



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 176 296 B1**

(51)

Int. Cl.

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

(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI  
 PATENDIKIRJELDUSE TÖLGE**

(10) Registreeringu number: <b>E006774</b>	(73) Patendiomanik: <b>Genentech, Inc.</b> 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990, US
(11) Patendikirjelduse tõlke number: <b>EE-EP 2 176 296</b>	(72) Leiutise autorid: <b>CHEN, Yvonne</b> 222 8th Avenue 320, San Mateo, CA 94401, US <b>DENNIS, Mark</b> 120 Plymouth Avenue, San Carlos, CA 94070, US <b>DORNAN, David</b> 1058 Shoreline Drive, San Mateo, CA 94404, US <b>ELKINS, Kristi</b> 524 Maple Avenue, South San Francisco, CA 94080-2944, US <b>JUNUTULA, Jagath, Reddy</b> 34391 Tupelo Street, Fremont, CA 94555, US <b>POLSON, Andrew</b> 281 Berkeley Way, San Francisco, CA 94115, US <b>ZHENG, Bing</b> 156 Montelena Court, Mountain View, CA 94040, US
(30) Prioriteediandmed: <b>16.07.2007</b> <b>US 950052 P</b>	
<b>31.01.2008</b> <b>US 25137</b>	
<b>29.02.2008</b> <b>US 32790</b>	
<b>20.05.2008</b> <b>US 54709</b>	
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: <b>15.07.2008</b>	
(96) Euroopa patendi-taotluse number: <b>08781859.7</b>	
(97) Euroopa patendi väljaand-misest teatamise kuupäev: <b>01.02.2012</b>	
(97) Euroopa patendi number: <b>EP 2 176 296</b>	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: <b>31.05.2012</b>	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: <b>15.08.2012</b>	
	(74) Patendivolinik: <b>Piret Niidas</b> <b>LASVET Patendibüroo OÜ</b> Suurtüki 4a, 10133 Tallinn, EE

(54) CD79b-vastased antikehad ja nende immunokonjugaadid ning nende kasutamismeetodid

**KIRJELDUS**

## LEIUTISE ALA

[0001] Käesolev leiutis on suunatud selle aine kompositsioonidele, mis on kasulikud imeta-jatel hematopoeetiliste kasvajate ravimiseks, ja nende kompositsioonide samaks otstarbeks kasutamise meetoditele.

## LEIUTISE EELDUS

[0002] Pahaloomulised kasvajad (vähid) on Ameerika Ühendriikides südamehaiguste järel teine juhtiv surma põhjus (Boring et al., CA Cancer J. Clin. 43:7 (1993)). Vähile on iseloomulik ebanormaalsete ehk neoplastiliste rakkude arvu kasv, mis on pärit normaalsest koest, mis prolifereruvad ja moodustavad kasvajamassi, nende neoplastiliste kasvajarakkude invasioon naaberkudedesse ja pahaloomuliste rakkude tekkimine, mis lõpptulemusena levi-vad vere või lümfisüsteemi kaudu regionaalsetesse lümfisõlmedesse ja kaugematesse kohta-desse metastaseerumiseks nimetatava protsessi abil. Vähiseisundis prolifererub rakk nendes tingimustes, milles normaalsed rakud ei kasvaks. Vähk avaldub paljudes erinevates vormides, mida iseloomustab invasiivsuse ja agressiivsuse erinev määr.

[0003] Vähke, milles osalevad rakud tekivad hematopoeesi – protsessi, mille abil tekivad vererakud, nagu lümfotsüüdid, leukotsüüdid, trombotsüüdid, erütrotsüüdid ja looduslikud tapjarakud – käigus, nimetatakse hematopoeetilistesks vähkideks. Lümfotsüüdid, mida leidub veres ja lümfikoes ja mis on otsustavad immuunvastuse jaoks, jaotatakse kahte klassi: B-lüm-fotsüüdid (B-rakud) ja T-lümfotsüüdid (T-rakud), mis vahendavad vastavalt humoraalset ja rakulist immuunsust.

[0004] B-rakud valmivad luuüdis ja ekspresseerivad luuüdist lahkumisel oma pinnal anti-geeni siduvat antikeha. Kui naiivne B-rakk esmakordselt kohtub antigeeni, mille suhtes tema membraanile seotud antikeha on spetsiifiline, hakkab rakk kiiresti jagunema ning tema järg-laskond diferentseerub B-mälurakkudeks ja efektorrakkudeks, mida nimetatakse plasmarak-kudeks. B-mälurakud on pikema elueaga ja jätkavad membraanile seotud antikeha ekspres-seerimist, mille spetsiifilisus on sama kui algsel eellasrakul. Plasmarakud ei tooda memb-raanile seotud antikeha, vaid toodavad selle asemel sellises vormis antikeha, mis saab sekre-teeruda. Sekreteeritud antikehad on humoraalse immuunsuse peamised efektormolekulid.

[0005] T-rakud valmivad tütümuses, mis on ebaküpsete T-rakkude polifereerumise ja diferentseerumise keskkond. T-raku valmimise käigus toimub T-rakus geenide ümberkorraldumine, mis annab tulemuseks T-raku retseptori ekspressiooni ning positiivse ja negatiivse selektsiooni, mis aitab määrata küpse T-raku rakupinna fenotüübi. Küpsete T-rakkude iseloomulikud pinnamarkerid on CD3 ja T-raku retseptori kompleksid ja üks kaasretseptoritest – kas CD4 või CD8.

[0006] Vähiraviks efektiivsete rakuliste sihtmärkide otsimisel on uurijad püüdnud identifitseerida membraani läbivaid või membraanidega muul viisil seondunud polüpeptiide, mis ekspresseeruvad spetsiifiliselt ühe või mitme konkreetse vähirakutüübi pinnal, võrreldes ühe või mitme normaalse mittevähirakuga. Sageli ekspresseeruvad sellised membraaniga seondunud polüpeptiidid vähirakkude pinnal ohtralt võrreldes mittevähirakkude pinnaga. Selliste kasvajaga seotud rakupinna antigeen-polüpeptiidide identifitseerimine on andnud võimaluse vähirakke spetsiifiliselt suunata nende hävitamiseks antikehapõhiste ravimenetluste abil. Selles suhtes märgitakse, et antikehapõhine ravi on teatud vähkide ravimisel osutunud väga efektiivseks. Näiteks HERCEPTIN® ja RITUXAN® (mõlemad firmast Genentech Inc., South San Francisco, California) on antikehad, mida on edukalt kasutatud vastavalt rinnavähi ja mitte-Hodgkini lümfoomi ravimiseks. Täpsemalt on HERCEPTIN® rekombinantse DNA meetodil loodud humaniseeritud monokloonne antikeha, mis seondub selektiivselt inimese proto-onkogeeni - epidermaalse kasvufaktori retseptori 2 (HER2) - rakuvälise domeeniga. HER2 valgu üleekspressiooni täheldatakse 25-30% primaarse rinnavähi juhtudel. RITUXAN® on geenitehnoloogiliselt loodud kimäärne hiire/inimese monokloonne antikeha, mis on suunatud CD20 antigeeni vastu, mida leidub normaalsete ja pahaloomuliste B-lümfotsüütide pinnal. Mõlemaid neid antikehi toodetakse rekombinantselt CHO rakkudes.

[0007] Muudel vähiraviks efektiivsete rakuliste sihtmärkide otsingutel on uurijad püüdnud identifitseerida (1) membraaniga mitteseotud polüpeptiide, mida toodab (toodavad) spetsiifiliselt üks või mitu vähiraku (vähirakkude) tüüp(i), võrreldes ühe või mitme konkreetse normaalse mittevähiraku tüübiga, (2) polüpeptiide, mida vähirakud toodavad ekspressioonitasemetel, mis on ühe või mitme mittevähiraku tüübi ekspressioonitasemetest oluliselt kõrgemad, või (3) polüpeptiide, mille ekspressioon on spetsiifiliselt piiratud ainult ühe (või väga piiratud arvu või erineva) koetüübiga nii vähi- kui mittevähiolekus (näiteks normaalse eesnäärme ja eesnäärmevähi koes). Sellised polüpeptiidid võivad jääda paiknema rakusiseselt või vähirakud võivad neid sekreteerida. Lisaks võivad neid polüpeptiide ekspresseerida mitte vähirakud

ise, vaid pigem rakud, mis toodavad ja/või sekreteerivad polüpeptiide, millel on vähirakkude toimimisvõimet tugevdav või nende kasvu võimendav toime. Sellised sekreteeritavad polüpeptiidid on sageli valgud, mis varustavad vähirakke kasvueelsetega võrreldes normaalsete rakkudega, ja siia kuuluvad sellised ained, nagu näiteks angiogeneesifaktorid, raku adhesioonifaktorid, kasvufaktorid jne. Selliste membraaniga mitteseotud polüpeptiidide antagonistide identifitseerimine loodetakse andvat efektiivsed terapeutilised vahendid nende vähkide ravimiseks. Lisaks on selliste polüpeptiidide ekspressioonimustrite identifitseerimine kasulik imetajatel esinevate konkreetsete vähkide diagnoosimiseks.

[0008] Vaatamata eespool määratletud edusammudele imetajate vähiravis püsib suur vajadus täiendavate terapeutiliste vahendite järele, mis oleksid suutelised vastavalt detekteerima kasvaja olemasolu imetajal ja neoplastiliste rakkude kasvu efektiivselt inhibeerima. Seega on käesoleva leiutise eesmärk identifitseerida polüpeptiidid – rakumembraaniga seotud, sekreteeritavad või rakusisesed polüpeptiidid – mille ekspressioon on spetsiifiliselt piiratud ainult ühe (või väga piiratud arvu või erineva) koetüübiga, hematopoeetiliste kudedega nii vähi- kui mittevähiolekus, ja neid kodeerivad nukleiinhapped, ning toota imetajate hematopoeetilise vähi terapeutiliseks raviks ja/või detekteerimiseks kasulike ainete kompositsioone.

[0009] CD79 on B-rakkude retseptori signaaliülekanne-komponent, mis koosneb kovalentselt seotud heterodimeerist, mis koosneb CD79a-st (Ig $\alpha$ , mb-1) ja CD79b-st (Ig $\beta$ , B29). Nii CD79a kui CD79b sisaldavad rakuvälist immunoglobuliini (Ig) domeeni, membraani läbivat domeeni ja rakusisest signaali ülekandedomeeni – immunoretseptori türosiinipõhist aktivatsioonimotiiviga (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) domeeni. CD79 ekspresseerub B-rakkudel ja mitte-Hodgkini lümfoomi rakkudel (NHS) ((Cabezudo et al., *Haematologica*, 84: 413-418 (1999); D'Arena et al., *Am. J. Hematol.*, 64: 275-281 (2000); Olejniczak et al., *Immunol. Invest.*, 35: 93-114 (2006)). CD79a, CD79b ja sIg on kõik vajalikud CD79 ekspresseerumiseks raku pinnal (Matsuuchi et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 13(3): 270-277 (2001)). CD79b keskmine ekspressioonitase NHL-de pinnal on normaalsete B-rakkude omaga sarnane, kuid varieerub suuremates piirides (Matsuuchi et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 13(3): 270-277 (2001)).

[0010] Arvestades CD79b ekspressiooni, on kasulik toota CD70b antigeeni vastaseid terapeutilisi antikehi, mis oleksid patsiendile manustamisel minimaalse antigeensusega või ei oleks antigeensed, eriti kroonilise ravi puhul. Käesolev leiutis rahuldab neid ja ka teisi vajadusi. Käesolev leiutis esitab CD79b-vastased antikehad, mis saavad jagu praeguste terapeu-

tiliste kompositsioonide piirangutest ja pakuvad täiendavaid eeliseid, mis tulevad ilmsiks alltoodud detailsest kirjeldusest. CD79b-vastased antikehad on avaldatud taotluses WO 01/71005 ning artiklites Polson et al., (2007), Blood 110(2): 616-623; Okazaki et al., (1993), Blood 81(1): 84-94.

[0011] Antikeha ja ravimi konjugaatide (*antibody-drug conjugates*, ADCC), st immunokonjugaatide kasutamine vähiravi puhul tsütotoksiliste või tsütostaatiliste ainete, st kasvajakude tapmiseks või inhibeerimiseks mõeldud ainete, lokaalseks kohaletoimetamiseks ((Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology, 5: 543-549; Wu et al., (2005) Nature Biotechnology, 23(9): 1137-1146; Payne, G. (2003) Cancer Cell, 3: 207-212; Syrigos, Epenetos (1999) Anticancer Research, 19: 605-614; Niculescu-Duvaz, Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev., 26: 151-172; US 4975278) võimaldab ravimi-osamolekuli kohaletoimetamist kasvajasse ja akumulereerumist selle rakkudes, samas kui nende konjugeerimata ravimainete süsteemne manustamine võib anda tulemuseks vastuvõetamatu toksilisuse taseme nii normaalsete rakkude kui kõrvaldamist vajavate kasvajakude jaoks (Baldwin et al., (1986) Lancet, (15. märts 1986) 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," teoses: Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al (toim.), 475-506). Püüded parendada terapeutilist indeksit, st ADC maksimaalset tõhusust ja minimaalset toksilisust, on keskendunud polükloonsete (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21: 183-87) ja monokloonsete antikehade (mAb) selektiivsusele, samuti ravimiga seondumise ja ravimi vabastamise probleemidele (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology, 5: 543-549). Antikeha ja ravimi konjugaatides kasutatavate ravimi-osamolekulide hulka kuuluvad bakteriaalsed valk-toksiinid, nagu difteeriatoksiin, taimsed valk-toksiinid, nagu ritsiin, väikesed molekulid, nagu auristatiinid, geldanamütsiin (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), maitansinoidid (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 8618-8623), kaliheamütsiin (Lode et al., (1998) Cancer Res., 58: 2928; Hinman et al., (1993) Cancer Res., 53: 3336-3342), daunomütsiin, doksorubitsiin, metotreksaat ja vindesiin (Rowland et al., (1986) *supra*). Ravimi-osamolekulid võivad mõjutada tsütotoksilisi ja tsütostaatilisi mehhanisme, kaasa arvatud tubuliini seondumine, DNA seondumine või topoisomeraasi inhibeerimine. Mõned tsütotoksilised ravimid kalduvad

olema mitteaktiivsed või vähem aktiivsed juhul, kui nad on konjugeeritud suurte antikehade või valguliste retseptoriligandidega.

[0012] Auristatiinpeptiide auristatiini E (AE) ja monometüülauristatiini (MMAE), mis on dolastatiini (WO 02/099172) sünteetilised analoogid, on konjugeeritud ravimi-osamolekulidena: (i) kimäärsete monokloonsete antikehadega cBR96 (mis on spetsiifilised kartsinoomidel oleva Lewis Y antigeeni suhtes), (ii) cAC10-ga, mis on spetsiifiline hematoloogilistel pahaloomulistel kasvajatel oleva CD30 suhtes (Klussman et al., (2004), *Bioconjugate Chemistry*, 15(4): 765-773; Doronina et al., (2003) *Nature Biotechnology*, 21(7): 778-784; Francisco et al., (2003) *Blood*, 102(4): 1458-1465; US 2004/0018194), (iii) CD20-vastaste antikehadega, nagu rituksaan (WO 04/032828), CD20 ekspresseerivate vähkide ja immuunhäirete ravimiseks, (iv) EphB2R-vasatse antikehaga 2H9 kolorektaalvähi ravimiseks (Mao et al., (2004) *Cancer Research*, 64(3): 781-788); (v) E-selektiini vastase antikehaga (Bhaskar et al., (2003) *Cancer Res.*, 63: 6387-6394); (vi) trastuzumab'iga (HERCEPTIN<sup>®</sup>, US 2005/0238649) ja (vi) CD30-vastaste antikehadega (WO 03/043583). Auristatiin E variandid on avaldatud US patentides 5767237 ja 6124431. Monokloonsete antikehadega konjugeeritud monometüülauristatiin E on avaldatud artiklis: Senter et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, kd 45, kokkuvõte nr. 623, esitatud 28. märtsil 2004. Auristatiini analooge MMAE ja MMAF on konjugeeritud erinevate antikehadega (US 2005/0238649).

[0013] Ravimi antikehale kinnitamise, st kovalentsete sidemete kaudu sidumise, tavapärased meetodid viivad üldiselt molekulide heterogeensele segule, kus ravimi-osamolekulid on kinnitunud antikehale paljudes kohtades. Näiteks on tsütotoksilised ravimid tavaliselt antikehadega konjugeeritud antikehal sageli suurel arvul esinevate lüsiinijääkide kaudu, mis tekitab heterogeense antikeha-ravimi konjugaatide segu. Sõltuvalt reaktsioonitingimustest on heterogeenes segus antikehaga seondunud tavaliselt 0 kuni umbes 8 või enam ravimi-osamolekuli. Lisaks on iga konkreetse täisarvulise ravimi-osamolekulide ja antikeha suhtega konjugaatide alarühm potentsiaalselt heterogeenne segu, kus ravimi-osamolekul on kinnitatud antikehale erinevates kohtades. Analüütilised ja preparatiivsed meetodid konjugeerimisreaktsiooni tulemusena saadud heterogeenses segus olevate antikeha-ravimikonjugaatide molekulide eraldamiseks ja iseloomustamiseks võivad olla ebaadekvaatsed. Antikehad on suured, kompleksed ja struktuuri poolest erinevad biomolekulid, mis sisaldavad sageli paljusid reageerimisvõimelisi funktsionaalrühmi. Nende reageerimisvõime linkerreagentide ja ravimi-linkeri vahe-

ühenditega sõltub sellistest teguritest nagu pH, kontsentratsioon, soola kontsentratsioon ja kaaslahustid. Lisaks võib mitmeetapiline konjugeerimisprotsess olla mittereprodutseeritav reaktsioonitingimustele raskendatud kontrollitavuse ning reagentide ja vaheühendite iseloomustamise raskendatuse tõttu.

[0014] Tsüsteiini tiolrühmad on neutraalse pH juures reageerimisvõimelised erinevalt enamikust amiinidest, mis on pH 7 lähedal protoonitud ja vähem nukleofiilsed. Kuna vabad tiolrühmad (RHS, sulfüdrüülrühmad) on suhteliselt aktiivsed, eksisteerivad tsüsteiinijääke sisaldavad valgud sageli oksüdeeritud vormis disulfiidide kaudu seotud oligomeeridena või sisaldavad disulfiidsildasid. Rakuvälised valgud üldiselt vabu tiolrühmi ei sisalda (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London, lk 55). Antikehade tsüsteiinijääkide tiolrühmad on üldiselt aktiivsemad, st elektrofiilsete konjugeerimisreagentide suhtes nukleofiilsemad kui antikeha amino- või hüdroksüülrühmad. Tsüsteiinijääke on valkudesse sisestatud geenitehnoloogia meetodite abil, et siduda neid kovalentselt ligandidega või moodustada uusi molekulisiseseid disulfiidsidemeid (Better et al., (1994) *J. Biol. Chem.*, 13: 9644-9650; Bernhard et al., (1994) *Bioconjugate Chem.*, 5: 126-132; Greenwood et al., (1994) *Therapeutic Immunology*, 1: 247-255; Tu et al., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 96: 4862-4867; Kanno et al., (2000) *J. of Biotechnology*, 76: 207-214; Chmura et al., (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 98(15): 8480-8484; US 6248564). Tsüsteiinijääkide tiolrühmade konstrueerimine erinevate valgu aminohappejääkide muteerimise abil tsüsteiinijääkideks on aga potentsiaalselt problemaatiline, eriti paardumata jääkide puhul (vaba Cys), või nende jääkide puhul, mis on reaktsiooniks või oksüdeerimiseks suhteliselt kättesaadavad. Kontsentreeritud valgulahustes, ükskõik kas *E. coli* periplasmas, raku kultuuri supernatandis või osaliselt või täielikult puhastatud valgu lahuses, võivad valgu pinnal olevad paardumata Cys-jäägid paarduda ja oksüdeeruda, moodustades molekulidevahelisi disulfiide ja seega valgu dimeere või multimeere. Disulfiid-dimeeri moodustumine muudab uue Cys rühma ravimi, ligandi või muu määrgisega konjugeerimiseks mitteaktiivseks. Veelgi enam – kui valk moodustab oksüdeerivalt uue rakusisese disulfiidsilla uue konstrueeritud Cys ja olemasoleva Cys-jäägi vahel, on mõlemad Cys tiolrühmad aktiivsaidis osalemiseks ja interaktsioonideks kättesaamatud. Lisaks võib valk muutuda mitteaktiivseks või mittespetsiifiliseks tertsiaarse struktuuri valesti voltumise või selle kadumise tõttu (Zhang et al., (2002) *Anal. Biochem.*, 311: 1-9).

[0015] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikehad on disainitud Fab-antikehafragmentidena (thioFab) ja ekspresseeritud täispikkade IgG monokloonsete (thioMab) antikehadena (Junutula, J. R. et al., (2008) J. Immunol. Methods, 332: 41-52; US 2007/0092940, mille sisu on siia liidetud viidetena). Antikeha ja ravimi konjugaatide (Thio ADC) valmistamiseks on ThioFab ja ThioMab antikehad konjugeeritud uute siseviidud tsüsteiinijääkide tiolrühmade juures olevate linkerite kaudu tioliga reageerivate linker-reagentide ja ravimi linker-reagentide abil.

## LEIUTISE KOKKUVÕTE

[0016] Leiutises esitatakse CD-79b-vastased antikehad või nende funktsionaalsed fragmendid ning nende kasutamise meetod hemotopoeetiliste kasvajate ravimiseks.

[0017] Ühes eripäras esitatakse leiutises antikeha, mis seondub, eelistatult spetsiifiliselt, ükskõik missugusele eespool või allpool kirjeldatud polüpeptiididest. Valikuliselt on antikeha monokloonne antikeha, antikehafragment, kaasa arvatud Fab, Fab', (F(ab')<sub>2</sub>) ja Fv fragment, diakeha, ühedomeeniline antikeha, kimäärne antikeha, humaniseeritud antikeha, üheahelaline antikeha või antikeha, mis konkureerivalt inhibeerib CD79b polüpeptiidi vastase antikeha seondumist vastavale antigeensele epitoobile. Käesoleva leiutisekohane antikehad võivad valikult olla konjugeeritud kasvu inhibeeriva aine või tsütotoksilise ainega nagu toksiin, kaasa arvatud näiteks auristatiin, maitansinoid, dolostatiini derivaat või kaliheamütsiin, antibiootikumi, radioaktiivse isotoobi, nukleolüütilise ensüümiga jne. Leiutisekohaseid antikehi võib valikuliselt toota CHO rakkudes või bakterirakkudes ning eelistatult kutsuda esile nende rakkude surma, millega nad seonduvad. Diagnostilistel eesmärkidel võib leiutisekohaseid antikehi detekteerivalt märgistada, kinnitada tahkele toesele, jne.

[0018] Ühes eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus antikeha monovalentne afiinsus (näiteks antikeha kui Fab fragmendi afiinsus CD79b suhtes) või antikeha bivalentse vormi afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha kui CD79b-vastase IgG fragmendi afiinsus) on praktiliselt samasugune või madalam või kõrgem kui vastavalt hiire antikeha monovalentne afiinsus või selle bivalentse vormi afiinsus (näiteks hiire antikeha kui Fab fragmendi või kui IgG fragmendi afiinsus CD79b suhtes) või kimäärse antikeha afiinsus (näiteks kimäärse antikeha kui Fab fragmendi või kui IgG fragmendi afiinsus CD79b suhtes), ja mis sisaldab joonistel 7A-B (SEQ ID NO: 10) ja joonistel 8A-B (SEQ ID NO: 14)



kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvate domeenide järjestusi või koosneb nendest või koosneb praktiliselt nendest.

[0019] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha kui IgG fragmendi afiinsus CD79b suhtes) on 0,4 nM, 0,2 nM või 0,5 nM.

[0020] Siin avaldatakse antikeha, mis seondub CD79b-ga, kus antikeha sisaldab vähemalt ühte, kahte, kolme, nelja, viit, kuut või seitset HRV, mis valitakse rühmast, millesse kuuluvad:

(i) HVR-L1, mis sisaldab järjestust A1-A15, kus A1-A15 on KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131)

(ii) HVR-L2, mis sisaldab järjestust B1-B7, kus B1-B7 on AASNLES (SEQ ID NO: 132)

(iii) HVR-L3, mis sisaldab järjestust C1-C9, kus C1-C9 on QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(iv) HVR-H1, mis sisaldab järjestust D1-D10, kus D1-D10 on GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(v) HVR-H2, mis sisaldab järjestust E1-E18, kus E1-E18 on GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135), ja

(vi) HVR-H3, mis sisaldab järjestust F1-F10, kus F1-F10 on TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136);

[0021] antikeha, mis seondub CD79b-ga, kus antikeha sisaldab vähemalt ühte HVR varianti, kus HVR variandi järjestus sisaldab vähemalt ühe jäägi modifikatsiooni järjestuses, mis on kujutatud kui SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 või 136;

[0022] antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab joonisel 15 kujutatud HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestusi (SEQ ID NO: 164-166);

[0023] antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab joonisel 15 kujutatud HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestusi (SEQ ID NO: 156-158);

[0024] antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab joonisel 16 kujutatud HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestusi (SEQ ID NO: 183-185);

[0025] antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab joonisel 16 kujutatud HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestusi (SEQ ID NO: 175-177).

[0026] Ühes eripäras esitatakse leiutises antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab joonisel 17 kujutatud HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestusi (SEQ ID NO: 202-204) ja/või järjestust SEQ ID NO: 207.

[0027] Ühes eripäras esitatakse leiutises antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab joonisel 17 kujutatud HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestusi (SEQ ID NO: 194-196) ja/või järjestust SEQ ID NO: 208.

[0028] Siin avaldatakse ka antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab joonisel 18 kujutatud HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HRV-HC järjestust;

[0029] antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab joonisel 18 kujutatud HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestusi (SEQ ID NO: 213-215);

[0030] CD79b-vastane antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis valitakse järjestuste SEQ ID NO: 170, 189, 208 või 227 hulgast; järgmises eripäras hõlmab leiutis CD79b-vastast antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis valitakse järjestuste SEQ ID NO: 169, 188, 207 või 226 hulgast;

[0031] tsüsteiinijääkidega konstrueeritud CD79b-vastast antikeha, mis sisaldab ühte või mitut vaba tsüsteiin-aminohapet ja järjestust, mis valitakse järjestuste SEQ ID NO: 251-298 hulgast; tsüsteiinijääkidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha võib seonduda CD79b polüpeptiidiga; tsüsteiinijääkidega konstrueeritud CD79b-vastast antikeha saab valmistada protsessi abil, mis hõlmab algses CD79b-vastases antikehas ühe või mitme aminohappejäägi asendamist tsüsteiini(de)ga;

[0032] tsüsteiinijääkidega konstrueeritud CD79b-vastast antikeha, mis sisaldab ühte või mitut vaba tsüsteiin-aminohapet, kus tsüsteiinijääkidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha seondub CD79b polüpeptiidiga ja see valmistatakse protsessi abil, mis hõlmab algses CD79b-vastases antikehas ühe või mitme aminohappejäägi asendamist tsüsteiini(de)ga, kus algne antikeha sisaldab vähemalt ühte HVR järjestust, mis valitakse järgnevatel hulgast:

(a) HVR-L1, mis sisaldab järjestust A1-A15, kus A1-A15 on KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131) või KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID NO: 137);

(b) HVR-L2, mis sisaldab järjestust B1-B7, kus B1-B7 on AASNLES (SEQ ID NO: 132);

(c) HVR-L3, mis sisaldab järjestust C1-C9, kus C1-C9 on QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133);

- (d) HVR-H1, mis sisaldab järjestust D1-D10, kus D1-D10 on GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134);
- (e) HVR-H2, mis sisaldab järjestust E1-E18, kus E1-E18 on GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135), ja
- (f) HVR-H3, mis sisaldab järjestust F1-F10, kus F1-F10 on TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136) või TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 138).

[0033] Tsüsteiniinjääkidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha võib olla monokloonne antikeha, antikehafragment, kimäärne antikeha, humaniseeritud antikeha, üheaheelaline antikeha või antikeha, mis inhibeerib konkureerivalt CD79b polüpeptiidi vastase antikeha seondumist vastavale antigeensele epitoobile. Käesoleva leiutisekohane antikehad võivad valikult olla konjugeeritud kasvu inhibeeriva aine või tsütotoksilise ainega nagu toksiin, kaasa arvatud näiteks auristatiin või maitansinoid. Käesoleva leiutise antikehi võib valikuliselt toota CHO rakkudes või bakterirakkudes ning eelistatult inhibeerida nende rakkude kasvu või proliferatsiooni, millega nad seonduvad, või esile kutsuda nende rakkude surma. Diagnostilisteks eesmärkideks võib käesoleva leiutise antikehi detekteeritavalt märgistada, kinnitada tahkele toesele jne.

[0034] Ühes eripäras esitatakse leiutises leiutisekohase antikeha valmistamismeetodid. Näiteks esitatakse leiutises CD79b-vastane antikeha (mis, nagu siin defineeritud, hõlmab täispikka antikeha ja selle fragmente) valmistamise meetodi, kus nimetatud meetod hõlmab nimetatud antikeha (või selle fragmenti) kodeeriva leiutisekohase rekombinantse vektori ekspresseerimist sobivates peremeesrakkudes ja nimetatud antikeha kättesaamist.

[0035] Ühes eripäras esitatakse leiutises farmatseutiline preparaat, mis sisaldab leiutisekohast antikeha või leiutisekohase antikeha ja ravimi konjugaati ning farmatseutiliselt vastuvõetavat lahjendit, kandjat või abiainet.

[0036] Ühes eripäras esitatakse leiutises tooteartikkel, mis hõlmab mahutit, ja mahutis sisalduvat kompositsiooni, kus kompositsioon sisaldab ühte või mitut leiutisekohast CD79b-vastast antikeha.

[0037] Ühes eripäras esitatakse leiutises komplekt, mis hõlmab esimest mahutit, mis sisaldab kompositsiooni, mis sisaldab ühte või mitut leiutisekohast CD79b-vastast antikeha, ja teist mahutit, mis sisaldab puhvrit.

[0038] Ühes eripäras esitatakse leiutises leiutisekohase CD79b-vastase antikeha kasutamine ravimi valmistamiseks haiguse, nagu vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire, terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks ravimiseks.

[0039] Ühes eripäras esitatakse leiutises leiutisekohase tooteartikli kasutamine ravimi valmistamiseks haiguse, nagu vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire, terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks ravimiseks.

[0040] Ühes eripäras esitatakse leiutises leiutisekohase komplekti kasutamine ravimi valmistamiseks haiguse, nagu vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire, terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks ravimiseks.

[0041] Ühes eripäras esitatakse leiutises CD79b ekspresseeriva raku kasvu inhibeerimise meetod, kus nimetatud meetod hõlmab nimetatud raku kokkupuutesse viimist leiutisekohase antikehaga, põhjustades sellega nimetatud raku kasvu inhibeerimise. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0042] Ühes eripäras esitatakse leiutises terapeutilise ravi meetod imetajale, kellel on vähk-kasvaja, mis sisaldab CD79b ekspresseerivaid rakke, kusjuures nimetatud meetod hõlmab nimetatud imetajale terapeutiliselt efektiivse koguse leiutisekohase antikeha manustamist, ravidel nii nimetatud imetajat efektiivselt. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0043] Ühes eripäras esitatakse leiutises CD79b suurenenud ekspressiooniga seotud raku proliferatsioonihäire ravimise või tõkestamise meetod, kusjuures nimetatud meetod hõlmab sellist ravi vajavale subjektile efektiivse koguse leiutisekohase antikeha manustamist, ravidel või tõkestades nii nimetatud rakuproliferatsioonihäiret efektiivselt. Ühes teostuses on nimetatud raku proliferatsioonihäire vähk. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0044] Ühes eripäras esitatakse leiutises raku kasvu inhibeerimise meetod, kus nimetatud raku kasv on vähemalt osaliselt sõltuv CD79b kasvu võimendavast toimest, kusjuures nimetatud meetod hõlmab nimetatud raku kokkupuutesse viimist efektiivse koguse leiutisekohase antikehaga, inhibeerides nii nimetatud raku kasvu. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0045] Ühes eripäras esitatakse leiutises imetajal esineva kasvaja terapeutilise ravi meetod, kus nimetatud kasvaja kasv on vähemalt osaliselt sõltuv CD79b kasvu võimendavast toimest,

kusjuures nimetatud meetod hõlmab nimetatud raku kokkupuutesse viimist efektiivse koguse leiutisekohase antikehaga, inhibeerides nii nimetatud kasvaja kasvu. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0046] Ühes eripäras esitatakse leiutises vähiravi meetod, mis hõlmab patsiendile farmatseutilise preparaadi manustamist, mis sisaldab siin kirjeldatud immunokonjugaati, vastuvõetavat lahjendit, kandjat või abiainet.

[0047] Ühes eripäras esitatakse leiutises B-raku proliferatsiooni inhibeerimise meetod, mis hõlmab raku eksponeerimist immunokonjugaadile, mis sisaldab leiutisekohast antikeha, tingimustes, mis võimaldavad immunokonjugaadi seondumist CD79b-ga.

[0048] Ühes eripäras esitatakse leiutises CD79b olemasolu määramise meetod proovis, milles kahtlustatakse CD79b sisaldumist, kusjuures nimetatud meetod hõlmab nimetatud proovi eksponeerimist leiutisekohasele antikehale ja nimetatud antikeha CD79b-ga seondumise määramist nimetatud proovis, kusjuures nimetatud antikeha seondumine CD79b-ga nimetatud proovis näitab nimetatud valguga olemasolu nimetatud proovis.

[0049] Ühes eripäras esitatakse leiutises raku proliferatsioonihäire, mis on seotud CD79b ekspresseerivate rakkude nagu B-rakud arvu suurenemisega, diagnoosimise meetod, kusjuures meetod hõlmab bioloogilises proovis sisalduvate testitavate rakkude kokkupuutesse viimist ükskõik missugusega eelnimetatud antikehadest, proovis olevate testitavate rakkudega seondunud antikehade taseme määramist antikeha CD79b-ga seondumise detekteerimise abil ning võrdlemist kontrollproovis olevate rakkudega seondunud antikehade tasemega, kusjuures seondunud antikehade tase normaliseeritakse CD79b ekspresseerivate rakkude arvule testitavas ja kontrollproovis ja kusjuures testitavas proovis seondunud antikehade kõrgem tase võrreldes kontrollprooviga näitab CD79b ekspresseerivate rakkudega seotud raku proliferatsioonihäire esinemist.

[0050] Ühes eripäras esitatakse leiutises veres või seerumis oleva lahustuva CD79b detekteerimise meetod, kusjuures meetod hõlmab imetajalt, keda kahtlustatakse kannatavat B-rakkude proliferatsioonihäire all, võetud testitava vere- või seerumiproovi kokkupuutesse viimist leiutisekohase CD79b-vastase antikehaga ja lahustuva CD79b suurenemise detekteerimist testitavas proovis võrreldes normaalselt imetajalt võetud vere või seerumi kontrollprooviga.

[0051] Ühes eripäras esitatakse leiutises leiutisekohase antikeha sidumise meetod CD79b ekspresseeriva rakuga, kusjuures nimetatud meetod hõlmab nimetatud raku kokkupuutesse

viimist leiutisekohase antikehaga. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

## JOONISTE LÜHIKIRJELDUS

[0052] Joonisel 1 on näidatud PRO36249 cDNA nukleotiidjärjestus (SEQ ID NO: 1), kus SEQ ID NO: 1 on kloon, mis siin on tähistatud kui „DNA225786“ (siin nimetatud ka kui „CD79b“). Nukleotiidjärjestus kodeerib CD79b, kusjuures start- ja stoppkoodon on rasvases kirjas ja alla joonitud.

[0053] Joonisel 2 on näidatud aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 2), mis on tuletatud joonisel 1 näidatud kodeerivast järjestusest SEQ ID NO: 1.

[0054] Joonisel 3 on näidatud CD79b-vastase hiire kimäärse antikeha (chMA79b) (MA79b on hiire monokloonne CD79b-vastane antikeha) IgG1 kerge ahela nukleotiidjärjestus (SEQ ID NO: 3). Nukleotiidjärjestus kodeerib chMA79b kergelt ahelat, kusjuures start- ja stoppkoodon on rasvases kirjas ja alla joonitud.

[0055] Joonisel 4 on näidatud joonisel 3 näidatud kodeerivast järjestusest SEQ ID NO: 3 tuletatud aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 4), milles puuduvad esimesed 18 signaaljärjestuse aminohapet. Varieeruvad piirkonnad on allajoonimata piirkonnad.

[0056] Joonisel 5 on näidatud CD79b-vastase hiire kimäärse antikeha (chMA79b) (MA79b on hiire monokloonne CD79b-vastane antikeha) IgG1 raske ahela nukleotiidjärjestus (SEQ ID NO: 5). Nukleotiidjärjestus kodeerib chMA79b rasket ahelat, kusjuures start- ja stoppkoodon on rasvases kirjas ja alla joonitud.

[0057] Joonisel 6 on näidatud joonisel 5 näidatud kodeerivast järjestusest SEQ ID NO: 5 tuletatud aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 6), milles puuduvad esimesed 18 signaaljärjestuse aminohapet ja stoppkoodonile eelnev viimane lüsiin (K). Varieeruvad piirkonnad on allajoonimata piirkonnad.

[0058] Joonistel 7A-B on näidatud järgnevate varieeruvate kergete ahelate järjestuste joonistus: inimese kerge ahela kappa I konsensusjärjestus (tähistatud kui „huKI“; SEQ ID NO: 9) koos VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3 ja VL-FR4 järjestustega (vastavalt SEQ ID NO: 139-142), hiire CD79b-vastane antikeha (tähistatud kui „MA79b“; SEQ ID NO: 10), MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha (tähistatud kui „huMA79b siirik“; SEQ ID NO: 11), MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 17 (tähistatud kui „huMA79b.v17“; SEQ ID NO:

169), MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 18 (tähistatud kui „huMA79b.v18; SEQ ID NO: 188), MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 28 (tähistatud kui „huMA79b.v28“; SEQ ID NO: 207) ja MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 32 (tähistatud kui „huMA79b.v32“; SEQ ID NO: 226). Asendid on nummerdatud Kabat'i järgi ning MA79b-lt varieeruvasse Kappa I konsensus-raamistikku siiratud hüpervarieeruvad piirkonnad (HVR) on raamiga ümbritsetud.

[0059] Joonistel 8A-B on näidatud järgnevate varieeruvate raskete ahelate järjestuste joondus: inimese raske ahela alarühma III konsensusjärjestus (tähistatud kui „humIII“; SEQ ID NO: 13) koos VH-FR1, VH-FR2, VH-FR3 ja VH-FR4 järjestustega (SEQ ID NO: 143-146), hiire CD79b-vastane antikeha (tähistatud kui „MA79b“; SEQ ID NO: 14), MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha (tähistatud kui „huMA79b siirik“; SEQ ID NO: 15) (mis sisaldab 71A, 73T ja 78A), MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 17 (tähistatud kui „huMA79b.v17“; SEQ ID NO: 170) (mis sisaldab 71A, 73T ja 78A), MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 18 (tähistatud kui „huMA79b.v18; SEQ ID NO: 189) (mis sisaldab 71A, 73T ja 78A), MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 28 (tähistatud kui „huMA79b.v28“; SEQ ID NO: 208) (mis sisaldab 71A, 73T ja 78A) ja MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 32 (tähistatud kui „huMA79b.v32“; SEQ ID NO: 227) (mis sisaldab 71A, 73T ja 78A). Asendid on nummerdatud Kabat'i järgi ning MA79b-lt varieeruvasse raske ahela alarühma III I konsensus-raamistikku siiratud hüpervarieeruvad piirkonnad (HVR) on raamiga ümbritsetud.

[0060] Joonisel 9 on näidatud valitud MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikehavariantide erinevad HVR järjestused (SEQ ID NO: 17-21), kus iga variant sisaldab MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha ühes HVR-s ühe aminohappe muutust (HVR-L1 (SEQ ID NO: 131); HVR-L2 (SEQ ID NO: 132); HVR-L3 (SEQ ID NO: 133)). Väljaspool näidatud aminohappemuutusi olid varieeruva kerge ahela ja varieeruva raske ahela järjestused identsed huMA79b siiriku järjestustega ja need ei ole näidatud. MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha HVR-H1 (SEQ ID NO: 134), HVR-H2 (SEQ ID NO: 135) või HVR-H3 (SEQ ID NO: 136) järjestustes muutusi ei täheldatud.

[0061] Joonisel 10 on näidatud valitud MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikehavariantide erinevad HVR järjestused (SEQ ID NO: 22-106), kaasa arvatud huMA79b L2-2 (siin nimetatud ka kui „L2“) ja huMA79b H3-10 (siin nimetatud ka kui „H3“), kus iga variant sisaldab MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha ühes HVR piirkonnas mitme aminohappe muu-

tust (HVR-L2 (SEQ ID NO: 132); HVR-L3 (SEQ ID NO: 133); HVR-H1 (SEQ ID NO: 134); osa HVR-H3 järjestusest (SEQ ID NO: 136) on näidatud joonisel 10 kui SEQ ID NO: 107). Väljaspool näidatud aminohappemuutusi olid varieeruva kerge ahela ja varieeruva raske ahela järjestused identsed huMA79b siiriku järjestustega ja need ei ole näidatud. MA79b-siiratud “humaniseeritud” antikeha HVR-L (SEQ ID NO: 131) või HVR-H2 (SEQ ID NO: 135) järjestustes muutusi ei täheldatud.

[0062] Joonisel 11 on näidatud valitud CD79b-vastaste antikehade, kaasa arvatud hiire CD79b antikeha (tähistatud kui „MA79b“), MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha (tähistatud kui „huMA79b siirik“) ja MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikehavariantide, kaasa arvatud 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) ja huMA79b L2/H3 (L2-2 ja H3-10 mutatsioonid on kirjeldatud allpool) Biacore analüüs määratud antigeenidega, kaasa arvatud inimese CD79b rakuvälise domeeniga (huCD79b<sub>ccc</sub>), inimese CD79b rakuvälise domeeniga, mis on liidetud Fc (huCD79b<sub>ecd</sub>- FC) ja 16 aminohapest koosneva peptiidiga, mis sisaldab epitoopi MA79b ja chMA79b (SEQ ID NO: 16) jaoks.

[0063] Joonisel 12 on näidatud valitud CD79b-vastaste antikehade, kaasa arvatud MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha (tähistatud kui „huMA79b siirik“) ja MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikehavariandid (tähistatud esimeses tulbas kui 1-34 või esimeses tulbas kui „kogu raamistik“), Biacore analüüs inimese CD79b rakuvälise domeeniga (huCD79b-edc antigeen). MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikehavariantide hulka kuulub ka „kogu raamistiku“ variant, kus potentsiaalselt tähtsad hiire raamistikujääd on olemas, ja variandid (tähistatud kui 1-34), kus raamistikumutatsioonid on kombineeritud või ei ole kombineeritud varieeruva kerge ahela ja varieeruva raske ahela HVR mutatsioonidega, nii nagu on tähistatud. MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 17 (siin viidatud kui „huMA79b.v17“) on esimeses tulbas tähistatud kui 17, MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 18 (siin viidatud kui „huMA79b.v18“) on esimeses tulbas tähistatud kui 18, MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 28 (siin viidatud kui „huMA79b.v28“) on esimeses tulbas tähistatud kui 28 ning MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 32 (siin viidatud kui „huMA79b.v32“) on esimeses tulbas tähistatud kui 32. Bivalentne sidumiskordus on näidatud kui konkreetse MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikehavariandi Kd (tähistatud kui „Kd<sub>variant</sub>“) / kimäärse MA79b antikeha (chMA79b) Kd (tähistatud kui



„ $K_{d_{\text{chimera}}}$ “); tulpade all olevad väärtused, mis on tähistatud kui „bivalentne sidumiskordus“ vastavad suhtele  $K_{d_{\text{variant}}}/K_{d_{\text{chimera}}}$ . Mittedetekteeritav sidumine on joonisel tähistatud kui „NDB“.

[0064] Joonistel 13A-B (varieeruvad raske ahela (VH) konsensusraamistikud) ja joonisel 14 (varieeruva kerge ahela (VL) konsensusraamistikud) on kujutatud inimese aktseptor-konsensusraamistike näidisjärjestused, mis on mõeldud käesolevas leiutises kasutamiseks, koos järgmiste järjestuse identifikaatoritega: ((joonised 13A-B) inimese VH alarühma I konsensusraamistik miinus Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 108), inimese VH alarühma I konsensusraamistik miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 109-111), inimese VH alarühma II konsensusraamistik miinus Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 112), inimese VH alarühma II konsensusraamistik miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 113-115), inimese VH alarühma III konsensusraamistik miinus Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 116), inimese VH alarühma III konsensusraamistik miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 117-119), inimese VH aktseptorraamistik miinus Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 120), inimese VH aktseptor-raamistik miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 121-122), inimese VH aktseptorraamistik 2 miinus Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 123) ja inimese VH aktseptorraamistik 2 miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 124-126) ning (joonis 14) inimese VL kappi alarühma I konsensusraamistik (SEQ ID NO: 127), inimese VL kappi alarühma II konsensusraamistik (SEQ ID NO: 128), inimese kappi alarühma III konsensusraamistik (SEQ ID NO: 129) ja inimese kappi alarühma IV konsensusraamistik (SEQ ID NO: 130).

[0065] Joonistel 15A (kerge ahel) ja 15B (raske ahel) on näidatud leiutisekohase antikeha (huMA79b.v17) aminohapete järjestused. Joonistel 15A (kerge ahel) ja 15B (raske ahel) on näidatud leiutisekohase antikeha ühe teostuse (huMA79b.v17) raamistiku (FR), hüpervarieeruva piirkonna (HVR), esimese konstantse domeeni (CL või CH1) ja Fc piirkonna (Fc) aminohapete järjestused (SEQ ID NO: 152-159) (joonis 15A) ja SEQ ID NO: 160-168 (joonis 15B)). huMA79b.v17 kerge ja raske ahela täispikad aminohapete järjestused (varieeruvad ja konstantsed piirkonnad) on näidatud vastavalt kui SEQ ID NO: 303 (joonis 15A) ja 304 (joonis 15B), kusjuures konstantsed domeenid on alla joonitud. Varieeruvate domeenide aminohapete järjestused on näidatud kui SEQ ID NO: 169 (joonis 15A kerge ahela jaoks) ja SEQ ID NO: 170 (joonis 15B raske ahela jaoks).

[0066] Joonistel 16A (kerge ahel) ja 16B (raske ahel) on näidatud leiutisekohase antikeha (huMA79b.v18) aminohapete järjestused. Joonistel 16A (kerge ahel) ja 16B (raske ahel) on näidatud leiutisekohase antikeha ühe teostuse (huMA79b.v18) raamistiku (FR), hüpervarieeruva piirkonna (HVR), esimese konstantse domeeni (CL või CH1) ja Fc piirkonna (Fc) aminohapete järjestused (SEQ ID NO: 171-178) (joonis 16A) ja SEQ ID NO: 179-187 (joonis 16B)). huMA79b.v18 kerge ja raske ahela täispikad aminohapete järjestused (varieeruvad ja konstantsed piirkonnad) on näidatud vastavalt kui SEQ ID NO: 305 (joonis 16A) ja 306 (joonis 16B), kusjuures konstantsed domeenid on alla joonitud. Varieeruvate domeenide aminohapete järjestused on näidatud kui SEQ ID NO: 188 (joonis 16A kerge ahela jaoks) ja SEQ ID NO: 189 (joonis 16B raske ahela jaoks).

[0067] Joonistel 17A (kerge ahel) ja 17B (raske ahel) on näidatud leiutisekohase antikeha (huMA79b.v28) aminohapete järjestused. Joonistel 17A (kerge ahel) ja 17B (raske ahel) on näidatud leiutisekohase antikeha ühe teostuse (huMA79b.v28) raamistiku (FR), hüpervarieeruva piirkonna (HVR), esimese konstantse domeeni (CL või CH1) ja Fc piirkonna (Fc) aminohapete järjestused (SEQ ID NO: 190-197) (joonis 17A) ja SEQ ID NO: 198-206 (joonis 17B)). huMA79b.v28 kerge ja raske ahela täispikad aminohapete järjestused (varieeruvad ja konstantsed piirkonnad) on näidatud vastavalt kui SEQ ID NO: 307 (joonis 17A) ja 308 (joonis 17B), kusjuures konstantsed domeenid on alla joonitud. Varieeruvate domeenide aminohapete järjestused on näidatud kui SEQ ID NO: 207 (joonised 7A-B kerge ahela jaoks) ja SEQ ID NO: 208 (joonised 8A-B raske ahela jaoks).

[0068] Joonistel 18A (kerge ahel) ja 18B (raske ahel) on näidatud leiutisekohase antikeha (huMA79b.v32) aminohapete järjestused. Joonistel 18A (kerge ahel) ja 18B (raske ahel) on näidatud leiutisekohase antikeha ühe teostuse (huMA79b.v32) raamistiku (FR), hüpervarieeruva piirkonna (HVR), esimese konstantse domeeni (CL või CH1) ja Fc piirkonna (Fc) aminohapete järjestused (SEQ ID NO: 209-216) (joonis 18A) ja SEQ ID NO: 217-225 (joonis 18B)). huMA79b.v32 kerge ja raske ahela täispikad aminohapete järjestused (varieeruvad ja konstantsed piirkonnad) on näidatud vastavalt kui SEQ ID NO: 309 (joonis 18A) ja 310 (joonis 18B), kusjuures konstantsed domeenid on alla joonitud. Varieeruvate domeenide aminohapete järjestused on näidatud kui SEQ ID NO: 1226 (joonis 18A kerge ahela jaoks) ja SEQ ID NO: 227 (joonis 18B raske ahela jaoks).

[0069] Joonisel 19 on näidatud inimese (SEQ ID NO: 2), makaagi (*cynomolgus monkey*, *cyno*) (SEQ ID NO: 7) ja hiire (SEQ ID NO: 8) CD79b aminohapete järjestuste joondus.

Inimese CD79b ja cyno-CD79b aminohapete järjestused on 85% identsed. Näidatud on signaaljärjestus, testitav peptiid (näites 1 kirjeldatud 11 aminohapest koosnev epitoop MA79b, chMA79b ja makaagi CD79b-vastase antikeha epitoobi jaoks: ARSEDRYRNPK (SEQ ID NO: 12)), membraani läbiv (*transmembrane*, TM) domeen ja immunoretseptori türosiini-põhine aktivatsioonimotiiv (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM). Raamiga ümbritsetud piirkond on CD79b piirkond, mis puudub CD789b splaissitud variandis (mida on kirjeldatud näites 1).

[0070] Joonisel 20 on BJAB-lutsiferaasi ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste antikehade manustamine ((a) chMA79b-SMCC-DM1, ravimikoormus oli umbes 2,9 (tabel 9) ja (b) huMA79b L2/H3-SMCC-DM1, ravimikoormus oli umbes 2,4 (tabel 9)) inimese B-raku kasvaja kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Kontrollina kasutati Herceptin<sup>®</sup> (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1).

[0071] Joonisel 21A on Granta-519 (inimese mantelrakkude lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste antikehade manustamine ((a) chMA79b-SMCC-DM1, ravimikoormus oli umbes 3,6 (tabel 10), (b) huMA79b.v17 L2/H3-SMCC-DM1, ravimikoormus oli umbes 3,4 (tabel 10), (c) huMA79b.v28-SMCC-DM1, ravimikoormus oli umbes 3,3 või 3,4 (tabel 10), (d) huMA79b.v18-SMCC-DM1, ravimikoormus oli umbes 3,4 (tabel 10) ja (e) huMA79b.v32-SMCC-DM1, ravimikoormus oli umbes 2,9 (tabel 10)) inimese B-raku kasvaja kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Kontrollina kasutati Herceptin<sup>®</sup> (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). Joonisel 21 on Granta-519 ksenograafi uuringus (joonis 21A ja tabel 10) kasutatud hiirte massi muutuse graafik, mis näitab, et esimese 7 uuringupäeva jooksul olulist massimuutust ei toimunud. „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha ja „ch“ tähistab kimäärset antikeha.

[0072] Joonisel 22 on näidatud tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha ja ravimi konjugaatide (ADC) kujutised, kus ravimi-osamolekul on kinnitatud lisatud tsüsteiinirühmale: kerges ahelas (LC-ADC), raskes ahelas (HC-ADC) ja Fc piirkonnas (Fc-ADC).

[0073] Joonisel 23 on näidatud järgmised etapid: (i) lisandunud tsüsteiini-disulfiidsidemete ning ahelatevaheliste ja ahelasiseste disulfiidide redutseerimine tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastases antikehas (ThioMab) redutseeriva ainega TCEP (tris(2-karboksüetüül)fosfiinhüdrokloriid); (ii) osaline oksüdeerimine, st taasoksüdeerimine, moodustamaks ahelate-

vahelisi ja ahelasiseseid disulfiidsidemeid dhAA-ga (dehüdroaskorbiinhape); ja (iii) taasoksideeritud antikeha konjugeerimine ravimi-linkeri vaheühendiga, moodustamaks tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha ja ravimi konjugaati (ADC).

[0074] Joonisel 24 on näidatud humaniseeritud ja tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha (thio-huMA79b.v17-HC-A118C) (A) kerge ahela järjestus (SEQ ID NO: 229) ja (B) raske ahela järjestus (SEQ ID NO: 228), kus raske ahela EU asendis 118 olev alaniin (alaniini järjestuseasend 118; Kabat'i asend 114) on muudetud tsüsteiiniks. Ravimi-osamolekuli võib kinnitada raskesse ahelasse konstrueeritud tsüsteiinirühmale. Kõigil joonistel on muudetud aminohape näidatud rasvase kirjaga ja kahekordselt alla joonitud. Ühekordsed allajoonimised näitavad konstantseid piirkondi. Varieeruvad piikonnad on need, mis ei ole alla joonitud. Fc piirkonnad on märgitud kaldkirjas. "Thio" tähendab tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha, samas kui "hu" tähendab humaniseeritud antikeha.

[0075] Joonisel 25 on näidatud humaniseeritud ja tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha (thio-huMA79b.v18-HC-A118C) (A) kerge ahela järjestus (SEQ ID NO: 231) ja (B) raske ahela järjestus (SEQ ID NO: 230), kus raske ahela EU asendis 118 olev alaniin (alaniini järjestuseasend 118; Kabat'i asend 114) on muudetud tsüsteiiniks. Ravimi-osamolekuli võib kinnitada raskesse ahelasse konstrueeritud tsüsteiinirühmale. Kõigil joonistel on muudetud aminohape näidatud rasvase kirjaga ja kahekordselt alla joonitud. Ühekordsed allajoonimised näitavad konstantseid piirkondi. Varieeruvad piikonnad on need, mis ei ole alla joonitud. Fc piirkonnad on märgitud kaldkirjas. "Thio" tähendab tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha, samas kui "hu" tähendab humaniseeritud antikeha.

[0076] Joonisel 26 on näidatud humaniseeritud ja tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha (thio-huMA79b.v28-HC-A118C) (A) kerge ahela järjestus (SEQ ID NO: 233) ja (B) raske ahela järjestus (SEQ ID NO: 232), kus raske ahela EU asendis 118 olev alaniin (alaniini järjestuseasend 118; Kabat'i asend 114) on muudetud tsüsteiiniks. Ravimi-osamolekuli võib kinnitada raskesse ahelasse konstrueeritud tsüsteiinirühmale. Kõigil joonistel on muudetud aminohape näidatud rasvase kirjaga ja kahekordselt alla joonitud. Ühekordsed allajoonimised näitavad konstantseid piirkondi. Varieeruvad piikonnad on need, mis ei ole alla joonitud. Fc piirkonnad on märgitud kaldkirjas. "Thio" tähendab tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha, samas kui "hu" tähendab humaniseeritud antikeha.

[0077] Joonisel 27 on näidatud humaniseeritud ja tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha (thio-MA79b-LC-V205C) (A) kerge ahela järjestus (SEQ ID NO: 235) ja (B)

raske ahela järjestus (SEQ ID NO: 234), kus kerge ahela Kabat'i asendis 205 olev valiin (valiini järjestuseasend 209) on muudetud tsüsteiiniks. Ravimi-osamolekuli võib kinnitada kergesse ahelasse konstrueeritud tsüsteiinirühmale. Kõigil joonistel on muudetud aminohape näidatud rasvase kirjaga ja kahekordselt alla joonitud. Ühekordsed allajoonimised näitavad konstantseid piirkondi. Varieeruvad piikonnad on need, mis ei ole alla joonitud. Fc piirkonnad on märgitud kaldkirjas. "Thio" tähendab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha.

[0078] Joonisel 28 on näidatud humaniseeritud ja tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha (thio-MA79b-HC-A118C) (A) kerge ahela järjestus (SEQ ID NO: 237) ja (B) raske ahela järjestus (SEQ ID NO: 236), kus raske ahela EU asendis 118 olevalaniin (alaniini järjestuseasend 118; Kabat'i asend 114) on muudetud tsüsteiiniks. Ravimi-osamolekuli võib kinnitada raskesse ahelasse konstrueeritud tsüsteiinirühmale. Kõigil joonistel on muudetud aminohape näidatud rasvase kirjaga ja kahekordselt alla joonitud. Ühekordsed allajoonimised näitavad konstantseid piirkondi. Varieeruvad piikonnad on need, mis ei ole alla joonitud. Fc piirkonnad on märgitud kaldkirjas. "Thio" tähendab tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha.

[0079] Joonistel 29A-B on FACS analüüsi graafikud, mis näitavad, et leiutisekohase CD79b-vastase thioMAb ja ravimi konjugaatide (TCD) seondumine BJAB-lutsiferaasi rakkudel ekspresseeruva CD79b-ga on ühesugune nii chMA79b (A) LC (V205C) thioMAb variantide kui (B) HC (A118C) thioMAb variantide ja MMAF konjugaatide puhul. Detekteerimiseks kasutati MS inimesevastast IgG-PE. "Thio" tähendab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha.

[0080] Joonistel 30A-D on FACS graafikud, mis näitavad, et leiutisekohase CD79b-vastase thioMAb ja ravimi konjugaatide (TDC) seondumine BJAB-lutsiferaasi rakkude pinnal ekspresseeruva CD79b-ga on ühesugune nii huMA79b.v18 (A) palja (konjugeerimata) HC (A118C) thioMAb variantide kui konjugeeritud HC (A118C) thioMAb variantide ja erinevate ravimite näidatud konjugaatide puhul ((B) MMAF, (C) MMAE ja (D) DM1). Detekteerimiseks kasutati MS inimesevastast IgG-PE. "Thio" tähendab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha.

[0081] Joonistel 31A-D on FACS graafikud, mis näitavad, et leiutisekohase CD79b-vastase thioMAb ja ravimi konjugaatide (TDC) seondumine BJAB-lutsiferaasi rakkude pinnal ekspresseeruva CD79b-ga on ühesugune nii huMA79b.v28 (A) palja (konjugeerimata) HC (A118C) thioMAb variantide kui konjugeeritud HC (A118C) thioMAb variantide ja erinevate ravimite näidatud konjugaatide puhul ((B) MMAE, (C) DM1 ja (D) MMAF). Detekteeri-

miseks kasutati MS inimesevastast IgG-PE. "Thio" tähendab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha.

[0082] Joonistel 32A-D on FACS graafikud, mis näitavad, et leiutisekohase makaagi CD79b vastase thioMAb ja ravimi konjugaatide (TDC) seondumine BJAB-lutsiferaasi rakkude pinnal ekspresseeruva makaagi CD79b-ga on ühesugune nii cynoCD79b-vastase (ch10D10) (A) palja (konjugeerimata) HC (A118C) thioMAb variantide kui konjugeeritud HC (A118C) thioMAb variantide ja erinevate ravimite näidatud konjugaatide puhul ((B) MMAE, (C) DM1 ja (D) MMAF). Detekteerimiseks kasutati MS inimesevastast IgG-PE. "Thio" tähendab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha.

[0083] Joonisel 33A on Granta-519 (inimese mantelrakkude lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste TCD-de manustamine, mis erinesid tsüsteiiniks modifitseeritud aminohappe asendi poolest (LC (V205C) või HC (A118C)) ja/või ravimiannuste poolest, inimese B-raku kasvajaid kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,9 (tabel 11), ja thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,8 (tabel 11), näitasid uuringu kestel kasvaja kasvu märkimisväärset inhibeerimist. Kontrollidena kasutati hu-anti-HER2-MC-MMAF ning thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF ja chMA79b-MC-MMAF. Joonisel 33B on Granta-519 ksenograafi uuringus (joonis 33A ja tabel 11) kasutatud hiirte massi protsendilise muutuse graafik, mis näitab, et esimese 14 uuringupäeva jooksul olulist massimuutust ei toimunud. "Thio" tähistab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha.

[0084] Joonisel 34A on BJAB-lutsiferaasi (Burkitt'i lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste TCD-de manustamine, mis olid konjugeeritud erinevate linkeri-ravimi-osamolekulidega (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 või MC-MMAF), inimese B-raku kasvajaid kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,87 (tabel 12), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,85 (tabel 12) ja thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAFga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,95 (tabel 12), näitasid uuringu kestel kasvaja kasvu märkimisväärset vähenemist. Kontrollide hulka kuulusid HER2-vastased kontrol-

lid (thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), huMA79b.v28 kontrollid (huMA79b.v28-SMCC-DM1 ja thio huMA79b.v28-HC(A118C)) ning CD22-vastased kontrollid (thio hu-anti-CD22(10F4v3)-HG(A118C)-MC-MMAF). Joonisel 34B on BJAB-lutsiferaasi ksenograafi uuringus (joonis 34A ja tabel 12) kasutatud hiirte massi protsendilise muutuse graafik, mis näitab, et esimese 7 uuringupäeva jooksul olulist massimuutust ei toimunud. "Thio" tähistab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha.

[0085] Joonisel 35A on WSU-DLCL2 (difuusse suurerakulise lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste TCD-de manustamine, mis olid konjugeeritud erinevate linkeri-ravimi-osamolekulidega (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 või MC-MMAF), inimese B-raku kasvaja kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,87 (tabel 13), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,85 (tabel 13), ja thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,95 (tabel 13), näitasid uuringu kestel kasvaja kasvu märkimisväärselt vähenemist. Kontrollide hulka kuulusid HER2-vastased kontrollid (thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), huMA79b.v28 kontrollid (huMA79b.v28-SMCC-DM1 ja thio huMA79b.v28-HC(A118C)) ning CD22-vastased kontrollid (thio hu-anti-CD22(10F4v3)-HG(A118C)-MC-MMAF). Joonisel 35B on WSU-DLCL2 ksenograafi uuringus (joonis 35A ja tabel 13) kasutatud hiirte massi protsendilise muutuse graafik, mis näitab, et esimese 7 uuringupäeva jooksul olulist massimuutust ei toimunud. "Thio" tähistab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha.

[0086] Joonisel 36 on DOHH2 (follikulaarse lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste TCD-de manustamine, mis olid konjugeeritud erinevate linkeri-ravimi-osamolekulidega (BMPEO-DM1, MC-MMAF või MCvcPAB-MMAE), inimese B-raku kasvaja kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Thio huMA79b.v28-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,85 (tabel 14), thio huMA79b.v28-MC-

MMAF-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,95 (tabel 14), ja thio MA79b-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,87 (tabel 14), näitasid uuringu kestel kasvaja kasvu märkimisväärset vähenemist. Kontrollide hulka kuulusid HER2-vastased kontrollid (thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), huMA79b.v28 kontrollid (huMA79b.v28-SMCC-DM1 ja thio huMA79b.v28-HC(A118C)) ning CD22-vastased kontrollid (thio hu-anti-CD22(10F4v3)-HG(A118C)-MC-MMAF). "Thio" tähistab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha.

[0087] Joonisel 37 on BJAB-lutsiferaasi (Burkitt'i lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste TCD-de manustamine, mis olid konjugeeritud erinevate linker-ravimi-osamolekulidega (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 või MC-MMAF), inimese B-raku kasvajaid kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,85 (tabel 15), thio MA79b-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,9 (tabel 15), või thio huMA79b.v28-MC-MMAF-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,9 (tabel 15), näitasid uuringu kestel kasvaja kasvu märkimisväärselt vähenemist. Kontrollide hulka kuulusid kandekeskond (ainult puhver), HER2-vastased kontrollid (thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), huMA79b.v28 kontrollid (huMA79b.v28-SMCC-DM1 ja thio huMA79b.v28-HC(A118C)) ning CD22-vastased kontrollid (thio hu-anti-CD22(10F4v3)-HG(A118C)-MC-MMAF). "Thio" tähistab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha.

[0088] Joonisel 38A on Granta-519 (inimese mantelrakkude lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste TCD-de manustamine, mis olid konjugeeritud erinevate linker-ravimi-osamolekulidega (BMPEO-DM1 või MC-MMAF), inimese B-raku kasvajaid kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,85 (tabel 16), ja thio MA79b-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,95 (tabel



16), näitasid uuringu kestel kasvaja kasvu märkimisväärset vähenemist. Kontrollide hulka kuulusid HER2-vastased kontrollid (thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF. Joonisel 38B on Granta-519 ksenograafi uuringus (joonis 38A ja tabel 16) kasutatud hiirte massi protsendilise muutuse graafik, mis näitab, et esimese 14 uuringupäeva jooksul olulist massimuutust ei toimunud. "Thio" tähistab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha.

[0089] Joonisel 39 on WSU-DLCL2 (difuusse suurerakulise lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste TCD-de manustamine, mis olid konjugeeritud erinevate linkeri-ravimi-osamolekulidega (BMPEO-DM1, MC-MMAF või MCvcPAB-MMAE), inimese B-raku kasvajaid kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,85 (tabel 17), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,9 (tabel 17), ja thio MA79b-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,9 (tabel 17), näitasid uuringu kestel kasvaja kasvu märkimisväärset vähenemist. Kontrollide hulka kuulusid kandeskeskkond (ainult puhver) ja HER2-vastased kontrollid (thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). "Thio" tähistab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha.

[0090] Joonisel 40 on Granta-519 (inimese mantelrakkude lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste TCD-de manustamine, mis olid konjugeeritud erinevate linkeri-ravimi-osamolekulidega (BMPEO-DM1 või MCvcPAB-MMAE), inimese B-raku kasvajaid kandvatele SCID hiirtele, inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,85 (tabel 18), ja thio MA79b-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,87 (tabel 18), näitasid uuringu kestel kasvaja kasvu märkimisväärset vähenemist. Kontrollide hulka kuulusid HER2-vastased kontrollid (thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE) "Thio" tähistab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha.

[0091] Joonisel 41 on näidatud *in vitro* raku proliferatsioonitesti tulemuste graafik (A) BJAB, (B) Granta-519 või (C) WSU-DLCL2 kasvajarakkude puhul, mida oli ravitud erinevate TDC kontsentratsioonidega – 0,01 kuni 10000 ng TCD/ml, kaasa arvatud: (1) thio hu anti-gD-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE kontroll, MMAE/Ab ravimikoormus 2,1, (2) thio hu anti-gD-HC(A118C)-MC-MMAF kontroll, MMAF/Ab ravimikoormus 2,1, (3) thio hu anti-gD-HC(A11-8C)-BMPEO-DM1 kontroll, DM1/Ab ravimikoormus 2,1, (4) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF, MMAF/Ab ravimikoormus 1,91, (5) thio huMA79b.v18-HC(A11BC)-BMPEO-DM1, DM1/Ab ravimikoormus 1,8, ja (6) thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, MMAE/Ab ravimikoormus 2,0. "Thio" tähistab tsüsteiini-dega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha. "gD" tähendab glükoproteiini D.

[0092] Joonisel 42 on näidatud PRO283627 cDNA nukleotiidjärjestus (SEQ ID NO: 238), kus SEQ ID NO: 235 on kloon, mida tähistatakse kui "DNA548455" (siin nimetatud ka kui "cyno CD79b"). See nukleotiidjärjestus kodeerib makaagi CD79b, kusjuures start- ja stoppkoodon on rasvases kirjas ja alla joonitud.

[0093] Joonisel 43 on näidatud joonisel 42 näidatud kodeerivast järjestusest SEQ ID NO: 235 tuletatud aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 239).

[0094] Joonisel 44 on näidatud makaagi CD79b-vastase antikeha (ch10D10) kerge ahela nukleotiidjärjestus (SEQ ID NO: 240). See nukleotiidjärjestus kodeerib makaagi CD79b-vastase antikeha (ch10D10) kerget ahelat, kusjuures start- ja stoppkoodonid on rasvases kirjas ja alla joonitud.

[0095] Joonisel 45 on näidatud joonisel 44 näidatud kodeerivast järjestusest SEQ ID NO: 240 tuletatud aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 241), milles puuduvad esimesed 18 signaaljärjestuse aminohapet. Varieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 302) on allajoonimata piirkonnad.

[0096] Joonisel 46 on näidatud makaagi CD79b-vastase antikeha (ch10D10) raske ahela nukleotiidjärjestus (SEQ ID NO: 242). Nukleotiidjärjestus kodeerib makaagi MA79b-vastase antikeha (ch10D10) rasket ahelat, kusjuures start- ja stoppkoodon on rasvases kirjas ja alla joonitud.

[0097] Joonisel 47 on näidatud joonisel 46 näidatud kodeerivast järjestusest SEQ ID NO: 242 tuletatud aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 243), milles puuduvad esimesed 18 signaal-

järjestuse aminohapet ja stoppkoodonile eelnev viimane lüsiin (K). Varieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 301) on allajoonimata piirkonnad.

[0098] Joonisel 48 on näidatud tsüsteiinide konstrueeritud CD79b-vastase makaagi antikeha (thio-anti-cynoCD79b-HC-A118C) (A) kerge ahela järjestus (SEQ ID NO: 245) ja (B) raske ahela järjestus (SEQ ID NO: 244), kus raske ahela EU asendis 118 olevalaniin (alaniini järjestuseasend 118; Kabat'i asend 114) on muudetud tsüsteiiniks. Raske ahela EU asendis 6 olev aminohape D (joonisel viirutatud) võib alternatiivselt olla E. Ravimi-osamolekuli võib kinnitada raskesse ahelasse konstrueeritud tsüsteiinirühmale. Kõigil joonistel on muudetud aminohape näidatud rasvase kirjaga ja kahekordselt alla joonitud. Ühekordsed allajoonimised näitavad konstantseid piirkondi. Varieeruvad piirkonnad on need, mis ei ole alla joonitud. Fc piirkonnad on märgitud kaldkirjas. "Thio" tähendab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha.

[0099] Joonisel 49 on näidatud tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase makaagi antikeha (thio-anti-cynoCD79b-LC-V205C) (A) kerge ahela järjestus (SEQ ID NO: 300) ja (B) raske ahela järjestus (SEQ ID NO: 299), kus kerge ahela Kabat'i asendis 205 olev valiin (valiini järjestuseasend 209) on muudetud tsüsteiiniks. Raske ahela EU asendis 6 olev aminohape D (joonisel viirutatud) võib alternatiivselt olla E. Ravimi-osamolekuli võib kinnitada raskesse ahelasse konstrueeritud tsüsteiinirühmale. Kõigil joonistel on muudetud aminohape näidatud rasvase kirjaga ja kahekordselt alla joonitud. Ühekordsed allajoonimised näitavad konstantseid piirkondi. Varieeruvad piirkonnad on need, mis ei ole alla joonitud. Fc piirkonnad on märgitud kaldkirjas. "Thio" tähendab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha.

[0100] Joonisel 50 on BJAB-cynoCD79b (cynoCD79b ekspresseerivate BJAB rakkudega) (Burkitt'i lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste TCD-de manustamine, mis olid konjugeeritud erinevate linker-ravimi-osamolekulidega (BMPEO-DM1, MC-MMAF või MCvcPAB-MMAE), inimese B-raku kasvaja kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,85 (tabel 19), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,9 (tabel 19), ja thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,9 (tabel 19), thio anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,8 (tabel 19), thio anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimi-

koormus oli umbes 1,9 (tabel 19), ja thio anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,86 (tabel 19), näitasid uuringu kestel kasvaja kasvu märkimisväärset vähenemist. Kontrollide hulka kuulusid HER2-vastased kontrollid (thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF). "Thio" tähistab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha.

[0101] Joonisel 51 on BJAB-cynoCD79b (cynoCD79b ekspresseerivate BJAB rakkudega) (Burkitt'i lümfoomi) ksenograafi mudelis saadud *in vivo* kasvaja kasvu inhibeerimise graafik, mis näitab, et CD79b-vastaste TCD-de näidatud erinevates annustes manustamine koos BMPEO-DM1 linkeri-ravimi-osamolekuliga inimese B-raku kasvaja kandvatele SCID hiirtele inhibeeris märkimisväärselt kasvaja kasvu. Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,85 (tabel 20), ja thio anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1-ga ravitud ksenograafi mudelid, kus ravimikoormus oli umbes 1,8 (tabel 20), näitasid uuringu kestel kasvaja kasvu märkimisväärselt vähenemist. Kontrollide hulka kuulusid HER2-vastased kontrollid (thio hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1), huMA79b.v28 kontrollid (thio huMA79b.v28-HC(A118C) ja cynoCD79b(ch10D10)-vastased kontrollid (thio anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)). "Thio" tähistab tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, samas kui „hu“ tähistab humaniseeritud antikeha.

#### EELISTATUD TEOSTUSTE DETAILNE KIRJELDUS

[0102] Leiutises esitatakse meetodid, kompositsioonid, komplektid ja tooteartiklid imetajatel hematopoeetiliste kasvajate ravimiseks kasulike kompositsioonide identifitseerimiseks ja nende kompositsioonide samal eesmärgil kasutamise meetodid.

[0103] Siin esitatakse nende meetodite, kompositsioonide, komplektide ja tooteartiklite detailid.

## I. Üldised meetodid

[0104] Käesoleva leiutise teostamisel kasutatakse, kui ei ole teisiti näidatud, tavapäraseid molekulaarbioloogia meetodeid (kaasa arvatud rekombinantsed meetodid), mikrobioloogia, rakubioloogia, biokeemia ja immunoloogia meetodeid, mis on tehnika asemest teada. Sellised meetodid on täielikult selgitatud kirjanduses, näiteks teostes "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", teine väljaanne (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (toim. M. J. Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (toim. R. I. Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (toim. F. M. Ausubel et al., 1987, ja selle perioodilised ajakohastamised); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (toim. Mullis et al., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

## II. Definiitsioonid

[0105] Selle kirjelduse interpreteerimise eesmärgil kohaldatakse järgmisi definiitsioone ning juhtudel, kus see on sobiv, hõlmavad ainsuses kasutatud terminid ka mitmust ja vastupidi. Juhul, kui ükskõik missugune esitatud definiitsioon satub vastuollu ükskõik missuguse siin viitena esitatud dokumendiga, on reguleerivaks allpool esitatud definiitsioon.

[0106] "B-raku pinnamarker" või "B-raku pinnaantigeen" on siin B-raku pinnal ekspresseeritud antigeen, mis saab olla sihtmärgiks temaga seonduvale antagonistile, kaasa arvatud, kuid nendega mitte piiratud, B-raku pinnaantigeeni või B-raku pinnaantigeeni lahustuva vormi vastased antikehad, mis on võimelised antagoniseerima looduslikult esineva B-raku antigeeni ligandi sidumist. B-raku pinnamarkerite näidete hulka kuuluvad 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 ja CD86 leukotsüütide pinnamarkerid (kirjeldusi vt.: The Leukocyte Antigen Facts Book, 2. väljaanne, 1997, toim. Barclay et al., Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Teiste B-raku pinnamarkerite hulka kuuluvad RP105, FcRH2, B-cell CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA I, FcRH6, BCMA ja 239287. Eritist huvi pakkuvad B-raku pinnamarkerid ekspresseeruvad eelistatult B-rakkudel võrreldes teiste, B-rakke mitte-

sisaldavate imetaja kudede, ning nad võivad ekspresseeruda nii eellas-B-rakkudel kui küpsetel B-rakkudel.

[0107] Termin "CD79b" tähendab siin kasutatuna ükskõik missuguse selgroogse organismi, kaasa arvatud imetajad, nagu primaadid (näiteks inimene, makaak (*cyno*) ja närilised (näiteks hiir ja rott), ükskõik missugust natiivset CD79b, kui ei ole teisiti näidatud. Inimese CD79b nimetatakse siin ka kui "PRO36249" (SEQ ID NO: 2) ja seda kodeerib nukleotiidjärjestus (SEQ ID NO: 1), mida siin nimetatakse ka kui "DNA225786". Makaagi CD79b nimetatakse siin ka kui "*cyno* CD79b" või "PRO283627" (SEQ ID NO: 239) ja seda kodeerib nukleotiidjärjestus (SEQ ID NO: 238), mida siin nimetatakse ka kui "DNA548455". Termin "CD79b" hõlmab nii "täispikka" töötlemata CD79b kui kõiki rakus toimuva töötlemise tulemusena saadavaid CD79b vorme. Termin hõlmab ka CD79b looduslikult esinevaid variante, näiteks splaissitud variante, alleelseid variante ja isovorme. Siin kirjeldatud CD79b polüpeptiide võib eraldada erinevatest allikatest, näiteks inimese koetüüpide või muudest allikatest, või siis valmistada rekombinantsete või sünteesimeetodite abil. "Natiivne CD79b polüpeptiidjärjestus" sisaldab polüpeptiidi, mille aminohapete järjestus on sama kui loodusest saadud vastav CD79b polüpeptiidjärjestus. Selliseid natiivseid CD79b polüpeptiidjärjestusi saab eraldada loodusest või toota rekombinantsete või sünteesimeetodite abil. Termin "natiivne CD79b polüpeptiidjärjestus" hõlmab spetsiifiliselt looduslikult esinevaid spetsiifilise CD79b polüpeptiidi kärbitud või sekreteeritavaid vorme (näiteks rakuvälise domeeni järjestust), looduslikult esinevaid variantvorme (näiteks alternatiivselt splaissitud vorme) ja looduslikult esinevaid polüpeptiidi alleelseid variante. Leiutise teatud teostustes on siin avaldatud CD79b natiivsed polüpeptiidjärjestused küpsed ehk täispikad natiivsed polüpeptiidjärjestused, mis sisaldavad täispikki aminohapete järjestusi, mis on näidatud kaasnevatel joonistel. Start- ja stoppkoodonid (kui need on näidatud) on joonistel näidatud rasvases kirjas ja alla joonitud. Kaasnevatel joonistel tähega "N" näidatud nukleinhappejäägid on ükskõik missugused nukleinhappejäägid. Kui aga kaasnevatel joonistel avaldatud CD79b polüpeptiidi on näidatud algavat metioniinjäägiga, mis siin joonistel on tähistatud aminohappeasendina 1, siis on mõeldav ja võimalik, et ka teisi metioniinjääke, mis paiknevad joonistel olevast aminohappeasendist 1 vastas- või pärisuunas, võib kasutada CD79b start-aminohappejääkidenä.

[0108] "MA79b" ehk "hiire CD79b antikeha" ehk "hiire CD79b-vastane antikeha" kasutatakse siin spetsiaalselt hiire CD79b-vastase monokloonse antikeha tähenduses, kus hiire CD79b-vastane monokloonne antikeha sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni järjestusega

SEQ ID NO: 10 (joonised 7A-B) ja raske ahela varieeruvat domeeni järjestusega SEQ ID NO: 14 (joonised 8A-B). Hiire CD79b-vastast monokloonset antikeha saab kaubanduslikest allikatest, nagu Biomeda (inimese CD79b-vastane antikeha; Foster City, CA), BD Bioscience (inimese CD79b-vastane antikeha; San Diego, CA) või Ancell (inimese CD79b-vastane antikeha; Bayport, MN), või toota Ameerika Rakutüüpide Kolleksioonis (American Type Culture Collection, ATCC) olevast hübriidomikloonist 3A2-2E7, mille deponeerimistähise number on HB11413 ja mis deponeeriti ATCC-sse 20. juunil 1993.

[0109] "chMA79b" ehk "kimääre MA79b antikeha" kasutatakse siin spetsiifiliselt inimese CD79b-vastase kimäärse antikeha tähenduses (nagu eelnevalt on kirjeldatud US patenditaotluses nr. 11/462336, mis esitati 3. augustil 2006), kus CD79b-vastane kimäärne antikeha sisaldab kerget ahelat järjestusega SEQ ID NO: 4 (joonis 4). Lisaks sisaldab kerge ahel järjestusega SEQ ID NO: 4 varieeruvat domeeni järjestusega SEQ ID NO: 10 (joonised 7A-B) ja inimese IgG1 kerge ahela konstantset domeeni. Lisaks sisaldab CD79b-vastane kimäärne antikeha rasket ahelat järjestusega SEQ ID NO: 6 (joonis 6). Lisaks sisaldab raske ahel järjestusega SEQ ID NO: 6 varieeruvat domeeni järjestusega SEQ ID NO: 14 (joonised 8A-B) ja inimese IgG1 raske ahela konstantset domeeni.

[0110] "Anti-cynoCD79b" või "anti cyno CD79b" kasutatakse siin, tähistamaks neid antikehi, mis seonduvad cyno CD79b-ga (SEQ ID NO: 239 joonisel 43) (nagu eelnevalt on kirjeldatud US patenditaotluses nr. 11/462336, mis esitati 3. augustil 2006). "Anti-cynoCD79b(ch10D10)" või "ch10D10" kasutatakse siin tähistavana kimäärset anti-cynoCD79b (nagu eelnevalt on kirjeldatud US patenditaotluses nr. 11/462336, mis esitati 3. augustil 2006), mis seondub cynoCD79b-ga (SEQ ID NO: 239 joonisel 43). Anti-cynoCD79b(ch10D10) ehk ch10D10 on cynoCD79b-vastane kimäärne antikeha, mis sisaldab kerget ahelat järjestusega SEQ ID NO: 241 (joonis 245). Lisaks sisaldab anti-cynoCD79b(ch10D10) ehk ch10D10 rasket ahelat järjestusega SEQ ID NO: 243 (joonis 47).

[0111] "MA79b-siirik" või "MA79b-siiratud humaniseeritud antikeha" või "huMA79b-siirik" kasutatakse siin, tähendamiseks spetsiifiliselt siirikut, mis on loodud hiire CD79b-vastase antikeha (MA79b) hüpervarieeruva piirkonna siirdamise abil inimese konsensus-VL-kapa (huKI) ja inimese alarühma III konsensus-VH (huIII) aktseptorpiirkondadesse, mis sisaldavad R71A, N73T ja L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992)) (vt näidet 1A ning jooniseid 7 (SEQ ID NO: 11) ja 8 (SEQ ID NO: 15)).

[0112] Aminohappejäägi/asendi "modifikatsioon" tähendab siin kasutatuna muutust primaar-ses aminohapete järjestuses, võrrelduna lähteaminohapete järjestusega, kus see muutus on nimetatud aminohapejäägi/asendit sisaldava järjestuse muutuse tulemuseks. Näiteks tüüpiline modifikatsioon hõlmab jäägi (või nimetatud asendis) asendamist teise aminohappega (st konservatiivne või mittekonserveeriv asendus), ühe või mitme (üldiselt vähem kui 5 või vähem kui 3) aminohappe insertiooni nimetatud jäägi/asendi kõrvale ning nimetatud jäägi/asendi deletsiooni. "Aminohappe asendus" või selle varieerimine tähendab eelnevalt määratud (lähte-)aminohapete järjestuses olemasoleva aminohapejäägi asendamist sellest erineva aminohapejäägiga. Üldiselt ja eelistatult annab modifikatsioon tulemuseks vähemalt ühe polüpeptiidivariandi füüsikalise-biokeemilise aktiivsuse muutuse võrreldes polüpeptiidiga, mis sisaldab lähte- (või "metsiktüüpi") aminohapete järjestust. Näiteks antikeha puhul võib muudetav füüsikalise-biokeemiline aktiivsus olla sidumisafiinsus, sidumisvõime ja/või sidumise toime sihtmolekulile.

[0113] Terminit "antikeha" kasutatakse kõige laiemas mõttes ja see katab spetsiifiliselt näiteks üksikuid CD79b-vastaseid monokloonseid antikehi (kaasa arvatud agonist-, antagonist-, neutraliseerivad antikehad, täispikad ehk intaktsed antikehad), mitme epitoobi suhtes spetsiifilisi CD79b-vastaste antikehade kompositsioone, polükloonseid antikehi, multivalentseid antikehi, multispetsiifilisi antikehi (näiteks bispetsiifilisi antikehi seni, kuni nad omavad soovitud bioloogilist aktiivsust), vähemalt kahest intaktsest antikehast moodustunud antikehi, üheaheelalisi CD79b-vastaseid antikehi ja CD79b-vastaste antikehade fragmente (vt. allpool), kaasa arvatud Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> ja Fv fragmendid, diakehi, ühe-domeenseid antikehi (sdAb) seni, kuni nad omavad soovitud bioloogilist või immunoloogilist aktiivsust. Terminit "immunoglobuliin" (Ig) kasutatakse siin vastastikku vahetatavana terminiga "antikeha". Antikeha võib olla inimese oma, humaniseeritud ja/või afiinselt valminud.

[0114] Termin "CD79b-vastane antikeha" või "antikeha, mis seondub CD79b-ga" tähendab antikeha, mis on suuteline seonduma CD79b-ga piisava afiinsusega, nii et antikeha oleks kasulik CD79b vastu suunatud diagnostilise ja/või terapeutilise vahendina. Eelistatult on CD79b-vastase antikeha seondumine CD79b-ga suguluses mitte oleva valguga alla 10% antikeha seondumisest CD79b-ga, mõõdetuna näiteks radioimmunotestis (*radioimmunoassay*, RIA). Teatud teostustes on CD79b-ga seonduva antikeha dissotsiatsioonikonstant (K<sub>d</sub>) ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM või ≤ 0,1 nM. Teatud teostustes seondub CD79b-vastane antikeha CD79b epitoobiga, mis erinevates liikides on konserveerunud.



[0115] „Eraldatud antikeha" on selline, mis on identifitseeritud ning eraldatud ja/või kätte saadud tema loodusliku keskkonna komponendist. Tema loodusliku keskkonna kontamineerivad komponendid on materjalid, mis häirivad antikeha diagnostilist või terapeutilist kasutamist, ning nende hulka võivad kuuluda ensüümid, hormoonid ning muud valgulised ja mittevalgulised lahustunud ained. Eelistatud teostustes puhastatakse antikeha (1) puhtuseni enam kui 95% (antikeha massi järgi), määratuna Lowry meetodi abil, ja kõige eelistatumalt puhtuseni üle 95% (massi järgi), (2) puhtusastmeni, mis on piisav vähemalt 15 jäägi pikkuse N-terminaalse või sisemise aminohapete järjestuse saamiseks pöörleva topsiga sekvenaatori kasutamisel, või (3) homogeensuseni, kasutades SDS-PAGE redutseerivates või mitteredutseerivates tingimustes värvi Coomassie blue või eelistatult hõbedaga värvimise abil. Eraldatud antikehade hulka kuuluvad ka rekombinantsetes rakkudes *in situ* olevad antikehad, kuna vähemalt üks antikeha loodusliku keskkonna komponent on puudu. Tavaliselt aga valmistatakse eraldatud antikeha vähemalt ühe puhastamisetapi abil.

[0116] 4-ahelalise antikeha põhiühik on heterotetrameerne glükoproteiin, mis koosneb kahest identsest kergest (*light*, L) ahelast ja kahest identsest raskest (*heavy*, H) ahelast (IgM antikeha koosneb 5 heterotetrameeri põhiühikust koos täiendava polüpeptiidiga, mida nimetatakse J-ahelaks, ja sisaldab seetõttu 5 antigeeni sidumissaiti, samas kui sekreteeritud IgA antikehad võivad polümeriseeruda, moodustades polüvalentseid kogumikke, mis sisaldavad 2-5 4-ahelalist põhiühikut koos J-ahelaga). IgG-de puhul on 4-ahelalise põhiühiku mass üldiselt umbes 150000 daltonit. Iga L-ahel on seotud H-ahelaga ühe kovalentse disulfiidsilla abil, samas kui kaks H-ahelat on teineteisega seotud ühe või mitme disulfiidsillaga, sõltuvalt H-ahela isotüübist. Iga H- ja L-ahel sisaldab ka regulaarse ruumipaigutusega ahelasiseseid disulfiidsildu. Kumbki H-ahel sisaldab N-terminuses varieeruvat domeeni ( $V_H$ ), millele järgnevad kolm konstantset domeeni ( $C_H$ ) nii  $\alpha$ - kui  $\gamma$ -ahela puhul ja neli  $C_H$  domeeni  $\mu$ - ja  $\varepsilon$ -isotüüpide puhul. Kumbki L-ahel sisaldab N-terminuses varieeruvat domeeni ( $V_L$ ), millele järgneb selle teises otsas konstantne domeen ( $C_L$ ).  $V_L$  joondub  $V_H$ -ga ja  $C_L$  joondub raske ahela esimese konstantse domeeniga ( $C_{H1}$ ). Arvatakse, et kerge ahela ja raske ahela varieeruvate domeenide vahelise piirpinna moodustavad konkreetseid aminohappejäägid.  $V_H$  ja  $V_L$  paardumised koos moodustavad ühe antigeeni sidumissaidi. Erinevate antikehaklasside struktuuri ja omadusi vt. näiteks: Basic and Clinical Immunology, 8. väljaanne, toim. Daniel P. Stites, Abba I. Terr ja Tristram G. Parslow, Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, lk. 71 ja ptk. 6.

[0117] Ükskõik missuguse selgroogse organismi L-ahela võib määrata kuuluvaks ühte kahest selgesti erinevast tüübist, mida nimetatakse kapa ja lambda ning mis põhinevad nende konstantsete domeenide aminohapete järjestustel. Raskete ahelate ( $C_H$ ) konstantsete domeenide aminohapete järjestustest sõltuvalt võib immunoglobuliinid määrata kuuluvateks erinevatesse klassidesse ehk isotüüpidesse. Immunoglobuliinid jaotatakse viide klassi: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM, ning nende raskeid ahelaid tähistatakse vastavalt kui  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ja  $\mu$ .  $\gamma$ - ja  $\alpha$ -klassid jaotatakse nende  $C_H$  järjestuste ja funktsiooni suhteliselt väikeste erinevuste järgi täiendavalt alamklassidesse, näiteks inimene ekspresseerib järgmisi alamklasse: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 ja IgA2.

[0118] Antikeha "varieeruv piirkond" või "varieeruv domeen" tähendab antikeha raske või kerge ahela aminotermiinaalseid domeene. Raske ahela varieeruvat domeeni võib nimetada kui "VH". Kerge ahela varieeruvat domeeni võib nimetada kui "VL". Need domeenid on üldiselt kõige varieeruvamad antikeha osad ja sisaldavad antigeeni sidumissaite.

[0119] Termin "varieeruv" tähendab asjaolu, et varieeruvate domeenide teatud segmendid on erinevates antikehades ulatuslikult erinevad. V-domeen vahendab antikeha seondumist ja defineerib konkreetse antikeha spetsiifilisuse tema konkreetse antigeeni suhtes. Varieeruvus ei jaotu aga varieeruvate domeenide 110 aminohappe ulatuses ühtlaselt. Selle asemel koosnevad V-piirkonnad suhteliselt invariantsetest 15-30 aminohappe pikkustest lõikudest, mida nimetatakse "raamistikupiirkondadeks" (*framework*, FR), mis on üksteisest eraldatud lühemate ülivarieeruvate piirkondadega, mida nimetatakse "hüpervarieeruvateks piirkondadeks" ja millest igäühe pikkus on 9-12 aminohapet. Nii natiivse raske ahela kui natiivse kerge ahela varieeruvad domeenid sisaldavad nelja FR, mis on suuresti võtnud  $\beta$ -lehe konfiguratsiooni ja mis on ühendatud kolme hüpervarieeruva piirkonna abil, mis moodustavad silmused, mis ühendavad  $\beta$ -lehe struktuure ja mõnel juhul moodustavad osa nendest struktuuridest. Iga ahela hüpervarieeruvad piirkonnad püsivad koos FR-de vahetus läheduses ning panustavad koos teise ahela hüpervarieeruvate piirkondadega antikeha antigeeni siduva saidi moodustumisse (vt. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Konstantsed domeenid ei osale otseselt antikeha seondumises antigeeniga, vaid täidavad mitmesuguseid efektorfunktsioone näiteks antikeha osalemises antikehast sõltuvas rakulises tsütotoksilisuses (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC).

[0120] "Intakne" antikeha on selline, mis sisaldab antigeeni sidumissaiti, samuti  $C_L$  ja vähemalt raske ahela konstantseid domeene  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  ja  $C_{H3}$ . Konstantsed domeenid võivad olla natiivse järjestuse konstantsed domeenid (näiteks inimese natiivse järjestuse konstantsed domeenid) või nende aminohapete järjestuste variandid. Eelistatult täidab intaktne antikeha ühte või mitut efektorfunktsiooni.

[0121] "Paljas antikeha" on siinsel eesmärgil antikeha, mis ei ole konjugeeritud tsütotoksilise osamolekuli või radioaktiivse märgisega.

[0122] „Antikehafragmendid“ sisaldavad osa intaktsest antikehast, eelistatult intaktse antikeha antigeeni siduvat või varieeruvat piirkonda. Antikehafragmentide näidete hulka kuuluvad Fab, Fab',  $F(ab')_2$  ja Fv fragmendid, diakehad, lineaarsed antikehad (vt. US patenti 5641870, näide 2; Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995)), üheaahelised antikehamolekulid ja antikehafragmentidest moodustunud multispetsiifilised antikehad. Ühes teostuses sisaldab antikehafragment intaktse antikeha antigeeni siduvat saiti ja säilitab seega antigeeni sidumise võime.

[0123] Antikehade ensümaatilise lõikamise papaiiniga annab kaks identset antigeeni siduvat fragmenti, mida nimetatakse "Fab" fragmentideks, ja järelejäänud "Fc" fragmenti, mille tähistus kajastab selle võimet kergesti kristalluda. Fab fragment koosneb täielikust L-ahelast koos H-ahela varieeruva piirkonna domeeni ( $V_H$ ) ja ühe raske ahela esimese konstantse domeeniga ( $C_{H1}$ ). Kõik Fab fragmendid on antigeeni sidumise suhtes monovalentsed, st neil on üks antigeeni sidumissait. Antikeha töötlemine pepsiiniga annab ühe suure  $F(ab')_2$  fragmenti, mis ligikaudselt vastab kahele disulfiidsidemega ühendatud Fab fragmentile, millel on bivalentne antigeeni siduv aktiivsus ja mis on ikka veel võimeline ristsideidama antigeeni. Fab' fragmendid erinevad Fab fragmentidest selle poolest, et nende  $C_{H1}$  domeeni karboksüterminuses on mõned täiendavad jäägid, kaasa arvatud üks või mitu antikeha hingepiirkonna tsüsteiinijääki. Fab'-SH tähistab siin Fab', mille konstantsete piirkondade tsüsteiinijääk (-jäägid) kannab (kannavad) vaba tiolrühma.  $F(ab')_2$  antikehafragmendid toodeti algselt Fab' fragmentide paaridena koos nendevaheliste hinge-tsüsteiinidega. Teada on ka teisi antikehafragmentide keemilisi sidestamise võimalusi.

[0124] Fc fragment sisaldab mõlema H-ahela karboksüterminaalseid osasid, mida hoiavad koos disulfiidsidemed. Antikehade efektorfunktsioonid on määratud Fc piirkonna järjestustega, kusjuures need piirkonnad on ka teatud rakutüüpides leiduvate Fc retseptorite (FcR) poolt äratuntav osa.

[0125] "Fv" on minimaalne antikehafragment, mis sisaldab antigeeni täielikku äratundmis- ja sidumissaiti. See fragment koosneb ühe raske ja ühe kerge ahela varieeruva piirkonna domeeniga tihedas mittekovalentses seoses olevast dimeerist. Üheaahelaliste Fv (*single-chain Fv*, scFv) molekulides võib ühe raske ahela ja ühe kerge ahela varieeruva domeeni kovalentselt siduda paindliku peptiidlinkeriga, nii et kerge ja raske ahel saavad ühineda "dimeerseks" struktuuriks analoogselt kaheaahelalistes Fv molekulides toimuvaga. Nende kahe domeeni voltumisest tuleneb kuus hüpervarieeruvat silmust (nii H kui L ahelast 3 silmust), mis panustavad oma aminohappejääke antigeeni sidumisse ja tagavad antikeha antigeeni sidumise spetsiifilisuse. Aga isegi üksik varieeruv domeen (või pool Fv-st, mis sisaldab ainult kolm antigeenispetsiifilist CDR-i) on võimeline antigeeni ära tundma ja sellega seonduma, ehkki madalama afiinsusega kui täielik sidumissait.

[0126] "Üheaahelaline Fv", mida lühendatakse ka kui "sFv" või "scFv", on antikehafragment, mis sisaldab  $V_H$  ja  $V_L$  antikehadomeene, mis on ühendatud ühte polüpeptiidahelasse. Eelistatult sisaldab sFv polüpeptiid lisaks  $V_H$  ja  $V_L$  domeenide vahelist polüpeptiidlinkerit, mis võimaldab sFv-l moodustada soovitud struktuuri antigeeni sidumiseks. Ülevaadet vt.: Pluckthun, teoses *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, kd. 113, toim. Rosenberg ja Moore, Springer-Verlag, New York, lk. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra*.

[0127] Termin "diakehad" tähendab kahe antigeeni siduva saidiga antikehafragmente, kus need fragmendid sisaldavad raske ahela varieeruvat domeeni ( $V_H$ ), mis on ühendatud kerge ahela varieeruva domeeniga ( $V_L$ ) samas polüpeptiidahelas ( $V_H$ - $V_L$ ). Väikesed antikehafragmendid valmistatakse sFv fragmentide konstrueerimise abil (vt. eelmist lõiku) koos  $V_H$  ja  $V_L$  domeenide vaheliste lühikeste linkeritega (umbes 5-10 jääki), nii et saavutatakse ahelatevaheline, kuid mitte ahelasisene V domeenide paardumine, mis annab tulemuseks bivalentse fragmendi, st fragmendi, mis sisaldab kahte antigeeni sidumissaiti. Diakehad võivad olla bivalentsed või bispetsiifilised. Bispetsiifilised diakehad on kahe "krossover" sFv fragmendi heterodimeerid, milles kahe antikeha  $V_H$  ja  $V_L$  domenid esinevad erinevatel polüpeptiidahelatel. Diakehasid on täielikumalt kirjeldatud näiteks patendis EP 404097; patenditaotluses WO 93/11161; artiklites Hudson et al., *Nat. Med.*, 9: 129-134 (2003); Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993). Triakehasid ja tetrakehasid on kirjeldatud ka artiklis: Hudson et al., *Nat. Med.*, 9: 129-134 (2003).

[0128] Termin „monokloonne antikeha“ tähendab siin kasutatuna antikeha, mis on saadud praktiliselt homogeensete antikehade populatsioonist, st populatsioonis sisalduvad indivi-

duaalsed antikehad on identsed, kuid nende hulgas võib vähesel hulgal esineda võimalikke looduslikult toimuvaid mutatsioone. Monokloonsed antikehad on väga spetsiifilised, olles suunatud ühe antigeeni vastu. Lisaks on iga monokloonne antikeha suunatud antigeeni ühe determinandi (epitooibi) vastu vastupidiselt polükloonsete antikehade preparaatidele, mis sisaldavad tüüpiliselt erinevate determinantide vastu suunatud erinevaid antikehi. Lisaks spetsiifilisusele on monokloonsed antikehad soodsad ka seetõttu, et neid saab sünteesida vabana teiste antikehade lisanditest. Modifikaator "monokloonne" ei ole mõeldud nõudvana antikeha tootmist mingil konkreetsel meetodil. Näiteks käesolevas leiutises võib kasulikke monokloonseid antikehi valmistada hübriidomitehnoloogia abil, mida esmakordselt kirjeldasid Kohler jt., *Nature*, 256: 495 (19759 või neid võib valmistada rekombinantse DNA meetodite kasutamisega bakterite, eukarüootsete loomade või taimede rakkudes (vt. näiteks US patenti nr. 4816567). "Monokloonseid antikehi" võib eraldada ka faagi antikeharaamatukogudest, kasutades näiteks tehnikaid, mida on kirjeldatud artiklites: Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

[0129] Monokloonsed antikehad hõlmavad siin spetsiifiliselt „kimäärseid“ antikehi, milles osa raskest ja/või kergest ahelast on identne või homoloogne vastava järjestusega nendes antikehades, mis pärinevad konkreetsest liigist või kuuluvad konkretsesse antikehade klassi või alaklassi, samas kui ülejäänud ahel(ad) on identne (identsed) või homoloogne (homoloogsed) vastavate järjestustega antikehades, mis pärinevad erinevatest liikidest või kuuluvad teise antikehade klassi või alaklassi, samuti nende antikehade fragmente seni, kuni neil on soovitud bioloogilised omadused (vt. US patenti nr. 4816567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Huvipakkuvate kimäärsete antikehade hulka kuuluvad siin "primatiseeritud" antikehad, mis sisaldavad varieeruva domeeni antigeeni siduvaid järjestusi, mis pärinevad inimesest erinevalt primaadilt (näiteks Vana Maaailma ahv, inimahv jt.), ja inimese konstantse piirkonna järjestusi.

[0130] Mitte-inimese (näiteks närilise) antikehade „humaniseeritud“ vormid on kimäärsed antikehad, mis sisaldavad minimaalset järjestust, mis pärineb mitte-inimese immunoglobuliinist. Suuremas osas on humaniseeritud antikehad inimese immunoglobuliinid (retsiipient-antikehad), milles retsiipiendi hüpervarieeruvast osast pärinevad jäägid on asendatud inimesest erineva liigi, nagu hiir, rott, küülik või inimesest erinev primaat, antikeha (doonor-antikeha), millel on soovitud spetsiifilisus, afiinsus ja tugevus, hüpervarieeruvast piirkonnast pärinevate jääkidega. Mõnel juhul on inimese immunoglobuliini raamistikupiirkonna

(*framework region*, FR) jäägid asendatud vastavate mitte-inimese järjestustega. Lisaks võivad humaniseeritud antikehad sisaldada jääke, mida ei esine retsipient-antikehas ega doonor-antikehas. Need modifikatsioonid tehakse antikeha toimimise täiendavaks parendamiseks. Üldiselt sisaldab humaniseeritud antikeha praktiliselt täielikult vähemalt ühte, tüüpiliselt kahte varieeruvat piirkonda, milles kõik või praktiliselt kõik hüpervarieeruvad lingud vastavad mitte-inimese immunoglobuliini omadele ja kõik või praktiliselt kõik FR-d on inimese immunoglobuliinjärjestuse FR-d. Humaniseeritud antikeha sisaldab valikuliselt ka vähemalt osa immunoglobuliini konstantsest piirkonnas (Fc), tüüpiliselt inimese immunoglobuliini omast. Lisadetaile vt. Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); ja Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). Vt. ka järgnevaid ülevaateartikleid ja nendes tsiteeritud viiteid: Vaswani ja Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.*, 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions*, 23: 1035-1038 (1995); Hurle, Gross, *Curr. Op. Biotech.*, 5: 428-433 (1994).

[0131] "Thio" tähendab siin antikeha suhtes kasutatuna tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha, samas kui "hu" tähendab siin antikeha suhtes kasutatuna humaniseeritud antikeha.

[0132] "Inimese antikeha" on see, mille aminohapete järjestus vastab selle antikeha omale, mida toodetakse inimese organismis ja/või mis on valmistatud ükskõik missugusel siin avaldatud inimese antikehade valmistamise meetodil. See inimese antikeha definitsioon välistab spetsiifiliselt humaniseeritud antikeha, mis sisaldab mitte-inimese antigeeni siduvaid jääke. Inimese antikehi võib toota erinevate tehnika tasemest tuntud meetodite abil, kaasa arvatud faagil kuvatavad raamatukogud, Hoogenboom, *Winter, J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). Samuti on inimese monokloonsete antikehade valmistamiseks saadaval meetodid, mida on kirjeldatud publikatsioonides: Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, lk. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991). Vt. ka: van Dijk, van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Inimese antikehi saab valmistada antigeeni manustamisel transgeensele loomale, keda on muundatud tootma selliseid antikehi vastusena antigeeniga stimuleerimisele, kuid kelle endogeensed lookused on blokeeritud, näiteks immuniseeritud ksenohiirele (XENOMOUSE™ tehnoloogia kohta vt. näiteks US patente nr. 6075181 ja 6150584). Inimese B-rakkude hübriidomitehnoloogia abil toodetud inimese antikehade kohta vt. ka näiteks: Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557-3562 (2006).

[0133] Terminid „hüpervarieeruv piirkond“, „HVR“ või „HV“ tähendavad siin kasutatuna antikeha varieeruva domeeni piirkondi, mis on järjestuse ja/või struktuuri poolest defineeritud lingude suhtes hüpervarieeruvad. Üldiselt sisaldavad antikehad kuut hüpervarieeruvat piirkonda: kolme VH-s (H1, H2 ja H3) ja kolme VL-s (L1, L2 ja L3). Kasutusel on palju hüpervarieeruva piirkonna täpseid kirjeldusi ja need on siin hõlmatud. Kabat'i komplementaarsust määravad piirkonnad (*Complementarity Determining Regions, CDR*) põhinevad järjestuse varieeruvusel ja on kõige tavalisemalt kasutatavad (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. väljaanne. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia viitab selle asemel struktuursete lingude paiknemisele (Chothia, Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987)). Chothia CDR-H1 lingu lõpp varieerub Kabat'i nummerdamissüsteemis vahemikus H32 kuni H34, sõltuvalt lingu pikkusest (see on nii sellepärast, et Kabat'i nummerdamissüsteem paneb H35A ja H35B vahele insertiooni, kui 35A ega 35B ei ole olemas, lõpeb ling 32 juures, kui ainult 35A on olemas, lõpeb ling 33 juures, kui nii 35A kui 35B on olemas, lõpeb ling 34 juures). AbM hüpervarieeruvad piirkonnad esindavad kompromissi Kabat'i CDR-de ja Chothia struktuursete lingude vahel ja neid kasutatakse firma Oxford Molecular Ltd. antikehade modelleerimise tarkvara AbM puhul. Hüpervarieeruvad „kontaktpiirkonnad“ põhinevad saadavate komplekside kristallstruktuuridel. Kõigi nende hüpervarieeruvate piirkondade jäägid on märgitud allpool.

Ling	Kabat	AbM	Chothia	Kontakt
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1, Kabat'i numeratsioon	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
H1, Chothia numeratsioon	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0134] Hüpervarieeruvad piirkonnad võivad sisaldada järgnevaid „laiendatud piirkondi“: 24-36 või 24-34 (L1), 46-56 või 49-56 või 50-56 või 52-56 (L2) ja 89-97 (L3) VL-s ning 26-35 (H1), 50-65 või 49-65 (H2) ja 93-102, 94-102 või 95-102 (H3) VH-s. Kõigi nende definitsioonide puhul on varieeruva domeeni jäägid nummerdatud Kabat'i jt., *supra*, järgi.

[0135] „Raamistiku“ ehk „FR“ jäägid on need varieeruva domeeni jäägid, mis ei ole siin defineeritud hüpervarieeruva piirkonna jäägid.

[0136] Termin "varieeruva domeeni jääkide nummerdamine Kabat'i järgi" või "aminohappeasendite nummerdamine Kabat'i järgi" ning selle variandid tähendavad nummerdamissüsteemi, mida kasutatakse raske ahela varieeruvate domeenide või kerge ahela varieeruvatele domeenidele antikehade kompüleerimisel teoses: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Selle nummerdamissüsteemi kasutamisel võib tegelik lineaarne aminohapete järjestus sisaldada vähem aminohappeid või täiendavaid aminohappeid, mis vastavad varieeruva domeeni FR või CDR lühendamisele või sellesse inserteerimisele. Näiteks võib raske ahela varieeruv domeen sisaldada H2 jäägi 52 järel ühe aminohappe inserti (Kabat'i järgi jääk 52a) ja raske ahela FR jäägi 82 järel mitut inserteeritud jääki (Kabat'i järgi näiteks jäägid 82a, 82b, 82c jne.). Kabat'i jääkide numeratsiooni antud antikehale võib määrata antikeha homoloogiapiirkondade joondamise abil Kabat'i järgi nummerdatud "standard"-järjestusega.

[0137] Kabat'i nummerdamissüsteemi kasutatakse üldiselt varieeruva domeeni jääkidele viitamiseks (kerge ahela jäägid umbes 1-107 ja raske ahela jäägid umbes 1-113) (näiteks Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). "EU nummerdamissüsteemi" ehk "EU registrit" (näiteks EU register, mis on avaldatud teoses: Kabat et al., *supra*) kasutatakse üldiselt immunoglobuliini raske ahela konstantse piirkonna jäägile viitamiseks. "EU register nagu Kabat'i teoses" tähendab inimese IgG1 EU antikeha jääkide nummerdamist. Kui siin ei ole teisiti väidetud, siis tähendavad viited antikehade varieeruva domeeni jääkide numbritele jääkide nummerdamist Kabat'i nummerdamissüsteemi järgi. Kui siin ei ole teisiti väidetud, siis tähendavad viited antikehade konstantse domeeni jääkide numbritele jääkide nummerdamist EU nummerdamissüsteemi järgi (vt. näiteks US esialgset patenditaotlust nr. 60/640323, joonised EU nummerdamise kohta).



[0138] „Afiinselt küpsenud“ antikeha on selline antikeha, mille ühes või mitmes HVR-s on üks või mitu muutust, mis annavad tulemuseks antikeha afiinsuse parenemise antigeeni suhtes võrreldes algse antikehaga, milles seda muutust (neid muutusi) ei ole. Eelistatud afiinselt küpsenud antikehadel on sihtmärk-antigeeni suhtes nanomolaarne või isegi pikomolaarne afiinsus. Afiinselt küpsenud antikehi toodetakse tehnika tasemest tuntud protseduuride abil. Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992), kirjeldavad afiinset küpsemist VH ja VL domeenide nihutamise abil. HVR ja/või raamistikujääkide juhuslikku mutageneesi on kirjeldanud 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); ja Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992).

[0139] „Blokeeriv“ antikeha või „antagonist“-antikeha on selline, mis inhibeerib või vähendab selle antigeeni bioloogilist aktiivsust, millega ta seondub. Eelistatud blokeerivad antikehad või antagonist-antikehad inhibeerivad antigeeni bioloogilist aktiivsust oluliselt või täielikult.

[0140] „Agonist-antikeha“ on siin kasutatuna selline antikeha, mis aimab järele vähemalt ühte huvialuse polüpeptiidi funktsionaalsetest aktiivsustest.

[0141] "Liigispetsiifiline antikeha", näiteks inimese IgE vastane imetaja antikeha, on selline antikeha, millel on esimese imetajaliigi antigeeni suhtes tugevam sidumisafiinsus kui selle antigeenihomoloogi vastu, mis on pärit teisest imetajaliigist. Tavaliselt "seondub" liigispetsiifiline antikeha "spetsiifiliselt" inimese antigeeniga (st sidumisafiinsuse (Kd) väärtus ei ole suurem kui  $1 \times 10^{-7}$  M, eelistatult mitte suurem kui  $1 \times 10^{-8}$  M, kõige eelistatumalt mitte suurem kui  $1 \times 10^{-9}$  M) ning tema sidumisafiinsus teisest, inimesest erinevast liigist pärit antigeenihomoloogi suhtes on vähemalt umbes 50 korda või vähemalt umbes 500 korda või vähemalt umbes 1000 korda nõrgem kui tema sidumisafiinsus inimese antigeeni suhtes. Liigispetsiifiline antikeha võib olla ükskõik missugust eespool defineeritud tüüpi antikeha, aga eelistatult on see humaniseeritud või inimese antikeha.

[0142] „Sidumisafiinsus“ tähendab üldiselt molekuli (näiteks antikeha) ühe sidumissaidi ja selle sidumispartneri (näiteks antigeeni) vaheliste mittekovalentsete interaktsioonide tugevuste kogusummat. Kui ei ole teisiti näidatud, tähendab „sidumisafiinsus“ siin kasutatuna tõelist sidumisafiinsust, mis peegeldab seonduva paari liikmete (näiteks antikeha ja antigeeni) vahelisi 1 : 1 interaktsioone. Molekuli X seondumise afiinsust partneriga Y saab üldiselt esitada dissotsiatsioonikonstandi (Kd) abil. Afiinsust saab mõõta tehnika tasemest tuntud tavaliste

meetodite abil, kaasa arvatud siin kirjeldatud meetodid. Üldiselt seovad madala afiinsusega antikehad antigeeni aeglaselt ja kalduvad kergesti dissotsieeruma, samas kui kõrge afiinsusega antikehad seovad antigeeni kiiremini ja jäävad kauem seotuks. Sidumisafiinsuse mõõtmiseks on tehnika tasemest teada palju erinevaid meetodeid, mida kõiki saab kasutada käesoleva leiutise eesmärkidel. Järgnevalt kirjeldatakse spetsiifilisi illustreerivaid teostusi.

[0143] "Või parem" tähendab siin sidumisafiinsuse kohta kasutatuna molekuli ja tema sidumispartneri tugevamat seondumist. "Või parem" tähendab siin kasutatuna tugevamat seondumist, mida näitab  $K_d$  väiksem numbriline väärtus. Näiteks antikeha, mille afiinsus antigeeni suhtes on "0,6 nM või parem", parem afiinsus antigeeni suhtes on  $< 0,6$ , st 0,59 nM, 0,57 nM jne. või ükskõik missugune väärtus, mis on väiksem kui 0,6 nM.

[0144] Ühes teostuses mõõdetakse sellele leiutisele vastavat „ $K_d$ “ või „ $K_d$  väärtust“ radioaktiivselt märgistatud antigeeni sidumistesti abil (RIA), mis viiakse läbi huvialuse antikeha Fab versiooni ja selle antigeeniga, nagu on kirjeldatud järgneva testi abil, kus mõõdetakse Fab-de antigeeniga seondumise afiinsust lahuses, tasakaalustades Fab minimaalses kontsentratsioonis ( $^{125}\text{I}$ )-märgistatud antigeeniga tiitritava märgistamata antigeeni seeriaste juuresolekul ja püüdes seejärel seondunud antigeeni Fab-vastase antikehaga kaetud plaadile (Chen et al., (1999) *J. Mol. Biol.*, 293: 865-881). Testi tingimuste määramiseks kaetakse mikrotiiterplaadid (Dynex) üle öö 5  $\mu\text{g/ml}$  Fab-vastase püüdur-antikehaga (Cappel Labs) 50 mM naatriumkarbonaadis (pH 9,6) ja blokeeritakse seejärel 2% (mass/maht) veise seerumi albumiini lahusega PBS-s kahe kuni viie tunni jooksul toatemperatuuril (umbes 23 °C). Mitteabsorberrival plaadil (Nunc # 269620) segatakse 100 pM või 26 pM [ $^{125}\text{I}$ ]-antigeeni seerialahjendustes huvialuse Fab-ga (näiteks kooskõlas VEGF-vastase antikeha Fab-12 hindamisega artiklis: Presta et al., (1997) *Cancer Res.*, 57: 4593-4599). Seejärel inkubeeritakse huvialust Fab-i üle öö, aga inkubeerimine võib kesta ka kauem (näiteks 65 tundi), et kindlustada tasakaalu saavumine. Siis kantakse segud üle püüdurplaadile inkubeerimiseks toatemperatuuril (näiteks tund aega). Seejärel eemaldatakse lahus ja plaate pestakse kaheksa korda 0,1% Tween-20 lahusega PBS-s. Kui plaadid on kuivanud, lisatakse süvendi kohta 150  $\mu\text{l}$  stsintillaatorit (MicroScint-20; Packard) ja plaate loendatakse kümme minutit Topcount gammaloenduris (Packard). Kõik Fab kontsentratsioonid, mis andsid 20% maksimaalsest seondumisest või alla selle, valitakse kasutamiseks konkureeriva sidumise testides. Teises teostuses mõõdetakse  $K_d$  või  $K_d$  väärtus pinnaplasmonresonantsi testide abil, kasutades BIAcore<sup>TM</sup>-2000 või BIAcore<sup>TM</sup>-3000 (BIAcore Inc., Piscataway, NJ) 25 °C juures immobiliseeritud antigeeni

CM5 kiipidega ~ 10 vastusühiku (*response units*, RU) juures. Lühidalt öeldes aktiveeritakse karboksümetüülitud dekstraanbiosensorkiibid (CM5, BIAcore Inc.) N-etüül-N<sup>3</sup>-(3-dimetüülaminopropüül)karbodiimiidhüdrokloriidi (EDC) ja N-hüdroksüsuktsiinimiidiga (NHS) vastavalt tarnija juhendile. Antigeen lahjendatakse 10 mM naatriumatsetaadiga, pH 4,8, kontsentratsioonini 5 µg/ml (~ 0,2 µM) enne süstimist kiirusel 5 µl/min, et saavutada umbes 10 sidestatud valgu vastusühikut (RU). Pärast antigeeni süstimist süstitakse reageerimata rühmade blokeerimiseks 1 M etanoolamiini. Kineetilisteks mõõtmisteks süstitakse Fab kahekordsed seerialahjendused (0,78 nM kuni 500 nM) PBS-s koos 0,05% Tween-20-ga (PBST) 25 °C juures voolukiirusel umbes 25 µl/min. Assotsiatsioonikiirused ( $k_{on}$ ) ja dissotsiatsioonikiirused ( $k_{off}$ ) arvutatakse, kasutades lihtsat Langmuiri üks-ühele seondumise mudelit (BIAcore hindamistarkvara versioon 3.2) assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonisensorprogrammide samaaegse sobitamise abil. Tasakaalulise dissotsiatsiooni konstant ( $K_d$ ) arvutatakse  $k_{off}/k_{on}$  suhtena, vt. näiteks Chen, Y. et al., (1999) J. Mol. Biol., 293: 865-881. Kui eeltoodud pinna-plasmonresonantsi testis assotsiatsioonikiirus ületab  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ , saab assotsiatsioonikiiruse määrata fluorestsentsi kustutamise tehnika abil, kus mõõdetakse 20 nM antigeenivastase anti-keha (Fab vormis) PBS-s, pH 7,2, lahuse fluorestsentskiirguse kasvamist või kahanemist (ergastus = 265 nm, kiirgus = 340 nm, 16 nm ribapääs) 25 °C juures kasvavates kontsentratsioonides antigeeni juuresolekul, kusjuures kontsentratsioone mõõdetakse spektromeetriga, näiteks *stop-flow* seadmega varustatud spektrofotomeetriga (Aviv Instruments) või seeria 8000 SLM-Aminco spektrofotomeetriga (ThermoSpectronics) segatavas küvetis.

[0145] Käesolevale leiutisele vastavat „assotsiatsioonikiirust“ või „ $k_{on}$ “ saab määrata sama eespool kirjeldatud pinna-plasmonresonantstechnika abil, kasutades BIAcore<sup>TM</sup>-2000 või BIAcore<sup>TM</sup>-3000 (BIAcore Inc., Piscataway, NJ).

[0146] Fraas "praktiliselt sarnane" või "praktiliselt sama" märgib siin kasutatuna piisavalt kõrget sarnasuse taset kahe numbrilise väärtuse vahel (millest üks on üldiselt seotud leiutisekohase anti-keha ja teine referents-/võrdlusantikehaga), nii et eriala asjatundja saab pidada kahe väärtuse erinevust nimetatud väärtuste (näiteks  $K_d$  väärtuste) abil mõõdetud bioloogiliste tunnuste kontekstis bioloogiliselt ja/või statistiliselt mitteoluliseks. Kahe nimetatud väärtuse erinevus funktsioonina referents-/võrdlusantikeha väärtusest on eelistatult väiksem kui umbes 50%, eelistatult väiksem kui umbes 40%, eelistatult väiksem kui umbes 30%, eelistatult väiksem kui umbes 20%, eelistatult väiksem kui umbes 10%.

[0147] Fraas „oluliselt vähenenud“ või „oluliselt erinev“ märgib siin kasutatuna piisavalt kõrget erinevuse taset kahe numbrilise väärtuse vahel (millest üks on üldiselt seotud leiutisekohase antikeha ja teine referents-/võrdlusantikehaga), nii et eriala asjatundja saab pidada kahe väärtuse erinevust nimetatud väärtuste (näiteks Kd väärtuste, HAMA vastuse) abil mõõdetud bioloogiliste tunnuste kontekstis statistiliselt oluliseks. Kahe nimetatud väärtuse erinevus funktsioonina referents-/võrdlusantikeha väärtusest on eelistatult suurem kui umbes 10%, eelistatult suurem kui umbes 20%, eelistatult suurem kui umbes 30%, eelistatult suurem kui umbes 40%, eelistatult suurem kui umbes 50%.

[0148] "Antigeen" on eelnevalt määratud antigeen, millega antikeha võib selektiivselt seonduda. Sihtmärk-antigeen võib olla polüpeptiid, süsivesik, nukleiinhape, lipiid, hapteen või mõni muu looduslikult esinev või sünteetiline ühend. Eelistatult on sihtmärk-antigeen polüpeptiid.

[0149] „Inimese aktseptorraamistik“ on siinsetel eesmärkidel raamistik, mis sisaldab inimese immunoglobuliiniraamistikust või inimese konsensusraamistikust pärinevat VL või VH raamistiku aminohapete järjestust. Inimese aktseptorraamistik, mis „pärib“ inimese immunoglobuliiniraamistikust või inimese konsensusraamistikust, võib sisaldada sellega samasugust aminohapete järjestust või võib sisaldada eelnevalt olemasolevaid aminohapete järjestuse muutusi. Kui eelnevalt on olemas aminohappemuutused, on neid eelistatult mitte enam kui 5, eelistatult 4 või vähem või eelistatult 3 või vähem. Kui eelnevalt olemasolevad aminohappemuutused esinevad VH-s, on neid muutusi eelistatult ainult kolmes, kahes või ühes asenditest 71H, 73H ja 78H, näiteks võivad nendes asendites olevad aminohapped olla 71A, 73T ja/või 78A. Ühes teostuses on inimese VL-aktseptorraamistiku konsensusjärjestus identne inimese immunoglobuliini VL raamistikujärjestuse või inimese raamistiku konsensusjärjestusega.

[0150] „Inimese konsensusraamistik“ on raamistik, mis vastab inimese immunoglobuliini VL või VH raamistikujärjestustes kõige tavalisematele valitud aminohappejääkidele. Üldiselt valitakse inimese immunoglobuliini VL või VH järjestused varieeruva domeeni järjestuste alarühmast. Üldiselt on järjestuste alarühm Kabat'i jt. alarühm. Ühes teostuses on VL alarühm Kabat'i jt. kapa I alarühm. Ühes teostuses on VH alarühm Kabat'i jt. alarühm III.

[0151] „VH alarühma III konsensusraamistik“ sisaldab Kabat'i jt. varieeruva raske ahela alarühma III aminohapete järjestustest saadud konsensusjärjestust. Ühes teostuses sisaldab VH alarühma III raamistiku konsensusjärjestus vähemalt osa või kõiki järgnevatest järjestus-

test: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143) - H1-WVRQAPGKG-LEWV (SEQ ID NO: 144) - H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 145) - H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 146).

[0152] „VL alarühma I konsensusraamistik“ sisaldab Kabat'i jt. varieeruva kerge ahela kapa alarühma I aminohapete järjestustest saadud konsensusjärjestust. Ühes teostuses sisaldab VL alarühma I raamistiku konsensusjärjestus vähemalt osa või kõiki järgnevatest järjestustest: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITG (SEQ ID NO: 139) - L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 140) - L2-GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 141) - L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 142).

[0153] „Inimese modifitseerimata raamistik“ on inimese raamistik, millel on sama aminohapete järjestus kui inimese aktseptorraamistikul, st et selles puudub (puuduvad) inimese aktseptorraamistiku järjestusse tehtud mitte-inimese järjestusele vastav(ad) aminohappeasendus(ed).

[0154] „Muudetud hüpervarieeruv piirkond“ on siinsetel eesmärkidel hüpervarieeruv piirkond, mis sisaldab ühte või mitut (näiteks ühte kuni 16) aminohappeasendust.

[155] „Modifitseerimata hüpervarieeruv piirkond“ on siinsetel eesmärkidel hüpervarieeruv piirkond, mis sisaldab samasugust aminohapete järjestust kui mitte-inimese antikeha, millest ta pärineb, st milles puudub üks või mitu aminohappeasendust.

[0156] Antikeha, "mis seondub" huvialuse antigeeniga, näiteks sihtmärgiks oleva kasvajaga seotud polüpeptiid-antigeeniga, on selline antikeha, mis seob antigeeni piisava afiinsusega, nii et antikeha on kasulik kui terapeutiline vahend suunamiseks antigeeni ekspresseeriva raku või koe vastu ja ei anna märkimisväärseid ristreaktsioone teiste valkudega. Sellistes teostustes on antikeha seondumise ulatus "mitte-sihtmärki"-valguga alla 10% antikeha seondumisest oma konkreetse sihtmärki valguga, määratuna läbivoolutsütomeetrilise (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) analüüsi või radioimmunosadestamise (RIA) meetodil. Antikeha seandumisel sihtmolekuliga tähendab termin "spetsiifiline sidumine" või "seondub spetsiifiliselt" või "on spetsiifiline" seandumist konkreetse polüpeptiidi või konkreetset sihtmärki-polüpeptiidil oleva epitoobiga, mis on mittespetsiifilisest interaktsioonist mõõdetavalt erinev. Spetsiifilist seandumist saab mõõta, määrates näiteks molekuli seandumise võrreldes kontrollmolekuli seandumisega, kus kontrollmolekul on üldiselt samasuguse struktuuriga molekul, kuid millel puudub sidumisaktiivsus. Näiteks saab spetsiifilist seandumist määrata konkureerimise abil sihtmärgiga sarnase kontrollmolekuliga näiteks märgistamata sihtmärgi

liia juuresolekul. Sel juhul on spetsiifiline sidumine näha, kui märgistamata sihtmärgi liig inhibeerib konkureerivalt märgistatud sihtmärgi seondumist sondiga. Konkreetse polüpeptiidi või konkreetsel sihtmärk-polüpeptiidil oleva epitoobi puhul võib terminit "spetsiifiline sidumine" või "seondub spetsiifiliselt" või "on spetsiifiline" kasutada siin molekuli puhul, mille Kd on sihtmärgi suhtes vähemalt umbes  $10^{-4}$  M, alternatiivselt vähemalt umbes  $10^{-5}$  M, alternatiivselt vähemalt umbes  $10^{-6}$  M, alternatiivselt vähemalt umbes  $10^{-7}$  M, alternatiivselt vähemalt umbes  $10^{-8}$  M, alternatiivselt vähemalt umbes  $10^{-9}$  M, alternatiivselt vähemalt umbes  $10^{-10}$  M, alternatiivselt vähemalt umbes  $10^{-11}$  M, alternatiivselt vähemalt umbes  $10^{-12}$  M või suurem. Ühes teostuses tähendab termin "spetsiifiline sidumine" sidumist, kus molekul seondub konkreetse polüpeptiidi või konkreetselt polüpeptiidil oleva epitoobiga, seondumata seejuures oluliselt ühegi teise polüpeptiidi või polüpeptiidil oleva epitoobiga.

[0157] Antikeha, mis "inhibeerib CD79b polüpeptiidi ekspresseerivate kasvajarakkude kasvu" ehk "kasvu inhibeeriv" antikeha on selline antikeha, mis annab tulemuseks asjakohast CD79b polüpeptiidi ekspresseerivate või üleekspresseerivate vähirakkude kasvu mõõdetava inhibeerimise. CD79b polüpeptiid võib olla vähiraku pinnal ekspresseeruv membraani läbiv polüpeptiid või see võib olla polüpeptiid, mis toodetakse ja sekreteeritakse vähiraku poolt. Eelistatud kasvu inhibeerivad CD79b-vastased antikehad inhibeerivad CD79b-ekspresseerivate kasvajarakkude kasvu enam kui 20%, eelistatult umbes 20% kuni 50%, veelgi eelistatumalt enam kui 50% (näiteks umbes 50% kuni 100%) võrreldes asjakohase kontrolliga, kusjuures kontrolliks on tavaliselt kasvajarakud, mida ei ole töödeldud testitava antikehaga. Ühes teostuses võib kasvu inhibeerimist mõõta rakukultuuris antikeha kontsentratsioonil umbes 0,1 kuni 30 µg/ml või umbes 0,5 nM kuni 200 nM, kusjuures kasvu inhibeerimine määratakse 1-10 päeva pärast vähirakkude antikehale eksponeerimist. Kasvajarakkude kasvu inhibeerimist *in vivo* võib määrata erinevatel viisidel, nagu allpool on kirjeldatud eksperimentaalsete näidete osas. Antikeha inhibeerib kasvu *in vivo* juhul, kui CD79b-vastase antikeha manustamine koguses umbes 1 µg/kg kuni 100 mg/kg kehamassi kohta annab tulemuseks kasvaja suuruse vähenemise või kasvajarakkude proliferatsiooni vähenemise 5 päeva kuni 3 kuu jooksul alates antikeha esimesest manustamisest, eelistatult umbes 5 kuni 30 päeva jooksul.

[0158] Antikeha, mis "indutseerib apoptoosi", on selline antikeha, mis kutsub esile programmeeritud rakusurma, määratuna anneksiin V seondumise, DNA fragmenteerumise, rakkude kokkutõmbumise, endoplasmaatilise retiikulumi paisumise, rakkude fragmenteerumise ja/või

membraanivesiikulite (mida nimetatakse apoptootilisteks kehadeks) moodustumise abil. Rakk on tavaliselt selline, mis ekspresseerib CD79b polüpeptiidi üle. Eelistatult on rakk kasvajarakk, näiteks hematopoeetiline rakk, nagu B-rakk, T-rakk, basofiil, eosinofiil, neutrofiil, monotsüüt, trombotsüüt või erütrotsüüt. Apoptoosiga seotud rakusündmuste hindamiseks on saadaval erinevaid meetodeid. Näiteks saab fosfatidüülseriini (PS) translokatsiooni mõõta aneksiini sidumise abil, DNA fragmenteerumist saab hinnata DNA redeli järgi ning tuuma/kromatiini kondenseerumist koos DNA fragmenteerumisega saab hinnata hüpodiploidsete rakkude arvu suurenemise järgi. Eelistatult on antikeha, mis indutseerib apoptoosi, selline antikeha, mis annab aneksiini sidumise testis tulemuseks umbes 2- kuni 50-kordse, eelistatult umbes 5- kuni 50-kordse ja kõige eelistatumalt umbes 10- kuni 50-kordse aneksiini sidumise induktsiooni võrreldes töötlemata rakkudega.

[0159] Antikeha, mis "indutseerib rakusurma", on selline antikeha, mis põhjustab eluvõimelise raku muutumist mitteeluvõimeliseks. Rakk on selline, mis ekspresseerib CD79b polüpeptiidi ja on sellist tüüpi rakk, mis ekspresseerib spetsiifiliselt või ekspresseerib üle CD79b polüpeptiidi. Rakk võib olla vähirakk või teatud tüüpi normaalne rakk. CD79b polüpeptiid võib olla vähiraku pinnal ekspresseeruv membraani läbiv polüpeptiid või see võib olla polüpeptiid, mis toodetakse ja sekreteeritakse vähiraku poolt. *In vitro* rakusurma saab määrata komplemendi ja efektor-immuunrakkude juuresolekuta, eristamaks antikeha-sõltuva rakkude poolt vahendatud tsütotoksilisuse (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) või komplemendi-sõltuva tsütotoksilisuse (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) poolt esile kutsutud rakusurma. Seega võib rakusurma testi läbi viia, kasutades kuumutamisega inaktiveeritud seerumit (st komplemendi juuresolekuta) efektor-immuunrakkude puudumisel. Et kindlaks teha, kas antikeha on võimeline indutseerima rakusurma, võib hinnata membraani terviklikkuse kadumist propiidiumjodiidi (PI), trüpaansinise (vt. Moore et al., *Cytotechnology*, 17: 1-1 (1995)) või 7AAD omastamise järgi võrreldes töötlemata rakkudega. Eelistatud rakusurma indutseerivad antikehad on need, mis indutseerivad PI omastamist BT474 rakkudes PI omastamistestis.

[0160] Antikeha "efektorfunktsioonid" tähendavad neid bioloogilisi aktiivsusi, mis on omistatavad antikeha Fc piirkonnale (natiivse järjestuse Fc piirkonnale või Fc piirkonna aminohapete järjestuse variandile) ja mis varieeruvad koos antikeha isotüübiga. Antikeha efektorfunktsioonide näidete hulka kuuluvad C1q sidumine ja komplemendi-sõltuv tsütotoksilisus, Fc retseptori sidumine, antikeha-sõltuv rakkude poolt vahendatud tsütotoksilisus (ADCC), fago-

tsütoos, rakupinna retseptorite (näiteks B-rakkude retseptorite) allareguleerimine ja B-rakkude aktiveerimine.

[0161] Terminit "Fc piirkond" kasutatakse siin immunoglobuliini raske ahela C-terminaalse piirkonna, kaasa arvatud natiivse järjestuse Fc piirkonnad ja Fc piirkondade variandid, defineerimiseks. Ehkki immunoglobuliini raske ahela Fc piirkonna piirid võivad varieeruda, defineeritakse inimese IgG raske ahela Fc piirkond tavaliselt lõiguna aminohappejäägist asendis Cys223 või jäägist Pro230 selle karboksüterminuseni. Fc piirkonna C-terminaalse lüsiini (EU nummerdamissüsteemi järgi jääk 447) võib eemaldada näiteks antikeha tootmise või puhastamise käigus või antikeha rasket ahelat kodeeriva nukleiinhappe rekombinantse töötlemise käigus. Seega võib intaktsete antikehade kompositsioon sisaldada antikehade populatsiooni, kus kõik K447 jäägid on eemaldatud, antikehade populatsiooni, kus K447 jäägid ei ole eemaldatud, ja antikehade populatsiooni, mis on K447 sisaldavate ja mittesisaldavate antikehade segu.

[0162] "Funktsionaalsel Fc piirkonnal" on natiivse järjestuse Fc piirkonna "efektorfunktsioon". "Efektorfunktsioonide" näidete hulka kuuluvad C1q sidumine, CDC, Fc retseptori sidumine, ADCC, fagotsütoos, rakupinna retseptorite (näiteks B-rakkude retseptorite, BRC) sidumine jne. Sellised efektorfunktsioonid nõuavad üldiselt Fc piirkonna ühendamist sidumisdomeeniga (näiteks antikeha varieeruva domeeniga) ja neid võib hinnata erinevate testide, näiteks siin definitsioonides avaldatud testide abil.

[0163] "Natiivse järjestusega Fc piirkond" sisaldab looduses leiduva Fc piirkonna aminohapete järjestusega identset aminohapete järjestust. Inimese natiivse järjestusega Fc piirkondade hulka kuuluvad inimese IgG1 Fc piirkonna natiivne järjestus (mitte-A ja A allotüübid); inimese IgG2 Fc piirkonna natiivne järjestus, inimese IgG3 Fc piirkonna natiivne järjestus ja inimese IgG4 Fc piirkonna natiivne järjestus, samuti nende looduslikult esinevad variandid.

[0164] "Fc piirkonna variant" sisaldab aminohapete järjestust, mis erineb Fc piirkonna natiivsest järjestusest vähemalt ühe aminohappe modifikatsiooni poolest, eelistatult ühe või mitme aminohappeasenduse poolest. Eelistatult sisaldab Fc piirkonna variant vähemalt ühte aminohappeasendust võrreldes Fc piirkonna natiivse järjestuse või algse polüpeptiidi Fc piirkonna järjestusega, näiteks umbes ühte kuni kümnet aminohappeasendust, eelistatult umbes ühte kuni viit aminohappeasendust Fc piirkonna natiivses järjestuses või algse polüpeptiidi Fc piirkonnas. Seega on Fc piirkonna variant eelistatult vähemalt umbes 80% homoloogne Fc



piirkonna natiivse järjestusega ja/või algse polüpeptiidi Fc piirkonnaga, eelistatumalt nendega vähemalt umbes 90% homoloogne, veelgi eelistatumalt vähemalt umbes 95% homoloogne.

