



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 446 904 B1**

(51) Int. Cl.  
*A61K 47/48 (2006.01)*  
*C07K 16/28 (2006.01)*  
*C07K 16/30 (2006.01)*  
*A61K 39/395 (2006.01)*  
*A61K 45/06 (2006.01)*

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

(10) Registreeringu number: <b>E010744</b>	(73) Patendiomanik:  <b>Genentech, Inc.</b> <b>1 DNA Way,</b> <b>South San Francisco, CA 94080-4990, US</b>
(11) Patendikirjelduse tõlke number: <b>EE-EP 2 446 904 B1</b>	(72) Leiutise autorid:  <b>Ebens, Allen J., jr.</b> <b>1932 Arroyo Avenue,</b> <b>San Carlos, CA 94070, US</b>  <b>Gray, Alane, M.</b> <b>122 Kestrel Court, Brisbane, CA 94005, US</b>  <b>Liang, Wei-Ching</b> <b>840 Sea Spray Lane, 112,</b> <b>Foster City, CA 94404, US</b>  <b>Wu, Yan</b> <b>1160 Blythe Street, Foster City, CA 94404, US</b>  <b>Yu, Shang-Fan</b> <b>1103 Sandalwood Lane,</b> <b>Milpitas, CA 95035, US</b>
(30) Prioriteediandmed: <b>30.05.2006</b> <b>US 809328 P</b>	
<b>29.03.2007</b> <b>US 908941 P</b>	
<b>13.04.2007</b> <b>US 911829 P</b>	
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: <b>29.05.2007</b>	
(96) Euroopa patendi-taotluse number: <b>11187568.8</b>	
(97) Euroopa patendi väljaand-misest teatamise kuupäev: <b>29.04.2015</b>	
(97) Euroopa patendi number: <b>EP 2 446 904</b>	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: <b>15.07.2015</b>	(74) Patendivolinik:  <b>Piret Niidas</b> <b>LASVET Patendibüroo OÜ</b> <b>Suurtüki 4a, 10133 Tallinn, EE</b>
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: <b>15.09.2015</b>	

(54) CD22-vastased antikehad, nende immunokonjugaadid ja kasutamine

## KIRJELDUS

### LEIUTISE VALDKOND

**[0001]** Leiutis käsitleb CD22-vastaseid antikehi ja nende immunokonjugaate. Lisaks käsitleb leiutis CD22-vastaste antikehade ja nende immunokonjugaatide kasutamise meetodeid.

### LEIUTISE TAUST

**[0002]** Lümfotsüüdid on üks mitmest hematopoeesi käigus luuüdis toodetavatest valgete vererakkude tüübist. Lümfotsüütide kaks peamist klassi on B-lümfotsüüdid (B-rakud) ja T-lümfotsüüdid (T-rakud). Käesolevas on erilist huvi pakkuvateks lümfotsüütideks B-rakud.

**[0003]** B-rakud küpsevad luuüdis ja lahkuvad luuüdist, ekspresseerides oma pinnal antigeeni siduvat antikeha. Kui naiivne B-rakk kohtub esmakordselt antigeeni, mille suhtes tema membraanile seondunud antikeha on spetsiifiline, hakkab rakk kiiresti jagunema ning tema järglaskond diferentseerub B-mälurakkudeks ja efektorrakkudeks, mida nimetatakse „plasmarrakkudeks“. B-mälurakud on pikema elueaga ja nad jätkavad membraanile seondunud antikeha ekspresseerimist samasuguse spetsiifilisusega nagu nende algsed eellasrakud. Plasmarrakud ei tooda membraanile seondunud antikeha, vaid toodavad selle asemel antikeha sekreteeritavat vormi. Sekreteeritavad antikehad on humoraalse immuunsuse peamised efektormolekulid.

**[0004]** B-rakkudega seotud häired hõlmavad, kuid ei ole nendega piiratud, halvaloomulisi lümfoome (mitte-Hodgkin'i lümfoomid, NHL), hulгимüeloomi ja kroonilisi lümfotsütaarseid leukeemiaid (CLL, B-raku leukeemia (CD5+ B- lümfotsüüdid)). Mitte-Hodgkin'i lümfoomid (NHL) on peamiselt B-lümfotsüütidest arenevate kasvajate heterogeenne rühm, mis moodustab ligikaudu 4% kasvajate esmastest diagnoosidest (Jemal, A. et al., CA-Cancer J. Clin., 52: 23-47, (2002)). Aggressiivne NHL moodustab täiskasvanute NHL-dest ligikaudu 30-40% (Harris, N. L. et al., Hematol. J., 1: 53-66 (2001)) ja hõlmab difuusset suurerakulist B-raku lümfoomi (DLBCL), mantelrakulist lümfoomi (MCL), perifeerset T-raku lümfoomi ja anaplastilist suurerakulist lümfoomi. Kaasaegne kombinatoorne kemoterapiaravi on tulemusrikas vähem kui poolte agressiivse NHL-iga patsientide puhul ja enamik patsiente sureb lõpuks haiguse tõttu (Fisher, R. L., Semin. Oncol., 27 (suppl 12): 2-8 (2000)).

**[0005]** B-rakkudega seotud häired hõlmavad ka autoimmuunhaiguseid. Inimeste autoimmuunhaigused on kliiniliselt jätkuvalt olulised. Nagu juba nende nimetus viitab, toimivad autoimmuunhaigused kehaomase immuunsüsteemi kaudu. Kuigi erinevate autoimmuunhaiguste patoloogiamehhanismid on erinevad, hõlmab nende ühine üldmehhanism teatud antikehade (käesolevas viidatud kui enesega seonduvad antikehad või autoantikehad) seondumist keha endogeensete valkudega. Arstid ja teadlased on identifitseerinud enam kui 70 kliiniliselt erinevat autoimmuunhaigust, sealhulgas on reumatoidartriit, hulgiskleroos, vaskuliit, immuunvahendatud diabeet ja luupus nagu süsteemne erütematoosluupus. Kuigi paljud autoimmuunhaigused on harvaesinevad ja mõjutavad vähem kui 200 000 inimest, siis summaarselt mõjutavad nad miljoneid ameeriklasi, ligikaudu viit protsenti elanikkonnast, kusjuures naiste osakaal on ebaproportsionaalselt suur. Tulenevalt nende haiguste kroonilisest iseloomust on nad suureks sotsiaalseks ja finantsiliseks koormaks.

**[0006]** B-rakkudega seotud kasvajate ravis on üheks oluliseks fookuseks B-rakkude pinnaantigeenidele suunatud tsütotoksilised agensid. Üheks selliseks B-raku pinnaantigeeniks on CD20. Rituksimab (rituksaan, firmadelt Genentech, Inc. (South San Francisco, CA ja IDEC Pharmaceutical Corp. (San Diego, CA)), mis on kimäärne (hiire/inimese) monokloonne CD-20-vastane antikeha, oli esimeseks Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiameti (FDA, *Food and Drug Administration*) poolt aksepteeritud terapeutiliseks antikehaks, mis on ette nähtud retsidiiveerunuda või refraktoornea aeglase kasvuga (indolentse) või follikulaarse NHL raviks (Leonard, J. P. et al., *Clin. Canc. Res.*, 10: 5327-5334 (2004)).

**[0007]** Teised B-raku antigeenid, nagu CD19, CD22 ja CD52, on samuti lümfoomi raviks terapeutilise potentsiaaliga sihtmärkideks (Grillo-Lopez A. J. et al., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2: 301-11, (2001)). CD22 on 135 kDa suurune B-raku-spetsiifiline sialoglükoproteiin, mida ekspresseerivad B-rakkude pinnale ainult diferentseerunud küpsed B-rakud (Dorken, B. et al., *J. Immunol.*, 136: 4470-4479 (1986)). Domineerivaks CD22 vormiks on inimesel CD22- $\beta$ , mis oma ekstratsellulaarses domeenis sisaldab seitset immunoglobuliini superperekonda kuuluvat domeeni (joonis 1) (Wilson, G. L. et al., *J. Exp. Med.*, 173: 137-146 (1991)). Variantsel vormil CD22- $\alpha$  puuduvad immunoglobuliini superperekonna domeenid 3 ja 4 (Stamenkovic, I., Seed, B., *Nature*, 345: 74-77 (1990)). Ligandi seondumine inimese CD22-ga on seotud immunoglobuliini superperekonna domeenidega 1 ja 2 (nimetatud ka epitoopideks 1 ja 2) (Engel, P. et al., *J. Exp. Med.*, 181: 1581-1586, 1995).