[0165] „Antikeha-sõltuv rakkude poolt vahendatud tsütotoksilisus (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)“ ehk „ADCC“ tähendab tsütotoksilisuse vormi, kus sekreteeritud Ig, mis on seondunud teatud tsütotoksilistel rakkudel (näiteks looduslikel tapjarakkudel (*Natural Killer*, NK), neutrofiilidel ja makrofaagidel) olevatele Fc retseptoritele (FcR), võimaldab neil tsütotoksilistel efektorrakkudel spetsiaalselt seonduda antigeeni kandvatele sihtrakkudele ja seejärel sihtraku tsütotoksiinidega tappa. Selliseks tapmiseks on tsütotoksiliste rakkude „relvastamine“ antikehadega absoluutselt vajalik. ADCC vahendavad primaarrakud, NK rakud, ekspresseerivad ainult FcγRIII, samas kui monotsüüdid ekspresseerivad FcγRI, FcγRII ja FcγRIII. FcR ekspresseerumine hematopoeetilistel rakkudel on kokku võetud artiklis: Ravetch, Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-92 (1991), 464, tabelis 3. Huvialuse molekuli ADCC aktiivsuse hindamiseks võib läbi viia *in vitro* ADCC testi, näiteks selle, mida on kirjeldatud US patentides nr. 5500362 või 5821337. Sellisteks testideks kasulike efektorrakkude hulka kuuluvad perifeerse vere mononukleaarsed rakud (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) ja looduslikud tapjarakud (MK rakud). Alternatiivselt või täiendavalt võib huvialuse molekuli ADCC aktiivsust hinnata *in vivo*, näiteks loomamudelis, nagu selles, mida on kirjeldanud Clynes et al. (USA) 95: 652-656 (1998).

[0166] „Fc retseptor“ ehk „FcR“ kirjeldab retseptorit, mis seondub antikeha Fc piirkonnaga. Eelistatud FcR on inimese FcR natiivne järjestus. Lisaks seob eelistatud FcR IgG antikeha (gamma-retseptori) ja hõlmab FcγRI, FcγRII ja FcγRIII alamklasside retseptoreid, kaasa arvatud nende retseptorite alleelsed variandid ja alternatiivselt splaissitud vormid. FcγRII retseptorite hulka kuuluvad FcγRIIA („aktiveeriv retseptor“) ja FcγRIIB („inhibeeriv retseptor“), mille aminohapete järjestused on sarnased, kuid mis erinevad eelkõige oma tsütoplasmaatiliste domeenide poolest. Aktiveeriv retseptor FcγRIIA sisaldab tsütoplasmaatilises domeenis immunoretseptori türosiinipõhist aktivatsioonimotiivi (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM). Inhibeeriv retseptor FcγRIIB sisaldab tsütoplasmaatilises domeenis immunoretseptori türosiinipõhist inhibitsioonimotiivi (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*, ITIM) (vt. ülevaadet: M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 203-234 (1997)). FcR-de kohta on ülevaadet: Ravetch, Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-492 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4: 25-34 (1994); de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126: 330-41 (1995). Termin „FcR“ hõlmab siin ka teisi FcR-e, kaasa arvatud need, mida

võidakse identifitseerida tulevikus. See termin hõlmab ka neonataalset retseptorit FcRn, mis vastutab ema IgG-de ülekandmise eest lootele (Guyer et al., J. Immunol., 117: 587 (1976) ja Kim et al., J. Immunol., 24: 249 (1994)).

[0167] Seondumist inimese FcRn-ga *in vivo* ja inimese FcRn kõrge afiinsusega siduvate polüpeptiidide poolväärtusaega seerumis võib testida näiteks transgeensetes hiirtes või inimese transfekteeritud rakuliinidel, mis ekspresseerivad inimese FcRn, või primaatidel, kellele on manustatud Fc piirkonna varianti sisaldavaid polüpeptide. WO 2000/42072 (Presta) kirjeldab parenenud või vähenenud FcRn sidumisega antikehavariante, vt. ka näiteks Shields et al., J. Biol. Chem., 9(2): 6591-6604 (20019).

[0168] „Inimese efektorrakud“ on leukotsüüdid, mis ekspresseerivad ühte või mitut FcR ja teostavad efektorfunktsioone. Eelistatult ekspresseerivad need rakud vähemalt FcγRIII ja teostavad ADCC efektorfunktsiooni. ADCC vahendavate inimese leukotsüütide hulka kuuluvad perifeerse vere mononukleaarsed rakud (PBMC), looduslikud tapjarakud (NK rakud), monotsüüdid, tsütotoksilised T-rakud ja neutrofiilid, kusjuures eelistatud on PBMC ja NK rakud. Efektorrakke saab eraldada looduslikust allikast, näiteks verest.

[0169] „Komplementi-sõltuv tsütotoksilisus“ ehk „CDC (*complement dependent cytotoxicity*)“ tähendab sihtraku lüüsi komplemendi juuresolekul. Klassikalise komplemendi-*raja* aktivatsioon käivitatakse komplemendisüsteemi (C1q) esimese komponendi sidumisel (sobiva alamklassi) antikehadega, mis seotakse oma sugulas-antigeeniga. Komplemendi aktiveerumise hindamiseks võib läbi viia CDC testi, näiteks selle, mida on kirjeldanud Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996). Muudetud Fc piirkonna aminohapete järjestustega Fc variante sisaldavaid polüpeptiidivariante (Fc variandiga polüpeptide) ning suurenenud või vähenenud C1q sidumisvõimega polüpeptiidivariante on kirjeldatud näiteks US patendis nr. 6194551 B1 ja taotluses WO 1999/51642, vt. ka näiteks Idusogie et al. J. Immunol., 164: 4178-4184 (2000).

[0170] Termin „Fc piirkonda sisaldav antikeha“ tähendab antikeha, mis sisaldab Fc piirkonda. Fc piirkonna C-terminaalse lüsiini (EU nummerdamissüsteemi järgi jääk 447) võib eemaldada näiteks antikeha puhastamise või antikeha kodeeriva nukleiinhappe rekombinantse töötlemise käigus. Seega võib leiutisekohast Fc piirkonda sisaldava antikeha kompositsioon sisaldada K447-ga antikeha, eemaldatud K447-ga antikeha või nii K447-ga kui selleta antikehade segu.

[0171] CD79b polüpeptiidi „rakuväline domeen“ ehk EDC (*extracellular domain*)“ tähendab CD79b polüpeptiidi vormi, mis on praktiliselt vaba membraani läbivast ja tsütoplasmaatilisest domeenist. Tavaliselt sisaldab CD79b polüpeptiidi EDC vähem kui 1% membraani läbivat ja/või tsütoplasmaatilist domeeni, eelistatult vähem kui 0,5%. On mõistetav, et kõik käesoleva leiutise CD79b polüpeptiidide jaoks identifitseeritud membraani läbivad domeenid identifitseeritakse kriteeriumide alusel, mida tavapäraselt kasutatakse seda tüüpi hüdrofoobsete domeenide identifitseerimiseks. Membraani läbiva domeeni täpsed piirid võivad varieeruda, aga kõige tõenäolisemalt mitte enam kui 5 aminohappe poolest domeeni mõlemas otsas, nii nagu siin on algselt identifitseeritud. Seetõttu võib CD79b polüpeptiidi rakuväline domeen sisaldada mõlemal pool membraani läbiva domeeni / rakuvälise domeeni piiri mõlemal pool umbes 5 või vähem aminohapet, nagu on identifitseeritud näidetes või kirjelduses, ning käesolevas leiutises peetakse silmas selliseid polüpeptiide koos nendega seotud signaaljärjestustega või nendeta.

[0172] Siin avaldatud CD79b polüpeptiidi „signaalpeptiidide“ ligikaudne paiknemine võib olla näidatud käesolevas kirjelduses ja/või kaasnevatel joonistel. Tuleb aga märkida, et signaalpeptiidi C-terminaalne piir võib varieeruda, kuid kõige tõenäolisemalt mitte enam kui 5 aminohappe poolest mõlemal pool signaalpeptiidi C-terminaalset piiri, nagu siin oli algselt identifitseeritud, kusjuures signaalpeptiidi C-terminaalse piiri võib identifitseerida kriteeriumide alusel, mida tavapäraselt kasutatakse seda tüüpi aminohapete järjestuse elementide identifitseerimiseks (näiteks Nielsen et al., *Prot. Eng.*, 10: 1-6 (1997); von Heinje et al., *Nucl. Acids. Res.*, 14: 4683-4690 (1986)). Lisaks on teada, et mõnedel juhtudel ei ole signaalpeptiidi sekreteeritavast polüpeptiidist lahtilõikamine ühtlane, mis annab tulemuseks enam kui ühe sekreteeritava molekuli. Käesolevas leiutises peetakse silmas neid küpseid polüpeptiide, kus signaalpeptiid lõigatakse lahti mitte kaugemal kui umbes 5 aminohappe ulatuses mõlemal pool signaalpeptiidi C-terminaalset piiri, nagu siin on identifitseeritud, ning neid kodeerivaid polünukleotiide.

[0173] „CD79b polüpeptiidi variant“ tähendab CD79b polüpeptiidi, eelistatult siin defineeritud aktiivset CD79b polüpeptiidi, mis on aminohapete järjestuselt vähemalt umbes 80% identne siin avaldatud täispika natiivse CD79b polüpeptiidjärjestusega, kus CD79b polüpeptiidjärjestuses puudub siin avaldatud signaalpeptiid, siin avaldatud CD79b polüpeptiidi rakuvälist domeeni koos signaalpeptiidiga või selleta või ükskõik missugust muud siin avaldatud täispika CD79b polüpeptiidjärjestuse fragmenti (näiteks sellist fragmenti, mis esindab ainult

osa täispika CD79b polüpeptiidi täielikust kodeerivast järjestusest). Selliste CD79b polüpeptiidi variantide hulka kuuluvad näiteks CD79b polüpeptiidid, kus täispika natiivse aminohapete järjestuse N- või C-terminusse on lisatud üks või mitu aminohappejääki või need on sealt deleteeritud. Tavaliselt on polüpeptiidi variant aminohapete järjestuselt vähemalt umbes 80%, alternatiivselt vähemalt umbes 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identne siin avaldatud täispika natiivse CD79b polüpeptiidijärjestuse, siin avaldatud CD79b polüpeptiidjärjestusega, millest puudub signaalpeptiid, siin avaldatud CD79b polüpeptiidi rakuvälise domeeniga koos signaalpeptiidiga või sellela või ükskõik missuguse siin avaldatud täispika polüpeptiidjärjestuse spetsiifiliselt defineeritud fragmendiga. Tavaliselt on CD79b polüpeptiidvariandi pikkus vähemalt umbes 10 aminohapet, alternatiivselt vähemalt umbes 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 või enam aminohapet. Valikuliselt ei sisalda CD79b polüpeptiidvariandid enam kui ühte aminohappeasendust võrreldes natiivse polüpeptiidjärjestusega, alternatiivselt mitte enam kui 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10 aminohappeasendust võrreldes natiivse CD79b polüpeptiidjärjestusega.

[0174] „Aminohapete järjestuse identsuse protsent (%)“ defineeritakse peptiid- või polüpeptiidjärjestuse suhtes, st siin identifitseeritud CD79b polüpeptiidjärjestuste suhtes, kui kandidaatjärjestuses olevate aminohappejääkide protsent, mis on identsed spetsiifilises peptiid- või polüpeptiidjärjestuses, st CD79b polüpeptiidjärjestuses olevate aminohappejääkidega pärast järjestuste joondamist ja vajadusel tühikute sisseviimist maksimaalse järjestuste identsuse protsendi saavutamiseks, mitte arvestades ühtki konservatiivset asendust järjestuste identsuse osana. Aminohapete järjestuste identsuse protsendi määramiseks saab joondamise teha erinevatel, eriala asjatundjale teadaolevatel viisidel, näiteks kasutades avalikult kättesaadavat arvutitarkvara, nagu BLAST, BLAST-2, ALIGN või Megalign (DNASTAR) tarkvara. Eriala asjatundja võib määrata joondamise mõõtmiseks sobivad parameetrid, kaasa arvatud kõik algoritmid, mis on vajalikud maksimaalse joonduse saavutamiseks kogu võrreldavate järjestuste pikkuse ulatuses. Siinsetel eesmärkidel aga leitakse aminohapete järjestuste identsuse protsendilised väärtused, kasutades järjestuste võrdlemise arvutiprogrammi ALIGN-2, kusjuures ALIGN-2 programmi täielik allikakood on esitatud alltoodud tabelis 1. ALIGN-2 järjestuste võrdlemise arvutiprogramm loodi firmas Genentech, Inc. ja alltoodud tabelis 1 näida-

tud allikakood kanti registrisse kasutaja dokumentatsiooniga USA Autoriõiguse Ametis (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, kus see registreeriti USA autoriõiguse registreerimisnumbriga TXU510087. ALIGN-2 programm on avalikult kättesaadav firmast Genentech, Inc., South San Francisco, California, või selle võib kompileerida alltoodud tabelis 1 esitatud allikakoodist. ALIGN-2 programm tuleb kompileerida kasutamiseks operatsioonisüsteemis UNIX, eelistatult digitaalses süsteemis UNIX V4.0D. Kõik järjestuste võrdlemise parameetrid seatakse ALIGN-2 programmi poolt ja need ei varieeru.

[0175] Olukordades, kus ALIGN-2 programmi kasutatakse aminohapete järjestuste võrdlemiseks, arvutatakse antud aminohapete järjestuse A aminohapete järjestuse identsuse protsent antud aminohapete järjestuse B (mis võib alternatiivselt olla väljendatud antud aminohapete järjestusena A, mis sisaldab kindlat aminohapete järjestuse protsendilist identsust antud aminohapete järjestuse B suhtes, koos sellega või selle vastu) suhtes, koos sellega või selle vastu, järgmiselt:

$$100 \times \text{fraktsioon } X/Y,$$

kus X on aminohappejääkide arv, mille järjestuste joondamise programm ALIGN-2 on A ja B joondamisel summeerinud ideaalsete kokkulangevustena ning kus Y on aminohappejääkide koguarv järjestuses B. On mõistetav, et kui aminohapete järjestuse A pikkus ei ole võrdne aminohapete järjestuse pikkusega B, ei ole aminohapete järjestuse A protsendiline identsus aminohapete järjestusega B võrdne aminohapete järjestuse B protsendilise identsusega aminohapete järjestusega A.

[0176] „CD79b polünukleotiidvariant“ või CD79b variandi nukleiinhappejärjestus“ tähendab nukleiinhappemolekuli, mis kodeerib CD79b polüpeptiidi, eelistatult siin defineeritud aktiivset CD79b polüpeptiidi, mille nukleiinhappejärjestus on vähemalt 80% identne nukleiinhappejärjestusega, mis kodeerib siin avaldatud täispikka natiivset CD79b polüpeptiidjärjestust, siin avaldatud täispikka natiivset polüpeptiidjärjestust, milles puudub siin avaldatud signaalpeptiid, siin avaldatud CD79b polüpeptiidi rakuvälist domeeni koos signaalpeptiidiga või selleta või ükskõik missugust muud siin avaldatud täispika CD79b polüpeptiidjärjestuse fragmenti (näiteks sellist fragmenti, mida kodeerib nukleiinhape, mis esindab ainult osa täispika CD79b polüpeptiidi täielikust kodeerivast järjestusest). Tavaliselt on CD79b polünukleotiidvariant nukleiinhappejärjestuselt vähemalt umbes 80%, alternatiivselt vähemalt umbes 81%, 82%,

83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, või 99% identne nukleiinhappejärjestusega, mis kodeerib siin avaldatud täispikka natiivset CD79b polüpeptiidjärjestust, siin avaldatud CD79b polüpeptiidjärjestust, millest puudub signaalpeptiid, siin avaldatud CD79b polüpeptiidi rakuvälist domeeni koos signaalpeptiidiga või selleta või ükskõik missugust siin avaldatud täispika polüpeptiidjärjestuse spetsiifiliselt defineeritud fragmenti. Need variandid ei hõlma natiivset nukleotiidjärjestust.

[0177] Tavaliselt on CD79b polünukleotiidvariandi pikkus vähemalt umbes 5 nukleotiidi, alternatiivselt vähemalt umbes 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 või 1000 nukleotiidi, kusjuures „umbes“ tähendab selles kontekstis otsustamiseks esitatud nukleotiidjärjestuse pikkust pluss või miinus 10% selle järjestuse pikkusest.

[0178] „Nukleiinhappejärjestuse identsuse protsent (%)“siin identifitseeritud CD79b kodeerivate nukleiinhappejärjestuste suhtes defineeritakse kui nukleotiidide protsent kandidaatjärjestuses, mis on identsed huvialuse CD79b nukleiinhappejärjestuses olevate nukleotiididega pärast järjestuste joondamist ja vajadusel tühikute sisseviiimist maksimaalse järjestuste identsuse protsendi saavutamiseks. Nukleiinhappejärjestuste identsuse protsendi määramiseks võib joondamise teha erinevatel, eriala asjatundjale teadaolevatel viisidel, näiteks kasutades avalikult kättesaadavat arvutitarkvara, nagu BLAST, BLAST-2, ALIGN või Megalign (DNASTAR) tarkvara. Siinsetel eesmärkidel aga leitakse nukleiinhappejärjestuste identsuse protsendilised väärtused, kasutades järjestuste võrdlemise arvutiprogrammi ALIGN-2, kusjuures ALIGN-2 programmi täielik allikakood on esitatud alltoodud tabelis 1. ALIGN-2 järjestuste võrdlemise arvutiprogramm loodi firmas Genentech, Inc., ja alltoodud tabelis 1 näidatud allikakood kanti registrisse kasutaja dokumentatsiooniga USA Autoriõiguse Ametis (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, kus see registreeriti USA autoriõiguse registreerimisnumbriga TXU510087. ALIGN-2 programm on avalikult kättesaadav firmast Genentech, Inc., South San Francisco, California, või selle võib kompileerida alltoodud

tabelis 1 esitatud allikakoodist. ALIGN-2 programm tuleb kompileerida kasutamiseks operatsioonisüsteemis UNIX, eelistatult digitaalses süsteemis UNIX V4.0D. Kõik järjestuste võrdlemise parameetrid seatakse ALIGN-2 programmi poolt ja need ei varieeru.

[0179] Olukordades, kus ALIGN-2 programmi kasutatakse nukleiinhappejärjestuste võrdlemiseks, arvutatakse antud nukleiinhappejärjestuse C identsuse protsent antud nukleiinhappejärjestuse D (mis võib alternatiivselt olla väljendatud antud nukleiinhappejärjestusena C, mis sisaldab kindlat nukleiinhappejärjestuse protsendilist identsust antud nukleiinhappejärjestuse D suhtes, koos sellega või selle vastu) suhtes, koos sellega või selle vastu, järgmiselt:

$$100 \times \text{fraktsioon } W/Z,$$

kus W on nukleotiidide arv, mille järjestuste joondamise programm ALIGN-2 on C ja D joondamisel summeerinud identsete kokkulangevustena ning kus Z on nukleotiidide koguarv järjestuses D. On mõistetav, et kui nukleiinhappejärjestuse C pikkus ei ole võrdne nukleiinhappejärjestuse D pikkusega, siis ei ole nukleiinhappejärjestuse C protsendiline identsus nukleiinhappejärjestusega D võrdne nukleiinhappejärjestuse D protsendilise identsusega nukleiinhappejärjestusega C. Kui ei ole teisiti öeldud, saadakse kõik siin kirjeldatud nukleiinhapete protsendilise identsuse väärtused nii, nagu on kirjeldatud sellele vahetult eelnevas lõigus, kasutades ALIGN-2 arvutiprogrammi.

[0180] Teistes teostustes on CD79b polünukleotiidvariandid nukleiinhappemolekulid, mis kodeerivad CD79b polüpeptiidi ja mis on võimelised hübridiseeruma, eelistatult karmides hübridisatsiooni- ja pesutingimustes, siin avaldatud täispikka CD79b polüpeptiidi kodeerivate nukleotiidjärjestustega. CD79b polüpeptiidvarindid võivad olla need, mida kodeerib CD79b polünukleotiidvariant.

[0181] Termin „täispikk kodeeriv piirkond“, mida siin kasutatakse CD79b polüpeptiidi kodeerivale nukleiinhappele viitamisel, tähendab nukleotiidjärjestust, mis kodeerib leiutisekohast täispikka CD79b polüpeptiidi (mis kaasnevatel joonistel on sageli näidatud start- ja stoppkoodonite vahel olevana, need kaasa arvatud). Termin „täispikk kodeeriv piirkond“, kasutatuna ATCC-sse deponeeritud nukleiinhappele viitamisel, tähendab CD79b polüpeptiidi kodeerivat cDNA osa, mis on inserteeritud ATCC-sse deponeeritud vektorisse (ja mis kaasnevatel joonistel on sageli näidatud start- ja stoppkoodonite vahel olevana (joonistel on start- ja stoppkoodonid rasvases kirjas ja alla joonitud)).

[0182] „Eraldatud“, kasutatuna siin avaldatud erinevate CD79b polüpeptiidide kirjeldamiseks, tähendab polüpeptiide, mis on identifitseeritud ning eraldatud ja/või kätte saadud tema loodusliku keskkonna komponendist. Tema loodusliku keskkonna kontamineerivad komponendid on materjalid, mis häirivad antikeha diagnostilist või terapeutilist kasutamist, ning nende hulka võivad kuuluda ensüümid, hormoonid ning muud valgulised ja mittevalgulised lahustunud ained. Eelistatud teostustes puhastatakse antikeha (1) puhtusastmeni, mis on piisav vähemalt 15 jäägi pikkuse N-terminaalse või sisemise aminohapete järjestuse saamiseks pöörleva topsiga sekvenaatori kasutamisel, või (2) homogeensuseni, mida näidatakse SDS-PAGE meetodil kas redutseerivates või mitteredutseerivates tingimustes, kasutades värvi Coomassie blue või eelistatult hõbedaga värvimist. Eraldatud polüpeptiidide hulka kuuluvad ka rekombinantsetes rakkudes *in situ* olevad polüpeptiidid, kuna vähemalt üks CD79b polüpeptiidi loodusliku keskkonna komponent on puudu. Tavaliselt aga valmistatakse eraldatud polüpeptiid vähemalt ühe puhastamisetapi abil.

[0183] „Eraldatud“ CD79b polüpeptiidi kodeeriv nukleiinhape või muu polüpeptiidi kodeeriv nukleiinhape on nukleiinhappemolekul, mis on identifitseeritud ja lahutatud vähemalt ühest kontamineerivast nukleiinhappemolekulist, millega ta tavaliselt polüpeptiidi kodeeriva nukleiinhappe looduslikus allikas on seotud. Eraldatud polüpeptiidi kodeeriv nukleiinhappemolekul erineb sellest vormist või ümbruskonnast, milles ta esineb looduses. Seetõttu eristatakse eraldatud polüpeptiide kodeerivaid nukleiinhappemolekule looduslikes rakkudes esinevatest spetsiifilistest polüpeptiidi kodeerivatest nukleiinhappemolekulidest. Eraldatud polüpeptiidi kodeeriv nukleiinhappemolekul aga hõlmab ka nendes rakkudes sisalduvaid polüpeptiidi kodeerivaid nukleiinhappemolekule, mis ekspresseerivad polüpeptiidi, kus näiteks nukleiinhappemolekuli paiknemine kromosoomis on loodusliku raku omast erinev.

[0184] Termin „kontrolljärjestused“ tähendab DNA järjestusi, mis on vajalikud nendega juhitavalt seotud kodeeriva järjestuse ekspresseerimiseks konkreetsetes peremeesorganismis. Näiteks prokarüootidele sobivate kontrolljärjestuste hulka kuuluvad promootor, valikuliselt operaatorjärjestus ja ribosoomi sidumissait. Eukarüootsete rakkude kohta on teada, et neis kasutatakse promootoreid, polüadenüülmissignaale ja enhaansereid.

[0185] Nukleiinhape on „juhitavalt seotud“, kui ta on paigutatud funktsionaalsesse suhtesse teise nukleiinhappejärjestusega. Näiteks eeljärjestuse või sekretsiooni juhtjärjestuse DNA on juhitavalt seotud polüpeptiidi DNA-ga juhul, kui ta ekspresseeritakse eellasvalguna, mis osaleb polüpeptiidi sekretsioonis, promootor või enhaanser on juhitavalt seotud kodeeriva



järjestusega juhul, kui ta mõjutab järjestuse transkriptsiooni, ribosoomi sidumissait on juhitavalt seotud kodeeriva järjestusega juhul, kui ta paikneb translatsiooni hõlbustavas asendis. Üldiselt tähendab „juhitavalt seotud“, et seotavad DNA järjestused on omavahel kokkupuutuvad ning sekretsiooni juhtjärjestuse puhul on nad ka samas lugemisraamis. Enhaanserid aga ei pea kodeeriva järjestusega kokku puutama. Sidumine viiakse läbi sobivate restriksioonisaitide ligeerimise teel. Kui selliseid saite ei esine, kasutatakse sünteetilisi oligonukleotiid-adaptoreid või -linkereid vastavalt tavapärasele praktikale.

[0186] Hübridisatsioonireaktsioonide „karmus“ on eriala asjatundja poolt kergesti määratav ning sageli on see empiiriline arvestus, mis sõltub sondi pikkusest, pesemistemperatuurist ja soola kontsentratsioonist. Üldiselt vajavad pikemad sondid õigeks anniilumiseks kõrgemat temperatuuri, samas kui lühemad sondid vajavad madalamat temperatuuri. Üldiselt sõltub hübridisatsioon denatureeritud DNA võimest uuesti anniiluda sulamistemperatuurist madalamal temperatuuril, kui ümbruses on olemas komplementaarsed ahelad. Mida kõrgem on sondi ja hübridiseeritava järjestuse soovitud homoloogia aste, seda kõrgem on suhteline temperatuur, mida saab kasutada. Selle tulemusena järeldub, et kõrgemad suhtelised temperatuurid kalduvad reaktsioonitingimusi karmistama, samas kui madalamad temperatuurid muudavad need vähem karmideks. Täiendavaid detaile ja selgitusi hübridisatsioonireaktsioonide karmuse kohta vt. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers (1995).

[0187] Siin defineeritud „karmide tingimustena“ või „väga karmide tingimustena“ võib määratleda need, kus (1) pesemiseks kasutatakse madalat ioonset jõudu ja kõrget temperatuuri, näiteks 0,015 M naatriumkloriid / 0,0015 M naatriumtsitraat / 0,1% naatriumdodetsüülsulfaat 50 °C juures, (2) hübridisatsiooni käigus kasutatakse denatureerivat ainet nagu formamiid, näiteks 50% (mahu järgi) formamiid 0,1% veise seerumalbumiini / 0,1% Ficoll / 0,1% polüvinüülpirrolidooni / 50 mM naatriumfosfaatpuhvriga, pH 6,5, koos 750 mM naatriumkloriidi ja 75 mM naatriumtsitraadiga 42 °C juures, või (3) hübridiseeritakse üle öö lahuses, mis sisaldab 50% formamiidi, 5-kordset SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M naatriumtsitraat), 50 mM naatriumfosfaati (pH 6,8), 0,1% naatriumopürofosfaati, 5-kordset Denhardti lahust, sonikeeritud lõhe sperma DNA (50 µg/ml), 0,1% SDS ja 10% dekstraansulfaati 42 °C juures ja 10-minutist pesemist 42 °C juures 0,2-kordses SSC-s (naatriumkloriidi/naatriumtsitraadi juuresolekul), millele järgneb 10-minutine pesemine karmides tingimustes, mis tähendab pesemist 55 °C juures 0,1-kordses SSC-s, mis sisaldab EDTA.

[0188] „Mõõdukalt karme tingimusi“ saab määratleda nii, nagu on kirjeldanud Sambrook jt., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, ning nende hulka kuuluvad eespool kirjeldatutest vähem karmide pesulahuste ja hübriidisatsioonitingimuste (näiteks temperatuuri, ioonse jõu ja SDS protsendi) kasutamine. Mõõdukalt karmide tingimuste näide on üle öö inkubeerimine 37 °C juures lahuses, mis sisaldab 20% formamiidi, 5-kordset SSC (150 mM NaCl, 15 mM trinaatriumtsitraat), 50 mM naatriumfosfaati (pH 7,6), 5-kordset Denhardti lahust, 10% dekstraansulfaati ja 20 mg/ml denatureeritud tükeldatud lõhe sperma DNA-d, millele järgneb filtrite pesemine 1-kordses SSC-s umbes 37-50 °C juures. Eriala asjatundjale on teada, kuidas vajadusel reguleerida temperatuuri, ioonset jõudu jne., et sobitada selliste teguritega nagu sondi pikkus jne.

[0189] Termin „epitooop-otsakuga“ tähendab siin kasutatuna kimäärset polüpeptiidi, mis sisaldab CD79b polüpeptiidi või CD79b-vastast antikeha, mis on liidetud „otsak-polüpeptiidiga“. Otsak-polüpeptiidis on piisavalt jääke, andmaks epitooobi, mille vastu saab valmistada antikeha, samas on ta piisavalt lühike, et mitte sekkuda selle polüpeptiidi aktiivsusesse, millega ta on liidetud. Otsak-polüpeptiid on eelistatult ka täiesti unikaalne, nii et antikeha praktiliselt ei reageeri teiste epitooopidega. Sobivad otsak-polüpeptiidid sisaldavad tavaliselt vähemalt kuut aminohappejääki, tavaliselt umbes 8 kuni 50 aminohappejääki (eelistatult umbes 10 kuni 20 aminohappejääki).

[0190] „Aktiivne“ või „aktiivsus“ tähendab siinsetel eesmärkidel CD79b polüpeptiidi vormi (vorme), mis säilitab (säilitavad) natiivse või looduslikult esineva CD79b bioloogilise ja/või immunoloogilise aktiivsuse, kus „bioloogiline“ aktiivsus tähendab natiivse või looduslikult esineva CD79b poolt põhjustatud muud bioloogilist funktsiooni (kas inhibeerivat või stimuleerivat) kui võimet indutseerida antikeha tootmist antigeense epitooobi vastu, mida sisaldab natiivne või looduslikult esinev CD79b, ning „immunoloogiline“ aktiivsus tähendab võimet indutseerida antikeha tootmist antigeense epitooobi vastu, mis on olemas natiivses või looduslikult esinevas CD79b-s.

[0191] Terminit „antagonist“ kasutatakse kõige laiemas mõttes ja see hõlmab molekule, mis osaliselt või täielikult blokeerivad, inhibeerivad või neutraliseerivad natiivse CD79b polüpeptiidi bioloogilise aktiivsuse. Samal viisil kasutatakse terminit „agonist“ kõige laiemas mõttes ning see hõlmab kõiki molekule, mis aimavad järele natiivse CD79b bioloogilist aktiivsust. Sobivate agonist- või antagonistmolekulide hulka kuuluvad spetsiifiliselt agonist- või antagonistantikehad või -antikehafragmendid, natiivsete CD79b polüpeptiidide fragmen-

did või aminohapete järjestuste variandid, peptiidid, *antisense* oligonukleotiidid, väikesed orgaanilised molekulid jne. CD79b polüpeptiidi agonistide või antagonistide identifitseerimismeetodid võivad hõlmata CD79b polüpeptiidi kokkupuutesse viimist agonist- või antagonist-kandidaatmolekulidega ja ühe või mitme tavaliselt CD79b polüpeptiidiga seotud bioloogilise aktiivsuse mõõtmist.

[0192] „Puhastatud“ tähendab, et molekuli kontsentratsioon proovis on vähemalt 95% (massi järgi) või vähemalt 98% selle proovi massist, milles ta sisaldub.

[0193] „Eraldatud“ nukleiinhappemolekul on nukleiinhappemolekul, mis on eraldatud vähemalt ühest teisest nukleiinhappemolekulist, millega ta tavaliselt on seotud näiteks oma looduslikus keskkonnas. Lisaks kuuluvad eraldatud nukleiinhappemolekulide hulka need nukleiinhappemolekulid, mis sisalduvad rakkudes, mis tavaliselt ekspresseerivad nukleiinhappemolekuli, aga see nukleiinhappemolekul esineb kromosoomiväliselt või paikneb kromosoomil kohas, mis on looduslikust paiknemiskohast erinev.

[0194] Termin „vektor“ on siin kasutatuna mõeldud tähendama nukleiinhappemolekuli, mis on võimeline transportima teist nukleiinhapet, millega ta on ühendatud. Üks vektoritüüp on „plasmiid“, mis tähendab tsirkulaarset kaheaheelalist DNA lugu, millesse võib ligeerida täiendavaid DNA segmente. Teine vektoritüüp on faagivektor. Järgmine vektoritüüp on viirusvektor, kus täiendavad DNA segmendid võivad olla ligeeritud viiruse genoomi. Teatud vektorid (näiteks bakteriaalset replikatsiooni alguspunkti sisaldavad bakteriaalsed vektorid ja episomaalsed imetajavektorid) on võimelised replitseerima selles peremeesrakus, millesse nad on sisse viidud. Teised vektorid (näiteks mitte-episomaalsed imetajavektorid) võivad peremeesrakku sisseviimisel integreeruda peremeesraku genoomi ja seetõttu replitseeruda koos peremeesgenoomiga. Lisaks on teatud vektorid suutelised suunama nende geenide ekspressiooni, millega nad on juhitud seotud. Selliseid vektoreid nimetatakse siin „rekombinantseteks ekspressioonivektoriteks“ (või lihtsalt „rekombinantseteks vektoriteks“). Üldiselt on rekombinantse DNA meetodite puhul kasulikud ekspressioonivektorid sageli plasmidi vormis. Käesolevas kirjelduses võib termineid „plasmiid“ ja „vektor“ kasutada vastastikku vahetatavatena, kuna plasmiid on kõige tavalisemalt kasutatav vektori vorm.

[0195] Terminid „polünukleotiid“ ja „nukleiinhape“, mida siin kasutatakse vastastikku vahetatavatena, tähendavad ükskõik missuguse pikkusega nukleotiididest koosnevaid polümeere, kaasa arvatud DNA ja RNA. Nukleotiidid võivad olla desoksüribonukleotiidid, ribonukleotiidid, modifitseeritud nukleotiidid või nukleotiidalused ja/või nende analoogid või ükskõik

missugune substraat, mida saab polümeeri liita DNA või RNA polümeraasi või sünteesireaktsiooni abil. Polünukleotiid võib sisaldada modifitseeritud nukleotiide, nagu metüleeritud nukleotiidid ja nende analoogid. Modifikatsioonide esinemisel võib nukleotiidi struktuurile anda modifikatsiooni kas enne või pärast polümeeri kokkupanekut. Nukleotiidjärjestus võib olla katkestatud mittenukleeotiidsete komponentidega. Polünukleotiidi võib pärast sünteesi täiendavalt modifitseerida, näiteks märgisega konjugeerimise abil. Teiste modifikatsioonide hulka kuuluvad näiteks „mütsid“ („caps“), ühe või mitme looduslikult esineva nukleotiidi asendamine selle analoogiga, nukleotiididevahelised modifikatsioonid, nagu näiteks laenguta sidemeid kandvad polünukleotiidid (näiteks metüülfosfonaadid, fosfotriestrid, fosfoamidid, karbamaadid jne.) ja laenguga sidemeid kandvad polünukleotiidid (näiteks fosforotioamidid, fosforoditioamidid jne.), ripats-osamolekule, nagu näiteks valke (näiteks nukleaase, toksine, antikehi, signaalpeptiide, polü-L-lüsiini jne.) sisaldavad polünukleotiidid, interkalaatoreid (näiteks akridiini, psoraleeni jne.) sisaldavad polünukleotiidid, kelaatijaid (näiteks metalle, radioaktiivseid metalle, boori, oksüdeerivaid metalle jne.) sisaldavad polünukleotiidid, alküüljaid sisaldavad polünukleotiidid, modifitseeritud sidemeid sisaldavad polünukleotiidid (näiteks alfa-anomeersed nukleoinhapped jne.), samuti polünukleotiidi(de) modifitseerimata vormid. Lisaks võib kõiki tavaliselt suhkrutes esinevaid hüdroksüülrühmi asendada näiteks fosfonaatrühmade, fosfaatrühmadega, kaitsta standardsete kaitserühmadega või aktiveerida täiendavate nukleotiidide jaoks lisasidemete tegemiseks või konjugeerida pooltahketele või tahketele toestele. 5'- ja 3'-terminaalseid OH rühmi võib fosforüülda või asendada amiinide või 1 kuni 20 süsinikuaatomist koosnevate „mütsi“ andvat rühma sisaldavate orgaaniliste osamolekulidega. Ka teisi hüdroksüülrühmi võib derivaatida standardseteks kaitserühmadeks. Polünukleotiidid võivad sisaldada ka riboos- või desoksüriboosuhkrutega analoogseid vorme, mis on tehnika tasemest üldiselt tuntud, näiteks 2'-O-metüül-, 2'-O-allüül-, 2'-fluoro- või 2'-asidoriboosi, karbotsükliilisi suhkruanalooge, alfa-anomeerseid suhkruid, epimeerseid suhkruid, nagu arabinoos, ksüloos või lüksoos, püranoosuhkruid, furanoosuhkruid, sedoheptuloose, atsükliilisi analooge ja nukleotiidalust mittesisaldavaid (*abasic*) nukleosiidanalooe nagu metüülribosiid. Ühe või mitu fosfodiesterisidit võib asendada alternatiivsete ühendavate rühmadega. Nende alternatiivsete ühendavate rühmade hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, teostused, kus fosfaatrühm on asendatud P(O)S- ("tioaat-"), P(S)S- ("ditioaat-"), "(O)NR<sub>2</sub>- ("amidaat-"), P(O)R-, P(O)OR'-, CO- või CH<sub>2</sub>- ("formatsetaal-") rühmaga, kus iga R või R' on sõltumatult H või asendatud või asendamata alküülrühm (1-20

C), mis vajadusel sisaldab eetersidet (-O-), arüül-, alkenüül-, tsükloalküül-, tsükloalkenüül- või aralküülrühma. Mitte kõik polünukleotiidis olevad sidemed ei tarvitse olla identsed. Eelnev kirjeldus rakendub kõigile siin nimetatud polünukleotiididele, kaasa arvatud RNA ja DNA.

[0196] „Oligonukleotiid“ tähendab siin kasutatuna lühikesi, üldiselt üheaahelalisi, üldiselt sünteetilisi polünukleotiide, mis on üldiselt, kuid mitte tingimata, pikkuselt lühemad kui umbes 200 nukleotiidi. Terminid „oligonukleotiid“ ja „polünukleotiid“ ei ole teineteist välis- tavad. Ülaltoodud polünukleotiidide kirjeldus on samavõrra ja täielikult rakendatav ka oligo- nukleotiididele.

[0197] Terminid „vähk“ ja „vähi-“, tähendavad või kirjeldavad imetajate füsioloogilist seisun- dit, mida tüüpiliselt iseloomustab reguleerimatu rakkude kasv. Vähi näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, hematopoeetilised vähid ehk verega seotud vähid, nagu lüm- foom, leukeemia, müeloom või lümfoidsed pahaloomulised kasvajakud, aga ka põrnavähid ja lümfisõlmede vähid, samuti kartsinoom, blastoom ja sarkoom. Vähi täpsemate näidete hulka kuuluvad B-rakkudega seotud vähid, kaasa arvatud näiteks kõrge, keskmise ja madala paha- loomulisuse astmega lümfoomid (kaasa arvatud B-rakkude lümfoomid, nagu näiteks limas- kestaga seotud lümfoidkoe B-rakkude lümfoom ja mitte-Hodgkini lümfoom (*non-Hodgkin's lymphoma*, NHL), mantelrakkude lümfoom, Burkitti lümfoom, väikeste lümfotsüütide lüm- foom, marginaaltooni lümfoom, difuusne suurerakuline lümfoom, follikulaarne lümfoom ja Hodgkini lümfoom ning T-rakkude lümfoomid), ja leukeemiad (kaasa arvatud sekundaarne leukeemia, kroonilised lümfotsütaarsed leukeemiad (*chronic lymphocytic leukemia*, CLL), nagu B-rakkude leukeemia (CD5+ B-lümfotsüüdid), müeloidsed leukeemiad, nagu äge müe- loidleukeemia, krooniline müeloidleukeemia, lümfoidsed leukeemiad, nagu äge lümfoblast- leukeemia (*acute lymphoblastic leukemia*, ALL) ja müelodüsplaasia) ning teised hemato- loogilised ja/või B-rakkude või T-rakkudega seotud vähid. Siia kuuluvad ka teiste hemato- poetiliste rakkude vähid, kaasa arvatud polümorfonukleaarsete leukotsüütide vähid, nagu basofiilide, eosinofiilide, neutrofiilide ja monotsüütide, dendriitrakkude, trombotsüütide, erütrotsüütide ja looduslike tapjaprakkude vähid. Siia kuuluvad ka pahaloomulised B-raku- de proliferatsioonihäired, mis valitakse järgnevate hulgast: lümfoom, mitte-Hodgkini lüm- foom (NHL), agressiivne NHL, relapseeruv agressiivne NHL, relapseeruv indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsütaarne leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoom, leukeemia, karvrakk-leukeemia (*hairy cell*

*leukemia*, HCL), äge lümfotsütaarne leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoom. B-rakkude vähkide päritolu on järgmine: marginaaltsooni B-rakkude lümfoom pärineb marginaaltsooni B-mälurakkudest, follikulaarne lümfoom ja difuusne suurerakuline B-rakkude lümfoom pärinevad germinaaltsentrite heleda tsooni tsentrotsüütidest, krooniline lümfotsütaarne leukeemia ja väikeste lümfotsüütide leukeemia pärinevad B1-rakkudest (CD5+), mantelrakkude lümfoom pärineb manteltsooni naiivsetest B-rakkudest ja Burkitti lümfoom pärineb germinaaltsentrite tumeda tsooni tsentroblastidest. Hematopoeetilisi rakke sisaldavaid kudesid nimetatakse „hematopoeetiliste rakkude kudedeks“ ja siia kuuluvad tüümus ja luuüdi ning perifeersed lümfoïdkoed, nagu põrn, lümfisõlmed, limaskestaga seotud lümfoïdkoed, nagu soolega seotud lümfoïdkoed, mandlid, Peyeri naastud ja ussipik ning teiste limaskestadega seotud lümfoïdkoed, näiteks bronhide sisekatted. Nende vähkide teiste konkreetsete näidete hulka kuuluvad soomusrakk-vähk, väikeserakuline kopsuvähk, mitteväikeserakuline kopsuvähk, kopsu adenokartsinoom, kõhukelmevähk, hepatotsellulaarne vähk, gastrointestinaalne vähk, pankreasevähk, glioom, emakakaelavähk, munasarjavähk, maksavähk, põievähk, hepatoom, rinnavähk, käärsoolevähk, kolorektaalvähk, emaka limaskesta või emakavähk, süljenäärmevähk, neeruvähk, maksavähk, eesnäärmevähk, häbemevähk, kilpnäärmevähk, maksa-kartsinoom, leukeemia ja teised lümfoproliferatiivsed häired ning erinevat tüüpi pea- ja kaelavähid.

[0198] „B-rakkude pahaloomuline kasvaja“ hõlmab siin mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), kaasa arvatud madala pahaloomulisuse astmega / follikulaarne NHL, väikeste lümfotsüütide (*small lymphocytic*, SL) NHL, keskmise pahaloomulisuse astmega difuusne NHL, kõrge pahaloomulisuse astmega immunoblastne NHL, kõrge pahaloomulisuse astmega lümfoblastne NHL, kõrge pahaloomulisuse astmega väikeste lõigustumata rakkude NHL, suuremahulise haigusega NHL, mantelrakkude lümfoom, AIDS-iga seotud lümfoom ja Waldenstromi makroglobulineemia, mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), lümfotsüütide domineerimisega Hodgkini haigus (*lymphocyte predominant Hodgkin's disease*, LPHD), väikeste lümfotsüütide lümfoom (*small lymphocytic lymphoma*, SLL), krooniline lümfotsütaarne leukeemia (CLL), indolentne NHL, kaasa arvatud relapseeruv indolentne NHL ja rituximab-refraktoorne indolentne NHL, leukeemia, kaasa arvatud äge lümfoblastne leukeemia (ALL), krooniline lümfotsütaarne leukeemia (CLL), karvrakk-leukeemia, krooniline müoblastne leukeemia, mantelrakkude lümfoom ja teised hematoloogilised pahaloomulised kasvajakasvaja. Selliseid pahaloomulisi kasvajakasvaja saab ravida B-rakkude pinnamarkerite nagu CD79b vastu suu-

natud antikehadega. Siin peetakse silmas nende haiguste ravimist B-rakkude pinnamarkeri nagu CD79b vastu suunatud antikehaga ning see hõlmab konjugeerimata („palja“) antikeha või tsütotoksilise ainega konjugeeritud antikeha manustamist nii, nagu siin on avaldatud. Samuti peetakse siin silmas selliste haiguste ravimist kombinatsiooniravi abil, mis hõlmab leiutisekohase CD79b-vastase antikeha või CD79b-vastase antikeha ja ravimi konjugaadi manustamist koos teise antikeha või antikeha ja ravimi konjugaadiga, koos teise tsütotoksilise aine, kiirituse või muu raviga, mida manustatakse kas samaaegselt või seeriatena. Leiutise näitliku ravimeetodi puhul manustatakse CD79b-vastast antikeha kombinatsioonis CD20-vastase antikehaga kas immunoglobuliinidena või selle CD20-siduva fragmendina kas koos või järjestikku. CD20-vastane antikeha võib olla paljas antikeha või antikeha ja ravimi konjugaat. Kombinatsiooniravi teostuses on CD79b-vastane antikeha leiutisekohane antikeha ja CD20-vastane antikeha on Rituxan<sup>®</sup> (rituximab).

[0199] Termin „mitte-Hodgkini lümfoom“ ehk „NHL“ tähendab siin kasutatuna Hodgkini lümfoomidest erinevat lümfisüsteemi vähki. Hodgkini lümfoome saab mitte-Hodgkini lümfoomidest üldiselt eristada Reedi-Sternbergi rakkude esinemise järgi Hodgkini lümfoomides ja nimetatud rakkude puudumise järgi mitte-Hodgkini lümfoomides. Mitte-Hodgkini lümfoomide näidete hulka, mida see termin siin kasutatuna hõlmab, kuuluvad kõik juhud, mida eriala asjatundja (näiteks onkoloog või patoloog) identifitseerib tehnika tasemest tuntud klassifitseerimisskeemide järgi, näiteks vastavalt Revised European-American Lymphoma (REAL) skeemile, nagu on kirjeldatud teoses: Color Atlas of Clinical Hematology (3. väljaanne), toim. A. Victor Hoffbrand ja John E. Pettit (Harcourt Publishers Ltd., 2000), vt. eriti loetelusid joonistel 11.57, 11.58 ja 11.59. Spetsiifilisemate näidete hulka kuuluvad, aga ei ole nendega piiratud, relapseeruv või refraktoorne NHL, arenenud madala pahaloomulisuse astmega NHL, II-/IV staadiumi NHL, kemoterapia-resistentne NHL, B-eellasrakkude lümfoblastne leukeemia ja/või lümfoom, väikeste lümfotsüütide lümfoom, B-rakkude krooniline lümfotsütaarne leukeemia ja/või prolümfotsütaarne leukeemia ja/või väikeste lümfotsüütide lümfoom, B-rakkude prolümfotsütaarne lümfoom, immunotsütoom ja/või lümfoplasmatütaarne lümfoom, lümfoplasmatütaarne lümfoom, marginaaltsooni B-rakkude lümfoom, põrna marginaaltsooni lümfoom, sõlmevälise marginaaltsooni (MALT) lümfoom, sõlme marginaaltsooni lümfoom, karvrakk-leukeemia, plasmatsütoom ja/või plasmarakkude müeloom, madala pahaloomulisuse astmega / follikulaarne lümfoom, vahepealse pahaloomulisuse astmega / follikulaarne NHL, mantelrakkude lümfoom, follikulaartsentri (follikulaarne) lüm-

foom, vahepealse pahaloomulisuse astmega difuusne NHL, difuusne suurerakuline B-rakkude lümfoom, agressiivne NHL (kaasa arvatud agressiivne edasijõudnud NHL ja agressiivne relapseerunud NHL), NHL, mis relapseerub kas pärast või refraktoorselt autoloogsete tüvirakkude transplantatsiooni, primaarne mediastinaalne B-rakkude suurerakuline lümfoom, primaarne efusioon-lümfoom, kõrge pahaloomulisuse astmega immunoblastne NHL, kõrge pahaloomulisuse astmega lümfoblastne NHL, kõrge pahaloomulisuse astmega väikeste löigustumata rakkude NHL, suuremahulise haigusega NHL, Burkitti lümfoom, suurte granulaarsete (perifeerset) eellasrakkude lümfootsütaarne leukeemia, *mucosis fungoides* ja/või Sezary sündroom, nahalümfoomid, anaplastiline suurerakuline lümfoom, angiotsentriline lümfoom.

[0200] „Häire“ on ükskõik missugune seisund, millele on kasulik leiutisekohase aine/molekuli või meetodiga ravimine. Siia kuuluvad kroonilised ja ägedad haigused, kaasa arvatud need patoloogilised seisundid, mis loovad imetajal eelsoodumuse kõnealusteks haigusteks. Siin ravitavate haiguste mittepiiravate näidete hulka kuuluvad vähiseisundid, nagu pahaloomulised ja healoomulised kasvaja, mitteleukeemiad ja pahaloomulised lümfooidkasvaja, neuronite, gliia, astrotsüütide, hüpotalamuse ja teiste näärmete, makrofaagide, epiteeli, strooma ja blastotsöoli häired ning põletikulised, immunoloogilised ja muud angiogeneesiga seotud haigused. Lisaks kuuluvad nende haiguste hulka vähiseisundid, nagu B-rakkude proliferatsioonihäired ja/või B-rakkude kasvaja, näiteks lümfoom, mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), agressiivne NHL, relapseeruv agressiivne NHL, relapseeruv indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfootsütaarne leukeemia (CLL), väikeste lümfootsüütide lümfoom, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), äge lümfootsütaarne leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoom.

[0201] Terminid „rakkude proliferatsioonihäire“ ja „proliferatsioonihäire“ tähendavad häireid, mis on teatud määral seotud ebanormaalse rakuproliferatsiooniga. Ühes teostuses on rakkude proliferatsioonihäire vähk.

[0202] „Kasvaja“ tähendab siin kasutatuna neoplastiliste rakkude kasvu ja proliferatsiooni, ükskõik kas pahaloomulist või healoomulist, ja kõiki vähieelseid ja vähirakke ning -kudesid.

[0203] „Autoimmuunhaigus“ on siin haigus või häire, mis tuleneb ja on suunatud indiviidi oma kudede või organite vastu, või segregeerub koos nendega või avaldub nendes, või selle tulemusena tekkiv seisund. Paljude autoimmuun- ja põletikuhäirete jaoks võib olla mitmeid kliinilisi ja laboratoorseid markereid, kaasa arvatud, kuid nendega mitte piiratud, hüpergammaglobulineemia, autoantikehade kõrge tase, antigeeni-antikehakehade ladestused ku-



dedes, kasu kortikosteroididega ravimisest ja immunosupresseerivast ravist ning lümfoid-rakkude agregaadid kahjustatud kudedes. Piiramata end ühegi teooriaga B-rakkude poolt vahendatud haiguste kohta arvatakse, et B-rakud avaldavad inimese autoimmuunhaiguste puhul patogeenset toimet paljude mehhanismiradade kaudu, kaasa arvatud autoantikehade tootmine, immuunkompleksi moodustumine, dendriit- ja T-rakkude aktivatsioon, tsütokiinide süntees, otsene kemokiinide vabanemine ja kolde pakkumine ektoopilisele neolümfogeneesile. Kõik need rajad võivad erineval määral osaleda autoimmuunhaiguste patoloogias.

[0204} „Autoimmuunhaigus“ võib olla organi-spetsiifiline haigus (st immuunvastus on spetsiifiliselt suunatud organisüsteemi vastu, nagu endokriinne süsteem, nahk, kardiopulmonaarne süsteem, gastrointestinaalne ja maksasüsteem, neerusüsteem, kilpnääre, kõrvad, neuromuskulaarsüsteem, kesknärvisüsteem jne.) või süsteemne haigus, mis võib kahjustada paljusid organisüsteeme (nagu süsteemne erütematoosluupus (SLE), reumatoidartriit, polümüosiit jne.). Eelistatult kuuluvad selliste haiguste hulka reumatoloogilised autoimmuunhaigused (nagu reumatoidartriit, Sjörgeni sündroom, sklerodermia, luupus, nagu SLE ja luupusnefriit, polümüosiit/dermatomüosiit, krüoglobulineemia, fosfolipiidi-vastaste antikehade sündroom ja psoriaatiline artriit), autoimmuunsed gastrointestinaal- ja maksahäired (nagu näiteks põletikulised soolehaigused (näiteks haavandiline koliit ja Crohni tõbi), autoimmuunne gastriit ja pernikoosne aneemia, autoimmuunne hepatiit, primaarne biliaarne tsirroos, primaarne skleroseeriv kolangiit ja tsöliaakiahaigus), vaskuliit (nagu näiteks ANCA-negatiivne vaskuliit ja ANCA-ga seotud vaskuliit, kaasa arvatud Churgi-Straussi vaskuliit, Wegeneri granulomatoos ja mikrokoopiline polüangiit), autoimmuunsed neuroloogilised häired (nagu näiteks luupus, opsokloonuse-müokloonuse sündroom, raske müasteenia, nägemisnärvi neuromüeliit, Parkinsoni tõbi, Alzheimeri tõbi ja autoimmuunsed polüneuropaatiad), neeruhäired (nagu näiteks glomerulonefriit, Goodpasture'i sündroom ja Bergeri haigus) autoimmuunsed dermatoloogilised häired (nagu näiteks psoriaas, urtikaaria, limaskestapõletik, harilik vill-lööve, villiline pemfigoid ja naha erütematoosluupus), hematoloogilised häired (nagu näiteks trombotsütopeeniline purpur, trombotsüütiline trombotsütopeeniline purpur, transfusioonijärgne purpur ja autoimmuunne hemolüütiline aneemia), ateroskleroos, uveiid, autoimmuunsed kuulmisega seotud haigused (nagu näiteks sisekõrvahaigus ja kuulmise kadumine), Bechet' haigus, Raynaud' sündroom, organitransplantaat ja autoimmuunsed endokriinsed häired (nagu näiteks diabeediga seotud autoimmuunhaigused, nagu insuliinisõltuv diabeet (*insulin-dependent diabetes mellitus*, IDDM), Addisoni haigus ja autoimmuunne kilpnäärmehaigus

(näiteks Graves'i haigus ja türeoidiit)). Eelistatumalt kuuluvad selliste haiguste hulka näiteks reumatoidartriit, haavandiline koliit, ANCA-seotud vaskuliit, luupus, Sjörgeni sündroom, Graves'i haigus, IDDM, pernikoosne aneemia, türeoidiit ja glomerulonefriit.

[0205] Teiste siin määratletud autoimmuunhaiguste hulka, mis mõnedel juhtudel hõlmavad eespool loetletuid, kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, artriit (äge ja krooniline, reumatoidartiit, kaasa arvatud juveniilse algusega reumatoidartriit ja artriidi staadiumid, nagu reumatooidsünoviit, podagra või podagra-artiit, äge immunoloogiline artriit, krooniline põletikuline artriit, degeneratiivne artriit, kollageeni poolt esile kutsutud II tüüpi artriit, infektsiooniline artriit, Lyme'i artriit, proliferatiivne artriit, psoriaatiline artriit, Stilli haigus, lüüsisamba artriit, osteoartriit, krooniline progresseeruv artriit, deformeeriv artriit, krooniline primaarne polüartriit, reaktiivne artriit, menopausi artriit, öestogeenipuudusega seotud artriit ja anküloseeriv spondüliit / reumatoidspondüliit), autoimmuunne lümfoproliferatiivne haigus, põletikulised hüperproliferatiivsed nahahaigused, psoriaas, nagu naastuline psoriaas, tähniline psoriaas, pustuloosne psoriaas ja küünte psoriaas, atoopiaid, kaasa arvatud atoopilised haigused, nagu heinapalavik ja Jobi sündroom, dermatiit, kaasa arvatud kontaktdermatiit, krooniline kontaktdermatiit, eksofoliativdermatiit, allergiline dermatiit, allergiline kontaktdermatiit, nahalööve, taimedest põhjustatud dermatiit, nummulaarne dermatiit, ekseem, mittespetsiifiline dermatiit, primaarne ärritav kontaktdermatiit ja atoopiline dermatiit, X-seoseline hüper-IgM sündroom, allergilised silmasisesed põletikuhaigused, urtikaaria, nagu krooniline allergiline urtikaaria ja krooniline idiopaatiline urtikaaria, kaasa arvatud krooniline autoimmuunne urtikaaria, müosiit, polümüosiit/dermatomüosiit, juveniilne dermatomüosiit, toksiline epidermise nekrolüüs, sklerodermia (kaasa arvatud süsteemne sklerodermia), sklerooos, nagu süsteemne sklerooos, hulgisklerooos (*multiple sclerosis*, MS), nagu spino-optiline MS, primaarne progresseeruv MS (PPMS) ja relapseeruv remiteeruv MS (RRMS), progresseeruv süsteemne sklerooos, aterosklerooos, arteriosklerooos, hulgikoldekõvastumus, ataksiline sklerooos, silmanärvi neuromüeliit (NMO), põletikuline soolehaigus (*inflammatory bowel disease*, IBD), näiteks Crohni haigus, autoimmuunselt vahendatud gastrointestinaalsed haigused, gastrointestinaalne põletik, koliit, nagu haavandiline koliit, mikroskoopiline koliit, kollagenoosne koliit, polüüp-koliit, nekrotiseeriv enterokoliit ja transmuraalne koliit ning autoimmuunne põletikuline soolehaigus), soolepõletik, papulaarne mutsinoos, sõlmeline erüteem, primaarne skleroseeriv kolangiit, respiratoorse distressi sündroom, kaasa arvatud täiskasvanute ehk ägeda respiratoorse distressi sündroom (ARDS), meningiit, kogu uueva või selle osa põletik,

iriit, koroidiit, autoimmuunne hematoloogiline häire, transplantaadi peremehevastane haigus, angioödeem, nagu pärilik angioödeem, kraniaalnärvi kahjustus, nagu näiteks meningiidi puhul, rasedusherpes, raseduspemfigoid, skrootumikihelus, autoimmuunne enneaegne munasarjafunktsiooni kahjustus, autoimmuunsest seisundist tingitud äkiline kuulmiskaotus, IgE-vahendatud haigused, nagu anafülaksia ning allergiline ja atoopiline riniit, entsefaliit, nagu Rasmusseni entsefaliit ning limbiline ja/või ajutüve entsefaliit, uveiid, nagu anterioorne uveiid, äge anterioorne uveiid, granulomatoosne uveiid, mittegranulomatoosne uveiid, võltsantigeenne uveiid, posterioorne uveiid või autoimmuunne uveiid, glomerulonefriit (GN) nefrootilise sündroomiga või selleta, nagu krooniline või äge glomerulonefriit, nagu primaarne GN, immuunvahendatud GN, membraanne GN (membraanne nefropaatia), idiopaatiline membraanne GN või idiopaatiline membraanne nefropaatia, membraan- või membraanne proliferatiivne GN (MPGN), kaasa arvatud I tüüpi ja II tüüpi ning kiiresti progresseeruv GN (*rapidly progressive GN*, RPGN), proliferatiivne nefriit, autoimmuunne polüglandulaarne endokriinne puudulikkus, balaniit, kaasa arvatud piiratud Zoon'i balaniit (*balanitis circumscripta plasmacellularis*), balanopostiit, rõngakujuline erüteem (*erythema annulare centrifugum*), *erythema dyschromicum perstans*, mitmekujuline erüteem, rõngasgranuloom, sõlmeline lihhen (*lichen nitidus*), skleroseeriv ja atroofiliseks muutuv lihhen, krooniline neurodermatiit, nõelakujulise sarvestumusega lihhen, lame lihhen, lamelliline ihtüoos, epidermolüütiline hüperkeratoos, premaliigne keratoos, gangrenoosne püodermia, allergilised seisundid ja reaktsioonid, toiduallergiad, ravimiallergiad, putukaallergiad, haruldased allergilised häired, nagu mastotsütoos, allergiline reaktsioon, ekseem, kaasa arvatud allergiline või atoopiline ekseem, vanurite ekseem (*eczema asteatoticum*), düshidrotiline ekseem ja vesikulaarne palmoplantaarne ekseem, astma, nagu *asthma bronchiale* ehk bronhiaalastma, ja autoimmuunastma, seisundid, mis hõlmavad T-rakkude infiltratsiooni, ja kroonilised põletiku-reaktsioonid, võõrantigeenide vastased immuunreaktsioonid, nagu loote A-B-O veregruppide vastu raseduse ajal, krooniline kopsupõletik, autoimmuunne müokardiit, leukotsüütide adhesioonipuudulikkus, luupus, kaasa arvatud nefriitluupus, tserebraalne luupus, laste lupus, mitte-neeru lupus, neeruväline lupus, diskoidne lupus ja diskoidne erütematoosluupus, luupusega kaasnev alopeetsia, SLE, nagu kutaanne SLE või subaktuutne kutaanne SLE, neonaalne lupussündroom (NLE) ja dissemineerunud erütematoosluupus, juveniilse algusega (I tüüpi) diabeet, kaasa arvatud lapseea IDDM, täiskasvanueas algav diabeet (II tüüpi diabeet), autoimmuunne diabeet, idiopaatiline suhkru diabeet, diabeetiline retinopaatia, diabeetiline

nefroopaatia, diabeetiline koliit, diabeetiline suurte arterite häire, tsütokiinide ja T-lümfotsüütide poolt vahendatud ägeda ja hilineva ülitundlikkusega seotud immuunvastused, tuberkuloos, sarkoidoos, granulomatoos, kaasa arvatud lümfomatoidne granulomatoos, agranulotsütoos, vaskuliidid (kaasa arvatud suurte soonte vaskuliit, nagu reumaatiline polümüalgia ja hiidrakuline (Takayasu) arteriit, keskmiste soonte vaskuliit, nagu Kawasaki haigus, ja nodoosne polüarteriit / nodoosne periarteriit, immunovaskuliit, kesknärvisüsteemi vaskuliit, kutaanne vaskuliit, ülitundlikkusest põhjustatud vaskuliit, nekrotiseeriv vaskuliit, nagu fibrinoidne nekrotiseeriv vaskuliit ja süsteemne nekrotiseeriv vaskuliit, ANCA-negatiivne vaskuliit ja ANCA-ga seotud vaskuliit, nagu Churgi-Straussi sündroom (CSS), Wegeneri granulomatoos ja mikroskoopiline polüangiit), mööduv arteriit, aplastiline aneemia, autoimmuunne aplastiline aneemia, Coombsi-positiivne aneemia, Diamondi-Blackfani aneemia, hemolüütiline aneemia või immuunne hemolüütiline aneemia, kaasa arvatud autoimmuunne hemolüütiline aneemia (AIHA), pernitsioosne aneemia (*anemia pernicioosa*), Addisoni haigus, puhas punaste vererakkude aneemia või aplaasia (*pure red cell anemia*, PRCA), faktori VIII puudulikkus, A-hemofiilia, autoimmuunne (autoimmuunsed) neutropeenid, tsütopeniad, nagu pantsütopenia, leukopeenia, haigused, mis hõlmavad leukotsüütide diapedeesi, kesknärvisüsteemi põletikulised haigused, Alzheimeri haigus, Parkinsoni haigus, hulgiorgankahjustuse sündroom, nagu septitseemia, trauma või hemorraagia suhtes teisesed hulgiorgankahjustused, antigeeni-antikeha kompleksi poolt vahendatud haigused, antiglomerulaarse basaalmembraani haigus, fosfolipiidivastase antikeha sündroom, motoneuriit, allergiline neuuriit, Bechet' haigus/sündroom, Castelmani sündroom, Goodpasture'i sündroom, Raynaud' sündroom, Sjörgeni sündroom, Stevensi-Johnsoni sündroom, pemfigoid või pemfigus (vill-lööve), nagu armistuv (limaskestas) pemfigoid, naha pemfigoid, harilik vill-lööve, paraneoplastiline vill-lööve, lehtjas vill-lööve, limaskestas pemfigoid ja erütematoosne pemfigus, mittepärilik bulloosepidermolüüs, silmapõletik, eelistatult allergiline silmapõletik, nagu allergiline konjunktiviit, lineaarse IgA bulloosne haigus, autoimmuunselt indutseeritud konjuktiivi põletik, autoimmuunsed polüendokrinopaatiaid, Reiteri haigus või sündroom, autoimmuunsest seisundist tingitud terminaalne kahjustus, preeklampsia, immuunkompleksi häire, nagu immuunkompleksi-nefriit, antikeha-vahendatud nefriit, närvipõletikuhäired, polüneuropaatiad, krooniline neuropaatia, nagu IgG polüneuropaatiad või IgM-vahendatud neuropaatia, trombotsütopenia (nagu näiteks müokardi infarkti patsientidel), kaasa arvatud trombootiline trombotsütopeniline purpur (TTP), transfusioonijärgne purpur (*post-transfusion purpura*, PTP),

hepariini-indutseeritud trombotsütopeenias ja autoimmuunne või immuunvahendatud trombotsütopeenias, kaasa arvatud näiteks idiopaatiline trombotsütopeeniline purpur (ITP), kaasa arvatud krooniline või äge ITP, skleriit, nagu idiopaatiline keratoskleriit, episkleriit, munandite ja munasarja autoimmuunhaigused, kaasa arvatud autoimmuunne munandipõletik ja munasarjapõletik, primaarne hüpötüreoidism, hüoparatiireoidism, endokriinsed autoimmuunhaigused, kaasa arvatud türeoidiit, nagu autoimmuunne türeoidiit, Hashimoto haigus, krooniline türeoidiit (Hashimoto türeoidiit) või alaäge türeoidiit, autoimmuunne kilpnäärmehaigus, idiopaatiline hüpötüreoidism, Graves'i haigus, Graves'i silmahaigus (oftalmopaatia või kilpnäärmega seotud oftalmopaatia), polüglandulaarsündroomid, nagu autoimmuunsed polüglandulaarsündroomid, näiteks I tüüpi polüglandulaarsündroomid (või polüglandulaarsed endokrinopaatiasündroomid), paraneoplastilised sündroomid, kaasa arvatud neuroloogilised paraneoplastilised sündroomid, nagu Lamberti-Eatoni müasteeniline sündroom või Eaton-Lamberti sündroom, kangestunud mehe sündroom, entsefalomüeliit, nagu allergiline entsefalomüeliit või allergiline entsefalomüeliit ja eksperimentaalne allergiline entsefalomüeliit (EAE), raske müasteenia, nagu tümoomiga seotud raske müasteenia, väikeaju degeneratsioon, neuromüotoonia, opsokloonus- või opsokloonus-müokloonus-sündroom (OMS) ja sensoorne neuropaatia, multifokaalne motoorne neuropaatia, Sheehani sündroom, autoimmuunne hepatiit, krooniline hepatiit, lupoidhepatiit, hiidrakkude hepatiit, krooniline aktiivne hepatiit või autoimmuunne krooniline aktiivne hepatiit, pneumoniit, nagu lümfoidne interstitsiaalne pneumoniit (LIP), oblitereeruv bronhioliit (mitte transplanaadist tingitud) vs. NSIP, Guillaini-Barre sündroom, Bergeri haigus (IgA nefropaatia), idiopaatiline IgA nefropaatia, lineaarse IgA dermatoos, äge palavikuline neutrofiilne dermatoos, subkorneaalne villiline dermatoos, transientne akantolüütiline dermatoos, tsirroos, nagu primaarne biliaarne tsirroos ja pneumonotsirroos, autoimmuunse enteropaatia sündroom, tsöliaakia ehk tsöliaakiahaigus, tsöliaakia spruu (gluteenist tingitud enteropaatia), refraktoorne spruu, idiopaatiline spruu, krüoglobulineemia, nagu segatüüpi krüoglobulineemia, amülotroofne lateraalskleroos (ALS, Lou Gehrigi haigus), koronaararterite haigus, autoimmuunne kõrvahaigus, nagu autoimmuunne sisekõrvahaigus (*autoimmune inner ear disease*, AIED), autoimmuunne kuulmiskaotus, polükondriit, nagu refraktoorne või relapseerunud või relapseeruv polükondriit, pulmonaalne alveolaarne proteinoos, keratiit, nagu Cogani sündroom / mittesüfiliitiline interstitsiaalne keratiit, Belli paralüüs, Sweeti haigus/sündroom, autoimmuunne roosvistik, vöötohatisega seotud valu, amüloidoos, mitte-vähi lümfotsütoos, primaarne lümfotsütoos, mis hõlmab ka

monokloonsete B-rakkude lümfotsütoosi (näiteks healoomulist monokloonset gammopaatiat ja tundmatu tähendusega monokloonset gammopaatiat (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*, MGUS), perifeerne neuropaatia, paraneoplastiline sündroom, ioonikanalite haiguslikud seisundid, nagu epilepsia, migreen, arütmia, lihashäired, kuulmisvõimetus, pimedus, perioodiline paralüüs, ja kesknärvisüsteemi ioonikanalite haiguslikud seisundid, autism, põletikuline müopaatia, fokaalne või segmentaarne või fokaal-segmentaarne glomeruloskleroos (*focal segmental glomerulosclerosis*, FSGS), endokriinne oftalmpaatia, uveoretiniit, korioretiniit, autoimmuunne hepatoloogiline häire, fibromüalgia, endokriinne hulgi puudulikkus, Schmidti sündroom, adrenaliit, mao atroofia, preseniilne dementsus, demüeliniseerivad haigused, nagu autoimmuunsed demüeliniseerivad haigused ja krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, Dressleri sündroom, areaatne alopeetsia, täielik alopeetsia, CREST sündroom (kaltsinoos, Raynaud' fenomen, ösofageaalne düsmotiilsus, daktüloskleroos ja telangiiektaasia), meeste ja naiste autoimmuunne viljatus, näiteks spermatoosididevastastest antikehadest tingitud viljatus, segatüüpi sidekoehaigus, Chagas' haigus, reumaatiline palavik, korduv raseduse katkemine, farmerikops, multiformne erüteem, karidotoomne sündroom, Cushingi sündroom, linnukasvataja kops, allergiline granulomaatosne angiit, healoomuline lümfotsütaarne angiit, Alporti sündroom, alveoliit, nagu allergiline alveoliit ja fibroosne alveoliit, interstitsiaalne kopsuhaigus, transfusioonireaktsioon, leepira, malaaria, parasiitidest põhjustatud haigused, nagu leišmaniaas, küpanosomiaas, šistosomiaas, askariaas, aspergilloos, Sampteri sündroom, Caplani sündroom, denguepalavik, endokardiit, endomüokardi fibroos, difuusne interstitsiaalne kopsufibroos, idiopaatiline kopsufibroos, tsüstiline fibroos, endoftalmiit, krooniline reljeefne erüteem, loote erütroblastoos, eosinofiilne rahhiit, Shulmani sündroom, Felty sündroom, filariaas, tsükliit, nagu krooniline tsükliit, heterokrooniline tsükliit, iridotsükliit (äge või krooniline), või Fuchi tsükliit, Henochi-Schonleini purpur, inimese immuunpuudulikkuse viiruse (*human immunodeficiency virus*, HIV) infektsioon, SCID, omandatud immuunpuudulikkuse sündroom (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS), ehoviiruse infektsioon, sepsis (süsteemse põletikuvasutuse sündroom (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS)), endotokseemia, pankreatiit, türoksikoos, parvoviiruse infektsioon, rubellaviiruse infektsioon, vaksineerimisjärgsed sündroomid, kongenitaalne rubellanakkus, Epstein-Barri viiruse nakkus, mumps, Evansi sündroom, autoimmuunne sugunäärmete puudulikkus, Sydenhami korea, streptokokijärgne nefriit, tromboosne põletik, türeotoksikoos, seljaajukuive (*tabes dorsalis*), korioidiit, hiidra-

kuline polümüalgia, krooniline hüpersensitiivne pneumoniit, konjunktiviit, nagu kevadine nohu, kuiv keratokonjunktiviit ja epideemiline keratokonjunktiviit, idiopaatiline nefriitiline sündroom, minimaalsete muutustega nefropaatia, healoomuline perekondlik ja isheemia-reperfusioonikahjustus, siiratud organi reperfusioon, reetnavastane autoimmuunsus, liigestepõletik, bronhiit, krooniline obstruktiivne hingamisteede haigus / kopsuhaigus, silikoos, suu limaskestast haavand, aftoosne stomatiit, arteriosklerootilised häired (tserebraalne vaskulaarne puudulikkus), nagu arteriosklerootiline entsefalopaatia ja arteriosklerootiline retinopaatia, aspermatogenees, autoimmuunne hemolüüs, Boeck'i haigus, krüoglobulineemia, Dupuytreni kontraktuur, fakoanafülaktiline endoftalmia, allergiline enteriit, sõlmjas leepraerütem, idiopaatiline näohalvatus, kroonilise väsimuse sündroom, reumaatiline palavik, Hammani-Richi haigus, sensoneuraalne kuulmiskaotus, paroksüsmaatiline hemoglobiinuuria, hüpogonadism, regionaalne enteriit, leukopeenia, nakkuslik mononukleoos, seljaaju ristisuunaline põletik, primaarne idiopaatiline müksödeem, nefroos, sümpaatiline silmapõletik, vastsündinute silmapõletik, optiline neuriit, granulomatoosne orhiit, pankreatiit, äge polüradikuliit, gangrenoosne püodermia, Quervaini türeoidiit, omandatud põrnaatroofia, mittepahaloomuline tümoom, lümfofollikulaarne tüümusepõletik, vitiliigo, toksilise šoki sündroom, toidumürgitus, T-rakkude infiltratsiooni hõlmavad seisundid, leukotsüütide adhesioonipuudulikkus, tsütokiinide ja T-rakkude poolt vahendatud ägeda ja viivitava ülitundlikkusega seotud immuunvastused, leukotsüütide diapedeesi hõlmavad haigused, hulgiorgankahjustuse sündroom, antigeeni-antikeha kompleksi poolt vahendatud haigused, antiglomerulaarse basaalmembraani haigus, autoimmuunsed polüendopaatiad, ooforiit, primaarne müksödeem, autoimmuunne atroofiline gastriit, reumaatilised haigused, segatüüpi sidekoehaigus, neerusündroom, insuliit, polüendokriinne puudulikkus, autoimmuunsed polügrandulaarsed sündroomid, kaasa arvatud 1. tüüpi polüglandulaarne sündroom, täiskasvanuea idiopaatiline hüpoparathüroidism (*adult-onset idiopathic hypoparathyroidism*, AOIH), kardiomiopaatia, nagu dilateerunud kardiomiopaatia, mittepärilik bulloosepidermolüüs (*epidermolysis bullosa acquisita*, EBA), hemokromatoos, müokardiit, neerusündroom, primaarne skleroseeriv kolangiit, mädane või mittemädane sinusiit, äge või krooniline sinusiit, etmoidiit, frontaalne, maksillaarne või sfenoidne sinusiit, allergiline sinusiit, eosinofiilidega seotud häire, nagu eosinofiilia, kopsuinfiltratsiooniga eosinofiilia, eosinofiilia-müalgia sündroom, Loffleri sündroom, krooniline eosinofiilne pneumoonia, troopiline pulmonaalne eosinofiilia, bronhopneumooniline aspergilloos, aspergilloom, või granuloomid, mis sisaldavad eosinofiile, anafülaksia, spondüloartropaatiaid, seronegatiiv-

sed spondüoartriidid, polüendokriinne autoimmuunhaigus, skleroseeriv kolangiit, skleriit, episkleriit, krooniline mukokutaanne kandidiaas, Brutoni sündroom, lapsea transientne hü-pogammaglobulineemia, Wiskotti-Aldrichi sündroom, ataksia-telangiektaasia sündroom, angiiektaasia, kollageenihaigusega seotud autoimmuunhäired, reumatism, nagu krooniline artro-reumatism, lümfadeniit, vererõhu vastuse vähenemine, vaskulaarne düsfunktsioon, koekahjustus, kardiovaskulaarne isheemia, hüperalgeesia, neeruisheemia, ajuisheemia ja vaskulari-satsiooniga kaasnev haigus, allergilise ülitundlikkuse häired, glomerulonefriidid, reperfusioo-nikahjustus, isheemiline reperfusioonihäire, müokardi või muude kudede kahjustus, lümfaa-tiline trahheobronhiit, põletikulised dermatoosid, ägeda põletikukomponendiga dermatoosid, hulgiorganpuudulikkus, bulloossed haigused, neeru kortikaalne nekroos, äge mädane meningiit või muud kesknärvisüsteemi põletikuhäired, silma ja silmakooa põletikulised häired, granu-lotsüütide transfusiooniga seotud sündroomid, tsütokiinide poolt esile kutsutud toksilisus, narkolepsia, äge raske põletik, krooniline raskesti ravitav põletik, püeliit, endarteriaalne hü-perplaasia, maohaavand, valvuliit ja endometriioos. Siin peetakse silmas nende haiguste ravi-mist antikeha manustamise abil, mis seondub B-rakkude pinnamarkeriga nagu CD79b ja see ravi hõlmab siin avaldatud konjugeerimata (palja“) antikeha või tsütotoksilise ainega konju-geeritud antikeha manustamist. Siin peetakse silmas ka nende haiguste ravimist kombi-natsioonravi abil, mis hõlmab leiutisekohase CD79b-vastase antikeha või CD79b-vastase antikeha ja ravimi konjugaadi manustamist koos teise antikeha või antikeha ja ravimi konju-gaadiga, teise tsütotoksilise aine, kiirituse või muu raviga, mis manustatakse kas samaaegselt või järjestikku.

[0206] „Ravimine“ või „ravi“ või „leevendamine“ tähendab nii terapeutilist ravi kui profü-laktilisi või preventiivseid meetmeid, kusjuures eesmärgiks on tõkestada või alandada (vä-hendada) sihtmärgiks olevat patoloogilist seisundit või häiret. Ravi vajajate hulka kuuluvad nii need, kellel juba vastav häire esineb, kui need, kellel on kalduvus nimetatud häireks, või need, kellel see häire tuleb ära hoida. Isik või imetaja on CD79b polüpeptiidi ekspresseeriva vähi suhtes edukalt "ravitud" juhul, kui pärast CD79b-vastase antikeha manustamist käes-oleva leiutise meetodite kohaselt on patsiendil täheldatav ja/või mõõdetav ühe või mitme järgneva seisundi vähenemine või puudumine: vähirakkude arvu vähenemine või vähiraku-de puudumine; kasvaja suuruse vähenemine, vähirakkude perifeersetesse organitesse infilt-reerumise, kaasa arvatud vähi pehmetesse kudedesse ja luukoosse levimine, inhibeerimine (st teatud määral aeglustamine ja eelistatult peatamine), kasvaja metastaaside inhibeerimine (st



teatud määral aeglustamine ja eelistatult peatamine), kasvaja kasvu inhibeerimine teatud määral ja/või teatud määral ühe või mitme spetsiifilise vähiga seotud sümptomi leevendamine, haigestumuse ja suremuse vähendamine ja elukvaliteedi parendamine. Selles ulatuses, kus CD79b-vastane antikeha võib tõkestada vähirakkude kasvu ja/või tappa olemasolevaid vähirakke, võib ta olla tsütostaatiline ja/või tsütotoksiline. Nende tunnuste või sümptomite vähenemist võib tunda ka patsient.

[0207] Eeltoodud parameetrid eduka ravi ja haiguse paranemise hindamiseks on kergesti mõõdetavad arstile tuttavate tavapärase protseduuride abil. Vähiravi puhul saab tõhusust mõõta näiteks haiguse progresseerumise aja (*the time of disease progression*, TTP) ja/või vastuse määra järgi (*response rate*, RR). Metastaase saab määrata staadiumitestide abil ja luude skaneerimise abil ning kaltsiumi taseme ja teiste ensüümide testimise abil, et määrata vähi levimist luukoosse. Saab teha ka CT skaneeringuid, et vaadata levimist vaagnasse ja piirkonna lümfisõlmedesse. Kopsus ja maksas olevate metastaaside otsimiseks kasutatakse vastavalt rinnakorvi röntgenit ja maksaensüümide taseme mõõtmist tuntud meetodite abil. Teiste haiguse jälgimise meetodite hulka kuuluvad transrektaalne ultrasonograafia (TRUS) ja transrektaalne nõelbiopsia (*transrectal needle biopsy*, TRNB).

[0208] Põievähi puhul, mis on enam lokaliseerunud vähk, kuuluvad haiguse progresseerumise määramise meetodite hulka põie tsütoloogiline hindamine tsüstoskoopia abil, vere olemasolu jälgimine uriinis, kusetrakti visualiseerimine sonograafia abil või intravenoosne püelogramm, kompuutertomograafia (*computer tomography*, CT) ja magnetresonantskuvaamine (*magnetic resonance imaging*, MRI). Kaugemate metastaaside olemasolu saab hinnata allkeha CT abil, rinnakorvi röntgeni abil või luustiku radionukliidkuvamise abil.

[0209] „Krooniline“ manustamine tähendab aine(te) manustamist pidevas režiimis vastandina akuutsele režiimile, et säilitada algset terapeutilist toimet (aktiivsust) pikema ajaperioodi jooksul. „Vahelduv“ manustamine on ravi, mida ei tehta järjestikku, katkestusteta, vaid see on pigem loomult tsükliline.

[0210] „Indiviid“ on selgroogne. Teatud teostustes on selgroogne imetaja. Imetajate hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, põllumajandusloomad (nagu lehmad), spordiloomad, lemmikloomad (nagu kassid, koerad ja hobused), primaadid, hiired ja rotid. Teatud teostustes on imetaja inimene.

[0211] „Imetaja“ tähendab vähi ravimise või sümptomite leevendamise eesmärgil ükskõik missugust looma, mis liigitatakse imetajaks, kaasa arvatud inimene, kodu- ja põllumajandus-

loomad ning loomaia-, spordi- ja lemmikloomad, nagu koerad, kassid, veised, hobused, lambad, sead, kitsed, küülikud jne. Eelistatult on imetaja inimene.

[0212] Manustamine „kombineeritult (koos)" ühe või mitme täiendava terapeutilise ainega hõlmab nii nende samaaegset (kaasnevat) kui järjestikku manustamist ükskõik missuguses järjekorras.

[0213] „Kandjad“ tähendab siin kasutatuna farmatseutiliselt vastuvõetavaid kandjaid, abiaineid või stabiliseerijaid, mis ei ole kasutatavates annustes ja kontsentratsioonides eksponeerimisel rakule või imetajale toksilised. Sageli on füsioloogiliselt vastuvõetav kandja puhverdatud pH-ga vesilahus. Füsioloogiliselt vastuvõetavate kandjate näidete hulka kuuluvad puhvrid, nagu fosfaat-, tsitraat- ja muude orgaaniliste hapete puhvrid, antioksüdandid, kaasa arvatud askorbiinhape, väikese molekulmassiga (alla 10 jäägi) polüpeptiidid, valgud, nagu seerumi albumiin, želatiin või immunoglobuliinid, hüdrofiilsed polümeerid nagu polüvinüül-pürrolidoon, aminohapped, nagu glütsiin, glutamiin, asparagiin, arginiin või lüsiin, monosahhariidid, disahhariidid ja teised süsivesikud, kaasa arvatud glükoos, mannoos või dekstriinid, kelaativad ained nagu EDTA, sukuralkoholid, nagu mannitool või sorbitool, soola moodustavad vastasioonid nagu naatriumiioonid ja/või mitteioonsed pindaktiivsed ained, nagu TWEEN<sup>®</sup>, polüetüleenglükool (PEG) ja PLURONICS<sup>®</sup>.

[0214] „Tahke faasi“ või „tahke toese“ all mõeldakse mittevesilahus-maatriksit, millele leiu-tisekohase antikeha saab kleepida või kinnitada. Siin hõlmataivate tahkete faaside näidete hulka kuuluvad need, mis on osaliselt või täielikult moodustunud klaasist (näiteks reguleeritud poorsusega klaasist), polüsahhariididest (näiteks agarosist), polüakrüülamiididest, polüstüreenist, polüvinüülalkoholist ja silikoonidest. Teatud teostustes, sõltuvalt kontekstist, võib tahke faas hõlmata testiplaadi süvendit, teistes on see puhastuskolonn (näiteks afiinsuskromatograafia kolonn). See termin hõlmab ka diskreetsetest osakestest koosnevat katkelist tahket faasi, näiteks US patendis nr. 4275149 kirjeldatud osakestest koosnevat tahket faasi.

[0215] „Liposoom“ on väike vesiikul, mis koosneb erinevat tüüpi lipiididest, fosfolipiididest ja/või pindaktiivsest ainest ning mis on kasulik ravimi (näiteks CD79b-vastase antikeha) imetaja organismi kohaletoimetamiseks. Liposoomi komponendid on tavaliselt korrastatud kahekihilise kujundusena, sarnaselt lipiidide korrastatusega bioloogilistes membraanides.

[0216] „Väike“ molekul või „väike“ orgaaniline molekul defineeritakse siin molekulina, mille molekulmass on alla 500 Da.

[0217] „Indiviid“, „subjekt“ või „patsient“ on selgroogne organism. Teatud teostustes on selgroogne organism imetaja. Imetajate hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, põllumajandusloomad (nagu lehmad), spordiloomad, lemmikloomad (nagu kassid, koerad ja hobused), primaadid, hiired ja rotid. Teatud teostustes on imetaja inimene.

[0218] Termin „farmatseutiline preparaati“ tähendab sellises vormis preparaati, mis võimaldab selle toimeaine bioloogilisel aktiivsusel olla efektiivne ja mis ei sisalda täiendavaid komponente, mis oleksid vastuvõtmatult toksilised subjektile, kellele seda preparaati manustatakse. Need preparaadid võivad olla steriilsed.

[0219] „Steriilne“ preparaati on aseptiline ehk vaba kõigist elusatest mikroorganismidest ja nende eostest.

[0220] Siin avaldatud antikeha „efektiivne kogus“ on kogus, mis on piisav spetsiifiliselt väidetud eesmärgi saavutamiseks. „Efektiivse koguse“ väidetud eesmärgi suhtes võib määrata empiirilisel ja tavapärasel viisil.

[0221] Termin „terapeutiliselt efektiivne kogus“ tähendab antikeha või muu ravimi kogust, mis on efektiivne subjektile või imetajal esineva haiguse või häire „ravimiseks“. Vähi puhul võib ravimi terapeutiliselt efektiivne kogus vähendada vähirakkude arvu, vähendada kasvaja suurust, inhibeerida (st teatud määral aeglustada ja eelistatult peatada) vähirakkude infiltreerumist perifeersetesse organitesse, inhibeerida (st teatud määral aeglustada ja eelistatult peatada) kasvaja metastaseerumist, inhibeerida teatud määral kasvaja kasvu ja/või leevendada teatud määral ühte või mitut vähiga seotud sümptomit, vt. siin „ravimise“ definitsiooni. Selle määrani, kus ravim võib tõkestada olemasolevate vähirakkude kasvu ja/või neid tappa, võib ta olla tsütostaatiline ja/või tsütotoksiline. „Profülaktiliselt efektiivne kogus“ tähendab ükskõik missugust kogust, mis vajalikes annustes ja vajaliku ajaperioodi kestel on efektiivne soovitud profülaktilise tulemuse saavutamiseks. Tavaliselt, kuid mitte tingimata, on profülaktiliselt efektiivne kogus väiksem kui terapeutiliselt efektiivne kogus, kuna profülaktilist annust kasutatakse subjektidel enne haigust või selle kõige varasemas staadiumis.

[0222] CD79b-vastase antikeha „kasvu inhibeeriv kogus“ on kogus, mis on suuteline inhibeerima raku kasvu, eriti kasvaja, näiteks vähiraku, kasvu *in vitro* või *in vivo*. CD79b-vastase antikeha „kasvu inhibeeriv koguse“ neoplastilise raku kasvu inhibeerimiseks võib määrata empiirilisel tavapärasel viisil.

[0223] CD79b-vastase antikeha „tsütotoksiline kogus“ on kogus, mis on suuteline põhjustama raku hävimist, eriti kasvaja, näiteks vähiraku, hävimist *in vitro* või *in vivo*. CD79b-

vastase antikeha „tsütotoksilise koguse“ neoplastilise raku hävitamiseks võib määrata empiirilisel tavapärasel viisil.

[0224] „CD79b ekspresseeriv rakk“ on rakk, mis ekspresseerib endogeenset või transfekteeritud CD79b polüpeptiidi kas raku pinnal või sekreteeritavas vormis. „CD79b ekspresseeriv vähk“ on vähk, mis sisaldab rakke, mille pinnal esineb CD79b polüpeptiidi või mis toodavad ja sekreteerivad CD79b polüpeptiidi. „CD79b ekspresseeriv vähk“ toodab rakkude pinnal vajadusel piisaval tasemel CD79b polüpeptiidi, et CD79b-vastane antikeha saab sellele seonduda ja anda vähi suhtes terapeutilise efekti. Teises teostuses toodab ja sekreteerib „CD79b ekspresseeriv vähk“ vajadusel piisaval tasemel CD79b polüpeptiidi, et CD79b-vastase antikeha antagonist saab sellega seonduda ja anda vähi suhtes terapeutilise efekti. Viimasel juhul võib antagonist olla *antisense* oligonukleotiid, mis vähendab, inhibeerib või tõkestab sekreteeritava CD79b polüpeptiidi tootmist ja sekreteerimist kasvajakarude poolt. Vähk, mis „ekspresseerib üle“ CD79b polüpeptiidi, on vähk, mis sisaldab oma rakkude pinnal või siis toodab ja sekreteerib märkimisväärselt kõrgemal tasemel CD79b polüpeptiidi kui sama koetüübi mittevähirakk. Selline üleekspressioon võib olla põhjustatud geeni amplifikatsioonist või suurenenud transkriptsiooni või translatsiooni tasemest. CD79b polüpeptiidi üleekspressiooni võib määrata detekteerimis- või prognostilise testi abil, hinnates raku pinnal oleva CD79b valgu või rakkude poolt sekreteeritava CD79b valgu kõrgeenenud tasemeid (näiteks immunohistokeemilise testi abil, kasutades CD79b-vastaseid antikehi, mis on valmistatud eraldatud CD79b polüpeptiidi vastu, mille võib valmistada CD79b polüpeptiidi kodeerivast eraldatud nukleiinhapest, kasutades rekombinantse DNA tehnoloogiat, FACS analüüsi abil jne.). Alternatiivselt või täiendavalt võib rakus mõõta CD79b kodeeriva nukleiinhappe või mRNA taset näiteks fluorestsentsi *in situ* hübriidsatsiooni meetodil, kasutades CD79b kodeerivale nukleiinhappele või selle komplemendile vastavat nukleiinhappepõhist sondi (FISH, vt. WO 98/45479, avaldatud oktoobris 1988), *Southern* blotti, *northern* blotti või polümeraasi ahelreaktsiooni (*polymerase chain reaction*, PCR) meetodeid, nagu reaalaaja kvantitatiivne PCR (RT-PCR). CD79b polüpeptiidi üleekspressiooni võib uurida ka bioloogilisse vedelikku, näiteks seerumisse, sattunud antigeeni mõõtmise abil, kasutades näiteks antikehapõhiseid teste (vt. ka näiteks US patenti nr. 4933294, välja antud 12. juunil 1990; WO 91/05264, avaldatud 18. aprillil 1991; US patenti nr. 5401638, välja antud 28. märtsil 1995, ja artiklit: Sias et al., J. Immunol. Methods, 132: 73-80 (1990)). Eelnimetatud testide kõrval on eriala asjatundjale saadaval ka erinevad *in vivo* testid. Näiteks võib patsiendi orga-

nismis olevaid rakke eksponeerida antikehale, mis on valikuliselt märgistatud detekteeritava märgise, näiteks radioaktiivse isotoobiga, ning antikeha seondumist patsiendi rakkudega saab hinnata näiteks radioaktiivsuse välise skaneerimisega või eelnevalt antikehale eksponeeritud patsiendilt võetud biopsia analüüsimisel.

[0225] Siin kasutatuna tähistab termin „immunoadhesiin“ antikehasarnaseid molekule, kus heteroloogse valgu („adhesiini“) seondumise spetsiifilisus on ühendatud immunoglobuliinide konstantsete domeenidega seondumise spetsiifilisusega. Struktuurselt sisaldavad immunoadhesiinid aminohapete järjestust, mille soovitud sidumisspetsiifilisus on antikeha antigeeni äratundmis- ja sidumissaidi omast erinev (st on „heteroloogne“), ja immunoglobuliini konstantse domeeni järjestust. Immunoadhesiini molekuli adhesiini osa on tavaliselt pidev aminohapete järjestus, mis sisaldab vähemalt retseptori või ligandi sidumissaiti. Immunoadhesiinis oleva immunoglobuliini konstantse domeeni järjestus võib olla saadud ükskõik missugusest immunoglobuliinist, nagu IgG-1, IgG-2, IgG-3 või IgG-4 alatüübid, IgA (kaasa arvatud IgA-1 ja IgA-2), IgE, IgD või IgM.

[0226] Sõna „märgis“ tähendab siin kasutatuna detekteeritavat ühendit või kompositsiooni, mis on konjugeeritud antikehaga kas otse või kaudselt „märgistatud“ antikeha saamiseks. Märgis võib olla kas ise detekteeritav (näiteks radioisotoopmärgised või fluorestseeruvad märgised) või ensümaatilise märgise puhul võivad nad katalüüsida substraatühendi või -kompositsiooni keemilist muundamist, mis on detekteeritav.

[0227] Termin „tsütotoksiline aine“ tähendab siin kasutatuna ainet, mis inhibeerib või takistab rakkude funktsioneerimist ja/või põhjustab rakkude hävimist. Termin on mõeldud hõlmama radioisotoope (näiteks  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$  ja Lu radioaktiivsed isotoobid), kemoterapeutilisi aineid, näiteks metotreksaati, adriamütsiini, vinca alkaloidide (vinkristiin, vinblastiin, etoposiid), doksorubitsiini, melfalaani, mitomütsiin C, kloorambutsiili, daunorubitsiini või muid interkaleeruvaid ühendeid, ensüüme ja nende fragmente nagu nukleolüütilised ensüümid, antibiootikume ja toksiine, nagu väikesemolekulilised toksiidid või bakteriaalse, seente, taimse või loomse päritoluga ensümaatilistelt aktiivsed toksiidid, kaasa arvatud nende fragmendid ja/või variandid, ning erinevaid allpool avaldatud kasvajakasvustaseid või vähivastaseid aineid. Allpool on kirjeldatud ka teisi tsütotoksilisi aineid. Tumoritsiidne aine põhjustab kasvajakrakkude hävimist.

[0228] „Toksiin“ on ükskõik missugune aine, mis on võimeline avaldama rakkude kasvule või proliferatsioonile kahjulikku toimet.

[0229] „Kemoterapeutiline aine“ on keemiline ühend, mis on kasulik vähi ravimiseks sõltumata toimemehhanismist. Kemoterapeutiliste ainete klassidesse kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud: alküülivad ained, antimetaboliidid, kikkapuu mürgised taimealkaloidid, tsütotoksilised/kasvajavastased antibiootikumid, topoisomeraasi inhibiitorid, antikehad, fotosensibiliseerijad ja kinaaside inhibiitorid. Kemoterapeutiliste ainete hulka kuuluvad ühendid, mida kasutatakse „suunatud teraapias“ ja tavapärasel kemoterapias. Kemoterapeutiliste ainete näidete hulka kuuluvad: erlotiniib (TARCEVA®), Genentech/OSI Pharm.), dotsetakseel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouratsüül, 5-fluorouratsüül, CAS nr. 51-21-8), gemtsitabiin (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS nr. 391210-10-9, Pfizer), tsisplatiin (dikloroplaatina(II)-*cis*-diamine, CAS nr. 15663-27-1), karboplatiin (CAS nr. 41575-94-4), paklitakseel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temosolomiid (4-metüül-5-okso-2,3,4,6,8-pentasabitsüklo[4.3.0]nona-2,7,9-trieen-9-karboksamiid, CAS nr. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoksifeen ((*Z*)-2-[4-(1,2-difenüülbut-1-enüül)fenoksü]-*N,N*-dimetüül-etaanamiin, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®, ja doksombitsiin (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD ja rapamütsiin.

[0230] Kemoterapeutiliste ainete näidete hulka kuuluvad veel oksaliplatiin (ELOXATIN®, Sanofi), bortesomiib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrosool (FEMARA®, Novartis), imatiniib-mesülaad (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (Mek inhibiitor, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (Mek inhibiitor, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (PI3K inhibiitor, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (PI3K inhibiitor, Novartis), XL-147 (PI3K inhibiitor, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leukovoriin (foliinhape), rapamütsiin (siroliimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo SmithKline), lonafamiib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafeniib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), getitiniib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotekaan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifamiib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (kremoforivaba), albumiiniga konstrueeritud paklitakseeli nanoosakeste preparaadid (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), vandetaniib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), klorambutsiil, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pasopaniib (GlaxoSmithKline), kanfosfamiid (TELCYTA®), Telik), tiotepa ja tsüklofosfamiid (CYTOXAN®, NEOSAR®); alküülsulfonaadid, nagu

busulfaan, improsulfaan ja piposulfaan, asiridiinid, nagu bensodopa, karbokviin, meritredopa ja uredopa, etüleenimiinid ja metüülmelamiinid, kaasa arvatud altrelamiin, trietüleenmelamiin, trietüleenfosforamiid, trietüleentiofosforamiid ja trimetülmelamiin, atsetogeniinid (eriti bullatatsiin ja bullatatsinoon), kamptotetsiin (kaasa arvatud selle sünteetiline analoog topotekaan), brüostatiin, kallistatiin, GG-1065 (kaasa arvatud selle sünteetilised analoogid adoselesiin, karselesiin ja biselesiin), krüptofütsiinid (eriti krüptofütsiin 1 ja krüptofütsiin 8), dolastatiin, duokarmütsiin (kaasa arvatud selle sünteetilised analoogid KW-2189 ja CB1-TM1), eleuterobiin, pankratiin, sarokdiktüin, spongistatiin, lämmastikipriidid, nagu kloorambutsiil, kloornafasiin, klorofosfamiid, estramustiin, ifosfamiid, mekloreтамиin, mekloreтамиinoksiidhüdrokloriid, melfalaan, novembitsiin, fenesteriin, prednimustiin, trofosfamiid, uratsüülpriit, nitrosouuread, nagu karmustiin, klorosototsiin, fotemustiin, lomustiin, nimustiin ja ranimustiin, antibiootikumid, nagu eendiüünantibiootikumid (näiteks kaliheamütsiin, kaliheamütsiin gammal II, kaliheamütsiin omega II (Angew. Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33: 183-186); dünemütsiin, dünemütsiin A, bisfosfonaadid, nagu klodronaat, esperamütsiin, samuti neokartsinostatiin-kromofoor ja sellega suguluses olevad kromoproteiinid (eendiüünantibiootikumid-kromofoorid), aklatsinomütsiinid, aktinomütsiin, autramütsiin, asaseriin, bleomütsiinid, kaktinomütsiin, karabitsiin, karminomütsiin, karsinofiliin, kromomütsiinid, daktinomütsiin, daunorubitsiin, detorubitsiin, 6-diaso-5-okso-L-norleutsiin, morfolinodoksoorubitsiin, tsüanomorfolinodoksoorubitsiin, 2-pürrolinodoksoorubitsiin ja desoksüdoksoorubitsiin), epirubitsiin, esorubitsiin, idarubitsiin, martsellomütsiin, mitomütsiinid nagu mitomütsiin C, mükofenoolhape, nogalamütsiin, olivomütsiinid, peplomütsiin, porfiromütsiin, puromütsiin, kvelamütsiin, roborubitsiin, streptonigriin, streptosotsiin, tubertsidiin, ubenimeks, zinostatiin, zorubitsiin, antimetaboliidid, nagu metotreksaat ja 5-fluorouratsüül (5-FU), foolhappe analoogid, nagu denopteriin, metotreksaat, pteropteriin, trimetreksaat, puuriini analoogid, nagu fludarabiin, 6-merkaptopuriin, tiamipriin, tioguaaniin, pürimidiini analoogid, nagu antsitabiin, asatsütidiin, 6-asauridiin, karmofur, tsütarabiin, didesokdüüridiin, doksifluridiin, enotsitabiin, floksuridiin, androgeenid, nagu kalusteroon, dromostanoolonpropionaat, epitiostanool, mepitiostaan, testolaktoon, adrenaliini supresseerijad, nagu aminoglutetimiid, mitotaan, trilostaan, foolhappe varude täiendajad nagu froliinhape, atseglatoon, aldofosfamiidglükosiid, aminolevuliinhape, eniluratsüül, amsakriin, bestrabutsiil, bisantreen, edatraksaat, defofamiin, demekoltsiin, diasikvoon, elfomilhiin, elliptiiniumatsetaat, epitiiloon, etoglütsiid, galliumnitraat, hüdroksüürea, lentinaan, lonidainiin, maitansinoidid, nagu

maitansiin ja ansamitotsiinid, mitoguasoon, mitoksantroon, mopidanmool, nitraeriin, pento-statiin, fenamet, pirarubitsiin, losoksantroon, podofüllinhape, 2-etüülhüdrasiid, prokarbasiin, PSK® polüsahhariidkompleks (JHS Natural Products, Eugene, OR), rasoksaan, risoksiin, sisofraan, spirogemlaanium, tenuasoonhape, triasikvoon, 2,2',2"-triklorotrietüülamiin, trihotetseenid (eriti T-2 toksiin, verrakuriin A, roridiin A ja anguidiin), uretaan, vindesiin, dakar-basiin, mannomustiin, mitobronitool, mitolaktool, pipobromaan, gatsütsiin, arabinosiid ("Ara-C"), tsüklofosfamiid, tiotepa, 6-tioguaaniin, merkaptopuriin, metotreksaat, plaatina-ana-loogid, nagu tsisplatiin ja karboplatiin, vinblastiin, etoposiid (VP-16), ifosfamiid, mito-ksantroon, vinkristiin, vinorelbiin (NAVELBINE®), novantroon, teniposiid, edatreksaat, daunomütsiin, aminopteriin, kaptsiitabiin (XELODAL®, Roche), ibandronaat, CPT-11, topo-isomeraasi inhibiitor RFS 2000, difluorometülomitiin (DMFO), retinoidid nagu retinoehape, ning kõigi eespool nimetatute farmatseutiliselt vastuvõetavad soolad, happed ja derivaadid.

[0231]"Kemoterapeutilise aine" definitsioon hõlmab ka (i) hormoonivastaseid aineid, mis reguleerivad või inhibeerivad hormoonide poolt kasvajatele avaldatavat toimet, nagu anti-östrogeenid ja selektiivsed östrogeenireseptorite modulaatorid (*selective estrogen receptor modulator*, SERM), kaasa arvatud näiteks tamoksifeen (kaasa arvatud NOLVADEX®; tam-oksifeentsitraat), raloksifeen, droloksifeen, 4-hüdroksütamoksifeen, trioksifeen, keoksifeen, LY117018, onapristoon ja FARESTON® (toremifiintsitraat), (ii) aromataasi inhibiitorid, mis inhibeerivad ensüümi aromataas, mis reguleerib östrogeeni tootmist neerupealistes, nagu näiteks 4(5)-imidasoolid, aminoglutetimiid, MEGASE® (megestrolatsetaat), AROMASIN® (eksemestaan, Pfizer), formestanik, fadrosool, RIVISOR® (vorosool), FEMARA® (letro-sool, Novartis) ja ARIMIDEX® (anastrosool, AstraZeneca), (iii) antiandrogeenid, nagu flutamiid, nilutamiid, bikalutamiid, leuproliid ja gosereliin, samuti troksatsitabiin (1,3-diok-solaan - nukleosiidi tsütosiini analoog), (iv) proteiinkinaaside inhibiitorid, nagu MEK inhibii-torid (WO 2007/044515), (v) lipiidkinaaside inhibiitorid, (vi) *antisense* oligonukleotiidid, eriti need, mis inhibeerivad hälbivasse rakuproliferatsiooni kaasatud signaaliradade geenide ekspressiooni, näiteks PKC-alfa, Raf ja H-Ras, nagu oblimerseen (GENASENSE®, Genta Inc.), (vii) ribosüümid, nagu VEGF ekspressiooni inhibiitorid (näiteks ANGIOZYME®) ja HER2 ekspressiooni inhibiitorid, (viii) vaktsiinid, nagu geeniteraapia vaktsiinid, näiteks ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® ja VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2, topoisomeraas 1 inhibiitorid, nagu LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH, (ix) angiogeneesivastased ained,



nagu bevatsizumab (AVASTIN®, Genentech), ning kõigi eespool nimetatute farmatseutiliselt vastuvõetavad soolad, happed ja derivaadid.

[0232] “Kemoterapeutiliste ainete” definitsioon hõlmab ka terapeutilisi antikehi, nagu alemtuzumab (Campath), bevatsizumab (AVASTIN®, Genentech), tsetuksimab (ERBITUX®, Imclone), panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituksimab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERGEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixia), ning antikeha ja ravimi konjuugaati gemtuzumab-osogamütsiin (MYLOTARG®, Wyeth).

[0233] “Kasvu inhibeeriv aine” tähendab siin kasutatuna ühendit või kompositsiooni, mis inhibeerib rakkude kasvu, eriti CD79b ekspresseerivate vähirakkude kasvu *in vitro* või *in vivo*. Seega võib kasvu inhibeeriv aine olla selline, mis oluliselt vähendab S-faasis olevate CD79b ekspresseerivate rakkude arvu. Kasvu inhibeerivate ainete näidete hulka kuuluvad ained, mis blokeerivad rakutsükli kulgemist (S-faasist erinevas kohas), nagu ained, mis indutseerivad peatumise G1-faasis või M-faasis. Klassikaliste M-faasi blokeerijate hulka kuuluvad vinka alkaloidid (vinkristiin ja vinblastiin), taksaanid ja topoisomeraas II inhibiitorid, nagu doksorubitsiin, epirubitsiin, daunorubitsiin, etoposiid ja bleomütsiin. Need ained, mis peatavad G1, peatavad ka S-faasi, näiteks DNA alküülivad ained, nagu tamoksifeen, prednisoon, dakarbasiin, mekloretamiin, tsisplatiin, metotreksaat, 5-fluorouratsüül ja ara-C. Täiendavat informatsiooni saab leida teose: The Molecular Basis of Cancer, toim. Mendelsohn ja Israel, peatükist I pealkirjaga: "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", autorid Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), eriti leheküljel 13. Taksaanid (paklitakseel ja dotsetakseel) on mõlemad jugapuust saadud vähivastased ravimid. Dotsetakseel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), mis on saadud Euroopa jugapuust, on paklitakseeli poolsünteetiline analoog (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paklitakseel ja dotsetakseel soodustavad mikrotobulite assambleerumist tubuliini dimeeridest ja stabiliseerivad mikrotorukesi, takistades depolümeriseerumist, mis annab tulemuseks rakkude mitoosi inhibeerimise.

[0234] „Doksorubitsiin“ on antratsükliinantibiootikum. Doksorubitsiini täielik keemiline nimetus on (8*S-cis*)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoksü- $\alpha$ -L-lüksoheksapüranosüül)oksü]-7,8,9,10-tetrahüdro-6,8,11-trihüdroksü-8-(hüdroksüatsetüül)-1-metoksü-5,12-naftatseen-dioon.

[0235] Termin „tsütokiin“ on geneeriline termin ühe rakupopulatsiooni poolt vabastatavate valkude kohta, mis toimivad teistele rakkudele rakkudevaheliste mediaatoritena. Selliste tsütokiinide näited on lümfokiinid, monokiinid ja tavalised polüpeptiidhormoonid. Tsütokiinide hulka kuuluvad kasvuhormoon, nagu inimese kasvuhormoon, inimese N-metionüül-kasvuhormoon ja veise kasvuhormoon, kõrvalkilpnäärme hormoon, türoksiin, insuliin, proinsuliin, relaksiin, prorelaksiin, glükoproteiinhormoonid, nagu folliikuleid stimuleeriv hormoon (FSH), kilpnääret stimuleeriv hormoon (*thyroid stimulating hormone*, TSH) ja luteiniseeriv hormoon (LH), maksa kasvufaktor, fibroblastide kasvufaktor, prolaktiin, platsenta laktogeen, kasvaja nekroosifaktorid  $\alpha$  ja  $\beta$ , Mülleri inhibeeriv aine, hiire gonadotropiiniga seotud peptiid, inhibiin, aktiviin, vaskulaarne endoteliaalne kasvufaktor, integriin, trombopoietiin (TPO), närvikasvufaktorid nagu NGF- $\beta$ , trombotsüütide kasvufaktor, transformeerivad kasvufaktorid (*transforming growth factor*, TGF), nagu TGF- $\alpha$  ja TGF- $\beta$ , insuliinisarnased kasvufaktorid I ja II, erütropoietiin (EPO), osteoinduktiivsed faktorid, interferoonid, nagu interferoonid  $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$ , kolooniaid stimuleerivad faktorid (*colony stimulating factor*, CSF), nagu makrofaagide CSF (M-CSF), granulotsüütide-makrofaagide CSF (GM-CSF) ja granulotsüütide CSF (G-CSF), interleukiinid (IL), nagu IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11 ja IL-12, kasvaja nekroosifaktorid, nagu TNF- $\alpha$  ja TNF- $\beta$ , ning teised polüpeptiidfaktorid, kaasa arvatud LIF ja komplektligand (KL). Siin kasutatuna hõlmab termin „tsütokiin“ looduslikest allikatest või rekombinantsest rakukultuurist pärit valke ja loodusliku järjestusega tsütokiinide bioloogiliselt aktiivseid ekvivalente.

[0236] Termin „pakendi infoleht“ kasutatakse nendele juhtnööridele viitamiseks, mis tavaliselt on kaasas terapeutiliste produktide kaubanduslikega pakenditega ja mis sisaldavad informatsiooni näidustuste, nende terapeutiliste produktide kasutamise, annustamise, manustamise, vastunäidustuste ja/või hoiatuste kohta.

[0237] Termin „rakusisene metaboliit“ tähendab ühendit, mis tekib rakus antikeha ja ravimi konjugaadiga (*antibody-drug conjugate*, ADC) toimuva metaboolse protsessi või reaktsiooni tulemusena. Metaboolne protsess või reaktsioon võib olla ensümaatiline protsess, nagu ADC peptiidlinkeri proteolüütiline lõikamine või funktsionaalrühma, nagu hüdrasoon-, ester- või amiidrühm, hüdroolüüs. Rakusiseste metaboliitide hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, antikehad ja vaba ravim, mis on pärast rakku sisenemist, sellesse difundeerumist, raku poolt omastamist või sellesse transportimist läbinud rakusisese lahtilõikamise.

[0238] Termin „rakusiseselt lahtilõigatud“ ja „rakusisene lahtilõikamine“ tähendavad rakus toimuvat antikeha ja ravimi konjugaadi (ADC) metaboolset protsessi või reaktsiooni, kus ravimi-osamolekuli (D) ja antikeha (Ab) vaheline kovalentne kinnitus, st linker, katkeb, andes tulemuseks vaba ravimi dissotsieerumise rakus oleva antikeha küljest. ADC lahtilõigatud osamolekulid on seega rakusisesed metaboliidid.

[0239] Termin „biosaadavus“ tähendab patsiendile manustatud ravimi antud koguse süsteemset kättesaadavust (väiteks vere/plasma tasemel). Biosaadavus on absoluutne termin, mis näitab nii aja (kiiruse) kui ravimi selle koguhulga (ulatuse) mõõtmist, mis jõuab manustatud annustamisvormist üldisse ringlusse.

[0240] Termin „tsütotoksiline aktiivsus“ tähendab ADC või ADC rakusise metaboliidi rakku tapvat, tsütostaatilist või kasvu inhibeerivat toimet. Tsütotoksilist aktiivsust võib väljendada IC<sub>50</sub> väärtusena, mis võib olla kontsentratsioon (molaarne või massiprotsentides) mahuühiku kohta, mille juures pooled rakud jäävad ellu.

[0241] Termin „alküül(rühm)“ tähendab siin kasutatuna küllastunud lineaarset või hargnenud ahelaga monovalentset süsivesinikrühma, mis koosneb ühest kuni kaheteistkümnest süsinikuaatomist (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), kus alküülrühm võib vajadusel ja sõltumatult olla asendatud ühe või enama allpool kirjeldatud asendajaga. Teises teostuses koosneb alküülrühm ühest kuni kaheksast süsinikuaatomist (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) või ühest kuni kuuest süsinikuaatomist (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>). Alküülrühmade näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, metüülrühm (Me, -CH<sub>3</sub>), etüülrühm (Et, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-propüülrühm (n-Pr, n-propüül-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-propüülrühm (i-Pr, i-propüül-, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1-butüülrühm (n-Bu, n-butüül-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metüül-1-propüülrühm (i-Bu, i-butüül-, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-butüülrühm (s-Bu, s-butüül-, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metüül-2-propüülrühm (t-Bu, t-butüül-, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1-pentüülrühm (n-pentüül-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-pentüülrühm (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-pentüülrühm (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metüül-2-butüülrühm (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metüül-2-butüülrühm (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metüül-1-butüülrühm (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metüül-1-butüülrühm (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-heksüülrühm (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-heksüülrühm (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-heksüülrühm (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 2-metüül-2-pentüülrühm (-C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metüül-2-pentüülrühm (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4-metüül-2-pentüülrühm (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metüül-3-pentüülrühm (-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metüül-3-pentüülrühm (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,3-dimetüül-

2-butüülrühm ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3,3-dimetüül-2-butüülrühm ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1-heptüülrühm, 1-oktüülrühm jne.

[0242] Termin „alkenüül(rühm)“ tähendab siin kasutatuna vähemalt ühe küllastumatuskohaga, st  $\text{sp}^2$  süsinik-süsinik-kaksiksidemega lineaarset või hargnenud ahelaga monovalentset süsivesinikrühma, mis koosneb kahest kuni kaheksast süsinikuaatomist ( $\text{C}_2\text{-C}_8$ ), kus alkenüülrühm võib vajadusel ja sõltumatult olla asendatud ühe või enama siin kirjeldatud asendajaga, ning mis hõlmab „cis“- ja „trans“-orientatsioonis rühmi, või alternatiivselt, „E“- ja „Z“-orientatsioonis rühmi. Näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, etüleenüül- ehk vinüülrühm ( $-\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ), allüülrühm ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ) jne.

[0243] Termin „alkünüül(rühm)“ tähendab siin kasutatuna vähemalt ühe küllastumatuskohaga, st  $\text{sp}$  süsinik-süsinik-kolmiksidemega lineaarset või hargnenud ahelaga monovalentset süsivesinikrühma, mis koosneb kahest kuni kaheksast süsinikuaatomist ( $\text{C}_2\text{-C}_8$ ), kus alkünüülrühm võib vajadusel ja sõltumatult olla asendatud ühe või enama siin kirjeldatud asendajaga. Näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, etünüülrühm ( $-\text{CH}\equiv\text{CH}$ ), propünüülrühm (propargüülrühm,  $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ) jne.

[0244] Terminid „karbotsükkel“, „karbotsükülüül(rühm)“, „karbotsükliiline tuum“ ja „tsükloalküül(rühm)“ tähendavad monovalentset mitteamaatset küllastunud või osaliselt küllastumata tuuma, mis koosneb 3 kuni 12 süsinikuaatomist ( $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ ) monotsükliilise tuumana või 7 kuni 12 süsinikuaatomist bitsükliilise tuumana. 7 kuni 12 aatomit sisaldavad bitsükliilised karbotsükliidid võivad olla organiseeritud näiteks bitsüklo- [4,5], [5,5], [5,6] või [6,6] süsteemi ning 9 või 10 tuuma aatomit sisaldavad bitsükliilised karbotsükliidid võivad olla organiseeritud bitsüklo- [5,6] või [6,6] süsteemi või sillatud süsteemidesse, nagu bitsüklo[2.2.1]heptaan, bitsüklo[2.2.2]oktaan ja bitsüklo[3.2.2]nonaan. Monotsükliiliste karbotsükliite näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, tsüklopropüül-, tsüklobutüül-, tsüklopentüül-, 1-tsüklopent-1-enüül-, 1-tsüklopent-2-enüül-, 1-tsüklopent-3-enüül-, tsükloheksüül-, 1-tsükloheks-1-enüül-, 1-tsükloheks-2-enüül-, 1-tsükloheks-3-enüül-, tsükloheksadienüül-, tsükloheptüül-, tsüklooktüül-, tsüklononüül-, tsüklodetsüül-, tsükloundetsüül-, tsüklododetsüülrühm jne.

[0245] „Arüül(rühm)“ tähendab 6-20 süsinikuaatomist ( $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ ) koosnevat aromaatsset süsivesinikrühma, mis on saadud vesiniku eemaldamisel algse aromaatsse tuumasüsteemi ühe süsinikuaatomi juurest. Mõned arüülrühmad on näidisstruktuurides esindatud tähistusega „Ar“. Arüülrühm hõlmab bitsükliilisi rühmi, mis sisaldavad aromaatsset tuuma, mis on liitunud küllastunud või osaliselt küllastumata tuuma või aromaatsse karbotsükliilise tuumaga. Tüüpi-

liste arüülrühmade hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, rühmad, mis pärinevad benseenist (fenüülrühm), asendatud benseenidest, naftaleen-, antratseen-, bifenüül-, indenüül-, indanüül-, 1,2-dihüdronaftaleen-, 1,2,3,4-tetrahüdronaftüülrühmadest jne. Arüülrühmad võivad vajadusel ja sõltumatult olla asendatud ühe või mitme siin kirjeldatud asendajaga.

[0246] Termineid „heterotsükkel“, „heterotsükliül(rühm)“ ja heterotsükliiline tuum“ kasutatakse siin vastastikku vahetatavatena ja need tähendavad 3 kuni 20 tuumaaatomist koosnevat küllastunud või osaliselt küllastumata (st sisaldavad tuumas ühte või mitut kaksik- ja/või kolmiksidet) karbotsükliilist rühma, milles vähemalt üks tuumaaatom on heteroatom, mis valitakse lämmastiku, hapniku, fosfori ja väevli hulgast, ning ülejäänud tuumaaatomid on C, kusjuures üks või mitu tuumaaatomit on vajadusel ja sõltumatult asendatud ühe või mitme allpool kirjeldatud asendajaga. Heterotsükkel võib olla monotsükkel, mis sisaldab 3 kuni 7 tuumaliiget (2 kuni 6 süsinikuaatomit ja 1 kuni 4 heteroatomit, mis valitakse N, O, P ja S hulgast), või bitsükkel, mis sisaldab 7 kuni 10 tuumaliiget (4 kuni 9 süsinikuaatomit ja 1 kuni 6 heteroatomit, mis valitakse N, O, P ja S hulgast), näiteks bitsüklo- [4,5], [5,5], [5,6] või [6,6] süsteem. Heterotsükleid on kirjeldatud teostes: Paquette, Leo A, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), eelkõige peatükkides 1, 3, 4, 6, 7 ja 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 praeguseni), eelkõige köidetes 13, 14, 16, 19 ja 28, ning artiklis: J. Am. Chem. Soc., (1960) 82: 5566. Termin „heterotsükliül(rühm)“ hõlmab ka rühmi, kus heterotsükliilised rühmad on liitunud küllastunud, osaliselt küllastumata tuuma või aromaatses karbotsükliilise või heterotsükliilise tuumaga. Heterotsükliiliste tuumade näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, pürrolidinüül-, tetrahydrofuranüül-, dihydrofuranüül-, tetrahydrotienüül-, tetrahydropüranüül-, dihydropüranüül-, tetrahydrotiopüranüül-, piperidino-, morfolino-, tiomorfolino-, tioksanüül-, piperasiinüül-, homopiperasiinüül-, asetidinüül-, oksetanüül-, tietanüül-, homopiperidiniinüül-, oksepanüül-, tiepanüül-, oksasepiniinüül-, diasepiniinüül-, tiasepiniinüül-, 2-pürroliniinüül-, 3-pürroliniinüül-, indoliniinüül-, 2*H*-püranüül-, 4*H*-püranüül-, dioksanüül-, 1,3-dioksolanüül-, pürasoliniinüül-, ditiianiinüül-, ditiolaniinüül-, dihydropüranüül-, dihydrotienüül-, dihydrofuranüül-, pürasolidiniinüül-, imidasolidiniinüül-, 3-asabitsüklo[3.1.0]heksaniinüül-, 3-asabitsüklo[4.1.0]heptaniinüül-, asabitsüklo[2.2.2]heksaniinüül-, 3*H*-indoliinüül-, kinolisiinüülrühm ja *N*-püridiiniinüüluread. Selle definitsiooni ulatusse kuuluvad ka spiroosamolekulid. Heterotsükliiliste rühmade näidete hulka, kus kaks tuuma süsinikuaatomit on

asendatud okso- (=O) osamolekulidega, kuuluvad pürimidinonüül- ja 1,1-dioksotiomorfolinüülrühm. Siin kirjeldatud heterotsüklilised rühmad on vajadusel ja sõltumatult asendatud ühe või mitme siin kirjeldatud asendajaga.

[0247] Termin „heteroarüül(rühm)“ tähendab 5-, 6- või 7-liikmelise tuuma monovalentset aromaatsset rühma ja see hõlmab 5-20 aatomist koosnevaid liitunud tuumasüsteeme (millest vähemalt üks on aromaatsne), mis sisaldavad ühte või mitut heteroaatomit, mis valitakse sõltumatult lämmastiku, hapniku ja väävli hulgast. Heteroarüülrühmade näited on püridinüülrühm (kaasa arvatud näiteks 2-hüdroksüpüridinüülrühm), imidasolüül-, imidasopüridinüül-, pürimidinüülrühm (kaasa arvatud näiteks 4-hüdroksüprimidinüülrühm), pürasolüül-, triasolüül-, pürasiinüül-, tetrasolüül-, furüül-, tienüül-, isoksasolüül-, tiasolüül-, oksasolüül-, isotiasolüül-, pürrolüül-, kinolinüül-, isokinolinüül-, indolüül-, bensimidazolüül-, bensofuranüül-, tsinnolinüül-, indasolüül-, indosilinüül-, ftalasiinüül-, püridasinüül-, triasiinüül-, isoindolüül-, pteridinüül-, puriinüül-, oksadiasolüül-, triasolüül-, tiadiasolüül-, furasaniinüül-, bensofurasaniinüül-, bensotiofenüül-, bensotiasolüül-, bensoksasolüül-, kinasolinüül-, kinoksalinüül-, naftüridinüül- ja furopüridinüülrühm. Heteroarüülrühmad on vajadusel ja sõltumatult asendatud ühe või mitme siin kirjeldatud asendajaga.

[0248] Heterotsükkel või heteroarüülrühm võib olla seotud süsiniku kaudu (süsinik-seotud) või lämmastiku kaudu (lämmastik-seotud), kui see on võimalik. Mittepiiravate näidetena on süsiniku kaudu seotud heterotsüklid või heteroarüülrühmad seotud püridiini asendite 2, 3, 4, 5 või 6 juurest, püridasiini asendite 3, 4, 5 või 6 juurest, pürimidiini asendite 2, 4, 5 või 6 juurest, pürasiini asendite 2, 3, 5 või 6 juurest, furaani, tetrahüdrofuraani, tiofuraani, tiofeeni, pürrooli või tetrahüdropürrooli asendite 2, 3, 4 või 5 juurest, oksasooli, imidasooli või tiasooli asendite 2, 4 või 5 juurest, isoksasooli, pürasooli või isotiasooli asendite 3, 4 või 5 juurest, asiridiini asendi 2 või 3 juurest, asetidiini asendite 2, 3 või 4 juurest, kinoliini asendite 2, 3, 4, 5, 6, 7 või 8 juurest või isokinoliini asendite 1, 3, 4, 5, 6, 7 või 8 juurest.

[0249] Mittepiiravate näidetena on lämmastiku kaudu seotud heterotsüklid seotud asiridiini, asetidiini, pürrooli, pürrolidiini, 2-pürroliini, 3-pürroliini, imidasooli, imidasolidiini, 2-imidasoliini, 3-imidasoliini, pürasooli, pürasoliini, 2-pürasoliini, 3-pürasoliini, piperidiini, piperasiini, indooli, indoliini, 1*H*-indasooli asendi 1 juurest, isoindooli või isoindoliini asendi 2 juurest, morfoliini asendi 4 juurest ning karbasooli või β-karboliini asendi 9 juurest.

[0250] „Alküleen(rühm)“ tähendab 1–18 süsinikaatomist koosnevat küllastunud, hargnenud või sirge ahelaga või tsüklilist süsivesinikrühma, mis sisaldab kahte monovalentset tsentrit,

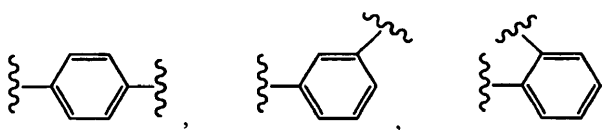
mis on saadud kahe vesinikuaatomi eemaldamisel algse alkaani sama või kahe erineva süsinikuaatomi juurest. Tüüpiliste alküleenrühmade hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, metüleenrühm (-CH<sub>2</sub>-), 1,2-etüülrühm (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,3-propüülrühm (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-butüülrühm (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) jne.

[0251] "(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-alküleen(rühm)" on sirge ahelaga küllastunud süsivesinikrühm valemiga -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>-. (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-alküleenrühmade hulka kuuluvad metüleen-, etüleen-, propüleen-, butüleen-, pentüleen-, heksüleen-, heptüleen-, oktüleen-, nonüleen- ja dekaleenrühmad.

[0252] "Alkenüleen(rühm)" tähendab 2–18 süsinikuaatomist koosnevat küllastumata, hargnenud või sirge ahelaga või tsüklilist süsivesinikrühma, mis sisaldab kahte monovalentset tsentrit, mis on saadud kahe vesinikuaatomi eemaldamisel algse alkeeni sama või kahe erineva süsinikuaatomi juurest. Tüüpiliste alkenüleenrühmade hulka kuulub, kuid ei ole sellega piiratud, 1,2-etüleenrühm (-CH=CH-).

[0253] "Alkünüleen(rühm)" tähendab 2–18 süsinikuaatomist koosnevat küllastumata, hargnenud või sirge ahelaga või tsüklilist süsivesinikku, mis sisaldab kahte monovalentset tsentrit, mis on saadud kahe vesinikuaatomi eemaldamisel algse alküüni sama või kahe erineva süsinikuaatomi juurest. Tüüpiliste alkünüleenrühmade hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud: atsetüleenrühm (-C≡C-), propargüülrühm (-CH<sub>2</sub>C≡C-) ja 4-pentünüülrühm (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡C-).

[0254] "Arüleen(rühm)" on arüülrühm, mis sisaldab kahte kovalentset sidet ja võib olla orto-, meta- või para-konfiguratsioonis, nagu on näidatud järgnevate struktuuridega:



kus fenüülrühm võib olla asendamata või asendatud kuni nelja rühmaga, kaasa arvatud, kuid nendega mitte piiratud, -(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühm, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühm, -arüülrühm, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>-NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halogenorühm, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> ja -CN, kus iga R' on sõltumatult valitud H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühma ja arüülrühma hulgast.

[0255] „Arüülalküül(rühm)“ tähendab atsüklilist alküülrühma, milles üks vesinikuaatomitest, mis on seotud süsinikuaatomiga, tüüpiliselt terminaalne või sp<sup>3</sup> süsinikuaatom, on asendatud arüülrühmaga. Tüüpiliste arüülalküülrühmade hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, bensüül-, 2-fenüületaani-1-üül-, 2-fenüületeeni-1-üül-, naftüülmetüül-, 2-naftüületaani-1-üül-, 2-naftüületeeni-1-üül-, naftobensüül-, 2-naftofenüületaani-1-üülrühm jne. Arüülalküülrühm

koosneb 6 kuni 20 süsinikuaatomist, näiteks arüülalküülrühma alküül-osamolekul, kaasa arvatud alkanüül-, alkenüül- või alkünüülrühm, sisaldab 1 kuni 6 süsinikuaatomit, ja arüül-osamolekul sisaldab 5 kuni 14 süsinikuaatomit.

[0256] „Heteroarüülalküül(rühm)“ tähendab atsüklilist alküülrühma, milles üks vesinikuaatomitest, mis on seotud süsinikuaatomiga, tüüpiliselt terminaalne või  $sp^3$  süsinikuaatom, on asendatud heteroarüülrühmaga. Tüüpiliste heteroarüülalküülrühmade hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, 2-bensimidiasolüülmetüülrühm, 2-furüületüülrühm jne. Heteroarüülalküülrühm koosneb 6 kuni 20 süsinikuaatomist, näiteks heteroarüülalküülrühma alküül-osamolekul, kaasa arvatud alkanüül-, alkenüül- või alkünüülrühm, sisaldab 1 kuni 6 süsinikuaatomit, ja heteroarüül-osamolekul sisaldab 5 kuni 14 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis valitakse N, O, P ja S hulgast. Heteroarüülalküülrühma heteroarüül-osamolekul võib olla monotsükliline ja sisaldada 3 kuni 7 tuumaliiget (2 kuni 6 süsinikuaatomit) või bitsükliline ja sisaldada 7 kuni 10 tuumaliiget (4 kuni 9 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis valitakse N, O, P ja S hulgast), näiteks bitsüklo[4,5], [5,5], [5,6] või [6,6] süsteem.

[0257] „Eelravim“ tähendab selles taotluses kasutatatuna leiutisekohase ühendi eellast või derivaatvormi, mis võib olla rakkudele vähem toksiline võrreldes algse ühendi või ravimiga, ning mida saab ensümaatilisel või hüdrofüüsilisel aktiveerida või konverteerida aktiivsemasse algsesse vormi, vt. näiteks: Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, 375-382, 615. konverents, Belfast (1986); Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, toim. Borchardt et al., 247-267, Humana Press (1985). Leiutisekohaste eelravimite hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, fosfaati sisaldavad eelravimid, tiofosfaati sisaldavad eelravimid, sulfaati sisaldavad eelravimid, peptiidi sisaldavad eelravimid, D-aminohapetega modifitseeritud eelravimid, glükosüülitud eelravimid,  $\beta$ -laktaami sisaldavad eelravimid, valikuliselt asendatud fenoksüatsetamiidi sisaldavad eelravimid, valikuliselt asendatud fenüülatssetamiidi sisaldavad eelravimid, 5-fluorotsütosiin ja teised fluorouridiini eelravimid, mida saab konverteerida aktiivsemaks tsütotoksiliseks vabaks ravimiks. Tsütotoksiliste ravimite näited, mida saab derivaatida leiutises kasutatavaks eelravimiks, kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, eespool kirjeldatud leiutisekohased ühendid ja kemoterapeutilised ained.

[0258] „Metaboliit“ on produkt, mis toodetakse kindla ühendi või selle soola metaboliseerumise teel organismis. Ühendi metaboliite võib identifitseerida, kasutades tehnika tasemest tuntud tavapäraseid meetodeid ja nende aktiivsusi, mis määratakse siin kirjeldatud testide



kasutamisel. Need produktid võivad tekkida näiteks manustatud ühendi oksüdeerimise, redutseerimise, hüdrolüüsi, amiidimise, desamiidimise, esterdamise, desesterdamise, ensümaatilise lõikamise jne. tulemusena. Seega hõlmab leiutis ka leiutisekohaste ühendite metaboliite, kaasa arvatud ühendid, mis saadakse meetodil, mis hõlmab leiutisekohase ühendi kokkupuutesse viimist imetajaga ajaperioodiks, mis on piisav tema metaboolse produkti saamiseks.

[0259] „Liposoom“ on väike vesiikul, mis koosneb erinevat tüüpi lipiididest, fosfolipiididest ja/või pindaktiivsest aineist, ja mis on kasulik ravimi imetaja organismi toimetamiseks. Liposoomi komponendid on tavaliselt korrastatud kahekihilisse moodustisse sarnaselt lipiidide korrastatusega bioloogilistes membraanides.

[0260] „Linker“ tähendab keemilist osamolekuli, mis sisaldab kovalentset sidet või aatomite ahelat, mis seob antikeha kovalentselt ravimi osamolekuliga. Erinevates teostustes hõlmavad linkerid kahevalentseid rühmi, nagu alküüldiüül-, arüüldiüül-, heteroarüüldiüülrühm, osamolekule nagu  $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ , korduvaid alküüloksü-üksusi (näiteks polüetüleenoksüüksusi, PEG-üksusi, polümetüleenoksüüksusi) ja alküülaminoüksusi (näiteks polüetüleenaminoüksusi, Jeffamine<sup>TM</sup>), ning dihapete estreid ja amiide, kaasa arvatud suktsinaati, suktsiinamiidi, diglükolaati, malonaati ja kaproamiidi.

[0261] Termin „kiraalne“ tähendab molekule, mille peegelkujutis ei ole oma partneriga kohakuti paigutatav, samas kui termin „akiraalne“ tähendab molekule, mille peegelkujutis on oma partneriga kohakuti paigutatav.

[0262] Termin „stereoisomeerid“ tähendab ühendeid, mis on identse keemilise koostisega, aga erinevad omavahel aatomite ruumilise paigutuse poolest.

[0263] „Diastereomeer“ tähendab kahe või enama kiraaltsentriga stereoisomeeri, mille molekulid ei ole teineteise suhtes peegelkujutised. Diastereomeeridel on erinevad füüsikalised omadused, näiteks sulamistemperatuur, keemistemperatuur ja spektraalsed omadused, ning erinev reaktsioonivõime. Diastereomeeride segusid võib lahutada kõrge lahutusvõimega analüütiliste protseduuride abil, nagu elektroforees ja kromatograafia.

[0264] „Enantiomeerid“ tähendab ühendi kahte stereoisomeeri, mis ei ole teineteisega kohakuti paigutatavad peegelkujutised.

[0265] Siin kasutatud stereokeemilised definitsioonid ja lepped järgivad üldiselt järgmistes teostes tooduid: S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; Eliel, E., Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds, (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Paljud orgaanilised ühendid

eksisteerivad optiliselt aktiivsetes vormides, st nad suudavad pöörata polariseeritud valguse polarisatsioonitasandit. Optiliselt aktiivse ühendi kirjeldamisel kasutatakse molekuli absoluutse konfiguratsiooni märkimiseks kiraaltsentri(te) suhtes eesliiteid D ja L või R ja S. Eesliiteid d ja l või (+) ja (-) kasutatakse ühendi abil valguse polarisatsioonitasandi pööramise suuna märkimiseks, kus (-) või l tähendab, et ühend pöörab valguse polarisatsioonitasandit vasakule. Ühend eesliitega (+) või d pöörab valguse polarisatsioonitasandit paremale. Antud keemilise struktuuri jaoks on need stereoisomeerid identsed, kuid nad ei ole teineteise peegelmujutised. Spetsiifilist stereoisomeeri võib nimetada ka enantiomeeriks ning nende isomeeride segu nimetatakse sageli enantiomeerseks seguks. Enantiomeeride 50 : 50 segu nimetatakse ratseemiliseks seguks ehk ratsemaadiks, mis võib esineda juhul, kui keemilise reaktsiooni või protsessi käigus ei ole olnud stereoselektiooni või stereospetsiifilisust. Terminid „ratseemiline segu“ ja „ratsemaat“ tähendavad kahe enantiomeeri molekulide ekvimolaarset segu, millel puudub optiline aktiivsus.

[0266] Termin „tautomeer“ või „tautomeerne vorm“ tähendab erineva energiaga struktuuriisomeere, mis on teineteiseks konverteeritavad üle madala energiabarjääri. Näiteks prooton-tautomeerid (mis on tuntud ka kui prototroopsed tautomeerid) lähevad teineteiseks üle prootoni migreerumise tõttu, nagu keto-enoolse ja imiini-eenamiini isomerisatsiooni puhul. Valentstautomeerid lähevad teineteiseks üle mõne sidemeelektroni ümberorganiseerumise abil.

[0267] Väljend „farmatseutiliselt vastuvõetav sool“ tähendab siin kasutatuna leiutisekohase ühendi farmatseutiliselt vastuvõetavaid orgaanilisi või anorgaanilisi sooli. Soolade näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, sulfaat-, tsitraat-, atsetaat-, oksalaat-, kloriid-, bromiid-, jodiid-, nitraat-, vesiniksulfaat-, fosfaat-, vesinikfosfaat-, isonikotinaat-, laktaat-, salitsülaat-, vesiniktsitraat-, tartraat-, oleaat-, tannaat-, pantotenaat-, vesiniktartraat-, askorbaat-, suktsinaat-, maleaat-, gentisinaat-, fumaraat-, glükonaat-, glükuronaat-, sahharaat-, formiaat-, bensoaat-, glutamaat-, metaansulfonaat- („mesülaat-“), etaansulfonaat-, benseensulfonaat-, *p*-tolueensulfonaat- ja pamaat- (st 1,1'-metüleen-bis(2-hüdroksü-3-naftoaat-)) soolad. Farmatseutiliselt vastuvõetavad soolad võivad sisaldada teise molekuli, näiteks atsetaatiooni, suktsinaatiooni või teise vastasiooni inklusiooni. Vastasioon võib olla ükskõik missugune orgaaniline või anorgaaniline osamolekul, mis stabiliseerib algse ühendi laengut. Lisaks võib farmatseutiliselt vastuvõetav sool sisaldada oma struktuuris enam kui ühte laetud aatomit. Neil juhtudel, kus farmatseutiliselt vastuvõetava soola osaks on mitu laetud aatomit, võib see

sisaldada mitut vastasiooni. Seega võib farmatseutiliselt vastuvõetav sool sisaldada ühte või mitut laetud aatomit ja/või ühte või mitut vastasiooni.

[0268] Kui leiutisekohane ühend on alus, võib soovitud farmatseutiliselt vastuvõetava soola valmistada ükskõik missugusel tehnika tasemest saadaval meetodil, näiteks vaba aluse töötlemisel anorgaanilise happega, nagu vesinikkloriidhape, vesinikbromiidhape, väävelhape, lämmastikhape, metaansulfoonhape, fosforhape jne., või orgaanilise happega, nagu äädikhape, trifluoroäädikhape, malehape, merevaikhape, mandelhape, fumaarhappega, maloonhape, püroviinamarihape, oblikhape, glükoolhape, salitsüülhape, püranosidüülhappega, nagu glükuronhape või galakturonhape, alfa-hüdroksühappega, nagu sidrunhape või viinhape, aminohappega, nagu asparagiinhape või gutamiinhape, aromaatsel happel, nagu bensoehape või kaneelhape, sulfoonhappega, nagu *p*-tolueensulfoonhape või etaansulfoonhape, jne.

[0269] Kui leiutisekohane ühend on hape, võib soovitud farmatseutiliselt vastuvõetavat soola valmistada ükskõik missugusel sobival meetodil, näiteks vaba happe töötlemisel anorgaanilise või orgaanilise alusega, nagu amiin (primaarne, sekundaarne või tertsiaarne amiin), leelismetalli hüdroksiidi või leelismuldmetalli hüdroksiidiga, vms. Sobivaid sooli illustreerivate näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, soolad, mis on saadud aminohapetest, nagu glütsiin ja arginiin, ammoniaagist, primaarsetest, sekundaarsetest ja tertsiaarsetest amiinidest ja tsüklilistest amiinidest, nagu piperidiin, morfoliin ja piperasiin, ning anorgaanilised soolad, nagu naatriumi-, kaltsiumi-, kaaliumi-, magneesiumi-, mangaani-, raua-, vase-, tsingi-, alumiiniumi- ja liitiumisoolad.

[0270] Väljend „farmatseutiliselt vastuvõetav“ näitab, et aine või kompositsioon peab olema keemiliselt ja/või toksikoloogiliselt kokkusobiv teiste preparaati moodustavate koostisosade ja/või ravitava imetaja organismiga.

[0271] „Solvaat“ tähendab ühe või mitme lahustimolekuli ja leiutisekohase ühendi kooslust või kompleksi. Solvaate moodustavate lahustite näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, vesi, isopropanool, etanool, metanool, DMSO, etüülatsetaat, äädikhape ja etanoolamiin. Termin „hüdraat“ tähendab kompleksi, milles lahustimolekul on vesi.

[272] Termin „kaitserühm“ tähendab asendajat, mida tavaliselt kasutatakse konkreetse funktsionaalsuse blokeerimiseks või kaitsmiseks ühendi teiste rühmade reageerimise ajal. Näiteks on „aminorühma kaitserühm“ asendaja, mis on seotud aminorühmaga ja mis blokeerib või kaitseb ühendi aminofunktsionaalsust. Sobivate aminorühma kaitserühmade hulka kuuluvad atsetüül-, trifluoroatsetüül-, *t*-butoksükarbonüül- (BOC), bensüüloksükarbonüül- (CBZ) ja

9-fluoreenüülmetüleenoskükarbonüülrühm (Fmoc). Samamoodi tähendab „hüdroksürühma kaitserühm“ hüdroksürühma asendajat, mis blokeerib või kaitseb hüdroksüfunktsionaalsust. Sobivate kaitserühmade hulka kuuluvad atsetüül- ja silüülrühm. „karboksürühma kaitserühm“ tähendab karboksürühma asendajat, mis blokeerib või kaitseb karboksü-funktsionaalsust. Tavaliste karboksürühma kaitserühmade hulka kuuluvad fenüülsulfonüületüül-, tsüanoetüül-, 2-(trimetüülsilüül)etüül-, 2-(trimetüülsilüül)etoksümetüül-, 2-(*p*-tolueensulfonüül)etüül-, 2-(*p*-nitrofenüülsulfonüül)etüül-, 2-(difenüülfosfino)etüül-, nitroetüülrühm jne. Üldist kirjeldust kaitserühmade ja nende kasutamise kohta vt.: T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*. John Wiley ja Sons, New York, 1991.

[0273] „Lahkuv rühm“ tähendab funktsionaalrühma, mida saab asendada teise funktsionaalrühmaga. Konkreetsete lahkuvad rühmad on tehnika tasemest hästi teada ning nende näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, halogeniid- (näiteks kloriid-, bromiid-, jodiid-), metaansulfonüül- (mesüül-), *p*-tolueensulfonüül- (tosüül-), trifluorometüülsulfonüül- (triflaat-) ja trifluorometüülsulfonaatrühmad.

### **Lühendid**

#### [0274] LINKERKOMPONENDID

MC = 6-maleimidokaproüül(rühm)

Val-Cit või „vc“ = valiin-tsitrulliin (näidisdipteiid proteaasi poolt lõigatavas linkeris)

Citrulline = 2-amino-5-ureidopentaanhape

PAB = *p*-aminobensüülloksükarbonüül(rühm) („iseohverduva“ linkerkomponendi näide)

Me-Val-Cit = N-metüül-valiin-tsitrulliin (kus linkeri peptiidsidet on modifitseeritud, takistamaks selle lõikamist katepsiin B-ga)

MC(PEG)6-OH = maleimidokaproüül-polüetüleenglükool (saab kinnitada antikeha tsüsteiini-dele).

#### TSÜTOTOKSILISED RAVIMID:

MMAE = monometüülauristatiin E (molekulmass 718)

MMAF = auristatiin E (MMAE) variant, kus ravimi C-terminuses on fenüülalaniin (molekulmass 731,5)

MMAF-DMAEA = MMAF koos DMAEA-ga (dimetüülaminoetüülamiin), mis on seotud C-terminaalse fenüülalaniini juurest amiidsidemega (molekulmass 801.5)

MMAF-TEG = MMAF koos tetraetüleenglükooliga, mis on esterdatud fenüülalaniiniga

MMAF-NtBu = N-*t*-butüülrühm, mis on seotud amiidina MMAF C-terminusse

DM1 = N(2')-desatsetüül-N(2')-(3-merkpto-1-oksopropüül)maitansiin

DM3 = N(2')-desatsetüül-N2-(4-merkpto-1-oksopentüül)maitansiin

DM4 = N(2')-desatsetüül-N2-(4-merkpto-4-metüül-1-oksopentüül)maitansiin

[0275] Edasised lühendid on järgmised: AE on auristatiin E, Boc on *N*-(*t*-butoksükarbonüül(rühm)), cit on tsitrulliin, dap on dolaproiin, DCC on 1,3-ditsükloheksüülkarbodiimid, DCM on diklorometaan, DEA on dietüülamiin, DEAD on dietüülasodikarboksülaat, DEPC on dietüülfosforüülsüanidaat, DIAD on diisopropüülasodikarboksülaat, DIEA on *N,N*-diisopropüületüülamiin, dil on dolaisoleutsiin, DMA on dimetüülatsetamiid, DMAP on 4-dimetüülaminopüridiin, DME on etüleenglükooldimetüüleeter (või 1,2-dimetoksüetaan), DMF on *N,N*-dimetüülformamiid, DMSO on dimetüülsulfoksiid, doe on dolafeniin, dov on *N,N*-dimetüülvaliin, DTNB on 5,5'-ditiobis(2-nitrobensoehape), DTPA on dietüleentriaminopentaäädikhape, DTT on ditiotreitol, EDCI on 1-(3-dimetüülaminopropüül)-3-etüülkarbodiimid-hüdrokloriid, EEDQ on 2-etoksü-1-etoksükarbonüül-1,2-dihüdrokinoliin, ES-MS on elektropihustus-massispektromeetria (*electrospray mass spectrometry*), EtOAc on etüülatsetaat, Fmoc on *N*-(9-fluorenüülmetoksükarbonüül(rühm)), gly on glütsiin, HATU on *O*-(7-asabensotriasooll-1-üül)-*N,N,N',N'*-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat, HOBt on 1-hüdroksübensotriasooll, HPLC on kõrgsurve-vedelikukromatograafia (*high pressure liquid chromatography*), ile on isoleutsiin, lys on lüsiin, MeCN (CH<sub>3</sub>CN) on atsetonitriil, MeOH on metanool, Mtr on 4-anisüüldifenüülmetüül(rühm) (või 4-metoksütritüül(rühm)), nor on (1*S*,1*R*)-(+)-norefedriin, PBS on fosfaat-puhverdatud soolalahus (pH 7,4), PEG on polüetüleenglükool, Ph on fenüül(rühm), Pnp on *p*-nitrofenüül(rühm), MC on 6-maleimidokaproüül(rühm), phe on L-fenüülalaniin, PyBrop on bromo-*tris*-pürrolidinofosfooniumheksafluorofosfaat, SEC on geelkromatograafia (*size-exclusion chromatography*), Su on suktsiiniimid, TFA on trifluoroäädikhape, TLC on õhekihi kromatograafia (*thin layer chromatography*), UV on ultraviolet ja val on valiin.

[0276] „Vaba tsüsteiin-aminohape“ tähendab, et aminohappe tsüsteiin jääk, mis on konstrueeritud algsesse antikehasse, sisaldab tiolfunktsionaalrühma (-SH) ja ei ole paardunud molekulisisesse või molekulidevahelise disulfiidsillana.

[0277] Termin „tioli reageerimisvõime väärtus“ on vabade tsüsteiin-aminohapete reageerimisvõime kvantitatiivne iseloomustus. Tioli reageerimisvõime väärtus on vabade tsüsteiin-aminohapete protsent tsüsteiiniga konstrueeritud antikehas, mis reageerib tioliga reageeriva reagendiga, ja see konverteeritakse maksimaalse väärtuseni 1. Näiteks vaba tsüsteiin-aminohappe reageerimisvõime väärtus tsüsteiiniga konstrueeritud antikehas, mis reageerib tioliga reageeriva reagendiga nagu biotiin-maleimiidreagent 100% saagisega, moodustades biotiiniga märgistatud antikeha, on 1,0. Teise tsüsteiin-aminohappe tiolrühma, mis on konstrueeritud samasse või erinevasse algsesse antikehasse ja mis reageerib tioliga reageeriva reagendiga 80% saagisega, tioli reageerimisvõime väärtus on 0,8. Järgmise tsüsteiin-aminohappe tiolrühma, mis on konstrueeritud samasse või erinevasse algsesse antikehasse ja mis üldse ei reageeri tioliga reageeriva reagendiga, tioli reageerimisvõime väärtus on 0. Konkreetse tsüsteiini tioli reageerimisvõime väärtuse saab määrata ELISA testi, massispektroskoopia, vedelikukromatograafia, autoradiograafia või mõne muu kvantitatiivse analüüsistesti abil.

[0278] „Algne (*parent*) antikeha“ on antikeha, mis sisaldab aminohapete järjestust, mille üks või mitu aminohappejääki on asendatud ühe või mitme tsüsteiinijäägiga. Algne antikeha võib sisaldada natiivset või metsiktüüpi järjestust. Algne antikeha võib sisaldada ka juba olemasolevaid aminohapete järjestuse modifikatsioone (nagu insertsioone, deletsioone ja/või asendusi) võrreldes antikeha teise natiivse, metsiktüüpi või modifitseeritud vormi järjestusega. Algne antikeha võib olla suunatud huvialuse sihtantigeeni vastu, näiteks bioloogiliselt tähtsa polüpeptiidi vastu. Silmas peetakse ka antikehi, mis on suunatud mittepöüpeptiidsete anti-geenide vastu (nagu kasvajaga seotud glükolipiid-antigeenid, vt. US 5091178).

**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, -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, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _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, 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, 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 jmps */
};

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

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

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

```



**Table 1 (cont')**

```

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

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

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

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

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

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

cleanup(0);          /* unlink any tmp files */
}
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 diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}
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) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
} 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) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
}
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()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

**print**

**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%$ 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, "\n, 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 pcr 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];     /* ptr to current element */
static char *ps[2];     /* ptr to current element */
static char *po[2];     /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;        /* char count */
    int      more;
    register i;

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

```

...getmat

pr\_align

**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) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            sprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
```

```
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
```

**static**

**nums(ix)**

**nums**

```
int ix; /* index in out[] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE];
    register int 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) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}
```

```
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
```

**static**

**putline(ix)**

**putline**

```
int ix;
{
```

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

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

```

...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: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

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

```

...getseq

g\_alloc

readjmps

**Table 1 (cont')**

```

...readjumps
if (j < 0 && dx[dmax].offset && !j) {
    (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 (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}
}

```

### III Leiutisekohased kompositsioonid ja meetodid

[0279] Leiutises esitatakse CD79b-vastased antikehad või nende funktsionaalsed fragmendid ja nende kasutamine hematopoeetiliste kasvajate ravimeetodites.

[0280] Ühes eripäras esitatakse leiutises antikeha, mis seondub, eelistatult spetsiifiliselt, ükskõik missuguse eespool või allpool kirjeldatud polüpeptiidiga, nagu patendinõudluses on defineeritud. Valikuliselt on antikeha monokloonne antikeha, antikehafragment, kaasa arvatud Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> ja Fv fragment, diakeha, ühe domeeniga antikeha, kimäärne antikeha,

humaniseeritud antikeha, üheaahelaline antikeha või antikeha, mis konkureerivalt inhibeerib CD79b polüpeptiidi vastase antikeha seondumist vastavale antigeensele epitoobile. Leiutisekohased antikehad võivad vajadusel olla konjugeeritud kasvu inhibeeriva aine või tsütotoksilise ainega nagu toksiin, kaasa arvatud näiteks auristatiin, maitansinoid, dolostatiini derivaat või kaliheamütsiin, antibiootikum, radioaktiivne isotoop, nukleolüütiline ensüüm vms. Leiutisekohaseid antikehi võib vajadusel toota CHO rakkudes või bakterirakkudes ning eelistatult esile kutsuda nende rakkude surma, millega nad seonduvad. Diagnostilistel eesmärkidel võib leiutisekohaseid antikehi detekteeritavalt märgistada, kinnitada tahkele toesele jne.

[0281] Ühes eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus antikeha monovalentne afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes Fab fragmendina) on praktiliselt sama kui hiire antikeha monovalentne afiinsus (näiteks hiire antikeha afiinsus CD79b suhtes Fab fragmendina) või kimäärse antikeha monovalentne afiinsus (näiteks kimäärse antikeha afiinsus CD79b suhtes Fab fragmendina) ja mis sisaldab, koosneb või praktiliselt koosneb joonistel 7A-B (SEQ ID NO: 10) ja joonistel 8A-B (SEQ ID NO: 14) kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvate domeenide järjestustest.

[0282] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus monovalentne afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes Fab fragmendina) on väiksem, näiteks vähemalt 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 või 60 korda väiksem kui hiire antikeha monovalentne afiinsus (näiteks hiire antikeha afiinsus CD79b suhtes Fab fragmendina) või kimäärse antikeha monovalentne afiinsus (näiteks kimäärse antikeha afiinsus CD79b suhtes Fab fragmendina) ja mis sisaldab, koosneb või praktiliselt koosneb joonistel 7A-B (SEQ ID NO: 10) ja joonistel 8A-B (SEQ ID NO: 14) kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvate domeenide järjestustest.

[0283] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus monovalentne afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes Fab fragmendina) on suurem, näiteks vähemalt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10 korda suurem kui hiire antikeha monovalentne afiinsus (näiteks hiire antikeha afiinsus CD79b suhtes Fab fragmendina) või kimäärse antikeha monovalentne afiinsus (näiteks kimäärse antikeha afiinsus CD79b suhtes Fab fragmendina) ja mis sisaldab, koosneb või praktiliselt koosneb joonistel

7A-B (SEQ ID NO: 10) ja joonistel 8A-B (SEQ ID NO: 14) kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvate domeenide järjestustest.

[0284] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on praktiliselt sama kui hiire bivalentses vormis antikeha afiinsus (näiteks hiire antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) või bivalentses vormis kimäärse antikeha afiinsus (näiteks kimäärse antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) ja mis sisaldab, koosneb või praktiliselt koosneb joonistel 7A-B (SEQ ID NO: 10) ja joonistel 8A-B (SEQ ID NO: 14) kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvate domeenide järjestustest.

[0285] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on väiksem, näiteks vähemalt 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 või 60 korda väiksem kui hiire bivalentses vormis antikeha afiinsus (näiteks hiire antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) või bivalentses vormis kimäärse antikeha afiinsus (näiteks kimäärse antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) ja mis sisaldab, koosneb või praktiliselt koosneb joonistel 7A-B (SEQ ID NO: 10) ja joonistel 8A-B (SEQ ID NO: 14) kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvate domeenide järjestustest.

[0286] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on suurem, näiteks vähemalt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10 korda suurem kui hiire bivalentses vormis antikeha afiinsus (näiteks hiire antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) või bivalentses vormis kimäärse antikeha afiinsus (näiteks kimäärse antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) ja mis sisaldab, koosneb või praktiliselt koosneb joonistel 7A-B (SEQ ID NO: 10) ja joonistel 8A-B (SEQ ID NO: 14) kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvate domeenide järjestustest.

[0287] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,4 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,4 +/- 0,04 nM.

[0288] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes

IgG-na) on 0,3 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,32 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,36 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,4 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,44 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,48 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,5 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,3 nM kuni 0,5 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,32 nM kuni 0,48 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,36 nM kuni 0,44 nM.

[0289] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,2 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,2 +/- 0,02 nM.

[0290] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,1 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,12 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b



suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,14 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,16 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,18 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,2 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,22 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,24 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,26 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,28 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,30 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,1 nM kuni 0,3 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,12 nM kuni 0,28 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,14 nM kuni 0,26 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,16 nM kuni 0,24 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,18 nM kuni 0,22 nM.

[0291] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,5 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,5 +/- 0,05 nM.

[0292] Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,4 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,5 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,6 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,7 nM või parem. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,3 nM kuni 0,7 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,4 nM kuni 0,6 nM. Järgmises eripäras esitatakse leiutises humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, kus bivalentses vormis antikeha afiinsus CD79b suhtes (näiteks antikeha afiinsus CD79b suhtes IgG-na) on 0,5 nM kuni 0,55 nM.

[0293] Ühes eripäras on hiire antikeha monovalentne afiinsus CD79b suhtes praktiliselt sama kui selle Fab fragmendi sidumisafiinsus, mis sisaldab varieeruvate domeenide järjestusi SEQ ID NO: 10 (joonised 7A-B) ja SEQ ID NO: 14 (joonised 8A-B). Teises teostuses on hiire antikeha monovalentne afiinsus CD79b suhtes praktiliselt sama kui selle Fab fragmendi sidumisafiinsus, mis sisaldab selle antikeha varieeruvate domeenide järjestusi, mis on saadud hübriidomist, mis deponeeriti ATCC-sse 20. juulil 1993 numbriga HB 11413, või selle kiimäärse antikeha varieeruvate domeenide järjestusi, mis on saadud hübriidomidest, mis deponeeriti ATCC-sse 20. juulil 1993 numbriga HB 11413.

[0294] Nagu tehnika tasemest hästi teada, võib ligandi retseptoriga seondumise afiinsust määrata mõne abil erinevatest testidest ning väljendada kvantitatiivsete väärtuste erinevates

terminites. Seega väljendatakse ühes teostuses sidumisafiinsust Kd väärtustena ja see peegeldab tõelise seondumise afiinsust (näiteks minimaalseks viidud aviidsusefektidega). Üldiselt ja eelistatult mõõdetakse sidumisafiinsust *in vitro* kas rakuvabas või rakkudega seotud seadistuses. Nagu siin on kirjeldatud detailsemalt, võib sidumisafiinsuse kordsetena väljendatud erinevust määrata kvantitatiivselt (näiteks Fab vormis) humaniseeritud antikeha monovalentse sidumisafiinsuse väärtuse ja (näiteks Fab vormis) referents-/võrdlusantikeha (näiteks hüpervarieeruva doonorpiirkonna järjestusi sisaldava hiire antikeha) monovalentsete sidumisafiinsuste väärtuste suhte terminites, kus sidumisafiinsuse väärtused määratakse samasugustes testitingimustes. Nii määratakse ühes teostuses sidumisafiinsuse kordsetena väljendatud erinevus Fab vormis humaniseeritud antikeha ja nimetatud referents-/võrdlus-Fab antikeha Kd väärtuste suhtena. Näiteks ühes teostuses, kus leiutisekohase antikeha (A) afiinsus on „3 korda väiksem“ kui referentsantikeha (M) afiinsus, on Kd väärtus A jaoks 3-kordne, Kd väärtus M jaoks 1-kordne ning A Kd ja M Kd suhe on 3 : 1. Ja vastupidi – ühes teostuses, kus leiutisekohase antikeha (C) afiinsus on „3 korda suurem“ kui referentsantikeha (R) afiinsus, siis Kd väärtus C jaoks on 1-kordne, Kd väärtus R jaoks on 3-kordne ning C Kd ja R Kd suhe on 1 : 3. Sidumisafiinsuse mõõtmisteks võib kasutada ükskõik missugust paljudest tehnika tasemest tuntud testidest, kaasa arvatud siin kirjeldatud testid, kaasa arvatud näiteks Biacore, radioimmunotest (RIA) ja ja ELISA.

[0295] Ühes eripäras esitatakse CD79b-ga seonduv antikeha, kus antikeha sisaldab:

(a) vähemalt ühte, kahte, kolme, nelja, viit või kuut HVR, mis valitakse rühmast, kuhu kuuluvad:

(i) HVR-L1, mis sisaldab järjestust A1-A15, kus A1-A15 on KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131)

(ii) HVR-L2, mis sisaldab järjestust B1-B7, kus B1-B7 on AASNLES (SEQ ID NO: 132)

(iii) HVR-L3, mis sisaldab järjestust C1-C9, kus C1-C9 on QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(iv) HVR-H1, mis sisaldab järjestust D1-D10, kus D1-D10 on GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(v) HVR-H2, mis sisaldab järjestust E1-E18, kus E1-E18 on GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) ja

(vi) HVR-H3, mis sisaldab järjestust F1-F10, kus F1-F10 on TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136).

Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1 järjestust SEQ ID NO: 131. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L2 järjestust SEQ ID NO: 132. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L3 järjestust SEQ ID NO: 133. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H1 järjestust SEQ ID NO: 134. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H2 järjestust SEQ ID NO: 135. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H3 järjestust SEQ ID NO: 136. Ühes teostuses on neid järjestusi (siin kirjeldatud kombinatsioonis) sisaldav leiutisekohane antikeha humaniseeritud antikeha või inimese antikeha.

[296] Ühes eripäras esitatakse CD79b-ga seonduv antikeha, kus antikeha sisaldab:

(a) vähemalt ühte, kahte, kolme, nelja, viit või kuut HVR, mis valitakse rühmast, kuhu kuuluvad:

(i) HVR-L1, mis sisaldab järjestust A1-A15, kus A1-A15 on KASQSVDYDGDSDLN (SEQ ID NO: 131)

(ii) HVR-L2, mis sisaldab järjestust B1-B7, kus B1-B7 on AASNLES (SEQ ID NO: 132)

(iii) HVR-L3, mis sisaldab järjestust C1-C9, kus C1-C9 on QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(iv) HVR-H1, mis sisaldab järjestust D1-D10, kus D1-D10 on GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(v) HVR-H2, mis sisaldab järjestust E1-E18, kus E-E18 on GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) ja

(vi) HVR-H3, mis sisaldab järjestust F1-F10, kus F1-F10 on TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136); ja

(b) vähemalt ühte HVR varianti, kus HVR variant sisaldab vähemalt ühe jäägi modifikatsiooni järjestuses, mida on kujutatud järjestustega SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 või 136. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1 järjestust SEQ ID NO: 131. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L2 järjestust SEQ ID NO: 132. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L3 järjestust SEQ ID NO: 133. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H1 järjestust SEQ ID NO: 134. Ühes teostuses

sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H2 järjestust SEQ ID NO: 135. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H3 järjestust SEQ ID NO: 136. Ühes teostuses on neid järjestusi (siin kirjeldatud kombinatsioonis) sisaldav leiutisekohane antikeha humaniseeritud antikeha või inimese antikeha.

[0297] Ühes eripäras esitatakse leiutises antikeha, mis sisaldab ühte, kahte, kolme, nelja, viit või kuut HVR, kus iga HVR sisaldab, koosneb või praktiliselt koosneb järjestusest, mis valitakse rühmast, millesse kuuluvad järjestused SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 ja 136, ja kus SEQ ID NO: 131 vastab HVR-L1-le, SEQ ID NO: 132 vastab HVR-L2-le, SEQ ID NO: 133 vastab HVR-L3-le, SEQ ID NO: 134 vastab HVR-H1-le, SEQ ID NO: 135 vastab HVR-H2-le ja SEQ ID NO: 136 vastab HVR-H3-le. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus need sisaldavad vastavas järjekorras järjestusi SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 ja 136.

[0298] Leiutisekohase antikeha HVR variandid võivad sisaldava HVR ühe või mitme jäägi modifikatsioone. Ühes teostuses sisaldab HVR-L1 variant ühte asendust ühes järgmistest asenditest: A4 (K), A9 (E või S) ja A10 (A või S). Ühes teostuses sisaldab HVR-L2 variant 1–5 (1, 2, 3, 4 või 5) asendust ükskõik missuguses järgnevatest asenditest või nende ükskõik missugust kombinatsiooni: B2 (S või G), B3 (R või G), B4 (K, R, Y, I, H või Q), B5 (R), B6 (G, K, A, R, S või L) ja B7 (R, N, T või G). Ühes teostuses sisaldab HVR-L3 variant 1–4 (1, 2, 3 või 4) asendust ükskõik missuguses järgnevatest asenditest või nende ükskõik missugust kombinatsiooni: C1 (N või D), C2 (N või P), C3 (D või R), C5 (S, K, A, Q, D, L või G), C6 (A, E või N), C7 (A), C8 (R) ja C9 (N). Ühes teostuses sisaldab HVR-H1 variant 1–7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 või 7) asendust ükskõik missuguses järgnevatest asenditest või nende ükskõik missugust kombinatsiooni: D1 (P), D2 (F), D3 (P, S, Y, G või N), D4 (L või V), D5 (T, R, N, K, C, G or P), D6 (R, T, K või G), D8 (F), D9 (V või L) ja D10 (S, Q, N või D). Ühes teostuses sisaldab HVR-H3 variant 1-3 (1, 2 või 3) asendust ükskõik missuguses järgnevatest asenditest või nende ükskõik missugust kombinatsiooni: F4 (R või I), F6 (I või F), F7 (K, C, R, V või F), F8 (L) ja F9 (S). Iga asendi järel sulgudes olev(ad) täht (tähed) näitab (näitavad) aminohappe illustreerivat asendust (st asendamist), nagu eriala asjatundjale on selge, võib siin kirjeldatud kontekstis teiste aminohapete sobivust asendavate aminohapetena tavapäraselt hinnata tehnika tasemest tuntud meetodite ja/või siin kirjeldatud meetodite kasutamise abil. Ühes teostuses on HVR-L1 variandis A9 E. Ühes teostuses on HVR-H3 variandis F6 I. Ühes teostuses on HVR-H3 variandis F7 R. Ühes teostuses on HVR-H3 variandis F8 L. Ühes

teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H3 varianti, kus F6 on I, F7 on R ja F8 on L. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1 varianti, kus A9 on E, ja HVR-H3 varianti, kus F6 on I, F7 on R ja F8 on L. Ühes teostuses on HVR-L1 variandis A9 S. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1 varianti, kus A9 on S, ja HVR-H3 varianti, kus F6 on I, F7 on R ja F8 on L.

[0299] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1 varianti, kus A4 on K. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-L1 variant HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavas järjekorras järjestusi SEQ ID NO: 132, 133, 134, 135 ja 136. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-L1 antikehavariant täiendavalt HVR-L1 varianti, kus A9 on E või S ja/või A10 on A või S. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-L1 antikehavariant täiendavalt HVR-L3 varianti, kus C6 on E või N ja/või C7 on A. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendusi asendites 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostustest sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 4 ja/või 47. Mõnedes nende antikehade teostustes on (inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 4 L ja/või asendis 47 F. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestus asendusi asendites 48, 67, 71, 73, 75, 78 ja/või 80. Nende antikehade mõnedes teostustes on (inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 48 I, asendis 69 F, asendis 71 A, asendis 73 T, asendis 75 S, asendis 78 A ja asendis 80 M. Mõnedes nende antikehade teostustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 4 ja/või 47. Mõnedes nende antikehade teostustes on (inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 4 L ja/või asendis 47 F.

[0300] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L2 varianti, kus B3 on R, B4 on K, B6 on G ja B7 on R. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L2 varianti, kus B3 on R, B4 on Y, B6 on K ja B7 on R. Ühes teostuses sisaldab nimetatud HVR-L2 antikehavariant HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisal-

dab vastavas järjekorras järjestusi SEQ ID NO: 131, 133, 134, 135 ja 136. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-L2 antikehavariant täiendavalt HVR-L1 varianti, kus A9 on E või S ja/või A10 on A või S. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-L2 antikehavariant täiendavalt HVR-L3 varianti, kus C6 on E või N ja/või C7 on A. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendusi asendites 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostustest sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 4 ja/või 47. Mõnedes nende antikehade teostustes on (inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 4 L ja/või asendis 47 F. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestus asendusi asendites 48, 67, 71, 73, 75, 78 ja/või 80. Nende antikehade mõnedes teostustes on (inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 48 I, asendis 69 F, asendis 71 A, asendis 73 T, asendis 75 S, asendis 78 A ja asendis 80 M. Mõnedes nende antikehade teostustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade mõnes teostuses sisaldab inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 4 ja/või 47. Mõnedes nende antikehade teostustes on (inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 4 L ja/või asendis 47 F.

[0301] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L3 varianti, kus C5 on K. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L3 varianti, kus C5 on S. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-L3 antikehavariant täiendavalt HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavas järjekorras järjestusi SEQ ID NO: 131, 132, 134, 135 ja 136. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-L3 antikehavariant täiendavalt HVR-L1 varianti, kus A9 on E või S ja/või A10 on A või S. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-L3 antikehavariant täiendavalt HVR-L3 varianti, kus C6 on E või N ja/või C7 on A. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendusi asendites 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostustest sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsen-

susjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 4 ja/või 47. Mõnedes nende antikehade teostustes on (inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 4 L ja/või asendis 47 F. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestus asendusi asendites 48, 67, 71, 73, 75, 78 ja/või 80. Nende antikehade mõnedes teostustes on (inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 48 I, asendis 69 F, asendis 71 A, asendis 73 T, asendis 75 S, asendis 78 A ja asendis 80 M. Mõnedes nende antikehade teostustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 4 ja/või 47. Mõnedes nende antikehade teostustes on (inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 4 L ja/või asendis 47 F.

[0302] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H1 varianti, kus D3 on P, D5 on T, D6 on R ja D10 on N. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H1 varianti, kus D3 on P, D5 on N, D6 on R ja D10 on N. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-H1 antikehavariant täiendavalt HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavas järjekorras järjestusi SEQ ID NO: 131, 132, 133, 135 ja 136. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-H1 antikehavariant täiendavalt HVR-L1 varianti, kus A9 on E või S ja/või A10 on A või S. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-H1 antikehavariant täiendavalt HVR-L3 varianti, kus C6 on E või N ja/või C7 on A. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendusi asendites 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostustest sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 4 ja/või 47. Mõnedes nende antikehade teostustes on (inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 4 L ja/või asendis 47 F. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestus asendusi asendites 48, 67, 71, 73, 75, 78 ja/või 80. Nende antikehade mõnedes teostustes on (inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 48 I, asendis 69 F, asendis 71 A, asendis 73 T, asendis 75 S, asendis 78 A ja asendis 80 M. Mõnedes nende antikehade teos-



tustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 4 ja/või 47. Mõnedes nende antikehade teostustes on (inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 4 L ja/või asendis 47 F.

[0303] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H3 varianti, kus F6 on I ja F8 on L. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H3 varianti, kus F6 on I, F7 on R ja F8 on L. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-H3 antikehavariant täiendavalt HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 ja HVR-H2, kus igaüks neist sisaldab vastavas järjekorras järjestusi SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134 ja 135. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-H3 antikehavariant täiendavalt HVR-L1 varianti, kus A9 on E või S ja/või A10 on A või S. Mõnedes teostustes sisaldab nimetatud HVR-H3 antikehavariant täiendavalt HVR-L3 varianti, kus C6 on E või N ja/või C7 on A. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendusi asendites 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostustest sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 4 ja/või 47. Mõnedes nende antikehade teostustes on (inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 4 L ja/või asendis 47 F. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestus asendusi asendites 48, 67, 71, 73, 75, 78 ja/või 80. Nende antikehade mõnedes teostustes on (inimese raske ahela III alarühma raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 48 I, asendis 69 F, asendis 71 A, asendis 73 T, asendis 75 S, asendis 78 A ja asendis 80 M. Mõnedes nende antikehade teostustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 4 ja/või 47. Mõnedes nende antikehade teostustes on (inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestuse) asendis 4 L ja/või asendis 47 F.

[0304] Ühes eripäras esitatakse leiutises antikeha, mis sisaldab ühte, kahte, kolme, nelja, viit või kõiki HVR järjestusi, mis on kujutatud joonisel 9 (SEQ ID NO: 17-21) ja/või joonisel 10 (SEQ ID NO: 22–106).

[0305] Eelistatult kutsub peremees-subjektil kasutamiseks mõeldud terapeutiline aine nimetatud subjektil esile vähese immunogeense vastuse või ei kutsu seda üldse esile. Ühes teostuses esitatakse leiutises sellise aine. Näiteks esitatakse leiutises ühes teostuses humaniseeritud antikeha, mis kutsub peremees-subjektil esile ja/või eeldatavasti kutsub esile inimese hiirevastase antikehavastuse (*human anti-mouse antibody response*, HAMA) oluliselt alanenud tasemel võrreldes antikehaga, mis sisaldab järjestusi SEQ ID NO: 10 ja 14. Teises näites esitatakse leiutises humaniseeritud antikeha, mis kutsub esile ja/või eeldatavasti kutsub esile inimese minimaalse hiirevastase antikehavastuse (HAMA) või ei kutsu seda üldse esile. Ühes näites kutsub leiutisekohane antikeha esile hiirevastase antikehavastuse, mis on kliiniliselt vastuvõetaval tasemel või alla selle.

[0306] Leiutisekohane humaniseeritud antikeha võib oma raske ja/või kerge ahela varieeruv domeenis sisaldada ühte või mitut inimese mitte-hüpervarieeruva piirkonna (näiteks raamistiku) järjestust või konsensusjärjestust. Mõnedes teostustes esineb inimese mittehüpervarieeruva piirkonna järjestustes ja/või konsensusjärjestustes üks või mitu täiendavat modifikatsiooni. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohase antikeha raske ahela varieeruv domeen inimese raamistiku konsensusjärjestust, mis ühes teostuses on alarühma III raamistiku konsensusjärjestus. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohase antikeha alarühma III raamistiku konsensusjärjestuse varianti, milles vähemalt üks aminohappeasend on modifitseeritud. Näiteks võib ühes teostuses alarühma III raamistiku konsensusjärjestuse variant sisaldada asendust ühes või mitmes positsioonidest 71, 73 ja/või 78. Ühes teostuses on nimetatud asendus R71A, N73T ja/või L78A ükskõik missuguses kombinatsioonis. Näiteks ühes teostuses sisaldab raske ahela alarühma III raamistiku konsensusjärjestuse variant asendust asendis 48, 67, 69, 71, 73 ja/või 78. Ühes teostuses on nimetatud asendus V48I, F67A, I69F, R71A, N73T ja/või L78A. Näiteks ühes teostuses sisaldab raske ahela alarühma III raamistiku konsensusjärjestuse variant asendust asendis 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 ja/või 80. Ühes teostuses on nimetatud asendus V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, K75S, L78A ja/või L80M. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohase antikeha kerge ahela varieeruv domeen inimese raamistiku konsensusjärjestust, mis ühes teostuses on κI raamistiku konsensusjärjestus. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha κI raamistiku konsensusjärjestust, mis vähemalt ühes aminohappeasendis on modifitseeritud. Näiteks võib ühes teostuses κI raamistiku konsensusjärjestuse variant sisaldada asendust asendis 4. Ühes teostuses on nimetatud asendus M4L. Näiteks

ühes teostuses võib κI raamistiku konsensusjärjestuse variant sisalda asendust asendis 4 ja/või asendis 47. Ühes teostuses on nimetatud asendus M4L ja/või L47F.

[0307] Nagu tehnika tasemest on teada ja nagu siin allpool on detailsemalt kirjeldatud, võib aminohappeasend / antikeha hüpervarieeruvat piirkonda kirjeldav piir varieeruda sõltuvalt kontekstist ja tehnika tasemest tuntud erinevatest definitsioonidest (nagu allpool on kirjeldatud). Mõnesid asendeid varieerub domeenis võib vaadelda hübriidsete hüpervarieeruvate asenditena selles mõttes, et neid asendeid saab ühe kriteeriumikomplekti järgi pidada hüpervarieeruva piirkonna sees olevateks, samas kui teise kriteeriumikomplekti järgi saab neid pidada hüpervarieeruvast piirkonnast väljaspool olevateks. Ühe või mitu nendest asenditest võib leida ka laiendatud hüpervarieeruvates piirkondades (nagu täiendavalt on allpool defineeritud). Leiutises esitatakse antikehad, mis sisaldavad modifikatsioone nendes hübriidsetes hüpervarieeruvates piirkondades. Ühes teostuses kuuluvad nende hüpervarieeruvate asendite hulka üks või mitu raske ahela varieeruva domeeni asenditest 26-30, 33-35B, 47-49, 57-65, 93, 94 ja 101-102. Ühes teostuses kuuluvad nende hüpervarieeruvate asendite hulka üks või mitu kerge ahela varieeruva domeeni asenditest 24-29, 35-36, 46-49, 56 ja 97. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha inimese alarühma raamistiku konsensusjärjestuse varianti, mis on modifitseeritud ühes või mitmes hübriidses hüpervarieeruv asendis.

[0308] Ühes eripäras sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab inimese alarühma III raamistiku konsensusjärjestuse varianti, mis on modifitseeritud ühes või mitmes asenditest 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 ja 101. Ühes teostuses sisaldab antikeha G26P asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha F27Y asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha T28P, S, Y, G või N asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha F29L või F29V asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha S30T, R, N, K, C, G või P asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha A33W või A33F asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha M34I, V või L asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha S35E, Q, N või D asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha V48I asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha S49G asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha Y58N asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha A60N asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha D61E asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha S62I asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha V63F asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha A93T asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha D101S asendust.

[0309] Ühes eripäras sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab inimese kapa alarühma I konsensusjärjestuse varianti, mis on modifitseeritud ühes

või mitmes asenditest 24, 27-29, 56 ja 97. Ühes teostuses sisaldab antikeha R24K asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha Q27K asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha S28D või E asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha I29G, A või S asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha S56R, N, T või G asendust. Ühes teostuses sisaldab antikeha T97N asendust.

[0310] Ühes eripäras sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab inimese alarühma III raamistiku konsensusjärjestuse varianti, mis on modifitseeritud 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 asendis või kõigis asenditest 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 ja 101. Ühes teostuses valitakse modifikatsioon rühmast, millesse kuuluvad G26P, F27Y, T28P (S, Y, G või N), F29L (V), S30T (R, N, K, C, G või P), A33W (F), M34I (V või L), S25E (Q, N või D), V48I, S49G, Y58N, A60N, D61E, S62I, V63F, A93T ja D101S. Mõnedes leiutise teostustes sisaldab leiutisekohane antikeha alarühma III raamistiku konsensusjärjestuse varianti, mis on modifitseeritud asendites 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 ja/või 80. Ühes teostuses on nimetatud asendus V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, K75S, L78A ja/või L80M.

[0311] Ühes eripäras sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab inimese kapa alarühma I konsensusjärjestuse varianti, mis on modifitseeritud 1, 2, 3, 4, 5 asendis või kõigis asenditest 24, 27-29, 56 ja 97. Ühes teostuses valitakse modifikatsioon rühmast, millesse kuuluvad R24K, Q27K, S28D (E), I29G (A või S), S56R (N, T või G) ja T97N. Leiutise mõnes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha κI raamistiku konsensusjärjestuse varianti, mis on modifitseeritud asendis 4 ja/või 47. Ühes teostuses on nimetatud asendus M4L ja/või L47F.

[0312] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada inimese kerge ahela ükskõik missugust sobivat raamistikujärjestust või raamistiku konsensusjärjestust eeldusel, et antikehal on soovitud bioloogilised tunnused (näiteks soovitud sidumisafiinsus). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha vähemalt osa (või kõike) inimese κ kerge ahela raamistikujärjestusest. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha vähemalt osa (või kõike) inimese κ kerge ahela raamistiku konsensusjärjestusest.

[0313] Ühes eripäras sisaldab leiutisekohane antikeha raske ja/või kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab raamistikujärjestust, mis on kujutatud järjestusega SEQ ID NO: 9 (joonised 7A-B) ja/või 13 (joonised 8A-B).

[0314] Ühes eripäras on leiutisekohane antikeha humaniseeritud CD79b-vastane antikeha, mis on konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes eripäras inhibeerib humaniseeritud CD79b-

vastane antikeha, mis on konjugeeritud tsütotoksilise ainega, kasvaja progresseerumist ksenograftides.

[0315] Ühes eripäras on nii humaniseeritud antikeha kui kimäärne antikeha monovalentsed. Ühes teostuses sisaldavad nii humaniseeritud kui kimäärne antikeha ühte Fab piirkonda, mis on ühendatud Fc piirkonnaga. Ühes teostuses sisaldab kimäärne referentsantikeha varieeruva domeeni järjestusi, mis on kujutatud joonistel 7A-B (SEQ ID NO: 10) ja joonistel 8A-B (SEQ ID NO: 14) ja mis on ühendatud inimese Fc piirkonnaga. Ühes teostuses on inimese Fc piirkond IgG (näiteks IgG1, 2, 3 või 4) Fc piirkond.

[0316] Siin avaldatakse antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust, mis on kujutatud joonisel 15 (SEQ ID NO: 164-166). Ühes teostuses sisaldab varieeruv domeen FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust, mis on kujutatud joonisel 15 (SEQ ID NO: 160-163). Ühes teostuses sisaldab antikeha CH1 ja/või Fc järjestust, mis on kujutatud joonisel 15 (SEQ ID NO: 167 ja/või 168). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 15, SEQ ID NO: 164-166) ning FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust (joonis 15, SEQ ID NO: 160-163). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 15, SEQ ID NO: 164-166) ning CH1 ja/või Fc järjestust, mis on kujutatud joonisel 15 (SEQ ID NO: 167 ja/või 168). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 15, SEQ ID NO: 164-166) ja FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust (joonis 15, SEQ ID NO: 160-163) ning CH1 ja/või Fc järjestust (joonis 15, SEQ ID NO: 167 ja/või 168).

[00317] Siin avaldatakse antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust, mis on kujutatud joonisel 15 (SEQ ID NO: 156-158). Ühes teostuses sisaldab varieeruv domeen FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust, mis on kujutatud joonisel 15 (SEQ ID NO: 152-155). Ühes teostuses sisaldab antikeha CL1 järjestust, mis on kujutatud joonisel 15 (SEQ ID NO: 159). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (joonis 15, SEQ ID NO: 156-158) ning FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust, mis on kujutatud joonisel 15 (SEQ ID NO: 152-155). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat

domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 156-158) ning CL1 järjestust, mis on kujutatud joonisel 15 (SEQ ID NO: 159). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 156-158) ja FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust (SEQ ID NO: 152-155) ning CL1 järjestust, mis on kujutatud joonisel 15 (SEQ ID NO: 159).

[0318] Siin avaldatakse antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust, mis on kujutatud joonisel 16 (SEQ ID NO: 183-185). Ühes teostuses sisaldab varieeruv domeen FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust, mis on kujutatud joonisel 16 (SEQ ID NO: 179-182). Ühes teostuses sisaldab antikeha CH1 ja/või Fc järjestust, mis on kujutatud joonisel 16 (SEQ ID NO: 186 ja/või 187). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 16, SEQ ID NO: 183-185) ning FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust (joonis 16, SEQ ID NO: 179-182). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 16, SEQ ID NO: 183-185) ning CH1 ja/või Fc järjestust, mis on kujutatud joonisel 16 (SEQ ID NO: 186 ja/või 187). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 16, SEQ ID NO: 183-185) ja FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust (joonis 16, SEQ ID NO: 179-182) ning CH1 ja/või Fc järjestust (joonis 16, SEQ ID NO: 186 ja/või 187).

[0319] Siin avaldatakse antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust, mis on kujutatud joonisel 16 (SEQ ID NO: 175-177). Ühes teostuses sisaldab varieeruv domeen FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust, mis on kujutatud joonisel 16 (SEQ ID NO: 171-174). Ühes teostuses sisaldab antikeha CL1 järjestust, mis on kujutatud joonisel 16 (SEQ ID NO: 178). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 175-177) ning FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust (SEQ ID NO: 171-174), mis on kujutatud joonisel 16. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 175-177) ning CL1 järjestust (SEQ ID NO: 178), mis on kujutatud joonisel 16. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane

antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 175-177) ja FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust (SEQ ID NO: 171-174), mis on kujutatud joonisel 16, ning CL1 järjestust, mis on kujutatud joonisel 16 (SEQ ID NO: 178).

[0320] Ühes eripäras avaldatakse leiutises antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust, mis on kujutatud joonisel 17 (SEQ ID NO: 202-204). Ühes teostuses sisaldab varieeruv domeen FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust, mis on kujutatud joonisel 17 (SEQ ID NO: 198-201). Ühes teostuses sisaldab antikeha CH1 ja/või Fc järjestust, mis on kujutatud joonisel 17 (SEQ ID NO: 205 ja/või 206). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 17, SEQ ID NO: 202-204) ning FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust (joonis 17, SEQ ID NO: 198-201). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 17, SEQ ID NO: 202-204) ning CH1 ja/või Fc järjestust, mis on kujutatud joonisel 17 (SEQ ID NO: 205 ja/või 206). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 17, SEQ ID NO: 202-204) ja FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust (joonis 17, SEQ ID NO: 198-201) ning CH1 ja/või Fc järjestust (joonis 17, SEQ ID NO: 205 ja/või 206).

[0321] Ühes eripäras esitatakse leiutises antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust, mis on kujutatud joonisel 17 (SEQ ID NO: 194-196). Ühes teostuses sisaldab varieeruv domeen FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust, mis on kujutatud joonisel 17 (SEQ ID NO: 190-193). Ühes teostuses sisaldab antikeha CL1 järjestust, mis on kujutatud joonisel 17 (SEQ ID NO: 197). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 194-196) ning FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust (SEQ ID NO: 190-193), mis on kujutatud joonisel 17. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 194-196) ning CL1 järjestust (SEQ ID NO: 197), mis on kujutatud joonisel 17. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-

LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 194-196) ja FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust (SEQ ID NO: 190-193), mis on kujutatud joonisel 17, ning CL1 järjestust, mis on kujutatud joonisel 17 (SEQ ID NO: 197).

[0322] Siin avaldatakse antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust, mis on kujutatud joonisel 18 (SEQ ID NO: 221-223). Ühes teostuses sisaldab varieeruv domeen FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust, mis on kujutatud joonisel 18 (SEQ ID NO: 217-220). Ühes teostuses sisaldab antikeha CH1 ja/või Fc järjestust, mis on kujutatud joonisel 18 (SEQ ID NO: 224 ja/või 225). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 18, SEQ ID NO: 221-223) ning FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust (joonis 18, SEQ ID NO: 217-220). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 18, SEQ ID NO: 221-223) ning CH1 ja/või Fc järjestust, mis on kujutatud joonisel 18 (SEQ ID NO: 224 ja/või 225). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-HC, HVR2-HC ja/või HVR3-HC järjestust (joonis 18, SEQ ID NO: 221-223) ja FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC ja/või FR4-HC järjestust (joonis 18, SEQ ID NO: 217-220) ning CH1 ja/või Fc järjestust (joonis 18, SEQ ID NO: 224 ja/või 225).

[0323] Siin avaldatakse antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust, mis on kujutatud joonisel 18 (SEQ ID NO: 213-215). Ühes teostuses sisaldab varieeruv domeen FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust, mis on kujutatud joonisel 18 (SEQ ID NO: 209-212). Ühes teostuses sisaldab antikeha CL1 järjestust, mis on kujutatud joonisel 18 (SEQ ID NO: 216). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 213-215) ning FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust (SEQ ID NO: 209-212), mis on kujutatud joonisel 18. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 213-215) ning CL1 järjestust (SEQ ID NO: 216), mis on kujutatud joonisel 18. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab HVR1-LC, HVR2-LC ja/või HVR3-LC järjestust (SEQ ID NO: 213-215) ja FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC ja/või FR4-LC järjestust



(SEQ ID NO: 209-212), mis on kujutatud joonisel 18, ning CL1 järjestust, mis on kujutatud joonisel 18 (SEQ ID NO: 216).

[0324] Samuti esitatakse tsüsteiinidega konstrueeritud antikehad, kus üks või mitu algse antikeha aminohapet on asendatud vaba tsüsteiin-aminohappega, nagu on avaldatud taotlustes WO2006/034488 ja US 2007/0092940 (mis on siia liidetud viidetena kogu täielikkuses). Selliselt konstrueerida, st muteerida, võib ükskõik missugust CD79b-vastase antikeha vormi. Näiteks võib algse Fab antikehafragmendi modifitseerida moodustamaks tsüsteiinidega konstrueeritud Fab-i, mida siin nimetatakse kui „ThioFab“. Samamoodi võib modifitseerida algse monokloonsed antikeha, et moodustada „ThioMab“. Tuleb märkida, et ühe saidi muteerimine annab ThioFab-is ühe konstrueeritud tsüsteiinijäägi, samas kui ThioMab-is annab ühe saidi mutatsioon tulemuseks kaks konstrueeritud tsüsteiinijääki tänu IgG antikeha dimeerisele loomusele. Leiutisekohaste tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastaste antikehade hulka kuuluvad monokloonsed antikehad, humaniseeritud või kimäärsed monokloonsed antikehad ning antikehade antigeeni siduvad fragmendid, liitpolüpeptiidid ja analoogid, mis eelistatult seonduvad rakkudega seondunud CD79b polüpeptiididega. Alternatiivselt võib tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha sisaldada tsüsteiini siin avaldatud antikeha või Fab asendis, mis on järjestuse disainimise ja/või antikeha selektsiooni tulemus, ilma et muudetakse algset antikeha näiteks antikeha disainimise ja selektsiooniga faagil kuvamise abil või kerge ahela ja/või raske ahela raamistikjärjestuste ja konstantsete piirkondade *de novo* disainimise abil. Tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha sisaldab ühte või mitut vaba tsüsteiin-aminohapet, mille tioli reageerimisvõime väärtus on vahemikus 0,6 kuni 1,0, 0,7 kuni 1,0 või 0,8 kuni 1,0. Vaba tsüsteiin-aminohape on tsüsteiinijääk, mis on modifitseeritud algse antikehasse ja mis ei ole disulfiidsilla osa. Tsüsteiinidega konstrueeritud antikehad on kasulikud tsütotoksiliste ja/või kuvatavate ühendite ühendamiseks modifitseeritud tsüsteiini saiti näiteks maleimiid- või halogenoatsetüülrühma kaudu. Cys-jäägi tiolfunktsionaalrühma nukleofiiline aktiivsus maleimiidrühma suhtes on umbes 1000 korda suurem kui ükskõik missuguse teise valgus sisalduva funktsionaalrühma aktiivsus, näiteks lüsiinijäägi aminorühma või N-terminaalse aminorühma aktiivsus. Jodoatsetüül- ja maleimiidreagentide tiolispetsiifiline funktsionaalrühm võib reageerida aminorühmaga, aga sel juhul on vajalik kõrgem pH (>9,0) ja pikemad reaktsiooniajad (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic press, London).

[0325] Ühes eripäras sisaldab tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha konstrueeritud tsüsteiini ühes järgnevatest asenditest, kus see asend on kerges ahelas nummerdatud Kabat'i jt. järgi (vt. Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) ja raskes ahelas (kaasa arvatud Fc piirkond) EU nummerdamissüsteemi järgi (vt. Kabat et al., (1991), *supra*), kus kerge ahela konstantne piirkond, mis joonistel 24A, 25A, 26A, 27A, 28A, 48A ja 49A on kujutatud alla joonituna, algab asendis 109 (Kabat'i numeratsioon) ja raske ahela konstantne piirkond, mis joonistel 24B, 25B, 26B, 27B, 28B, 48B ja 49B on kujutatud alla joonituna, algab asendis 118 (EU numeratsioon). Asendit võib viidata ka tema asendi järgi joonistel 24-28, 48 ja 49 näidatud täispika kerge ahela ja raske ahela aminohapete järjestikuse nummerdamise abil. Vastavalt leiutise ühele teostusele sisaldab CD79b-vastane antikeha konstrueeritud tsüsteiini asendis LC-V205C (Kabat'i number: Val 205, järjestuse number 209 joonistel 27A ja 49A, kus sellesse asendisse on konstrueeritud Cys). Kergesse ahelasse konstrueeritud tsüsteiin on joonistel 27A ja 49A näidatud rasvases kirjas kahekordselt alla joonituna. Vastavalt leiutise ühele teostusele sisaldab CD79b-vastane antikeha konstrueeritud tsüsteiini asendis HC-A118C (EU number: Ala 118; Kabat'i number 114, järjestuse number 118 joonistel 24B, 25B, 26B, 28B või 48B, kus sellesse asendisse on konstrueeritud Cys). Raskesse ahelasse konstrueeritud tsüsteiin on joonistel 24B, 25B, 26B, 28B või 48B näidatud rasvases kirjas kahekordselt alla joonituna. Vastavalt leiutise ühele teostusele sisaldab CD79b-vastane antikeha konstrueeritud tsüsteiini asendis Fc-S400C (EU number: Ser 400; Kabat'i number 396; järjestuse number 400 joonistel 24B, 25B, 26B, 28B või 48B, kus sellesse asendisse on modifitseeritud Cys). Teistes teostustes on raske ahela (kaasa arvatud Fc piirkonna) konstrueeritud tsüsteiin ükskõik missuguses järgnevatest asenditest (vastavalt Kabat'i nummerdamissüsteemile, kusjuures EU numbrid on antud sulgudes): 5, 23, 84, 112, 114 (EU number 118), 116 (EU number 120), 278 (EU number 282), 371 (EU number 375) või 396 (EU number 400). Seega on algses humaniseeritud CD79b-vastases antikehas tehtud nendes asendites järgmised aminohappemuutused: V5C, A23C, A84C, S112C, A114C, (EU number A118C), T116C (EU number T120C), V278C (EU number V282C), S371C (EU number S375C) või S396C (EU number S400C). Seega on algses kimäärses CD79b-vastases antikehas tehtud nendes asendites järgmised aminohappemuutused: Q5C, K23, S84C, S112C, A114C (EU number A118C), T116C (EU number T120C), V278C (EU number V282C), S371C (EU number S375C) või S396C (EU number S400C). Seega on nendes asendites

alguses cyno-CD79b vastases antikehas tehtud järgmised aminohappemuutused: Q5C, K23, S84C, S112C, A114C (EU number A118C), T116C (EU number T120C), V278C (EU number V282C), S371C (EU number S375C) või S396C (EU number S400C). Teistes teostustes on kergesse ahelasse konstrueeritud tsüsteiin ükskõik missuguses järgmistest asenditest (Kabat'i nummerdamissüsteemi järgi): 15, 110, 114, 121, 127, 168, 205. Seega on alguses humaniseeritud CD79b-vastases antikehas tehtud nendes asendites järgmised aminohappemuutused: V15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C või V205C. Seega on alguses kimäärses CD79b-vastases antikehas tehtud nendes asendites järgmised aminohappemuutused: L15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C või V205C. Seega on alguses cyno-CD79b vastases antikehas tehtud nendes asendites järgmised aminohappemuutused: L15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C või V205C.

[0326] Ühes eripäras sisaldab tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha ühte või mitut vaba tsüsteiin-aminohapet, kus tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha seondub CD79b polüpeptiidiga ja see valmistatakse meetodiga, mis hõlmab alguses CD79b-vastases antikehas ühe või mitme aminohappejäägi asendamist tsüsteiiniga, kusjuures algne antikeha sisaldab vähemalt ühte HVR järjestust, mis valitakse järgnevate hulgast:

- (a) HVR-L1, mis sisaldab järjestust A1-A15, kus A1-A15 on KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131) või KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID NO: 137);
- (b) HVR-L2, mis sisaldab järjestust B1-B7, kus B1-B7 on AASNLES (SEQ ID NO: 132)
- (c) HVR-L3, mis sisaldab järjestust C1-C9, kus C1-C9 on QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)
- (d) HVR-H1, mis sisaldab järjestust D1-D10, kus D1-D10 on GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)
- (e) HVR-H2, mis sisaldab järjestust E1-E18, kus E1-E18 on GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135), ja
- (f) HVR-H3, mis sisaldab järjestust F1-F10, kus F1-F10 on TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136) või TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 138).

[0327] Siin avaldatakse tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on järjestuselt umbes 80% identne, alternatiivselt vähemalt umbes 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98%, 99% või 100% identne siin avaldatud, tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha järjestusega, mis sisaldab täispikka aminohapete järjestust, või siin avaldatud, tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha aminohapete järjestusega, milles puudub signaalpeptiid;

[0328] eraldatud, tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha, mis sisaldab aminohapete järjestust, mida kodeerib nukleiinhape, mis hübridiseerub sellise DNA molekuli komplemendiga, mis kodeerib (a) siin avaldatud tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, mis sisaldab täispikka aminohapete järjestust, (b) siin avaldatud tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha aminohapete järjestust, milles puudub signaalpeptiid, (c) siin avaldatud tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha membraani läbiva valgus rakuvalmist domeeni koos signaalpeptiidiga või sellela, (d) ükskõik missuguse siin avaldatud nukleiinhappejärjestuse poolt kodeeritavat aminohapete järjestust, või (e) ükskõik missugust siin avaldatud tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha aminohapete järjestuse spetsiifiliselt määratletud fragmenti;

[0329] eraldatud, tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha ilma N-terminaalse signaaljärjestuse ja/või initsieeriva metioniiniga, mida kodeerib nukleotiidjärjestus, mis kodeerib sellist aminohapete järjestust, mida siin on kirjeldatud. Samuti kirjeldatakse siin nende tootmisprotsesse, kus need protsessid hõlmavad selliste peremeesrakkude kasvatamist, mis sisaldavad vektorit, mis sisaldab vastavat kodeerivat nukleiinhappemolekuli tingimustes, mis sobivad tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha ekspresseerimiseks ja tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha kätesaamiseks rakukultuurist;

[0330] eraldatud, tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha, mille membraani läbiv domeen on kas deleteeritud või inaktiveeritud. Samuti kirjeldatakse siin nende tootmisprotsesse, kus need protsessid hõlmavad selliste peremeesrakkude kasvatamist, mis sisaldavad vektorit, mis sisaldab vastavat kodeerivat nukleiinhappemolekuli tingimustes, mis sobivad tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha ekspresseerimiseks ja tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha kätesaamiseks rakukultuurist;

[0331] eraldatud, tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastane kimäärne antikeha, mis sisaldab ükskõik missugust siin kirjeldatud tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, mis on liidetud heteroloogse (mitte-CD79b) polüpeptiidiga. Selliste kimäärsete molekulide näidete hulka kuuluvad kõik siin kirjeldatud tsüsteiinidega konstrueeritud antikehad, mis on liidetud heteroloogse polüpeptiidiga, nagu näiteks epitoop-otsaku järjestus või immunoglobuliini Fc piirkond.

[0332] Tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha võib olla monokloonne antikeha, antikehafragment, kimäärne antikeha, humaniseeritud antikeha, üheaahelaline antikeha või antikeha, mis inhibeerib konkureerivalt CD79b-vastase polüpeptiid-antikeha seondumist vastava antigeense epitoobiga. Antikehi võib valikuliselt konjugeerida kasvu inhibeeriva aine või tsütotoksilise ainega nagu toksiin, kaasa arvatud näiteks auristatiin, maitansinoid, dolo-statiini derivaat või kaliheamütsiin, antibiootikumi, radioaktiivse isotoobi, nukleolüütilise ensüümiga vms. Antikehi võib valikuliselt toota CHO rakkudes või bakterirakkudes ning eelistatult inhibeerivad nad nende rakkude kasvu või proliferatsiooni, millele nad seonduvad, või kutsuvad esile nende rakkude surma. Diagnostilistel eesmärkidel võib leiutisekohaseid antikehi kinnitada tahkele toesele vms.

[0333] Leiutise teistes eripärades esitatakse leiutises vektorid, mis sisaldavad DNA-d, mis kodeerib ükskõik missugust siin kirjeldatud CD79b-vastastest antikehadest ja tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastastest antikehadest. Samuti esitatakse ükskõik missugust nendest vektoritest sisaldavad peremeesrakud. Peremeesrakud võivad olla näiteks CHO rakud, *E. coli* rakud või pärmirakud. Lisaks esitatakse ükskõik missuguse siin kirjeldatud polüpeptiidi tootmise meetod, mis hõlmab peremeesrakkude kasvatamist tingimustes, mis sobivad soovitud polüpeptiidi ekspresseerimiseks ja soovitud polüpeptiidi kättesaamiseks rakukultuurist.

[0334] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikehad võivad olla kasulikud vähi ravimiseks ning nende hulka kuuluvad antikehad, mis on spetsiifilised membraani läbivate rakupinna retseptorite ja kasvajaga seotud antigeenide (*tumor-associated antigens*, TAA) suhtes. Selliseid antikehi võib kasutada paljaste antikehadena (mis ei ole konjugeeritud ravimi- või määrgis-osamolekuliga) või antikeha ja ravimi konjugaatidena (ADC). Leiutisekohased tsüsteiinidega konstrueeritud antikehad võivad olla saidi-spetsiifilised ja tõhusalt sidestatud tiooliga reageerivate reagentidega. Tiooliga reageeriv reagent võib olla multifunktsionaalne linker-reagent, püüdurmärgisega reagent, fluorofoor-reagent või ravimi ja linkeri vaheline vaheühend. Tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha võib märgistada detekteeritava märgisega, immobiliseerida tahkefaasilisele toesele ja/või konjugeerida ravimi-osamolekuliga. Tioolrühma reageerimisvõime võib üldistada ükskõik missugusele antikehale, milles aminohapete asendamise reageerimisvõimeliste tsüsteiin-aminohapetega saab teha kerge ahela vahemikus, mis valitakse järgmiste aminohapete vahemike hulgast: L10-L20, L105-L115, L109-L119, L116-L126, L122-L132, L163-L173, L200-L210; ja raske ahela vahemikus, mis valitakse järgmiste aminohapete vahemike hulgast: H1-H10, H18-H28, H79-H89, H107-H117, H109-H119,

H111-H121, ning Fc piirkonnas vahemikes, mis valitakse H270-H280, H366-H376, H391-H401 hulgast, kus aminohappeasendite nummerdamine algab Kabat'i nummerdamissüsteemi asendist 1 (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) ja jätkub seejärel nii, nagu on avaldatud taotlustes WO 2006/034488 ja US 2007/0092940. Tiolrühma reageerimisvõime võib üldistada ka antikeha konkreetsetele domeenidele, nagu kerge ahela konstantne domeen (CL) ja raske ahela konstantsed domeenid CH1, CH2 ja CH3. Tsüsteiniiasendusi, mis annavad tulemuseks tioli reageerimisvõime väärtuse 0,6 või üle selle, võib teha intaktsete antikehade IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM, kaasa arvatud IgG alamklasside IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ning IgA1 ja IgA2, raske ahela vastavatesse konstantsetesse domeenidesse  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ja  $\mu$ . Sellised antikehad ja nende kasutamine on avaldatud taotlustes WO 2006/034488 ja US 2007/0092940.

[0335] Eelistatult säilitavad tsüsteiinidega konstrueeritud antikehad oma algsete metsiktüüpi antikeha-aarikute antigeeni siduva võime. Nii on tsüsteiinidega konstrueeritud antikehad võimelised seonduma antigeenidega, eelistatult spetsiifiliselt. Nende antigeenide hulka kuuluvad näiteks kasvajaseoselised antigeenid (TAA), rakupinna retseptorvalgud ja teised rakupinna molekulid, membraani läbivad valgud, signaalvalgud, rakkude eluspüsimit reguleerivad faktorid, rakkude proliferatsiooni reguleerivad faktorid, koe arenemise või diferentseerumisega seotud molekulid (näiteks need, mille kohta on teada või mis eeldatavasti panustavad sellesse funktsionaalselt), lümfokiinid, tsütokiinid, rakutsükli regulatsioonis osalevad molekulid, vaskulogeneesis osalevad molekulid ning molekulid, mis on seotud angiogeneesiga (näiteks need, mille kohta on teada või mis eeldatavasti panustavad sellesse funktsionaalselt). Kasvajaga seotud antigeen võib olla klaster-diferentseerumiskfaktor (st CD valk, kaasa arvatud, kuid sellega mitte piiratud, CD79b). Leiutisekohased tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastased antikehad säilitavad oma algsete CD79b-vastaste antikehapaarikute antigeeni siduva võime. Seega on tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastased leiutisekohased antikehad võimelised siduma, eelistatult spetsiifiliselt, CD79b antigeene, kaasa arvatud inimese CD79b beeta ja/või alfa isovorme, kaasa arvatud juhul, kui need antigeenid ekspresseeruvad raku pinnal, kaasa arvatud, kuid nendega mitte piiratud, B-rakkude pinnal.

[0336] Ühes eripäras võivad leiutisekohased antikehad olla konjugeeritud ükskõik missuguse märgise-osamolekuliga, mille võib antikehale kovalentselt kinnitada kas reageerimisvõimelise osamolekuli, aktiveeritud osamolekuli või reageerimisvõimelise tsüsteiini tiolrühma

kaudu (Singh et al., (2002) *Anal. Biochem.*, 304:147-15; Harlow E., 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*, 2. väljaanne, CRC Press, Boca Raton, FL). Antikehale kinnitatud märgis võib funktsioneerida, (i) esitades detekteeritava signaali, (ii) interakteerudes teise märgisega, et modifitseerida esimese või teise märgise poolt esitatavat signaali, st anda FRET (*fluorescence resonance energy transfer*, fluorestsentsi resonantsenergia ülekande), (iii) stabiliseerides interaktsioone antigeeni või ligandiga või suurendades nende sidumisafiinsust, (iv) mõjutades antikeha liikuvust, näiteks elektroforeetilist liikuvust või raku tungimise võimet laengu, hüdrofoobsuse, kuju või mõne muu füüsikalise parameetri muutmise abil, või (v) esitades püüdur-osamolekuli, et moduleerida ligandi afiinsust, antikeha seondumist antigeeniga või ionide komplekseerumist.

[0337] Tsüsteiinidega konstrueeritud märgistatud antikehad võivad olla kasulikud diagnostilisteks testideks, näiteks huvialuse antigeeni ekspressiooni detekteerimiseks spetsiifilistes rakkudes, kudedes või seerumis. Diagnostilisteks rakendusteks märgistatakse antikeha tavaliselt detekteeritava osamolekuliga. Saadaval on palju märgiseid ja need võib üldiselt jaotada järgmistesse klassidesse.

[0338] Radioisotoobid (radionukliidid), nagu  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$  või  $^{213}\text{Bi}$ . Radioisotoopidega märgistatud antikehad on kasulikud retseptorile suunatud kuvamiskatsetes. Antikeha võib märgistada ligand-reagentidega, mis seovad metalli radioisotoobi, kelaadivad selle või annavad sellega mingil muul moel kompleksi, kusjuures see reagent reageerib antikehasse konstrueeritud tsüsteiini tiolrühmaga, kui kasutatakse meetodeid, mida on kirjeldatud teoses: *Current Protocols in Immunology*, kd. 1 ja 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY (1991). Kelaativate ligandide hulka, mis võivad anda metalliiooniga kompleksi, kuuluvad DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA ja TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Radionukliidid võivad olla sihtmärgiks leiutisekohase antikeha ja ravimi konjugaatidele, andes nendega komplekse (Wu et al., (2005) *Nature Biotechnology*, 23(9): 1137-1146).

[0339] Linker-reagente, nagu DOTA-maleimiid (4-maleimidobutüüramidobensüül-DOTA), saab valmistada aminoberuüül-DOTA reaktsioonis 4-maleimidobutüürhappega (Fluka), mis on aktiveeritud isopropüülkloroformiaadiga (Aldrich) Axworthy jt. Meetodi kohaselt (Axworthy et al., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(4): 1802-1807). DOTA-maleimiid-

reagent reageerib tsüsteiinidega konstrueeritud antikehade vabade tsüsteiin-aminohapetega, varustades antikeha metalli komplekseeriva ligandiga (Lewis et al., (1998) *Bioconj. Chem.*, 9: 72-86). Kelaativad linker-märgistusreagentid, nagu DOTA-NHS (1,4,7,10-tetraasatsüklo-dodekaan-1,4,7,10-tetraädikhappe mono(N-hüdrosüsuktsiinimiid)ester, on kaubanduslikult saadavad (Macrocyclics, Dallas, TX). Retseptorile suunatud kuvamine radionukliididega märgistatud antikehadega võib anda metaboolse raja aktivatsiooni markeri, kus detekteeritakse ja mõõdetakse kvantitatiivselt antikehade progresseeruvat akumulereerumist vähikoosse (Albert et al., (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8: 1207-1210). Konjugeeritud radioaktiivsed metallid võivad lüsosomaalse degradatsiooni järel jääda rakkudesse.

[0340] Metall-kelaadi kompleksid, mis sobivad kuvamiskatsetes antikehamärgistena, on avaldatud järgmistes allikates: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich et al., (1983) *J. Immunol. Methods*, 65: 147-157; Meares et al., (1984) *Anal. Biochem.*, 142: 68-78; Minadeh et al., (1990) *Bioconjugate Chem.*, 1: 59-65; Meares et al., (1990) *J. Cancer*, 1990, täiendköide 10: 21-26; Izard et al., (1992) *Bioconjugate Chem.*, 3: 346-350; Nikula et al., (1995) *Nucl. Med. Biol.*, 22: 387-90; Camera et al., (1993) *Nucl. Med. Biol.*, 20: 955-62; Kukis et al., (1998) *J. Nucl. Med.*, 39: 2105-2110; Verel et al., (2003) *J. Nucl. Med.*, 44: 1663-1670; Camera et al., (1994) *J. Nucl. Med.*, 21: 640-646; Ruegg et al., (1990) *Cancer Res.*, 50: 4221-4226; Verel et al., (2003) *J. Nucl. Med.*, 44: 1663-1670; Lee et al., (2001) *Cancer Res.*, 61: 4474-4482; Mitchell, et al., (2003) *J. Nucl. Med.*, 44: 1105-1112; Kobayashi et al., (1999) *Bioconjugate Chem.*, 10: 103-111; Miederer et al., (2004) *J. Nucl. Med.*, 45: 129-137; DeNardo et al., (1998) *Clinical Cancer Research*, 4: 2483-90; Blend et al., (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 18: 355-363; Nikula et al., (1999) *J. Nucl. Med.*, 40: 166-76; Kobayashi et al., (1998) *J. Nucl. Med.*, 39: 829-36; Mardirossian et al., (1993) *Nucl. Med. Biol.*, 20: 65-74; Roselli et al., (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14: 209-20.

[0341] Fluorestseeruvaid märgiseid, nagu haruldaste muldmetallide kelaadid (näiteks euroopiumi kelaadid), eri tüüpi fluorestsüinid, kaasa arvatud FITC, 5-karboksfluorestseiin, 6-karboksüfluorestseiin, eri tüüpi rodamiinid, kaasa arvatud TAMRA, dansüülrühm, lissamiin, tsüaniinid fukoerütriin, värvaine Texas Red ja nende analoogid, võib antikehadega konjugeerida meetoditel, mis on avaldatud näiteks teoses: *Current Protocols in Immunology*, *supra*. Fluorestseeruvate värvide ja fluorestseeruvate märgis-reagentide hulka kuuluvad need, mis



on kaubanduslikult saadavad firmadest Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) ja Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

[0342] Saadaval või avaldatud on ka erinevaid ensüüm-substraatmürgiseid (UWS 4275149). Ensüüm katalüüsib üldiselt kromogeense substraadi keemilist muundamist, mida saab mõõta erinevate tehnikate kasutamisel. Näiteks võib ensüüm katalüüsida substraadi värvuse muutumist, mida saab mõõta spektrofotomeetriselt. Alternatiivselt võib ensüüm muuta substraadi fluorestsentsi või kemoluminestsentsi. Fluorestsentsi muutuse kvantitatiivse mõõtmise meetodeid on kirjeldatud eespool. Kemoluminestsentsi substraat ergastatakse keemilises reaktsioonis elektroonselt ja ta võib kiirata valgust, mida saab mõõta (näiteks kemoluminomeetri kasutamisel), või annab ta energia ära fluorestseeruvale aktseptorile. Ensüüm-mürgiste näidete hulka kuuluvad lutsiferaasid (näiteks jaanimardika lutsiferaas ja bakteriaalne lutsiferaas, US 4737456), lutsiferiin, 2,3-dihüdrotalasiindioonid, malaatdehüdrogenaas, ureaas, peroksüdaas, näiteks mädarõika peroksüdaas (*horseradish peroxidase*, HRP), leeliseline fosfataas (*alkaline phosphatase*, AP),  $\beta$ -galatosidaas, glükoamülaas, lüsotsüüm, sahhariidoksüdaasid (näiteks glükoosoksüdaas, galaktoosoksüdaas ja glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaas), heterotsükliite oksüdaasid (nagu urikaas ja ksantiinoksüdaas), laktoperoksüdaas, mikroperoksüdaas jne. Ensüümide ja antikehade konjugeerimise meetodeid on kirjeldanud O'Sullivan jt. (O'Sullivan et al., (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", teoses: *Methods in Enzym.* (toim. J. Langone ja H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73: 147-166).

[0343] Ensüüm-substraatide kombinatsioonide hulka kuuluvad näiteks:

- (i) mädarõika peroksüdaas (HRP) koos vesinikperoksüdaasi kui substraadiga, kus vesinikperoksüdaas oksüdeerib eellas-värvimolekuli (näiteks ortofenüleendiamiini (OPD) või 3,3',5,5'-tetrametüülbensidiinhüdrokloriidi (TMB)),
- (ii) leeliseline fosfataas (AP) paranitrofenüülfosfaadi kui kromogeense substraadiga ja
- (iii)  $\beta$ -D-galaktosidaas ( $\beta$ -D-Gal) kromogeense substraadi (näiteks p-nitrofenüül- $\beta$ -D-galaktosidaasiga) või fluorogeense substraadi 4-metüülumbelliferüül- $\beta$ -D-galaktosidaasiga.

[0344] Eriala asjatundjatele on saadaval ka palju teisi ensüüm-substraatide kombinatsioone. Üldist ülevaadet vt. patentidest US 4275149 ja US 4318980.

[0345] Märglise võib konjugeerida kaudselt tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha aminosahhara külghela kaudu, aktiveeritud aminosahhara külghela kaudu jne. Näiteks võib antikeha konjugeerida biotiiniga ning ükskõik missuguse kolmest eespool märgitud laiast märgistekategooriast võib konjugeerida avidiini või streptavidiiniga või vastupidi. Biotiin seondub selektiivselt streptavidiiniga ja seega saab märglise konjugeerida antikehaga ka kaudselt viisil. Alternatiivselt konjugeeritakse märglise kaudselt konjugeerimiseks polüpeptiidvariandiga see polüpeptiidvariant väikese hapteneiga (näiteks digoksiiniga) ja hapteneivastane polüpeptiidvariant (näiteks digoksiinivastane antikeha) konjugeeritakse ühega eespool märgitud erinevatest märgistest. Nii on võimalik saavutada märglise kaudne konjugeerimine polüpeptiidvariandiga (Hermanson, G. (1996) teoses: *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego).

[0346] Leiutisekohast antikeha võib kasutada ükskõik missuguse tuntud testmeetodi puhul, nagu ELISA konkureerivad sidumistestid, otsesed ja kaudsed „võileib“testid ja immunosadestamistestid (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 147-158, CRC Press, Inc.).

[0347] Detekteeritav märglise võib olla kasulik seondumis- või äratundmissündmuse lokaliseerimiseks, visualiseerimiseks ja kvantitatiivseks mõõtmiseks. Leiutisekohaste märgistatud antikehadega võib detekteerida rakupinna retseptoreid. Teine detekteeritavalt märgistatud antikehade kasutamise võimalus on kerakestel põhinev immuunpüüdmismeetod, mis hõlmab kerakese konjugeerimist fluorestseeruvalt märgistatud antikehaga ja ligandiga seondumise puhul fluorestsentsignaali detekteerimist. Samasugustes seondumise detekteerimise meetodites kasutatakse antikeha ja antigeeni interaktsioonide detekteerimiseks pinna plasmonresonantsi (*surface plasmon resonance*, SPR) efekti.

[0348] Sellised detekteeritavad märglise nagu fluorestseeruvad värvid ja kemoluminesseeruvad värvid ((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), mis annavad detekteeritava signaali ja on üldiselt rakendatavad antikehade märgistamiseks, on eelistatavalt järgmiste omadustega: (i) märgistatud antikeha peab andma väga tugeva signaali ja madala fooni, nii et antikehade väikesi koguseid saaks tundlikult detekteerida nii rakuvabades kui rakupõhistes testides, ja (ii) märgistatud antikeha peab olema fotostabiilne, nii et fluorestsentsignaali saaks detekteerida, jälgida ja registreerida olulise fotopleegitumiseta. Nende rakenduste puhul, mis hõlmavad märgistatud antikeha raku pinna seondumist

membraanide või raku pindadega, eriti elusrakkude membraanide või pindadega, on märgised eelistatult (iii) vees hästi lahustuvad, et saavutada konjugaadi efektiivne kontsentratsioon ja detekteerimise tundlikkus, ning (iv) elusrakkudele mittetoksilised, nii et nad ei riku rakkude normaalseid metaboolseid protsesse ja ei põhjusta rakkude enneaegset surma.

[0349] Raku fluorestsentsi intensiivsuse otsese kvantitatiivse mõõtmise ja fluorestsents-märgistatud sündmuste, näiteks peptiidi ja värvi konjugaatide seondumise raku pinnale, loendamise võib läbi viia süsteemis (FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, California), mis automatiseerib elusrakkude või kerakestega tehtavad segamise ja loendamise mitteradioaktiivsed testid (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *J. of Biomolecular Screening*, 4: 193-204). Märgistatud antikehade kasutamine hõlmab ka raku-pinna retseptorite sidumisteste, immuunpüüdumise teste, fluorestsentsiseoselisi immunosorbentanalüüse (FLISA), kaspasiga lõikamise teste (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), apoptoosisteste (Vermees, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) *J. Immunol. Methods*, 184: 39-51) ja tsütotoksilisuse teste. Rakupinnale siunatud molekuli abil toimuvate üles- ja allareguleerimise identifitseerimiseks võib kasutada fluorimeetrilist mikromahtude määramise testide meetodit (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *Anal. Biochem.*, 271: 143-51).

[0350] Leiutisekohased märgistatud antikehad on kasulikud biomarkerite ja sondidena, mida saab kuvada erinevate biomeditsiiniliste ja molekulaarsete kuvamismeetodite abil, nagu (i) MRI (*magnetic resonance imaging*, magnetresonantskuvamine), (ii) MicroCT (*computerized tomography*, kompuutertomograafia), (iii) SPECT (*single photon emission computed tomography*, üksiku footoni emissiooni kompuutertomograafia), (iv) PET (*positron emission tomography*, positronemissioontomograafia) (Chen et al., (2004) *Bioconjugate Chem.*, 15: 41-49), (v), bioluminestsents, (vi) fluorestsents ja (vii) ultraheli. Immunostsintigraafia on kuvamisprotseduur, mille puhul loom- või inimpatsiendile manustatakse radioaktiivsete ainetega märgistatud antikehad ja siis võetakse pildid nendest keha kohtadest, kuhu antikeha lokaliseerub (US 6528624). Kuvatavaid biomarkereid võib eesmärgipäraselt mõõta

ja hinnata normaalsete bioloogiliste protsesside, patogeensete protsesside või terapeutilise sekkumise farmakoloogiliste vastuste mõõtmise indikaatorina. Biomarkerid võivad olla mitut tüüpi. 0 tüüpi on loomuliku haiguskulu markerid ja need korreleeruvad tuntud kliiniliste näitajatega, näiteks sünoviaalpõletiku MRI hindamisega reumatoidartriidi puhul. I tüüpi markerid püüavad kinni sekkumise efekti vastavalt toimemehhanismile isegi juhul, kui see mehhanism võib mitte olla seotud kliinilise lõpptulemusega. II tüüpi markerid toimivad surrogaat-lõpp-punktidenä, kus biomarkeri muutus või sellelt tulev signaal ennustab sihiks oleva vastuse „valideerimise“ kliinilist kasulikkust, näiteks CT abil mõõdetud luu erosioon reumatoidartriidi puhul. Seega võivad kuvatavad biomarkerid anda farmakodünaamilist (*pharmacodynamic*, PD) terapeutilist informatsiooni: (i) sihtmärkvalgu ekspressiooni kohta, (ii) ravimi seondumise kohta sihtmärkvalguga, st selektiivsuse kohta, ja (iii) ravimi kõrvaldumise ja poolväärtusaja farmakokineetiliste andmete kohta. *In vivo* kuvatavate biomarkerite eeliste hulka laboripõhiste biomarkerite ees kuuluvad: mitteinvasiivne ravi, kvantitatiivne mõõdetavus, kogu keha hindamine, korduv annustamine ja hindamine, st palju ajapunkte, ning potentsiaalselt ülekantavad toimed eelkliinilistelt tulemustelt (väikeloomadelt) kliinilistele tulemustele (inimesele). Mõnede rakenduste puhul tõrjub biokuvamine eelkliinilistes uuringutes loomkatsed välja või viib nende arvu minimaalseks.

[0351] Peptiidide märgistamismeetodid on hästi teada, vt. Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Carman, (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* (toim. T. S. Work ja E. Work) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L., Noyes, C. M., (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, kd. I ja II, CRC Press, New York; Pfeleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, toim. H. Tschesche, Walter DeGryter, Berlin ja New York; ning Wong, (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.; De Leon-Rodriguez et al., (2004) *Chem. Eur. J.*, 10: 1149-1155; Lewis et al., (2001) *Bioconjugate Chem.*, 12: 320-324; Li et al., (2002) *Bioconjugate Chem.*, 13: 110-115; Mier et al., (2005) *Bioconjugate Chem.*, 16: 240-237.

[0352] Kahe osamolekuliga - fluorestseeruva reportertermärgise ja kustutava osamolekuliga – piisavalt lähestikku märgistatud peptiidides ja valkudes toimub fluorestsentsenergia ülekanne

(*fluorescence resonance energy transfer*, FRET). Reporterrühmad on tavaliselt fluorestseeruvad värvid, mis ergastatakse teatud lainepikkuse valgusega ja mis kannavad energia aktseptorrühmale ehk kustutavale rühmale koos ergastuse vastava Stokes'i nihkega maksimaalse heleduse juures. Fluorestseeruvate värvide hulka kuuluvad laiendatud aromaatsusega molekulid, nagu fluorestsein ja rodamiin ning nende derivaadid. Fluorestseeruva reporteri võib kas osaliselt või oluliselt kustutada intaktse valgus sisalduv kustutav osamolekul. Peptiidi lõikamisel kas peptidaasi või proteaasiga võib mõõta fluorestsentsi detekteeritavat suurenemist (Knight, C., (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248: 18-34).

[0353] Leiutisekohaseid märgistatud antikehi võib kasutada ka afiinse puhastamise vahendina. Selles protsessis immobiliseeritakse antikeha tahkele faasile, nagu Sephadex-kandja või filterpaber, kasutades tehnika tasemest hästi tuntud meetodeid. Immobiliseeritud antikeha viiakse kokkupuutesse puhastamist vajavat antigeeni sisaldava prooviga ning seejärel pestakse tahket faasi sobiva lahustiga, mis eemaldab praktiliselt kogu proovis oleva materjali peale puhastatava antigeeni, mis on seondunud immobiliseeritud polüpeptiidvariandile. Lõpuks pestakse kandjat teise sobiva lahustiga nagu glütsiinpuhver, pH 5,0, mis vabastab antigeeni polüpeptiidvariandist.

[0354] Märgistavad reaktiivid kannavad tavaliselt reageerimisvõimelist funktsionaalrühma, mis võib reageerida (i) otse tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha tsüsteiini tioolrühmaga, moodustades märgistatud antikeha, (ii) linkerreagendiga, moodustades linker-märgistatud vaheühendi, või (iii) linkerantikehaga, moodustades märgistatud antikeha. Märgistamisreagentide aktiivsete funktsionaalrühmade hulka kuuluvad: maleimiid-, halogenoatsetüül-, jodotatsetamiidsuktsiinimidüülester (näiteks NHS, N-hüdrosüsuktsiinimiid), isotiotsüanaat, sulfonüülkloriid, 2,6-diklorotriasiinüül-, pentafluorofenüülester- ja fosforamidiit-rühmad, ehkki võib kasutada ka teisi funktsionaalrühmi.

[0355] Reageerimisvõimelise funktsionaalrühma näide on detekteeritava märgise, näiteks biotiini või fluorestseeruva värvi, karboksüülrühma asendaja N-hüdrosüsuktsiinüülimidüülester (NHS). Märgise NHS-estri võib moodustada, eraldada, puhastada ja/või iseloomustada eelnevalt või selle võib moodustada *in situ* ja lasta reageerida antikeha nukleofiilse rühmaga. Tavaliselt aktiveeritakse märgise karboksüülvorm karbodiimiidreagendi, näiteks ditsükloheksüülkarbodiimiidi, diisopropüülkarbodiimiidi või urooniumreagendi, näiteks TSTU (O-(N-suktsiinimidüül)-N,N,N',N'-tetrametüülurooniumtetrafluoroboraadi), HBTU (O-bensotri-

asool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaadi) või HATU (O-(7-asabensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaadi), ja aktivaatori nagu 1-hüdrosübensotriasool (HOBt), ning N-hüdrosüsuksiinimiidi kombinatsiooniga, saades märgise NHS-estri. Mõnedel juhtudel võib märgise ja antikeha sidestada ühes etapis tehtava märgise *in situ* aktiveerimise ja antikehaga reageerimise abil, saades märgise ja antikeha konjugaadi. Teiste aktiveerimis- ja sidestamisreagentide hulka kuuluvad TBTU (2-(1H-bensotriaso-1-üül-1,3,3-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat), TFFH (N,N',N'',N'''-tetrametüüluroonium-2-fluoroheksafluorofosfaat), PyBOP (bensotriasool-1-üüloksütrispirrolidinofooniumheksafluorofosfaat), EEDQ (2-etoksü-1-etoksükarbonüül-1,2-dihüdrokiniin), DCC (ditsükloheksüülkarbodiimiid), DIPCDI (diisopropüülkarbodiimiid), MSNT (1-(mesitüleen-2-sulfonüül)-3-nitro-1H-1,2,4-triasool ja arüülsulfonüülhalogeniidid, näiteks triisopropüülbenseensulfonüülkloriid.

#### Leiutisekohase albumiini siduva peptiidi ja Fab ühendid

[0356] Ühes eripäras liidetakse leiutisekohane antikeha albumiini siduva valguga. Plasma-alkude sidumine võib olla efektiivne vahend lühikese elueaga molekulide farmakokineetiliste omaduste parendamiseks. Albumiin on plasmas kõige ohtralt esinev valk. Seerumi albumiini siduvad peptiidid (*albumin binding peptides*, ABP) võivad muuta nendega liidetud aktiivse domeeniga valkude farmakokineetilisi omadusi, kaasa arvatud muutused koosseisnevõtmises, koosseis tungimises ja difusioonis. Neid farmakokineetilisi parameetreid saab moduleerida sobiva seerumi albumiini siduva peptiidi järjestuse spetsiifilise valikuga (US 2004/0001827). Rida albumiini siduvaid peptiide on identifitseeritud skriinimisega faagil kuvamise meetodil (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). Leiutisekohaste ühendite hulka kuuluvad ABP järjestused, mis on avaldatud allikates: (i) Dennis et al., (2002) J. Biol. Chem., 277: 35035-35043, tabelid III ja IV, lk. 35038; (ii) US 2004/0001827 punktis [0076] toodud järjestused SEQ ID NO: 9-22, ja (iii) WO 01/45746 lk. 12-13, mis kõik on siia liidetud viidetena. Albumiini siduvad (ABP)-Fab antikehafragmendid konstrueeritakse albumiini siduva peptiidi liitmisel raske ahela Fab C-terminusega stöhhiomeetriselises suhtes 1 : 1 (1 ABP / 1 Fab). On näidatud, et nende ABP-Fab-ide sidumine albumiiniga suurendab nende poolväärtusaega küülikute ja hiirte organis-

mis enam kui 25 korda. Seetõttu saab eespool kirjeldatud reageerimisvõimelisi Cys-jääke viia nendesse ABP-Fab-idesse ja kasutada saidi-spetsiifiliseks konjugeerimiseks tsütotoksiliste ravimitega, millele järgnevad *in vivo* loomauuringud.

[0357] Näitlike albumiini siduvate peptiidjärjestuste hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, aminohapete järjestused, mis on loetletud järjestustega SEQ ID NO: 246-250.

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

#### Antikeha ja ravimi konjugaadid

[0358] Järgmises eripäras esitatakse leiutises immunokonjugaadid või antikeha ja ravimi konjugaadid (*antibody-drug conjugates*, ADC), mis sisaldavad antikeha, mis on konjugeeritud tsütotoksilise ainega, nagu kemoterapeutiline aine, ravim, kasvu inhibeeriv aine, toksiin (näiteks bakterist, seenest, taimest või loomast pärit ensümaatiliseltselt aktiivse toksiin või selle fragment) või radioaktiivne isotoop (st radiokonjugaadid). Järgmises eripäras esitatakse leiutises lisaks immunokonjugaatide kasutusmeetodid. Ühes eripäras sisaldab immunokonjugaat ükskõik missugust eespool nimetatud CD79b-vastastest antikehadest, mis on kovalentselt seotud tsütotoksilise aine või detekteeritava ainega.

[0359] Ühes eripäras seondub leiutisekohane CD79b-vastane antikeha sama CD79b-l oleva epitoobiga, mida seob ATCC-sse 20. juulil 1993 järjekorranumbriga HB11413 deponeeritud hübriidoomis toodetud monokloonse antikeha Fab fragment, kus monokloonne antikeha sisaldab varieeruvaid domeene järjestustega SEQ ID NO: 10 (joonised 7A-B) ja SEQ ID NO: 14 (joonised 8A-B), või mida seob kimäärne antikeha, mis sisaldab kas ATCC-sse 20. juulil 1993 järjekorranumbriga HB11413 deponeeritud hübriidoomis toodetud antikeha varieeruvat domeeni ja IgG1 konstantset domeeni või järjestusi SEQ ID NO: 10 (joonised 7A-B) ja SEQ ID NO: 14 (joonised 8A-B) sisaldava monokloonse antikeha varieeruvaid domeene. Järgmises teostuses seob leiutisekohane CD79b-vastane antikeha CD79b-vastase antikeha sama

epitoopi, mis on seotud teise CD79b-vastase antikehaga (st CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MC2209), CD79b-vastase inimese antikehaga (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

[0360] Järgmises eripäras on leiutisekohane CD79b-vastane antikeha vormis, mis erineb (st ei ole see vorm) (ATCC-sse 20. juulil 1993 järjekorranumbriga HB11413 deponeeritud hübriidoomis toodetud monokloonse antikeha Fab fragmendist, kus monokloonne antikeha sisaldab varieeruvaid domeene järjestustega SEQ ID NO: 10 (joonised 7A-B) ja SEQ ID NO: 14 (joonised 8A-B), või kimäärsest antikehast, mis sisaldab kas ATCC-sse 20. juulil 1993 järjekorranumbriga HB11413 deponeeritud hübriidoomis toodetud antikeha varieeruvat domeeni ja IgG1 konstantseid domeene või järjestusi SEQ ID NO: 10 (joonised 7A-B) ja SEQ ID NO: 14 (joonised 8A-B) sisaldava monokloonse antikeha varieeruvaid domeene. Järgmises teostuses on leiutisekohane CD79b-vastane antikeha vormis, mis erineb teise CD79b-vastase antikeha (st CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MC2209), CD79b-vastase inimese antikeha (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)) Fab fragmendist (st ei ole see vorm).

[0361] Ühes eripäras seob leiutisekohane antikeha spetsiifiliselt esimese loomaliigi CD79b ja ei seo spetsiifiliselt teise loomaliigi CD79b. Ühes teostuses on esimene loomaliik inimene ja/või primaat (näiteks jaava makaak) ja teine loomaliik on näriline (näiteks hiir) ja/või koerlane. Ühes teostuses on esimene loomaliik inimene. Ühes teostuses on esimene loomaliik primaat, näiteks jaava makaak. Ühes teostuses on teine loomaliik näriline, näiteks hiir. Ühes teostuses on teine loomaliik koerlane.

[0362] Ühes eripäras esitatakse leiutises kompositsioonid, mis sisaldavad ühte või mitut leiutisekohast antikeha ja kandjat. Ühes teostuses on kandja farmatseutiliselt vastuvõetav.

[0363] Ühes eripäras esitatakse leiutises nukleiinhapped, mis kodeerivad leiutisekohast antikeha.

[0364] Ühes eripäras esitatakse leiutises vektorid, mis sisaldavad leiutisekohast nukleiinhapet.

[0365] Ühes eripäras esitatakse leiutises peremeesrakud, mis sisaldavad leiutisekohast nukleiinhapet või vektorit. Vektor võib olla ükskõik missugust tüüpi, näiteks rekombinantne vektor nagu ekspressioonivektor. Kasutada võib ükskõik missugust peremeesrakkudest. Ühes



teostuses on peremeesrakk prokarüootne rakk, näiteks *E. coli*. Ühes teostuses on peremeesrakk eukarüootne rakk, näiteks imetajarakk, näiteks hiina hamstri munasarja (*Chinese Hamster Ovary*, CHO) rakk.

[0366] Ühes eripäras esitatakse leiutises leiutisekohase antikeha valmistamise meetodid. Näiteks esitatakse leiutises CD79b-vastase antikeha (mis siin defineerituna hõlmab nii täispikka antikeha kui selle fragmente) valmistamise meetod, kus nimetatud meetod hõlmab nimetatud antikeha (või selle fragmenti) kodeeriva leiutisekohase rekombinantse vektori ekspresseerimist sobivas peremeesrakus ja nimetatud antikeha kättesaamist.

[0367] Ühes eripäras esitatakse leiutises tootartikkel, mis hõlmab mahutit, ning mahutis sisalduvat kompositsiooni, kus kompositsioon sisaldab ühte või mitut leiutisekohast CD79b-vastast antikeha. Ühes teostuses sisaldab kompositsioon leiutisekohast nukleiinhapet. Ühes teostuses sisaldab antikeha sisaldav kompositsioon lisaks kandjat, mis mõnedes teostustes on farmatseutiliselt vastuvõetav. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane tootartikkel täiendavalt juhendit kompositsiooni (näiteks antikeha) inimesele manustamise kohta.

[0368] Ühes eripäras esitatakse leiutises komplekt, mis hõlmab esimest mahutit, mis sisaldab kompositsiooni, mis sisaldab ühte või mitut leiutisekohast CD79b-vastast antikeha, ja teist mahutit, mis sisaldab puhvrit. Ühes teostuses on puhver farmatseutiliselt vastuvõetav. Ühes teostuses sisaldab antagonist-antikeha sisaldav kompositsioon lisaks kandjat, mis mõnedes teostustes on farmatseutiliselt vastuvõetav. Ühes teostuses sisaldab komplekt täiendavalt juhendit kompositsiooni (näiteks antikeha) subjektile manustamise kohta.

[0369] Ühes eripäras esitatakse leiutises CD79b-vastase antikeha kasutamine ravimi valmistamiseks haiguse, nagu vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire, terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks. Ühes teostuses valitakse vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire lümfoomi, mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), agressiivse NHL, relapseeruva agressiivse NHL, relapseeruva indolentse NHL, refraktoorse NHL, refraktoorse indolentse NHL, kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoomi, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), ägeda lümfotsütaarse leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoomi hulgast.

[0370] Ühes eripäras esitatakse leiutises leiutisekohase nukleiinhappe kasutamine ravimi valmistamiseks haiguse, nagu vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire, terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks. Ühes teostuses valitakse vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire lümfoomi, mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), agressiivse NHL, relapseeruva

agressiivse NHL, relapseeruva indolentse NHL, refraktoorse NHL, refraktoorse indolentse NHL, kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoomi, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), ägeda lümfotsütaarse leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoomi hulgast.

[371] Ühes eripäras esitatakse leiutises leiutisekohase ekspressioonivektori kasutamine ravimi valmistamiseks haiguse, nagu vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks. Ühes teostuses valitakse vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire lümfoomi, mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), agressiivse NHL, relapseeruva agressiivse NHL, relapseeruva indolentse NHL, refraktoorse NHL, refraktoorse indolentse NHL, kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoomi, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), ägeda lümfotsütaarse leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoomi hulgast.

[0372] Ühes eripäras esitatakse leiutises leiutisekohaste peremeesrakkude kasutamine ravimi valmistamiseks haiguse, nagu vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire, terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks. Ühes teostuses valitakse vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire lümfoomi, mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), agressiivse NHL, relapseeruva agressiivse NHL, relapseeruva indolentse NHL, refraktoorse NHL, refraktoorse indolentse NHL, kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoomi, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), ägeda lümfotsütaarse leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoomi hulgast.

[0373] Ühes teostuses esitatakse leiutises leiutisekohase tooteartikli kasutamine ravimi valmistamiseks haiguse, nagu vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire, terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks. Ühes teostuses valitakse vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire lümfoomi, mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), agressiivse NHL, relapseeruva agressiivse NHL, relapseeruva indolentse NHL, refraktoorse NHL, refraktoorse indolentse NHL, kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoomi, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), ägeda lümfotsütaarse leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoomi hulgast.

[0374] Ühes eripäras esitatakse leiutises leiutisekohase komplekti kasutamine ravimi valmistamiseks haiguse, nagu vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire, terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks. Ühes teostuses valitakse vähk, kasvaja ja/või raku proliferatsioonihäire lümfoomi, mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), agressiivse NHL, relapseeruva agressiivse

NHL, relapseeruva indolentse NHL, refraktoorse NHL, refraktoorse indolentse NHL, kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoomi, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), ägeda lümfotsütaarse leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoomi hulgast.

[0375] Ühes eripäras esitatakse leiutises nende rakkude kasvu inhibeerimise meetod, mis ekspresseerivad CD79b, kus nimetatud meetod hõlmab nimetatud rakkude leiutisekohase antikehaga kokkupuutesse viimist, põhjustades sellega nimetatud rakkude kasvu inhibeerimise. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0376] Ühes eripäras esitatakse leiutises CD79b ekspresseerivaid rakke sisaldava vähkkasvajaga imetaja terapeutilise ravimise meetod, kus nimetatud meetod hõlmab nimetatud imetajale terapeutiliselt efektiivse koguse leiutisekohase antikeha manustamist, ravides sellega imetajat efektiivselt. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0377] Ühes eripäras esitatakse leiutises CD79b suurenenud ekspressiooniga seotud raku proliferatsioonihäire ravimise või tõkestamise meetod, kus nimetatud meetod hõlmab sellist ravi vajavale subjektile terapeutiliselt efektiivse koguse leiutisekohase antikeha manustamist, ravides sellega efektiivselt nimetatud raku proliferatsioonihäiret või seda tõkestades. Ühes teostuses on nimetatud proliferatsioonihäire vähk. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0378] Ühes teostuses esitatakse leiutises rakukasvu inhibeerimise meetod, kus nimetatud rakukasv on vähemalt osaliselt sõltuv CD79b kasvu võimendavast efektist, kus nimetatud meetod hõlmab nimetatud raku leiutisekohase antikeha efektiivse kogusega kokkupuutesse viimist, inhibeerides sellega nimetatud raku kasvu. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0379] Ühes teostuses esitatakse leiutises imetajal esineva kasvaja terapeutilise ravimise meetod, kus nimetatud kasvaja kasv sõltub vähemalt osaliselt CD79b kasvu võimendavast toimest, kus nimetatud meetod hõlmab nimetatud raku leiutisekohase antikeha efektiivse kogusega kokkupuutesse viimist, ravides sellega efektiivselt kasvajat. Ühes teostuses on anti-

keha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0380] Ühes eripäras esitatakse leiutises vähi ravimise meetod, mis hõlmab patsiendile farmatseutilise preparaadi manustamist, mis sisaldab siin kirjeldatud immunokonjugaati, vastu võetavat lahjendit, kandjat või abiainet. Ühes teostuses valitakse vähk lümfoomi, mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), agressiivse NHL, relapseeruva agressiivse NHL, relapseeruva indolentse NHL, refraktoorse NHL, refraktoorse indolentse NHL, kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoomi, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), ägeda lümfotsütaarse leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoomi hulgast. Ühes teostuses manustatakse patsiendile tsütotoksilist ainet kombinatsioonis antikeha ja ravimi konjugaatühendiga.

[0381] Ühes eripäras esitatakse leiutises B-rakkude proliferatsiooni inhibeerimise meetod, mis hõlmab rakkude eksponeerimist leiutisekohast antikeha sisaldavale immunokonjugaadile tingimustes, mis võimaldavad immunokonjugaadil seonduda CD79b-ga. Ühes teostuses valitakse B-rakkude proliferatsioon lümfoomi, mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), agressiivse NHL, relapseeruva agressiivse NHL, relapseeruva indolentse NHL, refraktoorse NHL, refraktoorse indolentse NHL, kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoomi, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), ägeda lümfotsütaarse leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoomi hulgast. Ühes teostuses on B-rakud ksenograft. Ühes teostuses toimub eksponeerimine *in vitro*. Ühes teostuses toimub eksponeerimine *in vivo*.

[0382] Ühes eripäras esitatakse leiutises CD79b esinemise määramise meetod proovis, milles kahtlustatakse CD79b sisaldumist, kus nimetatud meetod hõlmab nimetatud proovi eksponeerimist leiutisekohasele antikehale ja nimetatud antikeha seandumise määramist proovis oleva CD79b-ga, kus nimetatud antikeha seandumine nimetatud proovis näitab nimetatud valgus esinemist nimetatud proovis. Ühes teostuses on proov bioloogiline proov. Järgmises teostuses sisaldab bioloogiline proov B-rakke. Ühes teostuses pärineb bioloogiline proov imetajalt, kes põeb B-rakkude häiret ja/või B-rakkude proliferatsioonihäiret või kellel kahtlustatakse seda, kaasa arvatud, kuid nendega mitte piiratud, lümfoom, mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), agressiivne NHL, relapseeruv agressiivne NHL, relapseeruv indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsütaarne leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoom, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), äge lümfotsütaarne leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoom.

[0383] Ühes eripäras esitatakse sellise raku proliferatsioonihäire diagnoosimise meetod, mis on seotud CD79b ekspresseerivate rakkude nagu B-rakud arvu suurenemisega, kus meetod hõlmab bioloogilises proovis olevate testitavate rakkude kokkupuutesse viimist ükskõik mis-sugusega eeltoodud antikehadest, proovis olevate testitavate rakkudega seondunud antikeha taseme määramist antikeha CD79b-ga seondumise detekteerimise abil ja selle võrdlemist kontrollproovis olevate rakkudega seondunud antikeha tasemega, kusjuures seondunud antikeha tase normaliseeritakse testitavas ja kontrollproovis olevate CD79b ekspresseerivate rakkude arvu suhtes, ja kus testitavas proovis seondunud antikeha kõrgem tase võrreldes kontrollprooviga näitab CD79b ekspresseerivate rakkudega seotud raku proliferatsioonihäire esinemist.

[00384] Ühes eripäras esitatakse lahustuva CD79b detekteerimise meetod veres või seerumis, kus meetod hõlmab imetajalt, kellel kahtlustatakse B-rakkude proliferatsioonihäire esinemist või kellel see esineb, pärineva testitava vere- või seerumiproovi kokkupuutesse viimist leiutisekohase CD79b-vastase antikehaga ja lahustuva CD79b suurenemise detekteerimist testitavas proovis võrreldes normaalselt imetajalt võetud vere või seerumi kontrollprooviga. Ühes teostuses on see detekteerimismeetod kasulik sellise B-rakkude proliferatsioonihäire, mis on seotud lahustuva CD79b suurenemisega imetaja veres või seerumis, diagnoosimeetodina.

[0385] Ühes eripäras esitatakse leiutisekohase antikeha sidumise meetod CD79b ekspresseerivate rakkudega, kus nimetatud meetod hõlmab nimetatud rakkude leiutisekohase antikehaga kokkupuutesse viimist. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud tsütotoksilise ainega. Ühes teostuses on antikeha konjugeeritud kasvu inhibeeriva ainega.

[0386] Leiutisekohaseid meetodeid võib kasutada ükskõik missuguse sobiva patoloogilise seisundi, näiteks CD79b ekspressiooniga seotud rakkude ja/või kudede, mõjutamiseks. Ühes teostuses on rakud, mille vastu leiutisekohane meetod on suunatud, hematopoeetilised rakud. Näiteks võivad hematopoeetilised rakud olla valitud rühmast, millesse kuuluvad lümfotsüüdid, leukotsüüdid, trombotsüüdid, erütrotsüüdid ja looduslikud tapjarakud. Ühes teostuses on rakud, mille vastu leiutisekohane meetod on suunatud, vähirakud. Näiteks võivad vähirakud olla valitud rühmast, millesse kuuluvad lümfoomirakud, leukeemiarakud või müeloomirakud.

[0387] Lisaks võib leiutis hõlmata täiendavaid ravietape. Näiteks ühes teostuses hõlmab meetod täiendavat etappi, kus sihtmärkrakke ja/või -kudesid (näiteks vähirakke) eksponeeritakse kiiritusravile või kemoterapeutilisele ainele.

[0388] Nagu siin on kirjeldatud, on CD79b B-raku retseptori signaali ülekandev komponent. Seega on leiutisekohaste meetodite ühes teostuses sihtmärkrakk (näiteks vähirakk) selline rakk, milles ekspresseerub CD79b võrreldes rakuga, mis CD79b ei ekspresseeri. Järgmises teostuses on sihtmärkrakk vähirakk, milles CD79b ekspressioon on võimendatud võrreldes sama tüüpi koe normaalse mittevähirakuga. Ühes teostuses põhjustab leiutisekohane meetod sihtmärkrakkude surma.

[0389] Käesoleva leiutise teistes eripärades esitatakse leiutises vektorid, mis sisaldavad DNA-d, mis kodeerib ükskõik missugust siin kirjeldatud antikehadest. Samuti esitatakse ükskõik missugust sellist vektorit sisaldavad peremeesrakud. Peremeesrakud võivad olla näiteks CHO rakud, *E. coli* rakud või pärmirakud. Lisaks esitatakse ükskõik missuguste siin kirjeldatud antikehade tootmismeetod, mis hõlmab peremeesrakkude kasvatamist soovitud antikeha ekspresseerimiseks sobivates tingimustes ja soovitud antikeha rakukultuurist kättesaamist.

[0390] Järgmises eripäras käsitleb leiutis kompositsiooni või ainet, mis sisaldab siin kirjeldatud CD79b-vastast antikeha kombineerituna kandjaga. Vajadusel võib kandja olla farmatseutiliselt vastuvõetav.

[0391] Käesoleva leiutise järgmine eripära on suunatud siin kirjeldatud CD79b-vastase polüpeptiidantikeha kasutamisele ravimi valmistamiseks, mis on kasulik sellise seisundi ravimiseks, mis reageerib CD79b-vastasele polüpeptiidantikehale.

[0392] Leiutise järgmine eripära on kompositsioon, mis sisaldab antikeha ja valemiga I ravimühendeid, milles ravimi keskmine koormus antikeha kohta on umbes 2 kuni 5 või umbes 3 kuni 4.

[0393] Leiutise järgmine eripära on farmatseutiline kompositsioon, mis sisaldab ADC ühendit valemiga I, ADC ühendite valemiga I segu või nende farmatseutiliselt vastuvõetavat soola või solvaati ning farmatseutiliselt vastuvõetavat lahjendit, kandjat või abiainet.

[0394] Järgmises eripäras esitatakse farmatseutiline kombinatsioon, mis sisaldab ADC ühendit valemiga I ja teist ühendit, millel on kas vähivastased omadused või muud terapeutilised omadused.

[0395] Järgmine eripära on kasvajarakkude või vähirakkude tapmise või nende proliferatsiooni inhibeerimise meetod, mis hõlmab rakkude töötlemist antikeha ja ravimi valemiga I või selle farmatseutiliselt vastuvõetava soola või solvaadi konjugaadiga ja mis on efektiivne kasvajarakkude või vähirakkude tapmiseks või nende proliferatsiooni inhibeerimiseks.

[0396] Leiutise järgmine eripära on vähi ravimise meetod, mis hõlmab patsiendile terapeutiliselt efektiivse koguse ADC valemiga I sisaldava farmatseutilise kompositsiooni manustamist.

[0397] Järgmine eripära hõlmab tooteartikleid, st komplekte, mis hõlmavad antikeha ja ravimi konjugaati, mahutit ja pakendi infolehte või märgist ravinäidustusega.

[0398] Leiutise üks eripära on antikeha ja ravimi valemiga I konjugaadi valmistamise meetod, mis hõlmab järgmisi etappe: (a) tsüsteiinidega konstrueeritud antikehasse konstrueeritud tsüsteiini reaktsioon linkerreagendiga antikeha ja linkeri vaheühendi Ab-L moodustamiseks ja (b) Ab-L reaktsioon aktiveeritud ravimi osamolekuliga D, mille abil moodustatakse antikeha ja ravimi konjugaat, või mis hõlmab järgmisi etappe: (c) ravimi osamolekuli nukleofiilse rühma reaktsioon linkerreagendiga, moodustamaks ravimi ja linkeri vaheühendit D-L ja (d) D-L reaktsioon tsüsteiinidega konstrueeritud antikehasse konstrueeritud tsüsteiinrühmaga, mille abil moodustatakse antikeha ja ravimi konjugaat.

[0399] Leiutise üks eripära on vähirakkude detekteerimise test, mis hõlmab: (a) rakkude eksponeerimist tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha ja ravimi konjugaadile ja (b) tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha ja ravimi konjugaatühendi rakkude seondumise ulatuse määramist.

#### A. CD79b-vastased antikehad

[0400] Ühes teostuses esitatakse käesolevas leiutises CD79b-vastased antikehad, mis võivad siin leida kasutamist terapeutiliste ainetena. Näidisantikehade hulka kuuluvad polükloonsed, monokloonsed, humaniseeritud, bispetsiifilised ja heterokonjugaat-antikehad.

##### 1. Polükloonsed antikehad

[0401] Polükloonseid antikehi toodetakse eelistatult loomades relevantse antigeeni ja adjuvandi mitmekordse subkutaanse (*subcutaneous*, sc) või intraperitoneaalse (*interperitoneal*, ip) süstimise abil. Kasulik võib olla relevantse antigeeni (eriti sünteetiliste peptiidide kasutamisel) konjugeerimine valguga, mis immuniseeritavas loomas on immunogeenne. Näiteks võib antigeeni konjugeerida meriteo hemotsüaniini (*keyhole limpet hemocyanin*, KLH), seerumi albumiini, veise türeoglobuliini või sojaoa trüpsiinihüübitoriga, kasutades bifunkt-

sionaalset või derivaativat ainet, näiteks maleimidobensoöülsulfosuktsiinimiidestrit (konjugeerimine tsüsteiinijääkide kaudu), N-hüdroksüsuktsiinimiidi (lüsiinijääkide kaudu), glutaaraldehüüdi, suktsiinanahüdriidi,  $\text{SOCl}_2$  või  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , kus R ja  $\text{R}^1$  on erinevad alküülühmad.

[0402] Loomad immuniseeritakse antigeeni vastu, immunogeensete konjugaatide vastu või nende derivaatide vastu, kombineerides näiteks 100  $\mu\text{g}$  või 5  $\mu\text{g}$  valku või konjugaati (vastavalt küüliku või hiire puhul) 3 mahuosa Freundi täisadjuvandiga ja süstides seda lahust mitmesse kohta naha alla. Kuu aega hiljem süstitakse loomadele mitmesse kohta naha alla buusterannus - 1/5 kuni 1/10 peptiidi või konjugaadi algsest kogusest Freundi täisadjuvandis. Seitse kuni 14 päeva hiljem võetakse loomadelt vereproovid ja testitakse seerumit antikehade tiitri suhtes. Loomadele süstitakse buusterannuseid seni, kuni antikehade tiiter jõuab platoole. Konjugaate võib valmistada ka rekombinantsete rakkude kultuuris liitvalkudena. Immuunvastuse tugevdamiseks on sobiv kasutada ka agregeerivaid aineid nagu maarjas.

## 2. Monokloonsed antikehad

[0403] Monokloonseid antikehi võib valmistada, kasutades hübriidomeetodit, mida esimesena kirjeldasid Kohler jt., Nature, 256: 495 (1975), või kasutades rekombinantse DNA meetodeid (US patent nr. 4816567).

[0404] Hübriidomeetodi puhul immuniseeritakse hiir või mõni muu sobiv peremeesloom nagu hamster nii, nagu eespool on kirjeldatud, et kutsuda esile lümfotsüüdid, mis toodavad või on võimelised tootma antikehasid, mis spetsiifiliselt seonduvad immuniseerimiseks kasutatud valguga. Alternatiivselt võib lümfotsüüte immuniseerida *in vitro*. Pärast immuniseerimist eraldatakse lümfotsüüdid ja liidetakse need müeloomiliini rakkudega, kasutades sobivat liitvat ainet nagu polüetüleenglükool moodustamaks hübriidomirakke (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103 (Academic Press, 1986)).

[0405] Selliselt valmistatud hübriidomirakud külvatakse sobivasse rakusöötmesse ja kasvatatakse selles, kusjuures eelistatult sisaldab sööde ühte või mitut ainet, mis inhibeerib (inhibeerivad) liitumata algsete müeloomirakkude (mida nimetatakse ka liitumispartneriks) kasvu ja eluspüsimist. Näiteks juhul, kui algsetes müeloomirakkudes puudub ensüüm hüpoksaantiini-guaaniini fosforibosüültransferaas (*hypoxantine guanine phosphoribosyl transferase*, HGPRT või HPRT), sisaldab hübriidomide kasvatamiseks kasutatav rakkude selektiivsööde



tavaliselt hüpoksantiini, aminopteriini ja tümidiini (HAT sööde), kuna need ained takistavad HGPRT-puudulike rakkude kasvu.

[0406] Müeloomirakkude eelistatud liitumispartnerid on need, mis liituvad efektiivselt, toetavad stabiilset kõrgel tasemel toimuvat antikehade tootmist valitud antikeha tootvate rakkude poolt ning on tundlikud selektiivsöötme suhtes, mis selekteerib välja liitumata algsed rakud. Eelistatud müeloomirakuliinid on hiire müeloomiliinid, nagu need, mis pärinevad hiire MOPC-21 ja MPC-11 kasvajatelt ja mis on saadaval Salk'i Instituudi Rakujaotuskeskusest (Salk Institute Cell Distributor Center) San Diego California, USA, ning SP-2 ja selle derivaadid, näiteks X63-Ag8-653 rakud, mis on saadaval Ameerika Rakutüüpide Kolleksioonist (American Cell Type Collection), Manassas, Virginia, USA. Inimese monokloonsete antikehade tootmiseks on kirjeldatud ka inimese müeloomi ja hiire-inimese heteromüeloomi rakuliine (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); ja Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0407] Rakusöödet, milles hübriidomirakke kasvatatakse, testitakse antigeeni vastu suunatud monokloonsete antikehade tootmise suhtes. Hübriidomirakkudes toodetavate monokloonsete antikehade seondumise spetsiifilisuse määratakse eelistatult immunosadestamise või *in vitro* sidumistestis, nagu radioimmunosord (radioimmunoassay, RIA) või ensüümseoseline immunosorbenttest (ELISA).

[0408] Monokloonse antikeha seondumise afiinsust võib määrata näiteks Scatchardi analüüsi abil, mida on kirjeldanud Munson jt., Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

[0409] Kui hübriidomirakud, mis toodavad soovitud spetsiifilisuse, afiinsuse ja/või aktiivsusega antikehi, on identifitseeritud, võib kloonid subkloonida limiteerivate lahjendusprotseduuride abil ja kasvatada standardmeetoditel (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103 (Academic Press, 1986)). Selleks otstarbeks sobivate rakusöötmete hulka kuuluvad näiteks DMEM või RPMI-1640 sööde. Lisaks võib hübriidomirakke kasvatada *in vivo* astsiitkasvajatena looma organismis, näiteks rakkude *i.p.* süstimise abil hiire organismi.

[0410] Subkloonide poolt sekreteeritavad monokloonsete antikehad eraldatakse sobivalt kas rakusöötimest, astsiitvedelikust või seerumist antikeha puhastamise tavapärase protseduuride abil, nagu näiteks afiinsuskromatograafia (näiteks kasutades A-valgu või G-valguga Sepharose) või ioonivahetuskromatograafia, kromatograafia hüdroksüapatiidil, geelelektroforeesi meetodid, dialüüs jne.

[0411] Monokloonseid antikehi kodeeriva DNA võib kergesti eraldada ja sekveneerida tavapärase protseduuride kasutamise abil (näiteks kasutades oligonukleotiidsone, mis on võimelised seonduma spetsiifiliselt geenidega, mis kodeerivad hiire antikehade raskeid ja kergeid ahelaid). Sellise DNA eelistatud allikas on hübriidomirakud. Kui DNA on eraldatud, võib selle viia ekspressioonivektoritesse, mis seejärel transfekteeritakse peremeesrakkudesse, nagu *E. coli* rakud, ahvi COS rakud, hiina hamstri munasarja (CHO) rakud või müeloomirakud, mis tavaliselt antikehavalku ei tooda, et saada monokloonsete antikehade süntees rekombinantsetes peremeesrakkudes. Antikeha kodeeriva DNA rekombinantset ekspressiooni bakterites käsitlevate ülevaateartiklite hulka kuuluvad: Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993); Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

[0412] Järgmises teostuses võib monokloonseid antikehad või antikehafragmendid eraldada antikehade faagiraamatukogudest, mis on loodud nende meetodite kasutamise abil, mida on kirjeldatud artiklis: McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) ja Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) kirjeldavad vastavalt hiire ja inimese antikehade eraldamist, kasutades faagiraamatukogusid. Seejärel ilmunud publikatsioonid kirjeldavad kõrge afiinsusega (nanomolaarses piirkonnas) inimese antikehade tootmist ahela nihutamise abil (Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), samuti kombinatoorset infektsiooni ja *in vivo* rekombinatsiooni kui strateegiat väga suurte faagiraamatukogude konstrueerimiseks (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266 (1993)). Seega on need meetodid rakendatavad alternatiivid traditsioonilistele monokloonsete antikehade hübriidomimeetoditele monokloonsete antikehade eraldamiseks.

[0413] Antikeha kodeerivat DNA-d võib modifitseerida kimäärsete või antikeha-liitvalkude tootmiseks, näiteks asendades inimese raske ahela ja kerge ahela konstantsete domeenide ( $C_H$  ja  $C_L$ ) järjestused homoloogsete hiirejärjestustega (US patent nr. 4816567; Morrison, et al., *Proc, Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)) või liites immunoglobuliini kodeeriva järjestuse kas kogu immunoglobuliinist erineva polüpeptiidi kodeeriva järjestusega või osaga sellest (heteroloogne polüpeptiid). Immunoglobuliinist erinevad polüpeptiidjärjestused võivad asendada antikeha konstantseid domeene või need asendavad antikeha ühe antigeeni siduva saidi varieeruvaid domeene, luues kimäärse bivalentse antikeha, mis sisaldab ühte antigeeni siduvat saiti, millel on spetsiifilisus ühe antigeeni suhtes, ja teist antigeeni siduvat saiti, millel on spetsiifilisus teise antigeeni suhtes.

### 3. Inimese antikehad ja humaniseeritud antikehad

[0414] Leiutisekohased CD79b-vastased antikehad võivad lisaks hõlmata ka humaniseeritud antikehi või inimese antikehi. Inimese omadest erinevate antikehade (näiteks hiire antikehade) humaniseeritud vormid on kimäärsed immunoglobuliinid, immunoglobuliinide ahelad või nende fragmendid (nagu Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> või teised antikehade antigeeni siduvad alajärjestused), mis sisaldavad inimese omast erinevast immunoglobuliinist pärinevaid minimaalseid järjestusi. Humaniseeritud antikehade hulka kuuluvad inimese immunoglobuliinid (retsipientantikehad), milles retsiipiendi komplementaarsust määrava piirkonna (*complementarity determining region*, CDR) jäägid on asendatud inimesest erineva liigi, näiteks hiire, roti või küüliku (doonorantikeha) CDR jääkidega, millel on soovitud spetsiifilisus, affiinsus ja võime. Mõnedel juhtudel asendatakse inimese immunoglobuliini Fv raamistikujäägid vastavate inimesest erineva liigi jääkidega. Humaniseeritud antikehad võivad sisaldada ka jääke, mida ei leidu ei retsipientantikehas ega imporditud CDR või raamistikujärjestustes. Üldiselt sisaldab humaniseeritud antikeha vähemalt ühte ja tavaliselt kahte peaaegu täielikku varieeruvat domeeni, milles CDR piirkonnad vastavad täielikult või peaaegu täielikult inimesest erineva liigi immunoglobuliinide omadele, ning FR piirkonnad on kas täielikult või peaaegu täielikult inimese immunoglobuliini konsensusjärjestused. Optimaalselt sisaldab humaniseeritud antikeha ka vähemalt osa immunoglobuliini konstantsest piirkonnast (Fc), tavaliselt inimese immunoglobuliini konstantsest piirkonnast (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)).

[0415] Inimesest erineva liigi antikehade humaniseerimise meetodid on tehnika tasemest hästi teada. Üldiselt sisaldab humaniseeritud antikeha ühte või mitut aminohappejääki, mis temasse on viidud allikast, kes ei ole inimene. Neid inimesest erineva liigi aminohappejääke nimetatakse sageli ka „importjääkideks“ ja tavaliselt on need võetud varieeruvast „importdomeenist“. Humaniseerimise võib praktiliselt läbi viia Winteri jt. meetodil [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], asendades närilise CDR-d või CDR järjestused inimese antikeha vastavate järjestustega. Seega on sellised „humaniseeritud“ antikehad kimäärsed antikehad (US patent nr. 4816567), kus inimesest erinevast liigist pärineva vastava järjestusega on asendatud oluliselt väiksem osa kui inimese intaktne varieeruv domeen. Praktikas on

humaniseeritud antikehad tavaliselt inimese antikehad, milles mõned CDR jäägid ja võib-olla ka mõned FR jäägid on asendatud närilise antikehade analoogsetest saitidest pärinevate jääkidega.

[0416] Humaniseeritud antikehade tegemiseks kasutatavate inimese varieeruvate domeenide – nii kerge kui raske domeeni – valik on väga tähtis selleks, et vähendada antigeensust ja HAMA vastust (inimese hiirevastased antikehad) juhul, kui antikeha on mõeldud terapeutiliseks kasutamiseks inimesel. HAMA vastuse vähendamine või kõrvaldamine on sobivate terapeutiliste ainete kliinilise väljatöötamise tähtis aspekt, vt. näiteks Khaxzacli et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, (1988) 80: 937; Jaffers et al., *Transplantation*, (1986) 41: 572; Shawler et al., *J. Immunol.*, (1985) 135: 1530; Sears et al., *J. Biol. Response Mod.*, (1984) 3: 138; Miller et al., *Blood*, (1983) 62: 988; Hakimi et al., *J. Immunol.*, (1991) 147: 1352; Reichmann et al., *Nature*, (1988) 332: 323; Junghans et al., *Cancer Res.*, (1990) 50: 1495. Nagu siin on kirjeldatud, esitatakse leiutises antikehad, mis on humaniseeritud nii, et HAMA vastus on vähendatud või kõrvaldatud. Nende antikehade variante võib lisaks saada tehnika tasemest tuntud tavapärase meetodite kasutamisel, millest mõned on allpool kirjeldatud. Niinimetatud „parima sobituvuse“ meetodil skriinitakse närilise antikeha varieeruva domeeni järjestust inimese teadaolevate varieeruva domeeni järjestuste täieliku raamatukogu vastu. Identifitseeritakse inimese V domeeni järjestus, mis on närilises identifitseeritule kõige lähedasem, ning humaniseeritud antikeha tegemiseks võetakse selles olev inimese raamistikupiirkond (FR) (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Teise meetodi puhul kasutatakse konkreetset raamistikupiirkonda, mis on tuletatud inimese kõigi antikehade konkreetse alarühma kerge või raske ahela konsensusjärjestusest. Sama raamistikku võib kasutada mitme erineva humaniseeritud antikeha jaoks (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0417] Näiteks võib siin kirjeldatud antikeha aminohapete järjestus olla lähtejärjestuseks (algseks järjestuseks) raamistiku ja/või hüpervarieeruva(te) järjestus(t)e mitmekesistamiseks. Valitud raamistikujärjestust, millega hüpervarieeruv lähtejärjestus seotakse, nimetatakse siin inimese aktseptorraamistikuks. Kui inimese aktseptorraamistikud võivad olla inimese immunoglobuliini omad (selle VL ja/või VH piirkonnad) või nendest pärineda, siis inimese eelostatud aktseptorraamistikud on inimese raamistiku konsensusjärjestus või sellest tuletatud järjestused, kuna on näidatud, et sellised raamistikud on inimpatsientidele minimaalselt immunogeensed või ei ole üldse immunogeensed.

[0418] Kui aktseptor on tuletatud inimese immunoglobuliinist, võib vajadusel valida inimese raamistikujärjestuse, mille valik põhineb tema homoloogial doonor-raamistikujärjestusega, joondades doonor-raamistikujärjestuse inimese raamistikujärjestuste kollektsioonis olevate inimese erinevate raamistikujärjestustega ja valides aktseptoriks kõige homoloogsema raamistikujärjestuse.

[0419] Ühes teostuses on siin olevad inimese konsensusraamistikud VH alarühma III ja/või VL kapa alarühma I raamistike konsensusjärjestused või nendest tuletatud järjestused.

[0420] Nii võib inimese VH aktseptorraamistik sisaldada ühte, kahte või kolme järgnevat raamistikujärjestust või neid kõiki:

- FR1, mis sisaldab järjestust EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143),
- FR2, mis sisaldab järjestust WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 144),
- FR3, mis sisaldab järjestust RFTISX<sub>1</sub>DX<sub>2</sub>SKNTX<sub>3</sub>YMQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 147), kus X<sub>1</sub> on A või R, X<sub>2</sub> on T või N ja X<sub>3</sub> on A või L,
- FR4, mis sisaldab järjestust WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 146).

[0421] VH konsensusraamistike näidete hulka kuuluvad:

- inimese VH alarühma I konsensusraamistik, millest on lahutatud Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 108);
- inimese VH alarühma I konsensusraamistik, millest on lahutatud laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 109-111);
- inimese VH alarühma II konsensusraamistik, millest on lahutatud Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 112);
- inimese VH alarühma II konsensusraamistik, millest on lahutatud laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 113-115);
- inimese VH alarühma III konsensusraamistik, millest on lahutatud Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 116);
- inimese VH alarühma III konsensusraamistik, millest on lahutatud laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 117-119);
- inimese VH aktseptor-raamistik, millest on lahutatud Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 120);

inimese VH aktseptorraamistik, millest on lahutatud laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 121-122);

inimese VH aktseptorraamistik 2, millest on lahutatud Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 123) või

inimese VH aktseptorraamistik 2, millest on lahutatud laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 124-126).

[0422] Ühes teostuses sisaldab inimese VH aktseptorraamistik ühte, kahte või kolme järgnevat raamistikujärjestust või neid kõiki:

FR1, mis sisaldab järjestust EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143),

FR2, mis sisaldab järjestust WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 144),

FR3, mis sisaldab järjestust RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 145),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 148),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 149),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (SEQ ID NO: 150) või

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (SEQ ID NO: 151),

FR4, mis sisaldab järjestust WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 146).

[0423] Inimese VL aktseptorraamistik võib sisaldada ühte, kahte või kolme järgnevat järjestust või neid kõiki:

FR1, mis sisaldab järjestust DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 139),

FR2, mis sisaldab järjestust WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 140),

FR3, mis sisaldab järjestust GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 141),

FR4, mis sisaldab järjestust FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 142).

[0424] VL konsensusraamistike näidete hulka kuuluvad:

inimese VL kapa alarühma I konsensusraamistik (SEQ ID NO: 127);

inimese VL kapa alarühma II konsensusraamistik (SEQ ID NO: 128);  
inimese VL kapa alarühma III konsensusraamistik (SEQ ID NO: 129) või  
inimese VL kapa alarühma IV konsensusraamistik (SEQ ID NO: 130).

[0425] Samas kui aktseptor võib olla järjestuselt identne inimese valitud raamistikujärjestusega, ükskõik kas see on pärit inimese immunoglobuliinist või inimese konsensusraamistikust, peetakse käesolevas leutises silmas, et aktseptorjärjestus võib sisaldada inimese immunoglobuliini järjestuses või inimese raamistiku konsensusjärjestuses juba olemasolevaid aminohappeasendusi. Need juba olemasolevad asendused on eelistatult minimaalsed: tavaliselt on inimese immunoglobuliini järjestuse või raamistiku konsensusjärjestusega võrreldes ainult neli, kolm, kaks või üks aminohappe erinevus(t).

[0426] Inimesest erineva liigi antikeha hüpervarieeruva piirkonna jäägid liidetakse inimese raamistiku VL ja/või VH aktseptorraamistikesse. Näiteks võib sinna liita jääke, mis vastavad Kabat'i CDR jääkidele, Chothia hüpervarieeruva ligu jääkidele, Abm jääkidele ja/või kontaktjääkidele. Vajadusel liidetakse sellesse järgnevad laiendatud hüpervarieeruva piirkonna jäägid: 24-34 (L1), 50-56 (L2) ja 89-97 (L3), 26-35B (H1), 50-65, 47-65 või 49-65 (H2) ja 93-102, 94-102 või 95-102 (H3).

[0427] Kui siin arutletakse hüpervarieeruva piirkonna jääkide "liitumise" üle, tuleb mõista, et selle võib saavutada erinevatel viisidel, näiteks võib soovitud aminohapete järjestust kodeeriva nukleiinhappe luua hiire varieeruva domeeni järjestust kodeeriva nukleiinhappe muteerimisega, nii et selle raamistikujärjestused muudetakse inimese aktseptorraamistiku jääkideks, või inimese varieeruva domeeni järjestust kodeeriva nukleiinhappe muteerimisega, nii et hüpervarieeruva domeeni jäägid muudetakse inimesest erineva liigi jääkideks, või soovitud järjestust kodeeriva nukleiinhappe sünteesimisega jne.

[0428] Siin näidetes toodud siiratud hüpervarieeruva piirkonnaga variandid loodi inimese aktseptorjärjestusi kodeeriva nukleiinhappe Kunkeli mutageneesi abil, kasutades iga hüpervarieeruva piirkonna jaoks eraldi oligonukleotiidi (Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154: 367-382 (1987)). Raamistikku ja/või hüpervarieeruvasse piirkonda saab tavapäraste meetoditega viia sobivaid muutusi, et parandada ja taastada hüpervarieeruva piirkonna ja antigeeni vahelisi õigeid interaktsioone.

[0429] Järjestuste randomiseerimisega loodud raamatukogu loomise ja selles olevate paljude erinevate potentsiaalsete antikehavariantide skriinimise mugava ja kiire meetodina saab kasu-

tada faagil (fagemiidil) kuvamist (siin mõnes kontekstis nimetatakse seda ka faagikuvamiseks). Eriala asjatundjale on aga kättesaadavad ka teised muudetud antikehade tegemise ja skriinimise meetodid.

[0430] Faagil (fagemiidil) kuvamise tehnoloogia on osutunud võimsaks tööriistaks selliste uute valkude loomisel ja selekteerimisel, mis seonduvad ligandi, näiteks antigeeniga. Faagil (fagemiidil) kuvamise meetodite kasutamine võimaldab luua suuri valguvariantide raamatukogusid, millest saab kiiresti välja sorteerida need järjestused, mis seonduvad sihtmärkmolekuliga kõrge afiinsusega. Üldiselt liidetakse polüpeptiidvariante kodeerivad nukleiinhapped viiruse kattevalku, nagu geen II valk või geen III valk, kodeeriva nukleiinhappejärjestusega. Välja on töötatud monovalentsed fagemiidil kuvamise süsteemid, kus valku või polüpeptiidi kodeeriv nukleiinhappejärjestus liidetakse geeni III valguosa kodeeriva nukleiinhappejärjestusega (Bass, S., *Proteins*, 8: 309 (1990); Lowman, Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3: 205 (1991)). Monovalentse fagemiidil kuvamise süsteemi puhul ekspresseeritakse liitgeeni madalal tasemel ning ühtlasi ekspresseeritakse ka metsiktüüpi geeni II valke, nii et säilib partiklite infektsioonilisus. Peptiidiraamatukogude loomise ja nende raamatukogude skriinimise meetodid on avaldatud paljudes patentides (näiteks US patent nr. 5723286, US patent nr. 5432018, US patent nr. 5580717, US patent nr. 5427908 ja US patent nr. 5498530).

[0431] Antikehade või antigeeni siduvate polüpeptiidide raamatukogusid on valmistatud mitmel viisil, kaasa arvatud ühe geeni muutmise juhuslike DNA järjestuste inserteerimise teel või suguluses oleva geeniperekonna kloonimise teel. Antikehade või antigeeni siduvate fragmentide kuvamismeetodeid faagil (fagemiidil) kuvamise abil on kirjeldatud US patentides nr. 5750373, 5733743, 5837242, 5969108, 6172197, 5580717 ja 5658727. Seejärel skriinitakse raamatukogu soovitud omadustega antikehade või antigeeni siduvate valkude suhtes.

[0432] Valitud aminohappe asendamise meetodid matriitsiks olevasse nukleiinhappesse on tehnika tasemes hästi välja töötatud ja mõnesid neist on siin kirjeldatud. Näiteks saab hüpervarieeruva piirkonna jääke asendada, kasutades Kunkeli meetodit, vt. näiteks: Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154: 367-382 (1987).

[0433] Oligonukleotiidi järjestus sisaldab muudetavate hüpervarieeruva piirkonna jääkide jaoks ühte või mitut koodonikomplekti. Koodonikomplekt on erinevate nukleotiiditriplettide järjestuste kompleks, mida kasutatakse soovitud aminohappevariantide kodeerimiseks. Koo-



donikomplekte võib esitada, kasutades konkreetsete nukleotiidide või nukleotiidide ekvimo-  
laarsete segude tähistamiseks allpool näidatud IUB koodile vastavaid sümboleid.

## IUB KOODID

[0434] G guaniin

A adeniin

T tümiin

C tsütosiin

R (A või G)

Y (C või T)

M (A või C)

K (G või T)

S (C või G)

W (A või T)

H (A või C või T)

B (C või G või T)

V (A või C või G)

D (A või G või T) H

N (A või C või G või T)

[0435] Näiteks koodonikomplektis DVK võib D olla nukleotiid A või G või T, V võib olla A või G või C ja K võib olla G või T. See koodonikomplekt võib esindada 18 erinevat koodonit ning võib kodeerida aminohappeid Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly ja Cys.

[0436] Praimerikomplektide oligonukleotiidide võib sünteesida standardmeetoditel. Näiteks võib oligonukleotiidide komplekti sünteesida tahkefaasilise sünteesi abil ning see sisaldab kõiki selle koodonikomplektiga esitatud nukleotiiditriplettide võimalikke kombinatsioone, mis kodeerivad soovitud aminohapete rühma. Teatud asendites valitud “kõdu”nukleotiidide sisaldavate oligonukleotiidide süntees on tehnika tasemest hästi teada. Selliseid nukleotiidikomplekte, mis sisaldavad teatud koodonikomplekte, saab sünteesida kaubanduslike nukleiinhappe süntesaatorite abil (mis on saadaval näiteks firmast Applied Biosystems, Foster City, CA) või neid võib saada kaubandusest (näiteks firmast Life Technologies, Rockville,

MD). Seetõttu sisaldab sünteesitud oligonukleotiidide kompleks, mis sisaldab konkreetset koodonikomplekti, tavaliselt paljusid erinevate järjestustega oligonukleotide, kusjuures need kogu järjestuse ulatuses esinevad erinevused on määratud koodonikomplektiga. Oligonukleotiidid, mida kasutatakse vastavalt sellele leiutisele, sisaldavad järjestusi, mis võimaldavad neil hübridiseeruda matriitsnukleiinhappe varieeruva domeeniga ning võivad sisaldada ka kloonimiseks vajalikke restriksiooniensüümidele sobivaid saite.