**[0008]** B-rakulise NHL puhul on CD22 ekspressiooni tase agressiivsetes ja indolentsetes populatsioonides vastavalt 91% kuni 99% (Cesano, A. et al., Blood, 100: 350a (2002)). CD22 võib toimida nii B-raku aktivatsioonikompleksi komponendina (Sato, S. et al., Semin. Immunol., 10: 287-296 (1998)) kui ka adhesioonimolekulina (Engel, Pl. et al., J. Immunol., 150: 4719-4732 (1993)). CD22-puudulikkusega hiirtel on B-rakkude eluiga lühem ja apoptoosi tase tõusnud, mis viitab selle antigeeni võtmerollile B-rakkude ellujäämisel (Otipoby, K. L. et al., Nature (Lond.), 384: 634-637 (1996)). Pärast oma loodusliku (looduslike) ligandi(de)ga seondumist internaliseeritakse CD22 kiiresti, nii et see võib olla potentsiaalseks kostimuleerivaks signaaliks primaarsetes B-rakkudes ja proapoptootiliseks signaaliks neoplastilistes B-rakkudes (Sato, S. et al., Immunity, 5: 551-562 (1996)).

**[0009]** CD22-vastaseid antikehasid on uuritud potentsiaalse ravivahendina B-rakulise vähi ja teiste B-raku proliferatiivste häirete puhul. Selliste CD22-vastaste antikehade hulka kuuluvad RFB4 (Mansfield, E. et al., Blood, 90: 2020-2026 (1997), WO 2005/117986), CMC-544 (DiJoseph, J. F., Blood, 103: 1807-1814 (2004)) ja LL2 (Pawlak-Byczkowska, E. J. et al., Cancer Res., 49: 4568-4577 (1989)). LL2 antikeha (varem nimetusega HPB-2) on CD22 antigeeni vastane hiire IgG2a monokloonne antikeha (Pawlak-Byczkowska, E. J. et al., (1989), *supra*). Immunohistoloogiliste *in vitro* uuringutega demonstreeriti LL2 antikeha reageerimist 50-ga 51-st testitud NHL B-raku proovist, samal ajal kui teiste kasvajate või normaalse mittelümfoidse koe puhul reaktsiooni ei täheldatud (Pawlak-Byczkowska (1989), *supra*, Stein, R. et al., Cancer Immunol. Immunother., 37: 293-298 (1993)).

**[0010]** Antikeha ja ravimi konjugaatide kasutamine vähi ravis tsütotoksiliste või tsütostaatiliste agensite, see tähendab kasvajakarakke tapvate või inhibeerivate ravimite paikseks kohaletoimetamiseks (Syrigos, Epenetos, (1999) Anticancer Research, 19: 605-614, Niculescu-Duvaz, Springer, (1997) Adv. Drg Del. Rev., 26: 151-172, US patent nr 4975278) võimaldab ravimüksuse suunatud ülekannet kasvajatesse ning nende rakusisest kogunemist seal, samal ajal kui nende ravimagensite süsteemne, konjugeerimata manustamine võib lisaks kasvajakarakkude soovitud eemaldamisele anda tulemuseks vastuvõetamatud toksilisuse tasemed normaalsetes rakkudes (Baldwin et al., (1986) Lancet, (15. märts 1986): 603-05, Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" trükises Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (toimetajad), 475-506). Seega soovitakse maksimaalset tõhusust koos minimaalse toksilisusega. Kasutamiseks nende strateegiate kohaselt on sobivatena pakutud polükloonseid antikehasid ja monokloonne