[0437] Ühe meetodi puhul võib aminohappevarianti sünteesivad nukleiinhappejärjestused luua oligonukleotiidide poolt vahendatud mutageneesi meetodil. See meetod on tehnika tasemest hästi teada, nagu on kirjeldanud Zoller jt., *Nucleic Acids Res.*, 10: 6487-6504 (1987). Lühidalt öeldes luuakse aminohappevariante kodeerivad nukleiinhappejärjestused soovitud koodonikomplekti sisaldavate oligonukleotiidide komplekti hübridiseerimise abil DNA matriitsiga, kus matriits on matriitsnukleiinhappe järjestuse varieeruvat piirkonda sisaldava plasmidi üheaahelaline vorm. Pärast hübridiseerimist kasutatakse DNA polümeraasi, et sünteesida matriitsi teine täielik komplementaarne ahel, mis seega sisaldab oligonukleotiidpraimerit ja oligonukleotiidide komplekti poolt esitatud koodonikomplekte.

[0438] Üldiselt kasutatakse oligonukleotiidide pikkusega vähemalt 25 nukleotiidi. Optimaalne oligonukleotiid sisaldab 12 kuni 15 nukleotiidi, mis on matriitsiga täielikult komplementaarset mõlemal pool mutatsiooni kodeerivat nukleotiidi (mutatsioone kodeerivaid nukleotide). See kindlustab oligonukleotiidide õige hübridiseerumise üheaahelalise DNA matriitsmolekuliga. Oligonukleotide saab kergesti sünteesida, kasutades tehnika tasemest tuntud meetodeid, näiteks meetodit, mida on kirjeldanud Crea jt., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5765 (1978).

[0439] DNA-matriits luuakse vektorite abil, mis on tuletatud bakteriofaagi M13 vektoritest (sobivad on kaubanduslikult saadavad vektorid M13mp18 ja M13mp19), või mis sisaldavad üheaahelalise faagi replikatsiooni alguspunkti, nagu on kirjeldanud Vera jt., *Meth. Enzymol.*, 153: 3 (1987). Seega saab üheaahelalise matriitsi loomiseks inserteerida muteeritava DNA ühte nendest vektoritest. Üheaahelalise matriitsi saamist on kirjeldatud eespool viidatud käsiraamatu Sambrook et al. lõikudes 4.21–4.41.

[0440] Natiivse DNA järjestuse muutmiseks hübridiseeritakse oligonukleotiid sobivates hübridisatsioonitingimustes üheaahelalise matriitsiga. Seejärel lisatakse DNA polümeriseeriv ensüüm, tavaliselt T7 DNA polümeraas või DNA polümeraasi I Klenowi fragment, et sünteesida matriitsile komplementaarne ahel, kasutades sünteesipraimeritena oligonukleotide. Seega moodustub heterodupleksmolekul, milles üks DNA ahel kodeerib geeni 1 muteeritud

vormi ja teine ahel (originaalmatriits) kodeerib geeni 1 natiivset, muutmata järjestust. See heterodupleksmolekul transformeeritakse sobivasse peremeesrakku, tavaliselt prokarüoodi nagu *E. coli* JM101 rakku. Pärast rakkude kasvatamist plaaditakse nad agarosplaatidele ja skriinitakse muteeritud DNA-d sisaldavate bakterikolooniate identifitseerimiseks, kasutades 32-fosfaadiga radioaktiivselt märgistatud oligonukleotiidpraimerit.

[0441] Siin vahetult eespool kirjeldatud meetodit võib modifitseerida nii, et luuakse homodupleksmolekul, kus plasmidi mõlemad ahelad sisaldavad mutatsiooni (mutatsioone). Modifikatsioonid on järgnevad. Üheaahelaline oligonukleotiid anniilitakse eespool kirjeldatud üheaahelalisele matriitsile. Kolme desoksüribonukleotiidi – desoksüadenosiin trifosfaadi (dATP), desoksüriboguanosiin trifosfaadi (dGTP) ja desoksüribotümidin trifosfaadi (dTTP) – segu ühendatakse tidesoksüribotsütosiiniga, mida nimetatakse dCTP-(aS) (mida võib saada firmast Amersham). See segu lisatakse matriitsi ja oligonukleotiidi kompleksile. DNA polümeeraasi lisamisel sellele segule saadakse matriitsiga identne ahel, välja arvatud muteeritud aluste osas. Lisaks sisaldab see uus ahel dCTP asemel dCTP-(aS), mis kaitseb ahelat restriksiooniensüümiga lõikamise eest. Pärast seda, kui kaheaahelalise heterodupleksi matriitsahel on sobiva restriksiooniensüümiga sälgustatud, saab matriitsahela lõigata ExoIII nukleaasi või mõne muu sobiva nukleaasiga piirkonnani, mis sisaldab muteeritavat saiti (muteeritavaid saite). Seejärel reaktsioon peatub, jättes alles molekuli, mis on ainult osaliselt üheaahelaline. Seejärel moodustatakse täielik kaheaahelaline DNA homodupleks, kasutades DNA polümeeraasi kõigi nelja desoksüribonukleotiidtrifosfaadi, ATP ja DNA ligaasi juuresolekul. Selle homodupleksmolekuli saab seejärel transformeerida sobivasse peremeesrakku.

[0442] Nagu eelnevalt on näidatud, on oligonukleotiidide järjestused komplektis piisava pikkusega, et hübridiseeruda matriitsnukleiinhappega ja võivad ka, ehkki mitte tingimata, sisaldada restriksioonisaiti. DNA-matriitsi saab luua nende vektorite abil, mis on tuletatud bakteriofaagi M13 vektoritest või vektoritest, mis sisaldavad üheaahelalise faagi replikatsioonisaiti, nagu on kirjeldanud Viera jt., *Meth. Enzymol.*, 153: 3 (1987). Seega tuleb muteeritav DNA üheaahelalise matriitsi saamiseks inserteerida ühte nendest vektoritest. Üheaahelalise matriitsi saamist on kirjeldatud teoses Sambrook et al., *supra*, lõikudes 4.21–4.41.

[0443] Teise meetodi järgi võib antigeeni sidumise taastada antikehade humaniseerimise käigus parandatud hüpervarieeruvate piirkondade valimise teel (vt. taotlust nr. 11/061841, sisse antud 18. veebruaril 2005). Meetod hõlmab inimesest erineva liigi hüpervarieeruvate piirkondade liitmist aktseptorraamistikku ja ühe või mitme aminohappeasenduse viimist ühte või

mitmesse hüpervarieeruvasse piirkonda aktseptor-raamistikujärjestust modifitseerimata. Alternatiivselt võivad ühe või mitme aminohappeasenduse sisseviimisega kaasned aktseptor-raamistikujärjestuse modifikatsioonid.

[0444] Järgmise meetodi kohaselt võib luua raamatukogu, esitades vastassuunas paiknevate ja pärisuunas paiknevate oligonukleotiidide komplektid, kus iga komplekt sisaldab paljusid erinevate järjestustega oligonukleotiidide, kusjuures erinevad järjestused pannakse paika oligonukleotiidjärjestuste sees esitatud koodonikomplektide abil. Vastassuunas paiknevate ja pärisuunas paiknevate oligonukleotiidide komplekte koos varieeruva domeeni matriitsnukleiinhappe järjestusega võib kasutada polümeraasi ahelreaktsioonis, et luua PCR produktide „raamatukogu“. PCR produkte võib nimetada „nukleiinhappekassettideks“, kuna neid saab liita teistele nendega suguluses olevatele või suguluses mitteolevatele nukleiinhappejärjestustele, näiteks viiruse kattevalkudele ja dimeriseerumisdomeenidele, kasutades väljatöötatud molekulaarbioloogia meetodeid.

[0445] PCR praimerite järjestused sisaldavad ühte või mitut disainitud koodonikomplekti hüpervarieeruva piirkonna lahustile kättesaadavate ja väga divergeerunud asendite jaoks. Nagu eespool on kirjeldatud, on koodonikomplekt erinevate nukleotiiditriplettide järjestuste komplekt, mida kasutatakse soovitud aminohappevariantide kodeerimiseks.

[0446] Väljavalitud antikehad, mis vastavad soovitud kriteeriumidele, kuna nad on selekteeritud sobivate skriinimise ja selekteerimise etappide abil, võib eraldada ja kloonida, kasutades standardseid rekombinantseid meetodeid.

[0447] Lisaks on tähtis, et humaniseeritavad antikehad säilitaksid kõrge afiinsuse antigeeniga seondumiseks ja teised soovivad bioloogilised omadused. Selle eesmärgi saavutamiseks valmistatakse humaniseeritud antikehad eelistatud teostuses algsete järjestuste ja erinevate kontseptsioonidega humaniseeritud produktide analüüsiprotsessi abil, kasutades algsete ja humaniseeritud järjestuste kolmemõõtmelisi mudeleid. Immunoglobuliinide kolmemõõtmelised mudelid on üldiselt saadaval ja eriala asjatundjale tuttavad. Saadaval on ka arvuti-programmid, mis illustreerivad ja kuvavad valitud kandidaatimmunoglobuliinide järjestuste tõenäolisi kolmemõõtmelisi konformatsioonilisi struktuure. Nende kuvade ülevaatus võimaldab analüüsida jääkide tõenäolisi rolle kandidaatimmunoglobuliini järjestuse funktsioneerimises, st nende jääkide analüüsi, mis mõjutavad kandidaatimmunoglobuliini võimet seonduda oma antigeeniga. Sel viisil saab retsiipiendist valida ja kombineerida FR jäägid ning importida järjestused nii, et saavutatakse antikeha soovitud tunnused, nagu suurenenud afiinsus

sihtmärkantigeeni(de) suhtes. Üldiselt osalevad antigeeni sidumises otseselt ja kõige oluliselt hüpervarieeruva piirkonna jäägid.

[0448] Silmas peetakse humaniseeritud CD79b-vastase antikeha erinevaid vorme. Näiteks võib humaniseeritud antikeha olla antikehafragment nagu Fab, mis on immunokonjugaadi saamiseks vajadusel konjugeeritud ühe või mitme tsütotoksilise ainega. Alternatiivselt võib humaniseeritud antikeha olla intaktne antikeha, nagu intaktne IgG1 antikeha.

[0449] Humaniseerimise alternatiivina võib luua inimese antikehad. Näiteks on nüüd võimalik saada transgeenseid loomi (näiteks hiiri), kes on immuniseerimise järel suutelised tootma inimese antikehade täielikku repertuaari, kusjuures endogeenseid immunoglobuliine ei toodeta. Näiteks on kirjeldatud, et antikeha raskeid ahelaid ühendava piirkonna ( $J_H$ ) geeni homoloogne deletsioon kimäärsetes ja muteeritud idurakkudega hiirtes annab tulemuseks endogeense antikeha tootmise täieliku inhibeerimise. Inimese idurakkude immunoglobuliinide geenirivi (*gene array*) ülekanne nendesse muteeritud idurakkudega hiirtesse annab nende antigeeniga stimuleerimise tulemuseks inimese antikehade tootmise, vt. näiteks: 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 patendid nr. 5545806, 5569825, 5591669 (kõik kuuluvad firmale GenPharm), 5545807 ja taotlus WO 97/17852.

[0450] Alternatiivselt võib immuniseerimata doonorite immunoglobuliinide varieeruva (V) domeeni geenirepertuaaridest inimese antikehade ja antikehafragmentide tootmiseks *in vitro* kasutada faagil kuvamise tehnoloogiat (McCafferty et al., Nature, 348: 552-553 (1991)). Selle meetodi kohaselt kloonitakse antikeha V domeeni geenid õiges raamis kas filamentse bakteriofaagi, nagu M13 või fd, vähemtähtsa kattevalgu geeni ja kuvatakse faagipartikli pinnal funktsionaalsete antikehafragmentidena. Kuna filamentne partikkel sisaldab faagi genoomi üheaahelalist DNA koopiat, annab antikeha funktsionaalsetel omadustel põhinev seleksioon tulemuseks ka selle geeni valimise, mis kodeerib nende omadustega antikeha. Seega jäljendab faag mõnesid B-raku omadusi. Faagikuvamise võib läbi viia erinevates formaatides, mille kohta on näiteks ülevaade: Johnson, Kevin S., a Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology, 3: 564-571 (1993). Faagil kuvamiseks võib kasutada mitmeid V geenide segmentide allikaid. Clackson jt., Nature, 352: 624-628 (1991) eraldasid paljude erinevate oksasoolonivastaste antikehade rivi immuniseeritud hiirte põrnadest pärinevate V geenide väikesest juhuslike kombinatsioonide raamatukogust. Immuniseerimata inimdoonoritelt pärinevate V geenide repertuaari saab konstrueerida ja antigeenide (kaasa arvatud oma organismi

antigeenide) vastaste paljude erinevate antikehade rivi eraldada meetoditel, mida on kirjeldanud Marks jt., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), või Griffith jt., EMBO J., 12: 725-734 (1993), vt. ka US patente nr. 5565332 ja 5573905.

[0451] Nagu eespool on arutletud, võib inimese antikehi luua ka *in vitro* aktiveeritud B-rakkude abil (vt. US patente 5567610 ja 5229275).

#### 4. Antikehafragmendid

[0452] Teatud juhtudel on kasulik kasutada antikehade asemel antikehafragmente. Fragmentide väiksem suurus võimaldab nende kiiret kõrvaldumist ja paremat ligipääsu tahketele kasvajatele.

[0453] Antikehafragmentide tootmiseks on välja töötatud erinevaid meetodeid. Traditsiooniliselt on neid fragmente saadud intaktsete antikehade proteolüütilisel lõikamisel (vt. näiteks: Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24: 107-117 (1992); Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)). Nüüd aga saab neid fragmente toota otse rekombinantsetes peremeesrakkudes. Fab, Fv ja ScFv antikehafragmente saab kõiki ekspresseerida *E. coli* rakkudes ja nendest sekreteerida, mis võimaldab seega kergesti toota nende fragmentide suuri koguseid. Antikehafragmente võib eraldada ka eespool arutatud antikehade faagiraamatukogudest. Alternatiivselt võib Fab'-SH fragmendid saada kätte otse *E. coli* rakkudest ja liita keemiliselt, moodustamaks F(ab')<sub>2</sub> fragmente (Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)). Teise lähenemise puhul saab F(ab')<sub>2</sub> fragmente eraldada otse rekombinantsete peremeesrakkude kultuurist. Pikendatud *in vivo* poolväärtusajaga Fab ja F(ab')<sub>2</sub> fragmente, mis sisaldavad päästeretseptorit (*salvage receptor*) siduva epitoobi jääke, on kirjeldatud US patendis nr. 5869046. Eriala asjatundjale on selgesti nähtavad ka teised antikehafragmentide tootmise meetodid. Järgmistes teostustes on valitav antikeha üheaheelaline Fv fragment (scFv), vt. WO 93/16185, US patenti nr. 5571894 ja US patenti nr. 5587458. Fv ja sFv on ainsad intaktsete ühendamissaitidega molekulid, milles puuduvad konstantsed piirkonnad, seega sobivad nad *in vivo* kasutamisel mittespetsiifilise seondumise vähendamiseks. sFv liitvalke võib konstrueerida efektorvalgu liitmisel kas sFv amino- või karboksüterminusse, vt. Antibody Engineering, toim. Borrebaeck, *supra*. Antikehafragmendid võivad olla ka "lineaarsed antikehad", nagu on kirjeldatud näiteks US patendis 5641870. Sellised lineaarsed antikehafragmendid võivad olla monospetsiifilised või bispetsiifilised.

## 5. Bispetsiifilised antikehad

[0454] Bispetsiifilised antikehad on sellised antikehad, mis sisaldavad sidumisspetsiifilisusi vähemalt kahele erinevale epitoobile. Bispetsiifilised näidisantikehad võivad seonduda siin kirjeldatud CD79b valgu kahe erineva epitoobiga. Üks sellistest antikehadest võib ühendada endas CD79b sidumissaiti teise valgu sidumissaidiga. Alternatiivselt võib CD79b-vastane õlg olla ühendatud õlga, mis seondub leukotsüüdil oleva päästikmolekuliga (*triggering molecule*), nagu T-raku retseptormolekul (näiteks CD3) või IgG Fc retseptor (FcγR), nagu FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) ja FcγRIII (CD16), et fokusseerida ja lokaliseerida rakulised kaitsemehhanismid CD79b ekspresseerivatesse rakkudesse. Bispetsiifilisi antikehi võib kasutada ka tsütotoksiliste ainete lokaliseerimiseks rakkudesse, mis ekspresseerivad CD79b. Need antikehad sisaldavad CD79b siduvat õlga ja teist õlga, mis seondub tsütotoksilise ainega (näiteks saporini, interferoon-α vastase aine, vinca alkaloidi, ritsiini A-ahela, metotreksaadi või radioaktiivse hapteniisotoobiga). Bispetsiifilisi antikehi saab valmistada täispikkade antikehade või antikehafragmentidena (näiteks F(ab')<sub>2</sub> bispetsiifiliste antikehadena).

[04555] Patenditaotluses WO 96/16673 kirjeldatakse bispetsiifilist ErbB2/anti-FcγRIII vastast antikeha ja US patendis nr. 5837234 avaldatakse bispetsiifiline ErbB2/anti-FcγRI vastane antikeha. Bispetsiifiline ErbB2/Fcα-vastane antikeha on näidatud taotluses WO98/02463. US patendis nr. 5821337 avaldatakse bispetsiifiline ErbB2/CD3-vastane antikeha.

[0456] Bispetsiifiliste antikehade valmistamise meetodid on tehnika tasemest teada. Traditsiooniline täispikkade bispetsiifiliste antikehade tootmine põhineb immunoglobuliini raske ja kerge ahela kahe paari koossekspressioonil, kus need kaks ahelat on erineva spetsiifilisusega (Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)). Immunoglobuliini raske ja kerge ahela juhusliku sortimise tõttu toodavad need hübriidoomid (kvadroomid) 10 erineva antikehamolekuli võimalikku segu, millest ainult ühel on õige bispetsiifiline struktuur. Õige molekuli väljapuhastamine, mis tavaliselt tehakse afiinsuskromatograafia etappide abil, on üsna tülikas ning produkti saagised on madalad. Samasugused protseduurid on avaldatud taotluses WO 93/08829 ning artiklis: Trauneker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

[0457] Teistsuguse lähenemise puhul liidetakse soovitud sidumisspetsiifilisusega antikeha varieeruvad domeenid (antikeha antigeeniga ühendavad saidid) immunoglobuliinide konstantsete domeenide järjestustega. Eelistatult toimub liitmine Ig raske ahela konstantse domee-

niga, mis sisaldab vähemalt osaliselt hingepiirkonda ning  $C_{H2}$  ja  $C_{H3}$  piirkonda. Eelistatult sisaldab vähemalt üks liidetavatest esimest raske ahela konstantset piirkonda ( $C_{H1}$ ), mis sisaldab kerge ahela sidumiseks vajalikku saiti. Immunoglobuliini raske ahela liidetavaid piirkondi ja soovi korral ka immunoglobuliini kerget ahelat kodeerivad DNA-d inserteeritakse eraldi ekspresioonivektoritesse ja transfekteeritakse koos sobivasse peremeesrakku. See annab suurema paindlikkuse kolme polüpeptiidifragmendi omavaheliste vahekordade reguleerimiseks nendes teostustes, kus selles konstruktsioonis kasutatud kolme polüpeptiid-ahela ebavõrdsed suhted annavad soovitud bispetsiifilise antikeha optimaalse saagise. Võimalik on aga inserteerida kahte või kõiki kolme polüpeptiidahelat kodeerivad järjestused ühte ekspresioonivektorisse juhul, kui vähemalt kahe polüpeptiidahela võrdsel tasemel ekspresioon annab kõrged saagised, või juhul, kui nende suhe ei mõjuta oluliselt soovitud ahelatekombinatsiooni saagist.

[0458] Selle lähenemise eelistatud teostuses koosnevad bispetsiifilised antikehad hübriidse immunoglobuliini raskest ahelast, mille ühes õlas on esimene sidumisspetsiifilisus, ja hübriidse immunoglobuliini raske ahela ja kerge ahela paarist (mis annab teise sidumisspetsiifilisuse) teises õlas. On leitud, et see asümmeetriline struktuur hõlbustab soovitud bispetsiifilise ühendi lahutamist immunoglobuliiniahelate ebasoovitavatest kombinatsioonidest, kuna immunoglobuliini kerge ahela olemasolu ainult bispetsiifilise molekuli ühes pooles annab hõlpsa lahutamise võimaluse. See lähenemine on avaldatud taotluses WO 94/04690. Täiendavaid detaile bispetsiifiliste antikehade loomise kohta vt. näiteks artiklist: Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

[0459] Vastavalt teisele lähenemisele, mida on kirjeldatud US patendis nr. 5731168, võib konstrueerida antikehamolekulide paari vahelise piirpinna sellisena, et saadakse maksimaalne protsent heterodimeere, mis saadakse rekombinantsete rakkude kultuurist. Eelistatud piirpind sisaldab vähemalt osa  $C_{H3}$  domeenist. Selle meetodi puhul asendatakse üks või mitu esimese antikehamolekuli piirpinnal olevat väikest aminohappe külghelat suuremate külghelatega (näiteks türosiini või trüptofaaniga). Teise antikehamolekuli piirpinnale luuakse suur(t)e külghela(te)ga identse või lähedase suurusega kompenseeriv "süvend", asendades suured aminohappekülghelad väiksematega (näiteksalaniini või treoniiniga). See annab mehhanismi heterodimeeri saagise suurendamiseks võrreldes ebasoovitavate lõpp-produktidega nagu homodimeerid.



[0460] Bispetsiifiliste antikehade hulka kuuluvad ristsidestatud ehk "heterokonjugaat"-antikehad. Näiteks võib ühe heterokonjugaadis oleva antikeha liita avidiini ja teise antikeha biotiiniga. Selliseid antikehi on pakutud näiteks immuunsüsteemi rakkude suunamiseks ebasoovitavate rakkude vastu (US patent nr. 4676980) ja HIV infektsiooni ravimiseks (WO 91/00360, WO 92/00373 ja EP 03089). Heterokonjugaat-antikehi võib valmistada, kasutades ükskõik missugust mugavat ristsidestamise meetodit. Sobivad ristsidestavad ained on tehnika tasemest hästi teada ja need koos mitmete ristsidestamismeetoditega on avaldatud US patendis nr. 4676980.

[0461] Bispetsiifiliste antikehade antikehafragmentidest loomise meetodeid on samuti kirjanduses kirjeldatud. Näiteks võib bispetsiifilisi antikehi valmistada keemilise ühendamise abil. Brennan jt., *Science*, 229: 81 (1985), kirjeldavad protseduuri, kus intaktsed antikehad lõigatakse  $F(ab')_2$  saamiseks proteolüütiliselt. Need fragmendid redutseeritakse kompleksi moodustava ditioolreagendi naatriumarsenitiga, et stabiliseerida naabruses paiknevaid ditioole ja takistada molekulisisest disulfiidi moodustumist. Saadud Fab' fragmendid konverteeritakse tionitrobensoaat- (TNB) derivaatideks. Üks Fab'-TNB derivaatidest konverteeritakse seejärel uuesti Fab'-tiooliks redutseerimisel merkaptotoetüülamiiniga ja segatakse bispetsiifilise antikeha moodustamiseks ekvimolaarse koguse teise Fab'-TNB derivaadiga. Toodetud bispetsiifilisi antikehi võib kasutada ensüümide selektiivse immobiliseerimise vahendina.

[0462] Hiljutised edusammud on hõlbustanud Fab'-SH fragmentide saamist otse *E. coli* rakkudest, mille saab siis keemiliselt liita, moodustamaks bispetsiifilisi antikehi. Shalaby jt., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992), kirjeldavad täielikult humaniseeritud bispetsiifilise antikeha  $F(ab')_2$  molekuli tootmist. Kumbki Fab' fragment sekreteeriti *E. coli* rakkudest eraldi ja siis liideti need bispetsiifilise antikeha saamiseks keemiliselt *in vitro*. Selliselt moodustatud bispetsiifiline antikeha oli võimelike seonduma ErbB2 retseptorit üleekspressseerivate rakkude ja inimese normaalsete T rakkudega, samuti käivitama inimese tsütotoksiliste lümfotsüütide lüütilise aktiivsuse sihtmärgiks olevate inimese rinnakasvajate vastu.

[0463] Kirjeldatud on ka bispetsiifiliste antikehafragmentide valmistamise erinevaid meetodeid rekombinantsetes rakukultuuris ja sellest eraldamiseks. Näiteks on bispetsiifilisi antikehi toodetud leutsiini"tõmblukkude" (*leucine zipper*) kasutamise abil, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Fos ja Jun valkudest pärinevad leutsiini"tõmblukkude" peptiidid seoti kahe erineva antikeha Fab'-osadega geenide liitmisel. Antikeha homodimeerid taandati hingepiirkonnas, moodustamaks monomeere, ja oksüdeeriti siis uuesti, moodusta-

maks antikeha heterodimeere. Seda meetodit saab kasutada ka antikeha homodimeeride tootmiseks. Alternatiivse mehhanismi bispetsiifiliste antikehafragmentide tegemiseks pakub "diakehade" tehnoloogia, mida on kirjeldanud Hollinger jt., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993). Fragmentid sisaldavad  $V_H$ , mis on ühendatud  $V_L$ -ga linkeri kaudu, mis on liiga lühike selleks, et võimaldada sama ahela kahe domeeni omavahelist paardumist. Seega on ühe fragmendi  $V_H$  ja  $V_L$  domeenid sunnitud paaduma teise fragmendi komplementaarsete  $V_L$  ja  $V_H$  domeenidega, moodustades sellega kaks antigeeni siduvat saiti. Bispetsiifiliste antikehafragmentide valmistamiseks on avaldatud ka teine strateegia, kus kasutatakse üheaheelalisi Fv (scFv) dimeere, vt. Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994).

[0464] Silmas peetakse ka antikehi, millel on enam kui kaks valentsi. Näiteks võib valmistada trispetsiifilisi antikehi, Tutt et al., J. Immunol., 147: 60 (1991).

## 6. Heterokonjugaat-antikehad

[0465] Käesoleva leiutise ulatusse kuuluvad ka heterokonjugaat-antikehad. Heterokonjugaat-antikehad koosnevad kahest kovalentselt ühendatud antikehast. Selliseid antikehi on pakutud näiteks immuunsüsteemi rakkude suunamiseks soovimatute rakkude vastu (US patent nr. 4676980) ja HIV infektsiooni ravimiseks (WO 91/00360, WO 92/2011373, EP 03089). Peetakse silmas, et neid antikehi võib valmistada *in vitro*, kasutades valgusünteesi keemia tuntud meetodeid, kaasa arvatud ristsidestavad ained. Näiteks võib konstrueerida immuunotoksiinid, kasutades disulfiidi vahetusreaktsiooni või tioestersideme moodustamist. Selleks otstarbeks sobivate regentide näidete hulka kuuluvad iminotiolaat ja metüül-4-merkaptobutüürimidaat ning need, mida on kirjeldatud näiteks US patendis nr. 4676980.

## 7. Multivalentset antikehad

[0466] Rakk, mis ekspresseerib antigeeni, millega antikehad seonduvad, võib multivalentse antikeha internaliseerida (ja/või kataboliseerida) kiiremini kui bivalentse antikeha. Leiutisekohased antikehad võivad olla multivalentset antikehad (mis ei kuulu IgM klassi), millel on kolm või enam antigeeni siduvat saiti (näiteks tetravalentsed antikehad) ja mida saab kergesti toota antikeha polüpeptiidahelaid kodeeriva nukleiinhappe rekombinantse ekspressiooni abil. Multivalentne antikeha võib sisaldada dimeriseerumisdomeeni ja kolme või enam antigeeni

siduvat saiti. Eelistatud dimeriseerumisdomeen sisaldab Fc piirkonda või hingepiirkonda (või koosneb nendest). Selle stsenaariumi puhul sisaldab antikeha Fc piirkonda ja kolme või enam antigeeni siduvat saiti Fc piirkonna aminoterminuses. Siin eelistatud multivalentne antikeha sisaldab kolme kuni umbes kaheksat, eelistatult nelja, antigeeni siduvat saiti (või koosneb nendest). Multivalentne antikeha sisaldab vähemalt ühte polüpeptiidahelat (ja eelistatult kahte polüpeptiidahelat), kus polüpeptiidahel(ad) sisaldab (sisaldavad) kahte või enam varieeruvat domeeni. Näiteks võib (võivad) polüpeptiidahel(ad) sisaldada VDI-(X1)<sub>n</sub>-VD2-(X2)<sub>n</sub>-Fc, kus VD1 on esimene varieeruv domeen, VD2 on teine varieeruv domeen, Fc on üks Fc piirkonna polüpeptiidahel, X1 ja X2 vastavad aminohappele või polüpeptiidile ning n on 0 või 1. Näiteks polüpeptiidahel(ad) võib (võivad) sisaldada: VH-CH1 paindlikku linker-VH-CH1-Fc piirkonna ahelat või VH-CH1-VH-CH1-Fc piirkonna ahelat. Siin kasutatav multivalentne antikeha sisaldab eelistatult vähemalt kahte (eelistatult nelja) täiendavat kerge ahela varieeruva domeeni polüpeptiidi. Siinne multivalentne antikeha võib sisaldada näiteks umbes kahte kuni kaheksat kerge ahela varieeruva domeeni polüpeptiidi. Siin silmas peetavad kerge ahela varieeruva domeeni polüpeptiidid sisaldavad kege ahela varieeruvat domeeni ja vajadusel täiendavat CL domeeni.

#### 8. Efektorfunktsiooni konstrueerimine

[0467] Leiutisekohast antikeha võib olla soovitatav modifitseerida efektorfunktsioonide suhtes, näiteks tugevdada antikeha antigeeni-sõltuvat rakkude poolt vahendatud tsütotoksilisust (*antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) ja/või komplemendi-sõltuvat tsütotoksilisust (*complement dependent cytotoxicity*, CDC). Selle võib saavutada ühe või mitme aminohappeasenduse sisseviimise abil antikeha Fc piirkonda. Alternatiivselt või täiendavalt võib Fc piirkonda viia tsüsteiinijäägi(d), võimaldades sellega selles piirkonnas ahelatevahelise disulfiidsilla moodustumist. Selliselt loodud homodimeersetel antikehadel võib olla parenenud internaliseerimisvõime ja/või suurenenud komplemendi-vahendatud rakutapmise võime ja antikeha-sõltuv rakuline tsütotoksilisus (ATCC), vt. Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992), ja Shopes B. J., *Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Tugevnenud kasvajakasvatsuse aktiivsusega homodimeerseid antikehi võib valmistada ka heterobifunktsionaalsete ristsidestajate abil, nagu on kirjeldanud Wolff jt., *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternatiivselt võib konstrueerida antikeha, millel on kahekordsed Fc piirkonnad ja millel võib

seetõttu olla tugevnenud komplemendist tingitud lüüsi ja ADCC võime, vt. Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989). Antikeha poolväärtusaja pikendamiseks seerumis võib antikeha (eelkõige antikehafragmendi) koostisse liita päästmisretseptorile seonduva epitoobi, nagu on kirjeldatud näiteks US patendis nr. 57399277. Siin kasutatuna tähendab termin "päästmisretseptorile seonduv epitoop" IgG molekuli (näiteks IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> või IgG<sub>4</sub>) Fc piirkonna epitoopi, mis on vastutav IgG molekuli *in vivo* poolväärtusaja eest seerumis.

### 9. Immunokonjugaadid

[0468] Leiutis puudutab ka immunokonjugaate (mida vastastikku vahetatavalt nimetatakse ka "antikeha ja ravimi konjugaatideks" ehk "ADC-deks" ("*antibody-drug conjugates*"), mis sisaldavad antikeha, mis on konjugeeritud tsütotoksilise ainega, nagu kemoterapeutiline aine, kasvu inhibeeriv aine, toksiin (näiteks bakteriaalse, seene- taimse või loomse päritoluga ensümaatiliseltselt aktiivne toksiin või selle fragment) või radioaktiivne isotoop (st radiokonjugaat).

[0469] Teatud teostustes sisaldab immunokonjugaat antikeha ja toksiinist erinevat kemoterapeutilist ainet. Selliste immunokonjugaatide loomiseks kasulikke kemoterapeutilisi aineid on kirjeldatud eespool. Ensümaatiliseltselt aktiivsete toksiinide ja nende fragmentide hulka, mida võib kasutada, kuuluvad difteeriatoksiini A ahel, difteeriatoksiini mittesiduvad aktiivsed fragmentid, eksotoksiini A ahel (bakterist *Pseudomonas aeruginosa*), ritsiini A ahel, abriini A ahel, modetsiini A ahel, alfa-sartsiin, *Aleurites fordii* valgud, diantiinvalgud, *Phytolaca americana* valgud (PAPI, PAPII ja PAP-S), *Momordica charantia* inhibiitor, kurtsiin, krotiin, *Saponaria officinalis*'e inhibiitor, geloniin, restriktotsiin, fenomütsiin, enomütsiin ja trikottetseenid. Radiokonjugeeritud antikehade tootmiseks on saadaval erinevaid radionukliide. Näidete hulka kuuluvad <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y ja <sup>186</sup>Re. Antikeha ja tsütotoksilise aine konjugaate valmistatakse, kasutades erinevaid bifunktsionaalseid valke sidestavaid aineid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditiool)propionaat (SPDP), iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladiipimidaat-HCl), aktiivseid estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehüüdid (nagu glutaaraldehüüd), bis-asidoühendeid (nagu bis(p-asidobensoüül)heksaandiamiin), bis-diasooniumderivaadid (nagu bis-(p-diasooniumbensoüül)-etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu tolueen-2,6-diisotsüanaat), ja bis-aktiivseid fluori-

ühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Näiteks ritsiinimmunotoksiini võib valmistada nii, nagu on kirjeldanud Vitetta jt., Science, 238: 1098 (1987). Süsinik-14-märgistatud 1-isotiotsüanatotobensüül-3-metüüldietüleentriamiinpentaäädikhape (MX-DTPA) on radionukliidi ja antikeha konjugeerimiseks kasutatava kelaativa aine näide, vt. WO94/11026.

[0470] Siin peetakse silmas ka antikeha ja ühe või mitme väikesemolekulilise toksiini, nagu kaliheamütsiin, auristatiinpeptiidid, nagu monometüülauristatiin (MMAE) (dolastatiini sünteetiline analoog), maintansinoidid, ning DM1, trikoteen ja CC1065, ja nende toksiinide toksiiniaktiivsusega derivaatide konjugaate.

#### Näitlikud immunokonjugaadid – antikeha ja ravimi konjugaadid

[0471] Leiutisekohane immunokonjugaat (või „antikeha ja ravimi konjugaat“ („ADC“) võib olla alltoodud valemiga I, kus antikeha on konjugeeritud (st kovalentselt seotud) ühe või mitme ravimi-osamolekuliga (D) valikulise linkeri (L) kaudu. ADC-de hulka võivad kuuluda ka thioMAb ja ravimi konjugaadid („TDS“).



[0472] Seega võib antikeha olla ravimiga konjugeeritud kas otse või linkeri kaudu. Valemis I on p ravimi-osamolekulide keskmine arv antikeha kohta, mis võib olla vahemikus näiteks umbes 1 kuni 20 ravimi-osamolekuli antikeha kohta ning teatud teostustes umbes 1 kuni 8 ravimi-osamolekuli antikeha kohta. Leiutis hõlmab kompositsioone, mis sisaldavad antikeha ja ravimiühendeid valemiga I, kus keskmine ravimikoormus antikeha kohta on umbes 2 kuni 5 või umbes 3 kuni 4.

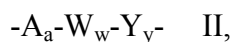
#### **a. Näidislinkerid**

[0473] Linker võib sisaldada ühte või mitut linkerkomponenti. Näitlike linkerkomponentide hulka kuuluvad 6-maleimidokaproüül(rühm) ("MC"), maleimidopropanoüül(rühm) ("MP"), valiin-tsitrulliin ("val-cit" või "vc"),alaniin-fenüülalaniin ("ala-phe"), p-aminobensüüloksükarbonüül(rühm) ("PAB") ning need, mis tekivad linkerreagentidega konjugeerimisel: N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüültio)pentanoaat ("SPP"), N-suktsiinimidüül-4-(N-maleimido-

tiometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaad ("SMCC", siin nimetatud ka kui "MCC") ja N-sukt-siinimidüül-(4-jodoatsetüül)aminobensoaat ("SIAB"). Tehnika tasemest on teada erinevaid linkerkomponente, millest mõnesid kirjeldatakse allpool.

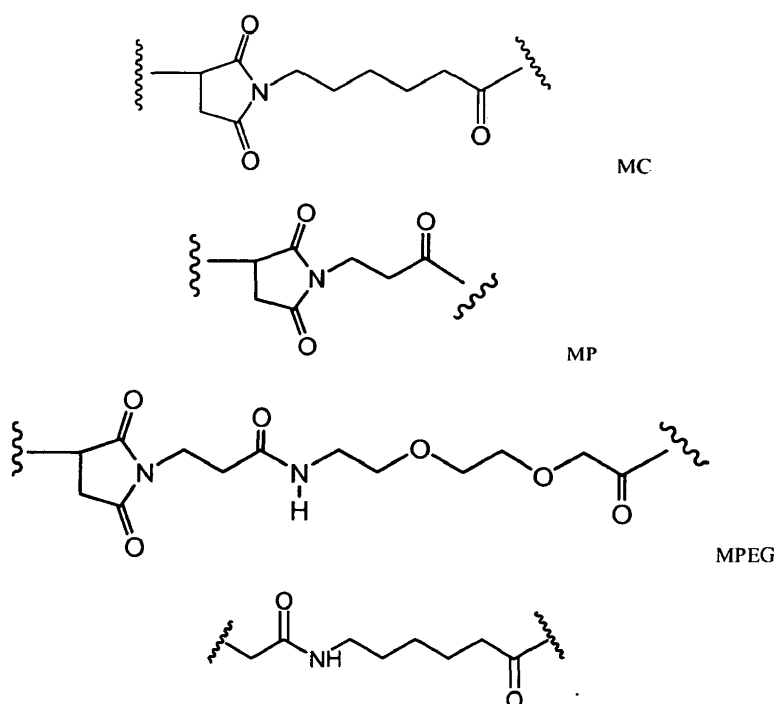
[0474] Linker võib olla „lahtilõigatav linker“, mis hõlbustab ravimi vabanemist rakus. Näiteks võib kasutada happelabiilset linkerit (näiteks hüdrasooni), proteaasitundlikku (näiteks peptidaasitundlikku) linkerit, fotolabiilset linkerit, dimetüül-linkerit või disulfiidisisaldavat linkerit (Chari et al., Cancer Research, 52: 127-131 (1992); US patent nr. 5208020).

[0475] Teatud teostustes on linker selline, nagu on näidatud järgneva valemiga II



kus A on pikendusüksus ja a on täisarv 0 kuni 1, W on aminohappeüksus ja w on täisarv 0 kuni 12, Y on speisserüksus ja v on 0, 1 või 2, ning Ab, D ja p on sellised, nagu eespool on defineeritud valemis I. Selliste linkerite näidisteostusi on kirjeldatud US patendis 2005/0238649 A1, mis on siia liidetud viitena.

[0476] Mõnedes teostustes võib linker sisaldada „pikendusüksust“ (“*stretcher unit*“), mis seob antikeha tesie linkerkomponendi või ravimi-osamolekuliga. Näitlikud pikendusüksused on näidatud allpool (kus laineline joon näitab antikehaga kovalentse ühendamise saite):



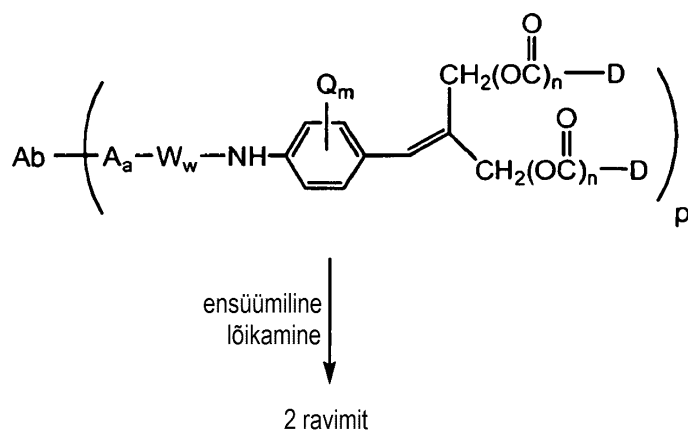
[0477] Mõnedes teostustes võib linkerikomponent sisaldada aminohappeüksust. Ühes sellises teostuses võimaldab aminohappeüksus linkeri lõikamist proteaasiga, hõlbustades sellega ravimi immunokonjugaadist vabanemist eksponeerimisel rakusisestele proteaasidele nagu lüsoosumi ensüümid, vt. näiteks Doronina et al., (2003) Nat. Biotechnol., 21: 778-784. Näitlike aminohappeüksuste hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, dipeptiid, tripeptiid, tetrapeptiid ja pentapeptiid. Näitlike dipeptiidide hulka kuuluvad valiin-tsitrulliin (vc või val-cit)alaniin-fenüülalaniin (af või ala-phe), fenüülalaniin-lüsiin (fk või phe-lys) või N-metüülvaliin-tsitrulliin (Me-val-cit). Näitlike tripeptiidide hulka kuuluvad glütsiin-valiin-tsitrulliin (gly-val-cit) ja glütsiin-glütsiin-glütsiin (gly-gly-gly). Aminohappeüksus võib sisaldada looduslikult esinevaid aminohappejääke, samuti minoorseid aminohappeid ja looduslikult mitteesinevaid aminohappeanalooge nagu tsitrulliin. Aminohappeüksusi võib disainida ja optimeerida nende selektiivsuse suhtes konkreetse ensüümiga lõikamiseks, näiteks kasvajaseoselise proteaasi, katepsiin B, C ja D või plasmiinproteaasiga lõikamiseks.

[0478] Mõnedes teostustes võib linker sisaldada „speisser“ühksust, mis seob antikeha ravimiosamolekuliga kas otse või pikendusüksuse ja/või aminohappeüksuse kaudu. Speisserüksus võib olla „ennastohverdav“ („*self immolative*“) või „ennast mitteohverdav“. „Ennast mitteohverdav“ speisserüksus on selline, millest kas osa või kogu speisserüksus jääb ADC ensümaatilise (näiteks proteolüütilise) lõikamise ajal ravimi-osamolekuliga seotuks. Ennast mitteohverdavate speisserüksuste hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, glütsiin-speisserüksus ja glütsiin-glütsiin-speisserüksus. Silmas peetakse ka teisi peptiid-speisserite kombinatsioone, mis on vastuvõetavad järjestusespetsiifilisele ensümaatilisele lõikamisele. Näiteks glütsiin-glütsiin-speisserüksust sisaldava ADC lõikamine kasvajarakkudega seotud proteaasi poolt annab tulemiseks glütsiin-glütsiin-ravimiosamolekuli vabanemise ülejäänud ADC-st. Ühes sellises teostuses viiakse seejärel eraldi läbi glütsiin-glütsiin-ravimi-osamolekuli hüdrolyüsietapp, lõigates niimoodi glütsiin-glütsiin-speisserüksuse ravimi-osamolekulist lahti.

[0479] „Ennastohverdav“ speisserüksus võimaldab ravimi-osamolekulil vabaneda eraldi hüdrolyüsietapita. Teatud teostustes sisaldab linkeri speisserüksus p-aminobensüülüksust. Ühes sellises teostuses seotakse p-aminobensüülalkohol aminohappeüksusega amiidsideme kaudu ning bensüülalkoholi ja tsütotoksilise aine vahel moodustatakse karbamaat, metüülkarbamaat või karbonaat, vt. näiteks: Hamann et al., (2005) Expert Opin. Ther. Patents, (2005) 15: 1087-1103. Ühes teostuses on speisserüksus p-aminobensüülloksükarbonüül(rühm) (PAB).

Teatud teostustes asendatakse p-aminobensüülüksuse fenüleeniosa Q<sub>m</sub>-ga, kus Q on (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-alküül-, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> alküül-, halogeno-, nitro- või tsüanorühm ja m on täisarv vahemikus 0-4. Lisaks kuuluvad ennastohverdavate speisserüksuste hulka, kuid ei ole nendega piiratud, aromaatsed ühendid, mis on elektroniliselt sarnased p-aminobensüülalkoholiga (vt. näiteks US 2005/0256030 A1), nagu 2-aminoimidasool-5-metanooli derivaadid (Hay et al., (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett., 9: 2237) ning *orto*- või *para*-aminobensüülatsetaalid. Võib kasutada speissereid, mis amiidsideme hüdrolüüsi ajal tsükliiseeruvad, nagu asendatud ja asendamata 4-aminovõihappe amiidid (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2: 223), sobivalt asendatud bitsüklo[2.2.1]- ja bitsüklo[2.2.2]-tuumasüsteemid (Storm et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94: 5815) ja 2-aminofenüülpropioonhappe amiidid (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55: 5867). ADC-des olevate kasulike ennastohverdavate speisserite näited on ka eemaldatavad amiini sisaldavad ravimid, mis on glütsiini α-asendis asendatud (Kingsbury. et al., J. Med. Chem., 1984, 27. 1447).

[0480] Ühes teostuses on speisserüksus allpool kujutatud hargnenud bis(hüdroksümetüül)-stüreeni (BHMS) ühik, mida saab liita paljudesse ravimitesse ja nendest vabastada.



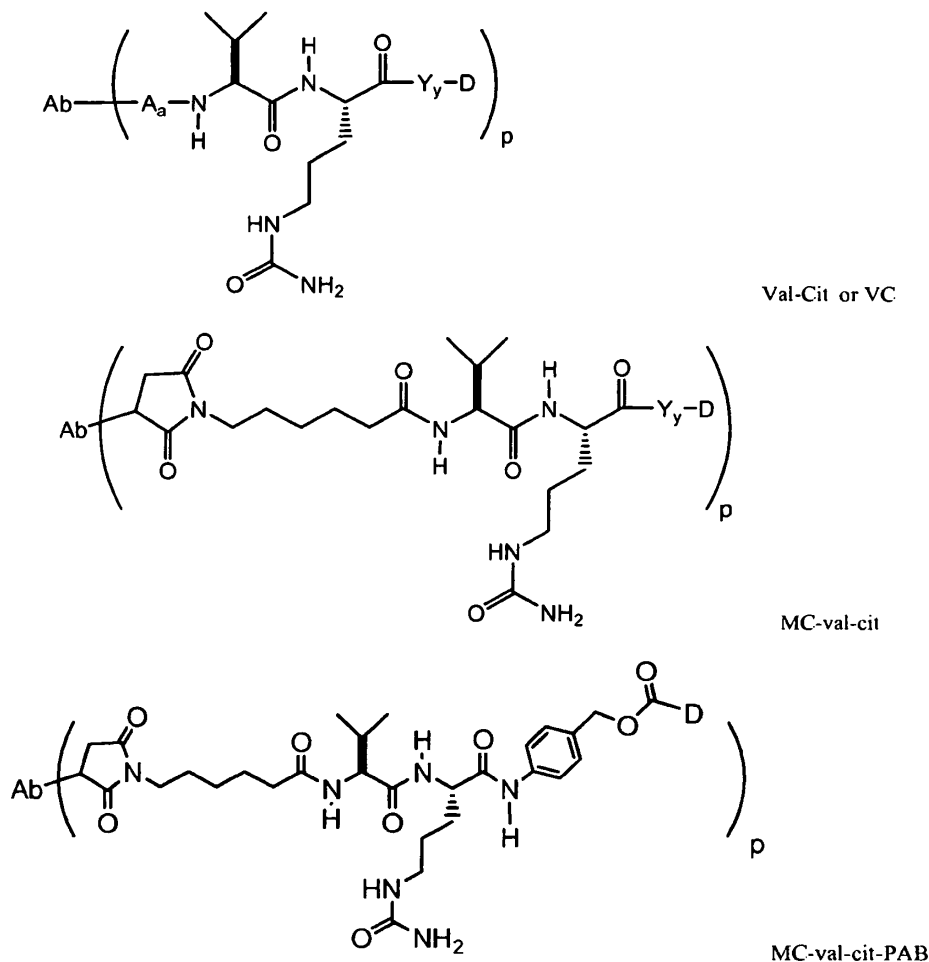
kus Q on (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküül-, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküül-, halogeno-, nitro- või tsüanorühm, m on täisarv vahemikus 0–4, n on 0 või 1 ja p on vahemikus 1 kuni umbes 20.

[0481] Järgmises teostuses võib linker L olla dendriiditüüpi linker, mis on mõeldud enam kui ühe ravimi-osamolekuli ühendamiseks antikehaga hargneva, multifunktsionaalse linker-osamolekuli kaudu (Sun et al., (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12: 2213-2215; Sun et al., (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11: 1761-1768). Dendriitsed linkerid võivad suurendada ravimi molaarset suhte antikeha suhtes, st selle koormust, ja see on seotud ADC tugevusega. Seega juhul, kui tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha kannab



ainult ühte reageerimisvõimelist tsüsteiini tiolrühma, võib dendriitse linkeri kaudu temaga ühendada suure arvu ravimi-osamolekule.

[0482] Näitlikud linkerkomponendid ja nende kombinatsioonid on näidatud allpool valemiga II ADC-de kontekstis:



[0483] Linkerkomponente, kaasa arvatud pikendusüksused, speisserid ja aminohappeüksused, võib sünteesida tehnika tasemest tuntud meetoditel, nagu need, mida on kirjeldatud US patenditaotluses 2005/0238649 A1.

## b. Näidslilikud ravimi-osamolekulid

### (1) Maitansiin ja maitansinoidid

[0484] Mõnedes teostustes sisaldab immunokonjugaat antikeha, mis on konjugeeritud ühe või mitme maitansinoidimolekuliga. Maitansinoidid on mitoosi inhibiitorid, mis toimivad tubuliini polümerisatsiooni inhibeerimise kaudu. Maitansiin eraldati esmakordselt Ida-

Aafrika põdsastaimest *Maytenus serrata* (US patent nr. 3896111). Seejärel avastati, et ka mõned bakterid toodavad maitansinoide, nagu maitansinool ja C-3 maitansinoolestrid (US patent nr. 4151042). Sünteetiline maitansinool ning selle derivaadid ja analoogid on avaldatud näiteks US patentides nr. 4137230, 4248870, 4256746, 4260608, 4265814, 4294757, 4307016, 4308268, 4308269, 4309428, 4313946, 4315929, 4317821, 4322348, 4331598, 4361650, 4364866, 4424219, 4450254, 4362663 ja 4371533.

[0485] Maitansinoidravimi-osamolekulid on antikeha ja ravimi konjugaatidele atraktiivsed ravimi-osamolekulid, kuna nad on (i) suhteliselt kättesaadavad valmistamiseks fermenteerimise või fermentatsiooniproductide keemilise modifitseerimise või derivaatimise abil, (ii) alluvad funktsionaalrühmadega derivaatimisele, sobivad antikehadega konjugeerimiseks disulfiid- ja mitte-disulfiidlinkerite kaudu, (iii) plasmas stabiilsed ja (iv) efektiivsed erinevate kasvajakuliinide vastu.

[0486] Maitansinoidravimi-osamolekulidega kasutamiseks sobivad maitansiiniühendid on tehnika tasemest hästi tuntud ja neid saab eraldada loodulikest allikatest tuntud meetodite abil või toota, kasutades geenitehnoloogia ja fermentatsiooni meetodeid ((US 6790952; US 2005/0170475; Yu et al., (2002) PNAS, 99: 7968-7973). Maitansinooli ja maitansinooli analooge võib valmistada ka sünteetiliselt tuntud meetodite abil.

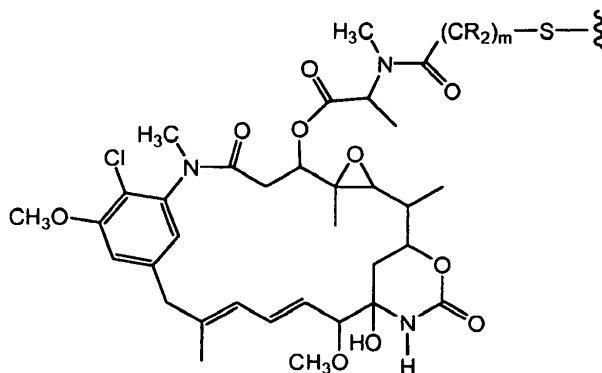
[0487] Näidislike maitansinoidravimi-osamolekulide hulka kuuluvad need, mis sisaldavad modifitseeritud aromaatsset tuuma, nagu C-19-dekloro- (US patent nr. 4256746) (valmistatud ansamütotsiini P2 redutseerimisel liitiumalumiiniumhüdriidiga), C-20-hüdroksü- (või C-20-demetüül-) +/-C-19-dekloro- (US patendid nr. 4361650 ja 4307016) (valmistatud demetüülimise teel, kasutades *Streptomyces*'t või *Actinomyces*'t, või dekloorimise teel, kasutades LAH) ja C-20-demetoksü-C-20-atsükloksü-(-OCOR) +/-dekloro- (US patent nr. 4294757) (valmistatud atsüülamise teel, kasutades atsüülkloriide) ja need, milles modifikatsioonid esinevad teistes asendites.

[0488] Näidislike maitansinoidravimi-osamolekulide hulka kuuluvad need, mis sisaldavad aromaatsset tuuma, nagu C-9-SH (US patent nr. 4424219) (valmistatud maitansinooli reaktsioonis  $H_2S$  või  $P_2S_5$ -ga), C-14-alkoksümetüül-(demetoksü/ $CH_2OR$ ) (US patent nr. 4331598), C-14-hüdroksümetüül- või atsüüloksümetüül- ( $CH_2OH$  või  $CH_2OAc$ ) (US patent nr. 4450254) (valmistatud *Nocardia*'st), C-15-hüdroksü/atsüüloksü- (US patent nr. 4364866) (valmistatud maitansinooli konversioonil *Streptomyces*'e abil), C-15-metoksü- (US patendid nr. 4313946 ja 4315929) (eraldatud *Trewia nudiflora*'st), C-18-N-demetüül- (US patendid nr.

4362663 ja 4322348) (valmistatud maitansinooli demetüülimisel *Streptomyces*'e abil) ja 4,5-desoksü- (US patent nr. 4371533) (valmistatud maitansinooli redutseerimisel titaantrikloriidi/LAH-ga).

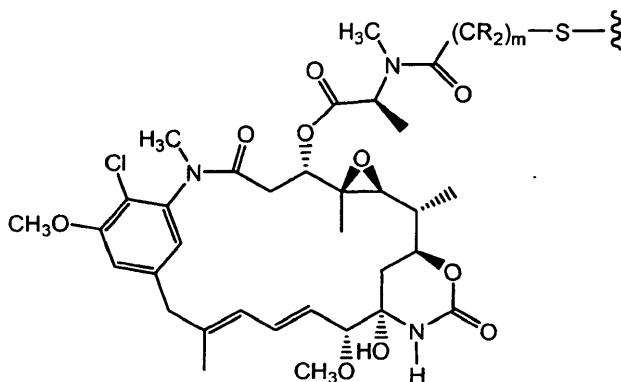
[0489] On teada, et paljud maitansiiniühendite asendid on kasulikud sideme moodustamiseks, sõltuvalt sideme tüübist. Näiteks on estersideme moodustamiseks sobivad asendid C-3, mis sisaldab hüdroksüülrühma, C-14, mis on modifitseeritud hüdroksümetüülrühmaga, ja C-20, mis sisaldab hüdroksüülrühma (US 5208020, US RE39151, US 6913748, US 7368565, US 2006/0167245, US 2007/0037972).

[0490] Maitansinoidravimi-osamolekulide hulka kuuluvad ühendid struktuuriga

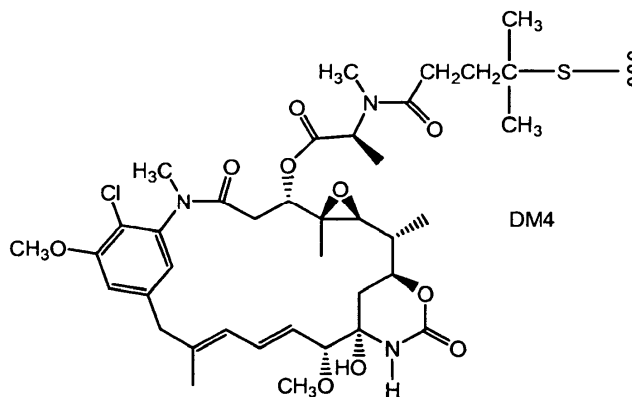
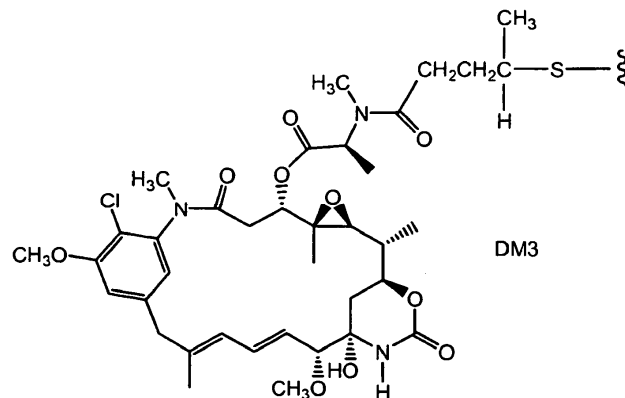
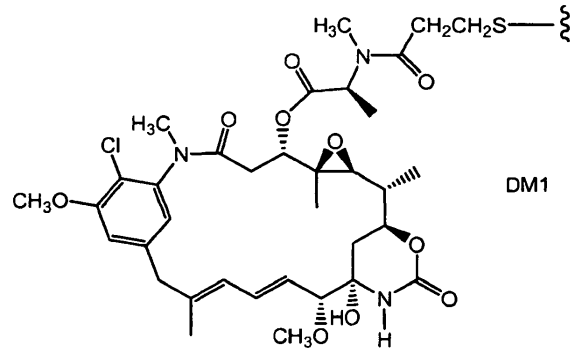


kus laineline joon näitab maitansinoidravimi-osamolekuli väävliaatomi kovalentset sidumist ADC linkeriga. R võib olla sõltumatult H või (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alküülrühm. Amiidrühma väävliaatomi ühendav alküleenahel võib olla metüül-, etüül- või propüülrühm, st m on 1, 2 või 3 (US 633410; US 5208020; US 7276497; Chari et al., (1992) *Cancer Res.*, 52: 127-131; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 8618-8623).

[0491] Leiutisekohaste ühendite puhul peetakse silmas kõiki maitansinoidravimi-osamolekuli stereoisomeere, st kõiki D kiraalsete süsinikuaatomite juures olevate R- ja S-konfiguratsioonide kombinatsioone. Ühes teostuses on maitansinoidravimi-osamolekuli stereokeemiline konfiguratsioon järgmine:

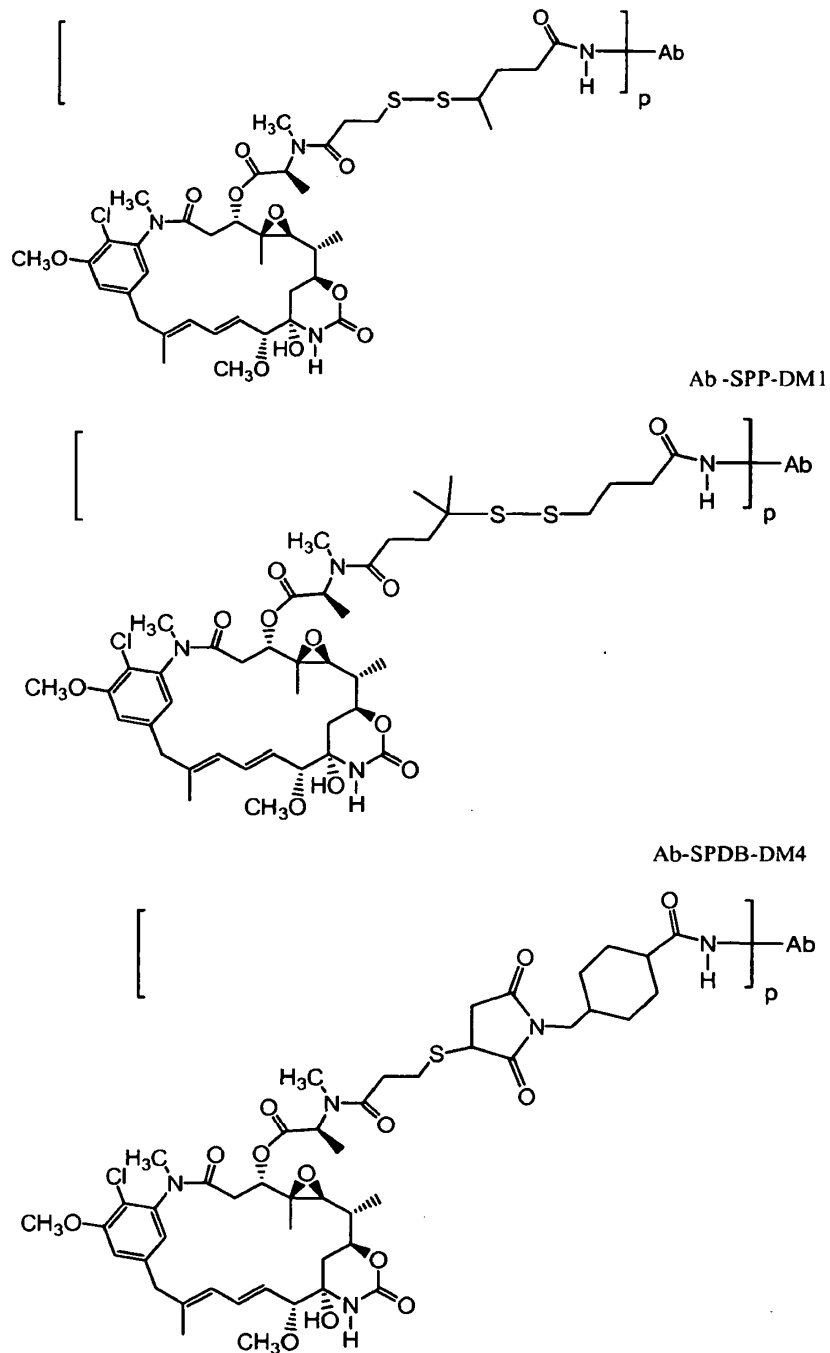


[0492] Maitansinoidravimi-osamolekulide näidisteostuste hulka kuuluvad DM1, DM3 ja DM4, mille struktuurid on järgmised:

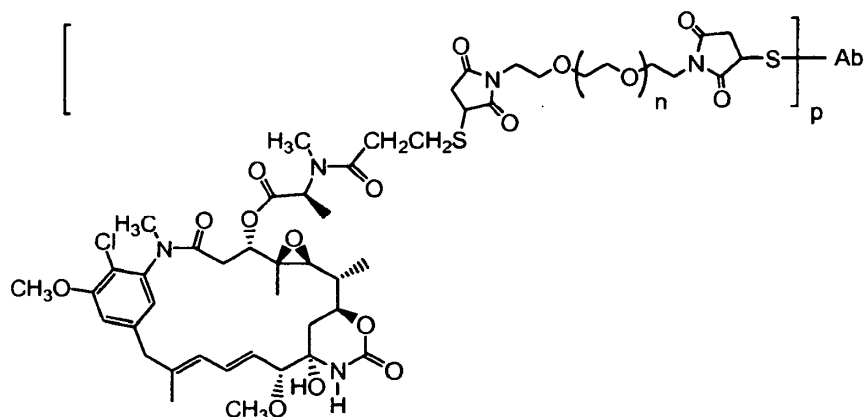


kus laineline joon näitab ravimi väävliaatomi kovalentset sidumist antikeha ja ravimi konjugaadi linkeriga (L) (WO 2005/037992, US 2005/0276812 A1).

[0493] Teised maitansinoidravimi ja antikeha näidiskonjugaadid on järgmiste struktuuride ja tähistega (kus Ab on antikeha ja p on 1 kuni umbes 8):



[0494] Antikeha ja ravimi näidiskonjugaadid, kus DM1 on seotud antikeha tiolrühmaga BMPEO linkeri kaudu, on järgmise struktuuri ja lühendiga:



kus Ab on antikeha, n on 0, 1 või 2 ning p on 1, 2, 3 või 4.

[0495] Maitansinoide sisaldavad immunokonjugaadid, nende valmistamine ja nende terapeutiline kasutamine on avaldatud näiteks artiklis: Erickson, et al., (2006) *Cancer Res.*, 66(8): 4426-4433, ning US patentides nr. 5208020, 5416064, US 2005/0276812 A1 ja Euroopa patendis EP 0 425 235 B1, milles avaldatu on siia liidetud viitena.

[0496] Antikeha ja maitansinoidi konjugaadid valmistatakse antikeha keemilisel sidumisel maitansinoidmolekuliga, vähendamata seejuures oluliselt antikeha või maitansinoidmolekuli bioloogilist aktiivsust, vt. näiteks US patenti nr. 5208020 (milles avaldatud on siia liidetud viitena). Maitansinoide võib sünteesida tuntud meetoditel või eraldada looduslikest allikatest. Sobivad maitansinoidid, näiteks maitansinool ja maitansinooli analoogid, milles maitansinoolimolekuli aromaadne tuum on modifitseeritud või mis on mõnes teises asendis modifitseeritud, nagu maitansinooli mitmesugused estrid, on avaldatud näiteks US patendis nr. 5208020 ning teistes siin eespool nimetatud patentides ja nendest erinevates publikatsioonides.

[0497] Antikeha ja maitansinoidi konjugaatide valmistamiseks on tehnika tasemest teada palju siduvaid rühmi, kaasa arvatud need, mis on avaldatud US patendis nr. 5208020 või patendis EP 0 425 235 B1, artiklis Chari et al., *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992) ning US patendis 2005/016993 A1, milles sisalduv on siia liidetud viitena. Antikeha ja maitansinoidi konjugaate, mis sisaldavad linkerkomponenti SMCC, võib valmistada nii, nagu on avaldatud allikas US 2005/0276812 A1, "Antibody-drug conjugates and Methods." Linkerid hõlmavad disulfiidrühmi, tioeeterrühmi, happelabiilseid rühmi, fotolabiilseid rühmi, peptidaaside suhtes labiilseid rühmi või esteraaside suhtes labiilseid rühmi, nagu on avaldatud eespool määratletud patentides. Siin on kirjeldatud ja näitlikustatud ka täiendavaid linkereid.

[0498] Antikeha ja maitansinoidi konjugaate võib valmistada, kasutades erinevaid bifunktsionaalseid valke sidestavaid aineid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditio)propionaat (SPDP), suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaad (SMCC), iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladiipimidaat HCl), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehüüdid (nagu glutaaraldehüüd), bis-asidoühendid (nagu (p-asidobensoüül)heksaandiamiin), bis-diasooniumderivaadid (nagu bis-(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluen-2,6-diisotsüanaat) ja bis-aktiivsed fluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Teatud teostustes on disulfiidsideme saamiseks kasutatav sidestav aine N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditio)propionaat (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)) või N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüülditio)pentanoaat (SPP).

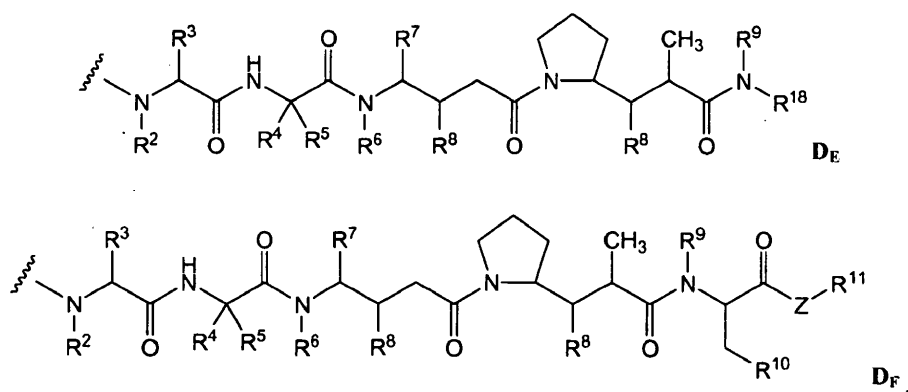
[0499] Linkeri võib maitansinoidimolekuliga siduda erinevates asendites, sõltuvalt sideme tüübist. Näiteks estersideme võib moodustada reaktsioonis hüdroksüülrühmaga, kasutades tavapäraseid sidestamise meetodeid. Reaktsioon võib toimuda asendis C-3, mis sisaldab hüdroksüülrühma, asendis C-14, mis on modifitseeritud hüdroksümetüülrühmaga, asendis C-15, mis on modifitseeritud hüdroksüülrühmaga, ja asendis C-20, mis sisaldab hüdroksüülrühma. Ühes teostuses moodustatakse side maitansinooli või maitansinooli analoogi asendis C-3.

## *(2) Auristatiinid ja dolastatiinid*

[0500] Mõnedes teostustes sisaldab immunokonjugaat antikeha, mis on konjugeeritud dolastatiini või dolastatiini peptiidanalooži või derivaadiga, näiteks auristatiiniga (US patendid nr. 5635483, 5780588). On näidatud, et dolastatiinid ja auristatiinid häirivad mikrotoobulite dünaamikat, GTP hüdrolyüüsi ning tuuma ja raku jagunemist (Woyke et al., (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 45(12): 3580-3584) ning on vähivastase (US patent nr. 5663149) ja fungitsiidse toimega (Pettit et al., (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 2961-2965). Dolastatiin- või auristatiinravimi-osamolekuli või siduda antikehaga peptiidravimi-osamolekuli N-(amino)terminuse või C-(karboksü)terminuse kaudu (WO 02/088172).

[0501] Auristatiini näidisteostuste hulka kuuluvad N-terminuse kaudu seotud monometüülauristatiinravimi-osamolekulid DE ja DF (US 2005/0238649, avaldatud ettekandes: Senter et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, kd. 45, lühikokkuvõtte nr 623, esitatud 28. märtsil 2004, ning selles avaldatu on siia liidetud kogu täielikkuses).

[0502] Peptiidravimi-osamolekuli võib valida alltoodud valemite D<sub>E</sub> ja D<sub>F</sub> hulgast:



kus laineline joon molekulides D<sub>E</sub> ja D<sub>F</sub> näitab antikehaga või antikeha-linkerkomponnediga kovalentse sidumise saiti, ning igas asendis tehakse üksteisest sõltumatult järgmised valikud:

R<sup>2</sup> valitakse H ja (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühma hulgast;

R<sup>3</sup> valitakse H, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühma, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)karbotsükli, arüülrühma, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülarüülrühma, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküül((C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)karbotsükli), (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)heterotsükli ja (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküül((C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)heterotsükli) hulgast;

R<sup>4</sup> valitakse H, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühma, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)karbotsükli, arüülrühma, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülarüülrühma, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküül((C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)karbotsükli), (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)heterotsükli ja (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküül((C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)heterotsükli) hulgast;

R<sup>5</sup> valitakse H ja metüülrühma hulgast;

või R<sup>4</sup> ja R<sup>5</sup> moodustavad ühiselt karbotsüklilise tuuma valemiga -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>-, kus R<sup>a</sup> ja R<sup>b</sup> valitakse teineteisest sõltumatult H, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühma ja (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)karbotsükli hulgast ning n valitakse 2, 3, 4, 5 ja 6 hulgast;

R<sup>6</sup> valitakse H ja (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühma hulgast;

R<sup>7</sup> valitakse H, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühma, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)karbotsükli, arüülrühma, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülarüülrühma, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküül((C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)karbotsükli), (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)heterotsükli ja (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküül((C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)heterotsükli) hulgast;

iga R<sup>8</sup> valitakse sõltumatult H, OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühma, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)karbotsükli ja O-((C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküül)rühma hulgast;

R<sup>9</sup> valitakse H ja (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühma hulgast;

R<sup>10</sup> valitakse arüülrühma või (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)heterotsükli hulgast;

Z on O, S, NH või NR<sup>12</sup>, kus R<sup>12</sup> on (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alküülrühm;



$R^{11}$  valitakse H,  $(C_1-C_{20})$ alküülrühma, arüülrühma,  $(C_3-C_8)$ heterotsükli,  $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ , või  $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$  hulgast;

m on täisarv vahemikus 1-1000;

$R^{13}$  on  $(C_2-C_8)$ alküülrühm;

$R^{14}$  on H või  $(1-C_8)$ alküülrühm;

igal esinemise juhul on  $R^{15}$  sõltumatult H, COOH,  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ ,  $-(CH_2)_n-SO_3H$  või  $-(CH_2)_n-SO-(C_1-C_8)$ alküülrühm;

igal esinemise juhul on  $R^{16}$  sõltumatult H,  $(C_1-C_8)$ alküülrühm või  $-(CH_2)_n-COOH$ ;

$R^{18}$  valitakse  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arüülrühma,  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-((C_3-C_8)$ heterotsükli) ja  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-((C_3-C_8)$ karbotsükli) hulgast; ja

n on täisarv vahemikus 0 kuni 6.

[0503] Ühes teostuses on  $R^3$ ,  $R^4$  ja  $R^7$  üksteisest sõltumatult isopropüül- või *sec*-butüülrühm ja  $R^5$  on H või metüülrühm. Näidisteostuses on  $R^3$  ja  $R^4$  mõlemad isopropüülrühmad,  $R^5$  on H ja  $R^7$  on *sec*-butüülrühm.

[0504] Järgmises teostuses on  $R^2$  ja  $R^6$  mõlemad metüülrühmad ning  $R^9$  on H.

[0505] Järgmises teostuses on  $R^8$  igal oma esinemise juhul  $-OCH_3$ .

[0506] Näidisteostuses on  $R^3$  ja  $R^4$  mõlemad isopropüülrühmad,  $R^2$  ja  $R^6$  on mõlemad metüülrühmad,  $R^5$  on H,  $R^7$  on *sec*-butüülrühm ja  $R^8$  on igal oma esinemise juhul  $-OCH_3$  ning  $R^9$  on H.

[0507] Ühes teostuses on Z -O- või -NH-.

[0508] Ühes teostuses on  $R^{10}$  arüülrühm.

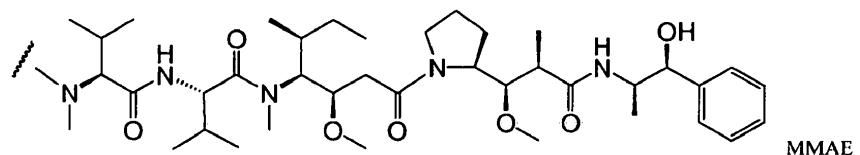
[0509] Näidisteostuses on  $R^{10}$  fenüülrühm.

[0510] Näidisteostuses, kus Z on -O-, on  $R^{11}$  -H, metüül- või *t*-butüülrühm.

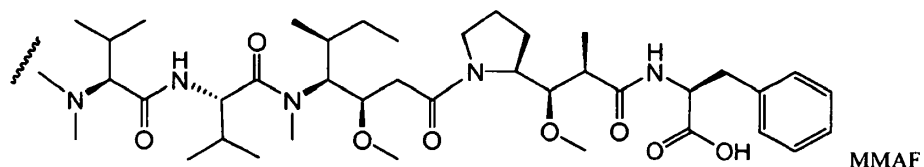
[0511] Ühes teostuses, kus Z on -NH, on  $R^{11}$   $-CH(R^{15})_2$ , kusjuures  $R^{15}$  on  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$  ja  $R^{16}$  on  $-(C_1-C_8)$ alküülrühm või  $-(CH_2)_n-COOH$ .

[0512] Teises teostuses, kus Z on -NH, on  $R^{11}$   $-CH(R^{15})_2$ , kusjuures  $R^{15}$  on  $-(CH_2)_n-SO)H$ .

[0513] Auristatiini näidisteostus valemiga  $D_E$  on MMAE, kus laineline joon näitab kovalentset sidet antikeha ja ravimi konjugaadi linkeriga (L)

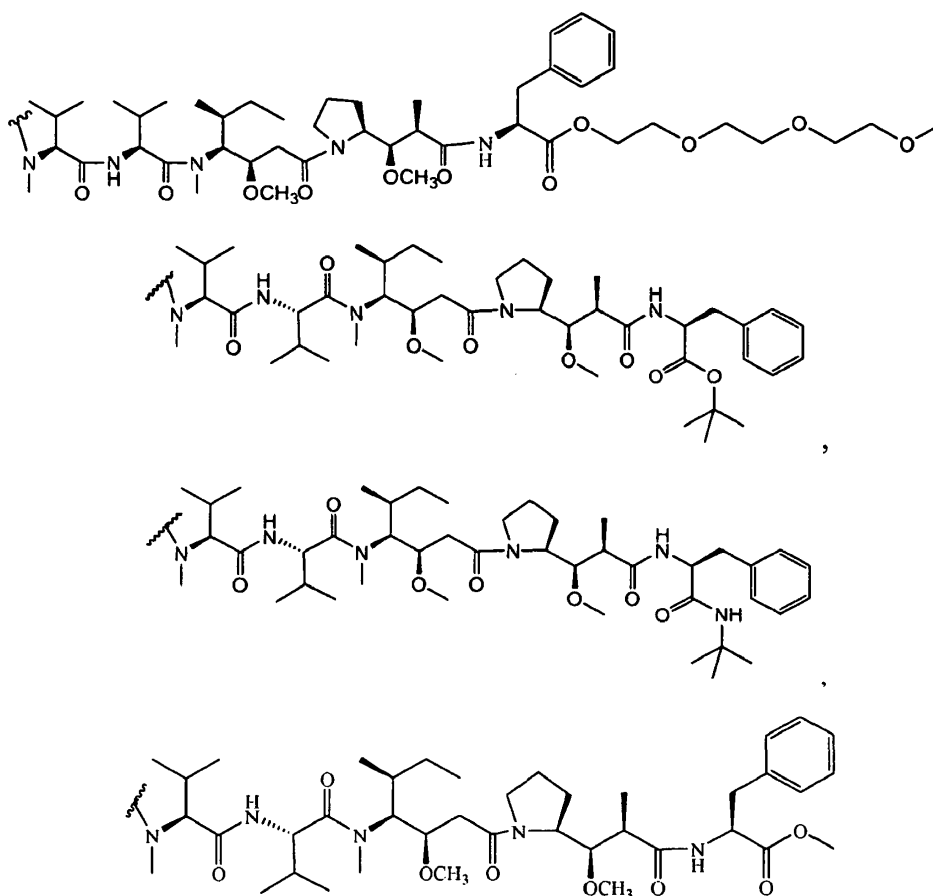


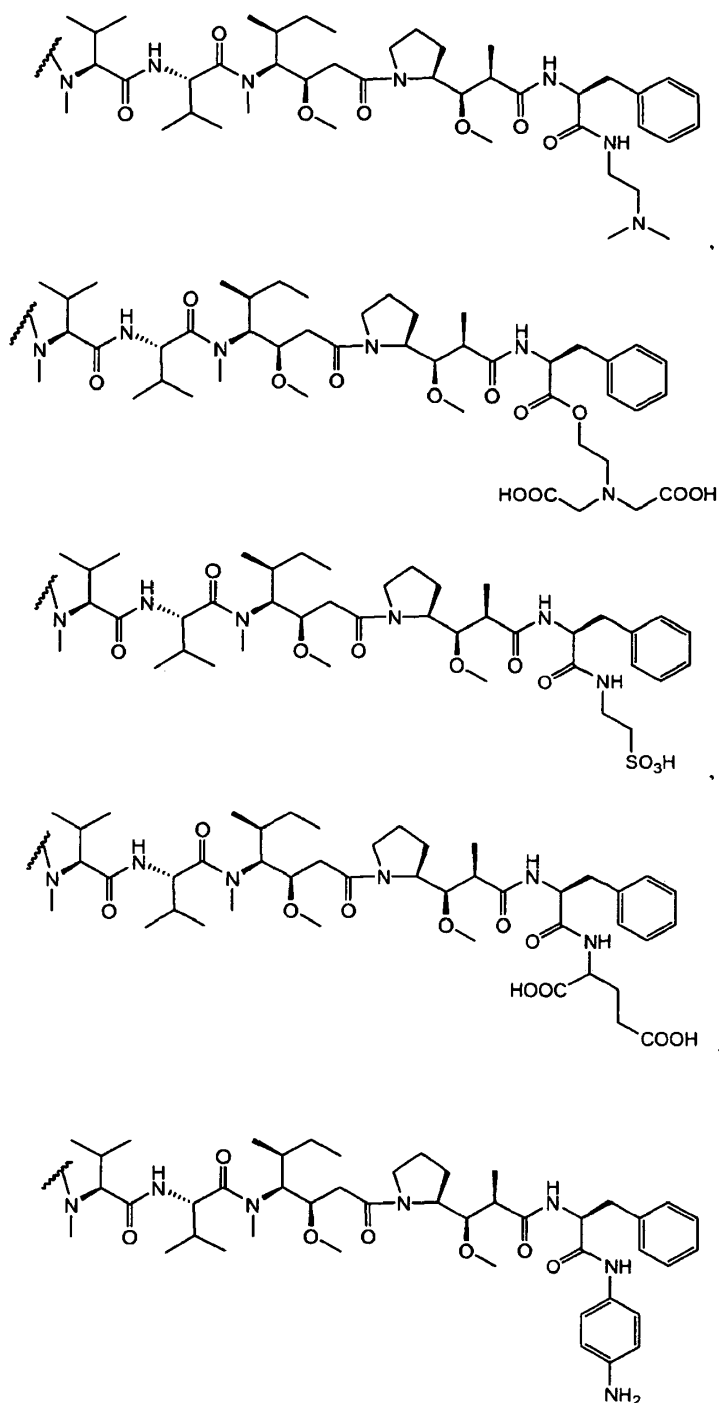
[0514] Auristatiini näidisteostus valemiga  $D_F$  on MMAF, kus laineline joon näitab kovalentset sidet antikeha ja ravimi konjugaadi linkeriga (L) (vt. US 2005/0238649 ja Doronina et al., (2006) Bioconjugate Chem., 17: 114-124)



[0515] Teiste näidisteostuste hulka kuuluvad monometüülvaliinühendid, mis sisaldavad auristatiinravimi-osamolekuli C-terminuses fenüülalaniini karboksü-modifikatsiooni (WO 2007/008848), ja monometüülvaliinühendid, mis sisaldavad pentapeptiid auristatiinravimi-osamolekuli C-terminuses fenüülalaniini külghela modifikatsioone (WO 2007/008603).

[0516] Teiste ravimi-osamolekulide hulka kuuluvad MMAF derivaadid, kus laineline joon näitab kovalentset sidet antikeha ja ravimi konjugaadi linkeriga (L)



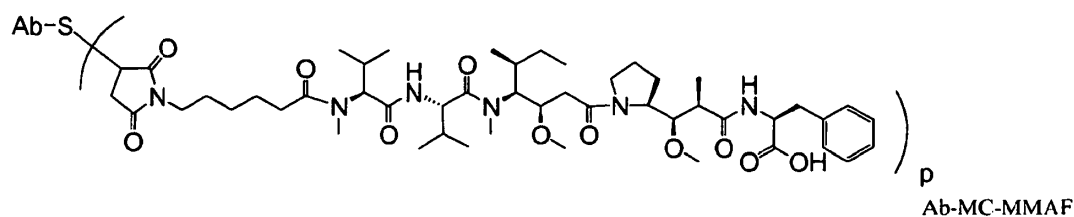
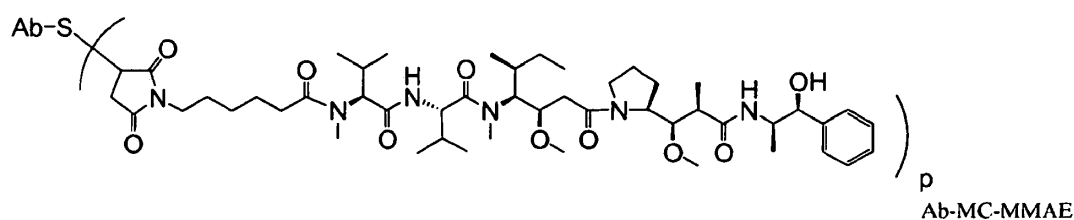
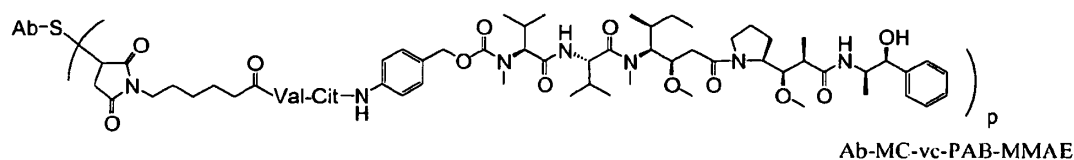
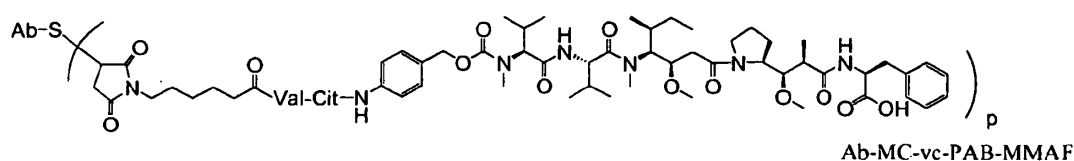


ja

[0517] Ühes eripäras võivad hüdrofiilsed rühmad, kaasa arvatud, kuid nendega mitte piiratud, eespool näidatud trietüleenglükoollestrid (TEG), olla ravimi-osamolekuliga seotud R<sup>11</sup> juures. Olemata seotud ühegi konkreetse teooriaga, osalevad hüdrofiilsed rühmad ravimi-osamolekuli internaliseerimises ja mitteagglomeriseerumises.

[0518] Valemiga I ADC-de näidisteostusi, mis sisaldavad auristatiini/dolastiini või nende derivaate, on kirjeldatud allikates US 2005/0238649 ja Doronina et al., (2006) Bioconjugate Chem., 17: 114-124, mis on liidetud siia viidetena. Valemiga I ADC-de näidisteostused, mis

hõlmavad MMAE või MMAF ja erinevaid linkerkomponente, on järgmiste struktuuride ja lühenditega (kus „Ab” on antikeha, p on 1 kuni umbes 8, „Val-Cit” või „vc” on valiini-tsitulliini dipeptiid ja „S” on väevliaatom). Tuleb märkida, et teatud väevliga seotud ADC struktuuri kirjeldustes tähistatakse antikeha kui „Ab-S” näitamaks üksnes väevlisideme olemasolu ning mitte näitamaks, et konkreetne väevliaatom kannab paljusid linkeri-ravimosamolekule. Järgnevates struktuurides võib vasakpoolsed sulud paigutada ka väevliaatomist vasakule, Ab ja S vahele, mis oleks kogu siin kirjeldatud leiutisekohaste ADC-de samaväärne kirjeldus.



[0519] Valemiga I ADC-de näidisteostused, mis hõlmavad MMAF ja erinevaid linkerkomponente, hõlmavad täiendavalt Ab-MC-PAB-MMAF ja Ab-PAB-MMAF. Huvitava kombel on näidatud, et immunokonjugaadid, mis sisaldavad antikehaga sellise linkeri kaudu seotud MMAF, mis ei ole proteolüütiliselt lõigatav, omavad aktiivsust, mis on võrreldav nende immunokonjugaatide aktiivsusega, mis sisaldavad MMAF, mis on antikehaga seotud proteolüütiliselt lõigatava linkeri kaudu, vt. Doronina et al., (2006) Bioconjugate Chem., 17: 114-124. Sellistel juhtudel arvatakse, et ravimi vabanemine rakus toimub antikeha degradeerumise tõttu.

[0520] Tavaliselt saab peptiidipõhiseid ravimi-osamolekule valmistada, moodustades kahe või enama aminohappe ja/või peptiidfragmendi vahele peptiidsideme. Selliseid peptiidside-

meid saab valmistada näiteks vedelfaasilise sünteesimeetodi järgi (vt. E. Schröder, Lübke, "The Peptides", kd. 1, lk. 76-36, 1965, Academic Press), mis on peptiidikeemia vallas hästi tuntud. Auristatiini-/dolastatiiniravimi-osamolekule võib valmistada järgmistel meetoditel: US 2005-0238649 A1; US patent nr. 5635483; US patent nr. 5780588; Pettit et al., (1989) J. Am. Chem. Soc., 111: 5463-5465; Pettit et al., (1999) 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; Doronina, (2003) Nat. Biotechnol., 21(7): 778-784.

[0521] Auristatiini/dolastatiiniravimi-osamolekule valemiga D<sub>F</sub>, nagu MMAF ja selle derivaadid, võib valmistada eelkõige meetoditel, mida on kirjeldatud allikates: US 2005-0238649 A1 ja Doronina et al., (2006) Bioconjugate Chem, 17: 114-124. Auristatiini/dolastatiiniravimi-osamolekule valemiga D<sub>E</sub>, nagu MMAE ja selle derivaadid, võib valmistada meetoditel, mida on kirjeldanud Doronina jt. (2003) Nat. Biotech., 21: 778-784. Ravimi-linkeri osamolekule MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF ja MC-vc-PAB-MMAE võib mugavalt sünteesida tavameetoditel, näiteks nii, nagu on kirjeldatud allikates: Doronina et al., (2003) Nat. Biotech., 21: 778-784, ja patenditaotluse publikatsioonis US 2005/0238649 A1, ning konjugeerida siis huvialuse antikehaga.

### (3) Kaliheamütsiin

[0522] Järgmistes teostustes sisaldab immunokonjugaat antikeha, mis on konjugeeritud ühe või mitme kaliheamütsiini molekuliga. Antibiootikumide kaliheamütsiiniperekond on submikromolaarsetes kontsentratsioonides võimeline tekitama kaheaahelalise DNA katkemisi. Kaliheamütsiiniperekonna konjugaatide valmistamist vt. US patentidest nr. 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (mis kõik kuuluvad firmale American Cyanamid Company). Kaliheamütsiini struktuursete analoogide hulka, mida võib kasutada, kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud,  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-atsetüül- $\gamma_1^1$ , PSAG ja  $\theta_1^1$  (Hinman et al., Cancer Research, 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research, 58: 2925-2928 (1998), ning eelnimetatud firma American Cyanamid patendid). Teine kasvajakavastane ravim, millega antikeha saab konjugeerida, on QFA, mis on antifolaat. Nii kaliheamütsiin kui QFA omavad rakusiseseid toimimissaitte ja ei läbi kergesti plasmamembraani. Seetõttu võimendab nende ainete omastamine rakkudes antikeha-vahendatud internaliseerumise teel tugevasti nende tsütotoksilist toimet.

### c. Teised tsütotoksilised ained

[0523] Teiste kasvjavastaste ainete hulka, mida saab antikehaga konjugeerida, kuuluvad BCNU, streptosotiin, vinkristiin ja 5-fluorouratsüül, ainete perekond, mida ühiselt nimetatakse LL-E33288 kompleksiks ja mida on kirjeldatud US patentides nr. 5053394 ja 5770710, samuti esperamütsiinid (US patent nr. 5877296).

[0524] Ensümaatiliseltselt aktiivsete toksiinide ja nende fragmentide hulka, mida saab kasutada, kuuluvad difteeriatoksiini A ahel, difteeriatoksiini mittesiduvad aktiivsed fragmendid, ekso-toksiini A ahel (*Pseudomonas aeruginosa*'st), ritsiini A ahel, abriini A ahel, modetsiini A ahel, alfa-sartsiin, *Aleurites fordii* valgud, dantiinvalgud, *Phytolaca americana* valgud (PAPI, PAPII, and PAP-S), *Momordica charantia* inhibiitor, kurtsiin, krotiin, *Saponaria officinalis*'e inhibiitor, geloniin, mitogelliin, restriktotsiin, fenomütsiin, enomütsiin ja triko-tetseenid, vt. näiteks WO 93/21232, mis avaldati 28. oktoobril 1993.

[0525] Leiutises peetakse silmas ka immunokonjugaate, mis moodustatakse antikeha ja nukleolüütilise aktiivsusega ühendi (näiteks ribonukleaasi või DNA endonukleaasi, nagu desoksüribonukleaas (DNAasi)) vahel.

[0526] Teatud teostustes võib immunokonjugaat sisaldada tugevalt radioaktiivset aatomit. Radiokonjugeeritud antikehade tootmiseks on saadaval erinevaid radioaktiivseid isotoope. Nende näidete hulka kuuluvad At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> ja Lu radioaktiivsed isotoobid. Kui immunokonjugaati kasutatakse detekteerimiseks, võib see sisaldada stsintigraafilisteks uuringuteks sobivat radioaktiivset aatomit, näiteks tc<sup>99m</sup> või I<sup>123</sup>, või spin-märgist tuumamagnetresonants- (NMR) kuvamiseks (tuntud ka kui magnetresonants-kuvamine, *magnetic resonance imaging*, mri), nagu jood-123, jood-131, indium-111, fluor-19, süsinik-13, lämmastik-15, hapnik-17, gadoliinium, mangaan või raud.

[0527] Radioaktiivseid ja muid märgiseid võib immunokonjugaadi koostisse liita tuntud viisidel. Näiteks peptiidi võib saada biosünteesi või keemilise sünteesi teel, kasutades sobivaid aminohapete eellasmolekule, mis sisaldavad vesiniku asemel näiteks fluor-19. Selliseid märgiseid nagu tc<sup>99m</sup> või I<sup>123</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup> ja In<sup>111</sup>, saab kinnitada peptiidis oleva tsüsteiini-jäägi kaudu. Ütrium-90 saab kinnitada lüsiinijäägi kaudu. Jood-123 immunokonjugaadi koostisse liitmiseks võib kasutada IODOGEN meetodit (Fraker et al., (1978) Biochem. Biophys.

Res. Commun., 80: 49-57). Teisi meetodeid on detailselt kirjeldatud teoses "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989).

[0528] Teatud teostustes võib immunokonjugaat sisaldada antikeha, mis on konjugeeritud eelravimit aktiveeriva ensüümiga, mis konverteerib eelravimi (näiteks kemoterapeutilise peptidüülühendi, vt. WO 81/01145) aktiivseks ravimiks nagu vähivastane ravim. Sellised immunokonjugaadid on kasulikud antikeha-sõltuva ensüümivahendatud eelravimiteraapiaks (*antibody-dependent enzyme-mediated prodrug therapy*, „ADEPT“). Ensüümide hulka, mida võib antikehaga konjugeerida, kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, leeliselised fosfataasid, mis on kasulikud fosfaati sisaldavate eelravimite konverteerimiseks vabadeks ravimiteks, arüülsulfataasid, mis on kasulikud sulfaati sisaldavate eelravimite konverteerimiseks vabadeks ravimiteks, tsütosiindeaminaas, mis on kasulik mittetoksilise 5-fluorouratsüüli konverteerimiseks vähivastaseks ravimiks 5-fluorouratsüülis, proteaasid, nagu *Serratia* proteaas, termolüsiin, subtilisiin, karboksüpeptidaasid ja katepsiinid (nagu katepsiinid B ja L), mis on kasulikud peptiide sisaldavate eelravimite konverteerimiseks vabadeks ravimiteks, D-alanüülkarboksüpeptidaasid, mis on kasulikud D-aminohapete asendajate konverteerimiseks, süsivesikuid lõikavad ensüümid, nagu  $\beta$ -galaktosidaas ja neuraminidaas, mis on kasulikud glükosüülitud eelravimite konverteerimiseks vabadeks ravimiteks,  $\beta$ -laktamaas, mis on kasulik  $\beta$ -laktaamidega derivaaditud ravimite konverteerimiseks vabadeks ravimiteks, ja pentisilliinamidaasid, nagu pentisilliin V amidaas ja pentisilliin G amidaas, mis on kasulikud nende ravimite konverteerimiseks vabadeks ravimiteks, mis on amiini lämmastiku juures derivaaditud vastavalt fenoksüatsetüülrühma või fenüülatsetüülrühmaga. Ensüüme võib antikehadega kovalentselt siduda rekombinantse DNA meetodite abil, mis on tehnika tasemest hästi tuntud, vt. näiteks Neuberger et al., Nature, 312: 604-608 (1984).

#### **d. Ravimikoormus**

[0529] Ravimikoormust tähistab  $p$  – ravimi-osamolekulide keskmine arv antikeha kohta molekulis valemiga I. Ravimikoormus võib olla vahemikus 1 kuni 20 ravimi-osamolekuli (D) antikeha kohta. ADC-d valemiga I hõlmavad antikehade kogusid, mis on konjugeeritud 1 kuni 20 ravimi-osamolekuliga. Ravimi-osamolekulide keskmist arvu antikeha kohta konjugeerimisreaktsioonides saadud ADC preparaatides võib iseloomustada tavapäraste vahendite abil, nagu massispektroskoopia, ELISA test ja HPLC. Samuti võib määrata ADC kvantita-

tiivse jaotumise  $p$  terminites. Mõnedel juhtudel võib kindla  $p$  väärtusega homogeense ADC lahutamise ja puhastamise teiste ravimikoormustega ADC-dest ja selle iseloomustamise saavutada selliste vahendite abil nagu HPLC või elektroforees. Seega võivad valemiga I antikeha ja ravimi konjugaatide farmatseutilised preparaadid olla nende konjugaatide heterogeensed segud, kus antikehad on seotud 1, 2, 3, 4 või enama ravimi-osamolekuliuga.

[0530] Mõnedes antikeha ja ravimi konjugaatides võib  $p$  olla piiratud antikeha sidumissaitide arvuga. Näiteks kui sidumine toimub tsüsteiini tiolrühma kaudu, nagu eespool toodud näidisteostustes, võib antikeha sisaldada ainult ühte või mõnda tsüsteiini tiolrühma või võib sisaldada ainult ühte või mõnda piisavalt reageerimisvõimelist tiolrühma, mille kaudu saab linkeri siduda. Teatud teostustes võib suurem ravimikoormus, näiteks  $p > 5$ , põhjustada teatud antikeha ja ravimi konjugaatide agregatsiooni, lahustumatust, toksilisust või rakkude läbimisevõime kadumist. Teatud teostustes on ravimikoormus leiutisekohase ADSC kohta 1 kuni umbes 8, umbes 2 kuni 6 või umbes 3 kuni 5. Teatud ADC-de puhul on tõepoolest näidatud, et ravimi-osamolekulide optimaalne suhe antikeha kohta võib olla alla 8 ning see võib olla umbes 2 kuni 5, vt. US 2005-0238549 A1.

[0531] Teatud teostustes konjugeerub konjugeerimisreaktsioonis antikehaga teoreetilisest maksimumist vähem ravimi-osamolekule. Antikeha võib näiteks sisaldada lüsiinjääke, mis ei reageeri ravimi-linkeri vaheühendi või linker-reagendiga, nagu allpool on arutletud. Üldiselt ei sisalda antikehad palju vabasid ja reageerimisvõimelisi tsüsteiini tiolrühmi, mida saab siduda ravimi-osamolekuliga, enamik antikehades olevaid tsüsteiini tiolijääke eksisteerib disulfiidsildadena. Teatud teostustes võib reageerimisvõimeliste tsüsteiini tiolrühmade tekitamiseks redutseerida antikeha redutseeriva ainega, nagu ditiotreitol (DTT) või trikarbonüületüülfosfiin (TCEP), kas osaliselt või täielikult redutseerivates tingimustes. Teatud tingimustes rakendatakse antikehale denatureerivaid tingimusi reageerimisvõimeliste nukleofiilsete rühmade, nagu lüsiin või tsüsteiin, esiletoomiseks.

[0532] ADC koormuse (ravimi/antikeha suhte) võib kontrolli all hoida erinevatel viisidel, näiteks (i) ravimi-linkeri vaheühendi või linkerreagendi molaarse liia piiramisega antikeha suhtes, (ii) konjugeerimisreaktsiooni aja või temperatuuri piiramisega ja (iii) osaliste või piiratud redutseerivate tingimustega tsüsteiini tiolrühma modifitseerimisel.

[0533] On mõistetav, et kui üks või mitu nukleofiilset rühma reageerib ravimi-linkeri vaheühendi või linkerreagendiga ja seejärel ravimi-osamolekulreagendiga, on selle tulemusena saadav produkt segu ADC ühenditest, mis sisaldavad ühte või mitut antikehaga seotud



ravimi-osamolekuli. Ravimimolekulide keskmise arvu antikehamolekuli kohta segus võib arvutada duaalse ELISA antikehatesti abil, mis on spetsiifiline nii antikeha kui ravimi suhtes. Segus olevad individuaalsed ADC molekulid võib identifitseerida massispektroskoopia meetodil ja lahutada HPLC meetodil, näiteks hüdrofoobsete interaktsioonide kromatograafia abil (vt. näiteks: McDonagh et al., (2006) Prot. Engr. Design & Selection, 19(7): 299-307; Hamblett et al., (2004) Clin. Cancer Res., 10: 7063-7070; Hamblett. K. J. et al., "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," kokkuvõte nr. 624, American Association for Cancer Research, 2004 aastakonverents, 27-31. märts 2004, Proceedings of the AACR, kd. 45, märts 2004; Alley S. C. et al., "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," kokkuvõte nr. 627, American Association for Cancer Research, 2004 aastakonverents, 27-31. märts 2004, Proceedings of the AACR, kd. 45, märts 2004). Teatud teostustes võib ühe koormusväärtusega homogeense ADC eraldada konjugeerimissegust kas elektroforeesi või kromatograafia meetodil.

#### **e. Immunokonjugaatide konkreetsed valmistamismeetodid**

[0534] Valemiga I ADC võib valmistada mitmel viisil, kasutades eriala asjatundjale tuntud reaktsioone, tingimusi ja reagente, kaasa arvatud (1) antikeha nukleofiilse rühma reaktsioon bivalentse linker-reagendiga Ab-L valmistamiseks kovalentse sideme kaudu, millele järgneb reaktsioon ravimi-osamolekuliga D, ja (2) ravimi-osamolekuli nukleofiilse rühma reaktsioon bivalentse linker-reagendiga D-L moodustamiseks kovalentse sideme kaudu, millele järgneb reaktsioon antikeha nukleofiilse rühmaga. Näidislikke valemiga I ADC valmistamismeetodeid on kirjeldatud taotluses US 2005-0238649 A1, mis siia on liidetud viitena.

[0535] Antikehade nukleofiilsete rühmade hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, (i) N-terminaalsed aminorühmad, (ii) aminohapete, näiteks lüsiini külghelad, (iii) külghelate tiolrühmad, näiteks tsüsteiini tiolrühmad, ja (iv) suhkuralkoholid või aminorühmad, mille juures antikeha on glükosüülitud. Amino-, tiol- ja hüdroksüülrühmad on nukleofiilsed ning on võimelised reageerima, moodustamaks kovalentseid sidemeid linker-osamolekulides ja linker-reagentides olevate elektrofiilsete rühmadega, kaasa arvatud aktiivsed estrid, nagu NHS estrid, HOBt estrid, halogenoformiaadid ja happahalogeniidid, (ii) alküül- ja bensüülhalogeniidid, nagu halogenoatsetamiidid, (iii) aldehüüdid, ketoonid, karboksüül- ja male-

imidorühmad. Teatud antikehad sisaldavad redutseeritavaid ahelatevahelisi disulfiide, st tsüsteiinsildasid. Antikehi võib muuta linkerreagentidega konjugeerimiseks reageerimisvõimelisteks töötlemisel redutseeriva ainega, nagu DDT (ditiotreitol) või trikarbonüületüülfosfiin (TCEP), nii et antikeha on kas osaliselt või täielikult redutseeritud. Seega moodustub igast tsüsteiinsillast teoreetiliselt kaks reageerimisvõimelist tiolnukleofiili. Täiendavaid nukleofiilseid rühmi saab antikehadesse viia lüsiinijääkide modifitseerimise teel, näiteks lastes lüsiinijääkidel reageerida 2-iminotiolaaniga (Traut'i reaktiivoga), mille tulemuseks on amiini konversioon tioliks. Reageerimisvõimelisi tiolrühmi võib antikehasse viia ühe, kahe, kolme, nelja või enama tsüsteiinijäägi sisseviimise abil (näiteks valmistades antikehavariandid, mis sisaldavad ühte või mitut mittenatiivset tsüsteiin-aminohappejääki).

[0536] Leiutisekohase antikeha ja ravimi konjugaate võib toota ka antikehas sisalduva elektrofiilse rühma, nagu aldehüüdi või ketooni karbonüülrühm, ning linkerreagendis või ravimis sisalduva nukleofiilse rühma vahelisel reaktsioonil. Linkerreagendi kasulike nukleofiilsete rühmade hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, hüdrasiid-, oksiim-, amino-, hüdrasiin-, tiosemikarbasoon-, hüdrasiinkarboksülaat- ja arüülhüdrasiidrühm. Ühes teostuses modifitseeritakse antikeha elektrofiilsete osamolekulide sisseviimiseks, mis on võimelised reageerima linkerreagendis või ravimis sisalduvate nukleofiilsete asendajatega. Teises teostuses võib glükosüülitud antikehade suhkruid oksüdeerida näiteks oksüdeerivate perjodaatreagentidega, et moodustada aldehüüd- või ketoonrühmad, mis võivad reageerida linkerreagentide või ravimi-osamolekulide aminorühmadega. Selle tulemusena tekkivad Schiffi aluse imiinrühmad võivad moodustada stabiilse sideme või need võib redutseerida näiteks borohüdriidreagentidega stabiilsete amiinsidemete moodustamiseks. Ühes teostuses võib glükosüülitud antikeha süsivesikuosa reaktsioon kas galaktoosoksidaasi või naatriummetaperjodaadiga anda antikehas tulemuseks (aldehüüdi ja ketooni) karbonüülrühmad, mis võivad reageerida ravimis sisalduvate sobivate rühmadega (Hermanson, Bioconjugate Techniques). Järgmises teostuses võivad N-terminaalsed seriini- või treoniinijäägid reageerida naatriummetaperjodaadiga, mille tulemusena tekib esimese aminohappe asemele aldehüüd (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem., 3: 138-146; US 5362852). Selline aldehüüd võib reageerida ravimi-osamolekuli või linkeri nukleofiiliga.

[0537] Ravimi-osamolekulide nukleofiilsete rühmade hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, amiin-, tiol-, hüdroksüül-, hüdrasiid-, oksiim-, hüdrasiin-, tiosemikarbasoon-, hüdrasiinkarboksülaat- ja arüülhüdrasiidrühmad, mis on võimelised reageerima, moodustades

kovalentseid sidemeid linker-osamolekulides ja linkerreagentides sisalduvate elektrofiilsete rühmadega, kaasa arvatud (i) aktiivsed estrid, nagu NHS estrid, HOBt estrid, halogenoformiaadid ja happahalogeniidid, (ii) alküül- ja bensüülhalogeniidid, nagu halogenoatsetamiidid, (iii) aldehüüdid, ketoonid, karboksüül- ja maleimidorühmad.

[0538] Leiutisekohaste ühendite hulgas peetakse selgesti silmas, kuid mitte ainult nendega piiratud, ADC, mis on valmistatud järgmiste ristsidestavate reagentide abil: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC ning sulfo-SMPB ja SVSB (suktsiinimidüül-(4-vinüülsulfoon)bensoaat), mis on kaubanduslikult saadaval (näiteks firmast Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., USA, vt. 2003-2004 Applications Handbook and Catalog, lk. 467-498).

[0539] Antikeha ja tsütotoksilist ainet sisaldavaid immunokonjugaate võib valmistada ka, kasutades erinevaid bifunktsionaalseid valke sidestavaid aineid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditio)propionaat (SPDP), suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat (SMCC), iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladipinidaat-HCl), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehüüdid (nagu glutaaraldehüüd), bis-asidoühendid (nagu bis(p-asidobensoüül)heksaandiamiin), bis-diasooniumderivadid (nagu bis-(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluen-2,6-diisotsüanaat) ja bis-aktiivsed fluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Näiteks ritsiini immunotoksiini võib valmistada nii, nagu on kirjeldanud Vitetta jt., Science, 238: 1098 (1987). Näidislik kelaativ aine radionukliidi konjugeerimiseks antikehaga on süsinik-14-märgistatud 1-isotiotsüanatobensüül-3-metüüldietüleentriaminopentaäädikhape (MX-DTPA), vt. WO94/11026.

[0540] Alternatiivselt võib antikeha ja tsütotoksilist ainet sisaldava liitvalgu valmistada näiteks rekombinantsete meetodite või peptiidsünteesi abil. Rekombinantne DNA molekul võib sisaldada antikeha kodeerivat piirkonda ja konjugaadi tsütotoksilist osa kodeerivat piirkonda kas üksteise kõrval või eraldatuna piirkonna abil, mis kodeerib linkerpeptiidi, mis ei hävita konjugaadi soovitud omadusi.

[0541] Järgmises teostuses võib antikeha konjugeerida „retseptoriga“ (nagu streptavidiiniga) kasutamiseks kasvaja eelsuunamiseks, kus antikeha ja retseptori konjugaat manustatakse patsiendile ning sellele järgneb seondumata konjugaadi ringlusest eemaldamine seda kõrval-

dava aine abil ja seejärel tsütotoksilise ainega (näiteks radionukliidiga) konjugeeritud „ligandi“ (näiteks avidiini) manustamine.

### Näidislikud immunokonjugaadid - tioantikeha ja ravimi konjugaadid

#### a. Tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastaste antikehade valmistamine

[0542] Tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastaste leiutisekohane antikehade ja algsete CD79b-vastaste antikehade aminohapete järjestuste variante kodeeriv DNA valmistatakse erinevatel meetoditel, mille hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, eraldamine looduslikust allikast (looduslikult esinevate aminohapete järjestuste variantide puhul), valmistamine eelnevalt valmistatud, polüpeptiidi kodeeriva DNA sait-suunatud (või oligonukleotiidvahendatud) mutageneesi abil (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 mutageneesi abil (Higuchi, (1990) teoses: *PCR Protocols*, lk.177-183, Academic Press; Ito et al., (1991) *Gene*, 102: 67-70; Bernhard et al., (1994) *Bioconjugate Chem.*, 5: 126-132; Vallette et al., (1989) *Nuc. Acids Res.*, 17: 723-733), ja kassettmutageneesi abil (Wells et al., (1985) *Gene*, 34: 315-323). Muteerimisjuhendid, komplektid ja reagentid on kaubanduslikult saadaval, nagu näiteks QuikChange® Multi Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Üksikuid mutatsioone saab tekitada ka oligonukleotiid-suunatud mutageneesi abil, kasutades PCR-põhise mutageneesi matriitsina kaheaahelalist plasmiidset DNA-d (Sambrook, Russel, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. väljaanne; Zoller et al., (1983) *Methods Enzymol.*, 100: 468-500; Zoller M. J., Smith, M., (1982) *Nucl. Acids Res.*, 10: 6487-6500). Rekombinantsete antikehade variante võib konstrueerida ka restriksioonifragmentidest või kattuvuste pikendamise abil PCR meetodil, kasutades sünteetilisi oligonukleotide. Mutageneesi primärid kodeerivad asendust (asendusi) tsüsteinikoodoniga. Selliseid mutantseid tsüsteiinidega konstrueeritud antikehi kodeeriva DNA loomiseks võib kasutada standardseid muteerimismeetodeid (Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience. New York, N.Y., 1993).

[0543] CD79b-vastaste inimese antikehade ja antikehafragmentide tootmiseks *in vitro* immuniseerimata doonorite immunoglobuliini varieeruva (V) domeeni repertuaaridest võib kasutada faagil kuvamise tehnoloogiat (McCafferty et al., (1990) Nature, 348: 552-553). Selle tehnika järgi kloonitakse antikeha V domeeni geenid õiges lugemisraamis filamentse bakteriofaagi, nagu M13 või fd, peamise või minoorse kattevalgu geeni koostisse ja kuvatakse faagipartikli pinnal funktsionaalsete antikehafragmentidena. Kuna filamentne partikkel sisaldab faagi genoomi üheaheelalist DNA koopiat, siis annab antikeha funktsionaalsetel omadustel põhinev seleksioon ka selle geeni seleksiooni, mis kodeerib nende omadustega antikeha. Seega jälgendab faag mõnesid B-rakkude omadusi (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).

[0544] CD79b-vastaseid antikehi võib sünteesida keemiliselt, kasutades tuntud oligopeptiidsünteesi metodoloogiat, või valmistada ja puhastada, kasutades rekombinantset tehnoloogiat. Sobiva aminohapete järjestuse või selle osa võib toota otsese peptiidsünteesi abil, kasutades tahkefaasilisi tehnikaid (Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W. H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154). *In vitro* valgusünteesi võib läbi viia käsitsi või automatiseeritult. Automatiseeritud tahkefaasilise sünteesi võib läbi viia näiteks t-BOC- või Fmoc-kaitstud aminohapete kasutamisega firma Applied Biosystems peptiidsüntesaatoril (Foster City, CA) vastavalt tootja juhistele. CD79b-vastase antikeha või CD79b polüpeptiidi erinevad osad võib keemiliselt eraldi sünteesida ja ühendada seejärel keemiliste või ensümaatiliste meetodite abil soovitud CD79b-vastase antikeha või CD79b polüpeptiidi saamiseks.

[0545] Antikehafragmentide tootmiseks on välja töötatud erinevaid meetodeid. Traditsiooniliselt tuletati need fragmendid intaktsete antikehade proteolüütilise lõikamise teel ((Morimoto et al., (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24: 107-117; Brennan et al., (1985) Science, 229: 81) või toodeti otse rekombinantstes peremeesrakkudes. CD79b-vastase antikeha Fab, Fv ja ScFv fragmente saab kõiki ekspresseerida *E. coli* rakkudes ja nendest sekreteerida, mis seega võimaldab kergesti toota nende fragmentide suuri koguseid. Antikehafragmente võib eraldada siin kirjeldatud antikehade faagiraamatukogudest. Alternatiivselt võib Fab'-SH fragmente saada otse *E. coli* rakkudest ja sidestada nad siis keemiliselt, moodustamaks F(ab')<sub>2</sub> fragmente (Carter et al., (1992) Bio/Technology, 10: 163-167), või eral-

dada otse rekombinantsete peremeesrakkude kultuurist. CD79b-vastane antikeha võib olla üheaahelaline Fv fragment (scFv) (WO 93/16185; US 5571894; US 5587458). Samuti võib CD79b-vastase antikeha fragment olla „lineaarne antikeha“ (US 5641870). Sellised lineaarsed antikehafragmendid võivad olla monospetsiifilised või bispetsiifilised.

[0546] Alltoodud kirjeldus puudutab eelkõige CD79b-vastaste antikehade tootmist nende rakkude, mida on transformeeritud või transfekteeritud CD79b-vastast antikeha kodeerivat nukleiinhapet sisaldava vektoriga, kultuuris kasvatamisel. CD79b-vastaseid antikehi kodeeriva DNA võib saada cDNA raamatukogust, mis on valmistatud kudedest, mille kohta eeldatakse, et need sisaldavad CD79b-vastase antikeha mRNA-d ja ekspresseerivad seda detekteeritaval tasemel. Seega võib inimese CD79b-vastase antikeha või CD79b polüpeptiidi DNA-d saada mugavasti inimese koest valmistatud cDNA raamatukogust. CD79b-vastast antikeha kodeeriva geeni võib saada ka genoomsest raamatukogust või tuntud sünteesiprotseduuride kasutamise abil (näiteks automatiseeritud nukleiinhappesünteesil).

[0547] Leiutisekohased disainimis-, selektsiooni- ja valmistamismeetodid teevad võimalikuks tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastased antikehad, mis on võimelised reageerima elektrofiilsete funktsionaalrühmadega. Lisaks teevad need meetodid võimalikuks antikehade konjugaatühendid, nagu antikeha ja ravimi konjugaatühendid (ADC), milles ravimimolekulid paiknevad ettemääratud disainitud selektiivsetes saitides. Antikeha pinnal olevad reageerimisvõimelised tsüsteiinijäägid võimaldavad spetsiifiliselt konjugeerida ravimi-osamolekule tiolrühmaga reageerivate rühmade kaudu, nagu maleimido- või halogenoatsetüülrühmad. Cys jäägi nukleofiilne aktiivsus maleimidorühma suhtes on umbes 1000 korda kõrgem kui ükskõik missuguse teise valgus oleva aminohappe funktsionaalrühma aktiivsus, näiteks lüsiinijäägi aminorühma aktiivsus või N-terminaalse aminorühma aktiivsus. Jodoatsetüül- ja maleimidoreagentide tiolispetsiifilised funktsionaalrühmad võivad aminorühmadega reageerida, kuid selleks on vajalik kõrgem pH (>9,0) ja pikemad reaktsiooniajad (Garman, 1997, *Non-Radioactive labelling: A Practical Approach*, Academic press, London). Valgus olevate vabade tiolrühmad arvu võib määrata standardse Ellmanni testi abil. Disulfiidsidemetega pentameeri näide on immunoglobuliin M, samas kui immunoglobuliin G on sellise valgu näide, kus subühikud on seotud sisemiste disulfiidsildadega. Sellistes valkudes on reageerimisvõimelise vaba tiolrühma saamiseks vaja disulfiidsillad redutseerida regentidega nagu ditiotreitool (DTT) või selenool (Singh et al., (2002) *Anal. Biochem.*, 304: 147-156). Selline

lähenemine võib aga anda tulemuseks antikeha tertsiaarse struktuuri ja antigeeni sidumispetsiifilisuse kaotsimineku.

[0548] PHESELECTOR (Phage ELISA for Selection of Reactive Thiols) test võimaldab detekteerida antikehades olevaid reageerimisvõimelisi tsüsteiinirühmi ELISA faagiformaadis, aidates sellega disainida tsüsteiinidega konstrueeritud antikehi (Juntula, J. R. et al., (2008) *J. Immunol. Methods*, 332: 41-52; WO 2006/034488; US 2007/0092940). Tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha kantakse süvendi pinnale ja inkubeeritakse seejärel faagipartiklitega, lisatakse HRP-märgistatud sekundaarne antikeha ja detekteeritakse neeldumist. Faagil kuvatavaid mutantseid valke võib skriinida kiirel, robustsel ja suure läbilaskevõimega viisil. Tsüsteiinidega konstrueeritud antikehade raamatukogusid saab toota ja selekteerida seondumise suhtes, kasutades sama lähenemist vaba Cys liitmiseks sobivate reageerimisvõimeliste saitide identifitseerimiseks juhuslikest antikehade või muude valkude faagiraamatukogudest. See meetod hõlmab faagil kuvatavate tsüsteiinimutantsete valkude reageerimist afiinse reagenti või reporterrühmaga, mis reageerib ka tioolrühmaga.

[0549] PHESELECTOR-test võimaldab skriinida antikehades olevaid reageerimisvõimelisi tioolrühmi. Selle meetodi näidiseks on A121C variandi identifitseerimine. Tervet Fab molekuli võib efektiivselt skriinida, et identifitseerida reageerimisvõimelisemate tioolrühmadega ThioFab variante. Polüpeptiidis olevate aminohappejääkide lahustile kättesaadavuse määramiseks ja selle kvantitatiivseks mõõtmiseks kasutatakse parameetrina pinnale osakaupa ligipääsetavust. Pinna kättesaadavust saab väljendada pinna pindalaga ( $\text{\AA}^2$ ), mis võib olla kokkupuutes lahusti, näiteks vee molekulidega. Vee poolt hõlmatud maht loetakse umbes 1,4 Å raadiusega sfääriks. Tarkvara on vabalt saadaval või litsentseeritav (CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, sekretäri fax: (+44) 1925 603825, või interneti kaudu: [www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html](http://www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)) kui kristallograafiaprogrammide CCP4 komplekt (Suite), milles kasutatakse algoritme, arvutamaks iga aminohappe pinna kättesaadavust valgus, mille kristallstruktuuri koordinaadid on kindlaks tehtud röntgenstruktuuranalüüsi alusel ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) *Acta Cryst.*, D50: 760-763). Kaks näidistarkvaramoodulit, mille abil pinna kättesaadavust arvutatakse, on "AREAIMOL" ja "SURFACE", ning need põhinevad B. Lee ja F. M. Richardsi, (1971) *J. Mol. Biol.*, 55: 379-400, algoritmidel. AREAIMOL defineerib lahustile kättesaadava valgupinna sfäärilise sondi (mis vastab lahustimolekulile) keskme lookusena, kui see rullub üle valgus Van der Waalsi pinna. AREAIMOL arvutab lahustile kättesaadava pinna

pindala, genereerides pinnapunktid iga aatomi laiendatud sfääri jaoks (aatomi keskmest kaugusel, mis on võrdne aatomi ja sondi raadiuste summaga) ja elimineerides need punktid, mis paiknevad naaberaatomitega seotud samaväärsetel sfääridel. AREAIMOL leiab lahustile kättesaadava aatomite pindala PDB koordinaatide failis ja summeerib kättesaadava pindala aminohappejäägi, ahela ja kogu molekuli jaoks. Individuaalsete aatomite kättesaadavad pindalad (või pindalade erinevused) saab kirjutada pseudo-PDB väljundfaili. AREAIMOL eeldab iga elemendi jaoks ühte raadiust ja tunneb ära ainult piiratud arvu erinevaid elemente.

[0550] AREAIMOL ja SURFACE annavad absoluutsed kättesaadavused, st ruutongströmitte arvu ( $\text{\AA}^2$ ). Pinna osakaupa kättesaadavus arvutatakse polüpeptiidis olevale aminohappele relevantse standardoleku suhtes. Referentsolek on tripeptiid Gly-X-Gly, kus X on huvialune aminohape ja referentsolek on „laiendatud“ konformatsioon, st nagu beeta-ahela konformatsioonid. Laiendatud konformatsioon annab X-le maksimaalse ligipääsetavuse. Arvutatud ligipääsetav pindala jagatakse Gly-X-Gly tripeptiidi referentsoleku ligipääsetava pindalaga ja esitatakse jagatisena, mis on osakaupa ligipääsetavus. Protsendiline ligipääsetavus on osakaupa ligipääsetavus korrutatud 100-ga. Teine pinna liigpääsetavuse arvutamise näidisalgoritm põhineb programmi xsa SOLV moodulil (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel), mis arvutab aminohappejäägi kättesaadavuse sfäärilisele veemolekulile polüpeptiidi röntgenanalüüsi koordinaatide alusel. Iga antikehas oleva aminohappe pinna osakaupa kättesaadavuse võib arvutada, kasutades kättesaadavat informatsiooni kristallstruktuuri kohta (Eigenbrot et al., (1993) J. Mol. Biol., 229: 969-995).

[0551] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha kodeeriva DNA saab kergesti eraldada ja sekveneerida tavapärase protseduuride abil (näiteks kasutades oligonukleotiidsone, mis on suutelised spetsiifiliselt seonduma hiire antikehade raskeid ja kergeid ahelaid kodeerivate geenidega). Sellise DNA allikana võib kasutada hübriidomirakke. Eraldatud DNA võib panna ekspressioonivektoritesse, mis seejärel transfekteeeritakse peremeesrakkudesse nagu *E. coli* rakud, ahvi COS rakud, hiina hamstri munasarja (CHO) rakud või teised imetajarakud nagu müeloomirakud (US 58077715; US 2005/0048572; US 2004/0229310), mis tavaliselt antikehavalgu ei tooda, et saada monokloonsete antikehade süntees rekombinantsetes peremeesrakkudes.

[0552] Pärast tsüsteiinidega konstrueeritud antikehade, näiteks ThioFab-ide, disainimist ja selektsiooni võib toota väga reageerimisvõimelisi paardumata Cys jääke (i) ekspressioonil bakteriaalses, näiteks *E. coli*, süsteemis ((Skerra et al., (1993) Curr. Opinion in Immunol., 5:



256-262; Plückthun, (1992) *Immunol. Revs.*, 130: 151-188) või imetaja rakukultuuri süsteemis (WO 01/00245), näiteks hiina hamstri munasarja (CHO) rakkudes, ja (ii) puhastamisel, kasutades tavalisi valgupuhastamise meetodeid (Lowman et al., (1991) *J. Biol. Chem.*, 266(17): 10982-10988).

[0553] Konstrueeritud Cys tiolrühmad reageerivad elektrofiilsete linkerreagentide ja ravimi-linkeri vaheühenditega, moodustades tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha ja ravimi konjugaate ja muid tsüsteiinidega konstrueeritud märgistatud antikehi. Tsüsteiinidega konstrueeritud antikehades ja algsetes antikehades olevad Cys jäägid, mis on paardunud ja moodustavad ahelatevahelisi ja ahelasiseseid disulfiidsidemeid, ei sisalda reageerimisvõimelisi tiolrühmi (kui neid ei ole töödeldud redutseeriva ainega) ja ei reageeri elektrofiilsete linkerreagentide või ravimi-linkeri vaheühenditega. Uus konstrueeritud Cys jääk võib jääda paardumata ja on võimeline reageerima, st konjugeeruma, elektrofiilse linkerreagenti või ravimi-linkeri vaheühendiga nagu maleimiidravim. Näidislike ravimi-linkeri vaheühendite hulka kuuluvad MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE ja MC-vc-PAB-MMAF. Raskest ja kerges ahelas olevate konstrueeritud Cys jääkide struktuuriasendid nummerdatakse vastavalt järjestikuse nummerdamise süsteemile. See järjestuste nummerdamise süsteem korreleeritakse Kabat'i nummerdamissüsteemiga (Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. väljaanne. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) alates N-terminusest, mis erineb Kabat'i nummerdamisskeemist (alumine rida) insertsioonide poolest, mis tähistatakse kui a, b, c. Kabat'i nummerdamissüsteemi kasutamisel võib tegelik lineaarne aminohapete järjestus sisaldada vähem või rohkem aminohappeid, mis vastavad varieeruva domeeni FR või CDR lühenemisele või sellesse tehtud insertsioonidele. Tsüsteiinidega konstrueeritud raske ahela variandi saidid identifitseeritakse järjestikuse nummerdamise ja Kabat'i nummerdamisskeemi abil.

[0554] Ühes teostuses valmistatakse tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastane antikeha meetodil, mis hõlmab

- (a) algses CD79b-vastases antikehas ühe või mitme aminohappejäägi asendamist tsüsteiini(de)ga ja
- (b) tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha tiolrühmade reageerimisvõime määramist tioliga reageeriva reagenti abil.

[0555] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha võib tioliga reageeriva reagendiga reageerida paremini kui algne antikeha.

[0556] Vabad tsüsteiin-aminohappejäägid võivad paikneda raskes või kerges ahelas või konstantses või varieeruvus domeenis. Ka antikehafragmente, näiteks Fab, võib konstrueerida ühe või mitme tsüsteiin-aminohappejäägiga, asendades antikehafragmendi aminohapped ja moodustades tsüsteiinidega konstrueeritud antikehafragmendid.

[0557] Leiutise järgmises teostuses esitatakse tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha valmistamismeetod, mis hõlmab

- (a) ühe või mitme tsüsteiin-aminohappe sisseviimist algsesse CD79b-vastasesse antikehasse tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha loomiseks ja
- (b) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha tiolrühmade reageerimisvõime määramist tioliga reageeriva reagenti abil,

kus tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha reageerib tioliga reageeriva reagendiga paremini kui algne antikeha.

Tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha valmistamismeetodi etapp (a) võib hõlmata

- (i) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha kodeeriva nukleiinhappe muteerimist,
- (ii) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha ekspresseerimist ja
- (iii) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha eraldamist ja puhastamist.

[0558] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha valmistamismeetodi etapp (b) võib hõlmata tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha ekspresseerimist viiruspartiklil, mis valitakse faagi- või fagemiidipartikli hulgast.

[0559] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha valmistamismeetodi etapp (b) võib hõlmata ka

- (i) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha reaktsiooni tiolrühmaga reageeriva afiinsusreagendiga, et saada afiinselt märgistatud, tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, ja
- (ii) afiinselt märgistatud, tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha püüdurkeskkonnaga seondumise mõõtmist.

[0560] Leiutise järgmine teostus on tsüsteiinidega konstrueeritud antikehade skriinimise meetod tiolrühma reageerimisvõime suhtes väga reageerimisvõimeliste paardumata tsüsteiin-aminohapetega, mis hõlmab

- (a) algsesse antikehasse ühe või mitme tsüsteiin-aminohappe sisseviimist, et saada tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha,
- (b) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha reaktsiooni tiolrühmaga reageerimisvõimelise afiinsusreagendiga, et saada afiinselt märgistatud, tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, ja
- (c) afiinselt märgistatud, tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha püüdurkeskkonnaga seondumise mõõtmist, ja
- (d) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha tiolrühmade reageerimisvõime määramist tiolrühmaga reageerimisvõimelise reagendi abil.

[0561] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikehade skriinimismeetodi etapp (a) võib hõlmata

- (i) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha kodeeriva nukleiinhappe muteerimist,
- (ii) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha ekspresseerimist ja
- (iii) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha eraldamist ja puhastamist.

[0562] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikehade skriinimismeetodi etapp (b) võib hõlmata tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha ekspresseerimist viiruspartiklil, mis valitakse faagi- või fagemiidipartikli hulgast.

[0563] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikehade skriinimismeetodi etapp (b) võib hõlmata ka

- (i) tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha reaktsiooni tiolrühmaga reageerimisvõimelise afiinsusreagendiga, et saada afiinselt märgistatud, tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha, ja
- (ii) afiinselt märgistatud, tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha püüdurkeskkonnaga seondumise mõõtmist.

b. CD79b-vastaste IgG variantide konstrueerimine tsüsteiinidega

[0564] Tsüsteiin viidi sisse algsete täispikkade kimäärsete monokloonsete CD79b-vastaste antikehade raske ahela saiti 118 (EU numeratsioon) (mis on samaväärne raske ahela asendiga 118 järjestikusel nummerdamisel) või algsete täispikkade kimäärsete monokloonsete CD79b-vastaste antikehade kerge ahela saiti 205 (Kabat'i numeratsioon) (mis on samaväärne kerge ahela asendiga 205 järjestikusel nummerdamisel) siin kirjeldatud tsüsteiinide konstrueerimise meetodite abil.

[0565] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikehad, mis sisaldasid tsüsteiini raske ahela saidis 118 (EU numeratsioon) olid: (a) thio-MA79b.v17-HC(A118C) joonisel 24 esitatud raske ahela järjestusega (SEQ ID NO: 228) ja kerge ahela järjestusega (SEQ ID NO: 229), (b) thio-MA79b.v18-HC(A118C) joonisel 25 esitatud raske ahela järjestusega (SEQ ID NO: 230) ja kerge ahela järjestusega (SEQ ID NO: 231), (c) thio-MA79b.v28-HC(A118C) joonisel 26 esitatud raske ahela järjestusega (SEQ ID NO: 232) ja kerge ahela järjestusega (SEQ ID NO: 233), (d) thio-MA79b-HC(A118C) joonisel 28 esitatud raske ahela järjestusega (SEQ ID NO: 236) ja kerge ahela järjestusega (SEQ ID NO: 237), ning (e) thio-anti-cynoCD79b-HC(A118C) joonisel 48 esitatud raske ahela järjestusega (SEQ ID NO: 244) ja kerge ahela järjestusega (SEQ ID NO: 245).

[0566] Tsüsteiinidega konstrueeritud antikehad, mis sisaldasid tsüsteiini kerge ahela saidis 205 (Kabat'i numeratsioon) olid: (a) thio-MA79b-LC(V205C) joonisel 27 esitatud raske ahela järjestusega (SEQ ID NO: 234) ja kerge ahela järjestusega (SEQ ID NO: 235), ning (b) thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-LC(V205C) joonisel 49 esitatud raske ahela järjestusega (SEQ ID NO: 299) ja kerge ahela järjestusega (SEQ ID NO: 300).

[0567] Need tsüsteiinidega konstrueeritud monokloonsed antikehad ekspresseeriti CHO (hiina hamstri munasarja) rakkudes transientsel fermenteerimisel söötmes, mis sisaldas 1 mM tsüsteiini.

[0568] Ühele teostusele vastavalt sisaldavad CD79b-vastased tsüsteiinidega konstrueeritud humaniseeritud MA79b antikehad ühte või mitut järgnevatest vaba tsüsteiin-aminohappega raske ahela järjestustest (SEQ ID NO: 251-259, tabel 2).

Tabel 2. CD79b-vastaste humaniseeritud ja tsüsteiinidega konstrueeritud MA79b antikeha-variantide raske ahela järjestikuse, Kabat'i ja EU numeratsiooni võrdlus

JÄRJESTUS	JÄRJESTIKUNE NUMERATSIOON	KABAT'I NUMERATSIOON	EU NUMERATSIOON	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
KGFYPC <u>D</u> IAVE	S375C	S371C	S375C	258
PPVLD <u>C</u> DGSFF	S400C	S396C	S400C	259

[0569] Ühele teostusele vastavalt sisaldavad CD79b-vastased tsüsteiinidega konstrueeritud kimäärsed MA79b antikehad ühte või mitut järgnevatest vaba tsüsteiin-aminohappega raske ahela järjestustest (SEQ ID NO: 260-268, tabel 3).

Tabel 3. CD79b-vastaste tsüsteiinidega konstrueeritud chMA79b antikehavariantide raske ahela järjestikuse, Kabat'i ja EU numeratsiooni võrdlus

JÄRJESTUS	JÄRJESTIKUNE NUMERATSIOON	KABAT'I NUMERATSIOON	EU NUMERATSIOON	SEQ ID NO:
EVQL <u>Q</u> QSGAE	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

JÄRJESTUS	JÄRJESTIKUNE NUMERATSIOON	KABAT'I NUMERATSIOON	EU NUMERATSIOON	SEQ ID NO:
VTVSSC <u>ST</u> KGP	A118C	A114C	A118C	264
VSSAS <u>CK</u> GPSV	T120C	T116C	T120C	265
WYVDG <u>CE</u> VHNA	V282C	V278C	V282C	266
KGFYPC <u>DIA</u> VE	S375C	S371C	S375C	267
PPVLD <u>CD</u> GSSF	S400C	S396C	S400C	268

[0570] Ühele teostusele vastavalt sisaldavad CD79b-vastased tsüsteiinidega konstrueeritud anti-cynoCD79b(ch10D10) antikehad ühte või mitut järgnevatest vaba tsüsteiin-amino-happega raske ahela järjestustest (SEQ ID NO: 269-277, tabel 4).

Tabel 4. CD79b-vastaste tsüsteiinidega konstrueeritud anti-cynoCD79b(ch10D10) antikeha-variantide raske ahela järjekuse, Kabat'i ja EU numeratsiooni võrdlus

JÄRJESTUS	JÄRJESTIKUNE NUMERATSIOON	KABAT'I NUMERATSIOON	EU NUMERATSIOON	SEQ ID NO:
EVQL <u>CE</u> SGPG	Q5C	Q5C		269
LSLT <u>CC</u> VTGYS	T23C	T23C		270
LNSVT <u>CE</u> DTAT	S88C	S84C		271
TTLTV <u>CS</u> ASTK	S111C	S112C		272
LTVSSC <u>ST</u> KGP	A113C	A114C	A118C	273
VSSAS <u>CK</u> GPSV	T115C	T116C	T120C	274
WYVDG <u>CE</u> VHNA	V282C	V278C	V282C	275
KGFYPC <u>DIA</u> VE	S370C	S371C	S375C	276
PPVLD <u>CD</u> GSSF	S395C	S396C	S400C	277

[0571] Ühele teostusele vastavalt sisaldavad CD79b-vastased tsüsteiinidega konstrueeritud humaniseeritud MA79b antikehad ühte või mitut järgnevatest vaba tsüsteiin-aminohappegaga kerge ahela järjestustest (SEQ ID NO: 278-284, tabel 5).

Tabel 5. CD79b-vastaste tsüsteiinidega konstrueeritud humaniseeritud MA79b antikehavarientide kerge ahela järjestikuse, Kabat'i ja EU numeratsiooni võrdlus

JÄRJESTUS	JÄRJESTIKUNE NUMERATSIOON	KABAT'I NUMERATSIOON	SEQ ID NO:
SLSASC <u>G</u> DRVT	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

[0572] Ühele teostusele vastavalt sisaldavad CD79b-vastased tsüsteiinidega konstrueeritud kimäärised MA79b antikehad ühte või mitut järgnevatest vaba tsüsteiin-aminohappegaga kerge ahela järjestustest (SEQ ID NO: 285-291, tabel 6).

Tabel 6. CD79b-vastaste tsüsteiinidega konstrueeritud kimäärsete MA79b antikehavarientide kerge ahela järjestikuse, Kabat'i ja EU numeratsiooni võrdlus

JÄRJESTUS	JÄRJESTIKUNE NUMERATSIOON	KABAT'I NUMERATSIOON	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

JÄRJESTUS	JÄRJESTIKUNE NUMERATSIOON	KABAT'I NUMERATSIOON	SEQ ID NO:
FIFPPC <u>D</u> EQLK	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

[0573] Ühele teostusele vastavalt sisaldavad CD79b-vastased tsüsteiinidega konstrueeritud anti-cynoCD79b(ch10D10) antikehad ühte või mitut järgnevatest vaba tsüsteiin-amino-happega kerge ahela järjestustest (SEQ ID NO: 292-298, tabel 7).

Tabel 7. CD79b-vastaste tsüsteiinidega konstrueeritud kimäärsete anti-cynoCD79b(ch10D10) antikehavariantide kerge ahela järjestikuse, Kabat'i ja EU numeratsiooni võrdlus

JÄRJESTUS	JÄRJESTIKUNE NUMERATSIOON	KABAT'I NUMERATSIOON	SEQ ID NO:
SLAVSC <u>G</u> QRAT	L15C	L15C	292
EIKRT <u>C</u> AAPSV	V114C	V110C	293
TVAAP <u>C</u> VFIFP	S118C	S114C	294
FIFPPC <u>D</u> EQLK	S125C	S121C	295
DEQLK <u>C</u> GTASV	S131C	S127C	296
VTEQD <u>C</u> KDSTY	S172C	S168C	297
GLSSP <u>C</u> TKSFN	V209C	V205C	298

c. Märgistatud, tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastased antikehad

[0574] Tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastaseid antikehi võib saidispetsiifiliselt ja efektiivselt sidestada tiolrühmadega reageerimisvõimelise reagentiga. Tiolrühmadega reageerimisvõimeline reagent võib olla multifunktsionaalne linkerreagent, püüdüreagent, st



afinne reagent, märgisreagent (näiteks biotiinlinkerreagent), detekteerimismärgis (näiteks fluorofoorreagent), tahkele faasile immobiliseerimise reagent (näiteks SEPHAROSE™, polüstüreen või klaas) või ravimi-linkeri vaheühend. Üks tiolrühmadega reageerimisvõimelise reagenti näide on N-etuülmaleimiid (NME). Näidisteostuses annab ThioFab reaktsioon biotiinlinkerreagentiga biotinüülitud ThioFab, mille abil saab detekteerida ja mõõta konstrueeritud tsüsteiinijäägi olemasolu ja reageerimisvõimet. ThioFab reaktsioon multifunktsionaalse linkerreagentiga annab funktsionaalrühmaga linkerit sisaldava ThioFab, mis võib edasi reageerida ravimi-osamolekuli või mõne muu märgisega. ThioFab reaktsioon ravimi-linkeri vaheühendiga annab ThioFab ja ravimi konjugaadi.

[0575] Siin kirjeldatud näidismeetodeid võib rakendada üldiselt antikehade identifitseerimiseks ja tootmiseks ning üldisemalt ka teistele valkudele, rakendades siin kirjeldatud disainimise ja skriinimise etappe.

[0576] Sellist lähenemist võib rakendada ka teiste tiolrühmadega reageerimisvõimeliste reagentide konjugeerimiseks, näiteks maleimiidi, jodoatsetamiidi, püridüülsulfaadi või teiste tioliga reageerimisvõimeliste konjugeerimispartnerite puhul (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.*, 3:2; German, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means, (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G., teoses: *Bioconjugate Techniques*, (1996) Academic Press. San Diego, lk. 40-55, 643-671) Tioolrühmaga reageerimisvõimeline reagent võib olla ravimi-osamolekul, fluorofoor, nagu fluorestsentsvärv, nagu fluorestseiin või rodamiin, kuvamiseks mõeldud kelaativ aine või radioterapeutiline metall, peptidüül- või mittepeptidüülmärgis või detekteerimisotsak või kõrvaldamist modifitseeriv aine, nagu polüetüleenglükooli erinevad isomeerid, peptiid, mis seondub kolmanda komponendiga või mõni muu süsivesik või lipofiilne aine.

d. Tsüsteiinidega konstrueeritud CD789b-vastaste antikehade kasutamine

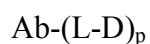
[0577] Tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastased antikehad ja nende konjugaadid võivad leida kasutamist terapeutiliste ja/või diagnostiliste vahenditena. Lisaks esitatakse käesolevas leiutises meetodid ühe või mitme B-rakkudega seotud häirega seotud sümptomi tõkestamiseks, ohjamiseks, ravimiseks või leevendamiseks. Täpsemalt esitatakse leiutises ühe või mitme sümptomi, mis on seotud rakkude proliferatsioonihäirega, nagu vähk, näiteks lüm-

foom, mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), agressiivne NHL, relapseeruv agressiivne NHL, relapseeruv indolentne NHL, refraktoorne NHL, refaktoorne indolentne NHL, krooniline lümfootsütaarne leukeemia (CLL), väikeste lümfootsüütide lümfoom, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), äge lümfootsütaarne leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoom, tõkestamise, ohjamise, ravimise või leevendamise meetodid. Lisaks esitatakse leiutises CD79b-ga seotud häire või sellise häire kujunemise eelduse diagnoosimeetodid, samuti nende antikehade ja antikehade antigeeni siduvate fragmentide, mis eelistatult seonduvad B-rakkudega seotud CD79b polüpeptiididega, identifitseerimismeetodid.

Käesoleva leiutise järgmine teostus on suunatud tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha kasutamisele medikamendi valmistamiseks, mis on kasulik sellise seisundi ravimiseks, mis on vastuseks B-rakkudega seotud häirele.

e. Tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha ja ravimi konjugaadid (tioantikeha ja ravimi konjugaadid (TDC-d))

[0578] Leiutise järgmine eripära on antikeha ja ravimi konjugaatühend, mis sisaldab tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastast antikeha (Ab) ja auristatiinravimi-osamolekuli (D), kus tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha on ühendatud D-ga ühe või mitme vaba tsüsteiin-aminohappe kaudu linker-osamolekuli (L) abil, ühend on valemiga I



kus p on 1, 2, 3 või 4 ja kus tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha valmistatakse meetodil, mis hõlmab algses antikehas ühe või mitme aminohappejäagi asendamist ühe või mitme vaba tsüsteiin-aminohappega.

[0579] Leiutise järgmine eripära on kompositsioon, mis sisaldab antikeha ja valemiga I ravimiühendite segu, kus keskmine ravimikoormus antikeha kohta on umbes 2 kuni 5 või umbes 3 kuni 4.

[0580] Joonistel 24–28 ja 48–49 on näidatud tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha ja ravimi konjugaatide teostused, kus auristatiinravimi-osamolekul on seotud konstrueeritud tsüsteiinirühmaga kas kerges ahelas (LC-ADC) või raskes ahelas (HC-ADC).

[0581] Tsüsteiinidega konstrueeritud CD79b-vastase antikeha ja ravimi konjugaatide potentsiaalsete eeliste hulka kuuluvad parenenud ohutus (suurem terapeutiline indeks), parenenud PK parameetrid, antikeha ahelatevaheliste disulfiidsildade säilimine, mis võib konjugaati stabiliseerida ja säilitada tema aktiivse sidumise konformatsiooni, ravimi konjugeerimiseks defineeritud saidid ning see, et tsüsteiinidega konstrueeritud antikeha ja ravimi konjugaatide valmistamine tsüsteiinidega konstrueeritud antikehade konjugeerimisel ravimi-linkeri reagentidega annab tulemuseks homogeensema produkti.

### Linkerid

[0582] „Linker“, „linkerühik“ või „side“ on keemiline osamolekul, mis hõlmab kovalentset sidet või aatomitest koosnevat ahelat, mille abil antikeha kinnitub kovalentselt ravimi-osamolekuli külge. Erinevates teostustes on linkeri tähiseks L. „Linker“ (L) on bifunktsionaalne või multifunktsionaalne osamolekul, mida saab kasutada ühe või enama ravimi-osamolekuli (D) ja antikehaühiku (Ab) ühendamiseks valemiga I antikeha-ravimi konjugaatide (ADC) moodustamiseks. Antikeha-ravimi konjugaate (ADC) saab käepäraselt valmistada linkeriga, millel on reagentne funktsionaalsus seondumiseks ravimi ja antikehaga. Tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha (Ab) tsüsteiintiool võib moodustada sideme ravimi-linkeri vaheühendi, ravimiosamolekuli või linkerreagenti elektrofiilse funktsionaalrühmaga.

[0583] Ühe eripära kohaselt on linkeril reagentne koht, milles on elektrofiilne rühm, mis reageerib antikehal oleva nukleofiilse tsüsteiiniga. Antikeha tsüsteiintiool reageerib linkeril elektrofiilse rühmaga ja moodustab linkeriga kovalentse sideme. Kasulikud elektrofiilsed rühmad on, kuid mitte ainult, maleimiid- ja haloatsetamiidrühmad.

[0584] Linkerid hõlmavad divalentseid rühmi, nagu alküüldiüül-, arüleen-, heteroarüleenrühm, osamolekule, nagu  $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ , alküüloksü- (nt polüetüleenoksü-, PEG, polümetüleenoksürühma) ja alküülaminorühma (nt polüetüleenaminorühma, Jeffamine™) korduvaid ühikuid, ning dihapete estreid ja amiide, sealhulgas suktsinaati, suktsiinamiidi, diglükolaati, malonaati ning kaproamiidi.

[0585] Tsüsteiiniga konstrueeritud antikehad reageerivad linkerreagentide või ravimi-linkeri vaheühendidega, elektrofiilsete funktsionaalrühmadega, nagu maleimiid- või  $\alpha$ -halokarboonüürühm, vastavalt publikatsioonis Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):

765-773, 766 toodud konjugatsioonimeetodile ning kooskõlas näites 6 kirjeldatud protokolliga.

**[0586]** Linker võib koosneda ühest või mitmest linkerkomponendist. Linkerkomponentide näideteks on 6-maleimidokaproül- („MC“), maleimidopropanoül- („MP“), valiin-tsitruiliin- („val-cit“ või „vc“),alaniin-fenüülalaniin- („ala-fe“ või „af“), p-aminobensüülloksükarbonül- („PAB“), N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüültio)pentanoaat- („SPP“), N-suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat- („SMCC“), N-suktsiinimidüül-(4-jodo-atsetüül)aminobensoaat- („SIAB“), etüleenoksü-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-rühmad ühe või enama korduva ühikuna („EO“ või „PEO“). Täiendavad linkerkomponendid on tehnika tasemest teada ja mõningaid neist on kirjeldatud käesolevas dokumendis.

**[0587]** Ühes teostuses on ADC linkeri L valem



milles

- A- on pikendusühik, mis on kovalentselt kinnitatud antikeha (Ab) tsüsteintiooli külge, a on 0 või 1,
- iga -W- on sõltumatult aminohappeühik,
- w on sõltumatult täisarv vahemikus 0 kuni 12,
- Y- on vaheühik, mis on kovalentselt kinnitatud ravimi-osamolekuli külge, ning y on 0, 1 või 2.

### Pikendusühik

**[0588]** Pikendusühik (-A-) (kui on) võimaldab ühendada antikehaühiku aminohappeühikuga (-W-). Sellest tulenevalt on antikehal (Ab) funktsionaalrühm, mis võib moodustada sideme pikendusühiku funktsionaalrühmaga. Kasulikud funktsionaalrühmad, mis võivad antikehal olla looduslikult või keemilise manipulatsiooni tulemusena, hõlmavad, kuid mitte ainult, sulfhüdrüül- (-SH), amino-, hüdroksüül-, karboksüülrühma, süsivesiku anomeerset hüdroksüülrühma ja karboksüülrühma. Ühe eripära kohaselt on antikeha funktsionaalrühmadeks sulfhüdrüül- või aminorühmad. Sulfhüdrüülrühmi võib luua antikeha molekulidevahelise disulfiidsideme redutseerimise teel. Alternatiivselt võib sulfhüdrüülrühmi luua antikeha

lüsiin-osamolekuli aminorühma reaktsioonil 2-iminotiolaani (Trauti reagenti) või muu sulfhüdrüülrühma tekitava reagenti abil. Ühes teostuses on antikehal (Ab) vaba tsüsteiintioolrühm, mis võib moodustada sideme pikendusühiku elektrofiilse funktsionaalrühmaga. Näidislikke pikendusühikuid konjugaatides valemiga I kirjeldavad valemid II ja III, kusjuures Ab-, -W-, -Y-, -D, w ja y vastavad ülaltoodud määratlustele ning  $R^{17}$  on divalentne rühm, mis on valitud järgnevate seast:  $-(CH_2)_n-C_3-C_8$ -karbotsükliül-,  $-O-(CH_2)_n$ -arüleen-,  $-(CH_2)_r$ -arüleen-, -arüleen- $(CH_2)_r$ -,  $-(CH_2)_r-(C_3-C_8$ -karbotsükliül)-,  $-(C_3-C_8$ -karbotsükliül)- $(CH_2)_r$ -,  $-C_3-C_8$ -heterotsükliül-,  $-(CH_2)_r-(C_3-C_8$ -heterotsükliül)-,  $-(C_3-C_8$ -heterotsükliül)- $(CH_2)_r$ -,  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ -,  $-(CH_2CH_2O)_r$ -,  $-(CH_2CH_2O)$ - $CH_2$ -,  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ -,  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2$ -,  $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ -,  $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2$ - ja  $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ -rühm, kusjuures  $R^b$  on H,  $C_1-C_6$ -alküül-, fenüül- või bensüülrühm, ning r on sõltumatult täisarv vahemikus 1-10.

**[0589]** Arüleen hõlmab divalentseid aromaateid 6-20 süsinikuaatomiga süsivesinikurühmi, mis on saadud kahe vesinikuaatomi eemaldamisel aromaatselt tsükliilisest süsteemist. Tüüpilised arüleenrühmad hõlmavad, kuid mitte ainult, rühmi, mis on saadud benseenist, asendatud benseenist, naftaleenist, antratseenist, bifenüülist jms.

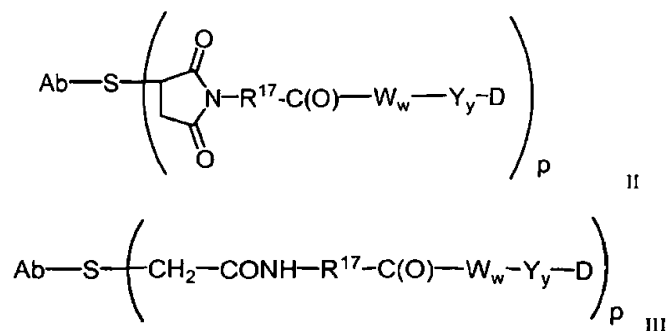
**[0590]** Heterotsükliülrühmad hõlmavad tsükliilist süsteemi, milles üheks või enamaks tsükli-aatomiks on heteroaatom, nt lämmastik, hapnik ja väävel. Heterotsükliiline rühm hõlmab 1-20 süsinikuaatomit ja 1-3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ning S seast. Heterotsükkel võib olla monotsükkel, milles on 3 kuni 7 tsükliilüli (2 kuni 6 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ning S seast) või bitsükkel, milles on 7 kuni 10 tsükliilüli (4 kuni 9 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ning S seast), näiteks bitsüklo-[4,5]-, -[5,5]-, -[5,6]- või -[6,6]-süsteem. Heterotsükleid on kirjeldatud allikates Paquette, Leo A., „Principles of Modern Heterocyclic Chemistry“ (W.A. Benjamin, New York, 1968), eelkõige peatükkides 1, 3, 4, 6, 7 ja 9; „The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs“ (John Wiley & Sons, New York, alates 1950 kuni tänaseni), eelkõige köidetes 13, 14, 16, 19 ja 28; ning J. Am. Chem. Soc., (1960) 82:5566.

**[0591]** Heterotsükliite mittepiiravateks näideteks on, kuid mitte ainult, püridüül-, dihidroksüpüridüül-, tetrahüdropüridüül- (pipefidüül-), tiasolüül-, tetrahüdrotiofenüül-, väävliga oksüdeeritud tetrahüdrotiofenüül-, pürimidinüül-, furanüül-, tienüül-, pürrolüül-, pürasolüül-, imidasolüül-, tetrasolüül-, bensofuranüül-, tianaftalenüül-, indolüül-, indolenüül-, kinolinüül-,

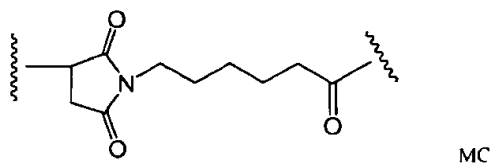
isokinolinüül-, bensimidazolüül-, piperidinüül-, 4-piperidonüül-, pürrolidinüül-, 2-pürrolidoniüül-, pürrolinüül-, tetrahüdrofuranüül-, bistetrahüdrofuranüül-, tetrahüdropüranüül-, bistetrahüdropüranüül-, tetrahüdrokinolinüül-, tetrahüdroisokinolinüül-, dekahüdrokinolinüül-, oktahüdroisokinolinüül-, asotsinüül-, triasinüül-, 6H-1,2,5-tiadiasinüül-, 2H,6H-1,5,2-ditiasinüül-, tienüül-, tiantrenüül-, püranüül-, isobensofuranüül-, kromenüül-, ksantenüül-, fenoksatinüül-, 2H-pürrolüül-, isotiasolüül-, isoksasolüül-, pürasinüül-, püridasinüül-, indolisinüül-, isoindolüül-, 3H-indolüül-, 1H-indasolüül-, purinüül-, 4H-kinolisinüül-, ftalasinüül-, naftüridinüül-, kinoksalinüül-, kinasolinüül-, tsinnolinüül-, pteridinüül-, 4H-karbasolüül-, karbasolüül-,  $\beta$ -karbolinüül-, fenantridinüül-, akridinüül-, pürimidinüül-, fenantrolinüül-, fenasinüül-, fenotiasinüül-, furasanüül-, fenoksasinüül-, isokromanüül-, kromanüül-, imidasolidinüül-, imidasolinüül-, pürasolidinüül-, pürasolinüül-, piperasinüül-, indolinüül-, isoindolinüül-, kinuklidinüül-, morfolinüül-, oksasolidinüül-, bensotriasolüül-, bensisoksasolüül-, oksindolüül-, bensoksasolinüül- ja isatinoöülrühmad.

**[0592]** Karbotsükliülrühmad hõlmavad küllastunud või küllastumata tsükliit, milles on monotsükliina 3 kuni 7 süsinikuaatomit või bitsükliina 7 kuni 12 süsinikuaatomit. Monotsükliilistes karbotsükliites on 3 kuni 6 tsükliiaatomit, veelgi tüüpilisemalt 5 või 6 tsükliiaatomit. Bitsükliilistes karbotsükliites on 7 kuni 12 tsükliiaatomit, mis moodustavad näiteks bitsüklo[4,5]-, -[5,5]-, -[5,6]- või -[6,6]-süsteemi, või 9 või 10 tsükliiaatomit, mis moodustavad -[5,6]- või -[6,6]-süsteemi. Monotsükliiliste karbotsükliite näideteks on tsüklopropüül-, tsüklobutüül-, tsüklopentüül-, 1-tsüklopent-1-enüül-, 1-tsüklopent-2-enüül-, 1-tsüklopent-3-enüül-, tsükloheksüül-, 1-tsükloheks-1-enüül-, 1-tsükloheks-2-enüül-, 1-tsükloheks-3-enüül-, tsükloheptüül- ja tsüklooktüülrühmad.

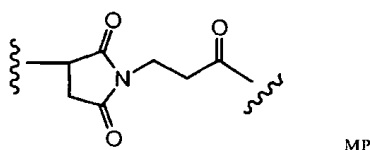
**[0593]** Valemiga I ADC kõigis näidisteostustes, näiteks II-VI, loetakse arusaadavaks, isegi kui seda pole selgesõnaliselt öeldud, et antikehaga ( $p = 1-4$ ) on ühendatud 1 kuni 4 ravimiosamolekuli, olenevalt konstrueeritud tsüsteiinijääkide arvust.



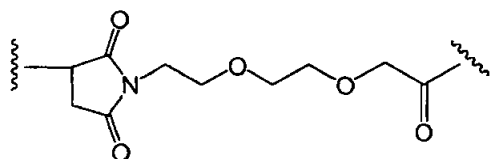
[0594] Näidislik valemile II vastav pikendusühik saadakse mateimidokaproüülrühmast (MC), milles  $R^{17}$  on  $-(CH_2)_5-$



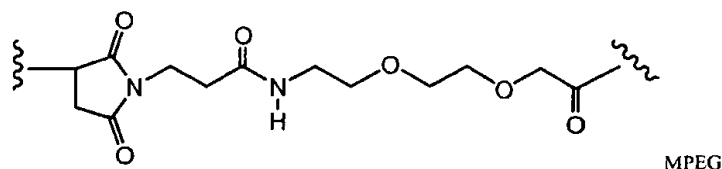
[0595] Näidislik valemile II vastav pikendusühik saadakse maleimidopropanoüülrühmast (MP), milles  $R^{17}$  on  $-(CH_2)_2-$



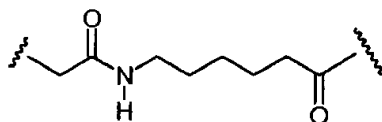
[0596] Veel üks näidislik valemile II vastav pikendusühik, milles  $R^{17}$  on  $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$  ja  $r$  on 2, on



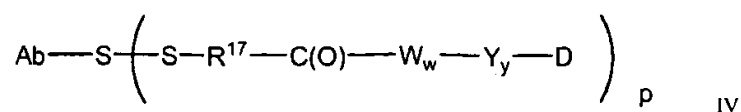
[0597] Veel üks näidislik valemile II vastav pikendusühik, milles  $R^{17}$  on  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ , kus  $R^b$  on H ja iga  $r$  on 2, on



[0598] Näidislik pikendusühik valemiga III, milles  $R^{17}$  on  $-(CH_2)_5-$ , on

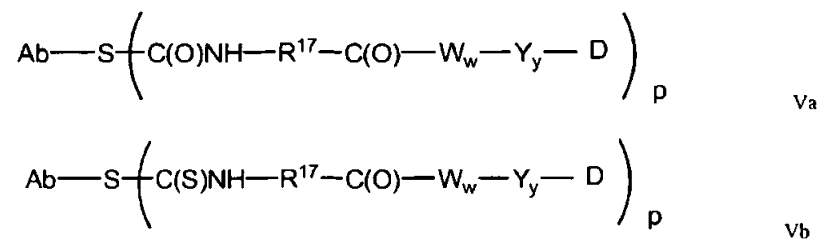


[0599] Ühes teostuses on pikendusühik seotud tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastase antikehaga disulfiidsideme kaudu, mis on moodustunud antikeha konstrueeritud tsüsteiini väävliatomi ja pikendusühiku väävliatomi vahel. Selle teostuse tüüpiline pikendusühik vastab valemile IV, milles  $R^{17}$ , Ab-, -W-, -Y-, -D, w ja y vastavad ülaltoodud määratlustele.



[0600] Veel ühes teostuses sisaldab pikendusühiku reaktsioonivõimeline rühm tiooliga reageerivat funktsionaalrühma, mis võib moodustada sideme antikeha vaba tsüsteiini tiool-

rühmaga. Tiooliga reageerivate funktsionaalrühmade näideteks on, kuid mitte ainult, malemiid- ja  $\alpha$ -haloatsetüülrühm, aktiveeritud estrid, nagu suktsiinimiidestrid, 4-nitrofenüülestrid, pentafluorofenüülestrid, tetrafluorofenüülestrid, anhüdriidid, happekloriidid, sulfonüülkloriidid, isotsüanaadid ja isotiotsüanaadid. Selle teostuse tüüpilised pikendusühikud vastavad valemitele Va ja Vb, milles  $-R^{17}$ -, Ab-,  $-W_w$ -,  $-Y_y$ -, -D, w ning y vastavad ülaltoodud määratlustele:



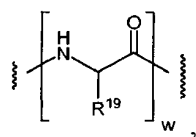
**[0601]** Veel ühes teostuses võib linkeriks olla dendriidi tüüpi linker, millega võib enam kui ühe ravimi-osamolekuli siduda kovalentselt hargnenud, multifunktsionaalse linkeri-osamolekuli kaudu antikehaga (Sun et al., (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12: 2213-2215; Sun et al., (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11: 1761-1768; King, (2002) *Tetrahedron Letters*, 43: 1987-1990). Dendriitsed linkerid võivad tõsta ravimi/antikeha molaarsuhet ehk koormust, mis seondub ADC potentsusega. Seega, kui tsüsteiiniga konstrueeritud antikehas on vaid üks reaktsioonivõimeline tsüsteiintioolrühm, võib dendriitse linkeri kaudu kinnitada mitu ravimi-osamolekuli.

### Aminohappeühik

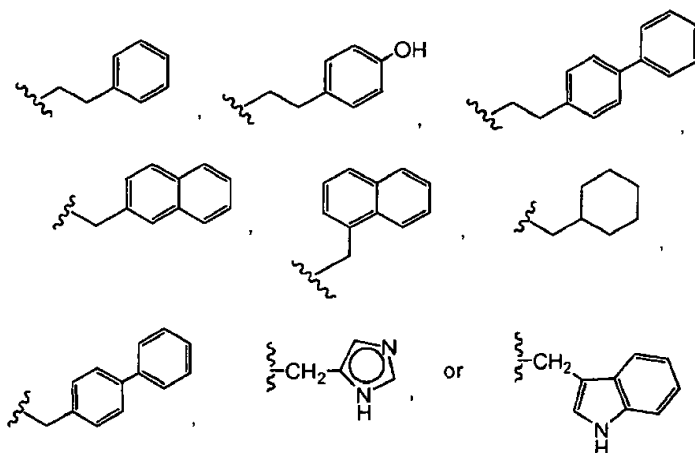
**[0602]** Linker võib sisaldada aminohappejääke. Aminohappeühik ( $-W_w$ ) (kui on) ühendab antikeha (Ab) leiutisekohase tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha-ravimi konjugaadi (ADC) ravimi-osamolekuliga (D).

**[0603]**  $-W_w$  on dipeptiid-, tripeptiid-, tetrapeptiid-, pentapeptiid-, heksapeptiid-, heptapeptiid-, oktapeptiid-, nonapeptiid-, dekapeptiid-, undekapeptiid- või dodekapeptiidühik. Aminohappejäägid, millesse kuulub aminohappeühik, hõlmavad looduslikke saadusi, nagu ka väiksemaid aminohappeid ja mittelooduslikke aminohappeanalooge, nt tsitrulliini. Igal  $-W$ -ühikul eraldi on allpool kandilistes sulgudes osutatud valem, ning w on täisarv vahemikus 0 kuni 12





milles  $R^{19}$  on vesinik, metüül-, isopropüül-, isobutüül-, *sec*-butüül-, bensüül-, *p*-hüdrosübensüülrühm,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{=NH})\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(\text{=NH})\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ , 2-püridüülmetüül-, 3-püridüülmetüül-, 4-püridüülmetüül-, fenüül-, tsükloheksüülrühm,



[0604] Kui  $R^{19}$  ei ole vesinik, on süsinikuaatom, mille külge  $R^{19}$  kinnitub, kiraalne. Iga süsinikuaatom, mille külge  $R^{19}$  kinnitub, on sõltumatult (*S*)- või (*R*)-konfiguratsioonis, või on selleks ratseemiline segumbes Seega võivad aminohappeühikud olla enantiomeeriliselt puhtad, ratseemilised või diastereomeersed segud.

[0605]  $-W_w$ - aminohappeühikute näideteks on dipeptiid, tripeptiid, tetrapeptiid või pentapeptiid. Dipeptiidide näideteks on valiin-tsitrulliin (vc või val-cit),alaniin-fenüülalaniin (af või ala-phe). Tripeptiidide näideteks on glütsiin-valiin-tsitrulliin (gly-val-cit) ja glütsiin-glütsiin-glütsiin (gly-gly-gly). Aminohappejäägid, mis sisaldavad aminohappe linkerkomponenti, hõlmavad looduslikke saadusi, nagu ka väiksemaid aminohappeid ja mittelooduslikke aminohappeanalooge, nt tsitrulliini.

[0606] Aminohappeühikut saab ensümaatilisel lõhustada ühe või enama ensüümiga, sh kasvajaspetsiifilise proteaasiga, ja vabastada ravimi-osamolekuli ( $-D$ ), mis ühes teostuses protonitakse vabastamisel *in vivo* ravimiks ( $D$ ). Aminohappe linkerkomponente võib konstrueerida ja optimeerida, nii et neil oleks selektiivsus ensümaatilise lõhustamise suhtes

konkreetsete ensüümidega, näiteks kasvajaspetsiifilise proteaasi, katepsiini B, C ja D või plasmiinproteasiga.

### Vaheühik

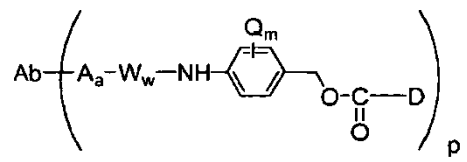
**[0607]** Vaheühik (-Y<sub>y</sub>-) (kui on) (y = 1 või 2) ühendab aminohappeühiku (-W<sub>w</sub>-) ravimi-osamolekuliga (D) aminohappeühiku olemasolul (w = 1-12). Alternatiivselt ühendab vaheühik pikendusühiku ravimi-osamolekuliga aminohappeühiku puudumisel. Vaheühik ühendab ravimi-osamolekuli antikehaühikuga ka juhul, kui puuduvad nii aminohappeühik kui ka pikendusühik (w, y = 0). Vaheühikud on üldiselt kahte liiki: autoimmolatiivsed ja mitte-autoimmolatiivsed. Mitte-autoimmolatiivne vaheühik on vaheühik, mille korral aminohappeühiku (eelkõige ensümaatilise) lõhustamise järel antikeha-ravimi konjugaadi või ravimi-osamolekul-linkeri küljest jääb vaheühik osaliselt või täielikult ravimi-osamolekuliga seotuks. Kui glütsiin-glütsiin-vaheühikut või glütsiin-vaheühikut sisaldav ADC läbib ensümaatilise lõhustamise kasvajakuga seotud proteaasi, vähirakuga seotud proteaasi või lümfotsüüdiga seotud proteaasi kaudu, lõhustatakse Ab-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>- küljest glütsiin-glütsiin ravimi-osamolekul või glütsiini-ravimi-osamolekul. Ühes teostuses toimub sihtrakus sõltumatu hüdrolyüsireaktsioon, mis lõhustab glütsiini-ravimiosamolekuli ja vabastab ravimi.

**[0608]** Ühes teostuses on -Y<sub>y</sub>- p-aminobensüülkarbamooül-(PAB)-ühik, mille fenüleenosa on asendatud Q<sub>m</sub>-ga, milles Q on -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül)-, halogeen, nitro- või tsüanorühm, ning m on täisarv vahemikus 0-4.

**[0609]** Mitte-autoimmolatiivse vaheühiku (-Y-) näidislikeks teostusteks on -Gly-Gly-, -Gly-, -Ala-Phe-, -Val-Cit-.

**[0610]** Ühes teostuses pakutakse ravimi-osamolekuli-linkerit või ADC, mille korral vaheüksus puudub (y = 0), või selle farmatseutiliselt sobivat soola või solvaati.

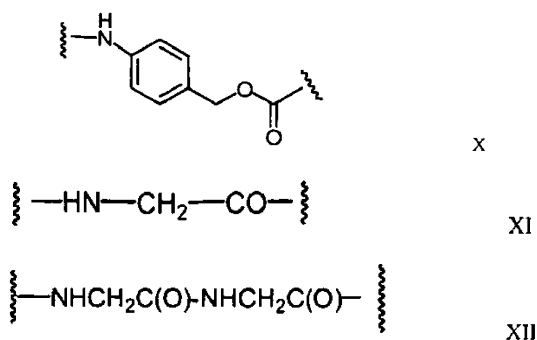
**[0611]** Alternatiivselt võib autoimmolatiivset vaheüksust sisaldav ADC vabastada -D. Ühes teostuses on -Y- PAB-rühm, mis on ühendatud -W<sub>w</sub>--ga PAB-rühma amino-lämmastiku-aatomi kaudu ja on otseühenduses -D-ga karbonaat-, karbamaat- või eeterühma kaudu, kusjuures ADC näidisstruktuur on



milles Q on -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül)-, halogeen, nitro või tsüanorühm, m on täisarv vahemikus 0-4 ning p jääb vahemikku 1 kuni 4.

**[0612]** Teisteks autoimmolatiivsete vaheühikute näideteks on, kuid mitte ainult, aromaatsed ühendid, mis sarnanevad elektrooniliselt PAB-rühmaga, nagu 2-aminoimidasool-5-metanooli derivaadid (Hay et al., (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett., 9: 2237), heterotsüklilised PAB analoogid (US 2005/0256030), beeta-glükuroniid (WO 2007/01196R) ja orto- või para-aminobensüülatsetaalid. Kasutada võib vaheühikuid, mis tsüklistatakse amiidsideme hüdroolüüsil, nagu asendatud ja asendamata 4-aminovõihappe amiidid (Rodrigues et al., (1995) Chemistry Biology, 2: 223), kohaselt asendatud bitsüklo[2.2.1]- ja bitsüklo[2.2.2]-tsüklilised süsteemid (Storm et al., (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94: 5815) ning 2-aminofenüülpropioonhappe amiidid (Amsberry et al., (1990) J. Org. Chem., 55: 5867). Amiini sisaldavate ravimite, mis asendatakse glütsiini juures, elimineerimine (Kingsbury et al., (1984) J. Med. Chem., 27: 1447) on samuti ADC-des kasuliku autoimmolatiivse vaheühiku näiteks.

**[0613]** Näidisvaheühikud (-Y<sub>y</sub>-) vastavad valemitele X-XII

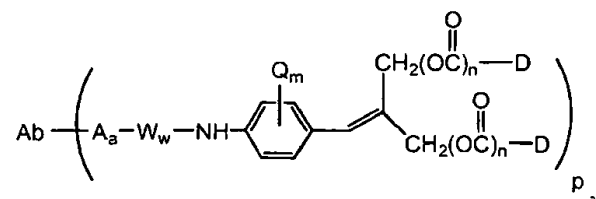


### Dendriitsed linkerid

**[0614]** Veel ühes teostuses võib linkeriks L olla dendriidi tüüpi linker, millega saab enam kui ühe ravimi-osamolekuli siduda kovalentselt hargnenud, multifunktsionaalse linkeriosamolekuli kaudu antikehaga (Sun et al., (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12: 2213-2215; Sun et al., (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11: 1761-1768). Dendriitsed linkerid võivad tõsta ravimi/antikeha molaarsuhet ehk koormust, mis seondub ADC potentsusega. Seega, kui tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha kannab vaid üht reaktsioonivõimelist tsüsteiini tioolrühma, on dendriitse linkerit kaudu võimalik kinnitada mitu ravimi-osamolekuli. Dendriitsete linkerite hargnenud näidisteostused hõlmavad 2,6-bis(hüdroksümetüül)-p-kresooli ja 2,4,6-tris(hüdroksümetüül)fenooli tüüpi dendrimeeriühikuid (WO

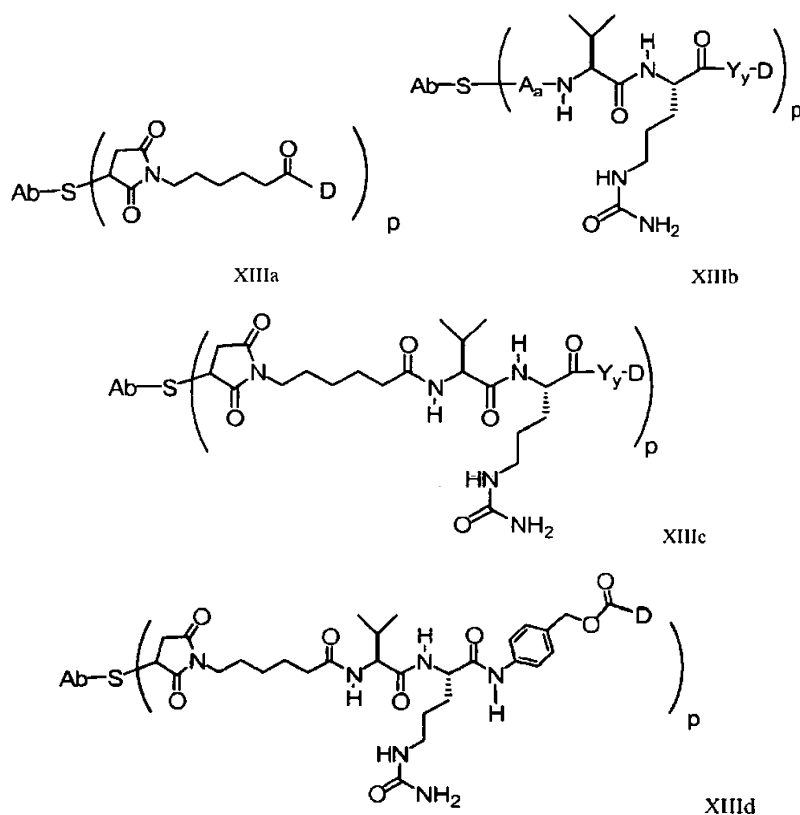
2004/01993; Szalai et al., (2003) J. Amer. Chem. Soc., 125: 15688-15689; Shamis et al., (2004) J. Amer. Chem. Soc., 126: 1726-1731; Amir et al., (2003) Angew. Chem. Int. Ed., 42: 4494-4499).

[0615] Ühes teostuses on vaheühikuks hargnenud bis(hüdroksümetüül)stüreen (BHMS), mida saab kasutada mitme ravimi kaasamiseks ja vabastamiseks, ja on struktuuriga

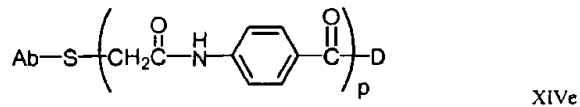
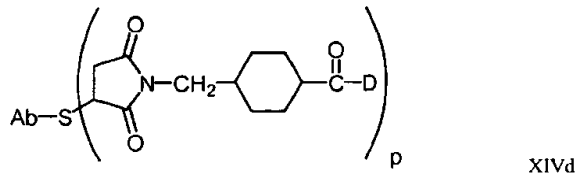
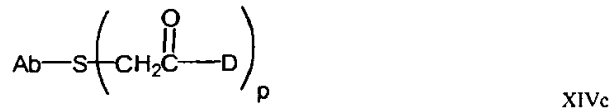
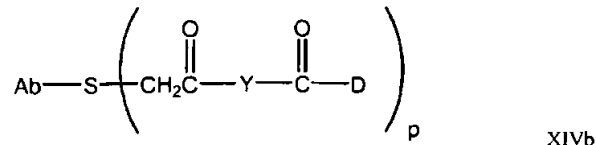
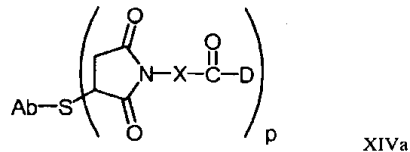


mis sisaldab 2-(4-aminobensülideen)propan-1,3-diooli dendrimeeriühikut (WO 2004/043493; de Groot et al., (2003) Angew. Chem. Int. Ed., 42: 4490-4494), milles Q on -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül)-, halogeen, nitro- või tsüanorühm, m on täisarv vahemikus 0-4, n on 0 või 1 ning p jääb vahemikku 1 kuni 4.

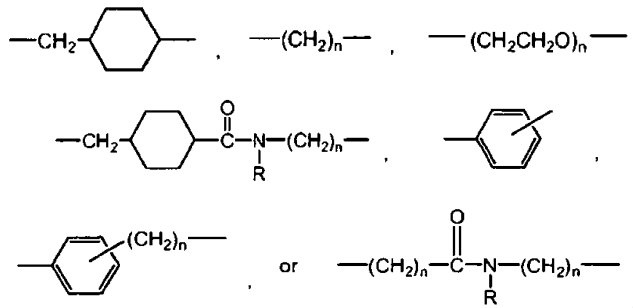
[0616] Valemiga I antikeha-ravimi konjugaatühendite näidisteostusteks on XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit) ja XIId (MC-val-cit-PAB)



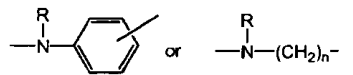
[0617] Valemiga Ia antikeha-ravimi konjugaadi teisteks näidisteostusteks on variandid XIVa-e



milles X on



Y on



ning R on sõltumatult H või C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alküülrühm ja n on 1 kuni 12.

**[0618]** Ühes teostuses on linkeril reaktsioonivõimeline funktsionaalrühm, milles on nukleofiilne rühm, mis reageerib antikeha elektrofiilse rühmaga. Antikeha kasulikud elektrofiilsed rühmad hõlmavad, kuid mitte ainult, aldehüüdi ja ketooni karbonüülrühmi. Linkeri nukleofiilse rühma heteroaatom reageerib antikeha elektrofiilse rühmaga ja moodustab antikehaühikuga kovalentse sideme. Linkeri kasulike nukleofiilsete rühmade seas on, kuid mitte ainult, hüdrasiid-, oksiim-, amino-, hüdrasiin-, tiosemikarbasoon-, hüdrasiinkarboksülaat- ja arüülhüdrasiidrühm. Elektrofiilne rühm antikehal on soodsaks linkeriga kinnitumise kohaks.

**[0619]** Peptiid-tüüpi linkerid saab üldjuhul valmistada kahe või enama aminohappe ja/või peptiid-osamolekulide vahelise peptiidsideme moodustamise teel. Selliseid peptiidsidemeid võib valmistada näiteks vedelfaasi sünteesimeetodil (E. Schröder, K. Lübke, (1965) „The Peptides“, köide 1, lk. 76-136, Academic Press), mis on peptiidide keemia valdkonnas hästi tuntud. Linker-vaheühendeid võib moodustada reaktsioonide mis tahes kombinatsiooni või järjekorraga, milles osalevad vahe-, pikendus- ja aminohappeühikud. Vahe-, pikendus- ja aminohappeühikud võivad kasutada reaktsioonivõimelisi funktsionaalrühmi, mis on elektrofiilsed, nukleofiilsed või vabad rühmad. Reaktsioonivõimelised funktsionaalrühmad on, kuid mitte ainult, karboksüül-, hüdroksüül-, para-nitrofenüülkarbonaat-, isotiotsüanaatrühmad ning lahuvad rühmad, nagu O-mesüül-, O-tosüül-, -Cl, -Br, -I või maleimidorühm.

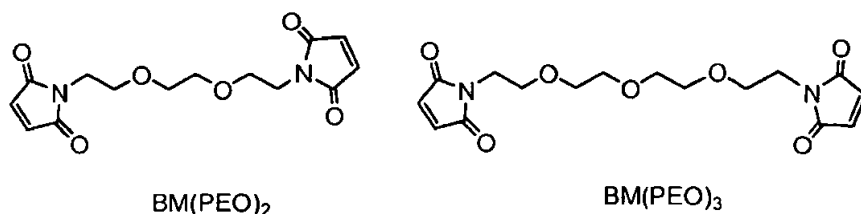
**[0620]** Näiteks võib laenguga asendaja, nagu sulfonaat ( $-\text{SO}_3^-$ ) või ammoonium, tõsta reagenti lahustuvust vees ja lihtsustada linkerreagenti sidestamisreaktsiooni antikeha või ravimi-osamolekuliga või lihtsustada Ab-L (antikeha-linkeri vaheühendi) sidestamisreaktsiooni D-ga või D-L (ravimi-linkeri vaheühendi) sidestamisreaktsiooni antikehaga, olenevalt ADC valmistamiseks kasutatavast sünteesimeetodist.

### Linkerreagentid

**[0621]** Antikeha ja auristatiini konjugaate võib valmistada mitmesuguste bifunktsionaalsete linkerreagentidega, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüültio)propionaat (SPDP), suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat (SMCC), iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladiipimidaat-HCl), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehüüdid (nagu glutaaraldehüüd), bisasidoühendid (nagu bis(p-asidobensoüül)heksaandiamiin), bisdiasoonium derivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluen-2,6-diisotsüanaat) ja bisaktiivse fluori ühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen).

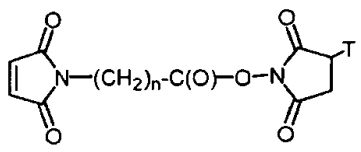
**[0622]** Antikeha-ravimi konjugaate võib valmistada ka linkerreagentidega, nagu BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC ja sulfo-SMPB ning SVSB (suktsiinimidüül-(4-vinüülsulfoon)bensoaat), sh bismaleimiidreagentidega, nagu DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-bismaleimidietüleenglükool ( $\text{BM}(\text{PEO})_2$ ), ja 1,11-bismaleimidotrietüleenglükooliga ( $\text{BM}(\text{PEO})_3$ ), mida turustavad firmad

Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL ning teised reagentide tarnijad. Bismaleimidoreagendid võimaldavad kinnitada tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha tiolrühma tioli sisaldavale ravimi-osamolekulile, määrgisele või linker-vaheühendile järjestikulisel või koos esineval viisil. Teised funktsionaalrühmad lisaks maleimiidile, mis reageerivad tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha, ravimi-osamolekuli, määrgise või linker-vaheühendi tiolrühmaga, hõlmavad jodoatsetamiidi, bromoatsetamiidi, vinüülpüridiini, disulfiidi, püridüüldisulfiidi, isotsüanaati ja isotiotsüanaati.

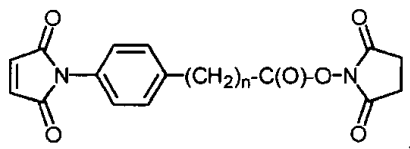


**[0623]** Kasulikke linkerreagente võib saada ka muudest kaubanduslikest allikatest nagu Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO) või sünteesida vastavalt protseduuridele, mida kirjeldatakse publikatsioonides Toki et al., (2002) *J. Org. Chem.*, 67: 1866-1872; Walker, M. A., (1995) *J. Org. Chem.*, 60: 5352-5355; Frisch et al., (1996) *Bioconjugate Chem.*, 7: 180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583 ja WO 04/032828.

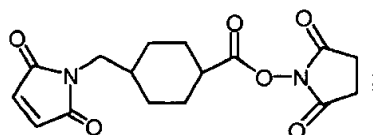
**[0624]** Pikendusühikuid valemiga (IIIa) võib linkerisse sisestada järgmiste linkerreagentide reaktsioonil aminohappeühiku N-otsaga

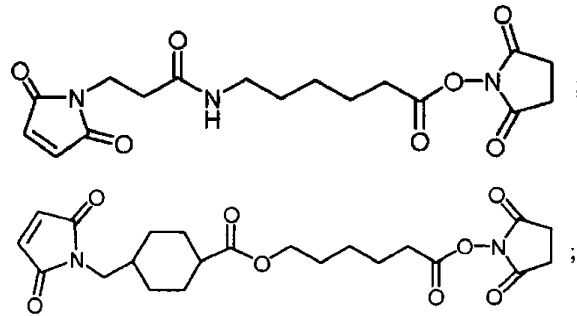


milles n on täisarv vahemikus 1-10 ja T on -H või -SO<sub>3</sub>Na;

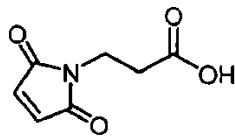


milles n on täisarv vahemikus 0-3;

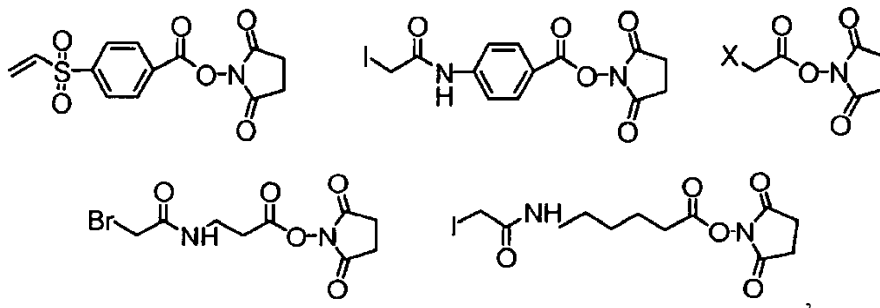




ja

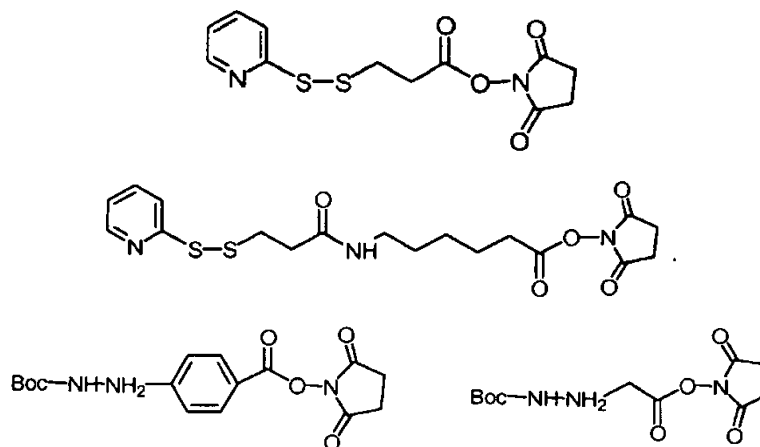


[0625] Pikendusühikuid võib linkerisse sisestada järgmiste bifunktsionaalsete reagentide reaktsioonil aminohappeühiku N-otsaga



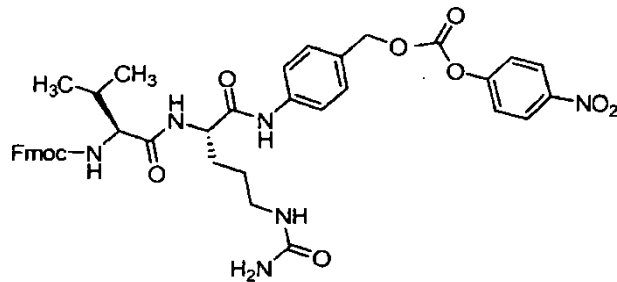
milles X on Br või I.

[0626] Valemiga pikendusühikuid võib lisaks linkerisse sisestada järgmiste bifunktsionaalsete reagentide reaktsioonil aminohappeühiku N-otsaga

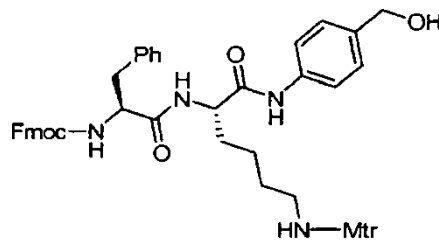


[0627] Näidisliku valiin-tsitrulliini (val-cit või vc) dipeptiid-linkerreagenti, milles on maleimiid-pikendusühik ja para-aminobensüülkarbamoyli tüüpi (PAB) autoimmolatiivne vaheühik, struktuur on järgmine:





[0628] Näidislikku phe-lys (Mtr, mono-4-metoksütritüül-) dipeptiid-linkerreagendi, milles on maleimiid-pikendusühik ja PAB autoimmolatiivne vaheühik, võib valmistada vastavalt publikatsioonile Dubowchik et al., (1997) Tetrahedron Letters, 38: 5257-60, ning selle struktuur on järgmine:



#### Tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastase antikeha-ravimi konjugaatide valmistamine

[0629] Valemiga I ADC-d võib valmistada mitmel viisil, kasutades selleks asjatundjatele teadaolevaid orgaanilise keemia reaktsioone, tingimusi ja reagente, sealhulgas (1) tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha tsüsteiinrühma reaktsiooni linkerreagendiga, mille tulemusel moodustub kovalentse sideme kaudu antikeha-linker-vaheühend Ab-L, millele järgneb reaktsioon aktiveeritud ravimi-osamolekuliga D, ning (2) ravimi-osamolekuli nukleofiilse rühma reaktsiooni linkerreagendiga, mille tulemusel moodustub kovalentse sideme kaudu ravimi-linkeri vaheühend D-L, millele järgneb reaktsioon tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha tsüsteiinrühmaga. Konjugeerimismeetodeid (1) ja (2) võib kasutada mitmesuguste tsüsteiiniga konstrueeritud antikehade, ravimi-osamolekulide ning linkerite korral, saades tulemusena antikeha-ravimi konjugaadid valemiga I.

[0630] Antikeha tsüsteiini tiolrühmad on nukleofiilsed ja reageerivad kovalentsete sidemete moodustamiseks elektrofiilsete rühmadega linkerreagentidel ning ravimi-linkeri vaheühenditel, moodustades sealhulgas (i) aktiivsed estreid, nagu NHS-estrid, HOBt-estrid, haloformid ja hapete halogeniidid, (ii) alküül- ja bensüülhaliide nagu haloatseetamiidid, (iii) aldehüüde, ketoone, karboksüül- ja maleimidorühmi, ning (iv) sulfiidivahetuse kaudu disulfiide, seal-

hulgas püridüüldisulfiide. Ravimi-osamolekulil paiknevad nukleofiilsed rühmad on, kuid mitte ainult, amiin-, tiol-, hüdroksüül-, hüdrasiid-, oksiim-, hüdrasiin-, tiosemikarbasoon-, hüdrasiinkarboksülaad- ja arüülhüdrasiidrühmad, mis võivad reageerida reaktsioonivõimeliste kovalentsete sidemete moodustamiseks elektrofiilsete rühmadega linker-osamolekulidel ning linkerreagentidel.

**[0631]** Tsüsteiiniga konstrueeritud antikehad võib muuta reaktsioonivõimeliseks konjugeerimiseks linkerreagentidega töötlemisel redutseeriva ainega, nagu DTT (Clelandi reagent, ditiotreitol) või TCEP (tris(2-karboksüetüül)fosfiinhüdrokloriid; Getz et al., (1999) Anal. Biochem., 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) ja seejärel taastada reoksüdeerimise teel ahelasisesed ja ahelavahelised disulfiidsidemed (näide 5). Näiteks redutseeritakse täispikad tsüsteiiniga konstrueeritud monokloonsed antikehad (ThioMab-id), mis on ekspresseeritud CHO rakkudes, TCEP-i umbes 50-kordse molaarse liiaga 3 tunni jooksul temperatuuril 37 °C, et redutseerida disulfiidsidemed tsüsteiniaduktides, mis võivad moodustuda äsja sisestatud tsüsteiinijääkide ning söötmes sisalduva tsüsteiini vahel. Redutseeritud ThioMab lahjendatakse ja sisestatakse HiTrap S kolonni 10 mM naatriumatsetaadis, pH 5, ning elueeritakse 0,3 M naatriumkloriidi sisaldava PBS-iga. Disulfiidsidemed taasluuakse lähte-Mab-s sisalduvate tsüsteiinijääkide vahel vasksulfaadi (CuSO<sub>4</sub>) lahjendatud (200 nM) vesilahusega öö jooksul toatemperatuuril. Alternatiivselt on dehüdroaskorbiinhape (DHAA) tõhusaks oksüdandiks tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha ahelasiseste disulfiidrühmade taastamisel pärast tsüsteiniaduktide reduktiivset lõhustamist. Kasutada võib muid tehnika tasemest tuntud oksüdante ehk oksüdeerivaid aineid ning oksüdeerimistingimusi. Tõhus on ka oksüdeerimine ümbritseva õhuga. Sellises leebes, osalises reoksüdatsoonietapis moodustuvad efektiivselt ja suure usaldusväärsusega ahelavahelised disulfiidid ning säilivad äsja sisestatud tsüsteiinijääkide tiolrühmad. Ravimi-linkeri vaheühendi umbes 10-kordne liig, nt MC-vc-PAB-MMAE, lisati, segati ja segu jäeti umbes tunniks toatemperatuurile seisma, et käivituks konjugeerimine ja moodustuks CD79b-vastase antikeha-ravimi konjugaat. Konjugatsioonisegu geelfiltriti, kanti kolonni ja elueeriti HiTrap S kolonnis ravim-linker vaheühendi liia ning muude lisandite eemaldamiseks.

**[0632]** Joonisel 23 on kujutatud tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha, mis ekspresseeritakse konjugatsiooniks rakukultuurist, üldine valmistamismeetod. Kui rakukultuuri sööde sisaldab tsüsteiini, võivad äsja sisestatud aminohappe tsüsteiini ja söötmes sisalduva tsüsteiini vahel moodustuda disulfiidaduktid. Need tsüsteiniaduktid, mis on joonise 23 näidis-ThioMab-is

(vasakpoolne) tähistatud ringiga, tuleb konjugeerimiseks sobivate (reaktsioonivõimeliste) tsüsteiiniga konstrueeritud antikehade loomiseks redutseerida. Tsüsteiiniaduktid, eeldatavalt koos mitmesuguste ahelavaheliste disulfiidsidemetega, lõhustatakse antikeha redutseeritud vormi saamiseks reduktiivselt redutseerijatega nagu TCEP. Ahelavahelised disulfiidsidemed paardunud tsüsteiinijääkide vahel taastatakse osalise oksüdatsiooni tingimustes vasksulfaadi, DHAA või ümbritsevas õhus sisalduva hapnikuga. Äsja sisestatud, konstrueeritud ja paardumata tsüsteiinijäägid võivad reageerida linkerreagentide või ravimi-linkeri vaheühendidega, mille tulemusel tekivad leiutisekohased antikeha konjugaadid. Imetaja rakuliinides ekspresseeritud ThioMab-ide puhul tekivad väliselt konjugeeritud Cys-aduktid konstrueeritud Cys-le-S-S-sideme moodustumise kaudumbes Sellest tulenevalt kasutatakse puhastatud ThioMab-ide puhul näites 5 kirjeldatud reduktsiooni- ja reoksüdatsiooniprotseduure, mille tulemusel saadakse reaktsioonivõimelised ThioMab-id. Need ThioMab-id konjugeeritakse maleimiidi sisaldavate tsütotoksiliste ravimite, fluorofooride ja muude määrgistega.

#### 10. Immunoliposoomid

**[0633]** Käesolevas dokumendis kirjeldatavaid CD79b-vastastest antikehadest võib valmistada ka immunoliposoomid. „Liposoom“ on erinevat tüüpi lipiididest, fosfolipiididest ja/või pindaktiivsest ainest koosnev väike vesiikul, mis on kasulik ravimi manustamisel imetajale. Liposoomi koostisosad paiknevad üldjuhul kahekihiliselt ehk nende paigustus sarnaneb lipiidide paigutusele bioloogilistes membraanides. Kõnealust antikeha sisaldavad liposoomid valmistatakse tehnika tasemest teadaolevate meetoditel, mida on kirjeldatud näiteks publikatsioonides Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); patentides US 4485045 ja US 4544545; ning WO 97/38731, avaldatud 23. oktoobril 1997. Vereringes pikemalt ringlevaid liposoomi kirjeldatakse US patendis 5013556.

**[0634]** Eriti kasulikke liposoomi võib valmistada pöördfaasi-aurustamismeetodil lipiidide kompositsiooniga, mis sisaldab fosfatidüülkoliini, kolesterooli ja PEG-derivaaditud fosfatidüületanolamiini (PEG-PE). Soovitud läbimõõduga liposoomide saamiseks ekstrudeeritakse liposoomid läbi kindlaksmääratud poori suurusega filtre. Leiutisekohase antikeha Fab'-fragmente võib liposoomidega konjugeerida disulfiidi vahetusreaktsiooni kaudu, mida kirjeldatakse publikatsioonis Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982). Liposoom

sisaldab valikulisel ka kemoterapeutikumi, vt. Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

## B. Teatud meetodid antikehade valmistamiseks

### I. Soovitud omadustega CD79b-vastaste antikehade sõelumine

[0635] Eespool on kirjeldatud CD79b polüpeptiididega seonduvate antikehade valmistamis-meetodeid. Soovi korral võib lisaks valida teatud bioloogiliste omadustega antikehi.

[0636] Leiutisekohase CD79b-vastase antikeha kasvu pärssivaid mõjusid võib hinnata teh-nika tasemest teadaolevatel meetoditel, nt kasutades rakke, mis ekspresseerivad CD79b polü-peptiidi kas endogeenselt või pärast CD79b geeniga transfekteerimist. Näiteks on võimalik asjakohaseid kasvaja rakuliine ja CD79b geeniga transfekteeritud rakke töödelda mõne päeva (nt 2-7 päeva) jooksul erinevates kontsentratsioonides leiutisekohase CD79b-vastase mono-kloonse antikehaga ning värvida kristallvioleti või MTT-ga või analüüsida mõne muu kolori-meetrilise analüüsi abil. Veel üks proliferatsiooni mõõtmise viis on <sup>3</sup>H-tümidüüni omastamise võrdlemine rakkudes, mida on töödeldud leiutisekohase CD79b-vastase antikeha juuresolekul või puudumisel. Töötluse järel kogutakse rakud kokku ja DNA-sse kaasatud radioaktiivsus kvantifitseeritakse stsintillatsiooniloenduris. Asjakohased positiivsed kontrollvahendid hõl-mavad valitud rakuliini töötlemist kasvu pärssiva antikehaga, mis pärssib teadaolevalt selle rakuliini kasvumises Kasvajarakkude kasvu pärssimist *in vivo* võib määrata mitmel tehnika tasemest tuntud viisil. Kasvajarakk võib olla kasvajarakk, mille korral toimub CD79b polüpeptiidi üleekspressioon. Ühes teostuses pärssib CD79b-vastane antikeha antikeha kontsentratsioonil 0,5 kuni 30 µg/ml CD79b poolt ekspresseeriva kasvajaraku proliferatsiooni *in vitro* või *in vivo* võrdluses töötlemata kasvajarakuga umbes 25-100%, eelistatavalt umbes 30-100% ja veelgi eelistatavamalt umbes 50-100% või 70-100%. Kasvu pärssimine on mõõdetav antikeha kontsentratsioonil 0,5 kuni 30 µg/ml või 0,5 nM kuni 200 nM rakukultuuris, milles kasvu pärssimine määratakse 1-10 päeva möödumisel kasvajarakkude antikehaga kokkupuutesse viimisest. Antikeha on *in vivo* kasvu pärssiv, kui CD79b-vastase antikeha manustamine koguses 1 µg kuni 100 mg kehakaalu kilogrammi kohta toob kaasa kasvaja suuruse vähenemise või kasvajarakkude proliferatsiooni

vähendamise 5 päeva kuni 3 kuu jooksul alates antikeha esmakordsest manustamisest, eelistatavalt umbes 5 kuni 30 päeva jooksul.

[0637] Selleks, et valida rakusurma indutseeriv CD79b-vastane antikeha, võib hinnata membraani terviklikkuse vähendamist võrreldes kontrollüksusega, mida näitab nt propiidiumjodiid (PI), trüpaansinine või 7AAD omastamine. PI omastamise analüüsi võib teha komplemendi ja immuunsüsteemi efektorrakkudeta. CD79b polüpeptiidi ekspresseerivaid kasvajakasvureid inkubeeritakse ainult söötme või söötmega, mis sisaldab asjakohast CD79b-vastast antikeha (nt koguses umbes 10 µg/ml). Rakke inkubeeritakse 3 päeva. Iga töötuse järel rakke pestakse ja alikvooditakse 35 mm sõelkorgiga 12 x 75 torudesse (1 ml toru kohta, 3 toru töötlusrühma kohta), et eemaldada rakukämbud. Seejärel sisestatakse torudesse PI (10 µg/ml). Proove võib analüüsida FACSCAN® voolutsütomeetri ja FACSCONVERT® CellQuest tADCvara (Becton Dickinson) abil. CD79b-vastaseid antikehi, mis PI omastamise põhjal määratuna kutsuvad esile statistiliselt olulise rakusurma, võib selekteerida rakusurma esile kutsuvate CD79b-vastaste antikehadena.

[0638] Selleks, et sõeluda antikehi, mis seonduvad CD79b polüpeptiidil paikneva epitoobiga, millega seondub huvipakkuv antikeha, võib kasutada tavapärasest risttõkestamise (*cross-blocking*) analüüsi, mida kirjeldatakse publikatsioonis *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow, David Lane (1988). Selle analüüsiga saab teha kindlaks, kas analüüsis vaadeldav antikeha seondub sama koha või epitoobiga mis teadaolev CD79b-vastane antikeha. Alternatiivselt või täiendavalt võib tehnika tasemest tuntud meetoditel teha epitoobi kaardistamise. Näiteks antikeha järjestust võib mutageenidaalaniini skaneerimise teel, et tuvastada kontaktjäägid. Mutantantikeha analüüsitakse esmalt polükloonse antikehaga seondumise suhtes, tagamaks õige voltumise. Veel ühe meetodi kohaselt võib CD79b polüpeptiidi erinevatele piirkondadele vastavaid peptiide kasutada konkurentsianalüüsides, mis hõlmavad testitavaid antikehi või testitavat antikeha ja iseloomustatud või teadaoleva epitoobiga antikeha.

## 2. Teatud raamatukogude sõelumismeetodid

[0639] Leiutisekohaseid CD79b-vastaseid antikehi võib valmistada kombinatoorsete raamatukogude sõelumise teel eesmärgiga saada soovitud toime või toimetega antikehad. Näiteks tehnika tasemest on teada mitmesugused erinevad meetodid faagi eksponeerimise raamatu-

kogude loomiseks ja selliste raamatukogude sõelumiseks eesmärgiga leiduda soovitud sidumismomadustega antikehad. Selliseid meetodeid on üldiselt kirjeldatud publikatsioonis Hoogenboom et al., (2001) *Methods in Molecular Biology*, 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ) ning teatud teostustes publikatsioonis Lee et al., (2004) *J. Mol. Biol.*, 340: 1073-1093.

**[0640]** Selleks, et valida sünteetilise antikeha kloone, sõelutakse faagiraamatukogusid, mis sisaldavad faagi, mis eksponeerivad erinevaid antikeha varieeruva piirkonna fragmente (Fv) sulandunult faagi kattevalguga. Selliseid faagiraamatukogusid sorteeritakse affiinsuskromatograafia abil soovitud antigeeni suhtes. Soovitud antigeeniga seonduvaid Fv fragmente ekspresseerivad kloonid adsorbeeritakse antigeenile ja eraldatakse seeläbi raamatukogus sisalduvatest mitteseonduvatest kloonidest. Seejärel eemaldatakse seonduvad kloonid elueerimise teel antigeenist ja neid võib rikastada ka täiendavate antigeenide adsorbeerimis/elueerimistsüklite teel. Mis tahes leiutisekohast CD79b-vastast antikeha võib saada selleks loodava sobiva antigeenide sõelumisprotseduuriga, millega valitakse huvipakkuv faagi kloon, ja seejärel konstrueeritakse Fv järjestuste ning sobivate konstantse piirkonna (Fc) järjestuste abil täispikk CD79b-vastase antikeha kloon, vt kirjeldust publikatsioonis Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), köited 1-3.

**[0641]** Teatud teostustes moodustavad antikeha antigeeni siduva domeeni kaks varieeruvat (V) piirkonda, mis koosnevad umbes 110 aminohapest ja millest üks pärineb kergest (VL) ja üks raskest (VH) ahelast, millest kummalgi on kolm hüpervarieeruvat piirkonda (HVR) või komplementaarsust määravat piirkonda (CDR). Varieeruvaid domeene võib faagil funktsionaalselt eksponeerida kas üheahelalise Fv (scFv) fragmentidena, mille korral VH ja VL on kovalentselt seotud lühikese, painduva peptiidi kaudu, või Fab fragmentidena, mille korral igauks neist on sulandunud konstantse piirkonnaga ning nende vahel avaldub mittekovalentne vastasmõju, nagu on kirjeldatud publikatsioonis Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Käesolevas dokumendis kasutatakse scFv kodeeritud faagi kloonide ja Fab kodeeritud faagi kloonide puhul üldnimetust „Fv faagi kloonid“ või „Fv kloonid“.

**[0642]** VH ja VL geenide repertuaari võib eraldi kloonida polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) teel ning juhuslikult rekombineerida faagiraamatukogudes, millest saab seejärel otsida antigeeni siduvaid kloone, nagu on kirjeldatud publikatsioonis Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Immuniseeritud allikatest pärinevad raamatukogud pakuvad

immunogeenile kõrge afiinsusega antikehi vajaduseta konstrueerida hübriidome. Alternatiivselt võib kloonida naiivse repertuaari, et saada immuniseerimiseta paljude erinevate võõraste kui ka iseenda antigeenide vastaste inimpäritolu antikehade allikas, nagu on kirjeldatud publikatsioonis Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Lõpetuseks, võimalik on ka naiivsete raamatukogude tehnilik valmistamine ümberasetamata V-geeni segmentide kloonimise teel tüvirakkudest ning juhuslikku järjestust sisaldavate PCR praimerite kasutamine kõrge varieeruvusega CDR3 piirkondade kodeerimiseks ja ümberpaiknemise tegemiseks *in vitro*, nagu on kirjeldatud publikatsioonis Hoogenboom, Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

**[0643]** Teatud teostustes kasutatakse filamentset faagi antikeha fragmentide eksponeerimiseks sulandamisel väikese kattevalguga pIII. Antikeha fragmente võib eksponeerida üheaahelalise Fv fragmentidena, milles VH ja VL domeenid on ühendatud samal polüpeptiidahelal painduva polüpeptiidvahelüluga, nt nagu on kirjeldatud publikatsioonis Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), või Fab fragmendina, mille üks ahel on sulandatud pIII-ga ja teine sekreteeritakse bakteriaalse peremeesraku periplasmasse, ning Fab-kattevalgu struktuuri koostis avaldub faagi pinnal mõningate metsiktüüpi kattevalgude ümberpaigutamise teel, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

**[0644]** Üldjuhul saadakse antikeha geenifragmente kodeerivad nukleinhapped inimestelt või loomadelt kogutud immuunrakkudest. Kui soovitakse CD79b-vastaste kloonide kasuks kallutatud raamatukogua, immuniseeritakse antikehavastuse esilekutsumiseks subjekt CD79b-ga ja põrnarakud ning/või vereringes ringlevad B-rakud või muud perifeerse vere lümfotsüüdid (PBL) talletatakse raamatukogu moodustamiseks. Eelistatud teostuses saadakse inimese antikeha geenifragmentide raamatukogu, mis on kallutatud CD79b-vastaste kloonide kasuks, CD79b-vastase antikehavastuse esilekutsumise teel transgeensetel hiirtel, kes kannavad inimese funktsionaalset immunoglobuliini geenikiipi (ja kellel puudub funktsionaalne endogeenne antikehade tootmise süsteem), nii et CD79b immuniseerimisel tekivad B-rakud, mis toodavad inimese CD79b-vastaseid antikehi. Inimese antikehi tootvate transgeensete hiirte loomist kirjeldatakse allpool.

**[0645]** Täiendav rikastus CD79b-vastaste reaktsioonivõimeliste rakupopulatsioonide osas on saavutatav sobiva sõelumisprotseduuriga, milles eraldatakse B-rakud, mis ekspresseerivad CD79b-spetsiifilist membraaniga seotud antikeha, näiteks rakkude lahutamise teel, milleks

kasutatakse CD79b afiinsuskromatograafiat või rakkude adsorptsiooni fluorokroomiga märgistatud CD79b-le, millele järgneb läbivoolutsütomeetiline rakkude sorteerimine (FACS).

**[0646]** Alternatiivselt saab põrnarakkude ja/või B-rakkude või muude immuniseerimata, doonorilt saadud PBL-ide kasutamisel parema võimaliku antikeharepertuaari ning nende abil saab luua ka antikeharaamatukogu mis tahes loomaliigi (inimese või mitte-inimese) abil, mille korral CD79b ei ole antigeenne. Kui on tegemist raamatukoguga, mis hõlmab antikeha geeni konstrueerimist *in vitro*, kogutakse tüvirakud subjektilt eesmärgiga saada ümberasetamata antikeha geenifragmente kodeerivad nukleiinhapped. Huvipakkuvaid immuunrakke võib saada mitmesugustelt loomaliikidelt, näiteks inimeselt, hiirelt, rotilt, jäneselastelt, huntlastelt, koerlastelt, kaslastelt, sigadelt, veistelt, hobustelt, linnuliikidelt jne.

**[0647]** Nukleiinhapped, mis kodeerivad antikeha varieeruvaid geenifragmente (sealhulgas VH ja VL segmente), võetakse huvipakkuvatest rakkudest ning amplifitseeritakse. Ümberkorraldatud VH ja VL geeniraamatukogude korral võib saada soovitud DNA-d genoomse DNA või mRNA eraldamisel lümfotsüütidest, millele järgneb polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) praimeritega, mis vastavad ümberkorraldatud VH ja VL geenide 5'-ning 3'-otstele, nagu on kirjeldatud publikatsioonis Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), mille tulemusena saadakse erinevad V-geeni repertuaarid ekspressiooniks. V-geene võib amplifitseerida cDNA-st ja genoomsest DNA-st, kusjuures tagumised praimerid on küpset V-domeeni kodeeriva eksoni 5'-otsal ja eesmised praimerid paiknevad J-segmenendis, nagu on kirjeldatud publikatsioonides Orlandi et al., (1989) ja Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989). Samas, cDNA-lt amplifitseerimiseks võivad tagumised praimerid paikneda ka liidereksonis, nagu on kirjeldatud publikatsioonis Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), ning eesmised praimerid konstantses piirkonnas, nagu on kirjeldatud publikatsioonis Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Selleks, et tagada maksimaalne komplementaarsus, võib praimer olla kōdupraimer, nagu on kirjeldatud publikatsioonides Orlandi et al. (1989) või Sastry et al. (1989). Teatud teostustes tagatakse raamatukogu maksimaalne mitmekesisus PCR praimeritega, mis on suunatud igale V-geeni perekonnale kõigi saadavate VH ja VL asetuste, mis sisalduvad immuunraku nukleiinhappe proovis, amplifitseerimiseks, nagu kirjeldatakse seoses meetodiga publikatsioonis Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) või nagu kirjeldatakse publikatsioonis Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Amplifitseeritud DNA kloonimiseks ekspressioonivektoritesse võib PCR praimerit ühes otsas kasutada



märgisena üksikuid restriksioonisaite, nagu on kirjeldatud publikatsioonis Orlandi et al. (1989), või täiendavat PCR amplifitseerimist märgistatud praimeriga, nagu on kirjeldatud publikatsioonis Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991).

**[0648]** Sünteetiliselt ümberkorraldatud V-geenide repertuaari saab tuletada *in vitro* V-geeni segmentidest. Suurem osa inimese VH-geeni segmentidest on kloonitud ja järjestatud (vt. Tomlinson et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)) ning kaardistatud (vt. Matsuda et al., *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)); neid kloonitud segmente (sh. kõiki H1 ja H2 lingude suuri konformatsioone) võib kasutada mitmesuguste VH geenirepertuaaride loomiseks PCR praimeritega, mis kodeerivad mitmesuguse järjestuse ning pikkusega H3 linge, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Hoogenboom, Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). VH repertuaari võib valmistada ka juhul, kus kogu järjestuse mitmekesisus on keskendatud pikka ühtsesse H3 linge, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Inimese  $V\kappa$  ja  $V\lambda$  segmendid on kloonitud ning järjestatud (vt. Williams, Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) ja neid võib kasutada kerge ahela sünteetiliste repertuaaride valmistamiseks. V-geeni sünteetilised repertuaarid, mis põhinevad VH- ja VL korduste teatud valikul ning L3 ja H3 pikkustel, kodeerivad arvestatava struktuurilise mitmekesisusega antikehi. DNA-sid kodeeriva V-geeni amplifitseerimise järel saab iduliini V-geeni segmente *in vitro* ümber korraldada meetoditel, mida kirjeldatakse publikatsioonis Hoogenboom, Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

**[0649]** Antikehafragmentide repertuaare saab konstrueerida VH- ja VL-geenirepertuaaride mitmel viisil rekombineerimise teel. Iga repertuaari saab luua erinevates vektorites ja vektoreid rekombineerida *in vitro*, nagu on kirjeldatud publikatsioonis Hogrefe et al., *Gene*, 128: 119-126 (1993), või *in vivo* kombinatoorse infektsiooni teel, nt loxP süsteemi abil, mida kirjeldatakse publikatsioonis Waterhouse, et al., *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). *In vivo* rekombineerimisel kasutatakse Fab fragmentide kaheaheelalist olemust, mis võimaldab ületada *E. coli* transformatsiooni efektiivsuse poolt raamatukogu suurusele kehtestatud piirangumbe. Niiivõimaldab VH- ja VL-repertuaarid kloonitakse eraldi, üks fagemiidiks ning teine faagivektoriks. Seejärel kombineeritakse kaks raamatukogu fagemiidi sisaldavate bakterite faagiinfektsiooni teel, nii et iga rakk sisaldab erinevat kombinatsiooni ja raamatukogu suurus piirab ainult olemasolevate rakkude arv (umbes  $10^{12}$  klooni). Kumbki vektor sisaldab *in vivo* rekombinatsioonisignaale, seega rekombineeritakse VH- ja VL-geenid ühtsele

replikonile ning pakitakse koos faagi virioonidesse. Need hiigelsuured raamatukogud pakuvad suurel arvul mitmesuguseid hea afiinsusega antikehi ( $K_d^{-1}$  umbes  $10^8$  M).

**[0650]** Alternatiivselt võib kloonida repertuaarid järjest samasse vektorisse, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), või kokku panna PCR-meetodil ja seejärel kloonida, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Samuti võib PCR koostamisel kasutada VH ja VL DNA-de ühendamiseks painduvat peptiidvahelüli, et moodustada kodeeriva DNA-ga üheaheelalise Fv (scFv) repertuaare. Veel ühe meetodi kohaselt kasutatakse „rakusisest PCR koostamist“ VH- ja VL-geenide kombineerimiseks lümfotsüütides PCR-meetodil, millele järgneb seotud geenide repertuaaride kloonimine, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

**[0651]** Naiivsete raamatukogude toodetud antikehad (kas looduslikud või sünteetilised) võivad olla mõõduka afiinsusega ( $K_d^{-1}$  umbes  $10^6$  kuni  $10^7$   $M^{-1}$ ), kuid võimalik on ka afiinsuse küpsemise jäljendamine *in vitro* teiseste raamatukogude konstrueerimise ja neist ümbervalimise teel, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Winter et al. (1994), (vt eespool). Näiteks on võimalik mutatsiooni juhuslik sisseviimine *in vitro*, kasutades vigadele vastuvõtlikku polümeraasi (vt. Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)) vastavalt meetodile publikatsioonis Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) või meetodile publikatsioonis Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992). Täiendavalt on võimalik afiinsuse küllastamine ühe või enama CDR-i juhusliku muteerimise teel, nt kasutades PCR-i praimeritega, mis kannavad huvipakkuvat CDR-i hõlmavat juhuslikku järjestust, valitud individuaalsetes Fv kloonides, ning sõelumise teel tugevama afiinsusega kloonide leidmiseks. WO 9607754 (avaldatud 14. märtsil 1996) kirjeldab mutageneesi esilekutsumise meetodit immunoglobuliini kerge ahela komplementaarsust määravas piirkonnas kerge ahela geenide raamatukogu loomiseks. Veel üheks efektiivseks lähenemiseks on faagimeetodil valitud VH- või VL-domeenide rekombineerimine looduslikult esinevate V-domeeni variantide repertuaaridega, mis on saadud immuniseerimata doonoritelt, ning sõelumine tugevama afiinsuse leidmiseks ahela mitmekordse ümbersegamise raames, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Kõnealune tehnika võimaldab toota antikehi ja antikehafragmente afiinsusega umbes  $10^9$  M või vähem.

**[0652]** Raamatukogusid võib sõeluda mitmetel tehnika tasemest tuntud meetoditel. Näiteks CD79b võib kasutada adsorptsiooniplaatide süvendite katmiseks, ekspresseerida adsorptsioo-

niplaatidele kinnitunud peremeesrakkudes või kasutada rakkude sorteerimisel või konjugeerida biotiiniga streptavidiiniga kaetud helmeste abil püüdmiseks või kasutada mis tahes muul meetodil faagi-displai raamatukogude sorteerimiseks.

**[0653]** Faagiraamatukogu proovid viiakse kokkupuutesse immobiliseeritud CD79b-ga tingimustes, mis sobivad vähemalt faagiosakeste teatud osa sidumiseks adsorbendiga. Üldjuhul valitakse tingimused, sh pH, ioontugevus, temperatuur jms, mis vastavad füsioloogilistele tingimustele. Tahke faasiga seondunud faagid pestakse ja elueeritakse seejärel happega, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), või leelisega, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), või CD79b antigeeni konkurendiga, näiteks protseduuris, mis sarnaneb antigeeniga konkureerimise meetodiga vastavalt Clackson et al. kirjeldusele, Nature, 352: 624-628 (1991). Faage saab ühe selektsioonivooru jooksul rikastada 20-1000-kordselt. Lisaks saab rikastatud faage kasvatada bakterikultuuris ja rakendada nende suhtes täiendavaid selektsioonivoorusid.

**[0654]** Selektiooni efektiivsus sõltub mitmest tegurist, sh dissotsiatsiooni kineetikast pesemise ajal ning sellest, kas mitu antikehaosamolekuli ühel faagil saavad üheaegselt antigeeniga haakuda. Kiire dissotsiatsiooni kineetikaga (ja nõrkade sidumisafiinsustega) antikehi saab kinni hoida lühikeste pesumenetluste kasutamise, multivalentse faagimeetodi ja antigeeni suure kattetiheduse abil. Lisaks sellele, et suur tihedus stabiliseerib faagi multivalentsete interaktsioonide kaudu, soodustab see dissotsieerunud faagi taassidumist. Aeglase dissotsiatsiooni kineetikaga (ja heade sidumisafiinsustega) antikehade selektsiooni võib soodustada pikkade pesuprotseduuride ning monovalentse faagimeetodi kasutamise teel, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990) ja WO 92/09690, ning antigeeni väikese kattetiheduse abil, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

**[0655]** Valida võib erinevate afiinsustega faagi antikehade vahel, kusjuures afiinsused võivad CD79b jaoks isegi veidi erineda. Samas on tõenäoline, et valitud antikeha juhuslik mutatsioon (nt mõningate afiinsuse küpsemise tehnikate raames) annab tulemuseks palju mutante – suurem osa neist seondub antigeeniga ja vähestele on omane suurem afiinsus. CD79b piiramisel võib valida haruldasi tugeva afiinsusega faage konkureerimise teel. Kõigi tugeva afiinsusega mutantide alleshoidmiseks võib faage inkubeerida biotinüülitud CD79b liiaga, kuid biotinüülitud CD79b kontsentratsiooni molaarsus peab olema madalam

taotletavast molaarsest afiinsuskonstandist CD79b jaoks. Seejärel saab kõrge afiinsusega sidumisfaage püüda streptavidiinkattega paramagnetilistele helmestele. Niisugune „tasakaaluline püüdmine“ võimaldab valida antikehi vastavalt nende sidumisafiinsusele tundlikkusel, mis võimaldab eraldada mutantsed kloonid, mille afiinsus on kõigest kaks korda suurem võrdluses valdava enamiku madalama afiinsusega faagidega. Tahkele faasile seondunud faagide pesemisel kasutatavaid tingimusi võib samuti muuta dissotsiatsiooni kineetikal põhinevaks eristamiseks.

**[0656]** CD79b-vastase antikeha kloone võib valida aktiivsuse põhjal. Käesoleva leiutise teatud teostustes pakutakse CD79b-vastaseid antikehi, mis seonduvad elusrakkudega, mis ekspresseerivad looduslikult CD79b-d. Käesoleva leiutise ühes teostuses pakutakse CD79b-vastaseid antikehi, mis blokeerivad CD79b ligandi ja CD79b vahelise seondumise, kuid ei blokeeri CD79b ligandi ning teise valgu vahelist seondumist. Niisugustele CD79b-vastastele antikehadele vastavaid Fv kloone võib valida järgmiselt: (1) CD79b-vastased kloonid eraldatakse faagiraamatukogust ülalkirjeldatud viisil ja faagikloonide eraldatud populatsiooni amplifitseeritakse valikuliselt populatsiooni kasvatamise teel sobivas bakterperemes, (2) valitakse CD79b ja teine valk, mille suhtes soovitakse vastavalt blokeerivat ning mitteblokeerivat toimet, (3) CD79b-vastased faagikloonid adsorbeeritakse immobiliseeritud CD79b-le, (4) teise valgu liiaga elueeritakse mis tahes soovimatud kloonid, mis tunnevad ära CD79b seondumise determinante, mis kattuvad või on ühised teise valgu seondumise determinantidega, ning (5) elueeritakse kloonid, mis jäävad etapi (4) järel adsorbeerunuks. Valikuliselt võib soovitud blokeerimis/mitteblokeerimisomadustega kloone täiendavalt rikastada siin kirjeldatud selektsiooniprotseduuride ühe- või mitmekordse kordamise teel.

**[0657]** Leiutisekohaseid faagimeetodil saadud Fv kloone või hübriidoomist saadud monokloonseid antikehi kodeerivat DNA-d on lihtne eraldada ning järjestada tavapärastel meetoditel (nt kasutades oligonukleotiidpraimereid, mis on loodud huvipakkuvate rasket ja kerget ahelat kodeerivate piirkondade amplifitseerimiseks hübriidoomi või faagi DNA maatriksist). Eraldamise järel võib DNA paigutada ekspressioonivektoritesse, mis seejärel transfekteeritakse peremeesrakkudesse, nagu *E. coli* rakud, ahvi COS rakud, hiina hamstri munarakud (CHO) või müeloomirakud, mis vastasel juhul ei tooda immunoglobuliini valku, soovitud monokloonsete antikehade sünteesi esilekutsumiseks rekombinantsetes peremeesrakkudes. Ülevaateartiklid rekombinantsest ekspressioonist antikeha kodeeriva DNA-ga bakterites

hõlmavad artikleid Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) ja Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992).

**[0658]** Leiutisekohaseid Fv kloone kodeerivat DNA-d võib kombineerida teadaolevate DNA järjestustega, mis kodeerivad raske ahela ja/või kerge ahela konstantseid piirkondi (asjakohased DNA järjestused on leitavad nt publikatsioonist Kabat et al., vt. ülalpool), et luua kloonid, mis kodeerivad täispikki või osalise pikkusega raskeid ja/või kergeid ahelaid. Arusaadavaks loetakse seda, et antud eesmärgil võib kasutada ükskõik millise isotoobi konstantseid piirkondi, sh IgG, IgM, IgA, IgD ja IgE konstantseid piirkondi, ning et vastavad konstantsed piirkonnad on saadavad ükskõik milliselt inim- või loomaliigilt. Fv klooni, mis saadakse ühe loomaliigi (nt inimese) varieeruva domeeni DNA-st ja liidetakse siis muu loomaliigi konstantse piirkonna DNA-ga, et saada „hübriidi“ kodeeriv järjestus (kodeerivad järjestused), määratlus hõlmab käesolevas dokumendis kasutatava „kimäärse“ ja „hübriidse“ antikeha täispikka rasket ja/või kergemat ahelat. Teatud teostustes liidetakse inimese varieeruvast DNA-st saadud Fv kloon inimese konstantse piirkonna DNA-ga, et saada järjestus(ed), mis kodeerib (kodeerivad) inimese täispikki või osalise pikkusega raskeid ja/või kergeid ahelaid.

**[0659]** Hübridoomist saadud CD79b-vastast antikeha kodeerivat DNA-d võib samuti modifitseerida, näiteks hübridoomi klooni homoloogsete hiire järjestuste asendamisel inimese raske ja kerge ahela konstantseid piirkondi kodeeriva järjestusega (nt vastavalt meetodile Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Hübridoomist või Fv kloonist saadud antikeha või osamolekuli kodeerivat DNA-d võib täiendavalt modifitseerida mitte-immunoglobuliini tüüpi polüpeptiidi kodeeriva järjestuse täieliku või osalise kovalentse sidumise teel immunoglobuliini kodeeriva järjestusega. Niisugusel viisil valmistatakse „kimäärseid“ või „hübriidseid“ antikehi, millele on omane leiutisekohaste Fv kloonist või hübridoomi kloonist saadud antikehade seondumise spetsiifilisus.

### C. Antikehast sõltuv ensüümi vahendatud eelravimravi (ADEPT)

**[0660]** Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada ka ADEPT-is antikeha konjugeerimise teel eelravimit aktiveeriva ensüümiga, mis muundab eelravimi (nt peptidüülkemoterapeutikumi, vt WO81/01145) aktiivseks vähivastaseks ravimiks, vt nt WO 88/07378 ja US patenti 4975278.

[0661] ADEPT-iga seoses kasuliku immunokonjugaadi ensüümikomponent hõlmab kõiki ensüüme, mille toimel eelravim muutub aktiivsemaks ja tsütotoksilisemaks vormiks.

[0662] Leiutisekohase meetodi korral kasulike ensüümide hulka kuuluvad, kuid mitte ainult, aluseline fosfataas, mis on kasulik fosfaati sisaldavate eelravimite muutmisel vabadeks ravimiteks, arüülsulfataas, mis on kasulik sulfaati sisaldavate eelravimite muutmisel vabadeks ravimiteks, tsütosiini desaminaas, mis on kasulik mittetoksilise 5-fluorotsütosiini muutmisel vähivastaseks ravimiks 5-fluorouratsiil, proteaasid, nagu *Serratia* proteaas, termolüsiin, subtiliin, karboksüpeptidaasid ja katepsiinid (nagu katepsiinid B ja L), mis on kasulikud peptiide sisaldavate eelravimite muutmisel vabadeks ravimiteks, D-alanüülkarboksüpeptidaasid, mis on kasulikud D-aminohappeasendusi sisaldavate eelravimite muutmisel, süsivesikuid lõhustavad ensüümid nagu  $\beta$ -galaktosidaas ja neuraminidaas, mis on kasulikud glükosüülitud eelravimite muutmisel vabadeks ravimiteks,  $\beta$ -laktamaas, mis on kasulik  $\beta$ -laktaamidega derivaaditud ravimite muutmisel vabadeks ravimiteks, ning penitsilliini amidaasid, nagu penitsilliin V amidaas või penitsilliin G amidaas, mis on kasulikud amiini-lämmastiku derivaatimisel vastavalt fenoksüatsetüül- või fenüülatsetüülrühmadega saadud ravimite muutmisel vabadeks ravimiteks. Alternatiivselt võib ensümaatilise aktiivsusega antikehi, mida tehnika tasemes tuntakse nimetuse „absüümid“ all, kasutada leiutisekohaste eelravimite muutmiseks vabadeks aktiivseteks ravimiteks (vt. nt. Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Antikeha-absüümi konjugaate saab absüümi viimiseks kasvajaraku populatsiooni valmistada siin kirjeldatud viisil.

[0663] Leiutisekohaseid ensüüme võib CD79b-vastaste antikehadega siduda tehnika tasemes hästi tuntud meetoditel, näiteks ülalkirjeldatud heterobifunktsionaalsete ristsidemeid moodustavate reagentide kasutamisega. Alternatiivselt võib konstrueerida liitvalke, mis sisaldavad vähemalt leiutisekohase antikeha antigeeni siduvat piirkonda, mis on ühendatud vähemalt leiutisekohase ensüümi funktsionaalselt aktiivse osaga, kasutades tehnika tasemes hästi tuntud rekombinantse DNA tehnikaid (vt. nt. Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)).

#### D. CD79b-vastane antikeha

[0664] Lisaks siin kirjeldatud CD79b-vastastele antikehadele saab valmistada ka CD79b-vastase antikeha variante. CD79b-vastase antikeha variante võib valmistada kohaste nukleotiidide muutmise kooderivas DNA-s ja/või soovitud antikeha või polüpeptiidi sünteesi teel. Ala asjatundjatele peaks olema arusaadav, et aminohapete muudatused võivad mõjutada

CD97b-vastase antikeha translatsioonijärgseid protsesse, näiteks muuta glükosüülimiskohtade arvu või asukohta või muuta membraani ankurdusega seotud näitajaid.

**[0665]** Siin kirjeldatud CD79b-vastaste antikehade variante võib luua näiteks mis tahes konservatiivseid ja mittekonservatiivseid mutatsioone puudutavate meetodite ning juhiste abil, mida on käsitletud näiteks US patendis 5364934. Variatsiooniks võib olla ühe või enama antikeha või polüpeptiidi kodeeriva koodoni asendus, deletsioon või insertioon, mis toob kaasa muutuse aminohapete järjestuses võrdluses antikeha või polüpeptiidi loodusliku järjestusega. Valikuliselt on variatsiooniks vähemalt ühe aminohappe asendamine mis tahes muu aminohappega ühes või mitmes CD79b-vastase antikeha domeenidest. Juhendit selle kindlaksmääramisel, millist aminohappejääki võib inserteerida, asendada või deleteerida soovitud aktiivsust negatiivselt mõjutamata, võib leida CD79b-vastase antikeha järjestuse võrdlemisel tuntud homoloogsete valgumolekulide omaga ja aminohapete järjestuse muudatuste arvu minimeerimisel kõrge homoloogia piirkondades. Aminohapete asendused võivad tuleneda ühe aminohappe asendamisest teise aminohappega, millel on sarnased struktuuri- ja/või keemilised omadused, näiteks leutsiini asendamisel seriiniga, ehk need võivad olla konservatiivsed aminohappeasendused. Insertioonid või deletsioonid võivad valikuliselt jääda vahemikku umbes 1 kuni 5 aminohapet. Vastuvõetavat variatsiooni saab kindlaks määrata aminohapete insertioonide, deletsioonide või asenduste süstemaatilisel tegemisel järjestuses ja saadud variantide katsetamisel täispikale või küpsele looduslikule järjestusele omase aktiivsuse tuvastamiseks.

**[0666]** Leiutises pakutakse CD79b-vastase antikeha fragmente. Niisugused fragmendid võivad olla N-otsast või C-otsast kärbitud või näiteks võrdluses täispika loodusliku antikeha või valguga mitte sisaldada sisemisi aminohappejääke. Teatud fragmentidel puuduvad aminohappejäägid, mis ei ole CD79b-vastase antikeha soovitud bioloogilise aktiivsuse seisukohast olulised.

**[0667]** CD79b-vastase antikeha fragmente võib valmistada mis tahes tavapärasel meetodil. Soovitud peptiidifragmente võib keemiselt sünteesida. Ühe alternatiivse meetodi korral valmistatakse antikeha või polüpeptiidi fragmendid ensümaatilise lõhustamise teel, nt valgu töötlemisel ensüümiga, mis teadaolevalt lõhustab valkuseid kohtades, mille määravad konkreetsed aminohappejäägid, või DNA lõhustamisel sobivate restriksiooniensüümidega ja soovitud fragmendi eraldamise teel. Veel üks sobiv meetod hõlmab soovitud antikeha või polüpeptiidi fragmenti kodeeriva DNA fragmendi eraldamist ja amplifitseerimist polümeraasi

ahelreaktsiooni (PCR) teel. DNA soovitud otsi määravaid oligonukleotiide kasutatakse PCR-meetodil 5'- ja 3'-praimerite juures. Eelistatavalt on CD79b-vastase antikeha fragmentidel vähemalt üks bioloogiline ja/või immunoloogiline toime, mis on omane siin käsitletud looduslikule CD79b-vastasele antikehale.

**[0668]** Konkreetsete teostuste korral on huvipakkuvad asendused toodud tabelis 8 pealkirja 'eelistatud asendused' all. Kui taolised asendused toovad kaasa bioloogilise aktiivsuse muutumise, tehakse olulised muudatused, mis on tabelis 8 esitatud pealkirja 'näidislikud asendused' all või mida kirjeldatakse täiendavalt allpool seoses aminohapete klassidega, ning saadused sõelutakse.

Tabel 8

Esialgne jääk	Näidisasendused	Eelistatud asendused
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleutsiin	leu
Leu (L)	norleutsiin; 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



Esialgne jääk	Näidisasendused	Eelistatud asendused
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleutsiin	leu

**[0669]** Olulised muudatused CD79b-vastase antikeha toimimisel või immunoloogilises olemuses tehakse asendustega, mis erinevad oluliselt mõju poolest (a) polüpeptiidikarkassi struktuuri asenduspiirkonnas, näiteks leht- või heelikskonformatsioonis, (b) sihtkohas molekuli laengu või hüdrofoobsuse või (c) külghela põhiosa säilitamisel. Looduslikult esinevad jäägid jaotatakse rühmadesse ühiste külghelate omaduste põhjal:

- (1) hüdrofoobsed: norleutsiin, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutraalsed hüdrofiilsed: cys, ser, thr;
- (3) happelised: asp, glu;
- (4) aluselised: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) ahela orientatsiooni mõjutavad jäägid: gly, pro; ning
- (6) aromaatsed: trp, tyr, phe.

**[0670]** Mittekonservatiivsete asenduste puhul asendatakse ühte neist klassidest kuuluv liige teise klassi omaga. Samuti on võimalik niisuguste asendatud jääkide sisseviimine konservatiivsetesse asenduskohtadesse või veelgi eelistatavamalt, allesjäänud (mittekonserveerunud) kohtadesse.

**[0671]** Variatsioone võib teha tehnika tasemest teadaolevatel meetoditel, milleks on näiteks oligonukleotiid-vahendatud (kohtsuunatud) mutagenees,alaniini skaneerimine ja PCR mutagenees. Kohtsuunatud mutageneesi [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)], kassett-mutageneesi [Wells et al., Gene, 34: 315 (1985)], restriksiooni-selektsiooni-mutageneesi [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] või muid teadaolevaid meetodeid saab rakendada kloonitud DNA-le CD79b-vastase antikeha variandi DNA tootmiseks.

**[0672]** Rakendada võib ka skaneerivat aminohapete analüüsi ühe või enama aminohapete tuvastamiseks pideva järjestuse ulatuses. Eelistatavateks skaneeritavateks aminohapeteks on suhteliselt väikesed neutraalsed aminohapped. Sellisteks aminohapeteks onalaniin, glütsiin,

seriin ja tsüsteiin. Alaniin on üldjuhul sellest rühmast eelistatavaks skaneeritavaks aminohappeks, sest see elimineerib külghela beeta-süsinikust edasi ja muudab väiksema tõenäosusega variandi põhiahela konformatsiooni [Cunningham, Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. Lisaks on alaniin üldjuhul eelistatav tulenevalt sellest, et tegu on levinuima aminohappega. Samuti võib seda sageli kohata nii peidetud kui ka nähtavatel positsioonidel [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]. Kui alaniini asendamine ei anna piisavat hulka variante, võib kasutada isosteerilist aminohapet.

**[0673]** Samuti võib mis tahes tsüsteiinijäägi, mis ei ole kaasatud CD79b-vastase antikeha konformatsiooni alalhoidmisse, asendada üldjuhul seriiniga, et parandada molekuli oksüdatiivset stabiilsust ja hoida ära aberrantne ristseondumine. CD79b-vastasele antikehale võib ka lisada tsüsteiinsideme(d), et parandada selle stabiilsust (eelkõige juhul, kui antikehaks on antikehafragment, nt Fv fragment).

**[0674]** Asendusvariandi eriti eelistatav tüüp hõlmab ühe või mitme hüpervarieeruva piirkonna jäägi asendamist vanemantikehas (nt humaniseeritud või inimese antikehas). Üldjuhul on saadud variandil (variantidel), mis valitakse täiendavaks arendamiseks, paremad bioloogilised omadused võrreldes vanemantikehadega, millest nad on loodud. Niisuguste asendusvariantide loomise mugavaks viisiks on afiinsusküpsuseni viimine faagimeetodil. Lühidalt, mitmes hüpervarieeruva piirkonna kohas (nt 6-7 kohas) kutsutakse esile mutatsioonid kõigi võimalike aminohappeasenduste tekitamiseks igas kohas. Nii tekitatud antikehade variandid eksponeeritakse monovalentsel viisil filamentse faagi osakestel kui igasse osakesse pakitud liitstruktuurid M13 geeni III saadusega. Seejärel sõelutakse siin käsitletaval viisil faagi eksponeeritavate variantide bioloogilist aktiivsust (nt. sidumisafiinsust). Modifitseerimiseks sobivate hüpervarieeruva piirkonna kandidaatkohtade tuvastamiseks võib läbi viia mutageneesi skaneerimise alaniiniga, mille abil selgitatakse välja need hüpervarieeruva piirkonna aminohappejäägid, mis aitavad oluliselt kaasa antigeeni sidumisele. Alternatiivselt või täiendavalt võib kasulik olla antigeeni-antikeha kompleksi kristallstruktuuri analüüsimine kokkupuutepunktide tuvastamiseks antikeha ja CD79b polüpeptiidi vahel. Niisugused kokkupuutes osalevad jäägid ja naaberjäägid on kandidaatideks asenduste teostamisel seoses siin käsitletud meetoditega. Kui taolised variandid on loodud, viiakse siin kirjeldatud viisil läbi variantide paneeli sõelumine ja ühes või mitmes asjaomases analüüsis paremaid tulemusi näidanud antikehad võidakse valida edasiseks arendamiseks.

[0675] CD79b-vastase antikeha aminohapete järjestuse variante kodeerivad nukleiinhappe-molekulid valmistatakse tehnika tasemes tuntud mitmesuguste meetoditega. Need meetodid hõlmavad, kuid mitte ainult, eraldamist looduslikust allikast (looduslikult esinevate amino-hapete järjestuste variantide korral) või valmistamist oligonukleotiidide vahendatud (või kohtsuunatud) mutageneesi, PCR mutageneesi ja CD79b-vastase antikeha varem valmistatud variandi või mittevariantse versiooni kassetmutageneesi abil.

#### E. CD79b-vastaste antikehade modifikatsioonid

[0676] Käesoleva leiutise ulatusse kuuluvad ka CD79b-vastaste antikehade kovalentsed mo-difikatsioonid. Üks kovalentse modifikatsiooni liik hõlmab CD79b-vastase antikeha sihtmärk-aminohappejääkide reaktsiooni orgaanilise derivaativa ainega, mis reageerib CD79b-vastase antikeha N- või C-otsa jääkide või valitud külghelatega. Derivaatimine bifunktsionaalsete ainetega on kasulik näiteks CD79b-vastase antikeha ristsidumiseks vees lahustumatu tugimaatriksi või pinnaga kasutamiseks CD79b-vastaste antikehade puhastamise meetodis, ja vastupidi. Üldkasutatavad ristsidujad hõlmavad näiteks järgnevaid: 1,1-bis(diasoatsetüül)-2-fenüületaan, glutaaraldehüüd, N-hüdroksüsuktsiinimiidi estrid, nt estrid 4-asidosalitsüülhappega, homobifunktsionaalsed imidoestrid, sealhulgas disuktsiinimidüül-estrid nagu 3,3'-ditiobis(suktsiinimidüülpropionaat), bifunktsionaalsed maleimiidid nagu bis-N-maleimido-1,8-oktaan ning ained nagu metüül-3-[(p-asidofenüül)ditio]propioimidaat.

[0677] Muud modifikatsioonid hõlmavad glutaminüüli- ja asparaginüüljääkide desamiidi-mist vastavateks glutamüüli- ning aspartüüljääkideks, proliini ja lüsiini hüdroksüülimist, serüüli- või treonüüljääkide hüdroksüülrühmade fosforüülimist, lüsiini, arginiini ja histidiini külghelate  $\alpha$ -aminorühmade metüülimist [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, lk 79-86 (1983)], N-otsa amiini atsüülimist, ning ükskõik millise C-otsa karboksüülrühma amiidimist.

[0678] Veel üks CD79b-vastase antikeha kovalentse modifitseerimise liik, mis kuulub selle leiutise ulatusse, hõlmab antikeha või polüpeptiidi loomuliku glükosüülimismustri muutmist. „Loomuliku glükosüülimismustri muutmine“ tähendab siin ühe või enama süsivesiku-osamolekuli, mis sisaldub loomuliku järjestusega CD79b-vastases antikehas, deleteerimist (kas vastava glükosüülimiskoha kõrvaldamise või glükosüülimise deleteerimise teel keemi-liste ja/või ensümaatiliste vahenditega) ning/või ühe või enama glükosüülimiskoha lisamist,

mis puuduvad CD79b-vastase antikeha loomulikus järjestuses. Mõiste hõlmab lisaks kvalitaatiivseid muutusi loomulike valkude glükosüülimises, sh muutust erinevate süsivesiku-osamolekulide olemuses ja proportsioonides.

**[0679]** Antikehade ja muude polüpeptiidide glükosüülimine on reeglina kas N-seotud või O-seotud. 'N-seotud' viitab süsivesiku-osamolekuli kinnitumisele asparagiinijäägi külgahele. Tripeptiidijärjestused asparagiin-X-seriin ja asparagiin-X-treoniin, milles X on mis tahes aminohape, välja arvatud proliin, on äratundmisjärjestused süsivesiku-osamolekuli ensümaatiliseks liitmiseks asparagiini külgahelega. Seega loob kummagi kõnealuse tripeptiidijärjestuse kohalolu polüpeptiidis potentsiaalse glükosüülimiskoha. O-seotud glükosüülimine viitab N-atsetüülgalaktosamiini, galaktoosi või ksüloosi ühe suhkru liitmisele mõne hüdroksüaminohappega, kõige sagedamini seriini või treoniiniga, ehkki kasutada võib ka 5-hüdroksüproliini või 5-hüdroksülüsiini.

**[0680]** Glükosüülimiskohad lisatakse CD79b-vastasele antikehale aminohapete järjestuse muutmise teel, nii et see sisaldaks üht või enamat ülalkirjeldatud tripeptiidijärjestust (N-seotud glükosüülimiskohtade korral). Muudatust saab teha ka ühe või enama seriini- või treoniinijäägi lisamise või asendamisega esialgse CD79b-vastase antikeha järjestusse (O-seotud glükosüülimiskohtade korral). CD79b-vastase antikeha aminohapete järjestus on valikuliselt muudetav muudatuste kaudu DNA tasemel, eelkõige CD79b-vastase antikeha kodeeriva DNA muutmise teel eelnevalt kindlaksmääratud alustel, nii et tekivad koodonid, mis transleeruvad soovitud aminohapeteks.

**[0681]** Veel üheks süsivesiku-osamolekulide arvu suurendamise võimaluseks CD79b-vastasel antikehal on glükosiidide keemiline või ensümaatiline liitmine polüpeptiidiga. Vastavad meetodid on tehnika tasemest teada, nt WO 87/05330 (avaldatud 11. septembril 1987) ning Aplin, Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981).

**[0682]** CD79b-vastasel antikeha süsivesiku-osamolekule saab eemaldada keemiliselt või ensümaatiliselt või glükosüülimise sihtmärgina toimivaid aminohappejääke kodeerivate koodonite mutatsioonilise asenduse teel. Keemilised deglükosüülimismeetodid on tehnika tasemest teada, neid kirjeldavad nt Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) ja Edge et al., Anal. Biochem., 118: 131 (1981). Süsivesiku-osamolekulide ensümaatiline lõhustamine polüpeptiididel on saavutatav mitmesuguste endo- ja eksoglükosidaaside kasutamise teel, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138: 350 (1987).

**[0683]** Veel üheks CD79b-vastase antikeha kovalentse modifitseerimise viisiks on antikeha ühendamine ühega mitmesugustest mittevalgulistest polümeeridest, nt polüetüleenglükooli (PEG), polüpropüleenglükooli või polüoksüalkeleenidega vastavalt kirjeldustele US patentes 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 või 4179337. Samuti võib antikeha olla sisestatud mikrokapslitesse, mis on valmistatud nt koatservatsioonimeetodil või faasidevahelise polümerisatsiooni teel (nt vastavalt hüdroksümetüülselluloos- või želatiin-mikrokapslitesse või polü(metüülmetakrülaat)-mikrokapslitesse) ravimi kolloidsetesse manustamissüsteemidesse (nagu liposoomid, albumiini mikrosfäärid, mikroemulsioonid, nanoosakesed ja nanokapslid) või makroemulsioonidesse. Vastavad meetodid on avaldatud publikatsioonis Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. väljaanne, Oslo, A., Ed., (1980).

**[0684]** Leiutisest CD79b-vastast antikeha võib samuti modifitseerida viisil, millega valmistatakse kimäärseid molekule, mille koostisse kuulub CD79b-vastane antikeha, mis on liidetud muu heteroloogilise polüpeptiid- või aminohapete järjestusega.

**[0685]** Ühes teostuses hõlmab niisugune kimäärne molekul CD79b-vastase antikeha liitmist märgis-polüpeptiidiga, mis toimib epitoobina, millega märgis-antikeha seondub selektiivselt. Epitoomärgis paikneb üldjuhul CD79b-vastase antikeha amino- või karboksüülsal. CD79b-vastase antikeha taoliste epitoomärgisega vormide juuresolekut võib detekteerida märgis-polüpeptiidi vastase antikeha kasutamisega. Epitoomärgise kasutamisel saab CD79b-vastast antikeha hõlpsasti puhastada afiinsuspuhastamise teel, kasutades märgis-antikeha või muud liiki afiinsusmaatriksit, mis seondub epitoomärgisega. Mitmesugused märgis-polüpeptiidid ja nende vastavad antikehad on tehnika tasemest hästi teada. Näideteks on polühistiin (poly-his) või polühistiin-glütsiin (poly-his-gly) märgised, gripi HA märgis-polüpeptiid ja selle antikeha 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; c-myc märgis ja selle 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 ning 9E10 antikehad [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)], ning lihtherpesviiruse (*Herpes Simplex*) glükoproteiin D (gD) märgis ja selle antikeha [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)]. Muud märgis-polüpeptiidid hõlmavad Flag-peptiidi [Hopp et al., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)], KT3 epitooibi peptiidi [Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)],  $\alpha$ -tubuliini epitooibi peptiide [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)], ning T7 geeni 10 valgu peptiidmärgist [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

[0686] Alternatiivses teostuses võib kimäärne molekul hõlmata CD79b-vastase antikeha liitumist immunoglobuliini või immunoglobuliini konkreetse piirkonnaga. Kimäärse molekuli bivalentse vormi korral (mille kohta kasutatakse ka nimetust „immunoadhesiin“) võib vastav liitumine aset leida IgG molekuli Fc piirkonnaga. Ig liitumised hõlmavad eelistatavalt CD79b-vastase antikeha lahustuva (membraanidevaheline domeen deleteeritud või desaktiveeritud) vormi asendamist vähemalt ühe varieeruva piirkonna kohaga Ig molekulis. Eriti eelistatud teostuses hõlmab immunoglobuliini liitmine IgG1 molekuli liigend-, CH<sub>2</sub> ja CH<sub>3</sub> või liigend-, CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> ja CH<sub>3</sub> piirkondi. Immunoglobuliini liitumiste loomist on kirjeldatud ka 27. juunil 1995 avaldatud US patendis 5428130.

#### F. CD79b-vastaste antikehade valmistamine

[0687] Järgnevas kirjelduses käsitletakse peamiselt CD79b-vastaste antikehade valmistamist CD97b-vastast antikeha kodeerivat nukleiinhapet sisaldava vektoriga transformeeritud või transfekteeritud rakkude kultiveerimise teel. Enesestmõistetavaks loetakse seda, et CD79b-vastaste antikehade valmistamiseks võib rakendada tehnika tasemest hästi tuntud alternatiivseid meetodeid. Näiteks võib vastavat aminohapete järjestust või selle osi valmistada otsese peptiidsünteesi teel, kasutades tahkefaasi-sünteesimeetodeid [vt. nt. Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. Valku võib *in vitro* sünteesida kas manuaalsete või automatiseeritud meetodite abil. Automatiseeritud süntees on teostatav näiteks süntesaatori Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) abil, järgides tootja juhiseid. Soovitav CD79b-vastase antikeha saamiseks on võimalik CD79b-vastase antikeha erinevate osade keemiline sünteesimine eraldi ja kombineerimine keemiliste või ensümaatiliste meetoditega.

#### I. CD79b-vastast antikeha kodeeriva DNA eraldamine

[0688] CD79b-vastast antikeha kodeeriva DNA võib saada cDNA raamatukogust, mis on valmistatud koest, mille kohta arvatakse, et sellel on CD79b-vastase antikeha mRNA ja et see ekspresseerib seda detekteeritaval tasemel. Järelikult võib sellise inimese CD79b-vastase antikeha DNA sobivalt saada inimese koest valmistatud cDNA raamatukogust. CD79b-

vastast antikeha kodeeriva geeni võib saada ka genoomiraamatukogust või tuntud sünteesi-protseduuride abil (nt nukleiinhapete automatiseeritud sünteesiga).

**[0689]** Raamatukogu võib sõeluda huvipakkuva geeni või selle poolt kodeeriva valgu tuvastamiseks kohandatud sondide abil (nagu vähemalt umbes 20-80-aluselised oligonukleotiidid). cDNA või genoomiraamatukogu saab valitud sondiga sõeluda standardsete protseduuride abil, nagu kirjeldatakse publikatsioonis Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). CD79b-vastase antikeha kodeeriva geeni alternatiivseks eraldamisviisiks on PCR-meetod [Sambrook et al., vt. eespool: Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

**[0690]** cDNA raamatukogu sõelumise meetodid on tehnika tasemes hästi teada. Sondideks valitud oligonukleotiidjärjestused peaksid olema piisavalt pikad ja ühetähenduslikud valepositiivsete tulemuste minimeerimiseks. Oligonukleotiid on eelistatavalt märgistatud nõnda, et seda saab detekteerida sõelutavas raamatukogus DNA-ga hübriidimisel. Märgistusemeetodid on tehnika tasemes hästi tuntud ja hõlmavad radiomärgiste nagu  $^{32}\text{P}$ -märgistatud ATP biotinüülimise või ensüümmärgistamise kasutamist. Hübriidiseerimistingimusi, sh keskmist ja suurt rangust, käsitletakse publikatsioonis Sambrook et al., vt. eespool.

**[0691]** Taoliste raamatukogude sõelumise meetodite abil tuvastatud järjestusi saab võrrelda ja kõrvutada muude teadaolevate järjestustega, mis on hoiul ning saadaval avalikes andmebaasides nagu GenBank või muudes eraõiguslikes järjestuste andmebaasides. Järjestuse identsust (kas aminohapete või nukleotiidide tasemel) molekulide määratletud piirkondades või piki täispikka järjestust saab määrata tehnika tasemes tuntud meetoditel ja siin kirjeldatud viisil.

**[0692]** Valku kodeeriva järjestusega nukleiinhappe võib saada valitud cDNA või genoomiraamatukogude sõelumise teel, kasutades siin esmakordselt avaldatud tuletatud aminohapete järjestust ning vajadusel tavapäraseid praimerite pikendamise menetlusi, mida on kirjeldatud publikatsioonis Sambrook et al., vt eespool, detekteerimaks mRNA prekursorid ja töötluse vaheühendeid, mida ei ole pöördtranskribeeritud cDNA-ks.

## 2. Peremeesrakkude valimine ja transformeerimine

[0693] Peremeesrakud transfekteeritakse või transformeeritakse CD79b-vastase antikeha saamiseks siin kirjeldatud ekspressiooni- või kloonimisvektoritega ja kasvatatakse tavapärastes toitekeskkondades, mida on sobivalt modifitseeritud promootorite indutseerimiseks, transformantide valimiseks või soovitud järjestusi kodeerivate geenide amplifitseerimiseks. Asjatundjad oskavad liigseid katsetusi tegemata valida tingimusi nagu sööde, temperatuur, pH vms. Rakukultuuride produktiivsuse maksimeerimise põhimõtteid, eeskirju ja praktilisi meetodeid käsitletakse publikatsioonides *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) ja Sambrook et al., vt eespool.

[0694] Eukarüootsete rakkude transfekteerimise ja prokarüootsete rakkude transformeerimise, mis tähendab DNA sisestamist peremeesse nii, et DNA on replitseeritav, kas ekstrakromosoomse või kromosoomse integrandina, meetodid on ala tavataseme asjatundjale teada, näiteks CaCl<sub>2</sub>, CaPO<sub>4</sub> abil, liposoomide vahendatud meetoditel, polüetüleenglükooli/DMSO abil ja elektroporatsiooniga. Kasutatavast peremeesrakust olenevalt kasutatakse transformeerimiseks vastavatele rakkudele kohaseid standardmeetodeid. Prokarüootide korral kasutatakse tavaliselt töötlemist kaltsiumkloriidiga, mida kirjeldatakse publikatsioonis Sambrook et al., vt eespool, või elektroporatsiooni. Teatud taimerakkude transformeerimiseks kasutatakse nakatamist *Agrobacterium tumefaciens*-iga, nagu kirjeldatakse publikatsioonides Shaw et al., *Gene*, 23: 315 (1983) ja WO 89/05859, avaldatud 29. juunil 1989. Võrreldavate rakuseinteta imetajarakkude korral võib rakendada kaltsiumfosfaadiga sadestamise meetodit, vt Graham, van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Imetaja peremeesrakusüsteemi transfekteerimise üldisi eripärasid on kirjeldatud US patendis 4399216. Transformeerimised pärmiseentesse viiakse tavaliselt läbi publikatsioonides Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130: 946 (1977) ja Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979) kirjeldatud meetodil. Samas võib DNA viimiseks rakkudesse kasutada muidki meetodeid, näiteks mikroinjektsiooni tuumadesse, elektroporatsiooni, bakteriaalsete protoplastide liitmist kahjustamata rakkudega, aga ka polükatioone, näiteks polübreeni või polüornitiini. Imetajarakkude transformeerimisel kasutatavaid erinevaid meetodeid on käsitletud publikatsioonides Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) ja Mansour et al., *Nature*, 336: 348-352 (1988).

[0695] Sobivad peremeesrakud DNA kloonimiseks või ekspresseerimiseks siin kirjeldatud vektorites hõlmavad prokarüootide, pärmiseente või kõrgemate eukarüootide rakke.



## a. Prokarüootsed peremeesrakud

[0696] Sobivad prokarüoodid hõlmavad, kuid mitte ainult, arhebaktereid ja eubaktereid, nagu gramnegatiivsed või grampositiivsed organismid, näiteks bakterid *Enterobacteriaceae* nagu *E. coli*. Erinevad *E. coli* tüved on avalikult saadaval, näiteks *E. coli* K12 tüvi MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* tüvi W3110 (ATCC 27,325) ja K5 772 (ATCC 53,635). Muudeks sobivateks prokarüootseteks peremeesrakkudeks on bakterid *Enterobacteriaceae* nagu *Escherichia*, nt. *E. coli*. *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteins*, *Salmonella*, nt. *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, nt. *Serratia marcescans* ja *Shigella*, samuti *Bacilli* nagu *B. subtilis* ja *B. licheniformis* (nt. *B. licheniformis* 41P, mida on käsitletud 12. aprillil 1989 avaldatud publikatsioonis DD 266,710), *Pseudomonas* nagu *P. aeruginosa*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* ning *Streptomyces*. Need näited on pigem illustreerivad kui piiravad. Tüvi W3110 on üheks eriti eelistatavaks peremeestüveks või algperemeestüveks, sest see on levinud peremeestüvi rekombinantse DNA-saaduse fermenteerimiseks. Eelistatavalt sekreteerib peremeesrakk minimaalsetes kogustes proteolüütilisi ensüüme. Näiteks tüve W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325) võib modifitseerida geneetiliste mutatsioonide esilekutsumiseks peremeestüve suhtes endogeenseid valke kodeerivates geenides, milliste peremeestüvede näideteks on *E. coli* W3110 tüvi 1A2, mille täielik genotüüp on *tonA*; *E. coli* W3110 tüvi 9E4, mille täielik genotüüp on *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 tüvi 27C7 (ATCC 55,244), mille täielik genotüüp on *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan<sup>r</sup>*; *E. coli* W3110 tüvi 37D6, mille täielik genotüüp on *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>*; *E. coli* W3110 tüvi 40B4, milleks on tüvi 37D6 kanamütsiini suhtes mitteresistentse *degP* deletsioonmutatsiooniga; *E. coli* W3110 tüvi 33D3, mille genotüüp on W3110 *AfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kan<sup>R</sup>* (US patent 5639635) ning mutantse periplasmaatilise proteaasiga *E. coli* tüvi, mis on avaldatud US patendis 4946783 7. augustist 1990. Sobivad ka muud tüved ja nende derivaadid, näiteks *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli*<sub>λ</sub> 1776 (ATCC 31,537) ning *E. coli* RV308 (ATCC 31,608). Need näited on pigem illustreerivad kui piiravad. Meetodid ükskõik milliste ülalmainitud, määratletud genotüüpidega bakterite derivaatide loomiseks on tehnika tasemest teada, neid on kirjeldatud

näiteks publikatsioonis Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990). Üldjuhul tuleb sobivate bakterite valimisel arvesse võtta replikoni replitseeritavust bakterirakkudes. Näiteks sobivad peremeheena kasutamiseks *E. coli*, *Serratia*, või *Salmonella* liigid, kui replikoniga varustamiseks kasutatakse hästi tuntud plasmide nagu pBR322, pBR325, pACYC177 või pKN410. Reeglina peaks peremeesrakk sekreteerima minimaalsetes kogustes proteolüütilisi ensüüme, ning eelistatav võib olla täiendavate proteaasiinhibiitorite kaasamine rakukultuuri. Alternatiivselt sobivad kasutamiseks *in vitro* kloonimismeetodid, nt. PCR või muud nukleiinhappe polümeraasireaktsioonid.

**[0697]** Täispikki antikehi, antikehade osamolekule ja antikeha liitvalke võib toota bakterites, eriti juhul, kui glükosüülimist ja Fc efektorfunktsiooni pole tarvis, nagu siis, kui raviotsustabeline antikeha on konjugeeritud tsütotoksilise ainega (nt mõne toksiiniga) ning immuno-konjugaat ise hävitab efektiivselt kasvajak rakke. Täispikkade antikehade poolväärtusaeg vereringes on pikem. *E. coli*-s tootmine on kiirem ja kulutasuvam. Antikehafragmentide ja polüpeptiidide ekspressiooni bakterites on käsitletud nt publikatsioonides US 5648237 (Carter et. al.), US 5789199 (Joly et al.) ja US 5840523 (Simmons et al.), kus kirjeldatakse translatsiooni initsiatsioonipiirkonda (TIR) ning signaaljärjestusi ekspressiooni ja sekretsiooni optimeerimiseks, mainitud patendid esitatakse siin viidetena. Ekspresseerimise järel eraldatakse antikeha *E. coli* rakususpensioonist lahustuva fraktsioonina, seda saab olenevalt isotüübist puhastada nt. A- või G-valgu kolonnist läbilaskmise teel. Lõplik puhastamine võib toimuda sarnaselt nt CHO rakkudes ekspresseeritud antikehade puhastamise protsessiga.

#### b. Eukarüootsed peremeesrakud

**[0698]** Lisaks prokarüootidele on CD79b-vastaseid antikehi kodeerivatele vektoritele sobivateks kloonimise või ekspressiooni peremeesrakkudeks ka eukarüootsed mikroobid nagu filamentsed seened. Tavaliselt kasutatavaks madalaks eukarüootseks peremeesmikroorganismiks on *Saccharomyces cerevisiae*. Muudeks võimalusteks on *Schizosaccharomyces pombe* (Beach, Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139383, avaldatud 2. mail 1985); *Kluyveromyces* peremeesorganismid (US patent 4943529; Fleer et al., *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)), nagu näiteks *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2): 737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilum* (ATCC

36906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans* ja *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* nagu *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394538, avaldatud 31. oktoobril 1990) ja filamentsed seened, nagu näiteks *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357, avaldatud 10. jaanuaril 1991), ning *Aspergillus* peremeesorganismid nagu *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]) ja *A. niger* (Kelly, Hynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]). Sobivad ka metülotroopsed pärmiseened, mis hõlmavad, kuid mitte ainult, pärmiseeni, mis võivad kasvada metanoolil ja on valitud perekondade *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* ning *Rhodotorula* seast. Selle pärmiseente klassi konkreetsete liikide loetelu võib leida publikatsioonist C. Anthony, The Biochemistry of Methylootrophs, 269 (1982).

**[0699]** Sobivad peremeesrakud glükosüülitud CD79b-vastase antikeha ekspresseerimiseks pärinevad paljuraksetest organismidest. Selgrootute rakkude näited hõlmavad putukarakke, nagu *Drosophila* S2 ja *Spodoptera* Sf9, samuti taimerakke, nagu puuvilla, maisi, kartuli, sojaoa, petuunia, tomati ning tubaka rakukultuurid. Identifitseeritud on arvukalt bakuloviiruse tüvesid ja variante ning vastavaid mittekeelatud peremees-putukarakke, mis pärinevad peremeestest nagu *Spodoptera frugiperda* (röövik), *Aedes aegypti* (säask), *Aedes albopictus* (säask), *Drosophila melanogaster* (äädikakärbes) ja *Bombyx mori*. Transfekterimiseks on avalikult saadaval mitmesugused viirusetüved, nt. *Autographa californica* NPV variant L-1, *Bombyx mori* NPV tüvi BM-5, ning selliseid viiruseid võib siin kasutada kui leiutisekohaseid viirusi, eriti *Spodoptera frugiperda* rakkude transfekterimiseks.

**[0700]** Kõige huvipakkuvamad on siiski selgroogsete organismide rakud ning selgroogsete organismide rakkude paljundamine kultuuris (koekultuuris) on muutunud rutiinseks toiminguks. Kasutatavate imetaja-peremeesrakuliinide näideteks on SV40-ga transformeeritud ahvi neerurakuliin CV1 (COS-7, ATCC CRL 1651), inimese embrüonaalse neeruraku tüvi (293 või suspensioonikultuuris kasvatamiseks subkloonitud 293 rakud, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)), hamstripoja neerurakud (BHK, ATCC CCL 10), hiina hamstri munasarjarakud / -DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)), hiire Sertoli rakud (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)), ahvi neerurakud (CV1

ATCC CCL 70), aafrika rohepärdiku neerurakud (VERO-76, ATCC CRL-1587), inimese emakakaela kartsinoomirakud (HELA, ATCC CCL 2), koera neerurakud (MDCK, ATCC CCL 34), piisamrovi maksarakud (BRL 3A, ATCC CRL 1442), inimese kopsurakud (W138, ATCC CCL 75), inimese maksarakud (Hep G2, HB 8065), hiire piimanäärme kasvajarakud (MMT 060562, ATCC CGL51), TRI rakud (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)), MRC 5 rakud, FS4 rakud, ning inimese hepatoomitüvi (Hep G2).

**[0701]** Peremeesrakud transformeeritakse ülalkirjeldatud ekspressiooni- või kloonimisvektoriga CD79b-vastase antikeha saamiseks ja kasvatatakse tavapärasest toitekeskkonnas, mida on sobivalt modifitseeritud promootorite indutseerimiseks, transformantide valimiseks või soovitud järjestusi kodeerivate geenide amplifitseerimiseks.

### 3. Replitseeruva vektori valimine ja kasutamine

**[0702]** Leiutisekohase antikeha rekombinantseks tootmiseks eraldatakse seda kodeeriv nukleiinhape (nt cDNA või genoomne DNA) ja sisestatakse replitseeruvasse vektorisse edasiseks kloonimiseks (DNA amplifitseerimiseks) või ekspresseerimiseks. Antikeha kodeerivat DNA-d on lihtne eraldada ning järjestada tavapärase meetoditega (nt kasutades oligonukleotiidsonde, mis võivad seonduda nimelt antikeha rasket ja kergest ahelat kodeerivate geenidega). Saadaval on palju vektoreid. Vektori valik sõltub osaliselt kasutatavast peremeesrakust. Üldjuhul on eelistatavad peremeesrakud kas prokarüootse või eukarüootse (üldjuhul imetaja) päritoluga.

**[0703]** Vektor võib olla näiteks plasmidi, kosmiidi, viirusosakese või faagi kujul. Sobiva nukleiinhappejärjestuse võib vektorisse sisestada mitmesugustel meetoditel. Tavaliselt sisestatakse DNA sobiva(te)sse endonukleaasi restriksioonikohta(desse), kasutades tehnika tasemes tuntud meetodeid. Vektori komponendid hõlmavad tavaliselt, kuid mitte ainult, üht või enam signaaljärjestust, replikatsiooni alguspunkti, üht või enam markergeeni, võimenduselementi (enhanserit), promootorit ja transkriptsiooni terminatsioonijärjestust. Üht või mitut neist komponentidest sisaldavate sobivate vektorite konstrueerimiseks kasutatakse ala asjatundjale teadaolevaid standardseid ligeerimistehnikaid.

**[0704]** CD79b võib rekombinantsest valmistada mitte ainult otse, vaid ka polüpeptiidi liitmise teel heteroloogse polüpeptiidiga, milleks võib olla signaaljärjestus või teine polüpeptiid, millel on N-otsas küpse valgu või polüpeptiidi spetsiifiline lõhustuskoht.

Tavaliselt võib signaaljärjestus olla vektori komponendiks või olla osa DNA-st, mis kodeerib vektorisse sisestavat CD79b-vastast antikeha. Signaaljärjestuseks võib olla prokarüootne signaaljärjestus, mis on näiteks valitud leeliselise fosfataasi, penitsilinaasi, lpp või kuuma-kindla enterotoksiin II liiderjärjestuste seast. Pärmis sekreteerimiseks võib signaaljärjestuseks olla näiteks pärmis invertaasi liiderjärjestus, alfa-faktori liiderjärjestus (sealhulgas *Saccharomyces*'i ja *Kluyveromyces*'i  $\alpha$ -faktori liiderjärjestus, kusjuures viimast on kirjeldatud US patendis 5010182) või happelise fosfataasi liiderjärjestus, *C. albicans*'i glükoamülaasi liiderjärjestus (EP 362179 avaldatud 4. aprillil 1990) või 15. novembril 1990 avaldatud publikatsioonis WO 90/13646 kirjeldatud signaaljärjestus. Imetajarakkudes ekspresseerimisel võib valgu otseseks sekreteerimiseks kasutada imetaja signaaljärjestusi, nagu sama või sugulasliigi sekreteeritud polüpeptiidide signaaljärjestused, samuti viiruse sekretoorsed liiderjärjestused.

#### a. Prokarüootsed peremeesrakud

**[0705]** Leiutisekohase antikeha polüpeptiidkomponente kodeerivad polünukleotiidjärjestusi võib valmistada standardsete rekombinantsete meetodite abil. Soovitud polünukleotiidjärjestusi võib eraldada ja järjestada antikehi tootvatest rakkudest, näiteks hübridoomirakkudest. Alternatiivselt on polünukleotiidid sünteesitavad nukleotiidisüntesaatori või PCR-tehnika abil. Polüpeptiide kodeerivate järjestuste saamise järel sisestatakse need rekombinantsesse vektorisse, mis on võimeline prokarüootsetes peremeestes replitseeruma ja ekspresseerima heteroloogseid polünukleotiide. Käesoleva leiutise huvides võib kasutada paljusid saadavaid ja tehnika tasemes tuntud vektoreid. Sobiva vektori valik sõltub peamiselt vektorisse sisestavate nukleiinhapete suurusel ja konkreetsest vektoriga transformeeritavast peremeesrakust. Iga vektor sisaldab mitmesuguseid komponente, olenevalt selle funktsioonist (heteroloogilise polünukleotiidi amplifitseerimine või ekspresseerimine, või mõlemad) ja sobivusest konkreetse peremeesrakuga, millel see paikneb.

**[0706]** Seoses nende peremeesrakkudega kasutatakse tavaliselt plasmiidseid vektoreid, mis sisaldavad peremeesrakuga sobivatest liikidest pärinevat replikoni ja kontrolljärjestusi. Nii ekspressiooni- kui ka kloonimisvektorid sisaldavad nukleiinhappejärjestust, mis võimaldab vektoril replitseeruda ühes või mitmes valitud peremeesrakus, nagu ka märgistusjärjestusi, mis on võimelised fenotüüpseks valikuks transformeeritud rakkudes. Niisugused järjestused

on mitmesuguste bakterite, pärmiseente ja viiruste seas hästi teada. Replikatsiooni lähtumine plasmiidist pBR322, mis sisaldab ampitsilliini (Amp) ja tetratsükliini (Tet) resistentsust kodeerivaid geene ning pakub seetõttu lihtsa võimaluse transformeeritud rakkude tuvastamiseks, sobib enamikule gramnegatiivsetest bakteritest, lähtumine 2 $\mu$  plasmiidist sobib pärmiseentele ja lähtumine mitmesugustest viirustest (SV40, polüoom, adenoviirus, VSV või BPV) on kasulik vektorite kloonimisel imetajarakkudes. pBR322, selle derivaadid või muud mikroobsed plasmiidid või bakteriofaagid võivad samuti sisaldada või olla modifitseeritud sisaldamiseks promotoreid, mida mikroobne organism võib kasutada endogeensete valkude ekspresseerimiseks. Näiteid pBR322 derivaatide kasutamisest konkreetsete antikehade ekspresseerimisel on üksikasjalikult kirjeldanud Carter et al. US patendis 5648237.

**[0707]** Lisaks saab seoses nende peremeesorganismidega kasutada transformatsioonivektoritena faagide vektoreid, mis sisaldavad peremeesmikroorganismiga sobivaid replikone ja kontrolljärjestusi. Näiteks võib bakteriofaagi nagu  $\lambda$ .GEM.TM.-11 rakendada rekombinantse vektori valmistamiseks, mida saab kasutada vastuvõtlike peremeesrakkude nagu *E. coli* LE392 transformeerimiseks.

**[0708]** Leiutisekohane ekspresseeriv vektor võib hõlmata kaht või enamat promotori-tsistroni paari, mis kodeerivad polüpeptiidi igat komponenti. Promootor on transleerimata regulatoorne järjestus, mis paikneb selle ekspresseerimise moduleerivast tsistronist vastassuunas (5'). Prokarüootsed promotored jaotatakse tavaliselt kahte klassi: indutseerivad ja konstitutiivsed. Indutseeritav promootor on promootor, mis kutsub esile tsistroni transkriptsiooni kõrgendatud tasemel ja kontrollib seda vastuseks kultiveerimistingimuste muutustele, näiteks toitainete olemasolule või puudumisele või temperatuurimuutustele.

**[0709]** Tuntud on suur hulk promotoreid, mida teatakse erinevate potentsiaalsete peremeesrakkude kaudumbe. Valitud promotori saab toimivalt ühendada tsistroni kerge või raske ahelat kodeeriva DNA-ga, eemaldades promotori lähte-DNA-st restriktiooniensüümi lagundamise teel ja sisestades eraldatud promotori järjestuse leiutisekohasesse vektorisse. Otseseks amplifitseerimiseks ja/või sihtmärkgeenide ekspresseerimiseks saab kasutada mõlemat, nii loomuliku promotori järjestust kui ka paljusid heteroloogseid promotoreid. Mõnes teostuses rakendatakse heteroloogilisi promotoreid, sest need võimaldavad üldiselt suuremat transkriptsiooni ja ekspresseeritud sihtmärkgeeni kõrgemaid saagiseid loomuliku sihtmärkpolüpeptiidi promotoriga võrreldes.

[0710] Mitmesuguste potentsiaalsete peremeesrakkude poolt tuntavad promootorid on hästi tuntud. Prokarüootsete peremeesrakkudega kasutamiseks sobivad promootorid hõlmavad PhoA promootorit,  $\beta$ -galaktamaasi ja laktoosi promootorsüsteeme [Chang et al., *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281: 544 (1979)], leeliselise fosfataasi, trüptofaani (*trp*) promootorsüsteemi [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980); EP 36776] ja hübriid-promootoreid nagu *tac* [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)] või *trc* promootor. Baktersüsteemides kasutatavad promootorid võivad sisaldada ka CD79b-vastase antikeha kodeeriva DNA-ga toimivalt seotud Shine-Dalgarno (S.D.) järjestust. Sama hästi sobivad teisedki bakterites toimivad promootorid (näiteks muud teadaolevad bakterite või faagide promootorid). Nende nukleotiidjärjestused on avaldatud, seega on kogenud töötajal võimalik ligeerida neid sihtmärgi kergeid ja raskeid ahelaid kodeerivate tsistronitega (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269), kasutades mis tahes vajaliku restriksioonikohaga varustamiseks linkereid või adaptoreid.

[0711] Leiutise ühe eripärana sisaldab rekombinantse vektori iga tsistron sekretsiooni signaaljärjestuse komponenti, mis juhib ekspresseeritud polüpeptiidide translokatsiooni läbi membraani. Tavaliselt võib signaaljärjestus olla vektori komponendiks või olla osa DNA-st, mis kodeerib vektorisse sisestatavat sihtmärkpolüpeptiidi DNA-d. Leiutise eesmärgil valitud signaaljärjestus peaks olema peremeesraku poolt äratuntav ja töödeldav (st signaalpeptidaasi poolt lõhustatav). Prokarüootsetes peremeesrakkudes, mis ei tunne ära ega töötle heteroloogsete polüpeptiidide loomulikke signaaljärjestusi, asendatakse signaaljärjestus prokarüootse signaaljärjestusega, mis on valitud nt. rühmast, kuhu kuuluvad aluseline fosfataas, penitsilliinaas, Ipp või kuumastabiilse enterotoksiini II (STII) liiderjärjestused, LamB, PhoE, PelB, OmpA ja MBP. Leiutise ühes teostuses kohaselt on mõlemas ekspressioonisüsteemi tsistronis kasutatavad signaaljärjestused STII signaaljärjestused või selle variandid.

[0712] Veel ühe eripärana võib leiutisekohaste immunoglobuliinide tootmine toimuda peremeesraku tsütoplasmas, mistõttu ei nõuta sekretsiooni signaaljärjestuste olemasolu igas tsistronis. Sellega seoses ekspresseeritakse, volditakse ja koostatakse immunoglobuliini kerged ning rasked ahelad funktsionaalsete immunoglobuliinide moodustamiseks tsütoplasmas. Teatud peremeestüved (nt. *E. coli trxB*<sup>-</sup> tüved) tagavad tsütoplasmas disulfiidsidemete moodustamiseks sobivad tingimused, võimaldades seeläbi ekspresseeritud valgu alaühikute õiget voltimist ja koostamist, vt. Proba, Pluckthun, *Gene*, 159: 203 (1995).

[0713] Käesolevas leiutises pakutakse ekspressioonisüsteemi, milles ekspresseeritud polüpeptiidi komponentide kvantitatiivset suhet saab moduleerida sekreteeritud ja õigesti koostatud leiutisekohaste antikehade saagise maksimeerimiseks. Niisugune modulatsioon saavutatakse vähemalt osaliselt translatsioonitugevuse samaaegse moduleerimisega polüpeptiidi komponentide jaoks.