seid antikehasid (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Nendes meetodites kasutatavad ravimid hõlmavad daunomütsiini, doksorubitsiini, metotreksaati ja vindesiini (Rowland et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87 (1986)). Antikeha ja toksiiini konjugaatides kasutatavad toksiiinid hõlmavad bakteritoksiine nagu difteeriatoksiin, taimetoksiine nagu ritsiin, väikese molekuliga toksiiine nagu geldanamütsiin (Kerr et al., (1997) *Bioconjugate Chem.*, 8(6): 781-784, Mandler et al., (2000) *Journal 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), maitansinoide (EP 1391213, Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 8618-8623) ja kalihheamütsiini (Lode et al., (1998) *Cancer Res.*, 58: 2928, Hinman et al., (1993) *Cancer Res.*, 53: 3336-3342). Toksiinide tsütotoksiline ja tsütostaatiline toime võib tuleneda mehhanismidest, mis hõlmavad tubuliini sidumist, DNA sidumist või topoisomeraasi inhibeerimist (Meyer, D. L., Senter, P. D., "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" trükises *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 38. köide (2003) 23. peatükk, lk 229-237). Konjugeerituna suurte antikehade või retseptorite valguliste ligandidega kalduvad mõned tsütotoksilised ravimid inaktiivsusele või väiksemale aktiivsusele.

**[0011]** ZEVALIN<sup>®</sup> (ibritumomab tiuksetaan, Biogen/Idex) on antikeha ja radioisotoobi konjugaat, mis koosneb hiire IgG<sub>1</sub> κ monokloonsest antikehast, mis on suunatud normaalsete ja pahaloomuliste B-lümfotsüütide pinnal leiduva antigeeni CD20 vastu, ning tiourea linker-kelaatori abil seotud radioisotoobist <sup>111</sup>In või <sup>90</sup>Y (Wiseman et al., (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.*, 27(7): 766-77, Wiseman et al., (2002) *Blood*, 99(12): 4336-42, Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.*, 20(10): 2453-63, Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.*, 20(15): 3262-69). Kuigi ZEVALIN on aktiivne B-rakulise mitte-Hodgini' lümfoomi (NHL) vastu, toob selle manustamine enamuse patsientide jaoks kaasa tõsiseid ja kestvaid tsütopeeniasid. Antikeha ja ravimi konjugaat MYLOTARG<sup>™</sup> (gemtusumab osogamitsiin, Wyeth Pharmaceuticals), mis koosneb inimese CD33-vastasest antikehast, mis on seotud kalihheamütsiiniga, sai 2000. aastal heakskiidu akuutse müeloidleukeemia ravimiseks süstimise teel (*Drugs of the Future*, (2000) 25(7): 686, US patendipublikatsioonid US 4970198, 5079233, 5585089, 5606040, 5693762, 5739116, 5767285, 5773001). Antikeha ja ravimi konjugaat kantusumab mertansiin (Immunogen, Inc.), mis koosneb inimese C242-vastasest antikehast, mis on disulfiidlinkeri SPP kaudu seotud maitansinoid-ravimüksusega DM1, on arendatud antigeeni CanAg ekspresseerivate vähkide, nagu käärsoole-, kõhunäärme-, maovähk ja teised, ravimiseks. Anti-

keha ja ravimi konjugaat MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), mis koosneb eesnäärmespetsiifilise membraaniantigeeni (*prostate specific membrane antigen* - PSMA) vastasest antikehast, mis on seotud maitansinoid-ravimüksusega DM1, on arendamisel eesnäärmekasvajate võimalikuks ravimiseks. Sama maitansinoid-ravimüksus DM1 seoti mitte-disulfiidlinkeri SMCC kaudu hiire monokloonse antikehaga TA.1 (Chari et al., (1992) *Cancer Research*, 52: 127-131). Võrreldes vastava disulfiidlinkeri abil seotud konjugaadiga teatati selle konjugaadi puhul 200 korda väiksemast võimekusest. Arvati, et linker SMCC on selles konjugaadis "mittelõigatav".

**[0012]** Merelimusest *Dolabella auricularia* on eraldatud mitu lühikest bioloogiliselt aktiivset peptiidset ühendit (Pettit et al., (1993) *Tetrahedron*, 49: 9151, Nakamura et al., (1995) *Tetrahedron Letters*, 36: 5059-5062, Sone et al., (1995) *Journal Org. Chem.*, 60: 4474). Valmistatud on ka nende ühendite analooge ning mõnel neist on leitud bioloogiline aktiivsus (ülevaateks vaadake trükist Pettit et al., (1998) *Anti-Cancer Drug Design*, 13: 243-277). Näiteks võib tuua auristatiin E (US 5635483), merelimuse loodusliku produkti dolastatiin 10 sünteetilise analoogi, mis on tubuliini polümeriseerumist inhibeeriv agens ja mis seondub tubuliinis sama saidiga kui vähivastane ravim vinkristiin (G. R. Pettit, (1997) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 70: 1-79). Dolastatin 10, auristatiin PE ja auristatiin E on lineaarsed peptiidid, mis koosnevad neljast aminohappest, millest kolm on dolastatiini ühendiklassi jaoks unikaalsed, ning C-terminaalsest amiidist.

**[0013]** Auristatiinpeptiidid auristatiin E (AE) ja monometüülauristatiin (MMAE), mis on dolastatiini sünteetilised analoogid, konjugeeriti (i) monokloonsete kimäärsete cBR96-antikehadega (kartsinoomide Lewis Y - spetsiifilised), (ii) cAC10-ga, mis on hematoloogilistes pahaloomulistes kasvajates CD30-spetsiifiline (Klussman et al., (2004) *Bioconjugate Chemistry*, 15(4): 765-773, Doronina et al., (2003) *Nature Biotechnology*, 21(7): 778-784, "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", Francisco et al., (2003) *Blood*, 102(4): 1458-1465, US patendipublikatsioon 2004/0018194), (iii) CD20-vastaste antikehadega, nagu Rituxan<sup>®</sup> (rituksimab) (WO 04/032828), et ravida CD20 ekspresseerivaid vähke ja immuunhäireid, (iv) EphB2-vastaste antikehadega 2H9 ja IL-8-vastase antikehaga, et ravida jämesoolevähki (Mao et al., (2004) *Cancer Research*, 64(3): 781-788), (v) E-selektiini-vastase antikehaga (Bhaskar et al., (2003) *Cancer Res.*, 63:6387-6394), ning (vi) muude CD30-vastaste antikehadega (WO 03/043583). Monometüülauristatiini (MMAE) on konjugeeritud ka 2H9-ga, mis on tüüp I TM türosiinkinaasi retseptori EphB2R vastane

antikeha, hiire ja inimese EphB2R vahel on suur homoloogia ning seda ekspresseeritakse üle jämesoolekasvaja rakkudes (Mao et al., (2004) *Cancer Res.*, 64: 781-788).

**[0014]** On teada, et monometüülaauristatiin MMAF, mis on auristatiin E (MMAE) C-terminuses fenüülalaniini sisaldav variant (US patendipublikatsioonid 5767237 ja 6124431), on vähem võimekas kui MMAE, kuid monokloonsete antikehadega konjugeerituna on selle võimekus suurem (Senter et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 45. köide, kokkuvõte nr 623, esitatud 28. märtsil 2004). Auristatiin F – fenüüldiamiin (AFP), mis on MMAE fenüülalaniinivariant, seoti CD70-vastase monokloonse antikeha 1F6 C-terminusega üle fenüüldiamiin-vaheühendi 1F6 (Law et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 45. köide, kokkuvõte nr 625, esitatud 28. märtsil 2004).