[0714] Üht meetodit translatsioonitugevuse moduleerimiseks on käsitletud Simmons et al. US patendis 5840523. Selles kasutatakse tsistronisiseid translatsiooni initsiatsioonipiirkondade (TIR) variante. Antud TIR-i jaoks võib translatsioonitugevuse ulatuses tekitada rea aminohapete või nukleiinhapete järjestuse variante, tagades seeläbi sobivad vahendid, mille abil kohandada vastav faktor spetsiifilise ahela soovitud ekspressioonitasemega. TIR-i variante võib luua tavapärase mutageneesimeetodite abil, mille tulemusena tekivad koodonis muutused, mis võivad muuta aminohapete järjestust, ehkki eelistatud on vaikivad muutused nukleotiidi järjestuses. Muutused TIR-is võivad hõlmata näiteks muutusi Shine-Dalgarno järjestuste arvus või pikkuses ühes muutustega signaaljärjestuses. Üheks meetodiks mutantsete signaaljärjestuste loomisel on „koodonipanga“ loomine kodeeriva järjestuse alguses, mis ei muuda signaaljärjestuse aminohapete järjestust (st muutused on vaikivad). See on saavutatav iga koodoni kolmanda nukleotiidi positsiooni muutmise kaudu, lisaks on mõningatel aminohapetel, näiteks leutsiinil, seriinil ja arginiinil, mitu esimest ja teist positsiooni, mis võib muuta panga tegemise keerukaks. Antud mutageneesimeetodit on üksikasjalikult kirjeldatud publikatsioonis Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol., 4: 151-158.

[0715] Eelistatavalt luuakse iga tsistroni jaoks erinevate TIR-tugevustega vektorite komplekt. See piiratud komplekt võimaldab iga ahela ekspressioonitaseme võrdlust, samuti soovitud antikehade tootmise saagise võrdlust TIR-i tugevuse erinevate kombinatsioonide tingimustes. TIR-i tugevusi saab määrata reportergeeni ekspressioonitaseme kvantifitseerimise teel, mida on üksikasjalikult kirjeldatud Simmons et al. US patendis 5840523. Soovitud individuaalsed TIR-id valitakse translatsioonitugevuse võrdluse alusel nende liitmiseks leiutisekohastesse ekspressioonivektori konstruktsioonidesse.

#### b. Eukarüootsed peremeesrakud

[0716] Vektori komponendid hõlmavad üldjuhul, kuid mitte ainult, üht või enamat järgnevatest: signaaljärjestus, replikatsiooni alguspunkt, üks või mitu markergeeni, võimendus-element, promootor ja transkriptsiooni terminatsioonijärjestus.



*(1) Signaaljärjestuse komponent*

**[0717]** Eukarüootses peremeesrakus kasutatav vektor võib samuti sisaldada signaaljärjestust või muid polüpeptiide, mille N-otsas on küpse valgu või huvipakkuva polüpeptiidi spetsiifiline lõikamiskoht. Valitud heteroloogiline signaaljärjestus on eelistatavalt peremeesraku poolt äratuntav ja töödeldav (ehk signaalpeptidaasi poolt lõigatav). Imetajate rakkude ekspresioonil on kasutatavad nii imetajate signaaljärjestused kui ka viraalsed sekretoorsed liiderjärjestused, näiteks lihtherpesviiruse gD signaaljärjestus.

**[0718]** Selle prekursorpiirkonna DNA ligeeritakse lugemisraami piirkonnas antikeha kodeeriva DNA-ga.

*(2) Replikatsiooni alguspunkt*

**[0719]** Üldjuhul ei ole replikatsiooni alguspunkti komponent imetaja ekspressioonivektorite korral vajalik. Näiteks võib tüüpiliselt kasutada vaid SV40 alguspunkti, sest see sisaldab varast promootorit.

*(3) Seleksioonigeeni komponent*

**[0720]** Ekspressiooni- ja kloonimisvektorid võivad sisaldada seleksioonigeeni, mida nimetatakse ka seleksioonimarkeriks. Tüüpilised seleksioonigeenid kodeerivad valke, mis (a) annavad resistentsuse antibiootikumidele või muudele toksiinidele, nt ampitsilliinile, neomütsiinile, metotreksaadile või tetratsükliinile, (b) täiendavad auksotroofseid puudujääke või (c) varustavad kriitiliste toitainetega, mis ei ole kättesaadavad komplekssest keskkonnast, nt *Bacilli* D-alaniini ratsemaasi kodeeriv geen.

**[0721]** Ühes seleksiooniskeemi näites rakendatakse peremeesraku kasvu seiskamiseks ravimit. Need rakud, mis on õnnestunult transformeeritud heteroloogse geeniga, toodavad ravimresistentsust tagavat valku ning jäävad seega seleksiooniskeemis ellumbes Taolise domineeriva valiku näidetes kasutatakse ravimeid, nagu neomütsiin, mükofenoolhape ja hügromütsiin.

**[0722]** Veel üheks sobivate seleksioonimarkerite näiteks imetaja rakkudes on markerid, mis võimaldavad CD79b-vastase antikeha nukleiinihappe vastuvõtmiseks kompetentsete rakkude tuvastamist, nagu DHFR või tümidiinkinaas, metallotioniin I ja II, eelistatult primaatide

metallotioniinigeenid, adenosiini desaminaas, ornitiini dekarboksülaas jne. Sobivaks peremeesrakuks metsiktüüpi DHFR rakendamisel on DHFR aktiivsuse poolest puudulik CHO rakuliin (nt. ATCC CRL-9096), mis on valmistatud ja paljundatud vastavalt kirjeldusele publikatsioonis Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980). Näiteks DHFR selektsioonigeeniga transformeeritud rakud on esmalt tuvastatavad kõikide transformantide kasvatamisel kultiveerimissöötmes, mis sisaldab metotreksaati (Mtx), DHFR-i konkureerivat antagonisti. Alternatiivselt võib valida peremeesrakke (eriti metsiktüüpi peremeesrakke, mis sisaldavad endogeenset DHFR-i), mis on transformeeritud või kotransformeeritud antikeha, metsiktüüpi DHFR-i valku kodeerivate DNA järjestuste ning teise selektsioonimarkeriga nagu aminoglükosiid-3'-fosfotransferaas (APH), rakkude kasvatamisel söötmes, mis sisaldab selektsioonimarkerina selekteerivat ainet nagu aminoglükosiidantibiootikum, näiteks kanamütsiin, neomütsiin või G418, vt US patenti 4965199.

**[0723]** Sobiv selektsioonigeen pärmis kasutamiseks on *trp1* geen, mis esineb pärmi plasmiidis YRp7 [Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10: 157 (1980)]. *Trp1* geen, näiteks ATCC nr. 44076 või PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)] pakub selektsioonimarkerit pärmi mutanttüvele, millel puudub võime kasvada trüptofaanis.

#### (4) *Promootori komponent*

**[0724]** Tavaliselt sisaldavad ekspressiooni- ja kloonimisvektorid promootorit, mis on mRNA sünteesi suunamiseks funktsionaalselt seotud CD79b-vastast antikeha kodeeriva nukleiinhappejärjestusega. Mitmesuguste potentsiaalsete peremeesrakkude poolt äratuntavad promootorid on hästi tuntud.

**[0725]** Peaaegu kõigil eukarüootsetel geenidel on AT-rikas piirkond, mis paikneb umbes 25 kuni 30 alust eespool kohast, kus transkriptsioon algatatakse. Veel üks järjestus, mis paljudes geenides esineb 70 kuni 80 aluse võrra transkriptsiooni alguspunktist eespool, on CNCAAT piirkond, kus N võib olla mis tahes nukleotiid. Enamuse eukarüootsete geenide 3'-otsas on AATAAA järjestus, mis võib olla signaaliks kodeeriva järjestuse 3'-otsa polü-A saba lisamiseks. Kõik need järjestused sobivad eukarüootsetesse ekspressioonivektoritesse sisestamiseks.

**[0726]** Sobivate promootorjärjestuste näited pärmpereemest kasutamiseks hõlmavad 3-fosfoglutüseraadi kinaasi [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)] või muude

glükolüütiliste ensüümide [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)], nagu enolaas, glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas, heksokinaas, püruvaadi dekarboksülaas, fosfofruktokinaas, glükoos-6-fosfaadi isomeraas, 3-fosfoglütseraadi mutaas, püruvaadi kinaas, trioosfosfaadi isomeraas, fosfoglükoosi isomeraas ja glükokinaas, promootoreid.

**[0727]** Muud päripromootorid, mis on indutseeritavad promootorid, millel on kasvutingimustega kontrollitud transkriptsiooni lisaeelis, on alkoholi dehüdrogenaasi 2, isotsütokroom C, happelise fosfataasi, lämmastiku ainevahetusega seotud lagundavate ensüümide, metallooniini, glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaasi ning maltoosi ja galaktoosi kasutamise eest vastutavate ensüümide promootorpiirkonnad. Pärmis ekspresseerimisega seoses kasutamiseks sobivaid vektoreid ja promootoreid on täiendavalt kirjeldatud publikatsioonis EP 73657.

**[0728]** Imetajaperemeesrakkudes kontrollitakse CD79b-vastase antikeha transkriptsiooni vektoritelt näiteks viiruste, nagu polüoomiviirus, lindude rõugeviirus (*fowlpox virus*) (UK 2211504, avaldatud 5. juulil 1989), adenoviirus (nagu adenoviirus 2), veise papilloomiviirus, lindude sarkoomiviirus, tsütomegaloviirus, retroviirus, B-hepatiidiviirus ja ahviviirus 40 (SV40) genoomidest saadud promootorite, heteroloogilistest imetajast pärinevate promootorite, näiteks aktiinipromootori või immunoglobuliinipromootoriga, ning kuumašoki promootoritega eeldusel, et taolised promootorid sobivad kokku peremeesraku süsteemidega.

**[0729]** Tavapärast saadakse SV40 viiruse varajane ja hiline promootor SV40 restriksioonifragmendina, mis sisaldab ka viiruse SV40 replikatsiooni alguspunkti. Tavapärast saadakse inimese tsütomegaloviiruse vahetult varajane promootor HindIII restriksioonifragmendina. Süsteem DNA ekspresseerimiseks imetaja-peremeesrakkudes veise papilloomviirust vektorina kasutades on avaldatud US patendis 4 419 446. Selle süsteemi muudatust on kirjeldatud US patendis 4601978, vt. ka Reyes et al., Nature, 297: 598-601 (1982), milles käsitletakse hiire rakkudes inimese  $\beta$ -interferooni cDNA ekspresseerimist lihtherpesviirusest pärineva tümidiinkinaasi promootori kontrolli all. Alternatiivselt võib promootorina kasutada Rous'i sarkoomiviiruse pikka terminaalset kordust.

*(5) Võimenduselemendi komponent*

**[0730]** CD79b-vastast antikeha kodeeriva DNA transkribeerimist kõrgemates eukarüootides saab suurendada võimendusjärjestuse sisestamise teel vektorisse. Võimendajad on DNA cis-toimivad elemendid, tavaliselt vahemikus 10 kuni 300 ap, mis toimivad promootorile selle transkriptsiooni suurendavalt. Praegu tuntakse paljusid imetajate geenidest (globiin, elastaas, albumiin,  $\alpha$ -fötovalk ja insuliin) pärinevaid võimendusjärjestusi. Tüüpiliselt kasutatakse aga eukarüootse raku viirusest pärinevat võimendajat. Näited hõlmavad SV40 võimendajat replikatsiooni alguspunkti hilisest alast (ap 100-270), tsütomegaloviiruse varajase promootori võimendajat, polüoomiviiruse võimendajat replikatsiooni alguspunkti hilisest alast ning adenooviiruse võimendajaid, vt. ka Yaniv, Nature, 297: 17-18 (1982), kus käsitletakse võimenduselemente eukarüootsete promootorite aktiveerimiseks. Võimendaja võib vektorisse liita CD79b-vastase antikeha kodeeriva järjestuse suhtes 5'- või 3'-asendis, kuid eelistatavalt paikneb see kohas, mis on promootorist 5'-suunas.

*(6) Transkriptsiooni terminatsioonikomponent*

**[0731]** Eukarüootsetes peremeesrakkudes (pärimi-, seene-, putuka-, taime- looma-, inimese- või muudes hulkraksete organismide tuumaga rakkudes) kasutatavad ekspressioonivektorid sisaldavad ka järjestusi, mis on vajalikud transkriptsiooni lõpetamiseks ja mRNA stabiliseerimiseks. Harilikult on sellised järjestused saadavad eukarüootsete või viiruse DNA-de või cDNA-de 5'- ning mõnikord 3'-mittetransleeritavatest piirkondadest. Need piirkonnad sisaldavad nukleotiidisegmente, mida CD79b-vastast antikeha kodeeriva mRNA mittetransleeritavas osas transkribeeritakse kui polüadenüülitud fragmente. Üks kasulik transkriptsiooni terminatsioonikomponent on veise kasvuhormooni polüadenüülimise piirkond, vt. WO 94/11026 ja selles avaldatud ekspressioonivektor.

**[0732]** Täiendavaid meetodeid, vektoreid ja peremeesrakke, mis sobivad kasutamiseks CD79b-vastase antikeha sünteesimisel selgroogsete loomade rekombinantsetes rakukultuurides, on kirjeldatud publikatsioonides Gething et al., Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281: 40-46 (1979); EP 117060 ning EP 117058.

#### 4. Peremeesrakkude kasvatamine

[0733] Leiutisekohase CD79b-vastase antikeha tootmiseks kasutatavaid peremeesrakke võib kasvatada mitmesugustes söötmetes.

##### a. Prokarüootsed peremeesrakud

[0734] Prokarüootseid rakke, mida kasutatakse leiutisekohaste polüpeptiidide tootmiseks, kasvatatakse tehnika tasemest tuntud ja valitud peremeesrakkudele kultiveerimiseks sobivas söötmes. Sobivate söötmete näited hõlmavad Luria-Bertani söödet (LB), millele lisatakse vajalikke toitainelisandeid. Mõningates teostustes sisaldab sööde ka selektsiooniat, mille valik põhineb ekspresioonivektori ülesehitusel ning mis võimaldab ekspresioonivektorit sisaldavate prokarüootsetel rakkudel selektiivselt kasvatada. Näiteks lisatakse kasvusöötmel, milles kasvavad rakud ekspresseerivad ampitsilliini resistentsuse geeni, ampitsilliini.

[0735] Lisaks süsiniku-, lämmastiku- ja anorgaanilise fosfaadi allikatele võivad söötmesse kuuluda sobivates kontsentratsioonides sisestatud mis tahes vajalikud lisandid, lisatuna üksi või segus teise lisandi või söötmega, näiteks kompleksse lämmastikuallikaga. Vajadusel võib kultiveerimissööde sisaldada üht või enam redutseerijat, mis on valitud rühmast, kuhu kuuluvad glutatioon, tsüsteiin, tsüstamiin, tioglükolaat, ditioerütritool ja ditiotreitool.

[0736] Prokarüootseid peremeesrakke kasvatatakse sobival temperatuuridel. Näiteks *E. coli* kasvuks on eelistatud temperatuurivahemik umbes 20 °C kuni 39 °C, eelistatumalt umbes 25 °C kuni 37 °C ja veelgi eelistatumalt umbes 30 °C. Söötme pH võib olla vahemikus 5 kuni 9, peamiselt peremeesorganismist sõltuvalt. *E. coli* jaoks on pH eelistatavalt vahemikus umbes 6,8 kuni 7,4, veelgi eelistatavamalt umbes 7,0.

[0737] Kui leiutisekohases ekspresioonivektoris kasutatakse indutseeritavat promootorit, indutseeritakse valgu ekspresioon promootori aktivatsiooniks sobivates tingimustes. Leiutise ühe eripärana kasutatakse polüpeptiidide kontrollitud transkriptsiooniks PhoA promootoreid. Seega kultiveeritakse transformeeritud peremeesrakke induktsiooniks fosfaadipuudulikus söötmes. Eelistatult on fosfaadipuudulikuks söötmeks C.R.A.P sööde (vt. nt. Simmons et al., J. Immunol. Methods, (2002), 263: 133-147). Vastavalt rakendatava vektori konstruktsioonile võib kasutada mitmeid teisi tehnika tasemest tuntud indutseerijaid.

**[0738]** Ühes teostuses sekreteeritakse leiutisekohased ekspresseeritud polüpeptiidid peremeesrakkude periplasmasse ja kogutakse sealt. Valgu kogumine hõlmab tavaliselt mikroorganismi lõhkumist, üldjuhul vahenditega, nagu osmootne šokk, sonikeerimine või lüüsimine. Kui rakud on lõhutud, võib rakkude jäänused või terveks jäänud rakud eemaldada tsentrifuugimise või filtrimise teel. Valke võib täiendavalt puhastada näiteks affiinsuskromatograafia abil. Alternatiivselt võib valgud transportida kultiveerimissöötmesse ja eraldada sellest. Rakud võib kultuurist eemaldada ja kultuuri supernatandi filtrida ning kontsentreerida toodetud valgu edasiseks puhastamiseks. Ekspresseeritud polüpeptiidid võib täiendavalt eraldada ning tuvastada üldtuntud meetodeid, näiteks polüakrüülamiidgeelelektroforeesi (PAGE) ning Western Blot analüüsi kasutades.

**[0739]** Leiutise ühe eripärana viiakse antikeha suurmahuline tootmine läbi fermentatsiooniprotsessi teel. Rekombinantsete valkude tootmiseks saab kasutada mitmesuguseid teadaolevaid suuremahulisi perioodilisi fermenteerimismenetlusi. Suures mahus fermenteerimine toimub mahus vähemalt 1000 liitrit, eelistatavalt mahus umbes 1000 kuni 100000 liitrit. Niisugustes fermenterites kasutatakse hapniku ja toitainete, eriti glükoosi (eelistatud süsiniku-/energiaallika) jaotamiseks tiiviksegureid. Väikeses mahus fermenteerimine viitab üldiselt fermenteerimisele fermenteris, mille maht ei ole suurem kui umbes 100 liitrit ning maht võib jääda vahemikku umbes 1 liiter kuni 100 liitrit.

**[0740]** Fermentatsiooniprotsessis initsieeritakse valguekspressioon harilikult pärast seda, kui rakud on kasvanud sobivates tingimustes soovitud tiheduseni, näiteks OD<sub>550</sub>-väärtuseni umbes 180-220, selles staadiumis on rakud varases statsionaarses faasis. Vastavalt rakendatava vektori konstruktsioonile võib kasutada mitmeid tehnika tasemest tuntud ja ülalpool kirjeldatud indutseerijaid. Rakke võib enne indutseerimist kasvatada lühemate perioodide jooksul. Tavaliselt indutseeritakse rakke umbes 12-50 tundi, samas võib kasutada ka lühemat või pikemat induktsiooniaega.

**[0741]** Selleks, et parandada leiutisekohaste polüpeptiidide tootmise saagist ning kvaliteeti, võib mitut fermentatsioonitingimust modifitseerida. Näiteks sekreteeritud antikehade polüpeptiidide õige moodustumise ja voltumise parandamiseks võib prokarüootsete peremeesrakkude kotransformatsiooniks kasutada lisavektoreid, mis ekspresseerivad üle voltevalke, nagu Dsb valgud (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD ja/või DsbG) või FkpA (peptidüülprolüül-cis, voltevalgu aktiivsusega transisomeraas). On näidatud, et voltevalgud soodustavad bakterperemeesrakkudes toodetud heteroloogsete valkude õiget voltumist ja lahustuvust, Chen et

al., (1999) J. Bio. Chem., 274: 19601-19605; Georgiou et al., US patent 6083715; Georgiou et al., US patent 6027888; Bothmann, Pluckthun, (2000) J. Biol. Chem., 275: 17100-17105; Ramm, Pluckthun, (2000) J. Biol. Chem., 275: 17106-17113; Arie et al., (2001) Mol. Microbiol., 39: 199-210.

**[0742]** Selleks, et minimeerida ekspresseeritud heteroloogiliste valkude proteolüüsi (eriti seliste, mis on proteolüüsile tundlikud), võib leiutises kasutada teatud peremeesrakkude tüvesid, mis on proteolüütiliste ensüümide suhtes defitsiitsed. Näiteks võib peremeesrakkude tüvesid modifitseerida geneetilis(t)e mutatsiooni(de) tekitamisega geenides, mis kodeerivad tuntud bakteriproteaase, nagu proteaas III, OmpT, DegP, Tsp, proteaas I, proteaas Mi, proteaas V, proteaas VI ning nende kombinatsioonid. Mõned *E. coli* proteaasi suhtes defitsiitsed tüved on saadaval ning kirjeldatud, vt. näiteks Joly et al., (1998), eespool; Georgiou et al., US patent 5264365; Georgiou et al., US patent 5508192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996).

**[0743]** Ühes teostuses kasutatakse leiutisekohases ekspressioonisüsteemis peremeesrakku-dena *E. coli* tüvesid, mis on proteolüütiliste ensüümide suhtes defitsiitsed ning transformeeritud plasmiididega, mis ekspresseerivad üle üht või enamalt voltevalkumbes

#### b. Eukarüootsed peremeesrakud

**[0744]** Peremeesrakkude kasvatamiseks sobivad kaubanduslikult saadavad söötmed, nagu Ham'i F10 (Sigma), minimaalselt vajalik sööde (Minimal Essential Medium, MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) ning Dulbecco modifitseeritud sööde (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) (Sigma). Samuti võib peremeesrakkude kasvusöötmena kasutada ükskõik millist publikatsioonides Ham et al., Meth. Enz., 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem., 102: 255 (1980), US patentides 4767704, US 4657866; US 4927762; US 4560655 või US 5122469, WO 90/03430, WO 87/00195 või US patendis 30985 kirjeldatud söödelt. Mis tahes nimetatud söödelt võib vajadusel täiendada, lisades hormoone ja/või muid kasvufaktoreid (näiteks insuliini, transferrini või epidermaalset kasvufaktorit), soolasid (näiteks naatriumkloriidi, kaltsiumit, magneesiumit ja fosfaati), puhvreid (näiteks HEPES-t), nukleotiide (näiteks adenosiini ja tümidiini), antibiootikume (näiteks ravimit GENTAMYCIN™), mikroelemente (defineeritud anorgaaniliste ühenditena, mille lõppkontsentratsioon on tavaliselt mikromolaarses piirkonnas) ning glükoosi või samaväärset energia-

allikat. Samuti võib lisada sobivates kontsentratsioonides mis tahes muid vajalikke lisandeid, mis on ala asjatundjatele teada. Kultiveerimise tingimused, näiteks temperatuur, pH jms, on samad, mida kasutati eelnevalt ekspresseerimiseks valitud peremeesrakkude korral, ning on ala tavataseme asjatundjale ilmsed.

#### 5. Geeni amplifikatsiooni/ekspressiooni detekteerimine

[0745] Geeni amplifitseerimist ja/või ekspressiooni saab proovis otseselt mõõta, nt. tavapärase Southern blot analüüsi või Northern blot analüüsi teel mRNA transkriptsiooni kvantifitseerimiseks [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)], tilkpealekandemeetodil (*dot blotting* – DNA analüüs) või *in situ* hübridiseerimise teel, kasutades sobivalt märgistatud sondi, mis põhineb siin esitatud järjestustel. Alternatiivselt võib rakendada antikehi, mis tunnevad ära konkreetsed dupleksid, sealhulgas DNA dupleksid, RNA dupleksid ja DNA-RNA hübriiddupleksid või DNA-valgu dupleksid. Võimalik on omakorda antikehade märgistamine ja analüüsi läbiviimine, kusjuures dupleks on seotud pinnaga nii, et duplexi moodustumisel pinnal saab detekteerida dupleksiga seotud antikeha olemasolubes

[0746] Geeni ekspresseerimise võib alternatiivselt mõõta immunoloogiliste meetoditega, nagu rakkude või koelõikude immunohistokeemiline värvimine ja rakukultuuri või kehavedelike analüüs geenisaaduse ekspresseerimise otseseks kvantifitseerimiseks. Immunohistokeemiliseks värvimiseks ja/või proovivedelike analüüsimiseks kasutatavad antikehad võivad olla kas monokloonsed või polükloonsed ning olla valmistatud suvalises imetajas. Tavapäraselt võib antikehad valmistada CD79b polüpeptiidi loomuliku järjestuse suhtes või sünteetilise peptiidi suhtes, mis põhineb siin esitatud DNA järjestustel, või eksogeense järjestuse suhtes, mis on liidetud CD79b DNA-ga ja kodeerib konkreetset antikeha epitoopi.

#### 6. CD79b-vastase antikeha puhastamine

[0747] CD79b-vastase antikeha vorme võib koguda kasvukeskkonnast või peremeesrakkude lüsaadist. Membraaniga seotuna võib seda membraanist vabastada, kasutades sobiva detergendi (nt Triton-X 100) lahust või ensümaatilist lõhustamist. CD79b-vastase antikeha ekspresseerimiseks kasutatavaid rakke võib purustada mitmesuguste füüsikaliste või keemiliste



vahenditega, nagu vahelduv külmutamine-sulatamine, sonikeerimine, mehaaniline purustamine või rakke lüüsiivad ained.

**[0748]** CD79b-vastase antikeha puhastamine rekombinantse raku valkudest või polüpeptiididest võib olla soovitud. Järgnevad menetlused on sobivate puhastusmenetluste näideteks: fraktsioneerimine ioonivahetuskolonnil, etanooliga sadestamine, pöördfaasi HPLC, kromatograafia silikageelil või katioonivahetusvaigul nagu DEAE, kromatofokuseerimine, SDS-PAGE, ammoniumsulfaadiga sadestamine, geelfiltratsioon, kasutades näiteks Sephadex G-75, A-valk-Sepharose kolonnid saasteainete nagu IgG eemaldamiseks, metallikelaatijatega kolonnid leütisekohaste polüpeptiidide epitoop-märgistatud vormide sidumiseks. Rakendada võib mitmesuguseid valgu puhastamise meetodeid, mis on tehnika tasemes tuntud ja mida kirjeldatakse näiteks publikatsioonides Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification; Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). Valitud puhastusetapp või -etapid sõltuvad näiteks kasutatud tootmisprotsessi olemusest ja konkreetsest toodetavast CD79b-vastasest antikehast.

**[0749]** Rekombinantsete meetodite kasutamisel saab antikeha toota rakusiseselt, periplasmas või sekreteerida vahetult söötmesse. Kui antikeha toodetakse rakusiseselt, eemaldatakse esimese etapina kas peremeesrakkude või lüüsiitud fragmentide tahked rakujäänused näiteks tsentrifuugimise või ultrafiltratsiooni teel. Carter et al., *Bio/Technology*, 10: 163-167 (1992) kirjeldavad menetlust antikehade eraldamiseks, mis sekreeditakse *E. coli* periplasmasse. Lühikokkuvõttes sulatatakse rakususpensioon naatriumatsetaadi (pH 3,5), EDTA ja fenüülmetüülsulfonüülfluoriidi (PMSF) juuresolekul umbes 30 minuti jooksul. Rakujäänuseid võib eemaldada tsentrifuugimise teel. Kui antikeha sekreteeritakse söötmesse, siis üldiselt taoliste ekspressioonisüsteemide supernatandid esmalt kontsentreeritakse, kasutades kaubanduslikult saadavaid valgu kontsentratsioonifiltreid, näiteks Amicon või Millipore Pellicon ultrafiltratsiooniseadet. Mis tahes eelmainitud etapis võib proteolüüsi inhibeerimiseks lisada proteaasi inhibiitorit nagu PMSF ning juhuslike lisandite kasvu ennetamiseks võib lisada antibiootikume.

**[0750]** Rakkudest valmistatud antikehakompositsiooni puhastamiseks võib kasutada näiteks hüdroksüülapatiitkromatograafiat, geelelektroforeesi, dialüüsi ja afiinsuskromatograafiat, millest afiinsuskromatograafia on eelistatud puhastustehnikaks. A-valgu sobivus afiinsusliigandina sõltub ükskõik millise immunoglobuliini Fc-domeeni liigist ja isotüübist, mis antikehas esineb. A-valku saab kasutada inimese  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  või  $\gamma 4$  rasketel ahelatel põhinevate

antikehade puhastamisel (Lindmark et al., J. Immunol. Meth., 62: 1-13 (1983)). G-alku soovitakse kõigi hiire isotüüpide ja inimese  $\gamma 3$  jaoks (Guss et al., EMBO J., 5: 15671575 (1986)). Maatriksiks, millele afiinsusligand kinnitub, on kõige sagedamini agaros, kuid saadaval on muudki maatriksid. Mehaaniliselt stabiilsed maatriksid, nagu kontrollitud poori suurusega klaas või polü(stüreendivinüül)benseen, võimaldavad suuremaid voolutuskiirusi ning lühemat töötusaega kui võib saavutada agarosiga. Kui antikeha hõlmab  $C_{H3}$  domeeni, sobib puhastamiseks Bakerbond ABX™ vaik (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ). Kogutavast antikehast sõltuvalt võib kasutada muidki valgu puhastamise meetodeid, näiteks fraktsioneerimist ionivahetuskolonnis, etanooliga sadestamist, pöördfaasi-HPLC-i, kromatograafiat silikageelil, kromatograafiat hepariinil SEPHAROSE™, kromatograafiat anioniidil või kationiidil (näiteks polüasparthappekolonnis), kromatofokuseerimist, SDS-PAGE ja ammoniumsulfaadiga sadestamist.

**[0751]** Ükskõik millise eelpuhastusetapi või -etappide järel võib segu, mis sisaldab huvipakkuvat antikeha ning lisandeid, suunata madala pH juures läbiviidavasse hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafiasse, kasutades elueerimispuhvrit pH väärtustel vahemikus umbes 2,5-4,5, kusjuures protsess viiakse eelistatult läbi madalatel soolakontsentratsioonidel (nt. alates umbes 0-0,25 M soola).

### G. Ravimvormid

**[0752]** Leiutisekohaseid antikeha-ravimi konjugaate (ADC) saab manustada ükskõik millisel ravitava tervises seisundi suhtes kohasel viisil. ADC-sid manustatakse üldjuhul parenteraalselt, st infusiooni teel, subkutaanselt, intramuskulaarselt, intravenoosselt, intradermaalselt, intratekaalselt ja epiduraalselt.

**[0753]** Nende vähkide ravimiseks manustatakse antikeha-ravimi konjugaat ühes teostuses intravenoosse infusiooni teel. Infusiooni teel manustatav annus jääb vahemikku umbes  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $10,000 \mu\text{g}/\text{m}^2$  annuse kohta, üldjuhul üks annus nädala kohta, kokku üks, kaks, kolm või neli annust. Alternatiivselt on annustamisvahemikuks umbes  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , umbes  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $800 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , umbes  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $600 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , umbes  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , umbes  $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , umbes  $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $300 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , umbes  $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$  ning umbes  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ . Võimalik on annuse manustamine üks kord päevas, üks kord nädalas, mitu korda nädalas, kuid vähem kui kord

päevas, mitu korda kuus, kuid vähem kui kord päevas, mitu korda kuus, kuid vähem kui kord nädalas, üks kord kuus, või aeg-ajalt, haiguse sümptomite leevendamiseks. Manustamine võib jätkuda ükskõik millise mainitud intervalliga kuni ravitava kasvaja või lümfoomi, leukeemia sümptomite taandumiseni. Manustamine võib jätkuda pärast sümptomite taandumise või leevenemise saavutamist juhul, kui jätkuv manustamine pikendab taandumist või leevenemist.

**[0754]** Leiutis pakub lisaks meetodi autoimmuunhaiguse leevendamiseks, mis hõlmab ükskõik millise eelneva teostuse kohase humaniseeritud MA79b antikeha-ravimi konjugaadi terapeutiliselt tõhusa koguse manustamist autoimmuunsushaiguse käes kannatavale patsiendile. Eelistatud teostustes manustatakse antikeha intravenoosselt või subkutaanselt. Antikeharavimi konjugaat manustatakse intravenoosselt annuses, mis jääb vahemikku umbes  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $100 \text{ mg}/\text{m}^2$  annuse kohta, ühes konkreetses teostuses on annus  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$ . Võimalik on annuse manustamine üks kord päevas, üks kord nädalas, mitu korda nädalas, kuid vähem kui kord päevas, mitu korda kuus, kuid vähem kui kord päevas, mitu korda kuus, kuid vähem kui kord nädalas, üks kord kuus, või aeg-ajalt, haiguse sümptomite leevendamiseks. Manustamine võib jätkuda ükskõik millise mainitud intervalliga kuni ravitava autoimmuunhaiguse sümptomite taandumise või leevenemiseni. Manustamine võib jätkuda pärast sümptomite taandumise või leevenemise saavutamist juhul, kui jätkuv manustamine pikendab leevenemist või taandumist.

**[0755]** Leiutis pakub lisaks B-rakulise häire ravimise meetodi, mis hõlmab ükskõik millise eelneva teostuse kohase humaniseeritud MA79b antikeha terapeutiliselt tõhusa koguse manustamist B-rakulise häire, näiteks B-rakulise proliferatiivse häire (sealhulgas, kuid mitte ainult, lümfoomi ja leukeemia) või autoimmuunhaiguse käes kannatavale patsiendile, milline antikeha ei ole konjugeeritud tsütotoksilise molekuli või detekteeritava molekuliga. Antikeha manustamise tavaliseks annustamisvahemikuks on umbes  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni  $1000 \text{ mg}/\text{m}^2$ .

**[0756]** Ühe eripära kohaselt pakub leiutis täiendavalt ravimvormi, mis hõlmavad vähemalt üht leiutisekohast CD79b-vastast antikeha ja/või selle vähemalt üht immunokonjugaati ning/või vähemalt üht leiutisekohast CD79b-vastast antikeha-ravimi konjugaati. Mõningate teostuste korral hõlmab ravimvorm (1) leiutisekohast antikeha ja/või selle immunokonjugaati, ning (2) farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat. Mõningate teostuste korral hõlmab ravimvorm (1) leiutisekohast antikeha ja/või selle immunokonjugaati, ning valikuliselt (2) vähemalt üht täiendavat terapeutilist. Täiendavateks terapeutilisteks on, kuid mitte ainult,

allpool kirjeldatud terapeutilikumid. ADC-sid manustatakse üldjuhul parenteraalselt, st infusiooni teel, subkutaanselt, intramuskulaarselt, intravenoosselt, intradermaalselt, intratekaalselt ja epiduraalselt.

**[0757]** Leiutise kohaselt kasutatavate CD79b-vastase antikeha või CD79b immunokonjugaadi ravimvormi valmistamiseks soovitud puhtusastmega antikeha või immunokonjugaadi segamise teel valikuliste farmatseutiliselt vastuvõetavate kandjate, abiainetega või stabilisaatoritega (Remington's Pharmaceutical Sciences 16. väljaanne, Osol, A. Ed. (1980)), lüofiliseeritud vormide või vesilahuste kujul. Vastuvõetavad kandjad, abiained või stabilisaatorid ei ole saajatele kasutatavate annustes ja kontsentratsioonides toksilised ning hõlmavad puhvreid, nagu atsetaat-, Tris-, fosfaat-, tsitraatpuhver ja muude orgaaniliste hapete puhvrid, antioksüdante, nagu askorbiinhape ja metioniin, säilitusaineid (nagu oktaadetsüüldimetüülbensüülammooniumkloriid, heksametooniumkloriid, bensalkooniumkloriid, bensetooniumkloriid, fenool, butüül- või bensüülalkohol, alküülparabeenid, nagu metüül- või propüülparabeen, katehhool, resortsinool, tsükloheksanool, 3-pentanool ja m-kresool), väikese molekulaarmassiga (alla umbes 10 jäägi) polüpeptiide, valke nagu seerumi albumiin, želatiini või immunoglobuliini, hüdrofiilseid polümeere nagu polüvinüülpirrolidoon, aminohappeid, nagu glütsiin, glutamiin, asparagiin, histidiin, arginiin või lüsiin, monosahhariide, disahhariide ja muid süsivesikuid, sealhulgas glükoosi, mannoosi või dekstriini, kelaativaid aineid nagu EDTA, toonust tõstvaid aineid, nagu trehhaloos ja naatriumkloriid, suhkruid nagu sahharoos, mannitool, trehhaloos või sorbitool, pindaktiivseid aineid nagu polüsorbaat, sooli moodustavaid vastasioone nagu naatrium, metallikomplekse (nt Zn- Valk komplekse), ning/või mitteioonseid pindaktiivseid aineid, nagu TWEEN®, PLURONICS® või polüetüleenglükool (PEG). *In vivo* manustamiseks kasutatavad ravimvormid on üldjuhul steriilsed. See on hõlpsasti saavutatav filtrimisega läbi steriilsete filtermembraanide.

**[0758]** Siin kirjeldatud ravimvormid võivad samuti sisaldada enam kui üht toimeainet, kui see on vajalik konkreetse tervises seisundi ravimiseks, eelistatavalt on niisuguste toimeainete toimed vastastikku täiendavad ega avalda üksteisele ebasoodsat mõju. Näiteks võib soovitatav olla lisaks CD79b-vastasele antikehale ühte ravimvormi täiendava antikeha kaasamine, milleks võib olla näiteks teine CD79b-vastane antikeha, mis seondub CD79b polüpeptiidi mõne muu epitoobiga, või mõni antikeha, mis on suunatud muu sihtmärgi vastu, näiteks kasvufaktor, mis mõjutab teatud kindla vähi kasvu. Alternatiivselt või täiendavalt võib koostis hõlmata kemoterapeutilikumi, tsütotoksilist ainet, tsütokiini, kasvu pärssivat ainet,

antihormonaalset ainet ja/või kardioprotektanti. Eelistatavalt sisalduvad niisugused molekulid koostises kogustes, mis on ette nähtud eesmärgil kasutamiseks tõhusad.

**[0759]** Toimeained võivad samuti olla suletud mikrokapslitesse, mis on valmistatud näiteks koatservatsioonitehnikate abil või polümerisatsiooni teel piirpinnal, näiteks vastavalt hüdroksümetüülselluloos- või želatiinmikrokapslitesse ja polümetüülmetakrülaatkapslitesse, ravimi kolloidsetesse kohtaletoimetamise süsteemidesse (näiteks liposoomidesse, albumiini mikrosfääridesse, mikroemulsioonidesse, nanoosakestes ja nanokapslitesse) või makroemulsioonidesse. Vastavad meetodid on avaldatud publikatsioonis Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. väljaanne, Osol, A., Ed., (1980).

**[0760]** Võimalik on toimeainet aeglustatult vabastavate preparaatide valmistamine. Toimeainet aeglustatult vabastavate preparaatide sobivateks näideteks on tahkete hüdrofoobsete polümeeride poolläbilaskvad maatriksid, mis sisaldavad leiutisekohast antikeha, need maatriksid on teostatud kujundatud toodete, näiteks kilede või mikrokapslitenäidena. Toimeainet aeglustatult vabastavate maatriksite näited hõlmavad polüestereid, hüdrogeele (näiteks polü(2-hüdroksüetüülmetakrülaati) või polü(vinüülalkohol)), polülaktiide (US patent 3773919), L-glutaanhappe ja  $\gamma$ -etüül-L-glutamaadi kopolümeere, mittelagundatavat etüleenvinüülatselaati, lagundatavaid piimhappe-glükoolhappe kopolümeere nagu LUPRON DEPOT® (süstitavad mikrosfäärid, mis koosnevad piimhappe-glükoolhappe kopolümeerist ning leuproliidatselaadist) ning polü-D(-)-3-hüdroksüvõihapet. Samas kui polümeerid nagu etüleenvinüülatselaat ja piimhappe-glükoolhappe kopolümeer võimaldavad molekulide vabanemist enam kui 100 päeva jooksul, vabastavad teatud hüdrogeelid valke lühemate ajavahemike jooksul. Kui kapseldatud immunoglobuliinid jäävad kehasse pikaks ajaks, võivad nad denatureeruda või agregeeruda niiskusele eksponeerituse tõttu temperatuuril 37 °C, mis toob kaasa bioloogilise aktiivsuse kadumise ning võimalikud muutused immunogeensuses. Sõltuvalt kasutatavast mehhanismist võib stabiliseerimiseks kavandada ratsionaalsed strateegiad. Näiteks kui on leitud, et agregatsioonimehhanismiks on molekulidevahelise S-S sideme moodustumine läbi tio-disulfiidi vahetuse, võib stabiliseerumise saavutada sulfhüdrüüljääkide modifitseerimise, happeliste lahuste lüofiliseerimise, niiskusesisalduse reguleerimise, sobivate lisaainete kasutamise ning spetsiifiliste polümeermaatriksi koostiste väljatöötamisega.

**[0761]** Antikehi võib moodustada ükskõik millises sihtrakku/koesse toimetamiseks sobival kujul. Näiteks on võimalik antikehade moodustamine immunoliposoomidena. „Liposoom“ on

erinevat tüüpi lipiididest, fosfolipiididest ja/või pindaktiivsest aineist koosnev väike vesiikul, millest on abi ravimi kohaletoimetamisel imetajale. Liposoomi komponendid on üldjuhul paigutatunud kahekihiliselt, sarnaselt bioloogiliste membraanide lipiidide paigutusega. Antikeha sisaldavad liposoomid valmistatakse tehnika tasemest tuntud meetodite abil, mida on kirjeldatud nt. publikatsioonides Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); US patendid 4485045 ja US 4544545; ning WO97/38731, avaldatud 23. oktoobril 1997. Pikendatud ringlusajaga liposoomi on käsitletud US patendis 5013556.

**[0762]** Eriti kasulikke liposoomi saab valmistada pöördfaasi-aurustamismeetodil lipiidide koostisega, kuhu kuuluvad fosfatidüülkoliin, kolesterool ja PEG-derivaaditud fosfatidüülletanolamiin (PEG-PE). Liposoomid ekstrudeeritakse soovitud läbimõõduga liposoomide saamiseks läbi kindlaksmääratud poori suurusega filtrite. Leiutisekohase antikeha Fab' fragmente võib liposoomidega konjugeerida vastavalt kirjeldusele publikatsioonis Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982), disulfiidi vahetusreaktsiooni kaudu. Valikuliselt sisaldab liposoom kemoterapeutikumi, vt. Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

**[0763]** *In vivo* manustamiseks kasutatavad vormid peavad olema steriilsed. See on hõlpsasti saavutatav filtrimisega läbi steriilsete filtermembraanide.

#### H. Ravi CD79b-vastaste antikehadega

**[0764]** CD79b ekspressiooni määramiseks vähis võib kasutada mitmesuguseid detekteerimisanalüüse. Ühes teostuses korral võib CD79b polüpeptiidi üleekspressiooni analüüsida immunohistokeemiliselt (IHC). Kasvaja biopsia parafiinis fikseeritud koelõigud võib allutada IHC analüüsile, saades tulemuseks järgnevad CD79b valgu värvumisintensiivsuse kriteeriumid.

**[0765]** Tulemus 0 – värvumist ei täheldata või täheldatakse membraani värvumine vähem kui 10% kasvajarakkudest.

**[0766]** Tulemus 1+ - membraani nõrk/vaevumärgatav värvumine on detekteeritav enam kui 10% kasvajarakkudest. Rakud on värvunud ainult oma membraani osas.

**[0767]** Tulemus 2+ - membraani vähene kuni mõõdukas värvumine on täheldatav enam kui 10% kasvajarakkudest.

[0768] Tulemus 3+ - membraani mõõdukas kuni tugev värvumine on täheldatav enam kui 10% kasvajakudest.

[0769] Kasvajaid, mille CD79b polüpeptiidi ekspressiooni tulemus on 0 või 1+, võib käsitleda CD79b-d üle mittekspreseeerivatena, samas kui kasvajaid tulemusega 2+ või 3+ võib käsitleda CD79b-d üleekspreseeerivatena.

[0770] Alternatiivselt või täiendavalt võib formaliiniga fikseeritud, parafiini valatud kasvajakoe suhtes läbi viia FISH analüüsi, nagu INFORM® (turustab Ventana, Arizona) või PATHVISION® (Vysis, Illinois), et määrata kindlaks CD79b üleekspressiooni (kui on) ulatus kasvajas.

[0771] CD79b üleekspressiooni või amplifikatsiooni saab hinnata *in vivo* detekteerimisanalüüsi abil, st manustades molekuli (nagu antikeha), mis seondub detekteeritava molekuliga ja märgistatakse detekteeritava märgisega (nt. radioaktiivse isotoobi või fluorestseeruva märgisega) ning skaneerides patsienti väljastpoolt märgise asukoha kindlaksmääramiseks.

[0772] Nagu eespool on kirjeldatud, on leiutisekohastel CD79b-vastastel antikehadel mitmesuguseid mitteterapeutilisi rakendusi. Leiutisekohaseid CD79b-vastaseid antikehi võib kasutada CD79b polüpeptiidi ekspresseerivate vähkide staadiumi tuvastamisel (nt. radioloogiliste uuringute teostamisel). Antikehi võib samuti kasutada CD79b polüpeptiidi puhastamiseks või immunosadestamiseks rakkudest, CD79b polüpeptiidi detekteerimiseks ja kvantifitseerimiseks *in vitro*, näiteks ELISA või Western blot analüüsi abil, CD79b ekspresseerivate rakkude surmamiseks ning kõrvaldamiseks segatud rakkude populatsioonist muude rakkude puhastamise etapina.

[0773] Hetkeseisuga, vähi staadiumist olenevalt, hõlmab vähiravi mõnd järgnevatest ravimeetoditest või nende kombinatsiooni: operatsioon vähikoe eemaldamiseks, kiiritusravi ja keemiaravi. Ravi CD79b-vastaste antikehadega võib olla eriti soovitatav eakate patsientide korral, kes ei talu keemiaravi toksilisust ja kõrvalmõjusid hästi, ning metastaatiliste haiguste korral, millisel juhul on kiiritusravi kasulikkus piiratud. Leiutisekohased kasvajale suunatud CD79b-vastased antikehad on kasulikud CD79b ekspresseerivate vähkide leevendamiseks haiguse esmasel diagnoosimisel või retsidiivi korral. Ravi eesmärgil võib CD79b-vastaseid antikehi kasutada kas eraldi või kombinatsioonis muu ravimiga, näiteks hormoonide, antiangiogeensete või radiomärgistatud ühenditega, või koos kirurgilise ravi, krüoravi ja/või kiiritusraviga. Ravi CD79b-vastaste antikehadega võib kasutada koos muude tavapäraste

ravimvormidega, kas tavapärase raviga samaaegselt, enne või pärast seda. Vähi ravimiseks kasutatakse kemoterapeutikume nagu TAXOTERE® (doksetakseel), TAXOL® (paliktakseel), estramustiin ja mitoksantroon, eelkõige headel riskipatsientidel. Käsitleva leiutisekohase meetodi korral vähi ravimiseks või leevendamiseks võib vähipatsiendile CD79b-vastaseid antikehi manustada koos ühe või enama eelmainitud kemoterapeutikumiga läbiviidava raviga. Eelkõige peetakse silmas kombineeritud ravi paliktakseeli ja selle modifitseeritud derivaatidega (vt. nt. EP0600517). CD79b-vastane antikeha manustatakse koos kemoterapeutikumi terapeutiliselt tõhusa annusega. Veel ühe teostuse korral manustatakse CD79b-vastane antikeha kombinatsioonis keemiaraviga, kemoterapeutikumi, nt. Paklitakseeli, aktiivsuse ja tõhususe suurendamiseks. Publikatsioonis Physicians' Desk Reference (PDR) näidatakse nende ainete annused, mida on erinevate vähkide ravimiseks kasutatud. Nende eelmainitud kemoterapeutikumide, mis on terapeutiliselt tõhusad, annustamisskeem ja annused sõltuvad konkreetsest ravitavast vähist, haiguse ulatusest ning muudest teguritest, mis on ala asjatundjast arstile teada ja tema poolt kindlaksmääratavad.

**[0774]** Ühe konkreetse teostuse korral manustatakse patsiendile konjugaati, mis sisaldab tsütotoksilise agensiga konjugeeritud CD79b-vastast antikeha. Eelistatavalt internaliseerib rakk CD79b valguga seotud immunokonjugaadi, mis toob kaasa immunokonjugaadi suurema terapeutilise tõhususe vähiraku surmamisel, millega see seondub. Ühe eelistatud teostuse korral on tsütotoksiline agens vähirakus suunatud nukleiinhappele või häirib selle talitlust. Niisuguste tsütotoksiliste ainete näiteid on kirjeldatud eespool, need hõlmavad maitansinoide, kaliheamütsiini, ribonukleaase ja DNA endonukleaase.

**[0775]** CD79b-vastased antikehad või selle toksiinikonjugaadid manustatakse inimpatsiendile vastavalt teadaolevatele meetoditele nagu intravenoosne manustamine, näiteks boolusena, või pideva infusiooni teel teatud ajavahemiku jooksul, intramuskulaarselt, intraperitonaalselt, intratserebrospinaalselt, subkutaanselt, intraartikulaarselt, intrasünoviaalselt, intratekaalselt, peroraalselt, toopiliselt või inhalatsiooni teel. Eelistatud on antikeha intravenoosne või subkutaanne manustamine.

**[0776]** Võimalik on muude ravirežiimide kombineerimine CD79b-vastase antikeha manustamisega. Kombineeritud manustamine hõlmab kaasmanustamist, eraldi vormide või ühe ravimvormi kasutamist ning järjestikust manustamist (mis tahes järjekorras), kusjuures eelistatavalt on olemas ajavahemik, mille jooksul kumbki toimeaine või kõik toimeained avalda-



vad oma bioloogilist mõju samaaegselt. Eelistatavalt annab niisugune kombineeritud ravi tulemuseks sünergilise terapeutilise efekti.

**[0777]** Samuti võib soovitatav olla CD79b-vastase antikeha või antikehade manustamise kombineerimine niisuguse antikeha manustamisega, mis on suunatud mõne muu asjaomase vähiga seostatud kasvaja antigeeni vastu.

**[0778]** Veel ühe teostuse korral hõlmavad käesoleva leiutise ravimeetodid CD79b-vastase antikeha (või antikehade) ja ühe või enama kemoterapeutikumi või kasvu pärssiva agensi kombineeritud manustamist, sh. erinevate kemoterapeutikumide või muu tsütotoksilise agensi või ainete või muu terapeutikumi või terapeutikumide, mis samuti pärssivad kasvaja kasvu, segude koos manustamist. Kemoterapeutikumid hõlmavad estramustiinfosfaati, prednimustiini, tsisplatiini, 5-fluorouratsiili, melfalaani, tsüklofosfamiidi, hüdroksüureat ja hüdroksüurea tüüpi taksaane (nagu paklitaksel ning dotsetaksel) ja/või antratsükliin-antibiootikume. Niisuguste kemoterapeutikumide valmistamis- ja annustamisskeeme võib kasutada vastavalt tootja juhiste või ala asjatundja poolt empiirilisel kindlaksmääratud viisil. Valmistamis- ja annustamisskeeme vastava keemiaravi korral on kirjeldatud ka publikatsioonis *Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)*. Võimalik on antikeha kombineerimine antihormonaalse ühendi, nt. antiöstrogeenühendiga nagu tamoksifeen, antiprogesterooniga nagu onapristoon (vt EP 616812) või antiandrogeeniga nagu flutamiid, taoliste molekulide korral teadaolevates annustes. Kui ravitav vähk on androgeenisõltumatu, on võimalik patsiendi eelnev antiandrogeenne ravi, ning pärast seda, kui vähk muutub androgeenisõltumatuks, saab patsiendile manustada CD79b-vastaseid antikehi (ja valikuliselt muid agenseid, nagu siin on kirjeldatud).

**[0779]** Mõnikord võib kasulik olla ka kardioprotektandi (raviga seonduva müokardi funktsioonihäirete ärahoidmiseks või piiramiseks) või ühe või enama tsütokiini kaasmanustamine patsiendile. Lisaks eeltoodud ravirežiimidele on võimalik patsiendi vähirakkude kirurgiline eemaldamine ja/või kiiritusravi (nt väline kiiritamine või ravi radioaktiivselt märgistatud aine, näiteks antikehaga) enne antikeharavi, sellega samaaegselt või pärast seda. Ükskõik milliste eelmainitud kaasmanustatavate ainete sobivateks annusteks on praegusel ajal kasutuselolevad annused, ning võimalik on nende vähendamine tulenevalt aine ja CD79b-vastase antikeha kombineeritud mõjust (sünergiast).

**[0780]** Leiutisekohane antikehakompositsioon valmistatakse, annustatakse ja manustatakse kooskõlas heade meditsiinitavadega. Antud kontekstis käsitlemisele kuuluvad tegurid hõlma-

vad konkreetset ravitavat tervisehäiret, konkreetset ravitavat imetajat, patsiendi kliinilist seisundit, tervisehäire põhjust, aine koahaletoimetuskohhta, manustamisviisi, manustamisskeemi ja muid praktiseerivatele arstidele teadaolevaid tegureid. Antikeha ei pruugi, kuid võib valikuliselt olla valmistatud koos ühe või enama agensiga, mida praegusel ajal kasutatakse asjaomase tervisehäire ärahoidmiseks või ravimiseks. Niisuguste muude ainete tõhus kogus oleneb preparaadis sisalduvast leiutisekohaste antikehade kogusest, tervisehäire või ravi liigist ja muudest ülalkirjeldatud teguritest. Tavaliselt kasutatakse neid annustes ja manustamisviiside kohaselt, mis vastavad senikasutatutele, või vastavad senikasutatud annustele umbes 1 kuni 99% ulatuses.

**[0781]** Haiguse ärahoidmiseks või ravimiseks valib arst annuse ja manustamisviisi kooskõlas teadaolevate kriteeriumidega. Antikeha kohane annus sõltub ravitava haiguse liigist, nagu eespool käsitletud, haiguse raskusest ja kulgemisest, antikeha manustamisest ennetuse või ravi eesmärgil, varasemast ravist, patsiendi haigusloost ja vastusest antikehale ning raviarsti äranägemisest. Antikeha manustatakse patsiendile ühekordselt või mitme raviseansi raames. Eelistatavalt manustatakse antikehad intravenoosse infusiooni või subkutaansete injektsioonide teel. Haiguse tüübist ja raskusastmest olenevalt võib antikeha esialgseks patsiendile manustatavaks kandidaatannuseks olla umbes 1 µg kuni 50 mg kehamassi kilogrammi kohta (nt. umbes 0,1-15 mg/kg/annus), näiteks ühe või mitme eraldi manustamiskorra või pideva infusiooni teel. Annustamisskeem võib hõlmata CD79b-vastase antikeha esialgse umbes 4 mg/kg küllastusannuse manustamist, millele järgneb iganädalane umbes 2 mg/kg säilitusannus. Samas võivad kasulikuks osutada muudki annustamisskeemid. Tüüpiline päevaannus võib jääda vahemikku umbes 1 µg/kg kuni 100 mg/kg või üle selle, olenevalt ülalmainitud teguritest. Korduval manustamisel mitme päeva pikkuse või pikema ajavahemiku jooksul jätkatakse ravi seisundist sõltuvalt kuni haiguse sümptomite soovitud allasurumiseni. Taolise ravi edenemise üle on lihtne teostada järelevalvet tavapäraste meetodite ja analüüsidega ning arstile või muudele ala asjatundjatele teadaolevate kriteeriumide põhjal.

**[0782]** Lisaks antikehavalgu manustamisele patsiendile näeb käesolev taotlus ette antikeha manustamist geeniteraapia teel. Antikeha kodeeriva nukleiinhappe niisugune manustamine kuulub väljendi „antikeha terapeutiliselt tõhusa koguse manustamine“ alla, vt. nt. WO 96/07321, avaldatud 14. märtsil 1996, mis käsitleb geeniteraapia kasutamist rakusiseste antikehade tootmiseks.

[0783] Olemas on kaks peamist lähenemist nukleiinhappe (mis valikuliselt sisaldub vektoris) saamiseks patsiendi rakkudesse: *in vivo* ja *ex vivo*. *In vivo* kohaletoimetamise korral süstitakse nukleiinhape vahetult patsienti, tavaliselt kohas, kus antikeha tarvis on. *Ex vivo* menetluse korral patsiendi rakud eemaldatakse, nukleiinhape viiakse nendesse eraldatud rakkudesse ja modifitseeritud rakud manustatakse patsiendile kas otse või näiteks kapseldatult poorsetesse membraanidesse, mis siiratakse patsiendi organismi (vt. nt. US patendid 4892538 ja US 5283187). Kasutusel on mitmesugused meetodid nukleiinhapete viimiseks elujõulistesse rakkudesse. Meetodid varieeruvad olenevalt sellest, kas nukleiinhape kantakse *in vitro* üle kultiveeritud rakkudesse või *in vivo* ettenähtud peremehe rakkudesse. Meetodid, mis sobivad nukleiinhappe ülekandeks imetajarakkudesse *in vivo*, hõlmavad liposoomide kasutamist, elektroporatsiooni, mikrosüstimist, rakkude liitmist, DEAE-dekstraani kasutamist, kaltsiumfosfaadiga sadestamise meetodit jne. Geeni *ex vivo* kohaletoimetamisel üldiselt kasutatavaks vektoriks on retroviirusvektor.

[0784] Hetkel eelistatavad *in vivo* nukleiinhappe ülekandemeetodid hõlmavad transfektiooni viirusvektoritega (nagu adenoviirus, *Herpes simplex I* viirus või adeno-seotud viirus) ja lipiidipõhiste süsteemidega (kasulikeks lipiidideks geeni lipiidivahendatud ülekandeks on näiteks DOTMA, DOPE ning DC-Chol). Ülevaate saamiseks hetkel teadaolevatest geenimärgistuse ja geeniteraapia protokollidest vt. Anderson et al., Science, 256: 808-813 (1992), vt. ka WO 93/25673 ja selles tsiteeritud viited.

[0785] Leiutisekohaseid CD79b-vastaseid antikehi saab nende erinevates vormides hõlmata siin toodud määratlusega „antikeha“. Seega kuuluvad antikehade alla täispikad või terved antikehad, antikehafragmendid, loomuliku järjestusega antikeha või aminohappe variandid, humaniseeritud, kimäärsed või liitunud antikehad, immunokonjugaadid ja nende funktsionaalsed fragmendid. Liitunud antikehade korral on antikehajärjestus liidetud heteroloogse polüpeptiidijärjestusega. Võimalik on antikehade modifitseerimine Fc piirkonnas soovitud efektorfunktsioonide saavutamiseks. Nagu selle leiutise osades on üksikasjalikumalt kirjeldatud, võib 'paljas' antikeha, mis on seotud raku pinnaga, põhjustada kohaste Fc piirkondade korral tsütotoksilisust, nt. antikehast sõltuvat rakulist tsütotoksilisust (ADCC), komplemendi rakendamisel komplemendist sõltuva tsütotoksilisuse või mõne muu mehhanismi korral. Alternatiivselt, kui soovitav on efektorfunktsiooni kõrvaldamine või piiramine kõrvalmõjude või terapeutiliste komplikatsioonide minimeerimiseks, võib kasutada teatud muid Fc piirkondi.

[0786] Ühes teostuses konkureerib antikeha seondumiseks või seondub põhimõtteliselt sama epitoobiga kui leiutisekohased antikehad. Ette nähakse ka antikehi, millel on leiutisekohaste CD79b-vastaste antikehade bioloogilised omadused, eelkõige suunatud kasvajale *in vivo* ja ükskõik millised rakkude proliferatsiooni pärssimisega seotud või tsütotoksilised omadused.

[0787] Ülaltoodud antikehade tootmise meetodeid on leiutises üksikasjalikult kirjeldatud.

[0788] Leiutisekohased CD79b-vastased antikehad on kasulikud CD79b ekspresseeriva vähi ravimisel või sellise vähi ühe või enama sümptomi leevendamisel imetajal. Niisugused vähid hõlmavad, kuid mitte ainult, vereloome või verega seotud vähke, nagu lümfoom, leukeemia, müeloom või lümfisüsteemi pahaloomulised kasvaja, kuid ka põrnavähid ja lümfisõlmedevähid. Niisuguste B-rakuliste vähkide konkreetsemad näited hõlmavad kõrge, keskmise ja madala raskusastmega lümfoome (sealhulgas B-rakulisi lümfoome, nagu näiteks limaskestaga seotud lümfoidkoe B-rakuline lümfoom ja mitte-Hodgkini lümfoom, mantelrakkude lümfoom, Burkitti lümfoom, väike lümfotsütaarne lümfoom, marginaaltooni lümfoom, difuusne B-suurerakuline lümfoom, follikulaarne lümfoom ning Hodgkini lümfoom ja T-rakulised lümfoomid) ning leukeemiaid (sealhulgas sekundaarset leukeemiat, kroonilist lümfotsütaarset leukeemiat nagu B-rakuline leukeemia (CD5+ B-lümfotsüüdid), müeloidset leukeemiat nagu akuutne müeloidne leukeemia, kroonilist müeloidset leukeemiat, lümfoidset leukeemiat, nagu akuutne lümfoblastne leukeemia ja müelodüsplaasia) ja muid hematoloogilisi ning/või B-rakkude või T-rakkudega seotud vähke. Vähid hõlmavad ükskõik millise eelneva vähi metastaatilisi vorme. Antikeha on võimeline seonduma vähemalt osaga vähirakkudest, mis ekspresseerivad CD79b polüpeptiidi imetajal. Eelistatud teostustes võimaldab antikeha hävitada või surmata CD79b ekspresseerivaid kasvajakarakke või pärssida niisuguste kasvajakarakkude kasvu *in vivo* või *in vitro* seondumise kaudu CD79b-polüpeptiidiga rakul. Niisugune antikeha hõlmab paljast CD79b-vastast antikeha (mis pole ühegi agensiga konjugeeritud). Paljaid antikehi, millel on tsütotoksilised või raku kasvu pärssivad omadused, võib täiendavalt kasutada koos tsütotoksilise agensiga, mis tõstab veelgi nende võimekust kasvajakarakkude hävitamisel. CD79b-vastasele antikehale saab tsütotoksilisi omadusi anda näiteks antikeha konjugeerimisel tsütotoksilise agensiga siin kirjeldatud immunokonjugaadi moodustamiseks. Tsütotoksiline agens või kasvu pärssiv agens on eelistatavalt väike molekul. Eelistatavad on toksiinid nagu kaliheamütsiin või mõni maitansinoid ja nende analoogid või derivaadid.

[0789] Leiutises esitatakse kompositsioon, mis sisaldab leiutisekohast CD79b-vastast antikeha ja kandjat. Vähi ravimiseks võib taolist ravi vajavale patsiendile manustada kompositsioone, mis võivad sisaldada üht või enam CD79b-vastast antikeha immunokonjugaadi või palja antikeha kujul. Veel ühes teostuses võivad kompositsioonid sisaldada neid antikehi kombinatsioonis muute terapeutikumide, näiteks tsütotoksiliste või kasvu pärssivate ainetega, sealhulgas kemoterapeutikumidega. Samuti esitatakse leiutises preparaate, mis sisaldavad leiutisekohast CD79b-vastast antikeha ja kandjat. Ühes teostuses on preparaadiks ravi-preparaat, mis sisaldab farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat.

[0790] Leiutise veel üheks eripäraks on eraldatud nukleiinhapped, mis kodeerivad CD79b-vastaseid antikehi. Leiutis hõlmab nukleiinhappeid, mis kodeerivad nii H- kui ka L-ahelaid ja eriti hüpervarieeruva piirkonna jääke, ahelaid, mis kodeerivad loomuliku järjestusega antikeha, ning antikeha variante, modifikatsioone ja humaniseeritud versioone.

[0791] Leiutisega esitakse ka meetodid, mis on kasulikud CD79b polüpeptiidi ekspresseeriva vähi ravimisel või niisuguse vähi ühe või enama sümptomi leevendamisel imetajal, hõlmates CD79b-vastase antikeha terapeutiliselt tõhusa koguse manustamist asjaomasele imetajale. Antikeha sisaldavaid farmatseutilisi kompositsioone võib manustada lühiajaliselt (akuutselt), krooniliselt või aeg-ajalt, vastavalt arsti suunistele. Leiutises esitatakse ka CD79b polüpeptiidi ekspresseeriva raku kasvu pärssimise või surmamise meetodid.

[0792] Leiutises esitatakse lisaks komplekte ja tooteid, mis hõlmavad vähemalt üht CD79b-vastast antikeha. CD79b-vastaseid antikehi sisaldavaid komplekte kasutatakse näiteks CD79b rakkude surmamise analüüside läbiviimisel, CD79b polüpeptiidi rakkudest immunosadestamisel või puhastamisel. Näiteks võib kompleks CD79b eraldamiseks ja puhastamiseks sisaldada CD79b-vastast antikeha, mis on seotud helmestega (nt Sepharose helmestega). Lisaks esitakse ka komplekte, mis sisaldavad antikehi CD79b detekteerimiseks ja kvantifitseerimiseks *in vitro*, nt. ELISA või Western blot'i abil. Taoline detekteerimiseks sobiv antikeha võib olla varustatud märgise, näiteks fluorestseeruva või radiomärgisega.

#### 1. Ravi antikeha-ravimi konjugaadiga

[0793] Nähakse ette, et leiutisekohaseid antikeha-ravimi konjugaate (ADC) saab kasutada mitmesuguste haiguste või häirete ravimiseks, millele on iseloomulik näiteks kasvaja antigeeni üleekspressioon. Hüperproliferatiivsete häirete näidisseisundid hõlmavad hea- või

pahaloomulisi kasvajaid, leukeemiat ja lümfisüsteemi pahaloomulisi kasvajaid. Muudeks näideteks on neuronaalsed, gliia, astrotsütaalsed, hüpotalaamilised, näärmelised, makrofaagide, epiteeli, strooma, blastotsöoli, põletikulised, angiogeensed ja immunoloogilised (sh autoimmuunsusega seotud) häired.

**[0794]** ADC ühendeid, mis on tuvastatud loomamudelite ja rakupõhiste analüüside raames, võib täiendavalt uurida kasvajaid kandvatel kõrgematel primaatidel ja kliiniliste inimuuringute käigus. Välja saab töötada kliinilisi inimuuringuid leiutisekohase CD79b-vastase monokloonse antikeha või immunokonjugaadi tõhususe katsetamiseks patsientidel, kes kannatavad B-rakulise proliferatiivse häire all, mille näideteks on, kuid mitte ainult, mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiivne agressiivne NHL, retsidiivne indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsütaarne leukeemia (CLL), väike lümfotsütaarne lümfoom, leukeemia, leukeemiline retikuloendotelioos (HCL), akuutne lümfotsütaarne leukeemia (ALL) ning mantelrakkude lümfoom. Võimalik on kliinilise uuringu väljatöötamine ADC tõhususe hindamiseks kombineeritult teadaolevate ravi- režiimidega, näiteks teadaolevate kemoterapeutikumide ja/või tsütotoksiliste ainete kasutamisel koos kiiritus- ning/või keemiaraviga.

**[0795]** Üldjuhul on ravitavaks haiguseks või häireks hüperproliferatiivne haigus nagu B-rakuline proliferatiivne häire ja/või B-rakuline vähk. Ravitavate vähkide näideteks on, kuid mitte ainult, B-rakuline proliferatiivne häire, mille alla kuuluvad mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiivne agressiivne NHL, retsidiivne indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsütaarne leukeemia (CLL), väike lümfotsütaarne lümfoom, leukeemia, leukeemiline retikuloendotelioos (HCL), akuutne lümfotsütaarne leukeemia (ALL) ning mantelrakkude lümfoom.

**[0796]** Vähk võib hõlmata CD79b-d ekspresseerivaid rakke, millisel juhul leiutisekohased ADC-d on suuteliselt seondma vähirakkudega. CD79b ekspressiooni määramiseks vähis võib kasutada mitmesuguseid diagnostilisi/prognostilisi analüüse. Ühes teostuses võib CD79b üleekspressiooni analüüsida IHC teel. Kasvaja biopsia parafiinis fikseeritud koelõigud võib allutada IHC analüüsile, saades tulemuseks CD79b valgu värvumisintensiivsuse kriteeriumid sõltuvalt värvumise astmest ja uuritud vähirakkude osakaalust.

**[0797]** Haiguse ärahoidmisel või ravimisel sõltub ADC kohane annus ravitava haiguse liigist, nagu eespool on käsitletud, haiguse raskusest ja kulgemisest, molekuli manustamisest ennetuse või ravi eesmärgil, varasemast ravist, patsiendi haigusloost ja vastusest antikehale

ning raviarsti äranägemisest. Molekule manustatakse patsiendile ühekordselt või mitme raviseansi raames. Haiguse tüübist ja raskusastmest olenevalt võib antikeha esialgseks patsiendile manustatavaks kandidaatanuseks olla umbes 1 µg/kg kuni 15 mg/kg (nt. 0,1-20 mg/kg), näiteks ühe või mitme eraldi manustamiskorra või pideva infusiooni teel. Tüüpiline päevaannus võib jääda vahemikku umbes 1 µg/kg kuni 100 mg/kg või üle selle, olenevalt ülalmainitud teguritest. Patsiendile manustatava ADC näidisannus jääb vahemikku umbes 0,1 kuni 10 mg patsiendi kehakaalu kilogrammi kohta.

**[0798]** Korduval manustamisel mitme päeva pikkuse või pikema ajavahemiku jooksul jätkatakse ravi seisundist sõltuvalt kuni haiguse sümptomite soovitud allasurumiseni. Näidislik annustamisskeem hõlmab esialgse umbes 4 mg/kg küllastusannuse manustamist, millele järgneb ErbB2-vastase antikeha igapäevane umbes 2 mg/kg säilitusannus. Kasulikuks võivad osutuda muudki annustamisskeemid. Selle ravi edenemist on lihtne jälgida tavapäraste meetodite ja analüüside abil.

#### J. Kombineeritud ravi

**[0799]** Leiutisekohase antikeha-ravimi konjugaadi (ADC) võib kombineeritud ravi kohaselt kaasata farmatseutilisse kombineeritud preparaati või annustamisskeemi koos teise ühendiga, millel on vähivastased omadused. Farmatseutilise kombineeritud preparaadi või annustamisskeemi teise ühendi toimed on eelistatavalt kombinatsiooni ADC-ga komplementaarsed, vältimaks vastastikust negatiivset mõju.

**[0800]** Teiseks ühendiks võib olla kemoterapeutikum, tsütotoksiline agens, tsütokiin, kasvu pärssiv agens, antihormonaalne agens ja/või kardioprotektant. Eelistatavalt sisalduvad niisugused molekulid kompositsioonis kogustes, mis on sel eesmärgil ette nähtud kasutamiseks tõhusad. Leiutisekohast ADC-d sisaldav farmatseutiline kompositsioon võib samuti sisaldada terapeutiliselt tõhusas koguses kemoterapeutikumi, näiteks tubuliini moodustumise inhibiitorit, topoisomeraasi inhibiitorit või DNA sidujat.

**[0801]** Ühe eripära kohaselt on esimeseks ühendiks leiutisekohane CD79b-vastane ADC ja teiseks ühendiks CD20-vastane antikeha (kas paljas antikeha või ADC). Ühes teostuses on teiseks ühendiks CD20-vastane antikeha rituksimab (Rituxan®) või 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Muudeks antikehadeks, mis on kasutatavad kombineeritud immu-

noteraapiaks leiutisekohaste CD79b-vastaste ADC-dega, on, kuid mitte ainult, VEGF-vastane ühend (nt Avastin®).

**[0802]** Leiutisega kooskõlas tuvastatud vähivastase agensi manustamisega võib kombineerida muid ravirežiime, muuhulgas, kuid mitte ainult, kiiritusravi ja/või luuüdi või perifeerse vere siirdamist ning/või tsütotoksilist ainet, kemoterapeutikumi või kasvu pärssivat ainet. Ühes taolises teostuses on kemoterapeutikumiks agens või ainete kombinatsioon, nagu näiteks tsüklofosfamiid, hüdroksüdaunorubiin, adriamütsiin, doksorubiin, vinkristiin (Oncovin™), prednisoloon, CHOP, CVP või COP või immunoterapeutikumid, nagu CD20-vastane (nt. Rituxan®) või VEGF-vastane ühend (nt. Avastin®).

**[0803]** Kombineeritud ravi võib manustada samaaegse või järjestikuse režiimina. Järjestikusel manustamisel võib kombinatsiooni manustada ühe või kahe manustamiskorrana. Kombineeritud manustamine hõlmab kaasmanustamist, eraldi vormide või ühe ravimvormi kasutamist ning järjestikust manustamist (mis tahes järjekorras), kusjuures eelistatavalt on ajavahe-  
mik, mille jooksul kumbki toimeaine või kõik toimeained avaldavad oma bioloogilist mõju samaaegselt.

**[0804]** Ühes teostuses hõlmab ravi ADC-ga ühe siin määratletud vähivastase agensi ja ühe või enama kemoterapeutikumi või kasvu pärssiva agensi kombineeritud manustamist, sh. erinevate kemoterapeutikumide segude koos manustamist. Kemoterapeutikumid hõlmavad taksaane (nagu paklitaksel ja dotsetaksel) ning/või antratsükliin-antibiootikume. Niisuguste kemoterapeutikumide valmistamis- ja annustamisskeeme võib kasutada vastavalt tootja juhiste või ala asjatundja poolt empiirilisel kindlaksmääratud viisil. Valmistamis- ja annustamisskeeme vastava keemiaravi korral on kirjeldatud ka publikatsioonis "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

**[0805]** Ükskõik milliste eelmainitud kaasmanustatavate ainete sobivateks annusteks on praegusel ajal kasutuselolevad annused, võimalik on nende vähendamine tulenevalt vastaselt tuvastatud agensi ja muude kemoterapeutikumide või ravide kombineeritud mõjust (sünergiast).

**[0806]** Kombineeritud ravi võib pakkuda „sünergiat“ ja osutada „sünergiliseks“, st toimeainete koos kasutamisest tulenev mõju on suurem ühendite eraldi kasutamisega kaasnevate mõjude summast. Sünergiline mõju on saavutatav juhul, kui toimeainetest (1) valmistatakse koos preparaat ja need manustatakse või toimetatakse kohale samaaegselt, kombineeritud üheosalises ravimvormis, (2) toimetatakse kohale vaheldumisi või paralleelselt erinevate



ravimvormidena või (3) mingi muu režiimi abil. Vahelduva ravi raames kohaletoimetamisel on sünergiline mõju saavutatav ühendite manustamisel või järjestikku kohaletoimetamisel, nt erinevate injektsioonide teel erinevates süstaldes. Üldjuhul manustatakse iga aktiivse toimeaine toimiv annus vahelduva ravi korral järjestikku ehk seeriaviisiliselt, samas kui kombineeritud ravi korral manustatakse kahe või enama toimeaine toimivad annused koos.

#### K. Tooted ja komplektid

**[0807]** Leiutise veel üheks teostuseks on toode, mis sisaldab CD79b ekspresseeriva vähi ravimiseks, ärahoidmiseks ja/või diagnoosimiseks sobivaid aineseid. Toode hõlmab mahutit ja etiketti või pakendi infolehte mahuti peal või sellega kaasas. Sobivateks mahutiteks on näiteks pudelid, viaalid, süstlad jne. Mahutid võivad olla valmistatud mitmesugustest materjalidest, näiteks klaasist või plastist. Mahutis on kompositsioon, mis on efektiivne vähiseisundi ravimiseks, ärahoidmiseks ja/või diagnoosimiseks, ning mahutil võib olla steriilne juurdepääsuava (näiteks võib mahutiks olla intravenoosse lahuse kott või viaal, millel on hüpodermilise süstlanõelaga läbistatav kork) Vähemalt üheks kompositsiooni toimeainetest on leiutisekohane CD79b-vastane antikeha. Etikett või infoleht osutab, et kompositsiooni kasutatakse vähi ravimiseks. Etikett või infoleht hõlmab ka juhiseid antikehakompositsiooni manustamise kohta vähipatsiendile. Toode võib lisaks hõlmata teist mahutit, mis sisaldab farmatseutiliselt vastuvõetavat puhvrit, näiteks bakteriostaatilist vett süstelahuse valmistamiseks (BWFI), fosfaadiga puhverdatud soolalahust, Ringeri lahust ja dekstroosilahust. Toode võib täiendavalt sisaldada muidki kaubanduslikust ja kasutaja seisukohast soovitavaid aineid, k.a. teised puhvrid, lahjendid, filtrid, nõelad ning süstlad.

**[0808]** Samuti pakutakse komplekte, mis sobivad kasutamiseks mitmesugustel eesmärkidel, nt CD79b ekspresseerivate rakkude surmamise analüüside läbiviimisel, CD79b polüpeptiidi rakkudest immunosadestamisel või puhastamisel. CD79b polüpeptiidi eraldamiseks ja puhastamiseks võib kompleks sisaldada CD79b-vastast antikeha, mis on seotud helmestele (nt. Sepharose helmestele). Võimalik on komplektide valmistamine, mis sisaldavad antikehi CD79b polüpeptiidi detekteerimiseks ja kvantifitseerimiseks *in vitro*, nt. ELISA või Western blot'i abil. Sarnaselt tootele hõlmab kompleks mahutit ja etiketti või pakendi infolehte mahuti peal või sellega kaasas. Mahuti sisaldab kompositsiooni, mis sisaldab vähemalt üht leiutisekohast CD79b-vastast antikeha. Võimalik on lisamahutite kaasamine, mis sisaldavad näiteks

lahjendeid ja puhvreid, kontrollantikehi. Etiketil või infolehel võivad leiduda kompositsiooni kirjeldus ning juhised ettenähtud *in vitro* või detekteeritava kasutamise kohta.

#### L. CD79b polüpeptiidide kasutusvõimalused

**[0809]** Siin käsitletakse ühendite sõelumise meetodeid nende ühendite tuvastamiseks, mis jälgendavad CD79b polüpeptiidi (agonistid) või hoiavad ära CD79b polüpeptiidi toime (antagonistid). Sõelumisanalüüsid antagonistide-ravimikandidaatide jaoks on kavandatud tuvastama ühendeid, mis seonduvad või komplekseeruvad siin tuvastatud geenide poolt kodeeritavate CD79b polüpeptiididega või sekkuvad muidu kodeeritud polüpeptiidide interaktsiooni muude rakuliste valkudega, sealhulgas näiteks pärsvivad CD79b polüpeptiidi ekspressiooni rakkudest. Taolised sõelumisanalüüsid hõlmavad analüüse, mis on kohaldatavad kemikaaliraamatukogude kõrge jõudlusega sõelumisele, muutes need eriti sobivaks väikestest molekulidest ravimikandidaatide tuvastamiseks.

**[0810]** Analüüse saab läbi viia mitmesugustes vormingutes, sh. valk-valk sidumisanalüüside, biokeemilise sõelumise analüüside, immuunanalüüside ja rakupõhiste analüüsidena, mida on tehnika tasemes hästi iseloomustatud.

**[0811]** Kõigi antagonistide analüüside ühiseks omaduseks on asjaolu, et need näevad ette ravimikandidaati viimist kokkupuutesse siin tuvastatud nukleiinhappe kodeeritud CD79b polüpeptiidiga tingimustel ja aja jooksul, millest piisab nende kahe komponendi interaktsiooni võimaldamiseks.

**[0812]** Sidumisanalüüside korral on interaktsioon siduv ja moodustunud kompleksi saab reaktsioonisegust eraldada või detekteerida. Ühes konkreetses teostuses immobiliseeritakse siin tuvastatud geeni kodeeritav CD79b polüpeptiid või ravimikandidaat tahkel faasil, nt. mikrotiiterplaadil kovalentsete või mittekovalentsete sidemega. Üldjuhul saadakse mittekovalentne side tahke pinna CD79b polüpeptiidi lahusega katmise ja kuivatamise teel. Alternatiivselt saab immobiliseeritavale CD79b polüpeptiidile spetsiifilist immobiliseeritud antikeha, nt monokloonset antikeha, kasutada selle ankurdamiseks tahkele pinnale. Analüüsi läbiviimiseks lisatakse immobiliseerimata komponent, mis võib olla märgistatud detekteeritava märgisega, immobiliseeritud komponendile, nt. kaetud pinnale, mis sisaldab ankurdatud komponenti. Kui reaktsioon on lõppenud, eemaldatakse reageerimata komponendid näiteks pesemise teel ja detekteeritakse tahkele pinnale ankurdunud kompleksid. Kui algselt

immobiliseerimata komponent sisaldab detekteeritavat märgist, annab immobiliseeritud märgise detekteerimine pinnal märku komplekseerumise toimumisest. Kui algselt immobiliseerimata komponent ei sisalda märgist, saab komplekseerumist detekteerida näiteks immobiliseeritud kompleksiga spetsiifiliselt seonduva märgistatud antikeha kasutamisega.

**[0813]** Kui kandidaatühend astub interaktsiooni, kuid ei seonu konkreetse CD79b polüpeptiidiga, mida kodeerib siin tuvastatud geen, võib tema interaktsiooni selle polüpeptiidiga analüüsida meetodite abil, mis on hästi teada valk-valk interaktsioonide detekteerimisel. Niisugused analüüsid hõlmavad traditsioonilisi lähenemisi, nagu näiteks ristsidumine, immuonokaassadestamine ja kaaspuhastamine gradientide või kromatograafiliste kolonnide abil. Lisaks võib valk-valk interaktsioone jälgida pärmipõhise geneetilise süsteemi abil, mida on kirjeldanud Fields ja tema kolleegid (Fields, Song, *Nature (London)*, 340:2 45-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991)), vastavalt publikatsioonile Chevray, Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Paljud transkriptsiooni aktiveerijad nagu pärmi GAL4 sisaldavad kaht füüsiliselt eraldatud modulaarset domeeni, millest üks toimib DNA-ga seonduva domeeni ja teine transkriptsiooni aktiveeriva domeenina. Eelnevates allikates kirjeldatud pärmi ekspressioonisüsteemis (mida üldjuhul nimetatakse „kaksikhübriidsüsteemiks“) kasutatakse seda omadust ja kasutatakse kaht hübriidset valku, millest ühe korral on sihtmärkvalk liidetud GAL4 DNA-ga seonduva domeeniga ning teise korral on kandidaatideks olevad aktiveerivad valgud liidetud aktiveeriva domeeniga. GAL1-*lacZ* reportergeeni ekspresseerumine GAL4-aktiveeritava promootori kontrolli all sõltub GAL4 aktiivsuse taastekkest valk-valk vastasmõju kaudu. Vastastikku toimivaid polüpeptide sisaldavad kolooniad tuvastatakse  $\beta$ -galaktosidaasi kromogeense substraadiga. Täielik kompleks (MATCHMAKER<sup>TM</sup>), milles kahe spetsiifilise valgu vaheliste valk-valk vastasmõjude tuvastamiseks kasutatakse kaksikhübriidmeetodit, on kaubanduslikult saadaval firmast Clontech. Seda süsteemi saab ka laiendada valgu spetsiifiliste vastasmõjudega seotud valgu-domeenide kaardistamiseks ning ka nendes vastasmõjudes otsustava tähtsusega aminohap-  
pejääkide täpseks näitamiseks.

**[0814]** Ühendeid, mis häirivad siin tuvastatud CD79b polüpeptiidi kodeeriva geeni ja muude rakusiseste või -välise komponentide vastasmõju, saab testida järgmiselt: tavaliselt valmistatakse geenisaadust ja rakusisest või -välist komponenti sisaldav reaktsioonisegu tingimustes ning aja jooksul, mis võimaldab kahe saaduse vastasmõju ja seondumist. Testimaks kandidaathendi võimet seondumist pärssida viiakse reaktsioon läbi nii testitava ühendi

puudumisel kui olemasolul. Lisaks võib kolmandasse reaktsioonisegusse lisada positiivse kontrollivahendina platseebot. Testitava ühendi ja rakusisese või -välise komponendi vahelise seondumise (kompleksi moodustumise) esinemist segus jälgitakse eespool kirjeldatud viisil. Kompleksi moodustumine kontrollreaktsiooni(de)s, kuid mitte testitavat ühendit sisaldavas reaktsioonisegus viitab sellele, et testitav ühend häirib katseühendi ja selle reaktsioonipartneri vastastikmõju.

**[0815]** Antagonistide analüüsiks võib rakule lisada CD79b polüpeptiidi koos konkreetseks tegevuseks väljasõelutud ühendiga, millisel juhul ühendi võime pärssida huvipakkuvat aktiveerimist CD79b polüpeptiidi juuresolekul annab tunnistust sellest, et ühend on CD79b polüpeptiidi antagonist. Alternatiivselt on antagonistide detekteerimine võimalik CD79b polüpeptiidi ja potentsiaalse antagonisti kombineerimisel membraaniga seotud CD79b polüpeptiidi retseptorite või rekombinantsete retseptoritega konkureerivaks pärssimisanalüüsiks kohastes tingimustes. CD79b polüpeptiidi võib märgistada näiteks radioaktiivsuse abil, võimaldamaks retseptoriga seotud CD79b polüpeptiidi molekulide arvu kasutamist potentsiaalse antagonisti tõhususe kindlaksmääramiseks. Retseptorit kodeerivat geeni saab tuvastada ala asjatundjatele teadaolevate mitmesuguste meetodite abil, mille näideteks on ligandi sorteerimine ja sorteerimine FACS abil, Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): peatükk 5 (1991). Eelistatavalt kasutatakse ekspressioon-kloonimist, mille korral poliadenüülitud RNA valmistatakse CD79n polüpeptiidi suhtes vastuvõtlikust rakust ja sellest RNA-st loodud cDNA raamatukogu jagatakse kogumiteks ning kasutatakse COS rakkude või muude rakkude, mis ei ole CD79b polüpeptiidi suhtes tundlikud, transfekteeerimiseks. Objektiklaasidel kasvatatud transfekteeeritud rakud eksponeeritakse märgistatud CD79b polüpeptiidile. CD79b polüpeptiidi saab märgistada mitmesugustel viisidel, sh. jodeerimise või kohaspetsiifilise valgu kinaasi tuvastuskoha kaasamisega. Fikseerimise ja inkubeerimise järel rakendatakse objektiklaaside suhtes autoradiograafilist analüüsi. Positiivsed kogumid tuvastatakse ja alamkogumid valmistatakse ning retransfekteeeritakse interaktiivse alamkogumi moodustamis- ja taassõelumisprotsessi abil, mis annab tulemuseks eeldatavat retseptorit kodeeriva üksiku klooni.

**[0816]** Alternatiivse lähenemisena retseptori tuvastamisele võib märgistatud CD79b polüpeptiid olla fotoafiinsus-seotud rakumembraani või retseptormolekuli ekspresseerivate ekstrakt-preparaatidega. Ristseotud aine lahutatakse PAGE-ga ja eksponeeritakse röntgenfilmile. Retseptorit sisaldava märgistatud kompleksi võib välja lõigata, peptiidfragmentideks

jaotada ja allutada valgu mikrosekveneerimisele. Mikrosekveneerimise teel saadud aminohapete järjestust kasutatakse kõdu-oligonukleotiidsõndide kogumi loomiseks cDNA raamatukogu sõelumise eesmärgil eeldatavat retseptorit kodeeriva geeni tuvastamiseks.

**[0817]** Veel ühe antagonistide analüüsi raames inkubeeritakse retseptorit ekspresseerivat membraanpreparaati või imetajarakke märgistatud CD79b polüpeptiidiga kandidaatühendi juuresolekul. Nii saab mõõta ühendi võimet taolise vastastikmõju võimendamiseks või blokeerimiseks.

**[0818]** Potentsiaalsete antagonistide konkreetsemateks näideteks on oligonukleotiid, mis seondub immunoglobuliiniga liitunud CD79b polüpeptiidiga, ning eriti antikehad, mis hõlmavad, kuid mitte ainult, polü- ja monokloonseid antikehi ning antikehafragmente, üheaahelalisi antikehi, antiidiotüüpseid antikehi ja taoliste antikehade või nende fragmentide kimäärseid või humaniseeritud variante, nagu ka inimese antikehi ja antikehafragmente. Alternatiivselt võib potentsiaalseks antagonistiks olla tihedas suguluses valk, näiteks CD79b polüpeptiidi muteerunud vorm, mis tuvastab retseptori, kuid ei avalda mingit mõju, pärssides sedakaudu konkureerivalt CD79b polüpeptiidi toimet.

**[0819]** Siin tuvastatud CD79b polüpeptiidi spetsiifiliselt siduvaid antikehi, nagu muidki siin eelnevalt avaldatud sõelumisanalüüsidega tuvastatud molekulile võib mitmesuguste häirete, sh. vähi, raviks manustada farmatseutiliste kompositsioonide kujul.

**[0820]** Kui CD79b polüpeptiid on rakusisene ja inhibiitoritena kasutatakse terveid antikehi, on eelistatavad internaliseeritavad antikehad. Samas võib leiutisekohase antikeha või antikehafragmendi toimetamiseks rakkudesse kasutada ka lipofektsioone või liposome. Kui kasutatakse antikehafragmente, on eelistatav väikseim pärssiv fragment, mis seondub spetsiifiliselt sihtmärkvalgu sidumisdomeeniga. Näiteks võib antikeha varieeruva piirkonna järjestustele tuginedes kujundada peptiidmolekule, mis säilitavad võime seonduda sihtmärkvalgu järjestusega. Niisuguseid peptiide võib sünteesida keemiliselt ja/või toota rekombinantse DNA tehnoloogia abil, vt nt Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

**[0821]** Siin kirjeldatud preparaat võib samuti sisaldada enam kui ühte toimeainet, kui see on vajalik konkreetse tervise seisundi ravimiseks, eelistatavalt on niisuguste toimeainete toimed vastastikku täiendavad ega avalda üksteisele ebasoodsat mõju. Alternatiivselt või täiendavalt võib kompositsioon sisaldada agensit, mis võimendab selle toimet, nagu näiteks tsütotoksilist agensit, tsütokiini, kemoterapeutikumi või kasvu pärssivat agensit. Eelistatavalt sisalduvad

niisugused molekulid kompositsioonis kogustes, mis on sel eesmärgil ette nähtud kasutamiseks tõhusad.

#### M. Antikeha derivaadid

[0822] Leiutisekohaseid antikehi võib lisaks modifitseerida nii, et need sisaldaksid täiendavaid mittevalk-osamolekule, mis on tehnika tasemest teada ja hõlpsasti kättesaadavad. Eelistatavalt on antikeha derivaatimiseks sobivateks osamolekulideks vees lahustuvad polümeerid. Vees lahustuvate polümeeride näideteks on, kuid mitte ainult, polüetüleenglükool (PEG), etüleenglükooli/propüleenglükooli kopolümeerid, karboksümetüülselluloos, dekstraan, polüvinüülalkohol, polüvinüülpürrolidoon, polü-1,3-dioksolaan, polü-1,3,6-trioksaan, etüleenimaleiinhüdriidi kopolümeer, polüaminohapped (kas homopolümeerid või juhuslikud polümeerid) ja dekstraan või polü(n-vinüülpürrolidoon)polüetüleenglükool, polüpropüleenglükooli homopolümeerid, polüpropüleenoksiidi/etüleenoksiidi kopolümeerid, polüoksüetüülitud polüoolid (nt. glütserool), polüvinüülalkohol ning nende segud. Polüetüleenglükoolpropioon-aldehüüdil võib olla eeliseid tootmise seisukohast, tulenevalt selle stabiilsusest vees. Polümeeril võib olla mis tahes molekulmass, polümeer võib olla hargnenud või hargnemata. Antikehale kinnitunud polümeeride arv võib varieeruda, kui kinnitunud on enam kui üks polümeer, võib tegu olla sama või erinevate molekulidega. Üldjuhul võib derivatimiseks kasutatud polümeeride arvu ja/või tüübi määrata kaalutluste põhjal, mis hõlmavad muu hulgas, kuid mitte ainult, täiustatava antikeha omadusi või toimet, antikehaderivaadi kasutamist ravi eesmärgil kindlaksmääratud tingimustel jne.

#### N. Sõelumismeetod

[0823] Käesoleva leiutise veel üks teostus on suunatud CD79b polüpeptiidi juuresoleku määramise meetodile proovis, milles kahtlustatakse CD79b polüpeptiidi sisaldumist, kusjuures meetod hõlmab proovi eksponeerimist selle antikeha-ravimi konjugaadile, mis seondub CD79b polüpeptiidiga ja määrab selle antikeha-ravimi konjugaadi seondumise CD79b polüpeptiidiga proovis, kusjuures vastava seondumise toimumine viitab CD79b polüpeptiidi juuresolekule proovis. Valikuliselt võib proov sisaldada rakke (mis võivad olla vähirakud), mille korral kahtlustatakse CD79b polüpeptiidi ekspressiooni. Antikeha-ravimi konjugaat, mida

meetodi raames kasutatakse, võib valikuliselt olla detekteeritavalt märgistatud, tahkele toesele kinnitatud vms.

**[0824]** Käesoleva leiutise veel üks teostus on suunatud kasvaja olemasolu diagnoosimise meetodile imetajal, mille korral meetod hõlmab (a) katseproovi, mis sisaldab imetajalt saadud koerakke, viimist kokkupuutesse selle antikeha-ravimi konjugaadiga, mis seondub CD79b polüpeptiidiga, ning (b) kompleksi moodustumise detekteerimist antikeha-ravimi konjugaadi ning katseproovis sisalduva CD79b polüpeptiidi vahel, kusjuures kompleksi moodustumine viitab kasvaja olemasolule imetajal. Valikuliselt on antikeha-ravimi konjugaat detekteeritavalt märgistatud, tahkele toesele kinnitatud vms. ja/või koerakkude katseproov saadakse individilt, kellel kahtlustatakse vähkkasvajad.

#### IV. Täiendavad meetodid CD79b-vastaste antikehade ja immunokonjugaatide kasutamiseks

##### A. Diagnostikameetodid ja detekteerimismeetodid

**[0825]** Ühe eripärana on leiutisekohased CD79b-vastased antikehad ja immunokonjugaadid kasutatavad CD79b juuresoleku tuvastamiseks bioloogilises proovis. Mõiste „detekteerimine“ hõlmab siin kasutatuna kvantitatiivset või kvalitatiivset detekteerimist. Teatud teostustes hõlmab bioloogiline proov rakku või kude. Teatud teostustes hõlmavad vastavad koed normaalseid ja/või vähikudesid, näiteks B-rakke ning/või B-rakkudega seotud kudesid, mis ekspresseerivad CD79b-d muude kudedega võrreldes kõrgematel tasemetel.

**[0826]** Leiutise ühe eripärana pakutakse CD79b olemasolu detekteerimise meetodit bioloogilises proovis. Teatud teostustes hõlmab meetod bioloogilise proovi viimist kokkupuutesse CD79b-vastase antikehaga tingimustel, mis võimaldavad CD79b-vastase antikeha seondumist CD79b-ga, ning kompleksi moodustumise detekteerimist CD79b-vastase antikeha ja CD79b vahel.

**[0827]** Leiutise ühe eripärana pakutakse CD79b lisandunud ekspressiooniga seotud häire diagnoosimise meetodit. Teatud teostuste korral hõlmab meetod katseraku viimist kokkupuutesse CD79b-vastase antikehaga, CD79b ekspressioonitaseme määramist (kas kvantitatiivselt või kvalitatiivselt) katseraku poolt CD79b-vastase antikeha CD79b-ga seondumise detekteerimise teel, ning CD79b katseraku poolt ekspresseerimise taseme võrdlemist CD79b ekspresseerimise tasemega kontrollraku poolt (nt. normaalse raku, mis pärineb samast koest

kui katserakk, või raku, mis ekspresseerib CD79b-d tasemetel, mis on vastava normaalse rakuga võrreldavad), kusjuures CD79b ekspressiooni kõrgem tase katseraku poolt võrdluses kontrollrakuga annab tunnistust CD79b lisandunud ekspressiooniga seotud häire olemasolust. Teatud teostustes saadakse katserakk indiviidilt, kellel kahtlustatakse CD79b lisandunud ekspressiooniga seotud häire olemasolu. Teatud teostustes on häireks rakkude proliferatiivne häire, nagu vähk või kasvaja.

**[0828]** Näitlikud rakkude proliferatiivsed häired, mida saab diagnoosida leiutisekohase anti-keha abil, hõlmavad B-rakkude häiret ja/või B-rakulist proliferatiivset häiret, mille alla kuuluvad muuhulgas, kuid mitte ainult, lümfoom, mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiivne agressiivne NHL, retsidiivne indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsütaarne leukeemia (CLL), väike lümfotsütaarne lümfoom, leukeemia, leukeemiline retikuloendotelioos (HCL), akuutne lümfotsütaarne leukeemia (ALL) ning mantelrakkude lümfoom.

**[0829]** Teatud teostustes hõlmab diagnostika- või detektsioonimeetod, nagu need, mida eespool on kirjeldatud, CD79b-vastase antikeha seondumise detekteerimist CD79b-ga, mis on ekspresseeritud raku pinnal või membraanipreparaadis, mis on saadud CD79b-d oma pinnal ekspresseerivast rakust. Teatud teostustes hõlmab meetod raku viimist kokkupuutesse CD79b-vastase antikehaga tingimustel, mis võimaldavad CD79b-vastase antikeha seondumist CD79b-ga, ning kompleksi moodustumise detekteerimist CD79b-vastase antikeha ja CD79b vahel raku pinnal. Näitlikuks analüüsiks, mis võimaldab tuvastada CD79b-vastase antikeha seondumist raku pinnal ekspresseeritud CD79b-ga, on „FACS“ analüüs.

**[0830]** CD79b-vastaste antikehade CD79b-ga seondumise tuvastamiseks võib kasutada teatud muid meetodeid. Vastavad meetodid hõlmavad, kuid mitte üksnes, antigeeni siduvaid analüüse, mis on tehnika tasemest hästi tuntud, näiteks Western blot'i, radioimmunoanalüüsid, ELISA (ensüümiseoseline immunosorbentanalüüs), "sandwich"-immunoanalüüsid, immunosadestusanalüüsid, fluorestsentsimmunoanalüüsid, A-valgu immunoanalüüsid ja immunohistokeemia (IHC).

**[0831]** Teatud teostustes on CD79b-vastase antikehad märgistatud. Märgised hõlmavad, kuid mitte üksnes, märgiseid või osamolekule, mis detekteeritakse otse (näiteks florestseeruvad, kromofoorid, elektrontihedad, kemoluminesseeruvad ja radioaktiivsed märgised), nagu ka osamolekule, näiteks ensüüme või ligande, mis detekteeritakse kaudselt, st ensümaatilise reaktsiooni või molekulaarse vastastikmõju kaudu. Märgiste näideteks on, kuid mitte üksnes,



radioisotoobid  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  ja  $^{131}\text{I}$ , fluorofoorid nagu haruldaste muldmetallide kelaadid või fluorestseini ning selle derivaadid, rodamiin ja selle derivaadid, dansüül, umbelliferoon, lutsiferaasid, näiteks jaanimardikalise lutsiferaas ning bakteriaalne lutsiferaas (US patent 4737456), lutsiferiin, 2,3-dihüdrotalasiindioonid, mädarõika peroksidaas (HRP), leeliseline fosfataas,  $\beta$ -galaktosidaas, glükoamülaas, lüsoosüüm, sahhariidi oksidaasid, nt glükoosi oksidaas, galaktoosi oksidaas ja glükoos-6-fosfaat-dehüdrogenaas, heterotsükliilised oksidaasid, nagu urikaas ning ksantiinoksidaas, liidetuna ensüümiga, milles kasutatakse vesinikperoksiidi värvi prekursori oksüdeerimiseks, nagu HRP, laktoperoksidaas või mikroperoksidaas, biotiin/avidiin, spin-märgised, bakteriofaagmärgised, stabiilsed vabad rühmid jms.

**[0832]** Teatud teostustes on CD79b-vastased antikehad immobiliseeritud lahustumatul maatriksil. Immobiliseerimine toob kaasa CD79b-vastase antikeha lahutamise kogu võimalikust lahuses vabalt säilinud CD79b-st. Tavapärast kasutatakse selleks kas CD79b-vastase antikeha analüüsi eel lahustumatuks muutmist, nt. vees lahustumatule maatriksile või pinnale adsorbeerimise (Bennich et al., US patent 3720760) või kovalentse ühendamise (näiteks glutaaraldehüüdi ristsidumist kasutades) teel, või CD79b-vastase antikeha muutmist lahustumatuks pärast kompleksi moodustumist CD79b-vastase antikeha ja CD79b vahel, nt. Immuunsadestamise teel.

**[0833]** Ükskõik millist eeltoodud diagnostika või detekteerimise teostust võib rakendada nii, et CD79b-vastase antikeha asemel või sellele lisaks kasutatakse leiutisekohast immunokonjugaati.

## B. Ravimeetodid

**[0834]** Leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati saab kasutada näiteks *in vitro*, *ex vivo* ja *in vivo* ravimeetodites. Ühe eripärana pakutakse leiutises rakkude kasvu või proliferatiooni pärssimise meetodid kas *in vivo* või *in vitro*, kusjuures meetod hõlmab raku eksponeerimist CD79b-vastasele antikehale või selle immunokonjugaadile tingimustel, mis võimaldavad immunokonjugaadi seondumist CD79b-ga. „Rakkude kasvu või proliferatsiooni pärssimine“ tähendab raku kasvu või proliferatsiooni piiramist vähemalt 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% või 100% võrra ja hõlmab rakusurma esilekutsumist. Teatud teostustes on rakuks kasvajarakk. Teatud teostustes on rakuks B-rakk. Teatud teostustes on rakuks ksenograft, nagu siin on näitlikustatud.

**[0835]** Ühe eripärana kasutatakse leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati B-rakulise proliferatiivse häire ravimiseks või ärahoidmiseks. Teatud teostustes on rakkude proliferatiivne häire seotud CD79b lisandunud ekspressiooni ja/või aktiivsusega. Näiteks B-rakuline proliferatiivne häire on teatud teostustes seotud CD79b lisandunud ekspressiooniga B-rakkude pinnal. Teatud teostustes on B-rakuline proliferatiivne häire kasvaja või vähk. Leiutisekohaste antikehade või immunokonjugaatidega ravitavate B-rakuliste proliferatiivsete häirete näideteks on, kuid mitte üksnes, lümfoom, mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiivne agressiivne NHL, retsidiivne indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsütaarne leukeemia (CLL), väike lümfotsütaarne lümfoom, leukeemia, leukeemiline retikuloendotelioos (HCL), akuutne lümfotsütaarne leukeemia (ALL) ning mantelrakkude lümfoom.

**[0836]** Ühe eripärana pakutakse leiutises B-rakulise proliferatiivse häire ravimise meetodeid, mis hõlmavad CD79b-vastase antikeha või selle immunokonjugaadi tõhusa koguse manustamist indiviidile. Teatud teostustes hõlmab meetod B-rakulise proliferatiivse häire ravimiseks CD79b-vastast antikeha või CD79b-vastast immunokonjugaati ja valikuliselt vähemalt üht täiendavat terapeutikumi, näiteks mõnd allpool käsitletavat terapeutikumi, sisaldava farmatseutilise kompositsiooni tõhusa koguse manustamist indiviidile. Teatud teostustes hõlmab meetod B-rakulise proliferatiivse häire ravimiseks farmatseutilise kompositsiooni tõhusa koguse manustamist indiviidile, mis sisaldab 1) CD79b antikeha ja tsütotoksilist agensit sisaldavat immunokonjugaati, ning valikuliselt 2) vähemalt üht täiendavat terapeutikumi, näiteks mõnd allpool käsitletavat terapeutikumi.

**[0837]** Ühe eripärana on vähemalt mõningad leiutisekohastest antikehadest või immunokonjugaatidest võimelised CD79b sidumiseks muudel liikidel peale inimese. Seega võib leiutisekohaseid antikehi või immunokonjugaate kasutada CD79b sidumiseks näiteks CD79b sisaldavas rakukultuuris inimestel või muudel imetajatel (näiteks šimpansil, paavianil, marmosetil, makaagil, reesusmakaagil, seal või hiirel), kelle CD79b-ga leiutisekohane antikeha või immunokonjugaat ristreageerib. Ühe teostuses võib CD79b-vastast antikeha või immunokonjugaati kasutada CD79b sihtmärgistamiseks B-rakkudel, viies antikeha või immunokonjugaadi kokkupuutesse CD79b-ga antikeha või immunokonjugaadi-antigeeni kompleksi moodustamiseks nii, et immunokonjugaadi konjugeeritud tsütotoksiin saaks juurdepääsu raku sisemusele. Ühes teostuses on CD79b inimese CD79b.

**[0838]** Ühes teostuses võib CD79b-vastast antikeha või immunokonjugaati kasutada meetodi raames CD79b sidumiseks indiviidil, kes kannatab CD79b lisandunud ekspressiooni ja/või aktiivsusega seotud häire all, kusjuures meetod hõlmab antikeha või immunokonjugaadi manustamist indiviidile, millega kaasneb CD79b sidumine indiviidil. Ühes teostuses internaliseeritakse seotud antikeha või immunokonjugaat CD79b-d ekspresseerivasse B-rakku. Ühes teostuses on CD79b inimese CD79b ja indiviidiks on inimene. Alternatiivselt võib indiviidiks olla imetaja, kes ekspresseerib CD79b-d, millega CD79b-vastane antikeha seondub. Täiendavalt võib indiviidiks olla imetaja, kelle organismi CD79b on viidud (nt CD79b manustamise või CD79b kodeeriva transgeeni ekspresseerimise teel).

**[0839]** CD79b-vastast antikeha või immunokonjugaati võib manustada inimesele ravi eesmärgil. Lisaks on võimalik CD79b-vastase antikeha või immunokonjugaadi manustamine muule imetajale peale inimese (nt primaadile, seale, rotile või hiirele), kes ekspresseerib CD79b-d, millega antikeha ristreageerib, veterinaarsetel eesmärkidel või inimhaiguse loomamudelina. Mis puutub viimatimainitud loomamudelitesse, siis võib neist olla kasu leiutisekohaste antikehade või immunokonjugaatide terapeutilise tõhususe hindamisel (nt. annuste ja manustamise mõjuperioodi katsetustel).

**[0840]** Leiutisekohaseid antikehi või immunokonjugaate võib ravis kasutada kas eraldi või kombinatsioonis muude kompositsioonidega. Näiteks võib leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati manustada koos vähemalt ühe täiendava terapeutikumiga ja/või adjuvandiga. Teatud teostustes on täiendavaks terapeutikumiks tsütotoksiline agens, kemoterapeutikum või kasvu pärssiv agens. Ühes vastavas teostuses on kemoterapeutikumiks agens või agensite kombinatsioon, nagu näiteks tsüklofosfamiid, hüdroksüdaunorubitsiin, adriamütsiin, doksorubitsiin, vinkristiin (Oncovin™), prednisoloon, CHOP, CVP või COP, või immunoteraapeutikum, nagu CD20-vastane antikeha (nt. Rituxan®) või VEGF-vastane antikeha (nt Avastin®), kusjuures kombineeritud ravist on kasu vähkide ja/või B-rakuliste häirete nagu B-rakulise proliferatsiooni häired ravimisel, sealhulgas lümfoomi, mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), agressiivse NHL, retsidiivse agressiivse NHL, retsidiivse indolentse NHL, refraktoorse NHL, refraktoorse indolentse NHL, kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (CLL), väikese lümfotsütaarse lümfoomi, leukeemia, leukeemilise retikuloendotelioosi (HCL), akuutse lümfotsütaarse leukeemia (ALL) ning mantelrakkude lümfoomi korral.

**[0841]** Üldmärgitud kombineeritud ravid hõlmavad kombineeritud manustamist (kui kaks või enam terapeutikumiga on kaasatud samasse või eraldi preparaati) ja eraldi manustamist,

millisel juhul võib leiutisekohase antikeha või immunokonjugaadi manustamine toimuda enne täiendava terapeutikumi ning/või adjuvandi manustamist, sellega samaaegselt ja/või pärast seda. Leiutisekohaseid antikehi või immunokonjugaate saab samuti kasutada kombinatsioonis kiiritusraviga.

**[0842]** Leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati (ja mis tahes täiendavat terapeutikumi või adjuvanti) võib manustada ükskõik millisel sobival viisil, sealhulgas parenteraalselt, subkutaanselt, intraperitoneaalselt, intrapulmonaarselt ning intranasaalselt ja (kui nõutav on lokaalne ravi) intralesionaalselt. Parenteraalsed infusioonid hõlmavad intramuskulaarset, intravenooset, intraarteriaalset, intraperitoneaalset või subkutaanset manustamist. Lisaks sobib antikeha või immunokonjugaat manustamiseks impulss-infusiooni teel, eriti antikeha või immunokonjugaadi vähenevate annuste korral. Annustada võib ükskõik millisel sobival viisil, näiteks injektsioonide (nagu intravenoossed või subkutaansed injektsioonid) teel, sõltuvalt osaliselt sellest, kas manustamine on lühiajaline või krooniline.

**[0843]** Leiutisekohased antikehad või immunokonjugaadid valmistatakse, annustatakse ja manustatakse kooskõlas heade meditsiinitavadega. Antud kontekstis käsitletavat tegurit hõlmavad konkreetset ravitavat tervisehäiret, konkreetset ravitavat imetajat, patsiendi kliinilist seisundit, tervisehäire põhjust, agensi kohaletoimetuskohata, manustamisviisi, manustamisskeemi ja muid praktiseerivatele arstidele teadaolevaid tegureid. Antikeha või immunokonjugaat ei pruugi, kuid võib valikuliselt olla valmistatud ühe või enama agensiga, mida praegusel ajal kasutatakse asjaomase tervisehäire ärahoidmiseks või ravimiseks. Niisuguste muude agensite tõhus kogus oleneb kompositsioonis sisalduvast antikeha või immunokonjugaadi kogusest, tervisehäire või ravi liigist ja muudest ülalkirjeldatud teguritest. Tavaliselt kasutatakse neid annustes ja manustamisviiside kohaselt, mis vastavad siin kirjeldatule, või vastavad siin kirjeldatud annustele umbes 1 kuni 99% ulatuses, või ükskõik millises annuses või manustamisviisi kohaselt, mille sobivus on empiiriliselts/kliiniliselt kindlaks tehtud.

**[0844]** Haiguse ärahoidmisel või ravimisel sõltub leiutisekohase antikeha või immunokonjugaadi (kasutamisel üksi või kombinatsioonis ühe või mitme täiendava terapeutikumi, näiteks kemoterapeutikumiga) kohane annus ravitava haiguse liigist, antikeha või immunokonjugaadi liigist, haiguse raskusest ja kulgemisest, antikeha või immunokonjugaadi manustamisest ennetuse või ravi eesmärgil, varasemast ravist, patsiendi haigusloost ja vastusest antikehale või immunokonjugaadile ning raviarsti äranägemisest. Antikeha või immunokon-

jugaat manustatakse patsiendile ühekordselt või mitme raviseansi raames. Haiguse tüübist ja raskusastmest olenevalt võib antikeha või immunokonjugaadi esialgseks patsiendile manustatavaks kandidaatannuseks olla umbes 1 µg/kg kuni 100 mg/kg (nt. 0,1 mg/kg-20 mg/kg), näiteks ühe või mitme eraldi manustamiskorra või pideva infusiooni teel. Üks tüüpiline päevaannus võib jääda vahemikku umbes 1 µg/kg kuni 100 mg/kg või üle selle, olenevalt ülalmainitud teguritest. Korduval manustamisel mitme päeva pikkuse või pikema ajavahemiku jooksul jätkatakse ravi üldjuhul seisundist sõltuvalt kuni haiguse sümptomite soovitud allasurumiseni. Üks antikeha või immunokonjugaadi näidisannus jääb vahemikku umbes 0,05 mg/kg kuni 10 mg/kg. Seega on võimalik antikeha või immunokonjugaadi ühe või mitme umbes 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg või 10 mg/kg annuse (või nende mis tahes kombinatsiooni) manustamine patsiendile. Niisuguste annuste manustamine võib toimuda vahelduvalt, näiteks kord nädalas või kord kolme nädala jooksul (nt. nõnda, et patsient saab umbes kaks kuni umbes kakskümmend või nt. umbes kuus antikeha või immunokonjugaadi annust). Võimalik on algsest suurema küllastusannuse manustamine, millele järgneb üks või mitu väiksemat annust. Näidislik annustamisskeem hõlmab algse umbes 4 mg/kg küllastusannuse manustamist, millele järgneb antikeha iganädalane umbes 2 mg/kg säilitusannus. Samas võivad kasulikuks osutada muudki annustamisskeemid. Selle ravi edenemist on lihtne jälgida tavapärase meetodite ja analüüside abil.

### C. Toime analüüsid

[0845] Leiutisekohaste CD79b-vastaste antikehade ja immunokonjugaatide füüsikalisi/keemilisi omadusi ning/või bioloogilisi toimeid võib iseloomustada mitmesuguste tehnika tasemest tuntud analüüside abil.

#### 1. Toime analüüsid

[0846] Ühe eripärana pakutakse analüüse bioloogilise toimega CD79b-vastaste antikehade või nende immunokonjugaatide tuvastamiseks. Bioloogiline toime võib hõlmata näiteks või-met pärssida raku kasvu või proliferatsiooni (nt „rakku surmav“ toime) või võimet kutsuda esile raku surma, sh programmeeritud rakusurma (apoptoosi). Ette nähakse ka antikehad või immunokonjugaadid, millel on vastav bioloogiline toime *in vivo* ja/või *in vitro*.

[0847] Teatud teostustes testitakse CD79b-vastast antikeha või selle immunokonjugaati võime osas pärssida rakkude kasvu või proliferatsiooni *in vitro*. Rakkude kasvu või proliferatsiooni pärssimise analüüsid on tehnika tasemest hästi tuntud. Teatud rakkude proliferatsioonianalüüsid, mille näideteks on siin kirjeldatud „raku surmamise“ analüüsid, mõõdavad rakkude elujõulisust. Üheks niisuguseks analüüsiks on CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (rakkude elujõulisuse luminescentsanalüüs), mis on kaubanduslikult saadaval firmalt Promega (Madison, WI). Analüüsiga määratakse elujõuliste rakkude arv kultuuris juuresoleva ATP kvantifitseerimise teel, mis näitab ära metaboolselt aktiivsed rakud, vt. Crouch et al., (1993) J. Immunol. Meth., 160: 81-88, US patent 6602677. Analüüsi võib teha 96 või 384 süvendiga variandis, mistõttu see sobib automatiseeritud kõrge jõudlusega sõelumiseks (HTS), vt. Cree et al., (1995) AntiCancer Drugs, 6: 398-404. Analüüs hõlmab üksiku reagenti (CellTiter-Glo® Reagent) lisamist vahetult kultiveeritud rakkudele. See toob kaasa rakkude lüüsi ja lutsiferaasi reaktsioonist põhjustatud luminescentssignaali tekke. Luminescentssignaali on võrdeline juuresoleva ATP kogusega, mis on otseselt võrdeline kultuuris sisalduvate elujõuliste rakkude arvuga. Andmeid saab salvestada luminomeetri või laengsidestuskaameraga (CCD). Luminescentsi väljundit väljendatakse suhtelistes valgusühikutes (RLU).

[0848] Veel üheks rakkude proliferatsiooni analüüsiks on analüüs „MTT“ – see on kolorimeetiline analüüs, millega mõõdetakse 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiidi oksüdeerimist formasaaniks mitokondriaalse reduktaasi abil. Sarnaselt CellTiter-Glo™ analüüsiga näitab see analüüs rakukultuuris sisalduvate metaboolselt aktiivsete rakkude arvu, vt. nt. Mosmann, (1983) J. Immunol. Meth., 65: 55-63 ja Zhang et al., (2005) Cancer Res., 65: 3877-3882.

[0849] Ühe eripärana testitakse CD79b-vastast antikeha suutlikkuse osas kutsuda esile rakuurma *in vitro*. Analüüsid rakusurma esilekutsumiseks on tehnika tasemest hästi tuntud. Mõningates teostustes mõõdavad niisugused analüüsid nt. membraani terviklikkuse kadu, millest annab märku propiidiumjodiidi (PI), trüpaansinise (vt. Moore et al., (1995) Cytotechnology, 17: 1-11) või 7AAD omastamine. PI omastamise näidisanalüüsil kultiveeritakse rakke söötmes Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) : Ham'i F-12 (50 : 50), millele on lisatud 10% soojusega desaktiveeritud FBS-i (Hyclone) ja 2 mM L-glutamiini. Seega viiakse analüüs läbi komplemendi ja immuunefektorrakkude puudumisel. Rakud külvatatakse 100 x 20 mm tassidele tihedusega  $3 \times 10^6$  rakku tassi kohta ning jäetakse üle öö

kinnituma. Sööde eemaldatakse ja asendatakse üksnes värske söötme või söötmega, mis sisaldab erinevas kontsentratsioonis leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati. Rakke inkubeeritakse 3 päeva. Töötluste järel pestakse monokihte PBS-iga ja eraldatakse trüpsiiniga töötlemisel. Seejärel tsentrifugeeritakse rakke 1200 p/min juures 5 minutit temperatuuril 4 °C, rakupellet resuspendeeritakse 3 ml külmas Ca<sup>2+</sup> sidumispuhvris (10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) ja alikvooditakse 35 mm sõelkorgiga 12 x 75 mm torudesse (1 ml toru kohta, 3 toru töötlusrühma kohta) rakukämpude eemaldamiseks. Seejärel sisestatakse torudesse PI (10 µg/ml). Proove analüüsitakse FACSCAN™ voolutsütomeetri ja FACSCONVERT™ CellQuest tarkvara (Becton Dickinson) abil. Nõnda saab tuvastada antikehi või immunokonjugaate, mis kutsuvad esile statistiliselt olulise rakusurma tasemeid, määratuna PI omastamise põhjal.

**[0850]** Ühe eripärana analüüsitakse CD79b-vastast antikeha või immunokonjugaati selle suutlikkuse osas kutsuda esile apoptoosi (programmeeritud rakusurma) *in vitro*. Apoptoosi esilekutsuvate antikehade või immunokonjugaatide korral kasutatavaks näidisanalüüsiks on anneksiini sidumisanalüüs. Anneksiini näidissidumisanalüüsi korral kultiveeritakse ja külvatatakse rakud tassidesse eelnevas lõigus kirjeldatud viisil. Sööde eemaldatakse ja asendatakse üksnes värske söötme või söötmega, mis sisaldab 0,001 kuni 10 µg/ml leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati. Kolmepäevase inkubatsiooni järel pestakse monokihte PBS-iga ja eraldatakse trüpsiiniga töötlemisel. Seejärel rakud tsentrifugeeritakse, resuspendeeritakse Ca<sup>2+</sup> sidumispuhvris ja alikvooditakse torudesse eelnevas lõigus kirjeldatud moel. Järgmiseks sisestatakse torudesse märgistatud anneksiin (nt. anneksiin V-FITC) (1 µg/ml). Proove analüüsitakse FACSCAN™ voolutsütomeetri ja FACSCONVERT™ CellQuest tarkvara (BD Biosciences) abil. Nõnda tuvastatakse antikehad või immunokonjugaadid, mis kutsuvad esile statistiliselt olulisi anneksiini sidumistasemeid võrdluses kontrollivahendiga. Veel üheks apoptoosi esilekutsuvate antikehade või immunokonjugaatide korral kasutatavaks näidisanalüüsiks on histooni DNA kolorimeetriline ELISA analüüs genoomse DNA nukleosoomidevahelise lagundamise tuvastamiseks. Niisuguse analüüsi läbiviimiseks võib kasutada näiteks Cell Death Detection ELISA komplekti (Roche, Palo Alto, CA).

**[0851]** Ükskõik millise ülalkirjeldatud *in vitro* analüüsi korral kasutatavad rakud hõlmavad rakke või rakuliine, mis ekspresseerivad CD79b-d looduslikult või on CD79b ekspresseerimiseks tehniliselt kohandatud. Vastavad rakud hõlmavad kasvajakarakke, mille korral avaldub CD79b üleekspressioon võrdluses samast koest pärinevate normaalsete rakkudega. Samuti

hõlmavad taolised rakud rakuliine (sh vähirakuliine), mis ekspresseerivad CD79b-d, ja rakuliine, mis tavaliselt CD79b-d ei ekspresseeri, kuid on transfekteeritud CD79b-d kodeeriva nukleiinhappega.

**[0852]** Ühe eripärana testitakse CD79b-vastast antikeha või selle immunokonjugaati võime osas pärssida rakkude kasvu või proliferatsiooni *in vivo*. Teatud teostustes testitakse CD79b-vastast antikeha või selle immunokonjugaati võime osas pärssida kasvaja kasvu *in vivo*. Niisuguseks testimiseks võib kasutada *in vivo* mudelsüsteeme, näiteks ksenograaftimudeleid. Näitliku ksenograaftsüsteemi korral viiakse inimese kasvajakarakud sobivalt immuunpuuduliku looma, nt SCID hiire organismi. Loomale manustatakse leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati. Antikeha või immunokonjugaadi võime kasvaja kasvu pärssimiseks või vähendamiseks mõõdetakse. Ülalkirjeldatud ksenograaftsüsteemi teatud teostustes on inimese kasvajakaradeks inimpatsiendilt saadud kasvajakarakud. Niisugused ksenograaftide valmistamiseks kasutatavad rakud hõlmavad inimese leukeemia ja lümfoomi rakuliine, mille hulka kuuluvad, kuid mitte üksnes, BJAB-luc rakud (EBV-negatiivne Burkitti lümfoomirakuliin, mis on transfekteeritud lutsiferaasi reportergeeniga), Ramos rakud (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), SuDHL-4 rakud (DSMZ, Braunschweig, Saksamaa, AAC 495), DoHH2 rakud (vt. Kluin-Neilemans, H. C. et al., *Leukemia*, 5: 221-224 (1991) ja Kluin-Neilemans, H. C. et al., *Leukemia*, 8: 1385-1391 (1994)), Granta-519 rakud (vt. Jadayel, D. M. et al, *Leukemia*, 11(1): 64-72 (1997)). Teatud teostustes viiakse inimese kasvajakarakud sobivalt immuunpuuduliku looma organismi subkutaanse süstimise või siirdamisega sobivasse kohta, näiteks udara rasvkoesse.

## 2. Sidumisanalüüsid ja muud analüüsid

**[0853]** Ühe eripärana testitakse CD79b-vastast antikeha selle antigeeni siduva toime osas. Näiteks testitakse CD79b-vastast antikeha teatud teostustes selle suutlikkuse suhtes seonduda raku pinnal ekspresseeritud CD79b-ga. Niisuguseks testimiseks võib kasutada FACS analüüsi.

**[0854]** Ühe eripärana võib konkurentsianalüüse kasutada monokloonse antikeha, mis konkureerib hiire MA79b antikeha, humaniseeritud MA79b.v17 antikeha ja/või humaniseeritud MA79b.v18 ja/või humaniseeritud MA79b.v28 ja/või humaniseeritud MA79b.v32 antikehaga seondumisel CD79b-ga, tuvastamiseks. Teatud teostustes seondub niisugune konkureeriv



antikeha sama epitoobiga (nt. lineaarse või konformatsioonilise epitoobiga), mida seob hiire MA79b antikeha, humaniseeritud MA79bv.17 antikeha ja/või humaniseeritud MA79b.v18 antikeha ja/või humaniseeritud MA79b.v28 ja/või humaniseeritud MA79b.v32. Näitlikeks konkurentsianalüüsideks on, kuid mitte üksnes, tavapärased analüüsid, mida on käsitletud näiteks publikatsioonis Harlow, Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, 14. peatükk (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Üksikasjalikud näidismeetodid epitoobi, millega antikeha seondub, kaardistamiseks on esitatud publikatsioonis Morris, (1996) „Epitope Mapping Protocols“ teoses *Methods in Molecular Biology*, 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Väidetavalt seonduvad kaks antikeha sama epitoobiga juhul, kui kumbki blokeerib teise seondumist 50% võrra või enam.

**[0855]** Näitliku konkurentsianalüüsi korral inkubeeritakse immobiliseeritud CD79b lahuses, mis sisaldab esimest, märgistatud antikeha, mis seondub CD79b-ga (nt hiire MA79b antikeha, humaniseeritud MA79b.v17 antikeha ja/või humaniseeritud MA79b.v18 antikeha ja/või humaniseeritud MA79b.v28 ja/või humaniseeritud MA79b.v32), ning teist, märgistamata antikeha, mida testitakse võime suhtes konkureerida esimese antikehaga CD79b-ga seondumisel. Teine antikeha võib sisaldada hübriidoomi supernatandis. Kontrollivahendina inkubeeritakse immobiliseeritud CD79b-d lahuses, mis sisaldab esimest, märgistatud antikeha, mitte aga teist, märgistamata antikeha. Inkubeerimise järel tingimustel, mis võimaldavad esimese antikeha seondumist CD79b-ga, eemaldatakse seondumata antikeha liig ja mõõdetakse immobiliseeritud CD79b-ga seondunud märgiste hulk. Kui immobiliseeritud CD79b-ga seotud märgiste hulk katseproovis kontrollprooviga võrreldes väheneb oluliselt, kinnitab see asjaolu, et teine antikeha konkureerib esimese antikehaga CD79b sidumisel. Teatud teostustes esineb immobiliseeritud CD79b raku pinnal või membraanipreparaadis, mis on saadud CD79b-d oma pinnal ekspresseerivast rakust.

**[0856]** Ühe eripärana on puhastatud CD79b-vastased antikehad täiendavalt iseloomustatavad analüüsiseeria abil, mis hõlmab, kuid mitte üksnes, N-otsa sekveneerimist, aminohapete analüüsi, mittedenatureerivat geel-kõrgsurve-vedelikkromatograafiat (HPLC), massispektrometriat, ionivahetuskromatograafiat ning papaiini digestiooni.

**[0857]** Ühes teostuses käsitleb leiutis muudetud antikeha, millel on mõningad, kuid mitte kõik efektorfunktsioonid, mis muudavad selle soovitavaks kandidaadiks paljudeks rakendusteks, kus on tähtis antikeha poolväärtusaeg *in vivo*, kuid teatud efektorfunktsioonid (nagu komplement ja ADCC) on ebavajalikud või kahjulikud. Teatud teostustes mõõdetakse anti-

keha Fc toimeid üksnes soovitud omaduste alalhoidmise tagamiseks. Läbi saab viia *in vitro* ja/või *in vivo* tsütotoksilisuse analüüse, tõendamaks CDC ja/või ADCC toimete langust/amendumist. Näiteks võib teha Fc retseptori (FcR) sidumisanalüüse, et kinnitada antikehal Fc $\gamma$ R sidumisvõime puudumist (ja sellest tulenevalt tõenäoliselt ADCC toime puudumist), kuid FcRn sidumisvõime säilimist. Primaarsed ADCC-d vahendavad rakud, NK rakud, ekspresseerivad üksnes Fc $\gamma$ RIII, samas kui monotsüüdid ekspresseerivad Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII ja Fc $\gamma$ RIII. Kokkuvõtte FcR ekspressioonist vereloomerakkudel on esitatud publikatsioonis Ravetch, Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92 (1991) tabelis 3, lk. 464. *In vitro* analüüsi näidet huvipakkuva molekuli ADCC toime hindamiseks on kirjeldatud US patentides 5500362 või US 5821337. Niisugustes analüüsides kasutatavad efektorrakud hõlmavad perifeerse vere mononukleaarseid rakke (PBMC) ja loomulikke tapjarakke (NK). Alternatiivselt või täiendavalt võib huvipakkuva molekuli ADCC toimet hinnata *in vivo*, näiteks loomamudelil, mida on käsitletud publikatsioonis Clynes et al., PNAS (USA), 95: 652-656 (1998). Samuti on võimalik Clq sidumisanalüüside läbiviimine veendumaks, et antikeha ei ole suuteline Clq sidumiseks ega oma seetõttu CDC toimet. Komplemendi aktiveerimise hindamiseks võib läbi viia CDC analüüsi, näiteks vastavalt publikatsioonis Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996) esitatud kirjeldusele. FcRn sidumise ja *in vivo* kliirensi/poolväärtusaja määramise võib samuti läbi viia tehnika tasemest teadaolevate meetodite abil.

**[0858]** Järgnevad näited on esitatud üksnes näitlikustamise eesmärkidel ega ole mõeldud käesoleva leiutise ulatust mingil viisil piirama.

## NÄITED

**[0859]** Näidetes mainitud kaubanduslikult saadavaid reagente kasutati kooskõlas tootjate juhistega, kui pole osutatud teisiti. Näidetes kasutatud antikehad hõlmavad kaubanduslikult saadavaid antikehi, sealhulgas, kuid mitte üksnes, CD79b-vastaseid antikehi (ostetud firmalt Biomeda (Foster City, CA), BD Bioscience (San Diego, CA) või Ancell (Bayport, MN)), CD79b-vastaseid antikehi (valmistatud hübriidoomidest, mis hoiustati ATCC-s kui HB11413 20. juulil 1993) ja kimäärseid CD79b-vastaseid antikehi (sisaldavad varieeruvaid domeene antikehadelt, mis valmistati hübriidoomidest, mis hoiustati ATCC-s kui HB11413 20. juulil 1993). Järgnevates näidetes ja kogu kirjelduses ATCC registreerimisnumbrite abil tuvasta-

tavate rakkude allikaks on Ameerika rakukultuuride kollektsioon (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

NÄIDE 1: Humaniseeritud CD79b-vastase antikeha loomine

**[0860]** Jääkide numbrid vastavad Kabati süsteemile (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5. väljaanne, toim., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Kasutatakse aminohapete ühetähelisi lühendeid. DNA kõduvuste tähistamiseks on kasutatud IUB koodi (N = A/C/G/T, D = A/(i/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).

*A. Humaniseeritud CD79b-vastase antikeha siirik*

**[0861]** Loodi mitmesuguseid humaniseeritud CD79b-vastaseid antikehi. Hiire MA79b antikeha (MA79b) VL ja VH domeenid (Roswell PADC Cancer Institute; Okazaki et al., Blood, 81:84-94 (1993)) joondati inimese VL kapa I (huKI) ning inimese alarüma III VH (huIII) konsensusdomeenidega. HVR-siiriku tegemiseks kasutati aktseptori VH raamistikku, mis erineb inimese alarüma III VH konsensusdomeenist 3. positsioonis: R71A, N73T ja L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992)). Hiire MA79b (MA79b) hüpervarieeruvad piirkonnad sisestati tehniliselt aktseptori inimese konsensusraamistikku MA79b otsese HVR-siiriku loomiseks (mille kohta siin kasutatakse nimetusi „MA79b siirik“ või „MA79b-siirik“ või „MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha“ või „huMA79b-siirik“). VL domeenis siirati järgnevad piirkonnad inimese konsensus-aktseptoris: positsioonid 24-34 (L1), 50-56 (L2) ja 89-97 (L3) (joonised 7A-B). VH domeenis siirati positsioonid 26-35 (H1), 49-65 (H2) ja 93-102 (H3) (joonised 8A-B). Publikatsioonis MacCallum et al., (MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262: 732-745 (1996)) analüüsiti antikeha ja antigeeni kompleksi kristallstruktuure ning leiti, et raske ahela positsioonid 49, 93 ja 94 on kontaktpiirkonna osaks ning seetõttu kaasatud HVR-H2 ja HVR-H3 määratlusse seoses antikehade humaniseerimisega.

**[0862]** Otsesuunas siiratud variant (huMA79b-siirik) loodi Kunkeli mutageneesi teel, nii faagil kuvatud Fab-i kui ka IgG-na, iga hüpervarieeruva piirkonna jaoks eraldi oligonukleotiidi kasutades. Õiged kloonid määrati DNA sekveneerimisega.

### *B. Humaniseeritud CD79b-vastase antikeha siiriku variandid*

[0863] CD79b-vastase antikeha siiriku variandid, mis hõlmasid mutatsioonide mitmekesisust MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha hüpervarieeruvates piirkondades, loodi faagiraaamatukogude abil. CD79b-vastase antikeha siiriku variandid hõlmasid kas ühe positsiooni variatsiooni HVR-is (joonis 9) või mitme positsiooni variatsioone HVR-is (joonis 10).

### *C. Faagi seleksioon*

[0864] Faagi seleksiooniks immobiliseeriti CD79b rakuväline domeen (huCD79b<sub>ccd</sub>) (2 µg/ml) PBS-is MaxiSorp mikrotiiterplaatidel (Nunc) üle öö 4°C juures. Plaaate blokeeriti vähemalt 1 tunni jooksul kaseiinblokeerijaga (Pierce). Faag koguti kultuuri supernatandist ja suspendeeriti 0,5% BSA ja 0,05% Tween 20 sisaldavas PBS-is (PBSBT). Pärast faagiraamatukogu lisamist ja faagi seleksiooni 2 tunni jooksul pesti mikrotiiterplaaate põhjalikult 0,05% Tween 20 sisaldava PBS-iga (PBST) seondumata faagi eemaldamiseks ning seondunud faag elueeriti süvendite inkubeerimise teel 100 mM HCl-ga 30 minuti jooksul. Seleksiooni rangust saab suurendada järjestikuste seleksioonivoorude käigus PBST pesukordade arvu suurendamise või lahustuva huCD79b<sub>ccd</sub>-ga inkubeerimise teel elueerimisele eelnevate ajavahemike pikendamiseks.

[0865] Elueeritud faag neutraliseeriti 1 M Tris-ga, pH 8, amplifitseeriti XL1-Blue rakke ja M13/KO7 abistajafaagi kasutades ning kasvatati üle öö 37 °C juures 2YT söötmes, mis sisaldas 50 µg/ml karbenatsilliini. Rikastamise hindamiseks võrreldi sihtmärki sisaldavast süvendist elueeritud faagi tiitrit sihtmärki mittesisaldavast süvendist saadud faagi tiitritega.

### *D. Fab tootmine ja IgG tootmine*

[0866] Fab valgu ekspresseerimiseks afiinsuse mõõtmiseks viidi faagi eksponeerivasse faktorisse raske ahela ja g3 vahele stoppkoodon. Klooniid transformeeriti *E. coli* 34B8 rakkudesse ja kasvatati Complete C.R.A.P. söötmes 30 °C juures (Presta et al., Cancer Res., 57: 4593-4599 (1997)). Rakud koguti tsentrifuugimisega, suspendeeriti (PBS, 100 µM

PMSF, 100  $\mu$ M bensamidiin, 2,4 mM EDTA) ja murti lahti mikrofluidisaatori abil. Fab puhastati afiinsuskromatograafiliselt G-valgul.

**[0867]** Sõelumise eesmärgil toodeti IgG variandid algselt 293 rakus. VL ja VH kodeerivad vektorid (25  $\mu$ g) transfekteeriti 293 rakku FuGene süsteemi abil. 500  $\mu$ l FuGene segati 4,5 ml FBS-i mittesisaldava DMEM söötmega ja inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Iga ahel (25  $\mu$ g) lisati sellele segule, inkubeeriti toatemperatuuril 20 minutit ja viidi siis üle kolbi üle öö transfekteerimiseks 37 °C juures 5% CO<sub>2</sub>-s. Järgmisel päeval transfektsioonisegu sisaldav sööde eemaldati ja asendati 23 ml PS04 söötmega, mis sisaldas 0,1 ml/l mikroelemente (A0934) ning 10 mg/l insuliini (A0940). Rakke inkubeeriti veel 5 päeva, mille järel sööde koguti 1000 p/min juures ja filtriti steriilselt 0,22  $\mu$ m madala valku siduva filtri abil. Proove võib säilitada 4 °C juures pärast 2,5 ml 0,1% PMSF-i lisamist söötme iga 125 ml kohta.

#### *E. Afiiinsuse määramine (Biacore analüüs)*

**[0868]** MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variantide afiinsuse määramiseks ekspresseeriti inimese CD79b (huCD79b<sub>ecd</sub>) rakuväline domeen CHO rakkudes üksi või Fc sulandina (huCD79b<sub>ecd</sub>-Fc) ja puhastati tavapäraste vahendite abil. Lisaks sünteesiti tavapäraste meetoditega 16 MA79b epitoopi sisaldav aminohappe peptiidi (ARSEDYRN-PKGSACK) (SEQ ID NO: 16).

**[0869]** MA79b antikeha epitoobi (tähistatud joonisel 19 kui „testipeptiid“) iseloomustus avaldati eelnevalt 3. augustil 2006 esitatud US patenditaotluses 11/462336. MA79b epitooop asus membraani läbiva domeeni suhtes distaalses rakuvälises peptiidi piirkonnas ja sisaldus inimese CD79b täispikkades ning kärbitud vormides (Cragg, Blood, 100(9): 3068-76 (2002)), mida on kirjeldatud normaalsetes ja pahaloomulistes B-rakkudes (Hashimoto, S. et al., Mol. Immunol., 32(9): 651-9 (1995); Alfarano et al., Blood, 93(7): 2327-35 (1999)). CD79b kärbitud vormil puudub kogu rakuväline Ig-sarnane domeen (rakuväline Ig-sarnane domeen, mis puudub CD79b splaissitud kärbitud vormil, on joonisel 19 esitatud kastikesega ümbritsetult).

**[0870]** MA79b Fab ja IgG variantide, MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha või MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variantide sidumist immobiliseeritud huCD79b<sub>ecd</sub>, huCD79b-Fc või MA79b epitoopi sisaldava 16 aminohappe peptiidiga mõõdeti pinnaplasmonresonantsi abil. Afiiinsuse määramised sooritati pinnaplasmonresonantsi abil, kasutades BIAcore™ -2000. Antigeen, huCD79b<sub>ecd</sub> või huCD79b-Fc immobiliseeriti (umbes

50-200 RU (vastusühikut)) 10 mM naatriumatsetaadis (pH 4,8) CM5 sensorkiibil. Suure aviidsuse tõttu olid afiinsuse mõõtmised tundlikud immobiliseeritud huCD79b<sub>ecd</sub> koguse suhtes. Sel põhjusel normaliseeriti erinevatel päevadel kasutatud proovide määratud afiinsused etalonina paralleelselt kasutatud MA79b suhtes. Eksperimentides, milles mõõdeti seondumist 16 MA79b epitoopi sisaldava aminohappe peptiidiga (ARSEDRYR-NPKGSACK) (SEQ ID NO: 16), püüti biotinüülitud peptiid (umbes 20 RU) streptaviidiinkattega sensorkiibile. Puhastatud MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant (nagu Fab või IgG) (0,5 kuni 1000 nM 2-kordne järjestikune lahjendus PBST-s) sisetati voolutugevuse 30 µl/min juures. Iga proovi analüüsiti 4-minutise assotsiatsiooni ja 10-minutilise disassotsiatsiooniga. Iga sisestamise järel regenereeriti kiip 10 mM glütsiiniga (pH 1,7).

**[0871]** Seondumisvastus korrigeeriti kontroll-läbivooluraku lahutamise teel MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variandi (nagu Fab või IgG) läbivoolurakkudest. Kineetika analüüsimiseks kasutati 1 : 1 Langmuiri mudelit  $k_{on}$  ja  $k_{off}$  samaaegse seadistusega.

#### *F. Sidumisanalüüs (FACS analüüs)*

**[0872]** MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha või antikeha variantide Fab variantide sidumise edasiseks määramiseks analüüsiti Fab ja/või IgG variantide seondumist DoHH-2 rakkudega FACS analüüsi abil. Lisaks kasutati FACS analüüsi MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variantide BJAB-lutsiferaasi rakkudega seondumise analüüsimiseks.

**[0873]** MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variantide (MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha (IgG versiooni kasutatakse kontrollivahendina)) Fab variantide FACS analüüsi läbiviimiseks inkubeeriti DoHH-2 rakke ( $1 \times 10^6$  100 µl mahus) esmalt 30 minuti jooksul koos või ilma 1 µg hiire algupärase CD79b-vastase monokloonse antikehaga (MA79b), mille järel lisati 1 µg individuaalset Fab varianti (või kontrollantikeha). PE konjugeeritud hiire inimesevastase Ig kapa kerge ahelat (kloon G20-193, BD Biosciences, San Diego, CA) kasutati sekundaarse detekteeriva antikehana, sest kõigil Fab variantidel on kapa kerge ahel ja DoHH-2 rakud ei ekspresseeri kapa kerge ahelat raku pinnal.

**[0874]** MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variantide IgG variantide täiendavaks FACS analüüsiks (chMA79b IgG versiooni kasutatakse kontrollivahendina) tiitriti 1,0 µg, 0,1 µg või 0,01 µg antikeha miljoni BJAB lutsiferaasiraku kohta. PE konjugeeritud hiire inimesevastast Ig-d kasutati sekundaarse detekteeriva antikehana.

### *G. Afiinsuse määramine (Scatchardi analüüs)*

[0875] IgG variantide seondumise edasiseks määramiseks seoses HVR-L2 ja HVR-H3 muutustega (huMA79b L2/H3) analüüsiti jooditud IgG variantide seondumist inimese CD79b ning makaagi CD79b ekspresseerivate rakkudega ja viidi läbi Scatchardi analüüs.

[0876] Scatchardi analüüsiks korraldati 0,5 nM I<sup>125</sup>-märgistatud MA79b või huMA79b L2/H3 konkurents vastavalt märgistamata MA79b või huMA79b L2/H3-ga vahemikus 50 kuni 0,02 nM (12-astmeline 1 : 2 järjestikune lahjendamine) makaagi CD79b-d ja endogeen-set inimese-CD79b-t stabiilselt ekspresseeriva transfekteeritud BJAB tüve juuresolekul. Neljatunnise inkubeerimise järel 4 °C juures rakud pesti ja rakusademed loendati gamma-loenduri abil (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA). Kõik katsepunktid mõõdeti kolmekordselt ja loendati 10 minutit. Keskmist CPM-i kasutati Kd arvutamiseks tarkvara New Ligand (Genentech, South San Francisco, CA) abil.

### Tulemused ja arutelu

#### *A. Humaniseeritud CD79b-vastase antikeha loomise tulemused*

[0877] Humaniseeritud CD79b-vastase antikeha valmistamiseks kasutatud inimese aktseptorraamistik sisaldab inimese VL domeeni kapa I konsensusjärjestust ja inimese VH domeeni alarühma III konsensusjärjestuse varianti. VH domeeni variandis on 3 muutust võrreldes inimese konsensusjärjestusega: R71A, N73T ja L78A. MA79b VL ja VH domeenid joondati inimese kapa I ning alarühma III domeenidega, iga HVR tuvastati ja siirati seejärel inimese aktseptorraamistikku HVR siiriku loomiseks, mida saaks faagil eksponeerida Fab-na (joonised 7 ning 8).

[0878] Faag eksponeerib MA79b-siirikut kui immobiliseeritud huCD79b<sub>ccd</sub>-ga seotud Fab (andmeid ei kujutata). Kui aga huMA79b-siiriku järjestus ekspresseeriti IgG-na, näitas selle afiinsuse FACS analüüs huCD79b<sub>ccd</sub> suhtes, et sidumisafiinsus vähenes enam kui 100-kordselt (andmeid ei kujutata), ja Biacore analüüs näitas enam kui 50-kordset kadu (joonis 11).

## 1. CDR parandamine

**[0879]** Tuvastati MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variandid, millel õnnestus seonduda immobiliseeritud huCD79b<sub>ecd</sub>-ga järgmiste järjestuste muutuste juures.

**[0880]** Ühe positsiooni muutusi sisaldavates raamatukogudes täheldati ainult järjestuse muutusi, mille sihtmärgiks on HVR-id VL-is, neid on kujutatud joonisel 9 (L1 mutatsioonid: Q27K (SEQ ID NO: 17; SPL-2 mutatsioon), (L2 mutatsioonid: L54R (SEQ ID NO: 18), E55K (SEQ ID NO: 19)), ning (L3 mutatsioonid: E93S (SEQ ID NO: 20; SPL-5 mutatsioon), E93K (SEQ ID NO: 21)).

**[0881]** Mitme positsiooni muutusi sisaldavates raamatukogudes täheldati ainult järjestuse muutusi, mille sihtmärgiks on HVR-id L2-s, L3-s, H1-s ja H3-s; neid on kujutatud joonisel 10 (L2 mutatsioonid: S52R, N53K, E55G ja S56R (SEQ ID NO: 22; L2-2 mutatsioon); N53R (SEQ ID NO: 23); S52R, N53K, E55G ja S56N (SEQ ID NO: 24); S52R N53K, E55K ja S56R (SEQ ID NO: 25); S52R, N53Y, E55K ja S56R (SEQ ID NO: 26; L2-29 mutatsioon); S52R, N53K ja E55K (SEQ ID NO: 27); S52R, N53K ja E55A (SEQ ID NO: 28); S52G, N53I, E55A ja S56R (SEQ ID NO: 29); S52R, N53K, E55R (SEQ ID NO: 30); S52R, N53K ja E55G (SEQ ID NO: 31; L2-38 mutatsioon); S52R, N53H, E55K ja S56R (SEQ ID NO: 32); A51S, S52R, N53Y, E55S ja S56R (SEQ ID NO: 33); A51G, N53K, E55L ja S56R (SEQ ID NO: 34); L54R ja E55K (SEQ ID NO: 35); N53K ja E55G (SEQ ID NO: 36); S52R, N53Y, E55R ja S56R (SEQ ID NO: 37); S52R, N53R, E55R ja S56T (SEQ ID NO: 38); S52R, N53R, E55G ja S56R (SEQ ID NO: 39); S52R, N53Q, L54R, E55K ja S56R (SEQ ID NO: 40); S52R, N53K, E55L ja S56R (SEQ ID NO: 41); S52R, N53K, E55K ja S56N (SEQ ID NO: 42); S52R, N53K, E55G ja S56T (SEQ ID NO: 43); S52R, N53K, E55G ja S56G (SEQ ID NO: 44); ja S52R, N53K, E55A ja S56R (SEQ ID NO: 45)), (L3 mutatsioonid: E93A (SEQ ID NO: 46); E93Q (SEQ ID NO: 47); mutatsioon puudub (SEQ ID NO: 48); E93D (SEQ ID NO: 49); E93L (SEQ ID NO: 50); Q89N, Q90N, E93G ja T97N (SEQ ID NO: 51); Q90P, S91 D, D94A ja L96R (SEQ ID NO: 52); Q89D, S91 R ja E93A (SEQ ID NO: 53)), (H1 mutatsioonid: T28P, S30T, S31R ja E35S (SEQ ID NO: 54); T28P, S30R ja E35Q (SEQ ID NO: 55); T28P, S30T ja E35N (SEQ ID NO: 56); T28P, S30T, S31R ja E36N (SEQ ID NO: 57; H1-6 mutatsioon)); S30N, S31R ja E35N (SEQ ID NO: 58); T28S ja S30K (SEQ ID NO: 59); G26P, T28S, F29L, S30C, S31T, W33F ja E35D (SEQ ID NO: 60); T28Y ja S30T (SEQ ID NO: 61); T28P, S30G, S31R, I34V ja E35N (SEQ ID NO: 62);



S30K ja S31 K (SEQ ID NO: 63); T28P, S30T ja E35Q (SEQ ID NO: 64); T28P, S30R ja S31R (SEQ ID NO: 65); T28P, F29V, S30G, S31R ja E35S (SEQ ID NO: 66); T28P, S30N, S31R ja E35N (SEQ ID NO: 67; H1-1 mutatsioon); T28G, S30T ja E35S (SEQ ID NO: 68); S30T, I34L ja E35S (SEQ ID NO: 69); S30T (SEQ ID NO: 70); S31G ja E35N (SEQ ID NO: 71); S30R, S31 R ja E35N (SEQ ID NO: 72); T28S, S30R ja E35N (SEQ ID NO: 73); T28S, S30R, S31 R ja E35N (SEQ ID NO: 74); T28S, S30R ja S31R (SEQ ID NO: 75); T28S, S30P, I34L ja E35Q (SEQ ID NO: 76); T28P, S30T ja S31 R (SEQ ID NO: 77); T28P ja S31G (SEQ ID NO: 78); T28P, S30R ja E35S (SEQ ID NO: 79); T28P, S30R ja E35N (SEQ ID NO: 80); T28P, S30R ja S31G (SEQ ID NO: 81); T28P, S30N ja S31R (SEQ ID NO: 82); T28P, S30N, S31G ja E35N (SEQ ID NO: 83); T28N, F29V, I34L ja E35S (SEQ ID NO: 84); Y27F, T28P, S30T ja E35S (SEQ ID NO: 85); ja Y27F, T28P, S30N, S31R ja E35N (SEQ ID NO: 86)) ja (H3 mutatsioonid: V98I ja F100L (SEQ ID NO: 87; H3-12 mutatsioon); mutatsioon puudub (SEQ ID NO: 88); Y99K ja F100L (SEQ ID NO: 89); F100L (SEQ ID NO: 90); V98I (SEQ ID NO: 91); V98F, Y99C ja F IOOL (SEQ ID NO: 92); F100L (SEQ ID NO: 93); V98I, Y99R ja F100L (SEQ ID NO: 94; H3-10 mutatsioon); V98I, Y99K ja F100L (SEQ ID NO: 95); V98I ja Y99R (SEQ ID NO: 96); V98I (SEQ ID NO: 97); D101S (SEQ ID NO: 98); Y99V ja F100L (SEQ ID NO: 99); Y99R ja F100L (SEQ ID NO: 100); Y99R (SEQ ID NO: 101); Y99F ja F100L (SEQ ID NO: 102); V98I ja F100L (SEQ ID NO: 103); V98I (SEQ ID NO: 104); V96R, Y99C ja F100L (SEQ ID NO: 105); ning V96I (SEQ ID NO: 106)).

**[0882]** Valitud kloonid vormindati Fab-na FACS analüüsiks ning IgG-na edasiseks Biacore ja Scatchardi analüüsiks.

a. Afiinsuse määramine (Biacore analüüs)

**[0883]** Nagu selgub jooniselt 11, millel on kujutatud Biacore analüüs, tuvastas niisugune CDR parandamisel põhinev lähenemine mitu individuaalset järjestuse muutust, mis parendavad MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha afiinsust. Pinnaplasmonresonantsanalüüsid näitasid, et ehkki ühelgi üksikute HVR muutustega testitud variantidest polnud MA79b-le sarnast afiinsust, viis HVR-L2-s ja HVR-H3-s tuvastatud muutuste kombinatsioon (MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant L2/H3, siin kasutatakse ka nimetust huMA79b L2/H3) MA79b-le sarnase afiinsusega variandini (joonis 11) seandumisel immobiliseeritud

huCD79b<sub>ccd</sub> või huCD79b<sub>ccd</sub>-Fc või 16 aminohappe peptiidiga, mis sisaldab MA79b epitoopi, nagu on määratud Biacore analüüsi abil.

**[0884]** MA79b ja antigeeni (huCD79b<sub>ccd</sub>-Fc) vahelise monomeerse sidumise (Fab) analüüs võrdluses dimeerse sidumisega (IgG) (joonis 11, rida 1, Fab tulba võrdlus IgG tulbaga) viis järeldusele, et MA79b-l olev 100-kordse aviidsusega komponent võib puududa parendatud afiinsusega variantide korral. Konkreetsemalt ei saavutata MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variandi L2-2 korral (mille kohta siin kasutatakse ka nimetust huMA79b L2-2), mis näitab 5-kordset monomeerse sidumise paranemist võrdluses MA79b-ga (joonis 11, read 1 ja 3, Fab tulpade võrdlus) afiinsuse ilmset juurdekasvu huMA79b L2-2 vormindamisel IgG-na (joonis 11, rida 4, Fab ja IgG tulpade võrdlus). Lisaks näitab algne MA79b HVR siiratud „humaniseeritud“ antikeha (huMA79b siirik) selle aviidsuskomponendi kadu sidumisel (joonis 11, rida 2, Fab ja IgG tulpade võrdlus). Võime võimendada sidumist aviidsuse kaudu võib olla soovitatav raku pinna antigeenide sidumisel.

#### b. Afiinsuse määramine (Scatchardi analüüs)

**[0885]** Scatchardi analüüsi kohaselt tuvastas taoline CDR paranduslähenedamine mitu individuaalset järjestuse muutust, mis parendasid MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha afiinsust. Konkreetsemalt näitasid rakkude sidumisanalüüsid, et MA79b ja MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variandi L2/H3 (huMA79b L2/H3) (vormindatud kui IgG) afiinsus makaagi CD79b ning inimese endogeenset CD79b stabiilselt ekspresseerivate BJAB rakkude sidumisel avaldus vastavalt K<sub>d</sub> väärtustel 0,63 nM (MA79b; K<sub>d</sub> = 0,63 ± 0,14 nM) ja 0,52 nM (huMA79b L2/H3; K<sub>d</sub> = 0,52 ± 0,1 nM) (andmeid ei kujutata), nagu on määratud Scatchardi analüüsi abil.

#### c. Sidumise määramine (FACS analüüs)

**[0886]** FACS analüüsi kohaselt tuvastas taoline CDR paranduslähenedamine mitu individuaalset järjestuse muutust, mis parendasid MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha (huMA79b siiriku) sidumist DoHH-2 rakkudega (andmeid ei kujutata). Konkreetsemalt näitas SP ja 6 SR raamatukogudest tuvastatud Fab variantide (L2-2, H3-10 ning H1-1 mutatsioonid) FACS analüüs DoHH-2 rakkude suhtes Fab variantide ja huMA79b siiriku

(vormindatud kui IgG) seondumist DoHH-2 rakkudega (andmeid ei kujutata). Lisaks näitas Fab variantide FACS analüüs, et Fab variantide seondumise DoHH-2 rakkudega blokeeris eelinkubeerimine hiire CD79b-vastase monokloonse antikehaga (MA79b) (andmeid ei kujutata).

## 2. Raamistiku parandus

**[0887]** huMA79b L2/H3 variandi HVR-L2 sisseviidud HVR järjestuse muutused erinesid radikaalselt ükskõik millises inimese iduliinis täheldatutest. DM1-ga konjugeerituna osutus huMA79b L2/H3 variant tõhusaks kasvaja kasvu pärssimisel *in vivo* hiire ksenograftimudelil (tabel 9). Kuivõrd huMA79b L2/H3 variandi ja antigeeni monomeerse seondumise (Fab) ning dimeerse seondumise (IgG) võrdlev analüüs näitas aviidsuse kadu (joonis 11), sooritati allkirjeldatud viisil raamistiku parandus.

**[0888]** Uurimaks raamistiku positsioonide rolli dimeerses antigeeni sidumises konstrueeriti variant „kõik raamistiku positsioonid“, kus potentsiaalselt tähtsad hiire raamistiku positsioonid kaasati MA79b HVR-siiratud „humaniseeritud“ antikehasse (huMA79b siirik). See variant (tähistatud joonisel 12 kui „kõik raamistikud“), millel puudusid igasugused HVR muutused, omas vastavalt Biacore analüüsile ja Scatchardi analüüsile sarnast dimeerset sidumisafiinsust kimäärse MA79b antikeha (chMA79b) (joonis 12) suhtes.

**[0889]** IgG variandid, sealhulgas hiire raamistikujäägid positsioonides 4 ja/või 47 (VL) ning/või positsioonides 47, 48, 67, 69, 71, 73, 74, 78 ja/või 80 (VH), valmistati minimaalse kõrge afiinsusega dimeerse sidumise alalhoidmiseks nõutava raamistikupositsioonide kogumi määramiseks (joonis 12). Hiire raamistikujääke on kujutatud joonistel 7A-B (SEQ ID NO: 10) ja joonistel 8A-B (SEQ ID NO: 14). Raamistiku positsioonid 47 VL-is ja 75 ning 80 VH-s osutusid mittekohustuslikuks, millest annab tunnistust MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 17 (huMA79b.v17) (joonis 12, rida tähistusega 17).

**[0890]** MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 18 (MA79b.v18; joonis 12, rida tähistusega 18), mis hõlmab hiire raamistikujääke positsioonides 4 VL-is ja 48, 67, 69, 71, 73 ning 78 VH-s ja hõlmab täiendavalt muutusi HVR-H3-s (tähistatud joonisel 12 kui „H3-10“ ning kirjeldatud eespool kui H3-10 mutatsioon), sealhulgas V98I, Y99R ja F100L, näitas täiendavat 2-kordset paremist (joonis 12, rida tähistusega 28) dimeersel sidumisel võrdluses variandiga 17 (joonis 12, rida tähistusega 17).

**[0891]** Potentsiaalsete tootmisprobleemide vältimiseks elimineeriti potentsiaalne isoasparaagiinhappe moodustamiskoht (Asp-Gly) MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variantide HVR-L1-s D28 teisendamise teel Glu-ks (glutamiinhappeks) (D28E; vt. variant 28, siin kasutatakse ka nimetust „huMA79b.v28“, joonis 12, rida tähistusega 28). Tolereeriti muidki asendusi MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha stabiliseerimiseks VL-is, sealhulgas D28 -> Ser (seriin) (D28E, vt. variant 32, siin kasutatakse ka nimetust „huMA79b.v32“, joonis 12, rida tähistusega 32).

**[0892]** MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha varianti 28 (huMA79b.v28, joonis 12, rida tähistusega 28), mis hõlmab: (1) hiire antikeha jääke positsioonides 4 VL-is ja 48, 67, 69, 71, 73 ning 78 VH-is, (2) hõlmates täiendavalt muutusi HVR-H3-s (tähistatud joonisel 12 kui „H3-10“ ja kirjeldatud eespool H3-10 mutatsioonina), sealhulgas V981, Y99R ja F100L, ning (3) hõlmates täiendavalt muutusi HVR-L1-s (D28E, kirjeldatud eespool), iseloomustati Biacore analüüsi kaudu.

**[0893]** MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 32 (MA79b.v32, joonis 12, rida tähistusega 32), mis hõlmab: (1) hiire antikeha jääke positsioonides 4 VL-is ja 48, 67, 69, 71, 73 ning 78 VH-is, (2) hõlmates täiendavalt muutusi HVR-H3-s (tähistatud joonisel 12 kui „H3-10“ ja kirjeldatud eespool H3-10 mutatsioonina), sealhulgas V981, Y99R ja F100L, ning (3) hõlmates täiendavalt muutusi HVR-L1-s (D28S, kirjeldatud eespool), iseloomustati Biacore analüüsi kaudu.

a. Afiinsuse määramine (Biacore analüüs)

**[0894]** Nagu selgub joonisel 12, millel on kujutatud Biacore analüüsi, tuvastas niisugune raamistiku parandamisel põhinev lähenemine mitu individuaalset järjestuse muutust, mis parendavad MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha afiinsust huCD79b<sub>ccd</sub> suhtes. Pinna-plasmonresonantsanalüüsid näitasid, et MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variandi 28 (huMA79b.v28, hiire raamistiku positsioonides 4 VL-is, 48, 67, 69, 71, 73 ja 78 VH-s, nagu ka H3-10 mutatsioon HVR-H3-s (V981, Y99R ning F100L (samuti kirjeldatud eespool) ja D28E mutatsioon HVR-L1-s (stabiilsuse osas vt. kirjeldust eespool), joonis 12, rida tähistusega 28) ning MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variandi (huMA79b.v32, hiire raamistiku positsioonides 4 VL-is, 47, 48, 67, 69, 71, 73 ja 78 VH-s, nagu ka H3-10 mutatsioon HVR-H3-s (V981, Y99R ning F100L (samuti kirjeldatud eespool) ja D28S mu-

tatsioon HVR-L1-s (stabiilsuse osas vt. kirjeldust allpool), joonis 12, rida tähistusega 32) afiinsus oli ekvivalentne kimäärse MA79b antikehaga (chMA79b) seondumisel immobiliseeritud huCD79b<sub>ccd</sub>-ga, nagu on määratud Biacore analüüsi teel.

#### b. Afiiinsuse määramine (Scatchardi analüüs)

**[0895]** Sarnaselt Biacore analüüsiga tuvastas Scatchardi analüüs, et taoline raamistiku paranduslähenedamine tuvastas mitu individuaalset järjestuse muutust, mis parendasid MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha (huMA79b siiriku) afiinsust. Rakkude sidumisanalüüsid näitasid, et MA79b, MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variandi 28 (huMA79b.v28, vt. joonist 12, rida tähistusega 28) (vormindatud kui IgG) ja MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variandi 32 (huMA79b.v32, vt. joonis 12, rida tähistusega 32) afiinsus makaagi CD79b ning inimese endogeenset CD79b stabiilselt ekspresseerivate BJAB rakkude sidumisel avaldus vastavalt K<sub>d</sub> väärtustel 0,63 nM (MA79b; K<sub>d</sub> = 0,63 ± 0,14 nM), 0,44 nM (huMA79b.v28; K<sub>d</sub> = 0,44 ± 0,04 nM) ja 0,24 nM (huMA79b.v32; K<sub>d</sub> = 0,24 ± 0,02 nM) (andmeid ei kujutata), nagu on määratud Scatchardi analüüsi abil.

#### c. Sidumise määramine (FACS analüüs)

**[0896]** FACS analüüsi kohaselt tuvastas taoline raamistiku paranduslähenedamine mitu individuaalset järjestuse muutust, mis parendasid MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha (huMA79b siiriku) seondumist BJAB-lutsiferaasi rakkudega (andmeid ei kujutata). Konkreetsemalt näitas MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variantide (variandid huMA79b.v28 ja huMA79b.v32) IgG variantide FACS analüüs BJAB-lutsiferaasi rakkude suhtes seondumist BJAB-lutsiferaasi rakkudega (andmeid ei kujutata).

#### *B. Humaniseeritud CD79b-vastase antikeha valmistamise arutlus*

**[0897]** Lähtudes 6 hiire MA79b HVR-i (määratletud positsioonidel 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) ja 93-102 (H3)) siirdest inimese konsensusjärjestusse kapa I VL ja alarühma III VH (sisaldab A71, T73 ning A78), kasutati CDR parandamist muutuste tuvastamiseks HVR-ides 1-6, mis parendavad sidumisasiinsust. Joonistel 10 ja 11

tuvastatud HVR järjestuse muutused või nende muutuste kombinatsioonid viisid MA76b humaniseeritud variantideni MA79b-ga sarnaste afiinsustega.

**[0898]** Alternatiivselt kasutati raamistiku parandamist dimeerse sidumise aviidsuse taaspüüdmiseks raamistikupositsioonide 4 lisamise teel VL-is ja 48, 67 ning 69 lisamise teel VH-s huMA79b siirikule (mis hõlmab hiire raamistikujäake VH positsioonidel 71, 73 ja 78) (joonis 12, MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 17 (huMA79b.v17)). Nende raamistikumutatsiooni variantide afiinsust huCD79b<sub>ccd</sub> antigeeni suhtes võimendati täiendavalt 3 muutuse lisamise teel HVR-H3-s: V991, Y99R ja F100L (joonis 12, MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 18 (huMA79b.v18)). Potentsiaalne isoasparagiinhappe moodustamiskoht HVR-L1-s elimineeriti D28E mutatsiooniga (joonis 12, MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 28 (huMA79b.v28)).

#### NÄIDE 2: CD79b-vastase antikeha-ravimi konjugaatide (ADC-de) valmistamine

**[0899]** MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikehavariantide IgG variantide tõhususe katsetamiseks konjugeeriti MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variandid ravimitega nagu DM1. DM1-ga konjugeeritud variandid hõlmasid variante muutustega HVR-L2-s ja HVR-H3-s (huMA79b L2/H3), huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 ning huMA79b.v32.

**[0900]** Ravimid, mida kasutati antikeha-ravimi konjugaatide (ADC-de) valmistamisel CD79b-vastase antikehade jaoks hõlmavad maintansinoidi DM1 ja dolastatiin 10 derivaate monometüülauristatiin E (MMAE) ning monometüülauristatiin 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., Acids Res., 66: 4426-4433 (2006), millest igaüks on kaasatud siia viitena täismahus). ADC-de valmistamisel kasutatavateks linkeriteks on BMPEO, SPP või SMCC (siin kasutatakse ka nimetust „MCC“) DM1 jaoks ning MC või MC-vc-PAB MMAE ja MMAF. DM1 korral seoti antikehad DM1 tiorühmaga ja lüsiini ε-aminorühma kaudu linkerreagendi SMCC abil. Alternatiivselt seoti antikehad DM1 korral DM1-ga lüsiini ε-aminorühma kaudu linkeri SPP abil. SPP (N-suktsiinimidüül-4-(2'-püridüülditio)pentanoaat) reageerib lüsiinide epsilon-aminorühmaga, jättes reaktsioonivõimelise 2-püridüüldisulfiidlinkeri valgule. SPP linkerite korral asendatakse reaktsioonil vaba sulfhüdraaliga (nt. DM1) püridüülrühm, jättes DM1 kinnitatuks redutseeritava disulfiidsidemega. SPP linkeri kaudu kinnitatud DM1 vabastatakse redutseerivates

tingimustes (ehk näiteks rakkude sees), samas kui SMCC linkeri kaudu kinnitatud DM1 on redutseerivates tingimustes lõhustumise suhtes resistentne. Lisaks kutsuvad SMCC-DM1 ADC-d esile raku toksilisuse juhul, kui ADC internaliseeritakse ja suunatakse lüsiin-N<sup>e</sup>-DM1 vabanemist põhjustavale lüsoosoomile – tegu on tõhusa antimitootilise ainega raku sees, ning rakust vabanemisel on lüsiin-N<sup>e</sup>-DM1 mittetoksiline (Erickson et al., *Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006)). MMAE ja MMAF korral seoti antikehad MMAE või MMAF-iga tsüsteiini kaudu maleimidokaproüül-valiin-tsitruuliin (vc)-p-aminobensüülloksükarbonüüli (MC-vc-PAB) poolt. MMAF korral seoti antikehad alternatiivselt MMAF-ga tsüsteiini kaudu maleimidokaproüül-(MC)-linkeri poolt. MC-vc-PAB linker on lõhustatav rakuvaheliste proteaasidega nagu katepsiin B, vabastades lõhustamisel vaba ravimi (Doronina et al., *Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003)) samas kui MC linker on resistentne lõhustamise vastu rakusiseste proteaasidega.

**[0901]** Antikeha-ravimi konjugaadid (ADC-d) CD79b-vastastele antikehadele valmistati SMCC ja DM1 kasutades sarnaselt publikatsioonis US 2005/0276812 kirjeldatud menetlusele. CD79b-vastaste puhastatud antikehade puhver vahetati 50 mM kaaliumfosfaati ja 2 mM EDTA-d, pH 7,0, sisaldava lahusega. SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) lahustati dimetüülatsietamiidis (DMA) ja lisati antikehalahusele lõpliku SMCC/Ab molaarsuhte 10 : 1 saavutamiseks. Reaktsioonil lasti segamisega kulgeda kolm tundi toatemperatuuril. SMCC-modifitseeritud antikeha puhastati järgnevalt GE Healthcare HiTrap soolatusamiskolonnis (G-25) tasakaalustatuna 35 mM naatriumtsitraadi, 150 mM NaCl ja 2 mM EDTA-ga, pH 6,0. DMA-s lahustatud DM1 lisati SMCC antikehapreparaadile DM1/antikeha molaarsuhte 10 : 1 saavutamiseks. Reaktsioonil lasti segamisega kulgeda 4-20 tundi toatemperatuuril. DM1-modifitseeritud antikehalahus diafiltriti 20 mahu PBS-iga reageerimata DM1 eemaldamiseks, filtriti steriilselt ja hoiti 4 °C juures. Üldjuhul võimaldas taoline protsess 40-60% antikeha saagist. Preparaat oli tavaliselt >95% monomeerne, analüüsitud geelfiltratsiooni ja laserivalguse hajumise abil. Kuivõrd DM1 absorptsiooni-maksimum saabub 252 nm juures, saab antikehaga seondunud ravimi koguse määrata diferentsiaalse absorptsiooni mõõtmiste teel lainepikkusel 252 ja 280 nm. Tüüpiliselt oli ravimi/antikeha suhe 3-4.

**[0902]** Antikeha-ravimi konjugaate (ADC-sid) CD79b-vastastele antikehadele, mida siin on kirjeldatud SPP-DM1 linkerite abil, saab valmistada sarnaselt publikatsioonis US 2005/0276812 kirjeldatud menetlusega. CD79b-vastaste puhastatud antikehade puhver vahe-

tatakse 50 mM kaaliumfosfaati ja 2 mM EDTA-d, pH 7,0, sisaldava lahusega. SPP (immunogeen) lahustati DMA-s ja lisati antikehalahusele lõpliku SPP/Ab molaarsuhte umbes 10 : 1 saamiseks, kusjuures täpne suhe sõltub antikeha soovitud ravimiküllastusest. 10 : 1 suhe annab tavaliselt tulemuseks ravimi-antikeha suhte umbes 3-4. SPP-l lastakse 3-4 tundi toatemperatuuril segamisega reageerida. SPP-modifitseeritud antikeha puhastatakse järgnevalt GE Healthcare HiTrap soolatusamiskolonnis (G-25), tasakaalustatult 35 mM naatriumtsitraadi, 150 mM NaCl ja 2 mM EDTA-ga, pH 6,0, või fosfaatpuhverdatud füsioloogilise lahusega, pH 7,4. DM1 lahustatakse DMA-s ja lisatakse SPP antikehapreparaadile DM1/antikeha molaarsuhte 10 : 1 saavutamiseks, mis annab tulemuseks 3-4-kordse molaarse liia antikehal saadavate SPP linkeritega võrreldes. DM1 reaktsioonil lastakse kulgeda 4-20 tundi toatemperatuuril segamisega. DM1-modifitseeritud antikehalahust diafiltritakse 20 mahu PBS-iga reageerimata DM1 eemaldamiseks, filtritakse steriilselt ja hoitakse 4 °C juures. Üldjuhul saavutatakse taolise protsessi abil 40-60% või suuremad antikehasaagised. Antikeha-ravimi konjugaat on tavaliselt >95% monomeerne, analüüsituna geelfiltratsiooni ja laserivalguse hajumise abil. Seondunud ravimi kogus määratakse diferentsiaalse absorptsiooni mõõtmiste teel lainepikkusel 252 ja 280 nm, nagu on kirjeldatud seoses SMCC-DM1 konjugaatide valmistamisega (vt. eespool).

**[0903]** Antikeha-ravimi konjugaate (ADC-sid) CD79b-vastastele antikehadele, mida siin on kirjeldatud MC-MMAF, MC-MMAE, MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE või MC-val-cit (vc)-PAB-MMAF ravimi linkerite abil, saab samuti valmistada sarnaselt publikatsioonis US 2005/0238649 kirjeldatud menetlusega. Puhastatud CD79b-vastase antikeha lahustatakse 500 mM naatriumboraadis pH 8,0 juures ning töödeldakse täiendavalt 100 mM ditiotreitooli (DTT) liiaga. Umbes 30-minutise inkubeerimise järel 37 °C juures puhver vahetatakse elueerimise teel Sephadex G25 vaigul ja elueeritakse PBS-iga 1 mM DTPA-ga. Tiool/Ab väärtuse kontrollimiseks määratakse redutseeritud antikeha kontsentratsioon lahuse absorptsiooni põhjal 280 nm juures ja tiooli kontsentratsioon reaktsiooni põhjal DTNB-ga (Aldrich, Milwaukee, WI) ning absorptsiooni määratakse lainepikkusel 412 nm. PBS-is lahustatud redutseeritud antikeha jahutati jääga. Ravimi linker, näiteks MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE DMSO-s, lahustatakse atsetonitriilis ja vees ning lisatakse jahutatud redutseeritud antikehale PBS-is. Ühetunnise inkubeerimise järel lisatakse maleimiidi liig reaktsiooni peatamiseks ja võimalike reageerimata antikeha tiolirühmade katmiseks. Reaktsioonisegu kontsentreeritakse tsentrifuugimise-ultrafiltrimise teel ja antikeha-ravimi konjugaat puhastatakse ning



soolatustatakse elueerimise teel G25 vaigu kaudu PBS-is, filtritakse läbi 0,2 µm filtrite steriilsetes tingimustes ja külmutatakse säilitamiseks.

**[0904]** Antikeha-ravimi konjugaate (kasutades siin kirjeldatud CD79b-vastaseid antikehi) lahjendati 2 x 10 µg/ml juures analüüsisöötmes. Konjugaadid seoti ristlinkeritega SMCC (võimalik on alternatiivse disulfiidlinkeri kasutamine SPP korral maintainsinoidi DM1 toksiooni suhtes) (vt. US 2005/0276812 ja US 2005/0238649). Lisaks võivad konjugaadid olla seotud MC-valiin-tsitruilliini (vc)-PAB või MC abil dolastatiin 10 derivaatide, monometüülauristatiin E-toksiini (MMAE) või monometüülauristatiin F-toksiiniga (MMAF) (vt. US patenditaotlust 11/141344, esitatud 31. mail 2005, ning US patenditaotlust 10/983340, esitatud 5. novembril 2004). Negatiivsed kontrollivahendid hõlmasid HERCEPTIN® (trastusumabil) (anti-HER2) põhinevaid konjugaate (SMCC-DM1 või SPP-DM1 või MC-vc-MMAE või MC-vc-MMAF). Positiivsed kontrollivahendid võivad hõlmata konjugaadi küllastusannusele vastavat vaba L-DM1. Proove keeristati homogeense segu tagamiseks enne lahjendamist.

**[0905]** CD79b-vastased antikehad ravimiga konjugeerimiseks hõlmasid kimäärseid MA79b antikehi (chMA79b) ja huMA79b L2/H3 antikeha varianti ning siin kirjeldatud huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 ja huMA79b.v32 (vt. näidet 1). Täieindavalt võivad konjugeeritavateks antikehadeks olla ükskõik millised siin kirjeldatud antikehad (vt. näidet 1).

### NÄIDE 3: *In vivo* kasvajakaraku surmamisanalüüs

#### *A. Ksenograftid*

**[0906]** MA79b-siirdatud “humaniseeritud” antikeha variantide IgG variantide muutustega HVR-L2-s ja HVR-H3-s (huMA79b L2/H3) tõhususe testimiseks konjugeeriti huMA79b L2/H3 variant DM1-ga ja konjugeeritud variandi mõju hiirte kasvajatele analüüsiti.

**[0907]** Konkreetsemalt võib uurida nende antikehade võimet kutsuda esile kasvajate regressiooni mitmesugustes ksenograftimudelites, sh. RAMOS rakkudes, BJAB rakkudes (Burkitti lümfoomi rakuliinis, mis sisaldab 1(2;8)(p112;q24) (IGK-MYC) translokatsiooni, muteerunud p53 geeni ja on Epstein-Barri viiruse (EBV) suhtes negatiivne) (Drexler, H. G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), Granta

519 rakkudes (mantelrakulise lümfoomi rakuliin, mis sisaldab t(11;14)(q13;q32) (BCL1-IGH) translokatsiooni, mis toob kaasa tsükliin D1 (BCL1) üleekspressiooni, sisaldab P16INK4B ja P16INK4A deletsioone ning on EBV positiivne) (Drexler, H. G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)), U698M rakkudes (lümfoblastse lümfosarkoomi B-rakuliin) (Drexler, H. G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001) ning DoHH2 rakkudes (follikulaarse lümfoomi rakuliin, mis sisaldab follikulaarsele lümfoomile iseloomulikku translokatsiooni t(14;18)(q32;q21), mis toob kaasa Bcl-2 üleekspressiooni Ig raske ahela ajendusel, sisaldab P16INK4A deletsiooni, sisaldab t(8;14)(q24;q32) (IGH-MYC) translokatsiooni ja on EBV negatiivne) (Drexler, H. G., The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, San Diego: Academic Press, 2001)).

**[0908]** MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variantide tõhususe analüüsimiseks inokuleeriti emased CB17 ICR SGID hiired (6-8 nädala vanused, päritolu: Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) subkutaanselt  $2 \times 10^7$  BJAB-lutsiferaasi rakkude või Granta-519 rakkudega injektsiooni teel CB17 ICR SCID hiirte külgedesse, ning ksenograaftkasvajatel lasti kasvada keskmiselt mahuni  $200 \text{ mm}^2$ . Päev 0 viitab päevale, mil kasvajad olid keskmiselt  $200 \text{ mm}^2$  suurusel ja kui manustati esimene/ainus raviannus, kui allpool pole näidatud teisiti. Kasvaja maht arvutati kahe mõõtme põhjal, mille mõõtmiseks kasutati nihkkaliibrit, ning väljendati  $\text{mm}^3$ -s kooskõlas valemiga:  $V = 0,5a \times b^2$ , kus a ja b on vastavalt kasvaja pikim ning lühim läbimõõt. Igalt katserühmalt kogutud andmed väljendati kui keskmine  $\pm$  SE. 10 hiirest koosnevaid rühmi raviti ühekordse veenisisesega annusega, mis jäi vahemikku 50  $\mu\text{g}$  kuni 210  $\mu\text{g}$  antikehaga seotud ravimit hiire  $\text{m}^2$  kohta (vastab  $\sim 1\text{-}4 \text{ mg/kg}$  hiir) koos MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variantide või kontroll-antikeha / ravimi konjugaatidega. Kasvajaid mõõdeti kogu katse jooksul kas üks või kaks korda nädalas. Hiirte kehamassid mõõdeti kogu katse jooksul kas üks või kaks korda nädalas. Hiired surmati enne seda, kui kasvajate mahud saavutasid  $3000 \text{ mm}^3$  või kui kasvajatel ilmnemise peatse haavandumise tunnused. Kõik loomadega seotud protseduurid kiitis heaks laboriloomade pidamise ja kasutamise komitee (IACUC).

**[0909]** Antikeha ja toksiooni vahel kasutatud linkeriks oli tioeeter-ristlinker SMCC DM1 jaoks. Täiendavateks linkeriteks võivad olla disulfidlinker SPP või tioeeter-ristlinker SMCC DM1 jaoks või MC või MC-valiin-tsitruilliin(vc)-PAB või (valiin-tsitruilliin (vc)) dipeptiid-linkerreagent), millel on maleimiidkomponent ning para-aminobensüülkarbamöüüli (PAB)

autoimmolatiivne komponent monometüülauristatiin E (MMAE) või monometüülauristaan F (MMAF) jaoks. Kasutatud toksiiniks oli DM1. Täiendavad toksiinideks võivad olla MMAE või MMAF.

**[0910]** CD79b antikehad antud eksperimendiks hõlmasid kimäärseid MA79b (chMA79b) antikehi, mida on kirjeldatud 3. augustil 2006 esitatud US patenditaotluses 11/462336, ning siin kirjeldatud MA79b-siirdatud „humaniseeritud“ antikeha variante (vt. näidet 1A). Täiendavad antikehad võivad hõlmata kaubanduslikult saadavaid antikehi, sealhulgas CD79b-vastast antikeha, ning MA79b monokloonseid antikehi, mis on valmistatud hübriidoomidest, mis hoiustati ATCC-s kui HB11413 20. juulil 1993.

**[0911]** Negatiivsed kontrollivahendid hõlmasid HER2-l-vastasel antikehal (HERCEPTIN® (trastusumab)) põhinevaid konjugaate (SMCC-DM1).

## *B. Tulemused*

### *1. BJAB-lutsiferaasi ksenograftid*

**[0912]** 35-päevase ajavahemiku jooksul avaldasid tabelis 9 kujutatud ravimikonjugaatide ja annuste korral MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant L2/H3 (huMA79b L2/H3 variant) (ümbervormindatud kui IgG) ja kimäärne CD79b-vastane antikeha (chMA79b) konjugeerituna DM1-ga (vastavalt huMA79b L2/H3-SMCC-DM1 ning chMA79b-SMCC-DM1) kasvaja kasvu pärssimist SCID hiirtel BJAB-lutsiferaasi-kasvajatega võrdluses negatiivse kontrollivahendiga, HERCEPTIN® (trastusumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). ADC-d manustati üksikannusena (nagu on osutatud tabelis 9) päeval 0 kõigi ADC-de ja kontrollivahendite korral. Konkreetsemalt pärssisid huMA79b L2/H3-SMCC-DM1 antikehad (vormindatud kui IgG) ja chMA79b-SMCC-DM1 oluliselt kasvaja kasvu (joonis 20). Tabelis 9 on võrdluses testitud hiirte koguarvuga toodud hiirte arv, kellel avaldus PR = osaline ravivastus (kasvaja maht vähenes suvalisel manustamisjärgsel ajal enam kui 50% võrdluses päeval 0 mõõdetud kasvaja mahuga) või CR = täielik ravivastus (kasvaja maht vähenes suvalisel manustamisjärgsel ajal kuni 0 mm<sup>3</sup>).

Tabel 9

Manustatud antikeha (ravi)	PR	CR	Ravimi annus – DM1 ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravim/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 ksenograftid

[0913] 14-päevase ajavahemiku jooksul, tabelis 10 kujutatud ravimikonjugaatide ja annuste korral, näitasid MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikeha variant 17, variant 18, variant 28 ning variant 32 (vastavalt huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 ja huMA79b.v32) (vormindatud kui IgG) ning kimäärne CD79b-vastane antikeha (chMA79b) konjugeerituna DM1-ga (vastavalt huMA79b.v17-SMCC-DM1, huMA79b.v18-SMCC-DM1, huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1 ja chMA79b-SMCC-DM1) kasvaja kasvu pärssimist SCID hiirtel Granta-519 kasvajatega võrdluses negatiivse kontrollivahendiga, HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1). ADC-d manustati üksikannusena (nagu on osutatud tabelis 10) päeval 0 kõigi ADC-de ja kontrollivahendite korral. Konkreetsemalt pärssisid huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1, huMA79b.v17-SMCC-DM1 ja huMA79b.v18-SMCC-DM1 antikehad (vormindatud kui IgG) ning chMA79b-SMCC-DM1 oluliselt kasvaja kasvu (joonis 21A).

Lisaks ei toonud huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1, huMA79b.v17-SMCC-DM1, huMA79b.v18-SMCC-DM1 ja chMA79b-SMCC-DM1 ning kontrollivahendi HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM (anti-HER2-SMCC-DM1) kasutamine kaasa hiirte kehamassi protsendi langust (joonis 21B). Tabelis 10 on võrdluses testitud hiirte koguarvuga (kümme) toodud hiirte arv, kellel avaldus PR = osaline ravivastus (kasvaja maht

väheneb suvalisel manustamisjärgsel ajal enam kui 50% võrra võrdluses päeval 0 mõõdetud kasvaja mahtga) või CR = täielik ravivastus (kasvaja maht väheneb suvalisel manustamisjärgsel ajal kuni 0 mm<sup>3</sup>).

Tabel 10

Manustatud antikeha (ravi)	PR	CR	Ravimi annus – DM1 (µg/m <sup>2</sup> )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravim/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

[0914] Võttes arvesse MA79b-siiratud “humaniseeritud” antikehaga ADC-de võimet piirata oluliselt kasvaja progresseerumist ksenograftides, võivad CD79b molekulid olla suurepäraseks sihtmärkideks kasvajate, sealhulgas B-rakuliste vähkide, nagu lümfoomid (ehk mitte-Hodgkini lümfoom), leukeemiad (ehk krooniline lümfotsütaarne leukeemia) ning muud vereloomerakkude vähid, ravimisel imetajatel. Lisaks on MA79b-siirdatud „humaniseeritud” antikehaga ADC-d kasulikud kasvajate, sealhulgas B-rakuliste vähkide nagu lümfoomid (s.t. mitte-Hodgkini lümfoom), leukeemiate (ehk krooniline lümfotsütaarne leukeemia) ning muude vereloomerakkude vähkide *in vivo* kasvu vähendamiseks.

NÄIDE 4: CD79b-vastase antikeha kaaslokaliseerimine

[0915] MA79b-siirdatud „humaniseeritud“ antikehade ja antikehavariantide internaliseerimise käigus rakku toimetamise koha määramiseks võib kasutada B-rakuliinidesse internaliseeritud CD79b-vastaste antikehade kaaslokaliseerimisuuringute hindamist RAMOS rakuliinides. LAMP-1 on marker hilistele endosoomidele ja lüsoosoomidele (Kleijmeer et al., *Journal of Cell Biology*, 139(3): 639-649 (1997); Hunziker et al., *Bioessays*, 18: 379-389 (1996); Mellman et al., *Annals Rev. Dev. Biology*, 12: 575-625 (1996)), sealhulgas MHC II klassi kompartmentidele (MIIC-d), mis kujutavad hilise endosoomi/lüsoomisarnast kompartmenti. HLA-DM on marker MIIC-dele.

[0916] RAMOS rakke inkubeeritakse 3 tundi temperatuuril 37 °C koos 1 µg/ml MA79b-siiratud „humaniseeritud“ antikehade ja antikehavariantide, FcR blokaatori (Miltenyi) ning 25 µg/ml Alexa647-transferriniga (Molecular Probes) täielikult karbonaadivabas söötmes (Gibco) 10 µg/ml leupeptiini (Roche) ja 5 µM pepstatiini (Roche) juuresolekul lüsoosomaalse degradatsiooni pärssimiseks. Seejärel pestakse rakke kaks korda, fikseeritakse 3% paraformaldehüüdiga (Electron Microscopy Sciences) 20 minutit toatemperatuuril, reaktsioon peatatakse 50 mM NH<sub>4</sub>Cl-ga (Sigma), permeabiliseeritakse 0,4% Saponiin / 2% FBS / 1% BSA-ga 20 minutit ja inkubeeritakse siis 1 µg/ml Cy3 hiirevastase antikehaga (Jackson ImmunoResearch) 20 minutit. Järgmiseks blokeeritakse reaktsioon 20 minutiks hiire IgG-ga (Molecular Probes), millele järgneb 30-minutine inkubeerimine Image-iT FX Signal Enhancer'iga (Molecular Probes). Lõpuks inkubeeritakse rakke Zenon Alexa488-märgistatud hiire anti-LAMP1-ga (BD Pharmingen), markeriga nii lüsoosoomidele kui ka MIIC-le (lüsoosoomisarnane kompartment, mis on osaks MHC II klassi rajast), 20 minuti jooksul ning fikseeritakse 3% PFA-ga. Rakud resuspendeeritakse 20 µl saponiinipuhvrts ja neil lastakse kleepuda polülüsiiniga (Sigma) kaetud objektiklaasidele enne DAPI-d sisaldava VectaShield'iga (Vector Laboratories) pealisklaasi paigaldamist. MIIC või lüsoosoomide immunofluorestsentsi määramiseks rakud fikseeritakse, permeabiliseeritakse ja võimendatakse ülalkirjeldatud viisil ning värvitakse seejärel Zenon-märgistatud Alexa555-HLA-DM (BD Pharmingen) ja Alexa488-Lamp1-ga hiire IgG liia juuresolekul kooskõlas tootja (Molecular Probes) juhistega.

[0917] Eeltoodust tulenevalt võib MA79b-siirdatud antikehade või antikehavariantide kaaslokaliseerimine B-rakuliinide lüsoosoomide või MHC-ga immunofluorestsentsi abil

hindamise põhjal tuvastada need molekulid suurepärase agensitena kasvajate, sealhulgas B-rakuliste vähkide, nagu lümfoomid (s.t. mitte-Hodgkini lümfoom), leukeemiad (ehk krooniline lümfotsütaarne leukeemia) ning muud vereloomerakkude vähid, ravimisel imetajatel.

#### NÄIDE 5: Tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastaste antikehade valmistamine

**[0918]** Tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastaste antikehade valmistamine viidi läbi siin kirjeldatud viisil.

**[0919]** MA79b antikeha kodeeriv DNA (kerge ahel, SEQ ID NO: 4, joonis 4, ning raske ahel, SEQ ID NO: 5, joonis 5) mutageniseeriti siin käsitletud meetoditel kerge ja raske ahela modifitseerimiseks. Samuti saab MA79b antikeha kodeerivat DNA-d (raske ahel, SEQ ID NO: 5; joonis 5) mutageenida siin käsitletud meetoditel raske ahela Fc piirkonna modifitseerimiseks.

**[0920]** huMA79b.v17 antikeha kodeerivat DNA-d (raske ahel, SEQ ID NO: 304, joonis 15) mutageniseeriti siin käsitletud meetoditel raske ahela modifitseerimiseks. Samuti saab huMA79b.v17 antikeha kodeerivat DNA-d (kerge ahel, SEQ ID NO: 303, joonis 15, ning raske ahel, SEQ ID NO: 304, joonis 15) mutageenida siin käsitletud meetoditel kerge ahela või raske ahela Fc piirkonna modifitseerimiseks.

**[0921]** huMA79b.v18 antikeha kodeerivat DNA-d (raske ahel, SEQ ID NO: 306, joonis 16) mutageniseeriti siin käsitletud meetoditel raske ahela modifitseerimiseks. Samuti saab huMA79b.v18 antikeha kodeerivat DNA-d (kerge ahel, SEQ ID NO: 305, joonis 16, ning raske ahel, SEQ ID NO: 306, joonis 16) mutageniseerida siin käsitletud meetoditel kerge ahela või raske ahela Fc piirkonna modifitseerimiseks.

**[0922]** huMA79b.v28 antikeha kodeerivat DNA-d (raske ahel, SEQ ID NO: 308, joonis 17) mutageniseeriti siin käsitletud meetoditel raske ahela modifitseerimiseks. Samuti saab huMA79b.v28 antikeha kodeerivat DNA-d (kerge ahel, SEQ ID NO: 307, joonis 17, ning raske ahel, SEQ ID NO: 308, joonis 17) mutageniseerida siin käsitletud meetoditel kerge ahela või raske ahela Fc piirkonna modifitseerimiseks.

**[0923]** huMA79b.v32 antikeha kodeerivat DNA-d (kerge ahel, SEQ ID NO: 310, joonis 18, ning raske ahel, SEQ ID NO: 309, joonis 18) saab mutageniseerida siin käsitletud meetoditel kerge ja raske ahela modifitseerimiseks.

[0924] Makaagi CD79b-vastast antikeha kodeerivat DNA-d (kerge ahel, SEQ ID NO: 241, joonis 45 ning raske ahel, SEQ ID NO: 243, joonis 47) mutageniseeriti siin käsitletud meetoditel kerge / raske ahela modifitseerimiseks. Samuti saab makaagi CD79b-vastast antikeha kodeerivat DNA-d (raske ahel, SEQ ID NO: 243, joonis 47) mutageniseerida siin käsitletud meetoditel raske ahela Fc piirkonna modifitseerimiseks.

[0925] Tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastaste antikehade valmistamisel mutageniseeriti kergelt ahelat kodeerivat DNA-d, nii et kerges ahelas Kabati positsioonil 205 (järjestuse positsioonil 209) asendati valiini jääk tsüsteini jäägiga, nagu on näidatud joonisel 27 (MA79b thioMab kerge ahel SEQ ID NO: 235) ja joonisel 49 (Mab anti-tsüano CD79b (ch10D10) kerge ahel SEQ ID NO: 300). Rasket ahelat kodeerivat DNA-d mutageniseeriti nii, et raske ahela EU positsioonil 118 asendatialaniini jääk tsüsteini jäägiga (järjestuse positsioon 118, Kabati number 114), nagu on näidatud joonisel 48 (thioMab anti-tsüano CD79b (ch10D10) antikeha raske ahel SEQ ID NO: 244, joonisel 28 (MA79b thioMab raske ahel SEQ ID NO: 236), joonisel 24 (thioMab huMA79b.v17 raske ahel SEQ ID NO: 228), joonisel 25 (thioMab httMA79b.v18 raske ahel SEQ ID NO: 230) ja joonisel 26 (thioMab httMA79b.v28 raske ahel SEQ ID NO: 232). CD79b-vastaste antikehade Fc piirkonda võib mutageniseerida selliselt, et raske ahela Fc piirkonnas EU positsioonil 400 (järjestuse positsioon 400; Kabati number 396) asendatakse seriini jääk tsüsteini jäägiga, nagu on näidatud tabelites 2-4.

A. Tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastaste antikehade ettevalmistamine reoksüdeerimise teel

[0926] Tsüsteiiniga konstrueeritud täispikad CD79b-vastased monokloonsed antikehad (ThioMab'id) ekspresseeritakse CHO rakkudes ja puhastatakse aafiinsuskromatograafia teel A-valgul, millele järgneb geelkromatograafia. Mittenatiivsed (*petrified*) antikehad rekonstitueeritakse 500 mM naatriumboraadis ja 500 mM naatriumkloriidis pH umbes 8,0 juures ja redutseeritakse 1 mM TCEP-i (tris(2-karboksüetüül)fosfiinhüdrokloriid; Getz et al., (1999) Anal. Biochem., 273: 73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) umbes 50-100-kordse molaarse liiaga umbes 1-2 tundi temperatuuril 37 °C. Redutseeritud ThioMab lahjendatakse ja kantakse HiTrap S kolonnile 10 mM naatriumatsetaadis, pH 5, ning elueeritakse PBS lahusega, mis sisaldab 0,3 M naatriumkloriidid. Elueeritud redutseeritud ThioMab'i töödeldakse pH 7



juures 3 tundi 2 mM dehüdroaskorbiinhappega (dhAA) või üle öö toatemperatuuril 2 mM vasksulfaadi ( $\text{CuSO}_4$ ) vesilahusega. Ümbritsevas õhus oksüdeerimine võib samuti osutada efektiivseks. Puhverlahus vahetatakse elueerimisega läbi Sephadex G25 vaigu, elueerides PBS lahusega, millele on lisatud 1 mM DTPA. Tioli/antikeha suhte hindamiseks määratakse redutseeritud antikeha kontsentratsioon lahuse optilise tiheduse põhjal 280 nm juures ning tioli kontsentratsioon optilise tiheduse mõõtmisega 412 nm juures pärast reaktsiooni DTNB-ga (Aldrich, Milwattkee, WI).

NÄIDE 6: Ravimi valmistamine tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastaste antikehadega, konjugeerimine tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastaste-antikehade ja ravimi-linkervaheühendite omavahelise konjugeerimise teel

**[0927]** Pärast näites 5 toodud redutseerimise ja reoksüdeerimise protseduuride läbiviimist rekonstitueeritakse tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastana antikeha PBS (soola lahus fosfaatpuhverlahuses) puhverlahuses ja jahutatakse jääl. Umbes 1,5 molaarekvivalenti tsüsteiiniga konstrueeritud antikeha lahustatakse DMSO-s ravimi auristatiini-linkervaheühendi, nagu MC-MMAE (maleimidokaproüülmonometüülauristatiin E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE või MC-val-cit-PAB-MMAF, kohta, mis kõik sisaldavad reaktiivset tiolfunktsionaalrühma nagu maleimidorühm, lahjendatakse atsetonitriilis ja vees ning lisatakse jahutatud redutseeritud ja reoksüdeeritud antikehale PBS-s. Umbes ühe tunni möödudes lisatakse reaktsiooni peatamiseks ja antikeha võimalike mittereageerinud tiolrühmade katmiseks liias maleimiidi. Reaktsioonisegu kontsentreeritakse tsentrifuugides ultrafiltrimisega ja tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastane antikeha-ravimi konjugaat puhastatakse ja vabastatakse sooladest elueerimisega läbi G25 vaigu PBS-s ning steriilsetes tingimustes läbi 0,2  $\mu\text{m}$  filtrite filtrimisega ja säilitatakse külmutatuna.

**[0928]** huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb-BMPEO-DM1 valmistamine toimus järgmiselt. huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb'i vaba tsüsteiin modifitseeriti bis-maleimidoreagendiga BM(PEO)3 (Pierce Chemical), selle tulemusel tekkis antikeha pinnale mittereageerinud maleidorühm. Selleks lahustati BM(PEO)3 kontsentratsioon 10 mM 50% etanooli/vee segus ja lahusele, mis sisaldas huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb'i soola kontsentratsioon 1,6 mg/ml (10 mikromolaarne) fosfaatpuhverlahuses, lisati BM(PEO)3 10-kordne molaarne ülehulk ning segul lasti 1 tund reageerida. BM(PEO)3 jääk eemaldati geelfiltrimise teel

(HiTrap kolonn, Pharmacia) 150 mM NaCl sisaldavas 30 mM tsitraatpuhverlahuses, pH 6. httMA79b.v18-HC(A118C) tioMAb-BMPEO vaheühendile lisati DM1 umbes 10-kordne molaarne liig dimetüülatsetaamiidis (DMA). Ravimi-osamolekuli reagenti lahustamiseks võib kasutada ka dimetüülformamiidi (DMF). Reaktsioonisegul lasti reageerida üle öö, seejärel eemaldati reageerimata ravim geelfiltrimise teel või dialüüsiga PBS lahusesse. Suure molekulmassiga agregaatide eemaldamiseks ja puhastatud huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb-BMPEO-DM1 saamiseks kasutati geelfiltrimist S200 kolonnidel PBS lahuses.

**[0929]** Samasuguste protokollide kohaselt saadi thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-kontroll-hu-anti-HER2-HG(A118C)-MC-MMAF, thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE ja thio-kontroll-anti-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF.

**[0930]** Eespool kirjeldatud protseduuride abil valmistati ja testiti järgnevad tsüsteiiniga konstrueeritud CD79b-vastase antikeha ja ravimi konjugaadid (TDC-d):

1. thio-huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF, konjugeerides A118C thio-huMA79b.v18-HC(A118C) ja MC-MMAF;
2. thio-huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1, konjugeerides A118C thio-huMA79b.v18-HC(A118C) ja BMPEO-DM1;
3. thio-huMA79b.v18-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, konjugeerides A118C thio-huMA79b.v18-HC(A118C) ja MC-val-cit-PAB-MMAE;
4. thio-huMA79b.v28-HG(A118C)-MC-MMAF, konjugeerides A118C thio-huMA79b.v28-HC(A118C) ja MC-MMAF;
5. thio-httMA79b.v28-HG(A118C)-BMPEO-DM1, konjugeerides thio-huMA79b.v28-HC(A118C) ja BMPEO-DM 1;
6. thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-val-cit-PAB-MMAE, konjugeerides thio-huMA79b.v28-HC(A118C) ja MC-val-cit-PAB-MMAE;
7. thio-anti-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF, konjugeerides A118C thio-anti-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C) ja MC-MMAF;
8. thio-anti-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1, konjugeerides A118C thio-anti-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C) ja BMPEO-DM1;
9. thio-anti-cynoCD79b (ch10D10)-13C(A118C)-MCvcPA13-MMAE, konjugeerides A118C thio-anti-cynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C) ja MC-val-cit-PAB-MMAE;

10. thio-MA79b-HC(A118C)-MC-MMAF, konjugeerides thio-MA79b-HC(A118C) ja MC-MMAF ja

11. thio-MA79b-LC(V205C)-MC-MMAF, konjugeerides thio-MA79b-LC(V205C) ja MC-MMAF.

NÄIDE 7: Tsüsteiiniga konstrueeritud thioMab'i ja ravimi konjugaatide rakupinna antigeeniga seondumisafiinsuse iseloomustamine

**[0931]** Thio-huMA79b.v18 ning thio-huMA79b.v28 ja ravimi konjugaatide seondumisafiinsus ning thio-MA79b-ravim konjugaatide ja BJAB-lutsiferaasi rakkudes ekspresseeritud CD79b seondumisafiinsus määrati FACS analüüsi abil. Lisaks määrati FACS analüüsi abil thio-anti-cynoCD79b(ch10D10) ja ravimi konjugaadi aktiivsus seondumisel cynoCD79b-d ekspresseerivates BJAB rakkudes ekspresseeritava CD79b-ga.

**[0932]** Lühidalt, umbes  $1 \times 10^6$  rakku mahus 100  $\mu$ l viidi kontakti antikeha erinevate kogustega (1,0  $\mu$ g, 0,1  $\mu$ g või 0,01  $\mu$ g ühe miljoni BJAB-lutsiferaasi raku või cynoCD79b ekspresseeriva (anti-cynoCD79b thioMab'ide puhul) BJAB raku kohta) ühega järgnevatest CD79b-vastase thioMab'i ja ravimi konjugaatidest või kontrollina kasutatud mittekonjugeeritud antikehaga: (1) thio-MA79b-LC(V205C)-MC-MMAF või (2) thio-MA79b-HC(A118C)-MC-MMAF (vastavalt joonistel 29A-B); (3) thio-httMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF, (4) thio-huMA79b.v18-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE või (5) thio-huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (vastavalt joonistel 30B-D); (6) thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (7) thio-httMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 või (8) thio-httMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (vt vastavalt joonistel 31B-31D) või (9) thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (10) thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 või (11) thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF (vt vastavalt joonistel 32B-32D). Sekundaarse detekteeriva antikehana kasutati PE-ga konjugeeritud hiire inimesevastast Ig (BD Cat#555787).

**[0933]** Raku pinnale seondunud CD79b-vastane antikeha detekteeriti PE-ga konjugeeritud hiire inimesevastase Ig abil. Joonistel 29-32 esitatud graafikud näitavad, et kõikide testitud thioMab'i ja ravimi konjugaatide puhul oli antigeeni seondumise ligikaudu ühesugune.

NÄIDE 8: *In vitro* testsüsteem CD79b-vastase thioMab'i ja ravimi konjugaatide poolt esile kutsutud raku proliferatsiooni vähenemise määramiseks

[0934] CD79b-vastase thioMAB-ravimi konjugaatide (sealhulgas thio-httMA79b.v18-HC(A118C)-MCMMAF, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE ja thio-huMA79b.v18-HG(A118C)-BMPEO-DM1) *in vitro* potentsiaali mõõdeti raku proliferatsiooni testsüsteemi abil (joonis 41A, BJAB-lutsiferaas; joonis 41B, Granta-519; joonis 41C, WSU-DLCL2). *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* on kaubandusest saadav (Promega Corp., Madison, WI) homogeenne testmeetod, mis põhineb *Coleoptera* lutsiferaasi (US 5583024; US 5674713; US 5700670) rekombinantsel ekspressioonil. Selle raku proliferatsioonitestiga määratakse elusrakkude arv kultuuris sisalduva metaboolselt aktiivsete rakkude indikaatori ATP koguse põhjal (Crouch et al., J. Immunol. Metho., 160: 81-88 (1993); US 6602677). *CellTiter-Glo® Assay* viidi läbi 96 süvendiga plaatidel, mis võimaldas suure läbilaskevõimega automatiseeritud skriiningut (HTS) (Cree et al., AntiCancer Drugs, 6: 398-404 (1995)). Homogeense testsüsteemi meetod hõlmas ühe reagenti (*CellTiter-Glo® Reagent*) vahetat lisamist seerumit sisaldavas söötmes kultiveeritavatele rakkudele.

[0935] Homogeenne “lisa-sega-mööda” formaat viib rakkude lüüsile ja ATP olemasoleva kogusega proportsionaalse luminesentsignaali tekkele. Substraat, mardika lutsiferiin (*Beetle Luciferin*), dekarboksüülitakse oksüdatiivselt tulekärbse rekombinantse lutsiferaasi toimel, sellega kaasneb ATP konverteerimine AMP-ks ning footonite genereerimine. Elusate rakkude hulk määratakse suhtelise luminesentsi ühikutes (RLU). Andmed võib registreerida luminomeetriga või CCD kaameraga. Luminesentsi väärtus esitatakse RLU-na antud ajavahemiku kestel. %RLU kujutab endast normaliseeritud RLU-d protsentides võrrelduna selle väärtusega “ravimita konjugaadi” kui kontrolli jaoks. Alternatiivina võib stsintillaatori lisamisel luminesents-footoneid loendada stsintillatsioonloendil. Helendamise ühikuks võib sel juhul olla CPS (lugem sekundi kohta).

[0936] ThioMAB-ravimi konjugaatide efektiivsust mõõdeti raku proliferatsiooni testsüsteemi abil järgneva, lähteprotokollist CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical bulletin TB288; Mendoza et al., Cancer Res., 62: 5485-5488 (2002)) adapteeritud protokolliga kohaselt.

1. Igasse 384 süvendiga läbipaistmatute seintega plaadi süvendisse paigutati rakukultuuri 40 µl alikvoot, mis sisaldas söötmes umbes 3000 BJAB, Granta-519 või WSU-DLCL2 rakku.
2. TDC (ThioMab-ravimi konjugaat) (10 µl) lisati süvenditesse lõppkontsentratsioonid 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 13,7, 4,6 või 1,5 ng/ml, (iga kontsentratsioon neljas korduses), kontrollina lisati “ravimita konjugaadi” süvenditesse ainult söödet, inkubeeriti 3 päeva.
3. Plaatide temperatuur tasakaalustati toatemperatuuriga umbes 30 minuti jooksul.
4. Lisati *CellTiter-Glo Reagent* (50 µl).
5. Rakkude lüüsi indutseerimiseks segati süvendite sisu 2 minutit orbitaalraputil.
6. Lumineentsussignaali stabiliseerimiseks inkubeeriti plaati 10 minutit toatemperatuuril.
7. Registreeriti lumineentsentsi väärtus ja esitati see graafiliselt %RLU väärtusena (suhtelise lumineentsentsi ühikud).

Andmed ravimikonjugaati mittesisaldavas söötmes inkubeeritud rakkude kohta on graafiliselt esitatud 0,51 ng/ml juures.

Sööde: BJAB, Granta-519 ja WSU-DLCL2 rakud kasvavad RPM11640/10%FBS 2 mM glutamiinis.

#### NÄIDE 9: *In vivo* testsüsteem CD79b-vastase ThioMab'i ja ravimi konjugaatide poolt esile kutsutud kasvaja kasvu inhibeerimise määramiseks

##### *A. Granta-519 (inimese mantelrakkude lümfoom)*

**[0937]** Eespool kirjeldatuga sarnases uuringus, kasutades sama ksenograaftmudeli protokollit, nagu esitati näites 3 (vt eespool), varieerides ravimikonjugaate ja manustatavaid annuseid, uuriti thioMab ja ravimi konjugaatide efektiivsust Granta-519 ksenograaftimudelil (inimese mantelrakkude lümfoomiga) CB17 SCID hiirtel. Ravimikonjugaadid ja annused (manustatud kõigile ADC-dele ja kontrollidele päeval 0) on esitatud järgnevas tabelis 11.

**[0938]** Kontrollantikehaks oli hu-anti-HER2-MC-MMAF või MA79b-MC-MMAF. Kontrollina kasutatud HC(A118C) thioMab oli thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MMAF thioMab. Tulemused on esitatud tabelis 11 ja joonisel 33.

[0939] Joonisel 33A on graafiliselt esitatud kasvaja keskmise suuruse muutumised ajas Granta-519 ksenograftis CB17 SCID hiires, mida mõjutati raske ahela A118C või kerge ahela V205C CD79b-vastaste TDC-dega annustes, mis on esitatud tabelis 11. Täpsemalt, thio-chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF ja thio-chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF manustamise järgselt täheldati kasvaja kasvu pidurdumist võrreldes negatiivsete kontrollidega (anti-hu-HER2-MC-MMAF ja thio-hu-anti-HER2-HC(A118G)-MC-MMAF). Teiste kontrollide seas oli MA79b-MC-MMAF.

[0940] Lisaks määrati samas uuringus iga annusrühma puhul kehamassi protsentuaalne muutus esimese 14 päeva jooksul. Tulemused (joonisel 33B) näitasid, et nende thioMAB-ravimi konjugaatide manustamine ei kutsunud antud ajavahemikus esile kehamassi olulist protsentuaalset vähenemist või kaalukaotust.

[0941] Lisaks on tabelis 11 esitatud nende hiirte arv kõigi testitud hiirte seas, kellel tuvastati PR = osaline regressioon (kasvaja maht vähenes mingil ajal pärast ravimi manustamist enam kui 50 protsendini selle esialgsest mahust päeval 0) või CR = täielik remissioon (mille puhul kasvaja maht mingil ajal pärast ravimi manustamist oli vähenenud kuni 0 mm<sup>3</sup>), NA = mittekasutatavad tulemused (DAR = ravimi ja antikeha suhe).

Tabel 11

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-chMA79b-HC(A118C) või thio-chMA79b-LC(V205C) MMAF konjugaadi manustamisel Granta-519 ksenograftidesse CB17 SCID hiirtes						
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF annus (µg/m <sup>2</sup> )	Antikeha annus (mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)	
Kontroll-hu-anti-HER2-MC-MMAF	0/8	0/8	413	6,8	4,0	
Thio-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	
Thio-chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	63	2,3	1,9	

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-chMA79b-HC(A118C) või thio-chMA79b-LC(V205C) MMAF konjugaadi manustamisel Granta-519 ksenograftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Antikeha annus (mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
Thio-chMA79b-HC(A118C)- MC-MMAF	4/9	0/9	190	6,8	1,9
Thio-chMA79b-LC(V205C)- MC-MMAF	0/8	0/8	60	2,3	1,8
Thio-chMA79b-LC(V205C)- MC-MMAF	5/9	4/9	180	6,8	1,8

*B. BJAB-lutsiferaasi (Burkitt'i lümfoomi) ksenograftid*

[0942] Eespool kirjeldatuga sarnases uuringus, kasutades sama ksenograftimudeli protokolliga nagu esitati näites 3 (vt eespool), varieerides ravimikonjugaate ja manustatavaid annuseid, uuriti täiendavate ravimikonjugaatide efektiivsust BJAB-lutsiferaasi (Burkitt'i lümfoomi) ksenograftimudelil CB17 SCID hiirtel. Ravimikonjugaadid ja annused (manustatud kõigile ADC-dele ja kontrollidele päeval 0) on esitatud järgnevas tabelis 12.

[0943] Kontroll-antikehaks oli huMA79b.v28 (konjugeeritud SMCC-DM1-ga). Kontroll-HC(A118C) thioMAb oli thio-htt-anti-HER2-HC(A118C) antikeha thioMAb (konjugeeritud BMPEO-DM1, MC-MMAF või MCvcPAB-MMAE-ga), thio-httMA79b.v28-HC(A118G) thioMAb või thio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C) thioMAb (konjugeeritud MC-MMAF-ga). Tulemused on esitatud järgnevas tabelis 12 ja joonisel 34.

[0944] Joonisel 34A on graafiliselt esitatud kasvaja suuruse keskmine muutumine ajas BJAB-lutsiferaas ksenograftis CB17 SCID hiirtes, keda mõjutati huMA79b.v28-HG(A118C) thioMAb-ravimi konjugaadiga, nagu on esitatud tabelis 12. Täpsemalt, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF ja thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thioMAb ja ravimi konjugaatide manustamise järgselt täheldati kasvaja kasvu pidurdumist võrreldes negatiivsete kontrollidena kasutatud antikeha-ravimi konjugaatidega (thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF ja thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). Teisteks kontrollideks olid thio-huMA79b.v28-HC(A118C), huMA79b.v28-SMCC-DM1 ja thio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF.

[0945] Lisaks määrati samas uuringus iga annusrühma puhul kehamassi protsentuaalne muutus esimese 7 päeva jooksul. Tulemused (joonisel 34B) näitasid, et nende thioMAb-ravimi konjugaatide manustamine ei kutsunud antud ajavahemikus esile kehamassi olulist protsentuaalset vähenemist või kaalukaotust.

[0946] Lisaks on tabelis 12 esitatud nende hiirte arv kõigi testitud hiirte seast, kellel tuvastati PR = osaline regressioon (kasvaja maht vähenes mingil ajal pärast ravimi manustamist enam kui 50 protsendini selle esialgselt mahust päeval 0) või CR = täielik remissioon (mille puhul kasvaja maht mingil ajal pärast ravimi manustamist oli vähenenud kuni 0 mm<sup>3</sup>), NA = mittekasutatavad tulemused (DAR = ravimi ja antikeha suhe).

Tabel 12

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-huMA 79b.v28-HC(A118C) MMAE, MMAF ja DM I konjugaatide manustamisel BJAB-lutsiferaasi ksenograftidesse CB 17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF, MMAE või DM1 annus (µg/m <sup>2</sup> )	Antikeha annus (mg/kg)	DAR (ravim/- antikeha)
Thio-kontroll-hu-anti-HER2- HC(A118C)-BMPEO- DM1	0/10	0/10	57	2	1,86
Thio-kontroll-hu-anti-HER2- HC(A118C)-MC- MMAF	1/10	0/10	58	2	1,9
Thio-kontroll-hit-anti-HER2- HC(A118C)- MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	46	2	1,55
kontroll htiMA79b.v28-SMCC- DM1	2/10	3/10	101	2	3,4
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)- BMPEO-DM1	3/10	2/10	55	2	1,85
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)- MC-MMAF	0/10	10/10	57	2	1,95
Thio-huMA79b.v2R-HC(A118C)- MCvcPAB- MMAE	0/10	10/10	54	2	1,87
Thio-kontroll-huMA79b.v2R- HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio-kontroll-hu-anti-	1/10	4/10	59	2	1,96



CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF					
--------------------------------	--	--	--	--	--

*C. WSU-DLCL2 (difuusse suurerakulise lümfoomi) ksenograftid*

[0947] Eespool kirjeldatuga sarnases uuringus, kasutades sama ksenograftimudeli protokolliga nagu esitati näites 3 (vt eespool), varieerides ravimikonjugaate ja manustatavaid annuseid, uuriti thioMAb-ravimi konjugaatide efektiivsust follikulaarse lümfoomi WSU-DLCL2 (difuusse suurerakulise lümfoomi) ksenograftimudelil CB17 SCID hiirtel. Ravimikonjugaadid ja annused on esitatud järgnevas tabelis 13.

[0948] Kontrollantikehaks oli huMA79b.v28 (konjugeeritud SMCC-DM1-ga). Kontroll-HC(A118C) thioMAb oli thio-hu-anti-HER2-HC(A118C) antikeha thioMAb (konjugeeritud BMPEO-DM1, MC-MMAF või MCvcPAB-MMAE-ga), thio-huMA79b.v28-HC(A118C) thioMAb või thio-anti-CD22 10F4v3-HC(A118C) thioMAb (konjugeeritud MC-MMAF-ga). Tulemused on esitatud järgnevas tabelis 13.

[0949] Joonisel 35A on graafiliselt esitatud kasvaja keskmise suuruse muutumine ajas WSU-DLCL2 (difuusse suurerakulise lümfoomi) ksenograftides CB17 SCID hiirtes, keda mõjutati raske ahela A118C CD79b-vastaste TDC-dega tabelis 13 esitatud annustes. Täpsemalt, thio-huMA79b.v28-HG(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF ja thio-huMA79b.v2R-HC(A118c)-MCvcPAB-MMAE manustamise järgselt täheldati kasvaja kasvu pidurdumist võrreldes negatiivsete kontrollidega (thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio-hu-anti-HER2-HG(A118C)-MGvcPAB-MMAE, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)). Teisteks kontrollideks olid thio-huMA79b.v28-14C(A118C), huMA79b.v2R-SMGC-DM1 ja thio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF.

[0950] Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MGvcPAB-MMAE TDC osutus käesolevas uuringus testitud ainetest kõige efektiivsemaks.

[0951] Lisaks määrati samas uuringus iga annusrühma puhul kehamassi protsentuaalne muutus esimese 7 päeva jooksul. Tulemused (joonisel 35B) näitasid, et nende thioMAb-ravimi konjugaatide manustamine ei kutsunud antud ajavahemikus esile kehamassi olulist protsentuaalset vähenemist või kaalukaotust.

[0952] Lisaks on tabelis 13 esitatud nende hiirte arv kõigi testitud hiirte seast, kellel tuvastati PR = osaline regressioon (kasvaja maht vähenes mingil ajal pärast ravimi manustamist enam

kui 50 protsendini selle esialgsest mahust päeval 0) või CR = täielik remissioon (mille puhul kasvaja maht mingil ajal pärast ravimi manustamist oli vähenenud kuni 0 mm<sup>3</sup>), NA = mittekasutatavad tulemused (DAR = ravimi ja antikeha suhe).

Tabel 13

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-huMA79b.v28-HC(A118C) MMAE, MMAF ja DM1 konjugaatide manustamisel WSU-DLCL2 ksenograftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF, MMAE või DM1 annus (µg/m <sup>2</sup> )	Antikeha annus(mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1,86
Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	115	4	1,9
Thio-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
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	110	4	1,85
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	3/10	1/10	115	4	1,95
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	3/10	108	4	1,87
Thio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	4	NA
Thio-kontroll-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	0/10	118	4	1,96
Thio-kontroll-	0/10	0/10	NA	4	NA

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-huMA79b.v28-HC(A118C) MMAE, MMAF ja DM1 konjugaatide manustamisel WSU-DLCL2 ksenograaftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF, MMAE või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Antikeha annus(mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
huMA79b.v28- HC(A118C)					

*D. DOHH2 (follikulaarse lümfoomi) ksenograaftid*

[0953] Eespool kirjeldatuga sarnases uuringus, kasutades sama ksenograaftimudeli protokolliga nagu esitati näites 3 (vt eespool), varieerides ravimikonjugaate ja manustatavaid annuseid, uuriti thioMAB-ravimi konjugaatide võimet vähendada B-rakkude kasvaja mahtu DOHH2 ksenograaftides CB17 SCID hiirtel. Ravimikonjugaadid ja annused (manustatud kõigile ADC-dele ja kontrollidele päeval 0) on esitatud järgnevas tabelis 14.

[0954] Kontrollantikeha oli huMA79b.v28 (konjugeeritud SMCC-DM1-ga). Kontroll-HC(A118C) thioMAB oli thio-hu-anti-HER2-HC(A118C) thioMAB (konjugeeritud BMPEO-DM1, MC-MMAF või MCvcPAB-MMAE-ga). thio-huMA79b.v28-HC(A118C) thioMAB ja thio-hu-anti-CD22-HC(A118C) (konjugeeritud MC-MMAF-ga). Tulemused on esitatud järgnevas tabelis 14 ja joonis 36.

[0955] Joonisel 36A on graafiliselt esitatud kasvaja suuruse keskmine muutumine ajas DOHH2 rakkude ksenograaftides CB17 SCID hiirtes, mida mõjutati raske ahela A118C TDC-dega tabelis 14 toodud annustes. Täpsemalt, thio-huMA79b.v28-HC-(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118G)-MC-MMAF ja thio-huMA796.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thioMAB-ravimi konjugaatide manustamine tabelis 14 toodud annustes kutsus esile kasvaja kasvu inhibeerimise võrreldes negatiivse kontrollina kasutatud ravimikonjugaatidega (Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). Teisteks kontrollideks olid Thio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C), Thio-kontroll-anti-CD22-HG(A118C)-MC-MMAF ja Thio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C) ning kontroll huMA79b.v28-SMCC-DM1.

[0956] Lisaks on tabelis 14 esitatud nende hiirte arv kõigi testitud hiirte seast, kellel tuvastati PR = osaline regressioon (kasvaja maht vähenes mingil ajal pärast ravimi manustamist enam kui 50 protsendini selle esialgsest mahust päeval 0) või CR = täielik remissioon (mille puhul kasvaja maht mingil ajal pärast ravimi manustamist oli vähenenud kuni 0 mm<sup>3</sup>), NA = mittekasutatavad tulemused (DAR = ravimi ja antikeha suhe).

Tabel 14

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-huMA79b.v28-HC(A118C) DM1, MMAF ja MMAE konjugaatide manustamisel DOHH2 ksenograftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF või DM1 annus (µg/m <sup>2</sup> )	Antikeha annus(mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	114	4	1,86
Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1,9
Thio-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
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/9	1/9	110	4	1,85
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	4/9	115	4	1,95
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	9/9	108	4	1,87
Thio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C)	1/9	0/9	NA	4	NA
Thio-kontroll-anti-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	118	4	1,96

*E. BJAB-lutsiferaasi (Burkitt'i lümfoomi) ksenograftid*

[0957] Eespool kirjeldatuga sarnases uuringus, kasutades sama ksenograftimudeli protokolliga nagu esitati näites 3 (vaata eespool), varieerides ravimikonjugaate ja manustatavaid annuseid, uuriti ravimikonjugaatide efektiivsust BJAB-lutsiferaasi (Burkitt'i lümfoomi) ksenograftides CB17 SCID hiirtes. Ravimikonjugaadid ja annused (manustatud kõigile ADC-dele ja kontrollidele päeval 0) on esitatud järgnevas tabelis 15.

[0958] Kontrollantikeha oli vehiikul (ADC-de puhul ainult puhverlahus). Kontroll-HC (A118C) thioMab oli thio-hu-anti-HER2-HC(A118C) antikeha thioMab (konjugeeritud BMPEO-DM1, MCvcPAB-MMAE või MC-MMAF-ga), thio-huMA79b.v28-HC(A118C) thioMab või thio-anti-CD22 10F4v3-HC(A118C) thioMab (konjugeeritud MC-MMAF-ga). Tulemused on esitatud järgnevas tabelis 15.

[0959] Joonisel 37A on graafiliselt esitatud kasvaja suuruse keskmine muutumine ajas BJAB-lutsiferaas ksenograftides CB17 SCID hiirtes, keda mõjutati raske ahela A118C CD79b-vastaste TDC-dega annustes, mis on toodud tabelis 15. Täpsemalt, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE ja thio-huMA79b.v28-HG(A118C)-MC-MMAF manustamise järgselt täheldati kasvaja kasvu pidurdumist võrreldes negatiivsete kontrollidega (thio-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF). Teisteks kontrollideks olid thio-huMA79b.v28-HC(A118C) ja thio-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF.

[0960] Lisaks on tabelis 15 esitatud nende hiirte arv kõigi testitud hiirte seast, kellel tuvastati PR = osaline regressioon (kasvaja maht vähenes mingil ajal pärast ravimi manustamist enam kui 50 protsendini selle esialgsest mahust päeval 0) või CR = täielik remissioon (mille puhul kasvaja maht mingil ajal pärast ravimi manustamist oli vähenenud kuni 0 mm<sup>3</sup>), NA = mittekasutatavad tulemused (DAR = ravimi ja antikeha suhe).

Tabel 15

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-huMA79b.v28-HC(A118C) MMAE, MMAF, ja DM 1 konjugaatide manustamisel BJAB-lutsiferaasi ksenograaftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF, MMAE või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Antikeha annus(mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
Kontrollvehiikul	0/10	0/10	NA	NA	NA
Thio-kontroll-hu-anti- HER2-HC(A118C)- BMPEO-DM1	0/10	1/10	57	2	1,86
Thio-kontroll-hu-anti- HER2-HC(A118C)- MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	23	1	1,55
Thio-kontroll-hu-anti- HER2-HC(A118C)- MC-MMAF	0/10	0/10	29	1	1,9
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-BMPEO- DM1	2/10	0/10	27	1	1,85
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-BMPEO- DM1	4/10	0/10	55	2	1,85
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)- MCvcPAB-MMAE	4/10	1/10	27	1	1,9
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MC- MMAF	3/8	1/8	28	1	1,9
Thio-kontroll- huMA79b.v28- HC(A118C)	0/10	0/10	NA	I	NA
Thio-kontroll-10F4v3- HC(A118C)-MC- MMAF	0/10	1/10	30	1	1,96

*F. Granta-519 (inimese mantelrakkude lümfoomi) ksenograaftid*

[0961] Eespool kirjeldatuga sarnases uuringus, kasutades sama ksenograaftimudeli protokolliga nagu esitati näites 3 (vt eespool), varieerides ravimikonjugaate ja manustatavaid annuseid, uuriti thioMAb-ravimi konjugaatide efektiivsust Granta-519 (inimese mantelrakkude lümfoo-

mi) ksenograaftides CB17 SCID hiirtes. Ravimikonjugaadid ja annused (manustatud kõigile ADC-dele ja kontrollidele päeval 0) on esitatud järgnevas tabelis 16.

**[0962]** Kontroll-HC(A118C) thioMAb oli thio-hu-anti-HER2-HC(A118C) thioMAb (konjugeeritud BMPEO-DM I või MC-MMAF-ga). Tulemused on esitatud järgnevas tabelis 16 ja joonisel 38.

**[0963]** Joonisel 38A on graafiliselt esitatud kasvaja suuruse keskmine muutumine ajas Granta 519 ksenograaftides CB17 SCID hiirtes, mida mõjutati raske ahela A118C CD79b-vastaste TDC-dega annustes, mis on toodud tabelis 16. Täpsemalt, thio-huMA79b.v28-HC-(A)118C)-BMPEO-DM ja thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF thioMAb-ravimi konjugaatide manustamine tabelis 16 toodud annustes kutsus esile kasvaja kasvu inhibeerimise võrreldes negatiivse kontrollina kasutatud ravimikonjugaatidega.

**[0964]** Lisaks määrati samas uuringus iga annusrühma puhul kehamassi protsentuaalne muutus esimese 14 päeva jooksul. Tulemused (joonisel 38B) näitasid, et nende thioMAb-ravimi konjugaatide manustamine ei kutsunud antud ajavahemikus esile kehamassi olulist protsentuaalset vähenemist või kaalukaotust.

**[0965]** Tabelis 16 on esitatud nende hiirte arv kõigi testitud hiirte seast, kellel tuvastati PR = osaline regressioon (kasvaja maht vähenes mingil ajal pärast ravimi manustamist enam kui 50 protsendini selle esialgsest mahust päeval 0) või CR = täielik remissioon (mille puhul kasvaja maht mingil ajal pärast ravimi manustamist oli vähenenud kuni 0 mm<sup>3</sup>) (DAR = ravimi ja antikeha suhe).

Tabel 16

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-huMA79b.v28-HC(A118C) DM1 ja MMAF konjugaatide manustamisel Granta-519 ksenograaftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF või DM1 annus (µg/m <sup>2</sup> )	Antikeha annus(mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
Thio-kontroll-hu-anti- HER2-HG(A118C)- BMPEO-	0/8	0/R	342	12	1,86
DM 1					
Thio-kontroll-hu-anti-	0/8	0/8	346	12	1,9

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-huMA79b.v28-HC(A118C) DM1 ja MMAF konjugaatide manustamisel Granta-519 ksenograftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Antikeha annus(mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
HER2-HC(A118C)-MC-MMAF					
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/6	0/6	55	2	1,85
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/8	110	4	1,85
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/8	4/8	219	8	1,85
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM 1	3/8	5/8	329	12	1,85
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	1/8	1/8	57	2	1,95
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	2/8	1/8	115	4	1,95
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	6/8	2/8	229	8	1,95
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	4/8	4/8	344	12	1,95



*G. WSU-DLCL2 (difuusse suurerakulise lümfoomi) ksenograftid*

**[0966]** Eespool kirjeldatuga sarnases uuringus, kasutades sama ksenograftimudeli protokolliga nagu esitati näites 3 (vt eespool), varieerides ravimikonjugaate ja manustatavaid annuseid, uuriti thioMAB-ravimi konjugaatide efektiivsust WSU-DLCL2 (difuusse suurerakulise lümfoomi) ksenograftides CB17 SCID hiirtes. Ravimikonjugaadid ja annused (manustatud kõigile ADC-dele ja kontrollidele päeval 0) on esitatud järgnevas tabelis 17.

**[0967]** Kontroll-antikeha oli vehiikul (ainult puhverlahus ADC-de puhul). Kontroll-thioMAB'id olid thio-hu-anti-HER2-HC(A118C) antikeha thioMAB'id (konjugeeritud BMPEO-DM1, MCvcPAB-MMAE või MC-MMAF-ga). Tulemused on esitatud järgnevas tabelis 17 ja joonisel 39.

**[0968]** Joonisel 39 on graafiliselt esitatud kasvaja suuruse keskmine muutumine ajas WSU-DLCL2 ksenograftides CB17 SCID hiirtes, keda mõjutati raske ahela A118C CD79b-vastaste TDC-dega annustes, mis on toodud tabelis 17. Täpsemalt, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF ja thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (antikeha annustes 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg ja 4,0 mg/kg) manustamise järgselt täheldati kasvaja kasvu pidurdumist võrreldes negatiivsete kontrollidega (thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF ja A-vehiikul).

**[0969]** Lisaks on tabelis 17 esitatud nende hiirte arv kõigi testitud hiirte seast, kellel tuvastati PR = osaline regressioon (kasvaja maht vähenes mingil ajal pärast ravimi manustamist enam kui 50 protsendini selle esialgsest mahust päeval 0) või CR = täielik remissioon (mille puhul kasvaja maht mingil ajal pärast ravimi manustamist oli vähenenud kuni 0 mm<sup>3</sup>), NA = mittekasutatavad tulemused (DAR = ravimi ja antikeha suhe).

Tabel 17

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-huMA79b.v28-HC(A118C) MMAE, MMAF ja DM 1 konjugaatide manustamisel WSU-DLCL2 ksenograftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF, MMAE või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Antikeha annus(mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
Kontrollvehiikul	0/9	0/9	NA	NA	NA
Thio-kontroll-hu-anti-HER2- HC(A118C)-BMPEO- DM1	0/9	0/9	114	4	1,86
Thio-kontroll-hu-anti-HER2- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	0/9	0/9	92	4	1,55
Thio-kontroll-hu-anti-HER2- HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1,9
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	2/9	112	4	1,9
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/9	0/9	110	4	1,85
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	1/9	0/9	14	0.5	1,9
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	0/9	0/9	27	1.0	1,9
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	2/9	1/9	55	2.0	1,9
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	1/9	7/9	110	4.0	1,9

*H. Granta-519 (inimese mantelrakkude lümfoomi) ksenograftid*

[0970] Eespool kirjeldatuga sarnases uuringus, kasutades sama ksenograftimudeli protokolliga nagu esitati näites 3 (vt eespool), varieerides ravimikonjugaate ja manustatavaid annuseid,

uuriti thioMAb-ravimi konjugaatide efektiivsust Granta-519 (inimese mantelrakkude lümfoomi) ksenograaftides CB17 SCID hiirtes. Ravimikonjugaadid ja annused (manustatud kõigile ADC-dele ja kontrollidele päeval 0) on esitatud järgnevas tabelis 18.

**[0971]** Kontroll-thio-MAb'id olid thio-hu-anti-HER2-HC(A118C) (konjugeeritud BMPEO-DM1-ga) ja thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE antikeha thioMAb'id. Tulemused on esitatud järgnevas tabelis 18.

**[0972]** Joonisel 40A on graafiliselt esitatud kasvaja suuruse keskmine muutumine ajas Granta-519 ksenograaftides CB17 SCID hiirtes, keda mõjutati raske ahela A118C CD79b-vastaste TDC-dega annustes, mis on toodud tabelis 18. Täpsemalt, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 ja thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (antikeha annused 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg ja 4,0 mg/kg) manustamise järgselt täheldati kasvaja kasvu pidurdumist võrreldes negatiivsete kontrollidega (thio-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1 ja thio-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE).

**[0973]** Lisaks on tabelis 18 esitatud nende hiirte arv kõigi testitud hiirte seast, kellel tuvastati PR = osaline regressioon (kasvaja maht vähenes mingil ajal pärast ravimi manustamist enam kui 50 protsendini selle esialgsest mahust päeval 0) või CR = täielik remissioon (mille puhul kasvaja maht mingil ajal pärast ravimi manustamist oli vähenenud kuni 0 mm<sup>3</sup>), NA = mittekasutatavad tulemused (DAR = ravimi ja antikeha suhe).

Tabel 18

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-huMA79b.v28-HC(A118C) DM1 ja MMAE konjugaatide manustamisel Granta-519 ksenograaftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF, MMAE või DM1 annus (µg/m <sup>2</sup> )	Antikeha annus (mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1,86
Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/10	1/10	92	4	1,55
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/10	0/10	110	4	1,85

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-huMA79b.v28-HC(A118C) DM1 ja MMAE konjugaatide manustamisel Granta-519 ksenograftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF, MMAE või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Antikeha annus (mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	0/10	1/10	13	0,5	1,87
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	1/10	0/10	27	1,0	1,87
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	1/10	7/10	54	2,0	1,87
Thio-huMA79b.v28- HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	0/10	10/10	108	4,0	1,87

### I. BJAB-cynoCD79b ksenograftid

[0974] Eespool kirjeldatuga sarnases uuringus, kasutades sama ksenograftimudeli protokolliga nagu esitati näites 3 (vt eespool), varieerides ravimikonjugaate ja manustatavaid annuseid, uuriti thioMAB-ravimi konjugaatide efektiivsust cynoCD79b (BJAB-cynoCD79b) ekspresseerivate BJAB (Burkitt'i lümfoomi) rakkude ksenograftides CB17 SCID hiirtes. Ravimikonjugaadid ja annused (manustatud kõigile ADC-dele ja kontrollidele päeval 0) on esitatud järgnevas tabelis 19.

[0975] Kontrollantikeha oli vehiikul (ainult puhverlahus). Kontroll-thio-MAB'id olid thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF ja thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE antikeha thioMAB'id. Tulemused on esitatud järgnevas tabelis 19 ja joonisel 50.

[0976] Joonisel 50 on graafiliselt esitatud kasvaja suuruse keskmine muutumine ajas BJAB-cynoCD79b ksenograftides CB17 SCID hiirtes, keda mõjutati raske ahela A118C CD79b-vastaste TDC-dega annustes, mis on toodud tabelis 19. Täpsemalt, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE ja thio-

huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF ja samuti ka thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE ja thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF manustamise järgselt täheldati kasvaja kasvu pidurdumist võrreldes negatiivsete kontrollidega (thio-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE ja thio-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF ning A-vehiikul).

[0977] Lisaks on tabelis 19 esitatud nende hiirte arv kõigi testitud hiirte seast, kellel tuvastati PR = osaline regressioon (kasvaja maht vähenes mingil ajal pärast ravimi manustamist enam kui 50 protsendini selle esialgsest mahust päeval 0) või CR = täielik remissioon (mille puhul kasvaja maht mingil ajal pärast ravimi manustamist oli vähenenud kuni 0 mm<sup>3</sup>), NA = mittekasutatavad tulemused (DAR = ravimi ja antikeha suhe).

Tabel 19

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-anti-cyno CD79b(ch10D10)-HC(A118C) DM1, MMAF või MMAE või Thio-huMA79b.v28 DM1, MMAF või MMAE konjugaatide manustamisel BJAB-cynoCD79b ksenograftidesse CB17 SCID hiirtes						
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF, MMAE või DM1 annus (µg/m <sup>2</sup> )	Antikeha annus (mg/kg)	DAR (ravim/- antikeha)	
Kontrollvehiikul	0/9	0/9	NA	NA	NA	
Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO- DM1	0/9	0/9	57	2	1,86	
Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	0/9	0/9	23	1	1,55	
Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	29	1	1,9	
Thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	1/8	53	2	1,8	
Thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	2/9	27	1	1,86	
Thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	1/9	28	1	1,9	

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-anti-cyno CD79b(ch10D10)-HC(A118C) DM1, MMAF või MMAE või Thio-huMA79b.v28 DM1, MMAF või MMAE konjugaatide manustamisel BJAB-cynoCD79b ksenograaftidesse CB17 SCID hiirtes						
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF, MMAE või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Antikeha annus (mg/kg)	DAR (ravim/ antikeha)	
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/9	0/9	55	2	1,85	
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/9	2/9	27	1	1,9	
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	7/9	1/9	28	1	1,9	

#### *J. BJAB-cynoCD79b ksenograaftid*

[0978] Eespool kirjeldatuga sarnases uuringus, kasutades sama ksenograaftimudeli protokolliga nagu esitati näites 3 (vt eespool), varieerides ravimikonjugaate ja manustatavaid annuseid, uuriti thioMAB-ravimi konjugaatide efektiivsust cynoCD79b (BJAB-cynoCD79b) ekspresseerivate BJAB (Burkitt'i lümfoomi) rakkude ksenograaftides CB17 SCID hiirtes. Ravimikonjugaadid ja annused (manustatud kõigile ADC-dele ja kontrollidele päeval 0) on esitatud järgnevas tabelis 20.

[0979] Kontroll-thio-MAB'id olid thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118C) ja thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) antikeha thioMAB'id. Tulemused on esitatud järgnevas tabelis 20 ja joonisel 51.

[0980] Joonisel 51 on graafiliselt esitatud kasvaja kasvu inhibeerimine ajas BJAB-cynoCD79b ksenograaftides CB17 SCID hiirtes, keda mõjutati raske ahela A118G CD79b-vastaste TDC-dega annustes, mis on toodud tabelis 20. Täpsemalt, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, samuti thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 manustamise järgselt täheldati kasvaja kasvu pidurdumist võrreldes negatiivsete kontrollidega (thio-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1. Teisteks kontrollideks olid thio-huMA79b.v28-HC(A118C) ja thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C).

[0981] Tulemused on esitatud järgnevas tabelis 20. Tabelis 20 on esitatud nende hiirte arv kõigi testitud hiirte seast, kellel tuvastati PR = osaline regressioon (kasvaja maht vähenes

mingil ajal pärast ravimi manustamist enam kui 50 protsendini selle esialgsest mahust päeval 0) või CR = täielik remissioon (mille puhul kasvaja maht mingil ajal pärast ravimi manustamist oli vähenenud kuni 0 mm<sup>3</sup>), NA = mittekasutatavad tulemused (DAR = ravimi ja antikeha suhe).

Tabel 20

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> Thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) DM1 või Thio-huMA79b.v28-HC(A 118C) DM 1 konjugaadi manustamisel BJAB-cynoCD79b ksenograftidesse CB17 SCID hiirtes					
Manustatud antikeha	PR	CR	MMAF, MMAE või DM1 annus (µg/m <sup>2</sup> )	Antikeha annus (mg/kg)	DAR (ravim/antikeha)
Thio-kontroll-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO- DM1	0/10	0/10	57	2	1,86
Thio-kontroll-huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio-kontroll-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/10	0/10	27	1	1,85
Thio-huMA796.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	2/10	55	2	1,85
Thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)- BMPEO-DM 1	0/10	0/10	27	1	1,8
Thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	53	2	1,8

### Järjestuste loetelu

<130> P5111R1 WO  
<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 acgttttctt ccaaggagcc 50
tcggacgctg tcacgggttt ggggtcgggg acagagcagt gaccatggcc 100
aggctggcgt tgtctcctgt gccagccac tggatggtgg cgttgctgct 150
gctgctctca gctgagccag taccagcagc cagatcggag gaccgggtacc 200
ggaatcccaa aggtagtgtt tgttcgcgga tctggcagag cccacgtttc 250
atagccagga aacggggctt cacggtgaaa atgcactgct acatgaacag 300
cgcctcggc aatgtgagct ggctctggaa gcaggagatg gacgagaatc 350
cccagcagct gaagctggaa aagggccgca tggaaagatc ccagaacgaa 400
tctctcgcca ccctcaccat ccaaggcatc cggtttgagg acaatggcat 450
ctacttctgt cagcagaagt gcaacaacac ctcgagggtc taccagggct 500
gcggcacaga gctgcgagtc atgggattca gcacctggc acagctgaag 550
cagaggaaca cgctgaagga tggatcatc atgatccaga cgctgctgat 600
catcctcttc atcatcgtgc ctatcttctt gctgctggac aaggatgaca 650

```



gcaaggctgg catggaggaa gatcacacct acgagggcct ggacattgac 700  
 cagacagcca cctatgagga catagtgacg ctgcggacag gggaagtga 750  
 gtggtctgta ggtgagcacc caggccagga gtgagagcca ggtcgcccca 800  
 tgacctgggt gcaggtccc tggcctcagt gactgcttcg gagctgcctg 850  
 gctcatggcc caacccttt cctggacccc ccagctggcc tctgaagctg 900  
 gccaccaga gctgccattt gtctccagcc cctgggtccc agctcttgcc 950  
 aaagggcctg gtagtagagg acaacagggc agcaacttgg agggagtctt 1000  
 ctgggatgg acgggaccca gccttctggg ggtgctatga ggtgatccgt 1050  
 cccacacat gggatggggg aggcagagac tggccagag cccgcaaatg 1100  
 gactcggagc cgagggcctc ccagcagagc ttgggaaggg ccatggaccc 1150  
 aactgggcc cagaagagcc acaggaacat cattcctctc ccgcaaccac 1200  
 tcccaccca gggaggcctt ggcctccagt gccttcccc gtggaataaa 1250  
 cgggtgtgcc 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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Kimäärse antikeha kerga ahel (chMA79b)

<400> 3

```

cactcccagc tccaactgca cctcggttct atcgattgaa ttccaccatg 50
ggatggtcac gtatcaccct ttttctagta gcaactgcaa ctggagtaca 100
ttcagatata gtgctgacce aatctccagc ttctttggct gtgtctctgg 150
ggcagagggc caccatctcc tgcaaggcca gccaaagtgt tgattatgat 200
ggtgatagtt ttttgaactg gtaccaacag aaaccaggac agccacccaa 250
actcttcata tatgctgcat ccaatctaga atctgggatc ccagccaggt 300
ttagtgagcag tgggtctggg acagacttca ccctcaacat ccatcctgtg 350
gaggaggagg atgctgcaac ctattactgt cagcaaagta atgaggatcc 400
gctcacgttc ggggcaggca ccgagctgga actcaaacgg accgtggctg 450
caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 500
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa 550
agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga 600
gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 650
ctgacgctga gcaaagcaga ctacagagaaa cacaaagtct acgcctgcga 700
agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg 750
gagagtgtta agcttggccg ccatggccca acttgtttat tgcagcttat 800
aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 850
tttttactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcacc aatgtatctt 900
atcatgtctg gatcgggaat taattcggc 929

```

<210> 4

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Kimäärse antikeha kerge ahel &lt;chMA79b)

&lt;400&gt; 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										

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1469

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Kimäärse antikeha raske ahel (chMA79b)

&lt;400&gt; 5

tcggttctat cgattgaatt ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt 50  
 ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt cagaagttca gctgcagcag 100  
 tctggggctg aactgatgaa gcctggggcc tcagtgaaga taticctgcaa 150  
 ggctactggc tacacattca gtagttactg gatagagtgg gtaaagcaga 200  
 ggctggaca tggccttgag tggattggag agatthtacc tggaggtggt 250  
 gatactaact acaatgagat tttcaagggc aaggccacat tcaactgcaga 300  
 tacatcctcc aacacagcct acatgcaact cagcagcctg acatctgagg 350  
 actctgccgt ctattactgt acaagacgag taccggttta ctttgactac 400  
 tggggccaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcctcca ccaagggccc 450  
 atcggctctc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag 500  
 cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 550  
 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt 600  
 cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg actgtgccct 650  
 ctagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 700  
 agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac 750  
 tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag 800  
 tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 850  
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt 900  
 caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa 950  
 agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 1000  
 accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt 1050  
 ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca 1100  
 aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggaa 1150  
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggta aaggcttcta 1200  
 tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca 1250  
 actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 1300  
 tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt 1350  
 ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga 1400  
 gcctctccct gtctccgggt aatgagtgc gacggccta gactcgacct 1450  
 gcagaagctt ggccgcat 1469

<210> 6

<211> 446

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Kimäärse antikeha raske ahel (chMA79b)

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 231

&lt;212&gt; PRT

<213> *Macaca fascicularis*

&lt;400&gt; 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

Met	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Ser	Ser	Met	Pro	Cys	His	Trp	Leu	Leu
1				5					10					15
Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	Gly	Glu	Pro	Val	Pro	Ala	Met	Thr
				20					25					30
Ser	Ser	Asp	Leu	Pro	Leu	Asn	Phe	Gln	Gly	Ser	Pro	Cys	Ser	Gln
				35					40					45
Ile	Trp	Gln	His	Pro	Arg	Phe	Ala	Ala	Lys	Lys	Arg	Ser	Ser	Met
				50					55					60
Val	Lys	Phe	His	Cys	Tyr	Thr	Asn	His	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Trp
				65					70					75
Phe	Arg	Lys	Arg	Gly	Ser	Gln	Gln	Pro	Gln	Glu	Leu	Val	Ser	Glu
				80					85					90

Glu Gly Arg Ile Val Gln Thr Gln Asn Gly Ser Val Tyr Thr Leu  
 95 100 105  
 Thr Ile Gln Asn Ile Gln Tyr Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys  
 110 115 120  
 Lys Gln Lys Cys Asp Ser Ala Asn His Asn Val Thr Asp Ser Cys  
 125 130 135  
 Gly Thr Glu Leu Leu Val Leu Gly Phe Ser Thr Leu Asp Gln Leu  
 140 145 150  
 Lys Arg Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Leu Ile Gln Thr  
 155 160 165  
 Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu  
 170 175 180  
 Asp Lys Asp Asp Gly Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr  
 185 190 195  
 Glu Gly Leu Asn Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val  
 200 205 210  
 Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro  
 215 220 225

Gly Gln Glu

- <210> 9
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 35 40 45  
 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 65 70 75  
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 80 85 90  
 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
 95 100 105

Ile Lys Arg

- <210> 10
- <211> 111
- <212> PRT
- <213> Kunstlik järjestus
- <220>
- <223> Kimäärse antikeha kerge ahela varieeruv domeen (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
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

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha siiriku kerge ahela varieeruv domeen (huMA79b graft)

&lt;400&gt; 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

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 12

353

Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys  
 5 10

- <210> 13
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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> Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Kimäärse antikeha raske ahela varieeruv domeen (chMA79b)

&lt;400&gt; 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

```

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha siiriku raske ahela varieeruv domeen (huMA79b graft)

&lt;400&gt; 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					

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 16

Ala	Arg	Ser	Glu	Asp	Arg	Tyr	Arg	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Ala	Cys	1	5	10	15
Lys																		

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 17

Lys	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn	1	5	10	15
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----	----

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 18

Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser  
5

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 19

Ala Ala Ser Asn Leu Lys Ser  
5

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 20

Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 21

Gln Gln Ser Asn Lys Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 22

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Arg  
5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 23

Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser  
5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 24

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Asn  
5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 25

Ala Ala Arg Lys Leu Lys Arg  
5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 26

Ala Ala Arg Tyr Leu Lys Arg  
5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 27

Ala Ala Arg Lys Leu Lys Ser  
5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 28

Ala Ala Arg Lys Leu Ala Ser  
5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 29

Ala Ala Gly Ile Leu Ala Arg  
5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 30

Ala Ala Arg Lys Leu Arg Ser  
5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 31

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Ser  
5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 32

Ala Ala Arg His Leu Lys Arg  
5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 33

Ala Ser Arg Tyr Leu Ser Arg  
5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 34

Ala Gly Ser Lys Leu Leu Arg  
5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 35

Ala Ala Ser Asn Arg Lys Ser  
5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 36

Ala Ala Ser Lys Leu Gly Ser  
5

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 37

Ala Ala Arg Tyr Leu Arg Arg  
5

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 38

Ala Ala Arg Arg Leu Arg Thr  
5

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 39

Ala Ala Arg Arg Leu Gly Arg  
5

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 40

Ala Ala Arg Gln Arg Lys Arg  
5

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT



<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 41

Ala Ala Arg Lys Leu Leu Arg  
5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 42

Ala Ala Arg Lys Leu Lys Asn  
5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 43

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Thr  
5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 44

Ala Ala Arg Lys Leu Gly Gly  
5

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 45

361

Ala Ala Arg Lys Leu Ala Arg  
5

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 46

Gln Gln Ser Asn Ala Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 47

Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 48

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 49

Gln Gln Ser Asn Asp Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 50

Gln Gln Ser Asn Leu Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 51

Asn Asn Ser Asn Gly Asp Pro Leu Asn  
5

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 52

Gln Pro Asp Asn Glu Ala Pro Arg Thr  
5

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 53

Asp Gln Arg Asn Ala Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 54

Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Ser  
5 10

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 55

Gly	Tyr	Pro	Phe	Arg	Ser	Tyr	Trp	Ile	Gln
				5					10

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 56

Gly	Tyr	Pro	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 57

Gly	Tyr	Pro	Phe	Thr	Arg	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 58

Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Arg	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 59

Gly	Tyr	Ser	Phe	Lys	Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 60

Pro	Tyr	Ser	Leu	Cys	Thr	Tyr	Phe	Ile	Asp
				5					10

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 61

Gly	Tyr	Tyr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 62

Gly	Tyr	Pro	Phe	Gly	Arg	Tyr	Trp	Val	Asn
				5					10

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 63

Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	Lys	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 64

Gly Tyr Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gln  
5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 65

Gly Tyr Pro Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Glu  
5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 66

Gly Tyr Pro Val Gly Arg Tyr Trp Ile Ser  
5 10

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 67

Gly Tyr Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn  
5 10

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 68

366

Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ser  
5 10

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 69

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu Ser  
5 10

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 70

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Glu  
5 10

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 71

Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Tyr Trp Ile Asn  
5 10

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sünteesitud järjestus

&lt;400&gt; 72

Gly Tyr Thr Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Asn  
5 10

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 73

Gly	Tyr	Ser	Phe	Arg	Ser	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 74

Gly	Tyr	Ser	Phe	Arg	Arg	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 75

Gly	Tyr	Ser	Phe	Arg	Arg	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 76

Gly	Tyr	Ser	Phe	Pro	Ser	Tyr	Trp	Leu	Gln
				5					10

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 77

Gly	Tyr	Pro	Phe	Thr	Arg	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

&lt;210&gt; 78



<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 78  
 Gly Tyr Pro Phe Ser Gly Tyr Trp Ile Glu  
 5 10

<210> 79  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 79  
 Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Ser  
 5 10

<210> 80  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 80  
 Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Asn  
 5 10

<210> 81  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 81  
 Gly Tyr Pro Phe Arg Gly Tyr Trp Ile Glu  
 5 10

<210> 82  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 82

Gly	Tyr	Pro	Phe	Asn	Arg	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 83

Gly	Tyr	Pro	Phe	Asn	Gly	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 84

Gly	Tyr	Asn	Val	Ser	Ser	Tyr	Trp	Leu	Ser
				5					10

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 85

Gly	Phe	Pro	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Ile	Ser
				5					10

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 86

Gly	Phe	Pro	Phe	Asn	Arg	Tyr	Trp	Ile	Asn
				5					10

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 87

```

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Leu Asp
                    5                               10

```

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 88

```

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
                    5                               10

```

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 89

```

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Lys Leu Asp
                    5                               10

```

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 90

```

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Leu Asp
                    5                               10

```

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 91

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp  
5 10

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 92

Cys Thr Arg Arg Val Pro Phe Cys Leu Asp  
5 10

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 93

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Leu Asp  
5 10

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 94

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp  
5 10

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 95

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Lys Leu Asp  
5 10

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 96

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Arg	Phe	Asp
				5					10

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 97

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Tyr	Phe	Asp
				5					10

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 98

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Tyr	Phe	Ser
				5					10

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 99

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Val	Leu	Asp
				5					10

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variant

&lt;400&gt; 100

Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Arg	Leu	Asp
				5					10

<210> 101

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 101

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Arg Phe Asp  
5 10

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 102

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Phe Leu Asp  
5 10

<210> 103

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 103

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Leu Asp  
5 10

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 104

Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp  
5 10

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 105

Cys Thr Arg Arg Arg Pro Val Cys Leu Asp  
5 10

<210> 106

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variant

<400> 106

Cys Thr Arg Arg Ile Pro Val Tyr Phe Asp  
5 10

<210> 107

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 107

Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp  
5 10

<210> 108

<211> 87

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 108

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly
1				5					10					15
Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
			20						25					30
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Arg
			35						40					45
Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
			50						55					60
Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
			65						70					75
Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
			80						85					

<210> 109

<211> 81

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 109

375

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

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 110

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
 20 25 30  
 Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp  
 35 40 45  
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser  
 50 55 60  
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 65 70 75  
 Val Thr Val Ser Ser

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 79

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 86



&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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						

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 81

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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												

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 114

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro  
 20 25 30  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp  
 35 40 45  
 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
 50 55 60  
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 65 70 75  
 Val Thr Val Ser Ser  
 80

<210> 115  
 <211> 79  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 115

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro  
 20 25 30  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp  
 35 40 45  
 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
 50 55 60  
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 65 70 75  
 Thr Val Ser Ser

<210> 116  
 <211> 87  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 116

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 20 25 30  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg  
 35 40 45  
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 50 55 60  
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 65 70 75  
 Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 80 85

<210> 117

&lt;211&gt; 81

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 117

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala
				20					25					30
Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
				35					40					45
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala
				50					55					60
Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				65					70					75
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
				80										

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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										

&lt;210&gt; 119

&lt;211&gt; 79

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 119

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
 20 25 30  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 35 40 45  
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 50 55 60  
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 65 70 75  
 Thr Val Ser Ser

&lt;210&gt; 120

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 121

&lt;211&gt; 81

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 121

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
 20 25 30  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp  
 35 40 45  
 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 50 55 60  
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr  
 65 70 75  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 80

&lt;210&gt; 122

<211> 80  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 122

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1                    5                      10              15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
                20                      25              30
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
                35                      40              45
Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                50                      55              60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                65                      70              75
Val Thr Val Ser Ser
                80
    
```

<210> 123  
 <211> 86  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 123

```

----
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1                    5                      10              15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
                20                      25              30
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg
                35                      40              45
Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
                50                      55              60
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Cys Ala Arg
                65                      70              75
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                80                      85
    
```

<210> 124  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 124

381

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

&lt;210&gt; 125

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala  
 20 25 30  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp  
 35 40 45  
 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 50 55 60  
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 65 70 75  
 Val Thr Val Ser Ser  
 80

&lt;210&gt; 126

&lt;211&gt; 79

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 127

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 127

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1                               5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 20 25 30
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 35 40 45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 50 55 60
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
 65 70 75
Lys Val Glu Ile Lys
 80

```

&lt;210&gt; 128

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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

```

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 129

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 20 25 30  
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 35 40 45  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu  
 50 55 60  
 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr  
 65 70 75  
 Lys Val Glu Ile Lys  
 80

&lt;210&gt; 130

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79b siiriku HVR1-LC

&lt;400&gt; 131

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79b siiriku HVR2-LC



&lt;400&gt; 132

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
5

&lt;210&gt; 133

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79b siiriku HVR3-LC

&lt;400&gt; 133

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79b siiriku HVR1-HC

&lt;400&gt; 134

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu  
5 10

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79b siiriku HVR2-HC

&lt;400&gt; 135

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile  
1 5 10 15

Phe Lys Gly

&lt;210&gt; 136

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79b siiriku HVR3-HC

&lt;400&gt; 136

Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr  
5 10

&lt;210&gt; 137

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) HVR1-LC

&lt;400&gt; 137

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Glu	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn
1				5					10					15

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) HVR3-HC

&lt;400&gt; 138

Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Arg	Leu	Asp	Tyr
				5					10

&lt;210&gt; 139

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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			

&lt;210&gt; 140

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 140

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

&lt;210&gt; 141

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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
-----	-----

&lt;210&gt; 142



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 6

&lt;223&gt; Xaa on A với R

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 8

&lt;223&gt; Xaa on T với N

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; Xaa

&lt;222&gt; 13

&lt;223&gt; Xaa on A với L

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 148

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 149

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 150

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) FR1-LC

<400> 152

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 153

<211> 15

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) FR2-LC

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) FR3-LC

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) FR4-LC

<400> 155

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 5 10

<210> 156

<211> 15

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) HVR1-LC

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) HVR2-LC

<400> 157

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) HVR3-LC

<400> 158

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr  
 5

<210> 159

<211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) CL1-LC

<400> 159

```

..... ---
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
  1                               5                10                15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
                20                25                30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
                35                40                45

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
                50                55                60

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
                65                70                75

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
                80                85                90

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
                95                100                105

Cys

```

<210> 160  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) FR1-HC

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) FR2-HC

<400> 161

```

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
                5                10

```

<210> 162  
 <211> 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) FR3-HC

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 163

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) FR4-HC

&lt;400&gt; 163

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				5					10	

&lt;210&gt; 164

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) HVR1-HC

&lt;400&gt; 164

Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

&lt;210&gt; 165

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) HVR2-HC

&lt;400&gt; 165

Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Ile
1				5					10					15
Phe	Lys	Gly												

&lt;210&gt; 166

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) HVR-H3

&lt;400&gt; 166

```

      Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr
                    5                10

```

&lt;210&gt; 167

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) CH1-HC

&lt;400&gt; 167

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
  1                    5                10                15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                20                25                30

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
                35                40                45

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                50                55                60

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
                65                70                75

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
                80                85                90

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
                95                100                105

Thr His Thr

```

&lt;210&gt; 168

&lt;211&gt; 221

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) FC-HC

&lt;400&gt; 168

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

&lt;210&gt; 169

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) varieeruva domeeni LC-HC

&lt;400&gt; 169

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1                    5                      10                      15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp
 20                      25
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

```

&lt;210&gt; 170

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v17) HC-varieeruv domeen

&lt;400&gt; 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

```

&lt;210&gt; 171

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) FR1-LC

&lt;400&gt; 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														

&lt;210&gt; 172

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) FR2-LC

&lt;400&gt; 172

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

&lt;210&gt; 173

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) FR3-LC

&lt;400&gt; 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														

&lt;210&gt; 174

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) FR4-LC

&lt;400&gt; 174

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				5					10	

&lt;210&gt; 175

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) HVR1-LC

&lt;400&gt; 175

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 176

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) HVR2-LC

&lt;400&gt; 176

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 5

&lt;210&gt; 177

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) HVR3-LC

&lt;400&gt; 177

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr  
 5

&lt;210&gt; 178

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) CL1-LC

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 179

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) FR1-HC

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 180

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) FR2-HC

&lt;400&gt; 180

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				5					10			

&lt;210&gt; 181

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) FR3-HC

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 182

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) FR4-HC

&lt;400&gt; 182

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				5					10	

&lt;210&gt; 183

&lt;211&gt; 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) HVR1-HC

<400> 183

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu  
5 10

<210> 184

<211> 18

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) HVR2-HC

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) HVR3-HC

<400> 185

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr  
5 10

<210> 186

<211> 108

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) CH1-HC

<400> 186

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	1	5	10	15
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	20	25	30	
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	35	40	45	
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	50	55	60	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	65	70	75	
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	80	85	90	
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	95	100	105	
Thr	His	Thr																

&lt;210&gt; 187

&lt;211&gt; 221

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) FC-HC

&lt;400&gt; 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					

&lt;210&gt; 188

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) LC varieeruv domeen

&lt;400&gt; 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										

&lt;210&gt; 189

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v18) HC varieeruv domeen

&lt;400&gt; 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					

&lt;210&gt; 190

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) FR1-LC

&lt;400&gt; 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										

&lt;210&gt; 191

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) FR2-LC

&lt;400&gt; 191

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	1	5	10	15
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----	----

&lt;210&gt; 192

<211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) FR3-LC

<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> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) FR4-LC

<400> 193

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				5					10	

<210> 194  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) HVR1-LC

<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> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) HVR2-LC

<400> 195

Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
				5		

<210> 196  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) HVR3-LC

&lt;400&gt; 196

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 197

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) CL1-LC

&lt;400&gt; 197

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
1 5 10 15  
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
20 25 30  
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala  
35 40 45  
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser  
50 55 60  
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys  
65 70 75  
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
80 85 90  
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu  
95 100 105  
Cys

&lt;210&gt; 198

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) FR1-HC

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 199

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) FR2-HC

&lt;400&gt; 199

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				5					10			

&lt;210&gt; 200

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) FR3-HC

&lt;400&gt; 200

Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu
1				5					10					15
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

&lt;210&gt; 201

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) FR4-HC

&lt;400&gt; 201

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				5					10	

&lt;210&gt; 202

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) HVR1-HC

&lt;400&gt; 202

Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu
				5					10

&lt;210&gt; 203

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) HVR2-HLC

&lt;400&gt; 203

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile  
 1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 204

<211> 10

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) HVR3-HC

<400> 204

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr  
 5 10

<210> 205

<211> 108

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) CH1-HC

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v28) Fc-HC

<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

&lt;210&gt; 207

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; (huMA79b.v28) LC-varieeruv domeen

&lt;400&gt; 207

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

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

&lt;210&gt; 208

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha (huMA79b.v28) HC varieeruv domeen

&lt;400&gt; 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						

&lt;210&gt; 209

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) FR1-LC

&lt;400&gt; 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											

&lt;210&gt; 210

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) FR2-LC

&lt;400&gt; 210

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Phe	Ile	Tyr
1				5					10					15

&lt;210&gt; 211

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) FR3-LC

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 212

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) FR4-LC

&lt;400&gt; 212

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				5					10	

&lt;210&gt; 213

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) HVR1-LC

&lt;400&gt; 213

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Ser	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn
1				5					10					15

&lt;210&gt; 214

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) HVR2-LC

&lt;400&gt; 214

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
5

&lt;210&gt; 215

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) HVR3-LC

&lt;400&gt; 215

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr  
5

&lt;210&gt; 216

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32)

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 217

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) FR1-HC

&lt;400&gt; 217

410

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

&lt;210&gt; 218

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) FR2-HC

&lt;400&gt; 218

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 5 10

&lt;210&gt; 219

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) FR3-HC

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 220

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) FR4-HC

&lt;400&gt; 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 5 10

&lt;210&gt; 221

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) HVR1-HC

&lt;400&gt; 221

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu  
 5 10

<210> 222  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) HVR2-HC

<400> 222  
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Phe Lys Gly

<210> 223  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) HVR3-HC

<400> 223  
 Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr  
 5 10

<210> 224  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Kunstlik järjestus

<220>  
 <223> Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) CH1-HC

<400> 224  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 20 25 30  
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 35 40 45  
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 50 55 60  
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 65 70 75  
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 80 85 90  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 95 100 105  
 Thr His Thr

<210> 225  
 <211> 221

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) FC-HC

&lt;400&gt; 225

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

&lt;210&gt; 226

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) LC varieeruv domeen

&lt;400&gt; 226

```

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp
                20                      25                      30

Tyr Ser Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
                35                      40                      45

Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
                50                      55                      60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                      70                      75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
                80                      85                      90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
                95                      100                     105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                110

```

&lt;210&gt; 227

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Humaniseeritud antikeha variandi (huMA79b.v32) HC varieeruv domeen

&lt;400&gt; 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

```

&lt;210&gt; 228

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ThioMAb-huMA79b.v17-HC(A118C) variandi HC

&lt;400&gt; 228

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	20	25	30	
Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	50	55	60	
Asn	Glu	Ile	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Val	Tyr	Phe	Asp	95	100	105	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	110	115	120	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	125	130	135	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	140	145	150	
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	155	160	165	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	170	175	180	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	185	190	195	
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	200	205	210	
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	215	220	225	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	230	235	240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	290	295	300	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	305	310	315	

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 320 325 330  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 335 340 345  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 350 355 360  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 365 370 375  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 380 385 390  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 395 400 405  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 410 415 420  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 425 430 435  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 440 445

&lt;210&gt; 229

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ThioMAb-huMA79b.v17-HC(A118C) variandi LC

&lt;400&gt; 229

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp  
 20 25 30  
 Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 35 40 45  
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 50 55 60  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 65 70 75  
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
 80 85 90  
 Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly  
 95 100 105  
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe  
 110 115 120  
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser



					125					130					135
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	
				140					145					150	
Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	
				155					160					165	
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				170					175					180	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
				185					190					195	
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	
				200					205					210	
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
				215											

&lt;210&gt; 230

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ThioMAb-huMA79b.v18-HC(A118C) variandi HC

&lt;400&gt; 230

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	
1				5					10					15	
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	
				20					25					30	
Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
				35					40					45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	
				50					55					60	
Asn	Glu	Ile	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	
				65					70					75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Arg	Leu	Asp	
				95					100					105	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	
				110					115					120	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	
				125					130					135	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
				140					145					150	
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
				155					160					165	

Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				170					175					180
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr
				185					190					195
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys
				200					205					210
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
				215					220					225
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
				230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265					270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
				275					280					285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
				290					295					300
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
				305					310					315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
				320					325					330
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				335					340					345
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
				350					355					360
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
				365					370					375
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
				380					385					390
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				395					400					405
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
				410					415					420
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
				425					430					435
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly				
				440					445					

&lt;210&gt; 231

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ThioMAb-huMA79b.v18-HC(A118C) variandi LC

&lt;400&gt; 231

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

&lt;210&gt; 232

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ThioMAb-huMA79b.v28-HC(A118C) variandi HC

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 233

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ThioMAb-huMA79b.v28-HC(A118C) variandi LC

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 234

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ThioMAb-chMA79b-LC(V205C) variandi HC

&lt;400&gt; 234

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

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

Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu  
 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr  
 50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser  
 65 70 75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
 80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp  
 95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 110 115 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 125 130 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 140 145 150

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

				155					160					165
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				170					175					180
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr
				185					190					195
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys
				200					205					210
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
				215					220					225
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
				230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265					270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
				275					280					285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
				290					295					300
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
				305					310					315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
				320					325					330
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				335					340					345
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
				350					355					360
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
				365					370					375
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
				380					385					390
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				395					400					405
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
				410					415					420
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
				425					430					435
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly				
				440					445					

&lt;210&gt; 235

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ThioMAb-chMA79b-LC(V205C) variandi LC

&lt;400&gt; 235

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

&lt;210&gt; 236

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ThioMAb-chMA79b-HC(A118C) variandi HC

&lt;400&gt; 236



Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser  
 20 25 30  
 Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr  
 50 55 60  
 Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser  
 65 70 75  
 Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
 80 85 90  
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp  
 95 100 105  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr  
 110 115 120  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 125 130 135  
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 140 145 150  
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 155 160 165  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
 170 175 180  
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 185 190 195  
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 200 205 210  
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 215 220 225  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

					305						310					315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala		
				320					325					330		
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu		
				335					340					345		
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
				350					355					360		
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser		
				365					370					375		
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn		
				380					385					390		
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe		
				395					400					405		
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly		
				410					415					420		
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His		
				425					430					435		
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly						
				440					445							

<210> 237

<211> 218

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> ThioMAb-chMA79b-HC(A118C) variandi LC

<400> 237

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu		
1				5					10					15		
Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp		
				20					25					30		
Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly		
				35					40					45		
Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Phe	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser		
				50					55					60		
Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe		
				65					70					75		
Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr		
				80					85					90		
Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly		
				95					100					105		
Thr	Glu	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe		
				110					115					120		

Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser
				125					130					135
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val
			140						145					150
Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu
			155						160					165
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
			170						175					180
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
			185						190					195
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
			200						205					210
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
				215										

<210> 238

<211> 893

<212> DNA

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 238

```

tcatggtgat ggtgatgatg accggtacgc gtagaatcga gaccgaggag 50
agggttaggg ataggcttac cttcgaaccg cgggccctct agactcgagc 100
ggccgcact gtgctggata tctgcagaat tgcccttggg gacagagcag 150
tgaccatggc caggctggcg ttgtctcctg tgtccagcca ctggctggtg 200
gcgttgctgc tgctgctctc agcagctgag ccagtgccag cagccaaatc 250
agaggacctg taccgaatc ccaaaggtag tgcttgttct cggatctggc 300
agagcccacg tttcatagcc aggaaacggg gcttcacggg gaaaatgcac 350
tgctacgtga ccaacagcac cttcagcatc gtgagctggc tccggaagcg 400
ggagacggac aaggagcccc aacaggtgaa cctggagcag ggccacatgc 450
atcagacca aacagctct gtcaccacc tcatcatcca agacatccgg 500
tttgaggaca acggcatcta cttctgtcag caggagtgca gcaagacctc 550
ggaggtctac cggggctgcg gcacggagct gcgagtcatg gggttcagca 600
ccttggcaca gctgaagcag aggaacacgc tgaaggatgg catcatcatg 650
atccagacgc tgctgatcat cctcttcac atcgtgccca tcttctgct 700
gctggacaag gatgacagca aggccggcat ggaggaagat cacacctacg 750
agggcctgga cattgaccag acggccacct acgaggacat agtgacgctg 800
cggacagggg aagtgaagtg gtctgtgggt gagcaccag gtcaggagtg 850
agagccagga cctccccacg gcctgggtgc aggtcccca gcc 893

```

<210> 239

<211> 231

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

&lt;400&gt; 239

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

&lt;210&gt; 240

&lt;211&gt; 800

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Kimäärse cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) LC

&lt;400&gt; 240

acctcggttc tatcgattga attccaccat gggatggtca tgtatcatcc 50  
 tttttctagt agcaactgca actggagtac attcagatat cgtgctgacc 100  
 caatctccac cctctttggc tgtgtctcta gggcagaggg ccaccatatac 150  
 ctgcagagcc agtgaaagtg ttgatagtta tggcaaaact tttatgcact 200  
 ggcaccagca gaaaccagga cagccaccca aactcctcat ctatcgtgta 250  
 tccaacctag aatctgggat ccctgccagg ttcagtggca gtgggtcaag 300  
 gacagacttc accctcacca ttaatcctgt ggaggctgat gatggtgcaa 350  
 cctattactg tcagcaaagt aatgaggatc cgttcacggt cggtggaggc 400  
 accaagctgg aatcaaacg gaccgtggct gcaccatctg tcttcatctt 450  
 cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc 500  
 tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat 550  
 aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag 600  
 caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag 650  
 actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 700  
 agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aagcttggcc 750  
 gccatggccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 800

<210> 241

<211> 218

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Kimäärse cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) LC

<400> 241

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Pro	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu
1				5					10					15
Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp
				20					25					30
Ser	Tyr	Gly	Lys	Thr	Phe	Met	His	Trp	His	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
				35					40					45
Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser
				50					55					60
Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe
				65					70					75

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr  
 80 85 90  
 Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly  
 95 100 105  
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe  
 110 115 120  
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser  
 125 130 135  
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val  
 140 145 150  
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu  
 155 160 165  
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 170 175 180  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
 185 190 195  
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr  
 200 205 210  
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 215

&lt;210&gt; 242

&lt;211&gt; 1500

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Kimäärse cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) LC

&lt;400&gt; 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 aagtcgaate tctatcactc 300  
 gagacacatc caagaaccag ttcttctctg agttgaattc tgtgacttct 350  
 gaggacacag ccacatatta ctgttcaaga atggacttct ggggtcaagg 400  
 caccactctc acagtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc 450  
 ccctggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggcctgggc 500  
 tgcttggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc 550

aggcgcctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct 600  
 caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ctgtgccctc tagcagcttg 650  
 ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa 700  
 ggtggacaag aaagttgagc ccaaactctg tgacaaaact cacacatgcc 750  
 caccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt cttcctcttc 800  
 cccccaaaac 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 gcctgggtaa aggettctat cccagcgaca 1200  
 tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1250  
 acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct 1300  
 caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgtctccg 1350  
 tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1400  
 tctccgggta aatgagtgcg acggccctag agtcgacctg cagaagcttg 1450  
 gccgcatgg cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa 1500

<210> 243

<211> 441

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Kimäärse cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) LC

<400> 243

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	1	5	10	15
Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	20	25	30	
Ser	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	35	40	45	
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Asn	Ile	Trp	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	50	55	60	
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	65	70	75	

Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ser	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Met	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
				95					100					105
Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
				110					115					120
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
				125					130					135
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
				140					145					150
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
				155					160					165
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
				170					175					180
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys
				185					190					195
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
				200					205					210
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
				215					220					225
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
				230					235					240
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				245					250					255
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
				260					265					270
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
				275					280					285
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
				290					295					300
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				305					310					315
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				320					325					330
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				335					340					345
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
				350					355					360
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				365					370					375





		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					

&lt;210&gt; 245

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-MAb-cyno-CD79b-vastase (ch10D10)-HC(A118C) antikeha variandi LC

&lt;400&gt; 245

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

&lt;210&gt; 246

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Albumiini siduv peptiid

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 247

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Albumiini siduv peptiid

&lt;400&gt; 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										

&lt;210&gt; 248

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Albumiini siduv peptiid

&lt;400&gt; 248

Gln	Arg	Leu	Ile	Glu	Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu
1				5					10					15
Trp	Glu	Asp	Asp	Phe										
				20										

&lt;210&gt; 249

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Albumiini siduv peptiid

&lt;400&gt; 249

Arg	Leu	Ile	Glu	Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu	Trp
1				5					10					15
Glu	Asp	Asp												

&lt;210&gt; 250

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Albumiini siduv peptiid

&lt;400&gt; 250

Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu	Trp	
				5					10		

&lt;210&gt; 251

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

<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> Kunstlik järjestus

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Thio-huMA79b HC variant

<400> 253

Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val  
5 10

<210> 254

<211> 11

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<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> Kunstlik järjestus

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Thio-huMA79b HC variant

<400> 256

Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val  
5 10

<210> 257

<211> 11

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<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> Kunstlik järjestus

<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> Kunstlik järjestus

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Thio-chMA79b HC variant



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b HC variant

&lt;400&gt; 265

Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Cys	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
				5					10	

&lt;210&gt; 266

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b HC variant

&lt;400&gt; 266

Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Cys	Glu	Val	His	Asn	Ala
				5					10	

&lt;210&gt; 267

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b HC variant

&lt;400&gt; 267

Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Cys	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				5					10	

&lt;210&gt; 268

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b HC variant

&lt;400&gt; 268

Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Cys	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				5					10	

&lt;210&gt; 269

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b(ch10D10)-vastase antikeha HC variant

&lt;400&gt; 269

Glu	Val	Gln	Leu	Cys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly
				5					10



<210> 270

<211> 11

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Thio-cyno-CD79b(ch10D10)-vastase antikeha HC variant

<400> 270

Leu Ser Leu Thr Cys Cys Val Thr Gly Tyr Ser  
5 10

<210> 271

<211> 11

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Thio-cyno-CD79b(ch10D10)-vastase antikeha HC variant

<400> 271

Leu Asn Ser Val Thr Cys Glu Asp Thr Ala Thr  
5 10

<210> 272

<211> 11

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Thio-cyno-CD79b(ch10D10)-vastase antikeha HC variant

<400> 272

Thr Thr Leu Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys  
5 10

<210> 273

<211> 11

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Thio-cyno-CD79b(ch10D10)-vastase antikeha HC variant

<400> 273

Leu Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro  
5 10

<210> 274

<211> 11

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Thio-cyno-CD79b(ch10D10)-vastase antikeha HC variant

&lt;400&gt; 274

Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Cys	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
				5					10	

&lt;210&gt; 275

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b(ch10D10)-vastase antikeha HC variant

&lt;400&gt; 275

Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Cys	Glu	Val	His	Asn	Ala
				5					10	

&lt;210&gt; 276

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b(ch10D10)-vastase antikeha HC variant

&lt;400&gt; 276

Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Cys	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				5					10	

&lt;210&gt; 277

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b(ch10D10)-vastase antikeha HC variant

&lt;400&gt; 277

Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Cys	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				5					10	

&lt;210&gt; 278

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-huMA79b LC variant

&lt;400&gt; 278

Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Cys	Gly	Asp	Arg	Val	Thr
				5					10	

&lt;210&gt; 279

&lt;211&gt; 11

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<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> Kunstlik järjestus

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Thio-huMA79b LC variant

<400> 281

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys  
5 10

<210> 282

<211> 11

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<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> Kunstlik järjestus

<220>

<223> Thio-huMA79b LC variant

&lt;400&gt; 283

Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
				5					10	

&lt;210&gt; 284

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-huMA79b LC variant

&lt;400&gt; 284

Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				5					10	

&lt;210&gt; 285

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b LC variant

&lt;400&gt; 285

Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Cys	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr
				5					10	

&lt;210&gt; 286

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b LC variant

&lt;400&gt; 286

Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Cys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
				5					10	

&lt;210&gt; 287

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b LC variant

&lt;400&gt; 287

Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Cys	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
				5					10	

&lt;210&gt; 288

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b LC variant

&lt;400&gt; 288

Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Cys	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys
				5						10

&lt;210&gt; 289

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b LC variant

&lt;400&gt; 289

Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Cys	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
				5						10

&lt;210&gt; 290

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b LC variant

&lt;400&gt; 290

Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
				5						10

&lt;210&gt; 291

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-chMA79b LC variant

&lt;400&gt; 291

Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				5						10

&lt;210&gt; 292

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) HC variant

&lt;400&gt; 292

445

Ser Leu Ala Val Ser Cys Gly Gln Arg Ala Thr  
 5 10

&lt;210&gt; 293

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) HC variant

&lt;400&gt; 293

Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val  
 5 10

&lt;210&gt; 294

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) HC variant

&lt;400&gt; 294

Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro  
 5 10

&lt;210&gt; 295

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) HC variant

&lt;400&gt; 295

Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys  
 5 10

&lt;210&gt; 296

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) HC variant

&lt;400&gt; 296

Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val  
 5 10

&lt;210&gt; 297

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) HC variant

&lt;400&gt; 297

Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Cys	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr
				5					10	

&lt;210&gt; 298

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) HC variant

&lt;400&gt; 298

Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
				5					10	

&lt;210&gt; 299

&lt;211&gt; 441

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b-LC(V205C)-vastase antikeha variandi HC

&lt;400&gt; 299

Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
1				5					10					15
Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr
				20					25					30
Ser	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys
				35					40					45
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Asn	Ile	Trp	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr
				50					55					60
Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Gln	Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ser	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Met	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
				95					100					105
Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
				110					115					120
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
				125					130					135
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
				140					145					150

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 155 160 165  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 170 175 180  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys  
 185 190 195  
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val  
 200 205 210  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 215 220 225  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 230 235 240  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 245 250 255  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 260 265 270  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 320 325 330  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 335 340 345  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 350 355 360  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 365 370 375  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 380 385 390  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 395 400 405  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 410 415 420  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 425 430 435  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 440

&lt;210&gt; 300

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Thio-cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) LC(V205C) variandi LC



&lt;400&gt; 300

```

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

```

&lt;210&gt; 301

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) HC varieeruv domeen

&lt;400&gt; 301

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr  
 20 25 30  
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys  
 35 40 45  
 Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Trp Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr  
 50 55 60  
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp  
 80 85 90  
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Arg Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 95 100 105  
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 110

&lt;210&gt; 302

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cyno-CD79b-vastase antikeha (ch10D10) LC varieeruv domeen

&lt;400&gt; 302

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Val Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp  
 20 25 30  
 Ser Tyr Gly Lys Thr Phe Met His Trp His Gln Gln Lys Pro Gly  
 35 40 45  
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Glu Ser  
 50 55 60  
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe  
 65 70 75  
 Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr  
 80 85 90  
 Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly  
 95 100 105  
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 110

&lt;210&gt; 303

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79bv.17 kerge ahel

&lt;400&gt; 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

```

&lt;210&gt; 304

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79bv.17 raske ahel

&lt;400&gt; 304

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser  
 20 25 30  
 Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45  
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr  
 50 55 60  
 Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser  
 65 70 75  
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp  
 95 100 105  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 110 115 120  
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 125 130 135  
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 140 145 150  
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 155 160 165  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
 170 175 180  
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 185 190 195  
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 200 205 210  
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 215 220 225  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

					305						310					315
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala		
				320					325					330		
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu		
				335					340					345		
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
				350					355					360		
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser		
				365					370					375		
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn		
				380					385					390		
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe		
				395					400					405		
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly		
				410					415					420		
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His		
				425					430					435		
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly						
				440					445							

<210> 305

<211> 218

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> huMA79bv.18 kerge ahel

<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

&lt;210&gt; 306

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79bv.18 raske ahel

&lt;400&gt; 306

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser  
 20 25 30

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr  
 50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser  
 65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp  
 95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 110 115 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr  
 125 130 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 140 145 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 155 160 165  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
 170 175 180  
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 185 190 195  
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 200 205 210  
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 215 220 225  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 320 325 330  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 335 340 345  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 350 355 360  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 365 370 375  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 380 385 390  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 395 400 405  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 410 415 420  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 425 430 435  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 440 445

&lt;210&gt; 307

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79bv.28 kerge ahel

&lt;400&gt; 307

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

&lt;210&gt; 308

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; huMA79bv.28 raske ahel

&lt;400&gt; 308



Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	20	25	30	
Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	50	55	60	
Asn	Glu	Ile	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	65	70	75	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Arg	Leu	Asp	95	100	105	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	110	115	120	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	125	130	135	
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	140	145	150	
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	155	160	165	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	170	175	180	
Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	185	190	195	
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	200	205	210	
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	215	220	225	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	230	235	240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	245	250	255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	290	295	300	

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 320 325 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 335 340 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 350 355 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 365 370 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 380 385 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 395 400 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 410 415 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 440 445

<210> 309

<211> 218

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> huMA79bv.32 kerge ahel

<400> 309

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp  
 20 25 30

Tyr Ser Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 35 40 45

Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 50 55 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
 80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly  
 95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe

					110						115					120
Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser		
				125					130					135		
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val		
				140					145					150		
Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu		
				155					160					165		
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser		
				170					175					180		
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val		
				185					190					195		
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr		
				200					205					210		
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
				215												

<210> 310

<211> 446

<212> PRT

<213> Kunstlik järjestus

<220>

<223> huMA79bv.32 raske ahel

<400> 310

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
1				5					10					15		
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser		
				20					25					30		
Ser	Tyr	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		
				35					40					45		
Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr		
				50					55					60		
Asn	Glu	Ile	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser		
				65					70					75		
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp		
				80					85					90		
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Arg	Val	Pro	Ile	Arg	Leu	Asp		
				95					100					105		
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr		
				110					115					120		
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr		
				125					130					135		
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe		
				140					145					150		

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 155 160 165  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
 170 175 180  
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 185 190 195  
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
 200 205 210  
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 215 220 225  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 290 295 300  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305 310 315  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 320 325 330  
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 335 340 345  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 350 355 360  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 365 370 375  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 380 385 390  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 395 400 405  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly  
 410 415 420  
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 425 430 435  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 440 445

**PATENDINÕUDLUS**

1. CD79b-vastane antikeha, mis sisaldab järgnevaid HVR järjestusi:

- (i) HVR-L1, mis sisaldab järjestust A1-A15, kus A1-A15 on KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID NO: 194)
- (ii) HVR-L2, mis sisaldab järjestust B1-B7, kus B1-B7 on AASNLES (SEQ ID NO: 195)
- (iii) HVR-L3, mis sisaldab järjestust C1-C9, kus C1-C9 on QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 196)
- (iv) HVR-H1, mis sisaldab järjestust D1-D10, kus D1-D10 on GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 202)
- (v) HVR-H2, mis sisaldab järjestust E1-E18, kus E1-E18 on GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 203)
- (vi) HVR-H3, mis sisaldab järjestust F1-F10, kus F1-F10 on TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 204);

kusjuures antikeha seondub sama epitoobiga kui monokloonne antikeha, mis sisaldab varieeruvaid domeene järjestustega SEQ ID NO: 10 ja SEQ ID NO: 14, antikeha, mis sisaldab varieeruvaid domeene järjestustega SEQ ID NO: 207 ja SEQ ID NO: 208, või antikeha, mis sisaldab kergelt ahelat järjestusega SEQ ID NO: 307 ja rasket ahelat järjestusega SEQ ID NO: 308.

2. Antikeha vastavalt nõudluspunktile 1, mis seondub CD79b piirkonnas järjestuse SEQ ID NO: 2 aminohapetest 29–39 moodustunud epitoobi või järjestuse SEQ ID NO: 16 aminohapetest 1–11 moodustunud epitoobiga.

3. Antikeha vastavalt nõudluspunktile 1, mis on (i) monokloonne antikeha, (ii) antikeha-fragment, mis on valitud Fab, Fab'-SH, Fv või (Fab')<sub>2</sub> fragmendi hulgast, ja/või (iii) kimäärne või humaniseeritud antikeha, valikuliselt monovalentne või bivalentne antikeha, mis sisaldab valikuliselt ühte Fab piirkonda, mis on seotud Fc piirkonnaga.

4. Humaniseeritud antikeha vastavalt nõudluspunktile 3(iii), kus bivalentses vormis antikeha afiinsus inimese CD79b suhtes on praktiliselt sama või vähemalt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10 korda suurem kui bivalentses vormis närilise või kimäärse antikeha, mis sisaldab joonistel 7A-B (SEQ ID NO: 10) ja joonistel 8A-B (SEQ ID NO: 14) kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvaid järjestusi, afiinsus, kusjuures sidumisafiinsus on vajadusel väljendatud Kd väärtusena ja sidumisafiinsus on vajadusel mõõdetud Biacore või radioimmunotesti abil.

5. Humaniseeritud antikeha vastavalt nõudluspunktile 3(iii) või nõudluspunktile 4, mis sisaldab inimese kerge ahela kapa alarühma I raamistiku konsensusjärjestust ja/või inimese raske ahela alarühma III raamistiku konsensusjärjestust.

6. Antikeha vastavalt nõudluspunktile 5, kus

- (i) raske ahela raamistikujärjestus sisaldab asendust asendites 48, 67, 69, 71, 73 ja/või 78, vajadusel V481, F67A, I69F, R71A, N73T ja/või L78A, ja/või
- (ii) kerge ahela raamistikujärjestus sisaldab asendust asendis 4 ja/või asendis 47, vajadusel M4L ja/või L47F, ja/või
- (iii) kerge ahela raamistikujärjestus sisaldab ühte või mitut järgnevatest: FR1-LC järjestusega SEQ ID NO: 190, FR2-LC järjestusega SEQ ID NO: 191, FR3-LC järjestusega SEQ ID NO: 193 ja FR4-LC järjestusega SEQ ID NO: 194, ja/või raske ahela raamistikujärjestus sisaldab ühte või mitut järgnevatest: FR1-HC järjestusega SEQ ID NO: 198, FR2-HC järjestusega SEQ ID NO: 199, FR3-HC järjestusega SEQ ID NO: 200 ja FR4-HC järjestusega SEQ ID NO: 201, ja/või
- (iv) antikeha sisaldab täiendavalt järjestustega SEQ ID NO: 197, 205 ja/või 206 näidatud CL1, CH1 ja /või Fc järjestusi, ja/või
- (v) antikeha sisaldab (a) järjestusega SEQ ID NO: 307 näidatud kerge ahela järjestust ja (b) järjestusega SEQ ID NO: 308 näidatud raske ahela järjestust.

7. Antikeha vastavalt ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 6, mis valmistatakse järgneva meetodi abil:

- (a) rakkude kasvatamine, mis ekspresseerivad antikeha, mis sisaldab ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 6 vastavat raske ahela varieeruvat domeeni ja ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 6 vastavat kerge ahela varieeruvat domeeni, ja
- (b) antikeha eraldamine nimetatud rakukultuurist.

8. Ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 7 vastava antikeha valmistamismeetod, kus meetod hõlmab (a) peremeesrakkude kasvatamist, mis on valitud rühmast, millesse kuuluvad eukarüootsed rakud ja CHO rakud, antikeha kodeeriva polünukleotiidi ekspresseerimiseks sobivates tingimustes, ja (b) antikeha eraldamist.

9. Polüpeptiid, mis sisaldab nõudluspunktile 6(v)(a) või nõudluspunktile 6(v)(b) vastavat järjestust.

10. Immunokonjugaat, mis sisaldab ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 7 vastavat antikeha, mis on kovalentselt seotud

- (i) tsütotoksilise aine, valikuliselt kemoterapeutilise aine, ravimi-osamolekuli, antibiootikumi, radioaktiivse isotoobi või nukleolüütilise ensüümiga, või
- (ii) püüdurmärgise, valikuliselt biotiinpüüdurmärgisega, või
- (iii) detekteerimismärgise, valikuliselt fluorestseeruva värvi detekteerimismärgisega, nagu fluorestseiini tüüpi, rodamiini tüüpi, dansüül-, lissamiin-, tsüaniin-fükoerütriinmärgis, värvaine Texas Red ja selle analoog, või radionukliid-detekteerimismärgisega, mis on valitud  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ , etc,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$  ja  $^{213}\text{Bi}$  hulgast, kusjuures antikeha on vajadusel ühendatud detekteerimismärgisega kelaativa ligandi, valikuliselt DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA või TETA kaudu.

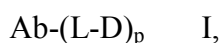
11. Immunokonjugaat vastavalt nõudluspunktile 10, milles immunokonjugaadi valem on  $\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$ , kus

- (a) Ab on ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 7 vastav antikeha,
- (b) L on linker ja

(c) D on ravimi-osamolekul,

kusjuures L on valikuliselt 6-maleimidokaproüül(rühm) (MC), maleimidopropanoüül(rühm) (MP), valiin-tsitrulliin (val-cit),alaniin-fenüülalaniin (ala-phe), *p*-aminobensüüloksükarbo-  
nüül(rühm) (PAB), N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüültio)pentanoaat (SPP), N-suktsiinimidüül-  
4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat (SMCC) või N-suktsiinimidüül-(4-jo-  
doatsetüül)aminobensoaat (SIAB), ja/või D on auristatiin või dolostatiin.

12. Immunokonjugaat vastavalt nõudluspunktile 10, mis sisaldab auristatiin- või maitansi-  
noidravimi-osamolekuli (D), kus antikeha on D-ga ühendatud linkerosamolekuli (L) kaudu;  
ühend on valemiga I



kus p on valikuliselt 1 kuni 8,

(i) L on valemiga



kus

A on pikendusüksus,

a on 0 või 1,

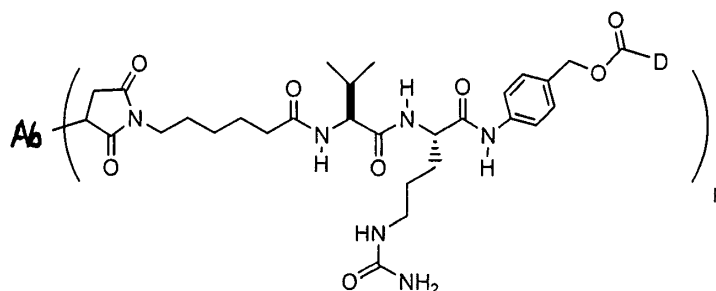
iga W on sõltumatult aminohappeüksus,

w on täisarv 0 kuni 12,

Y on speisserüksus, mis on kovalentselt seotud ravimi-osamolekuliga, ja

y on 0, 1 või 2.

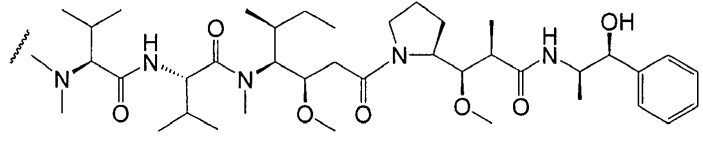
(ii) immunokonjugaadi valem on





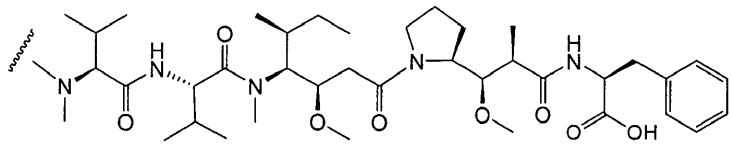
(iii) L on SMCC, SPP või SPDB,

(iv) D on MMAE, mille struktuur on



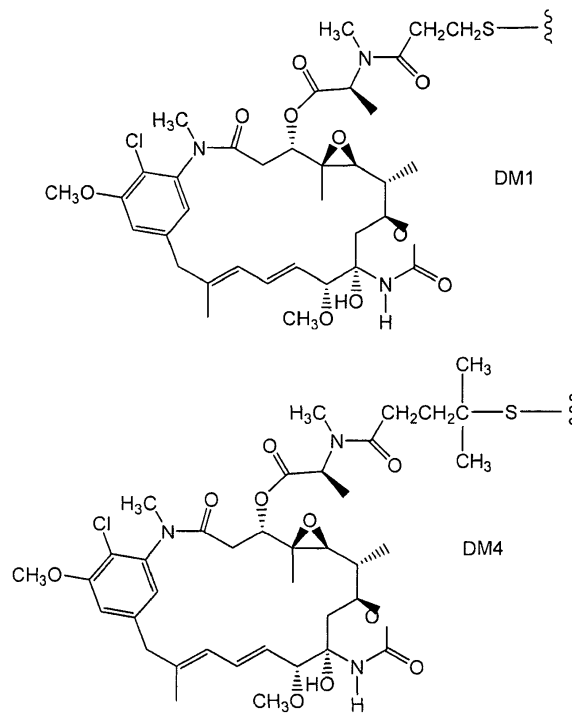
kus laineline joon näitab ühenduskohta linkeriga L,

(v) D on MMAF, mille struktuur on



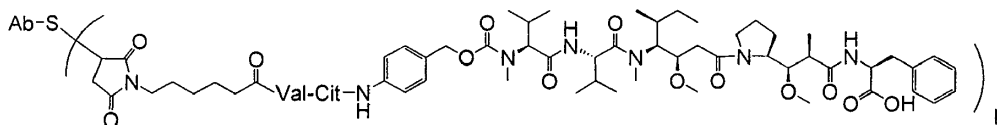
kus laineline joon näitab ühenduskohta linkeriga L,

(vi) D on DM1 või DM4, mille struktuurid on

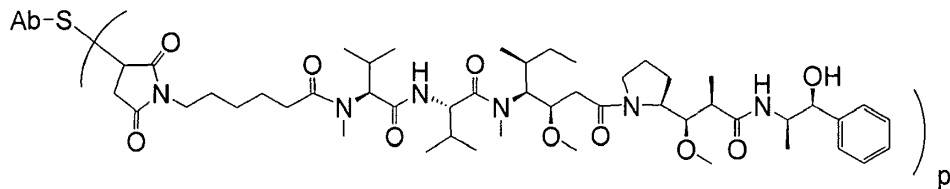
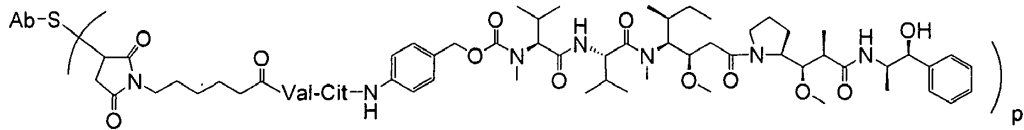


kus laineline joon näitab ühenduskohta linkeriga L,

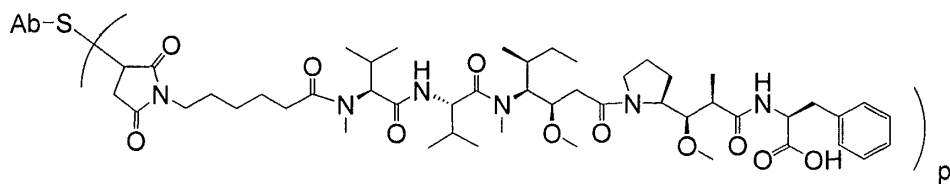
(vii) immunokonjugaat-ühend, mis on valitud järgmiste struktuuride hulgast:



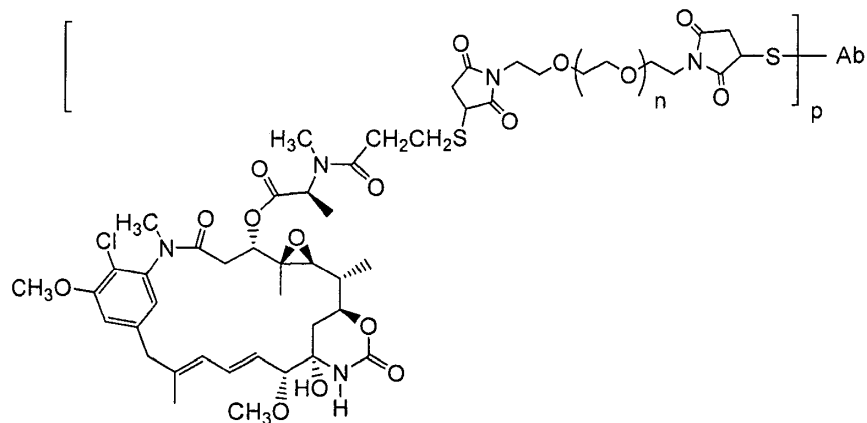
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DMI,

kus Val on valiin ja Cit on tsitrulliin, ja/või  
(viii) L on MC-val-cit-PAB või MC.

13. Farmatseutiline kompositsioon, mis sisaldab ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 7 vastavat antikeha või ükskõik missugusele nõudluspunktidest 10 kuni 12 vastavat immunokonjugaati ja farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat, vajadusel kombinatsioonis tsütotoksilise ainega.

14. Ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 7 vastav antikeha kasutamiseks medikamendina.

15. Ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 7 vastav antikeha või ükskõik missugusele nõudluspunktidest 10 kuni 12 vastav immunokonjugaat kasutamiseks proliferatiivse häire ravimiseks, vajadusel kombinatsioonis tsütotoksilise ainega.

16. Nõudluspunktile 14 vastav antikeha kasutamiseks vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures nimetatud proliferatiivne häire on vähk, valikuliselt lümfoom, mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), agressiivne NHL, relapseeruv agressiivne NHL, relapseeruv indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsütaarne leukeemia (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoom, leukeemia, karvrakk-leukeemia (HCL), äge lümfotsütaarne leukeemia (ALL) ja mantelrakkude lümfoom.

17. Ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 7 vastav antikeha või ükskõik missugusele nõudluspunktidest 10 kuni 12 vastav immunokonjugaat kasutamiseks CD79b ekspresseeriva raku kasvu inhibeerimiseks, kusjuures nimetatud rakk on kasvajak.

18. CD79b valgu olemasolu määramise meetod proovis, milles kahtlustatakse nimetatud valgu olemasolu, nimetatud meetod hõlmab nimetatud proovi eksponeerimist ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 7 vastavale antikehale või ükskõik missugusele nõudluspunktidest 10 kuni 12 vastavale immunokonjugaadile ja nimetatud proovis nimetatud antikeha või immunokonjugaadi nimetatud CD79b-ga seondumise määramist, kusjuures antikeha seondumine nimetatud valguga näitab nimetatud valgu olemasolu nimetatud proovis, seejuures pärineb proov valikuliselt patsiendilt, kellel kahtlustatakse B-rakkude proliferatsioonihäiret, valikuliselt lümfoomi, mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL), agressiivset NHL, relapseeruvat agressiivset NHL, relapseeruvat indolentset NHL, refraktoorseid NHL, refraktoorseid indolentset NHL, kroonilist lümfotsütaarset leukeemiat (CLL), väikeste lümfotsüütide lümfoomi, leukeemiat, karvrakk-leukeemiat (HCL), ägedat lümfotsütaarset leukeemiat (ALL) ja mantelrakkude lümfoomi.

19. CD79b ekspresseeriva raku kasvu *in vitro* inhibeerimise meetod, nimetatud meetod hõlmab nimetatud raku kokkupuutesse viimist ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni

7 vastava antikeha või ükskõik missugusele nõudluspunktidest 10 kuni 12 vastava immuno-konjugaadiga, kusjuures nimetatud rakk on valikuliselt B-rakk ja/või kasvajarakk.

20. B-rakkude detekteerimise test, mis hõlmab

- (a) rakkude eksponeerimist ükskõik missugusele nõudluspunktidest 1 kuni 7 vastavale antikehale või ükskõik missugusele nõudluspunktidest 10 kuni 12 vastavale immuno-konjugaadile, ja
- (b) antikeha või immunokonjugaat-ühendi rakkudega seondumise ulatuse määramist.

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCCCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG  
TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT  
GCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC  
CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTTCGCGGATCTGGCAGAG  
CCCACGTTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG  
CGCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCAGCAGCT  
GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT  
CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTGTCAGCAGAAGTGCAACAACAC  
CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC  
ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT  
CATCCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG  
CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA  
CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA  
GTGAGAGCCAGGTGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTACTGCTTCG  
GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTTCCTGGACCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG  
GCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG  
GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA  
GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCAGAGAC  
TGGTCCAGAGCCCGCAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG  
CCATGGACCCAACCTGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCTCTCCCGCAACCAC  
TCCCACCCCAGGGAGGCCCTGGCCTCCAGTGCCTTCCCCCGTGAATAAACGGTGTGTCC  
TGAGAAACCA

**FIG. 1**

**DNA225786**

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT  
VKMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQOLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY  
FCQQKCNNTSEVYQCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGI IMIQTLIILFIIVPIFLL  
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

**Signaaljärjestus**

aminohapped 1-28.

**Transmembraanne domeen**

aminohapped 5-25, 159-179.

**Immunoglobuliinidomeen**

aminohapped 58-124.

**Immunoretseptori türosiinipõhine aktivatsioonimotiiv**

aminohapped 193-213.

**N-glükosüülimissait**

aminohapped 73-76, 101-104, 127-130, 128-131.

**Proteiinkinaasi C fosforülimissait**

aminohapped 49-51, 60-62, 156-158, 212-214.

**Kaseiinkinaasi II fosforülimissait**

aminohapped 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.

**Türosiinkinaasi fosforülimissait**

aminohapped 113-120.

**N-müristoüülimissait**

aminohapped 40-45, 118-123.

**FIG. 2**

**Inimese CD79b-vastase kimäärise antikeha (chMA79b) kerge ahel**

CACTCCCAGCTCCAACCTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGT  
 ATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGATATCGTGCTGACCCAATC  
 TCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAA  
 GTGTTGATTATGATGGTGATAGTTTTTTGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCC  
 AAACCTTTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAG  
 TGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT  
 ATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGCTCACGTTCCGGGGCAGGCACCGAGCTGGAACCTC  
 AAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC  
 TGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT  
 GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC  
 AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA  
 CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA  
 ACAGGGGAGAGTGTTAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGT  
 TACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAG  
 TTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGGGAATTAATTCGGC

**FIG. 3****Inimese CD79b-vastase kimäärise antikeha CD79b (chMA79b) kerge ahel**

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSFLNWFYQQKPGQPPKLFITYAASNLES  
 GIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVE  
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALOSGNSQESVTEODSKDSTYLS  
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC

**FIG. 4**

**Inimese CD79b-vastase kimäärise antikeha CD79b (chMA79b) raske ahel**

TCGGTCTATCGATTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAA  
 CTGCAACTGGAGTACATTCAGAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGATGAAGCCT  
 GGGGCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTAGTACTGGATAGA  
 GTGGGTAAAGCAGAGGCCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAGGTG  
 GTGATACTAACTACAATGAGATTTTCAAGGGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCC  
 AACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTAC  
 AAGACGAGTACCGGTTTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG  
 CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC  
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAA  
 CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCT  
 ACTCCCTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
 AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA  
 CAAAACCTCACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC  
 TCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG  
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA  
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA  
 GCGTCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC  
 AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA  
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGA  
 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG  
 CCGGAGAACAATAACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA  
 CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA  
 TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATTGA  
 GTGCGACGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCAT

**FIG. 5****Inimese CD79b-vastase kimäärise antikeha CD79b (chMA79b) raske ahel**

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNY  
NEIFK GKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRVPVYFDYWGQGTSVTVSSAST  
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPVAVLOSSGLY  
SLSSVTVFPSSSLGTOTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV  
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPOVYTLPPSREEMTK  
NOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMEALHNHYTOKLSLSLSPG

**FIG. 6**



VL järjestused

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15									
huki	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	
MA79b	D	I	Q	V	L	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	R	A	T	S	C
huMA79b.graft	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	
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	
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	
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	
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	

Kabat - CDR L1	1	2	3	4	5	6	7	8		
Kabat - CDR L1	R	A	S	Q	S	V	D	Y		
Chothia - CDR L1	K	A	S	Q	S	V	D	Y		
kontakt-CDR L1	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q
	D	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
	D	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
	D	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
	D	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
	E	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q
	S	G	D	S	F	L	N	W	Y	Q

Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
huki	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	L	I	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		
huMA79b.graft	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	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	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	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	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		
huMA79b.v32	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	N	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		

Kabat - CDR L2	1	2	3	4	5	6	7															
Kabat - CDR L2	Y	A	A	S	S	L	E	S														
Chothia - CDR L2	Y	A	A	S	N	L	E	S														
kontakt-CDR L2	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P

FIG. 7A

VL-järjestused

Kabat# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

Kabat - CDR L3  
 Chothia - CDR L3  
 kontakt-CDR L3

huki	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	L	F	G	A	G	T	E	L	E	L	K	R	SEQ ID NO: 10
huMA79b.graft	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	E	D	P	L	L	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	L	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	L	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	L	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	L	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

VH järjestused

<b>Kabat#</b>	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
<b>humIII</b>	E	V	Q	L	V	E	S	G	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		
<b>MA79b</b>	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	L	K	Q	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	T	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	P	W	V	R	Q	R	P		
<b>huMA79b.graft</b>	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	P	W	V	R	Q	A	P		
<b>huMA79b.v17</b>	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	P	W	V	R	Q	A	P		
<b>huMA79b.v18</b>	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	P	W	V	R	Q	A	P		
<b>huMA79b.v28</b>	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	P	W	V	R	Q	A	P		
<b>huMA79b.v32</b>	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	S	S	Y	W	I	P	W	V	R	Q	A	P		

D1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

<b>Kabat#</b>	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		
<b>humIII</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
<b>MA79b</b>	G	H	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
<b>huMA79b.graft</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
<b>huMA79b.v17</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<b>huMA79b.v18</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<b>huMA79b.v28</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<b>huMA79b.v32</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P



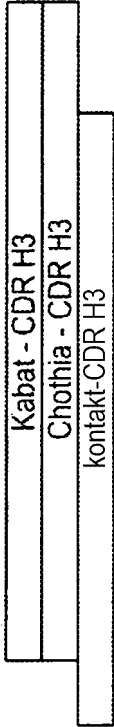
<b>humIII</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
<b>MA79b</b>	G	H	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<b>huMA79b.graft</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<b>huMA79b.v17</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<b>huMA79b.v18</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<b>huMA79b.v28</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<b>huMA79b.v32</b>	G	K	G	L	E	W	V	I	S	G	L	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	

E1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

FIG. 8A

VH järjestused

**Kabat#** 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K 101 102 103 104



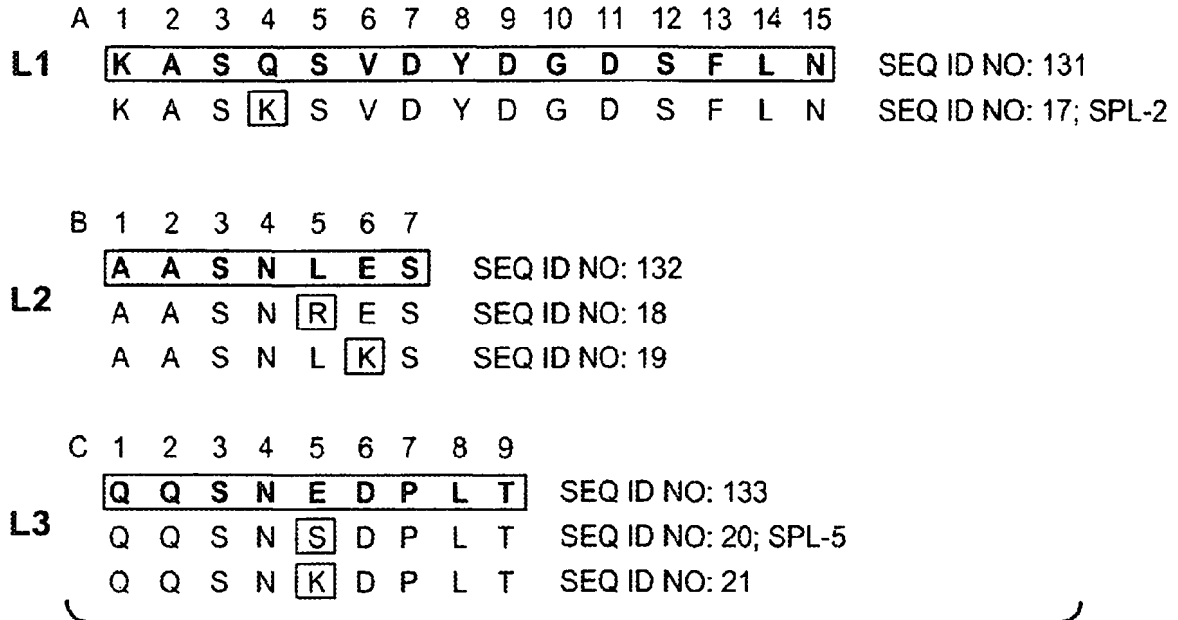
humIII	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G
<b>MA79b</b>	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	R	F	D	Y	W	G
huMA79b.graft	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	F	D	Y	W	G
huMA79b.v17	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	F	D	Y	W	G
huMA79b.v18	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	R	F	D	Y	W	G
huMA79b.v28	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	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	L	D	Y	W	G

F1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

**Kabat#** 105 106 107 108 109 110 111 112 113

humIII	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>MA79b</b>	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
huMA79b.graft	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
huMA79b.v17	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
huMA79b.v18	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
huMA79b.v28	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
huMA79b.v32	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

FIG. 8B



**FIG. 9**

MA79b IgG variant	Biacore KD (nM)		Immobiliseeritud antigeen
	Fab	IgG	
MA79b	200	2	hu CD79b.ecd-Fc
		4.7	hu CD79b.ecd
hu MA79b graft		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 peptiid

**FIG. 11**



huMA79 FW IgG variant	Hiire olemasolevad raamistikujärgid										Stabiilsuse muutus kerges ahelas				CDR-H3 järjestused	Kd <sub>variant</sub> / Kd <sub>chimera</sub>
	VL	VH									28 29 94 95					
huMA79 siiriku kõik raamistikujärjestused	4	47	48	67	69	71	73	75	78	80					wt	56
1			48			71	73		78						wt	1
2	47					71	73		78						wt	9,4
3			67	69	71	73	75	78	80						wt	18
4				69	71	73	75	78	80						wt	5,5
5			48	67	69	71	73	75	78	80					wt	12
6			48	67		71	73		78						wt	3,5
7			48		69	71	73		78						wt	7,6
8			48	67	69	71	73		78						wt	3,5
9			48	67	69	71	73		78	80					wt	1,7
10			48	67	69	71	73	75	78						wt	1,8
11			48	67	69	71	73	75	78	80					wt	NA
12			48	67	69	71	73		78						H3-10	0,6
13		47	48		69	71	73		78						H3-10	0,5
14	4		48		69	71	73		78						wt	1,8
15	4	47	48		69	71	73		78						wt	1,1
16	4		48	67		71	73		78						wt	0,8
17	4		48	67	69	71	73		78						wt	1,6
18	4		48	67	69	71	73		78						wt	1,0
19	4		48	67	69	71	73		78						H3-10	0,4
20	4		48	67	69	71	73		78		S		E		H3-10	NDB
21	4		48	67	69	71	73		78		S		E		H3-10	NDB
22	4		48	67	69	71	73		78		S		E		H3-10	NDB
23	4	47	48	67	69	71	73		78		S		E		H3-10	NDB
24	4	47	48	67	69	71	73		78		S		E		H3-10	25
25	4	47	48	67	69	71	73		78		S		E		H3-10	NDB
26	4	47	48	67	69	71	73		78		S		E		H3-10	NDB
27	4	47	48	67	69	71	73		78		S		E		H3-10	NDB
28	4		48	67	69	71	73		78		E				H3-10	0,8
29			48	67	69	71	73		78					N	H3-10	väga nõrk
30	4	47	48	67	69	71	73		78					A	H3-10	1,3
31	4	47	48	67	69	71	73		78					S	H3-10	1,0
32	4	47	48	67	69	71	73		78		S				H3-10	1,6
33	4	47	48	67	69	71	73		78					A	H3-10	väga nõrk
34	4	47	48	67	69	71	73		78					E	H3-10	NDB

FIG. 12

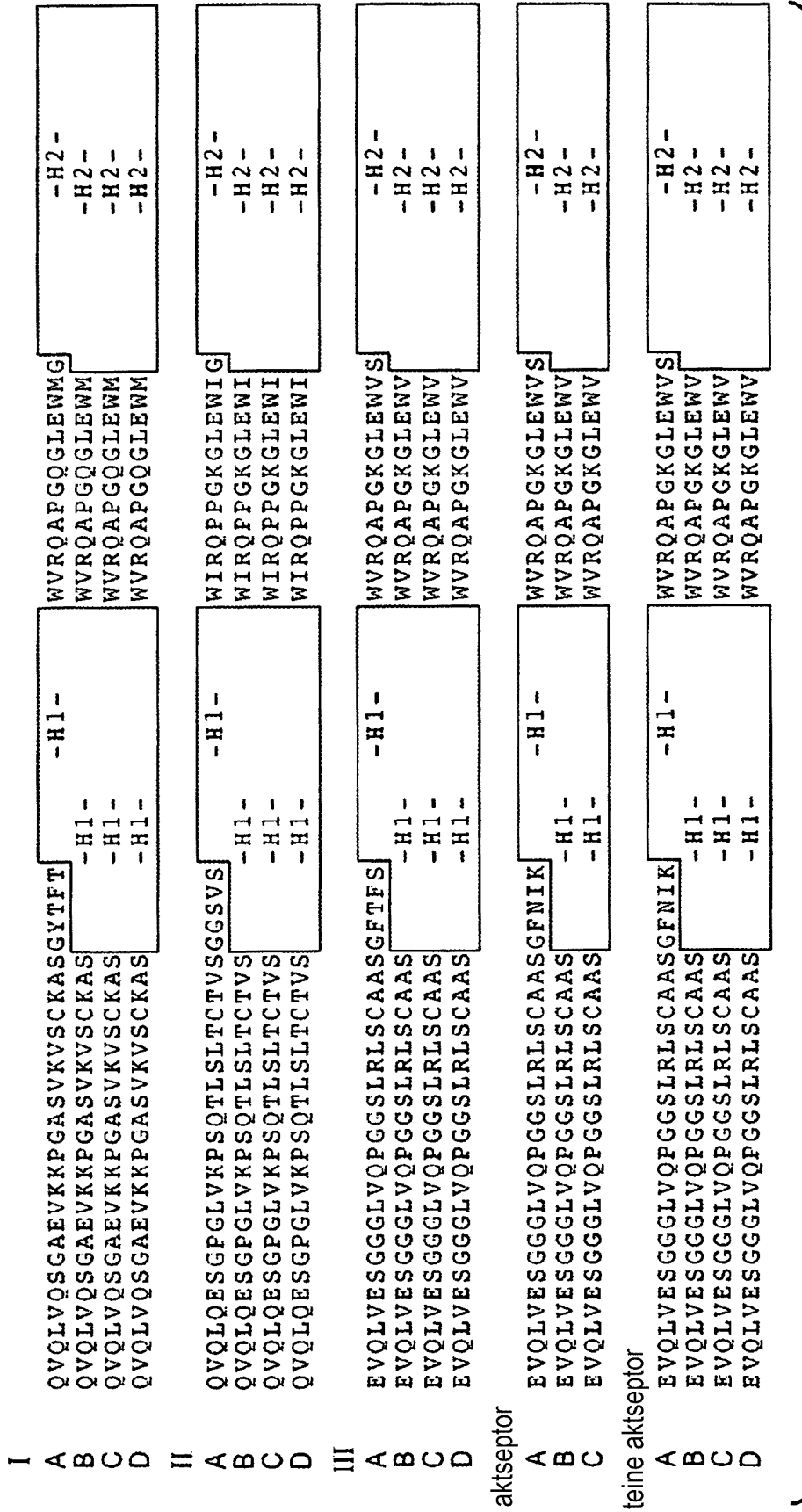
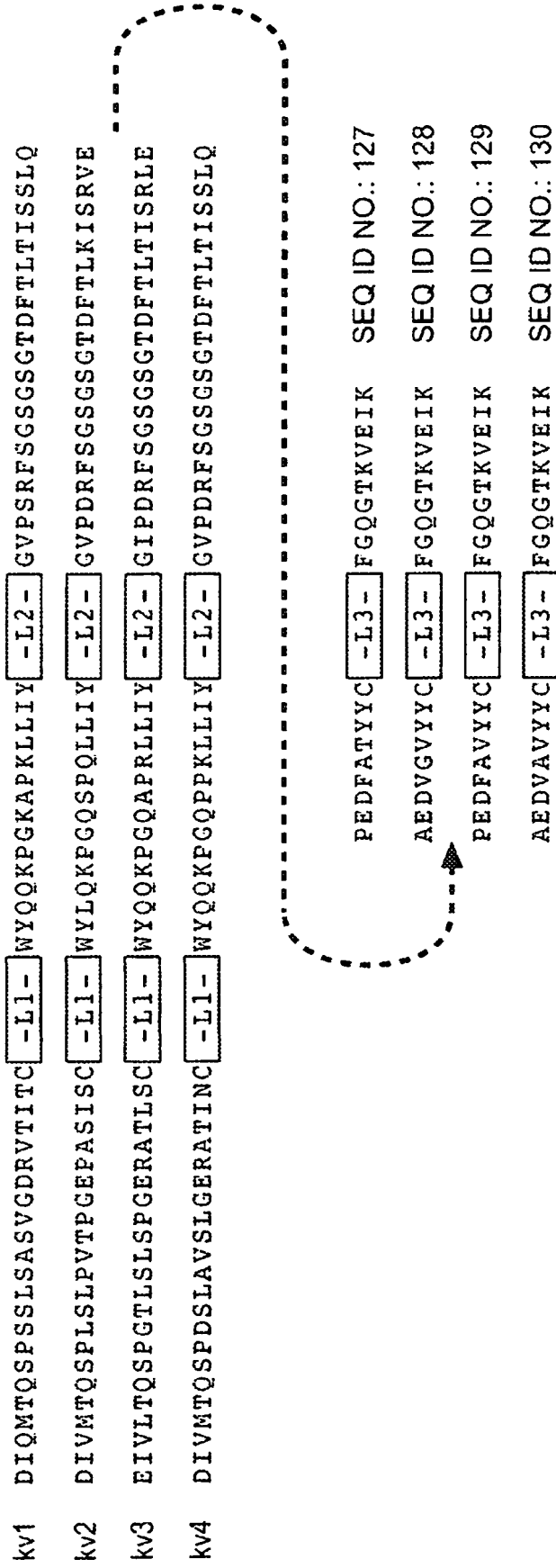


FIG. 13A



I	A	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 108
	B	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 109
	C	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 110
	D	RVTITADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 111
II	A	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 112
	B	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 113
	C	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 114
	D	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 115
III	A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 116
	B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 117
	C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 118
	D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 119
		akteptor				
	A	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 120
	B	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCSR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 121
	C	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCS	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 122
		teine akteptor				
	A	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 123
	B	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 124
	C	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCA	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 125
	D	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGTLLVTVSS	SEQ ID NO.: 126

FIG. 13B



**FIG. 14**

**A. huMA79b.v17 kerge ahel**

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 152)  
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 153)  
 FR3-LC: GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 154)  
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 155)  
 HVR1-LC: KASQSVVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 156)  
 HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 157)  
 HVR3-LC: QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 158)  
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
 DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 159)

**Kerge ahel:**

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGS  
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 303)

**LC varieeruv domeen:**

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFGSGS  
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 169)

**B. huMA79b.v17 raske ahel**

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 160)  
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 161)  
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 162)  
 FR4-HC: WGQGTTLVTVSS (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: ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT  
 (SEQ ID NO: 167)  
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID NO: 168)

**Raske ahel:**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT  
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVVPVYFDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID NO: 304)

**HC varieeruv domeen:**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT  
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVVPVYFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 170)

**FIG. 15**

**A. huMA79b.v18 kerge ahel**

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITC (SEQ ID NO: 171)  
 FR2-LC: WYQOKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 172)  
 FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLOPEDFATYYC (SEQ ID NO: 173)  
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 174)  
 HVR1-LC: KASQSVVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 175)  
 HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 176)  
 HVR3-LC: QQSNEPLT (SEQ ID NO: 177)  
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
 DSTYLSLSTLTLSKADYEHKVKYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 178)

**Kerge ahel:**

DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQSVVDYDGDSFLNHWYQOKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLOPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSTLTLSKADYEHKVKYACEVTHOGLSS  
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 305)

**LC varieeruv domeen:**

DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQSVVDYDGDSFLNHWYQOKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLOPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 188)

**B. huMA79b.v18 raske ahel**

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 179)  
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 180)  
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYC (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: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKVEPKSCDKTHT  
 (SEQ ID NO: 186)  
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 187)

**Raske ahel:**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT  
 FSADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPRE  
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 306)

**HC varieeruv domeen:**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT  
 FSADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 189)

**FIG. 16**

**A. huMA79b.v28 kerge ahel**

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRTTITC (SEQ ID NO: 190)  
 FR2-LC: WYQOKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 191)  
 FR3-LC: GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYC (SEQ ID NO: 192)  
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 193)  
 HVR1-LC: KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID NO: 194)  
 HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 195)  
 HVR3-LC: QQSNEPLT (SEQ ID NO: 196)  
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
 DSTYLSLSTLTLSKADYERHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
 (SEQ ID NO: 197)

**Kerge ahel:**

DIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQOKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFG  
SGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQSNEPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSTLTLSKADYERHKVYACEVTHQ  
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 307)

**B. huMA79b.v28 raske ahel**

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 198)  
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 199)  
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 200)  
 FR4-HC: WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 201)  
 HVR1-HC: GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 202)  
 HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 203)  
 HVR3-HC: TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 204)  
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT  
 (SEQ ID NO: 205)  
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 206)

**Raske ahel:**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRA  
TFSADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCTRVRPIRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS  
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN  
KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 308)

**FIG. 17**

**A. huMA79b.v32 kerge ahel**

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 209)  
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLFYIY (SEQ ID NO: 210)  
 FR3-LC: GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (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: QQSNEDEPLT (SEQ ID NO: 215)  
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
 DSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 216)

**Kerge ahel:**

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSDYSGDSFLNHWYQQKPGKAPKLFYIYAASNLESGVPSRFGSGS  
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHOGLSS  
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 309)

**LC varieeruv domeen:**

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSDYSGDSFLNHWYQQKPGKAPKLFYIYAASNLESGVPSRFGSGS  
 GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 226)

**B. huMA79b.v32 raske ahel**

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 217)  
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 218)  
 FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 219)  
 FR4-HC: WGQGLTVTVSS (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: ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT  
 (SEQ ID NO: 224)  
 Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL  
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 225)

**Raske ahel:**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT  
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPRE  
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 310)

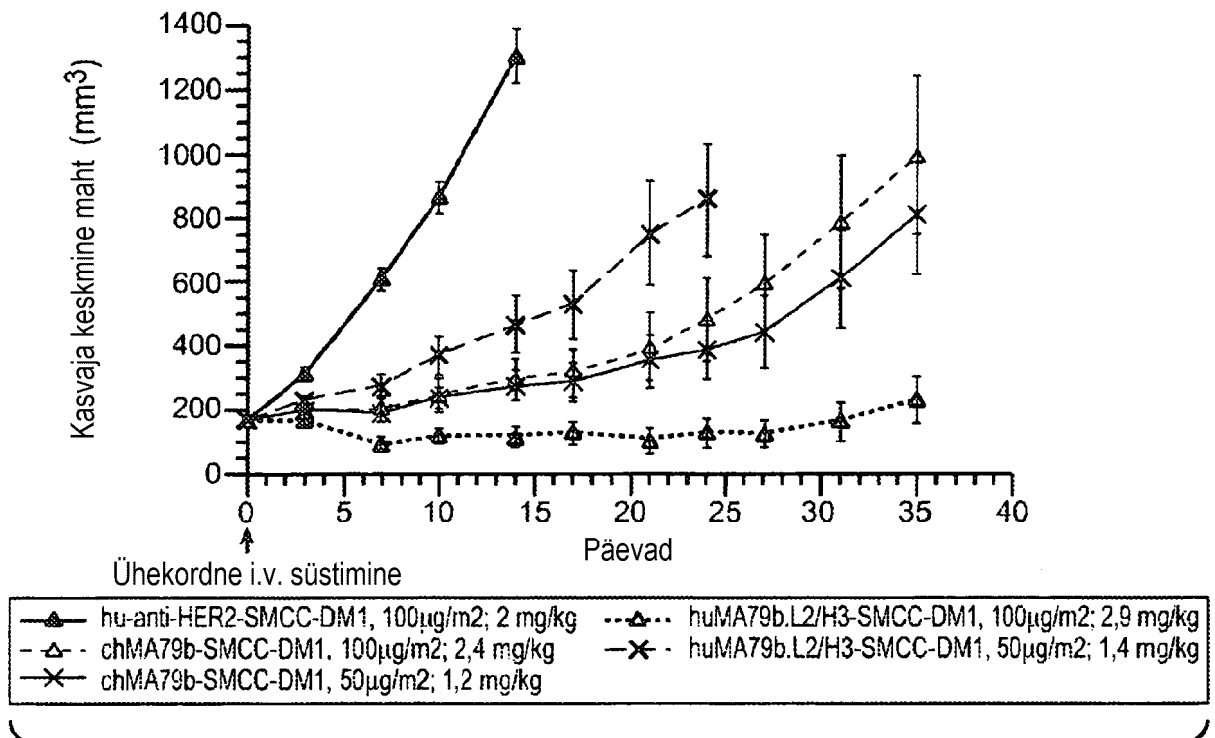
**HC varieeruv domeen:**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT  
 FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 227)

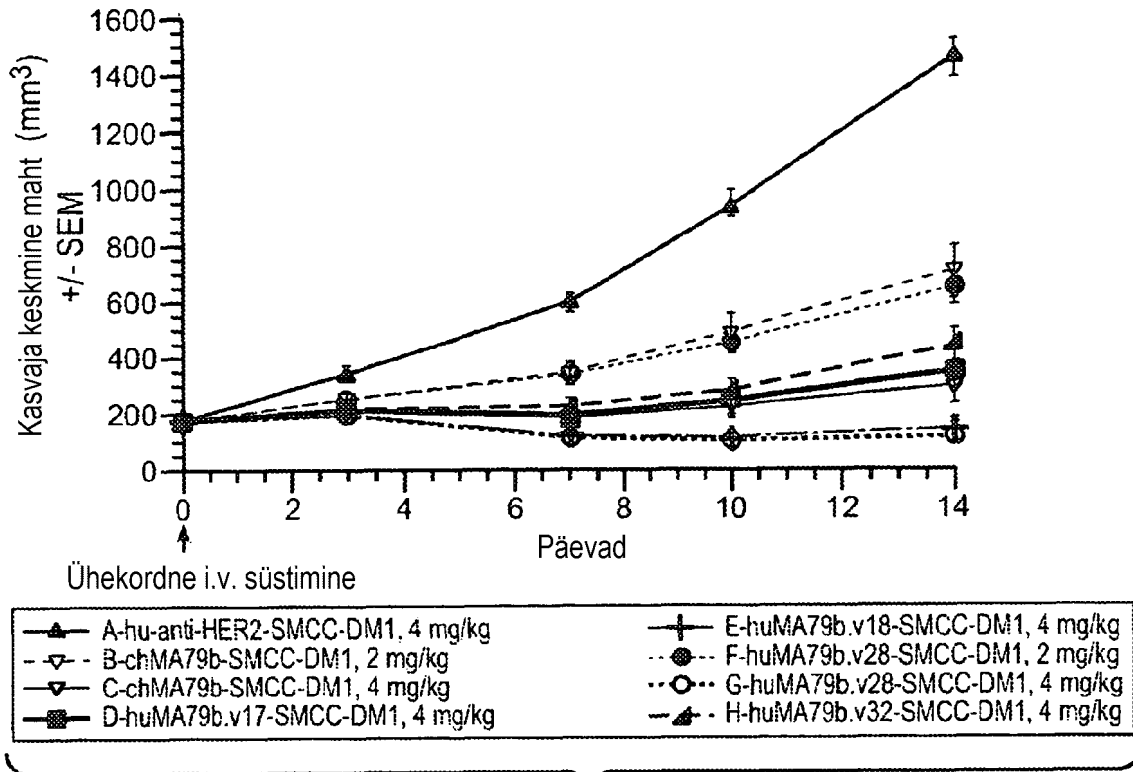
**FIG. 18**

	signaaljärjestus	testitav peptiid	
hCD79b	1	MARLALSPVPSHWMVALLLLSAEP-VPAARSEDIRYRNPKGSA CSRIWQS	49
CynCD79b	1	MARLALSPVSSHVLVALLLLSAEPVPAAKSEDLYPNPKGSA CSRIWQS	50
mCD79b	1	MATLVLSMPCHWLLFLLLFSGEP-VPAMTSSDLP LN FQSPCSQIWOH	49
hCD79b	50	PRFIARKRGFTVKMH CYMN-SASGNVSWLWKQEMDENPQQ LKLEKGRMEE	98
CynCD79b	51	PRFIARKRGFTVKMH CYVTNS TFSIVSWLRRRETDKEPQQVNL EQGHMHO	100
mCD79b	50	PRFAAKKRSSMVKFH CYTN--HSGALTWFRKRGSQQPELVSEEGRIVQ	96
hCD79b	99	SQNESLATLTIQIRFEDNGIYFCQQKCN-NTSEVYQGGTEL RVMGFST	147
CynCD79b	101	TQNSVVTLLIQD IRFEDNGIYFCQQECS-KTSEVYRGC TEL RVMGFST	149
mCD79b	97	TQNGSVYTLTIQNIQYEDNGIYFCQKQCD SANHNVTDS CGTE LLV LGFST	146
hCD79b	148	LAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGMEEDHTYE	197
CynCD79b	150	LAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGMEADHTYE	199
mCD79b	147	LDQLKRNRNTLKDGIILIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDCKAGMEEDHTYE	196
		ITAM domeen	
hCD79b	198	GLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE	229 SEQ ID NO: 2
CynCD79b	200	GLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE	231 SEQ ID NO: 7
mCD79b	197	GLNIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE	228 SEQ ID NO: 8

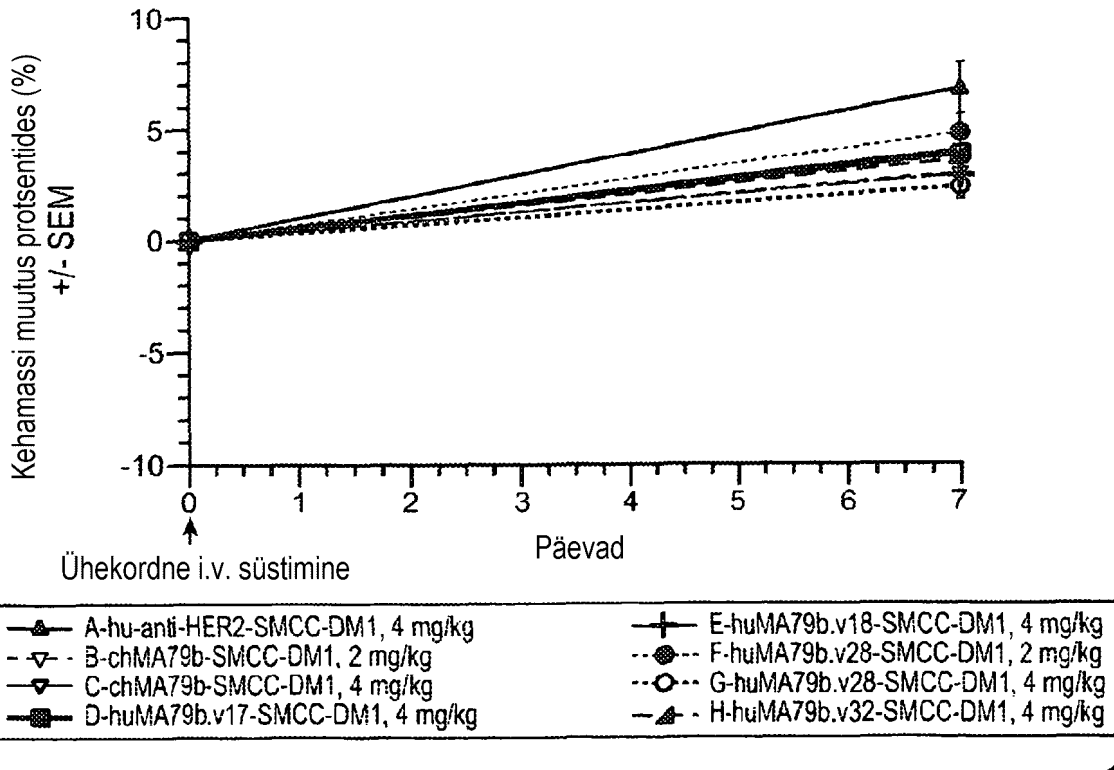
FIG. 19

**FIG. 20**

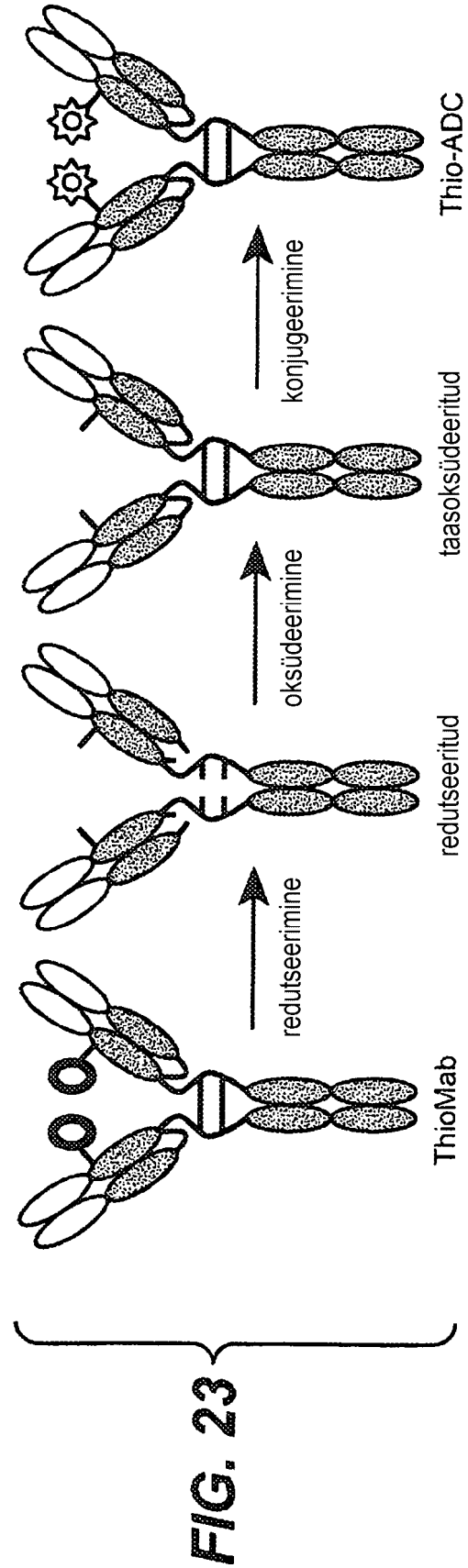
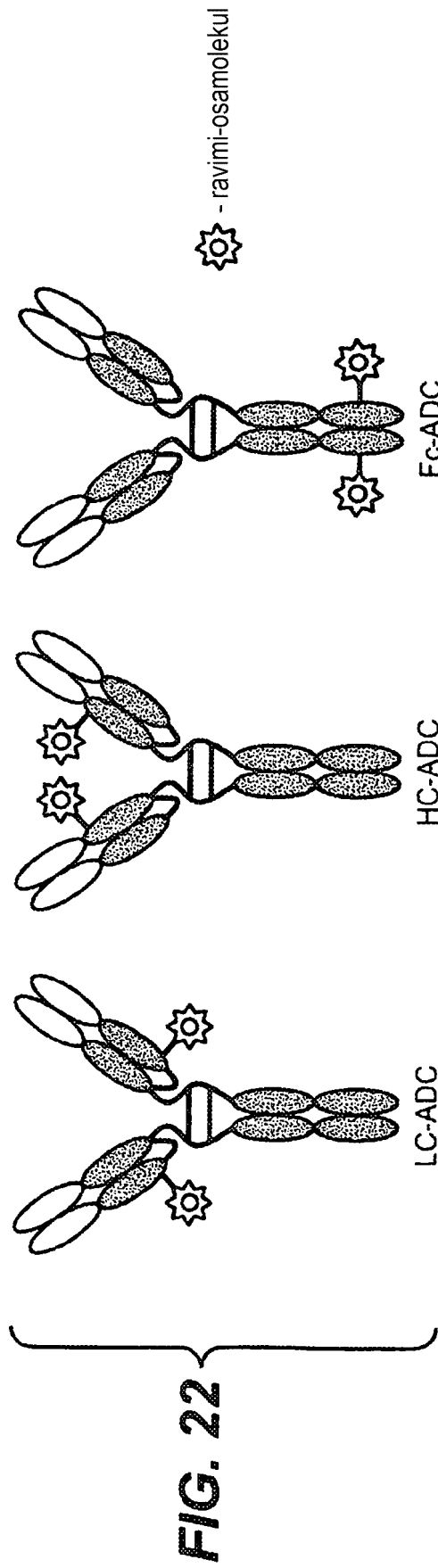




**FIG. 21A**



**FIG. 21B**



## Anti-CD79b A118C huMA79b.v17 – tsüsteiinidega konstrueeritud ThioMAb raske ahel

A. Kerge ahela järjestus  
Thio-huMA79b.v17-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVVDYDGDSTFLNWDYQKPKGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS  
GSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQOSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNNFYPREAKVOWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYKHKVYACEVTHOGLSS  
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 229)

B. Raske ahela järjestus  
Thio-huMA79b.v17-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSAD  
TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV  
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS  
CDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL  
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
 (SEQ ID NO: 228)

**FIG. 24**

## Anti-CD79b A118C huMA79b.v18 – tsüsteiinidega konstrueeritud ThioMAb raske ahel

A. Kerge ahela järjestus  
Thio-huMA79b.v18-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVVDYDGDSTFLNWDYQKPKGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS  
GSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQOSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNNFYPREAKVOWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYKHKVYACEVTHOGLSS  
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 231)

B. Raske ahela järjestus  
Thio-huMA79b.v18-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT  
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRE  
POVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 230)

**FIG. 25**

Anti-CD79b A118C huMA79b.v28 – tsüsteiinidega konstrueeritud ThioMAb raske ahel

A. Kerge ahela järjestus

Thio-huMA79b.v28-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQSVDYEGDSFLNWFYQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS  
GSGETDFTLTISSLPEDFATYYCQOSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEODSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSS  
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 233)

B. Raske ahela järjestus

Thio-huMA79b.v28-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT  
FSADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGLTVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE  
POVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQEPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPG (SEQ ID NO: 232)

## FIG. 26

Anti-CD79b V205C chMA79b – tsüsteiinidega konstrueeritud ThioMAb kerge ahel

A. Kerge ahela järjestus

Thio chMA79b-LC-V205C (LC)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSFLNWFYQKPGQPPKLF IYAASNLESGIPARFSGS  
GSGETDFTLNHPVEEEDAATYYCQOSNEDPLTFGAGTELELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEODSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSS  
PCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 235)

B. Raske ahela järjestus

Thio chMA79b-LC-V205C (HC)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGGAT  
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE  
POVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQEPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPG (SEQ ID NO: 234)

## FIG. 27

Anti-CD79b A118C chMA79b – tsüsteinidega konstrueeritud ThioMAb raske ahel

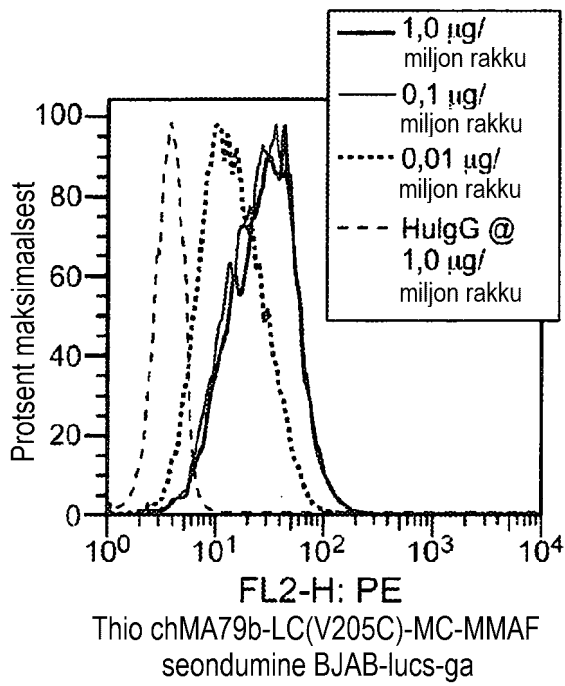
**A. Kerge ahela järjestus**  
**Thio chMA79b-HC-A118C (LC)**

DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDSTFLNWFYQKPGQPPKLFITYAASNLESGIPARFSGS  
GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQOSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 237)

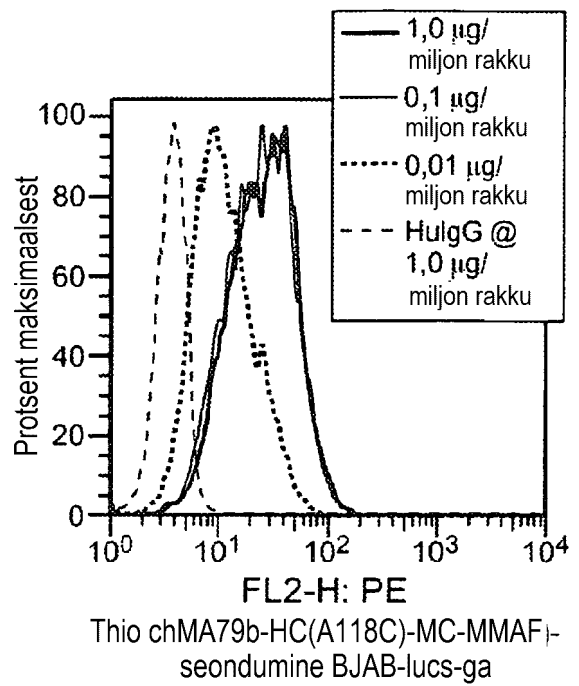
**B. Raske ahela järjestus**  
**Thio chMA79b-HC-A118C (HC)**

EVQLQDSGAELMKGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKPKAT  
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSTVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  
POVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 236)

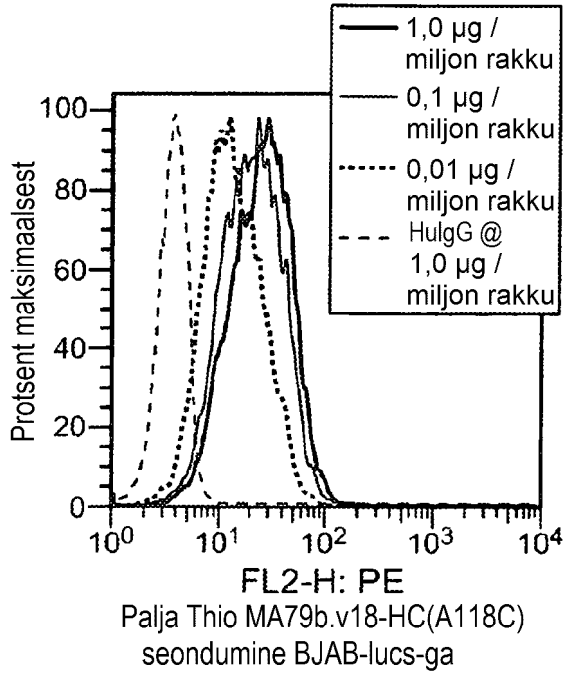
**FIG. 28**



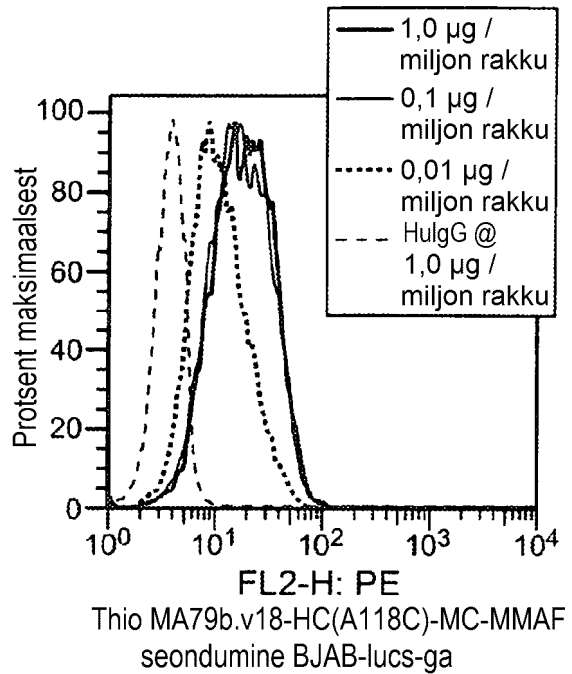
**FIG. 29A**



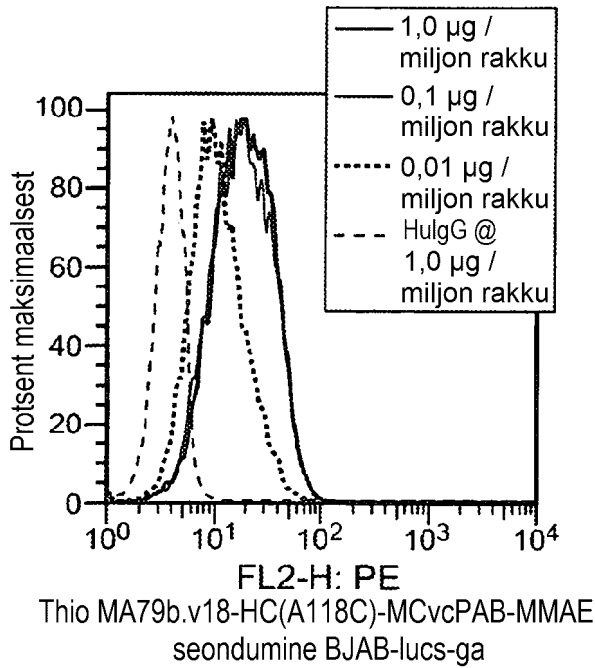
**FIG. 29B**



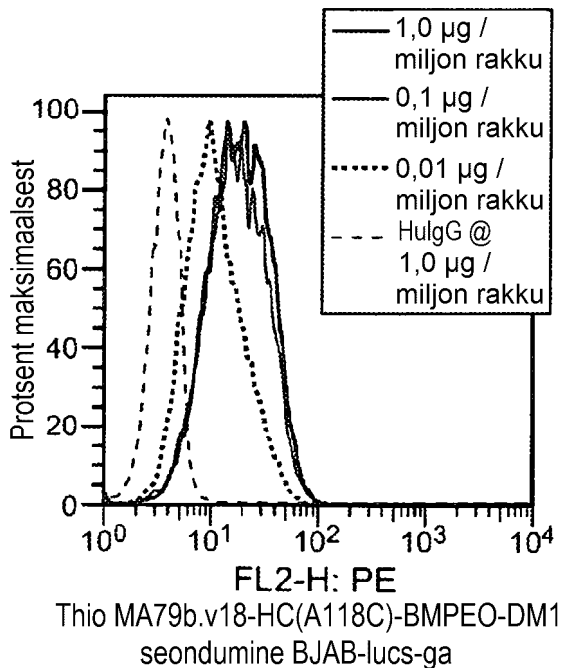
**FIG. 30A**



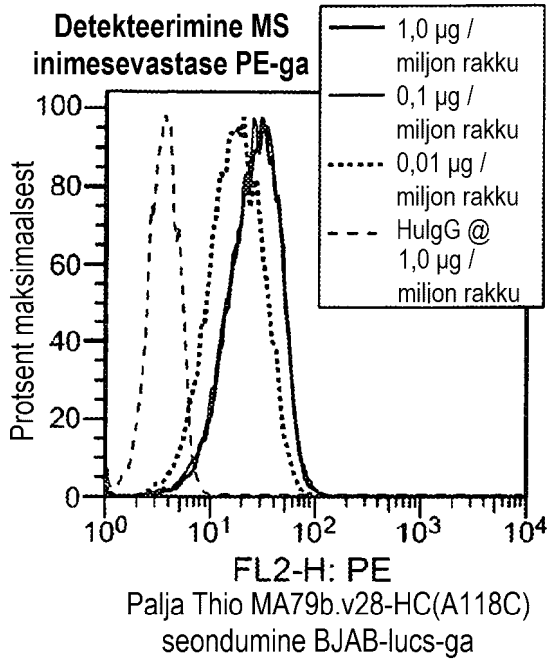
**FIG. 30B**



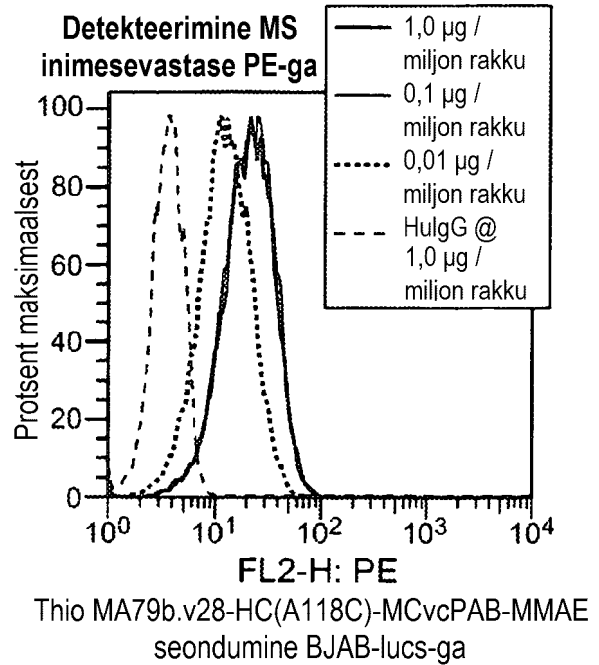
**FIG. 30C**



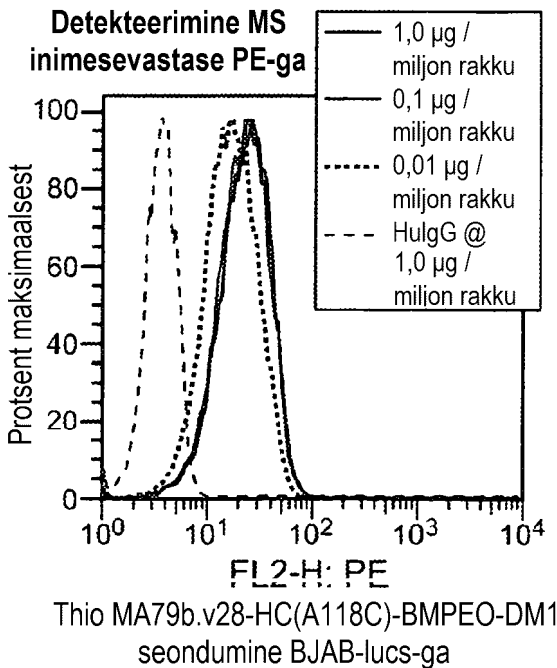
**FIG. 30D**



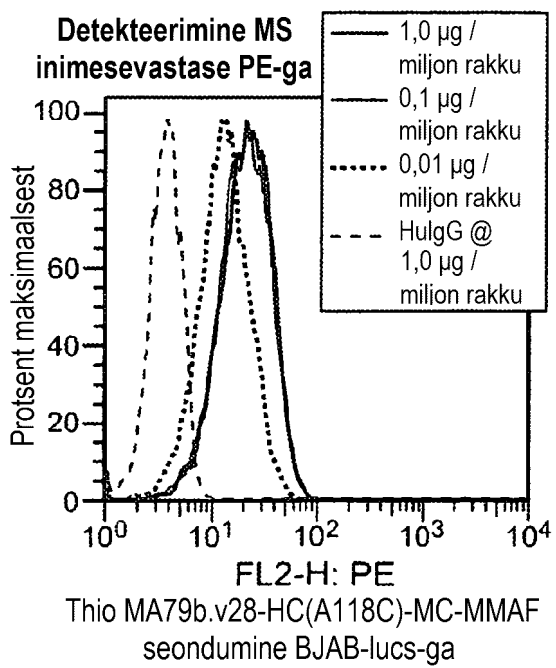
**FIG. 31A**



**FIG. 31B**

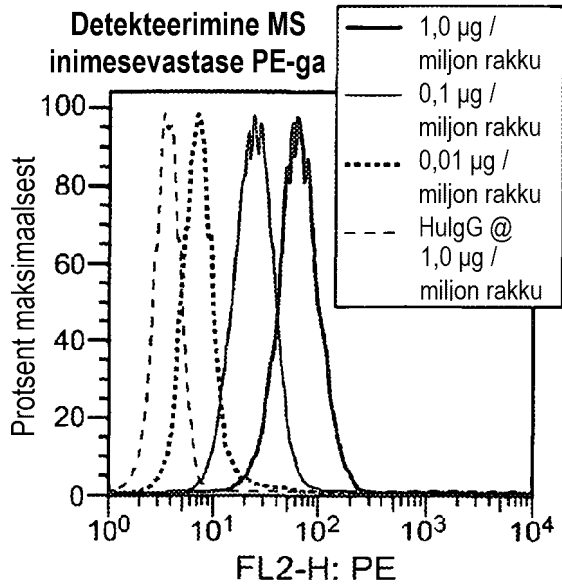


**FIG. 31C**



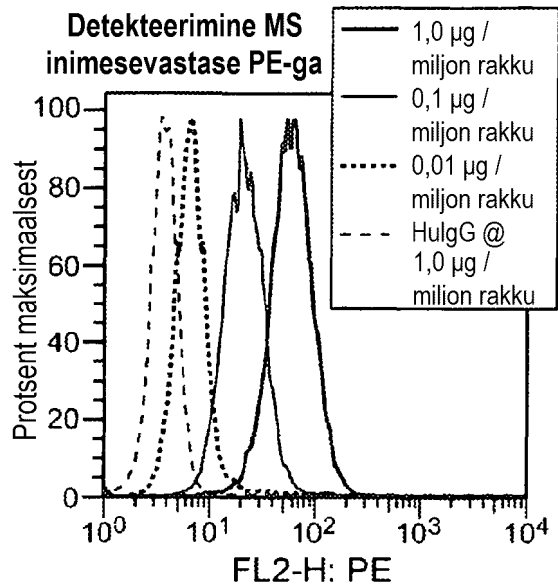
**FIG. 31D**





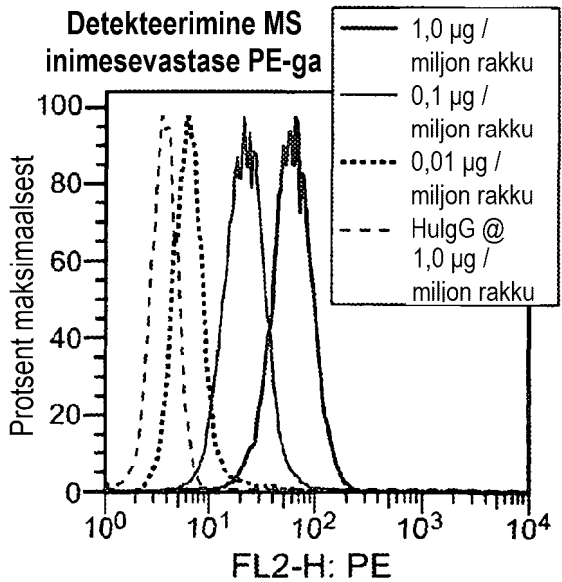
Palja Thio Anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) seondumine BJAB-cynoCD79b rakkudega

**FIG. 32A**



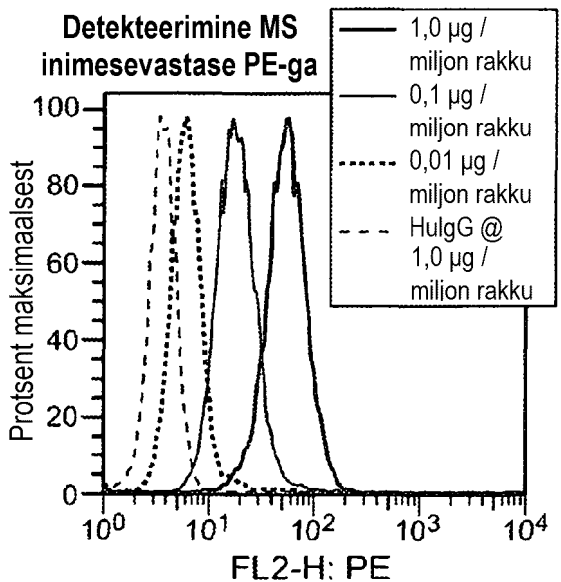
Thio Anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE seondumine BJAB-cynoCD79b rakkudega

**FIG. 32B**



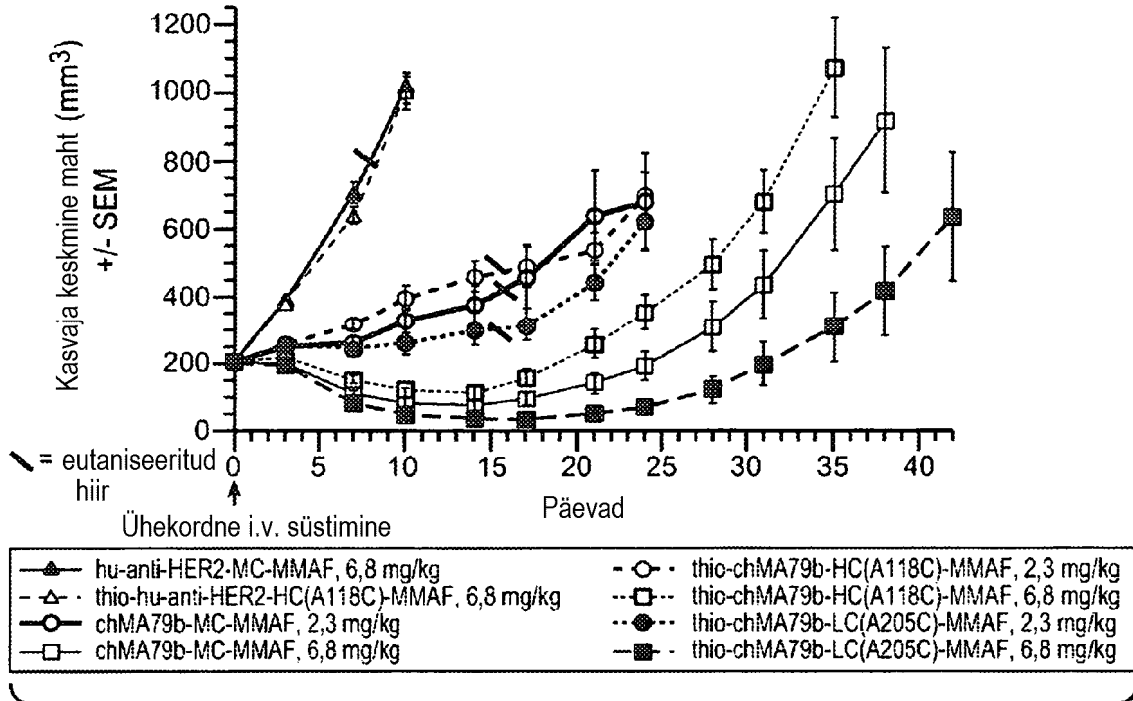
Thio Anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 seondumine BJAB-cynoCD79b rakkudega

**FIG. 32C**

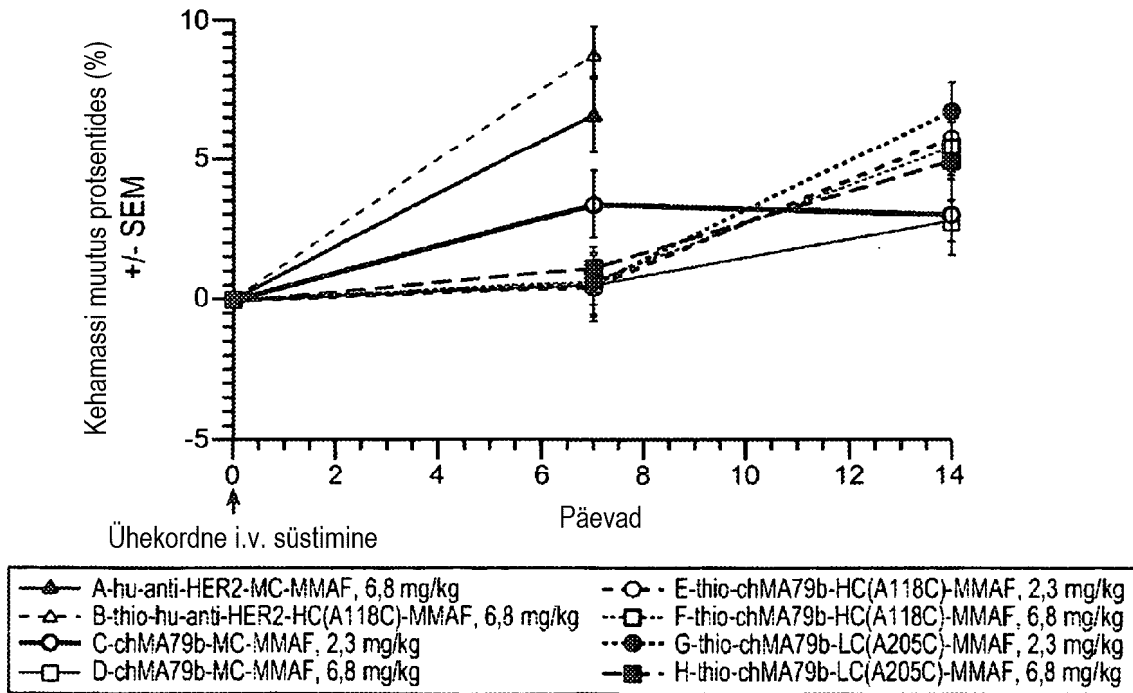


Thio Anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF seondumine BJAB-cynoCD79b rakkudega

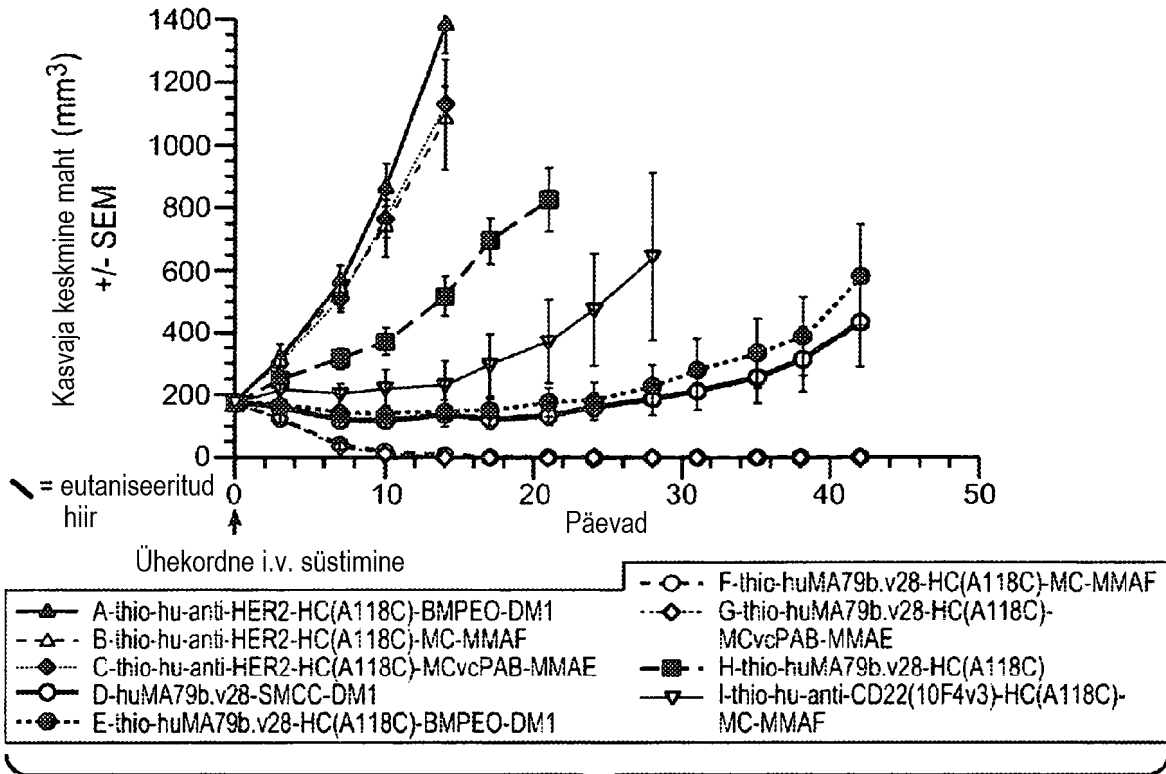
**FIG. 32D**



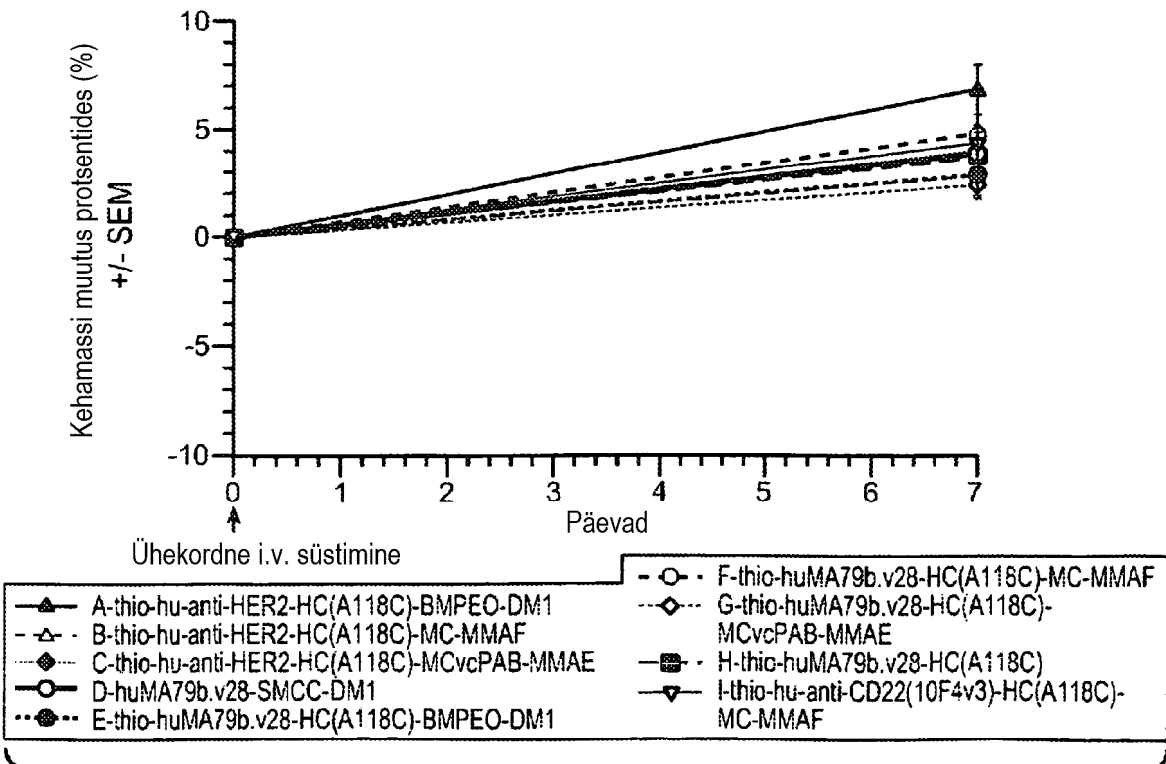
**FIG. 33A**



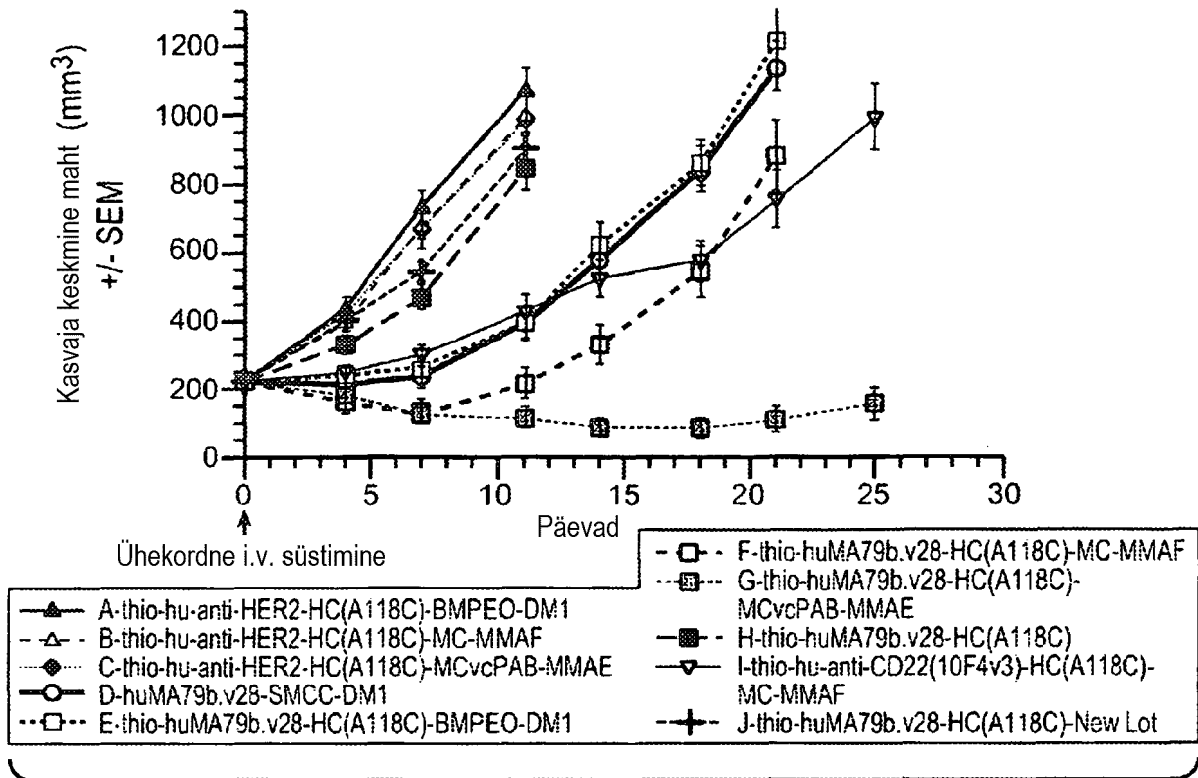
**FIG. 33B**



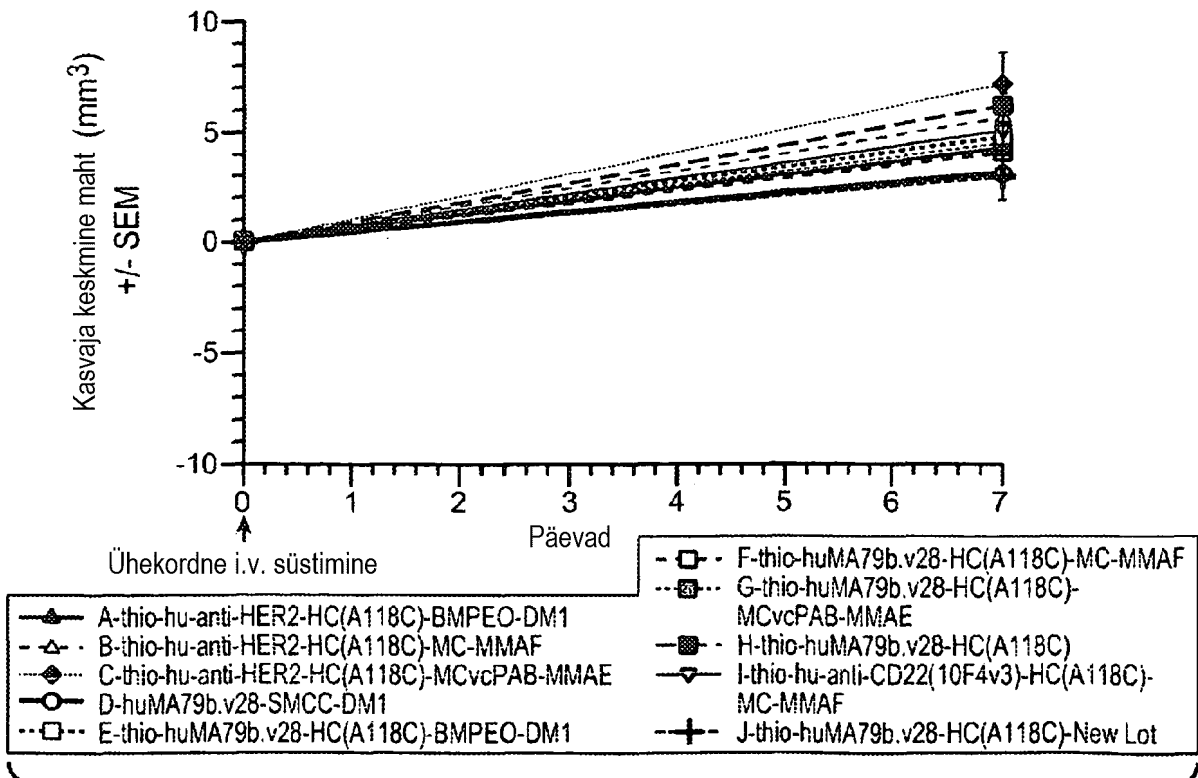
**FIG. 34A**



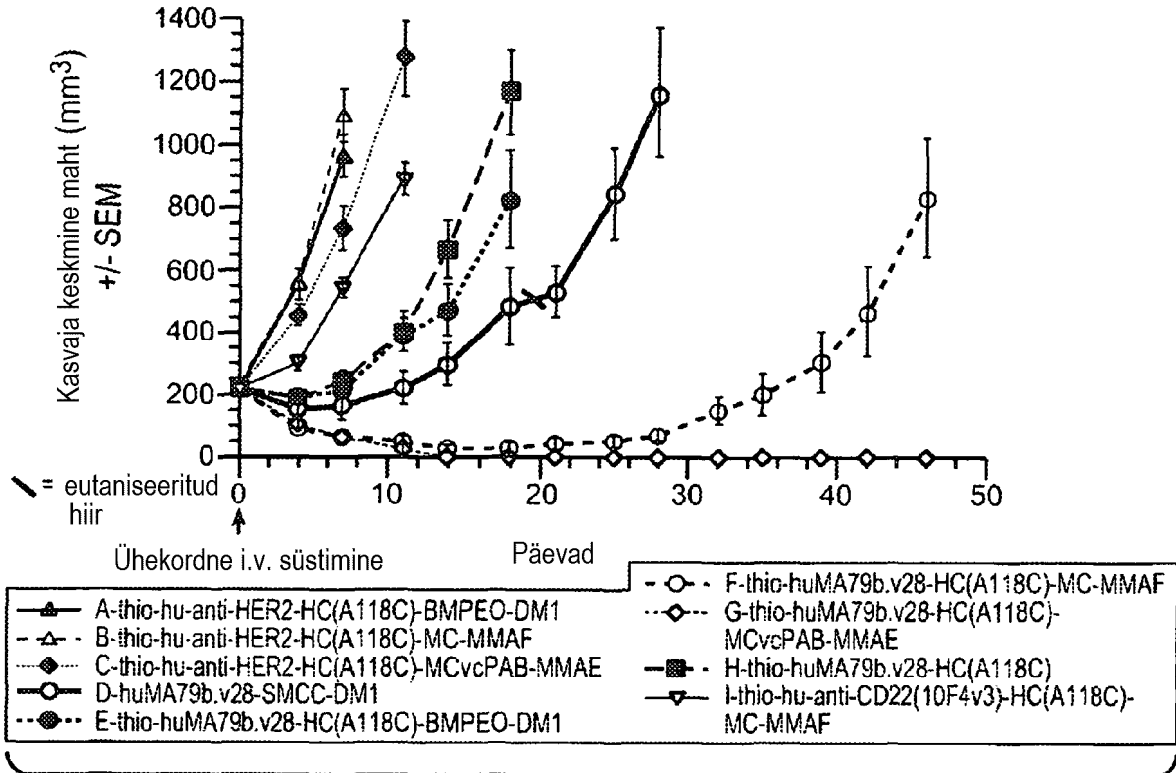
**FIG. 34B**



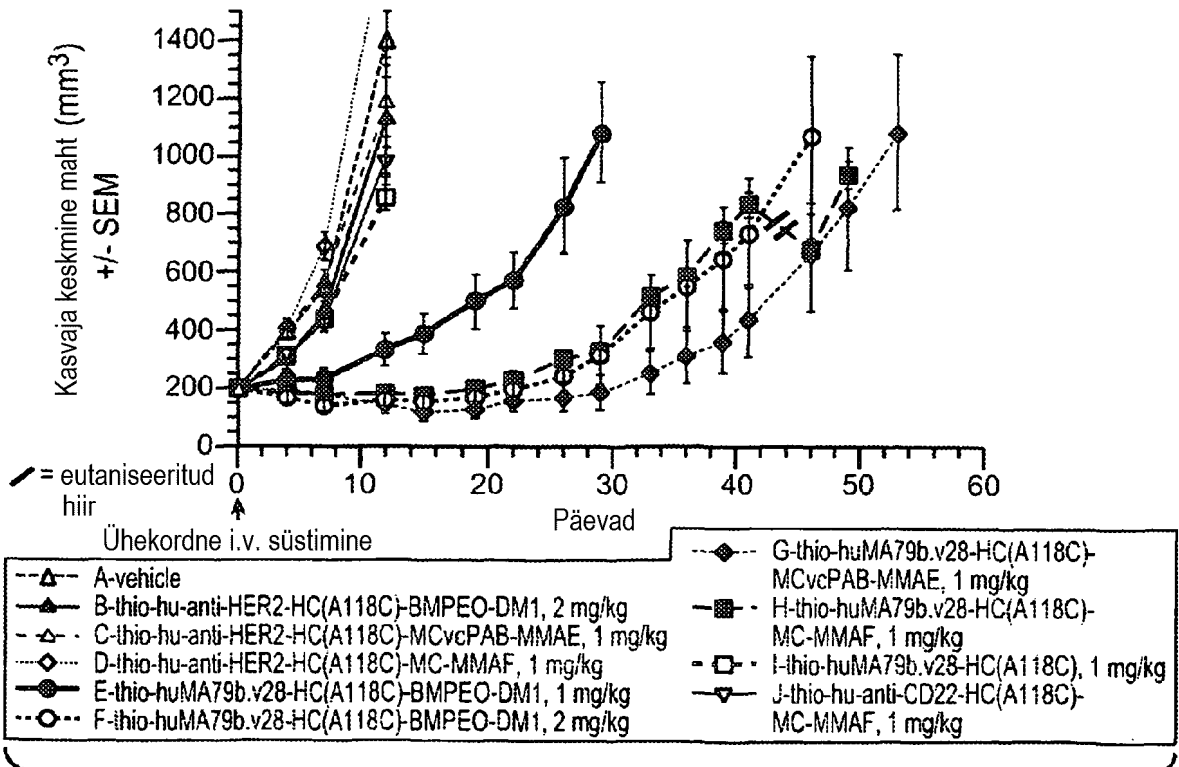
**FIG. 35A**



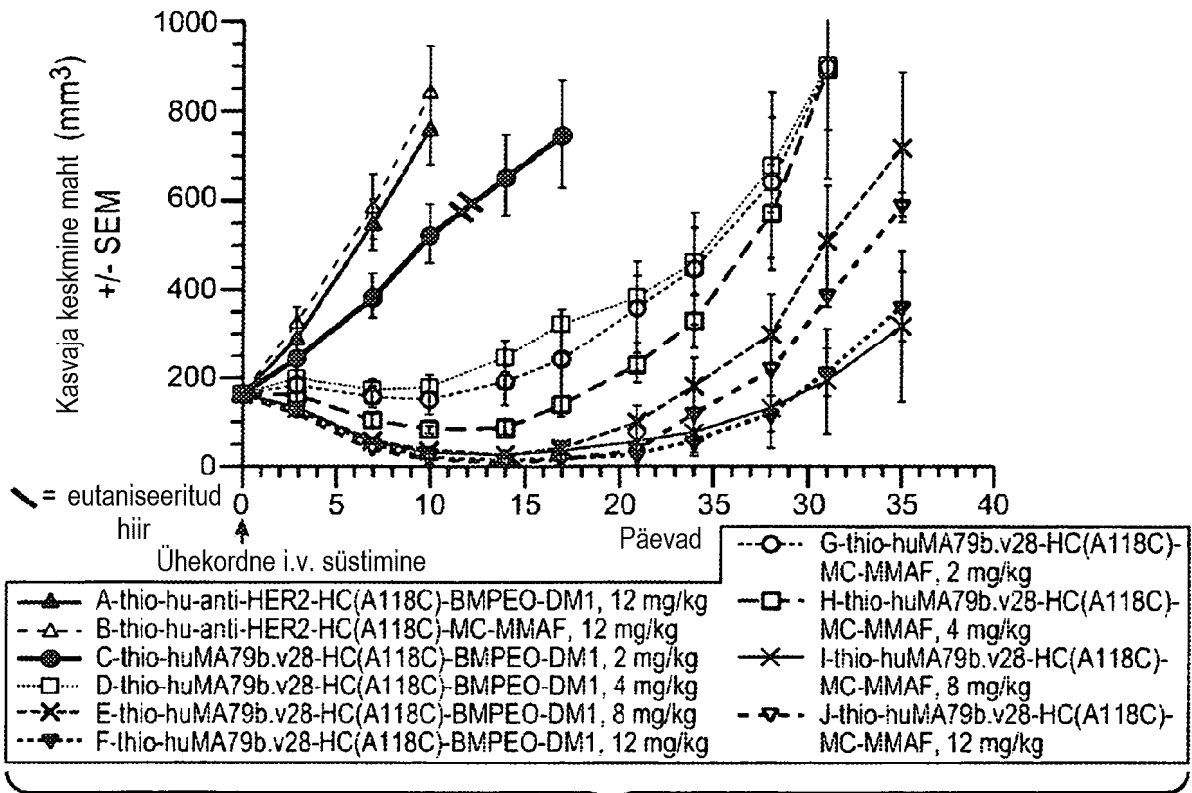
**FIG. 35B**



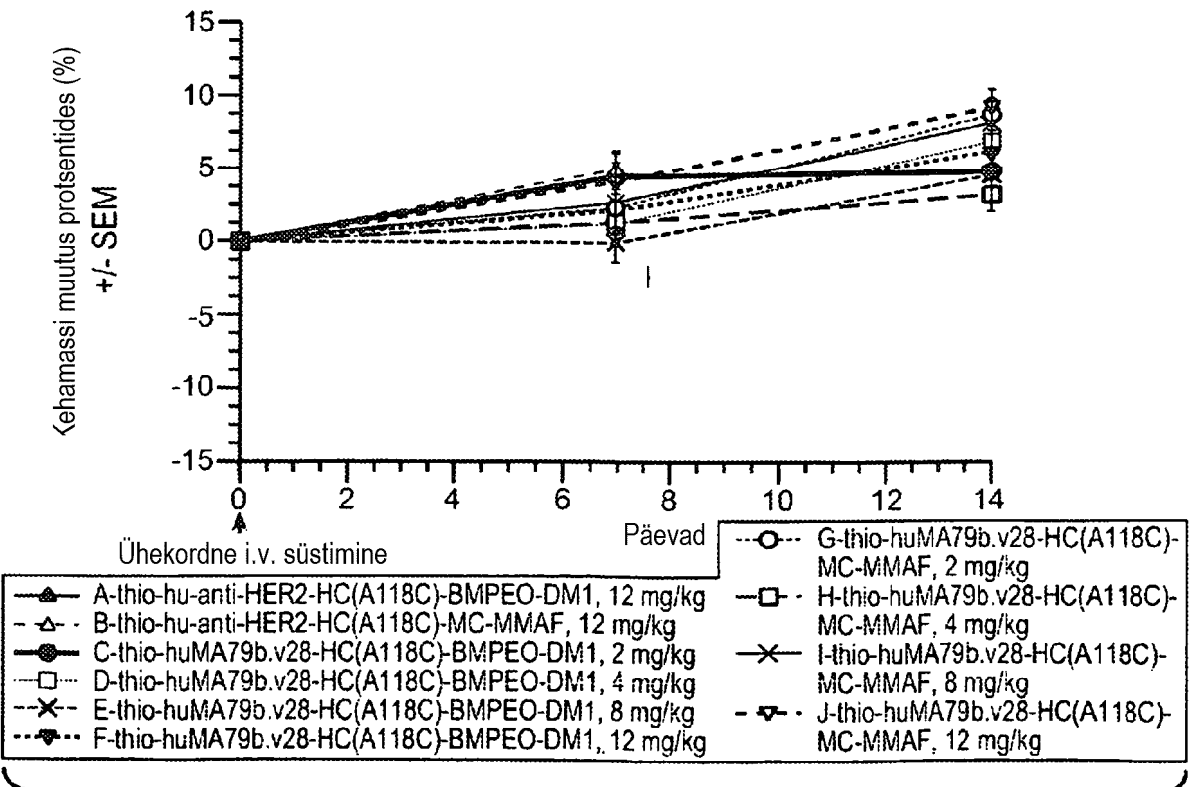
**FIG. 36**



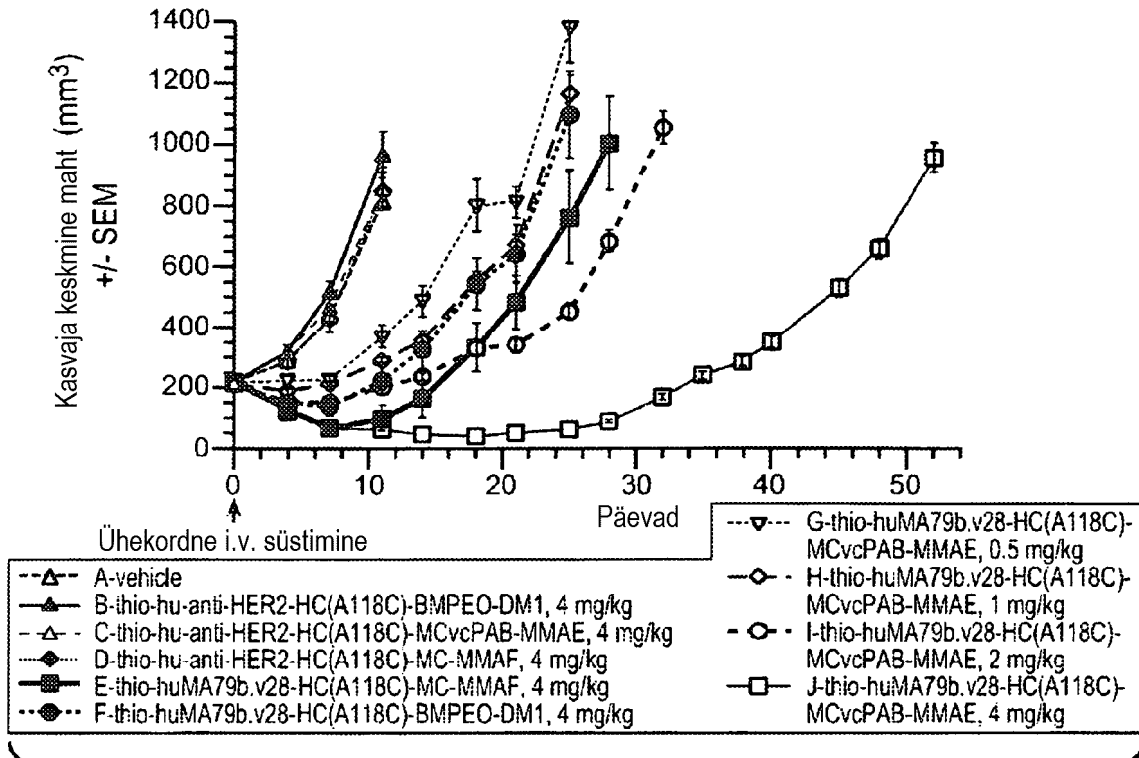
**FIG. 37**



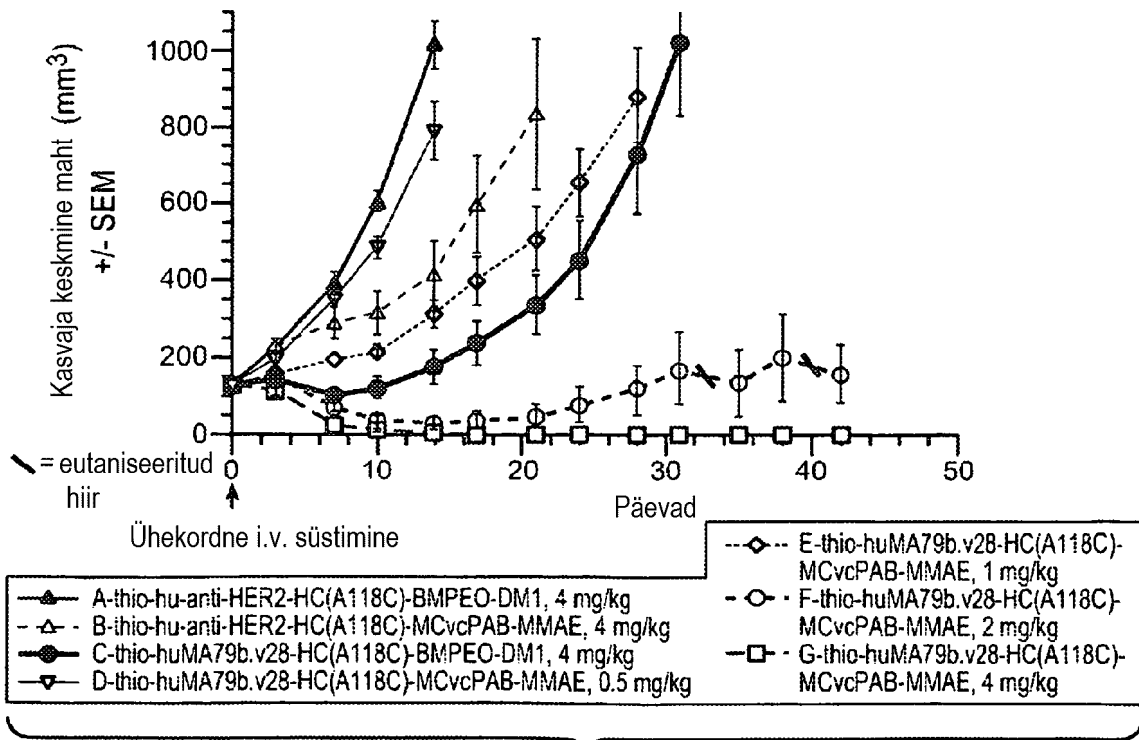
**FIG. 38A**



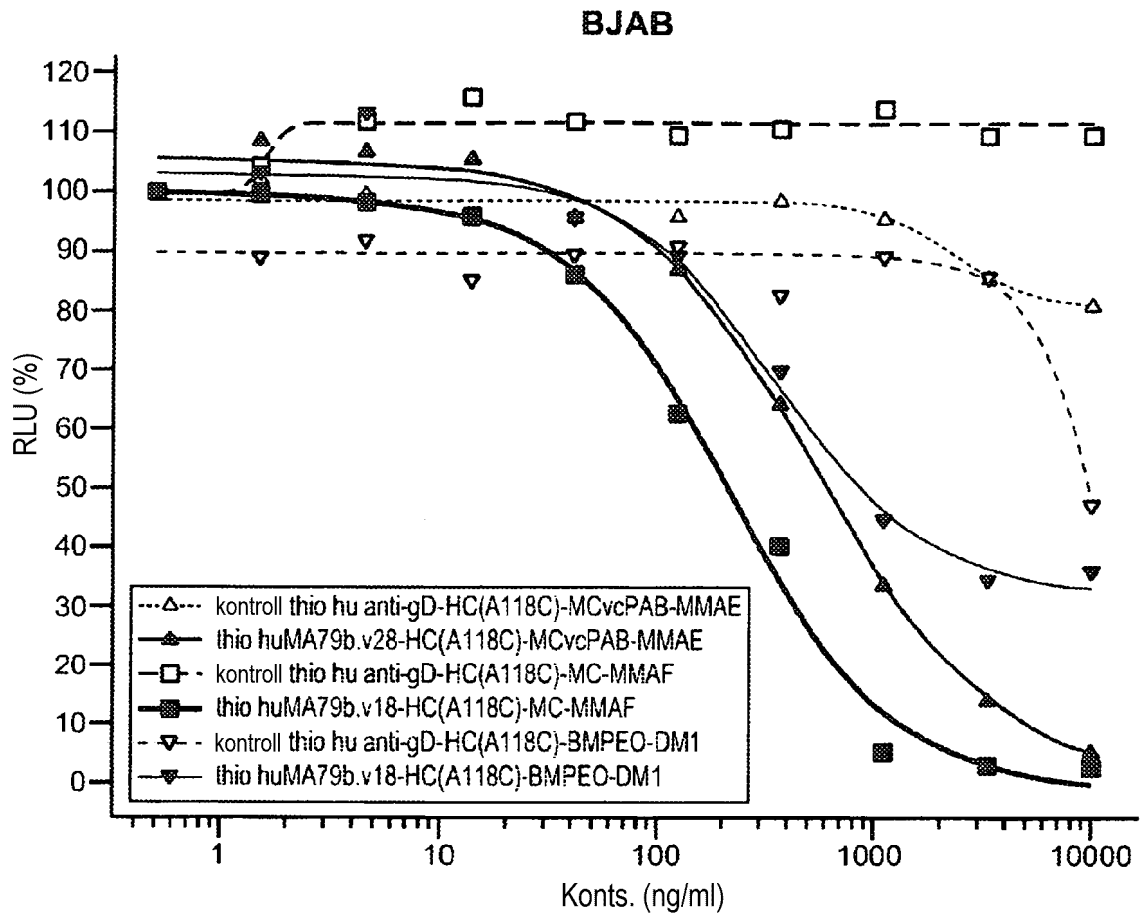
**FIG. 38B**



**FIG. 39**



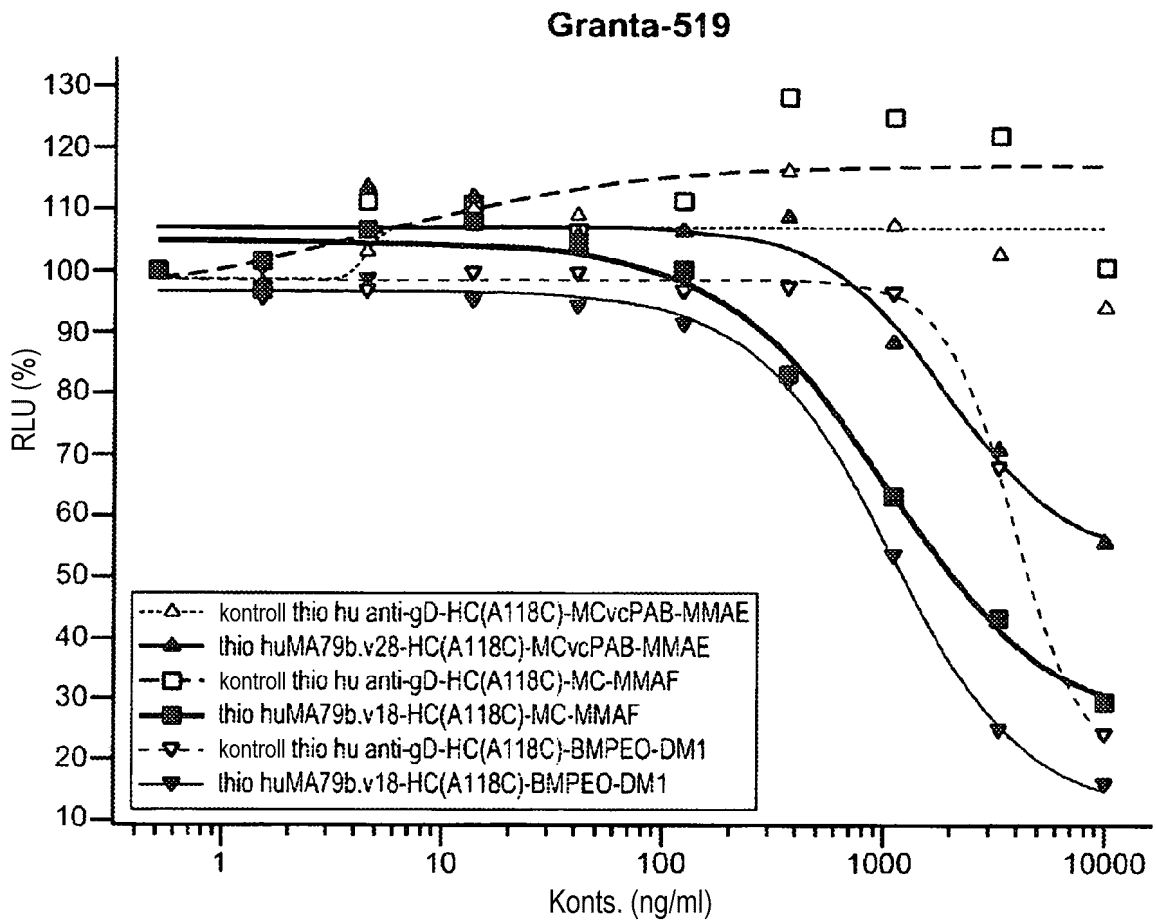
**FIG. 40**



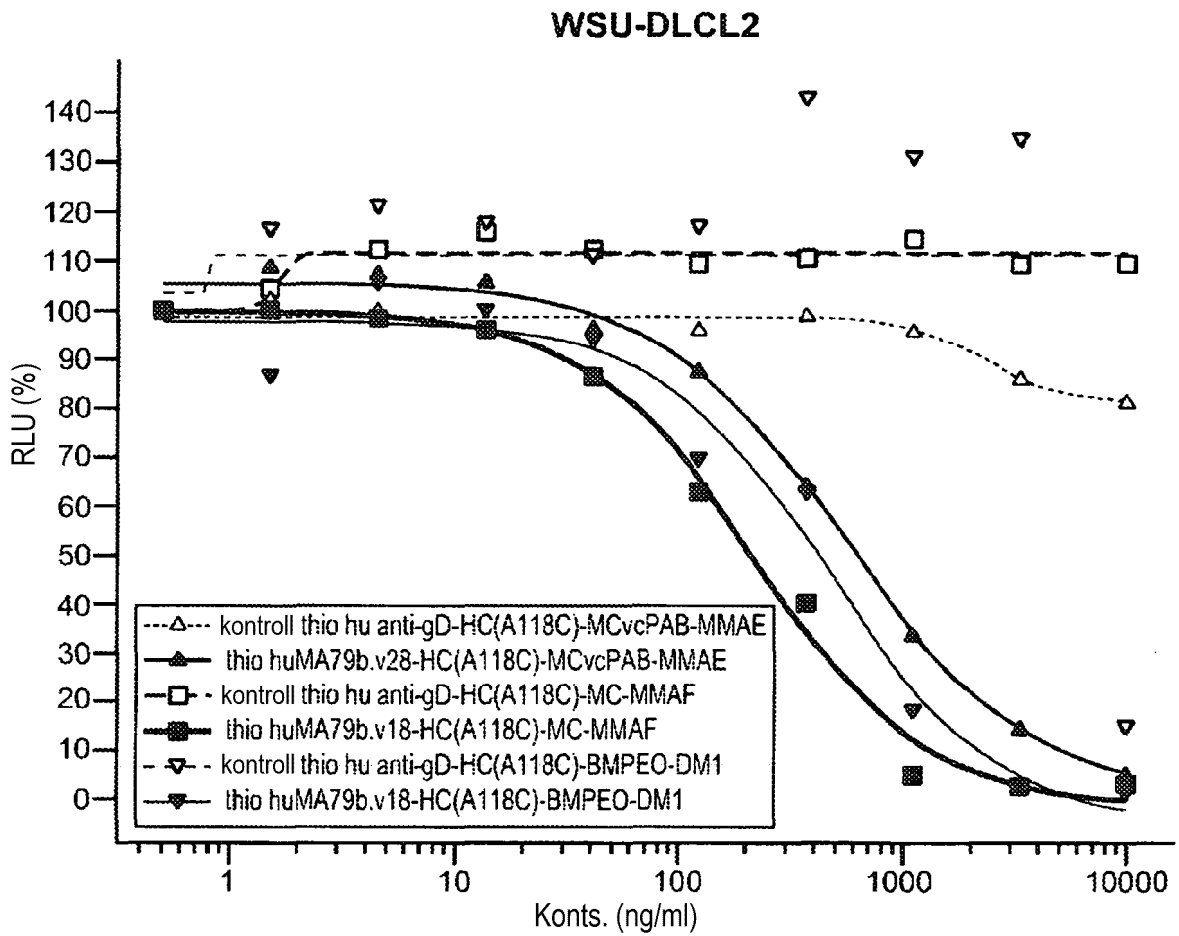
**FIG. 41A**



37/44



**FIG. 41B**



**FIG. 41C**

**<p1.cynoCD79b**

TCATGGTGATGGTGATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGG  
CTTACCTTCGAACCGCGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCACTGTGCTGGATATCTGCAGAAT  
TGCCCTTGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGTGTCCAGCCACTGGC  
TGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCAGCTGAGCCAGTGCCAGCAGCCAAATCAGAGGACCTG  
TACCCGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCGCGATCTGGCAGAGCCCACGTTTCATAGCCAGGAA  
ACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACGTGACCAACAGCACCTTCAGCATCGTGAGCTGGC  
TCCGGAAGCGGGAGACGGACAAGGAGCCCCAACAGGTGAACCTGGAGCAGGGCCACATGCATCAG  
ACCCAAAACAGCTCTGTCACCACCCTCATCATCCAAGACATCCGGTTTGAGGACAACGGCATCTA  
CTTCTGTCAGCAGGAGTGCAGCAAGACCTCGGAGGTCTACCGGGGCTGCGGCACGGAGCTGCGAG  
TCATGGGGTTCAGCACCTTGGCACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGCATCATCATG  
ATCCAGACGCTGCTGATCATCCTCTTCATCATCGTGCCATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGA  
CAGCAAGGCCGGCATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCCTGGACATTGACCAGACGGCCACCT  
ACGAGGACATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTGGGTGAGCACCCAGGTCAG  
GAGTGAGAGCCAGGACCTCCCCACGGCCTGGGTGCAGGCTCCCCAGCC

**FIG. 42**

**<p1.cynoCD79b  
DNA548455**

MARLALSPVSSHVLVALLLLLSAAEPVPAKSEDLYPNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT  
VKMHCYVTNSTFSIVSWLRKRETDKEPQQVNLEQGHMHQTQNSSVTTLIIQDIRFEDNGIY  
FCQQECSKTSEVYRGCGETELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLL  
DKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

**Signaaljärjestus**

aminohapped 1-26.

**Transmembraanne domeen**

aminohapped 161-181.

**Immunoglobuliinidomeen**

aminohapped 59-126.

**Immunoretseptori türosiinipõhine aktivatsioonimotiiv**

aminohapped 195-215.

**Immunoglobuliini V-kogumi domeen**

aminohapped 44-145.

**N-glükosüülimissait**

aminohapped 70-73, 103-106.

**cAMP ja cGMP sõltuva proteiinkinaasi fosforülimissait**

aminohapped 81-84.

**Proteiinkinaasi C fosforülimissait**

aminohapped 50-52, 61-63, 84-86, 158-160, 214-216.

**Kaseiinkinaasi II fosforülimissait**

aminohapped 22-25, 84-87, 158-161, 208-211, 223-226.

**Türosiinkinaasi fosforülimissait**

aminohapped 115-122.

**N-müristoüülimissait**

aminohapped 41-46, 120-125.

**FIG. 43**

**Cyno CD79b-vastase kimäärise antikeha (ch10D10) kerge ahel**

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 CCGTGGAGGC ACCAAGCTGG AAATCAAACG  
 GACCGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG  
 AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG  
 GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTCACAG AGCAGGACAG  
 CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA  
 ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG  
 CTTCAACAGG GGAGAGTGT AAGCTTGGCC GCCATGGCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA  
 TAATGGTTAC AAATAAAGCA

**FIG. 44****Cyno CD79b-vastase kimäärise antikeha (ch10D10) kerge ahel**

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR  
 FSGSGSRDTDFTLINPVEADDVATYYCQQSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK  
SGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEHKV  
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**FIG. 45**

**Cyno CD79b-vastase kimäärise antikeha (ch10D10) raske ahel**

CACCTCGGTT CTATCGATTG AATTCCACCA TGGGATGGTC ATGTATCATC CTTTTTCTAG  
TAGCAACTGC AACTGGAGTA CATTCAGAAAG TTCAGCTGCA GGAGTCGGGA CCTGGCCTGG  
TGAAACCTTC TCAGTCTCTG TCCCTCACCT GCACTGTAC TGGCTACTCA ATCACCAGTG  
ATTATGCCTG GAACTGGATC CGGCAGTTTC CAGGAAACAA ACTGGAGTGG ATGGGCAACA  
TATGGTACAG TGGTAGCACT ACCTACAACC CATCTCTCAA AAGTCGAATC TCTATCACTC  
GAGACACATC CAAGAACCAG TTCTTCCTGC AGTTGAATTC TGTGACTTCT GAGGACACAG  
CCACATATTA CTGTTCAAGA ATGGACTTCT GGGGTCAAGG CACCACTCTC ACAGTCTCCT  
CAGCCTCCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG  
GGGGCACAG GGGCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT  
CGTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT  
CAGGACTCTA CTCCTCAGC AGCGTGGTGA CTGTGCCCTC TAGCAGCTTG GGCACCCAGA  
CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC  
CCAAATCTTG TGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG  
GACCGTCAGT CTTCCCTCTC CCCCCAAAAC 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 AATGAGTGGC ACGGCCCTAG AGTCGACCTG  
CAGAAGCTTG GCCGCCATGG CCCAACTTGT TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA

**FIG. 46****Cyno CD79b-vastase kimäärise antikeha (ch10D10) raske ahel**

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIROFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK  
SRI<sup>SITRDTSKNQFFLQLNSVTS</sup>EDTATYYCSRMDFWGQTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST  
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDK<sup>KVEPKSCDKHTHTCPPCP</sup>APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
VSHEDPEVRFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHODWLN<sup>NGKEYCKVSNKALPA</sup>  
PIEKTI<sup>SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYK</sup>TTTP  
PVLDS<sup>DGSFFLYSKLTVDKSRWQOGN</sup>VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

**FIG. 47**

**Anti-cyno CD79b ch10D10 A118C – tsüsteinidega konstrueeritud ThioMAb raske ahel****A. Kerge ahela järjestus****Thio-anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC-A118C (LC)**

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR  
FSGSGSRTDFTLTINPVEADVDATYYCQOSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLK  
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKV  
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 245)

**B. Raske ahela järjestus****Thio-anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC-A118C (HC)**

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIROFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK  
SRI SITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKST  
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTOTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYCKKVSNAKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTT  
PVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
 (SEQ ID NO: 244)

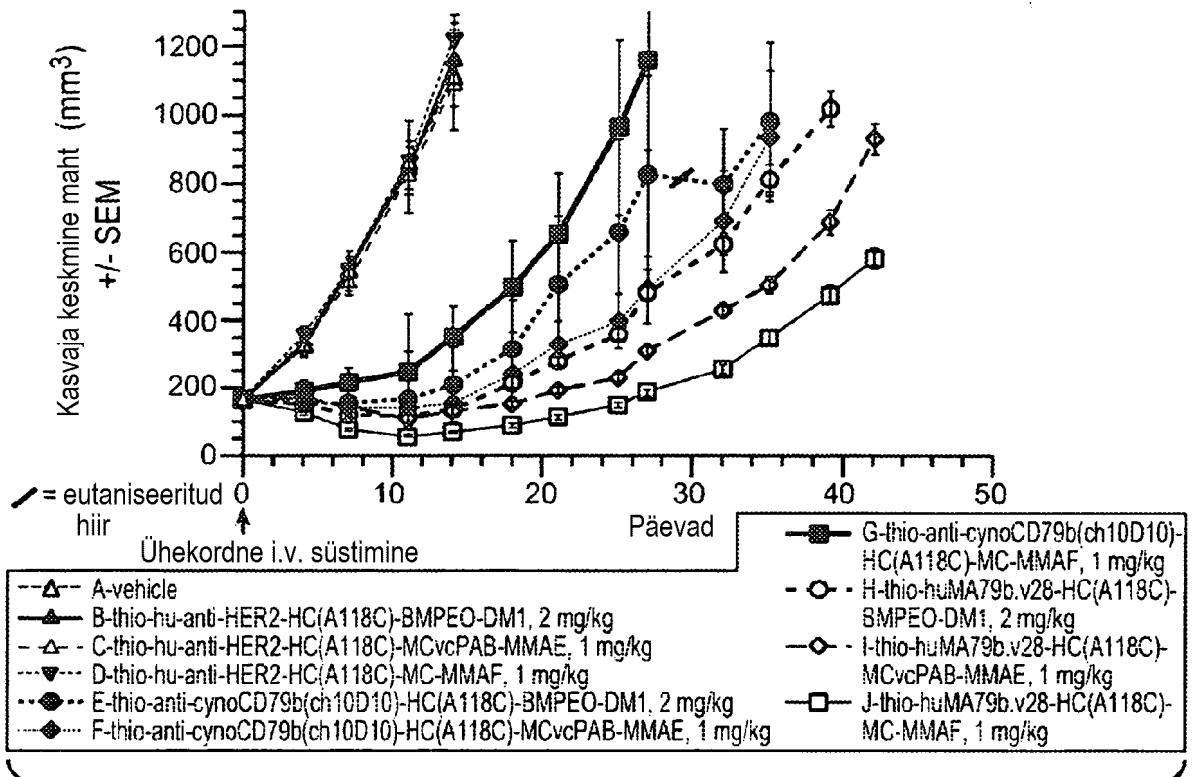
**FIG. 48****Anti-cyno CD79b ch10D10 V205C – tsüsteinidega konstrueeritud ThioMAb kerge ahel****A. Kerge ahela järjestus****Thio-anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC-V205C (LC)**

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR  
FSGSGSRTDFTLTINPVEADVDATYYCQOSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFFPSDEQLK  
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKV  
YACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 300)

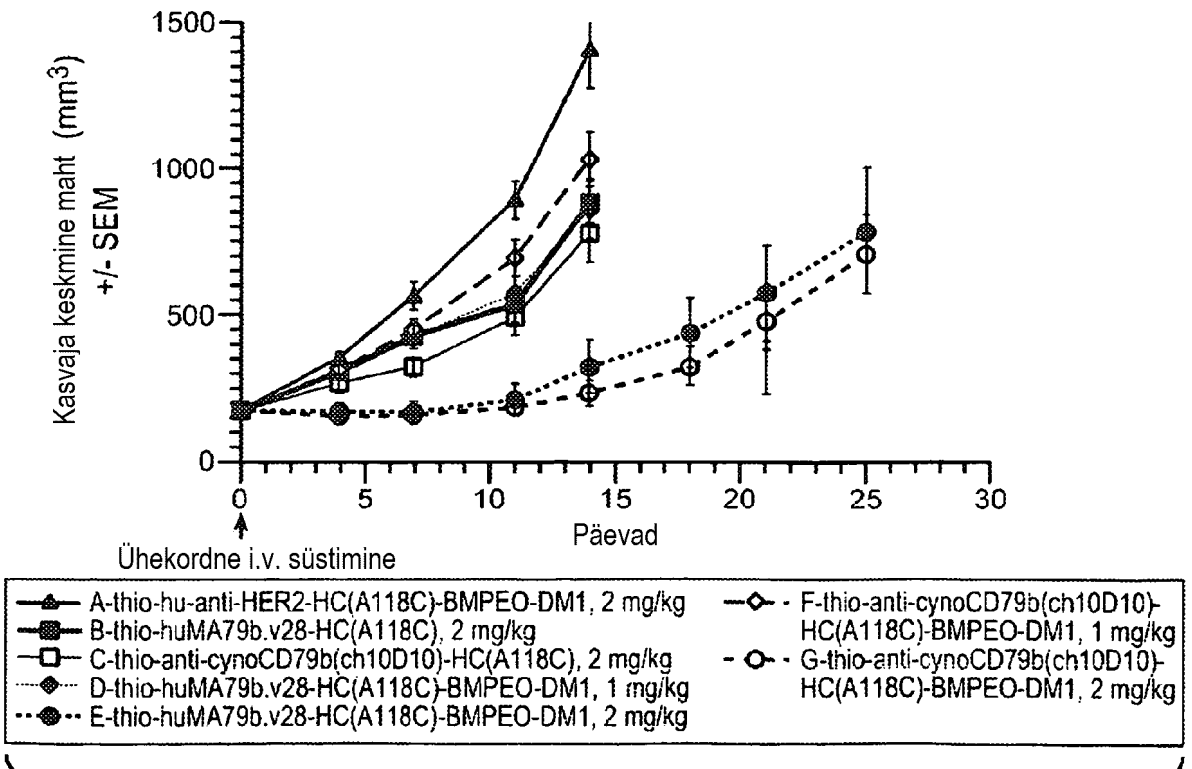
**B. Raske ahela järjestus****Thio-anti-cyno CD79b (ch10D10)-HC-V205C (HC)**

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIROFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK  
SRI SITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST  
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTOTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYCKKVSNAKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTT  
PVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 299)

**FIG. 49**



**FIG. 50**



**FIG. 51**