**[0015]** Potentsiaalsete terapeutiliste ühenditena on uuritud ka CD22-vastaste antikehade ja toksiooni konjugaate. Näiteks kirjeldati varasemates töödes potentsiaalsete vähivastaste agensitena ritsiini A-ahelat sisaldavaid immunotoksiine, mis olid suunatud CD22-vastase antikeha vastu (May, R. D. et al., *Chemical Abstracts*, 106(21): 168656x, lk 35-36 (1987), Ghetie, M. A. et al., *Cancer Research*, 48: 2610-2617 (1988) ja Amlot, P. L. et al., *Blood*, 82(9): 2624-2633 (1993)). Kui toksiiniks oli radioaktiivne isotoop, näitas LL2 humaniseeritud (CDR-siiratud) IgG1 variant epratusumab teatavat radioimmunokonjugaadi terapeutilist aktiivsust (Juweid, M. E. et al., *Clin. Cancer Res.*, 5 (Suppl 10): 3292s-3303s (1999), Griffiths, G. L. et al., *J. Nucl. Med.*, 44: 77-84 (2003), Linden, O. et al., *Clin. Cancer Res.* 5 (suppl 10): 3287s-3291s (1999)).

**[0016]** Erialal esineb täiendav vajadus ravimite järele, mis on erinevate B-rakkudega seotud vähihaiguste ravimiseks, nagu lümfoomid, nagu mitte-Hodgkin'i lümfoom ja teised B-rakkude proliferatsiooni häired. Selleks eriti kasulikud ravimid hõlmavad B-rakkudele suunatud CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaate, mille puhul toksilisus on madalam ja siiski on olemas kasulik terapeutiline efektiivsus. Käesolev leiutus käsitleb neid ja teisi seni esile kerkinud piiranguid ja probleeme.

**[0017]** Ühegi viite puhul ei tähenda käesolevas taotluses tsiteerimine mõõndust, et see viide on käesoleva taotluse tehnika tase.

## KOKKUVÕTE

**[0018]** Leiutis käsitleb CD22-vastaseid antikehi ja nende kasutamise meetodeid.

**[0019]** Leiutis käsitleb antikeha, mis seondub CD22-ga, kus antikeha sisaldab kuut HVR-i:

- (1) HVR-H1, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 2,
- (2) HVR-H2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 4,
- (3) HVR-H3, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 6,
- (4) HVR-L1, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 10,
- (5) HVR-L2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 12 ja
- (6) HVR-L3, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 14, nagu on defineeritud patendinõudluses.

**[0020]** Lisaks sisaldab nimetatud antikeha raamistikku, mis pärineb  $V_H$  III alamrühma konsensusraamistikust ja  $V_L$  I alamrühma konsensusraamistikust, nagu on defineeritud patendinõudluses.

**[0021]** CD22-ga seonduv antikeha sisaldab SEQ ID NO: 16 raske ahela varieeruvat piirkonda.

**[0022]** Antikeha sisaldab SEQ ID NO: 18 kerge ahela varieeruvat piirkonda.

**[0023]** Nimetatud antikeha kodeerivat polünukleotiidi kirjeldatakse vektorina, mis sisaldab seda polünukleotiidi, ja peremeesrakuna, mis sisaldab seda vektorit. Peremeesrakk võib olla eukarüootne, näiteks on peremeesrakk Hiina hamstri munasarjarakk (CHO). Kirjeldatakse CD22-vastase antikeha valmistamise meetodit, mille kohaselt peremeesrakku kultiveeritakse tingimustes, mis sobivad antikeha kodeeriva polünukleotiidi ekspresseerimiseks, ja eraldatakse antikeha.

**[0024]** Ühe aspektina esitab leiutis CD22-ga seonduva antikeha, mida ekspresseeritakse raku pinnal. Ühe teostusena seondub antikeha epitoobiga inimese või hiire CD22 piirkonnas, mis sisaldab domeeni 1 või domeeni 2 või domeene 1 ja 2. Ühe teostusena on see rakk ime-tejarakk. Ühe teostusena on see rakk inimese rakk. Ühe teostusena on see rakk vähirakk. Ühe teostusena on see rakk B-rakk. Ühe teostusena on see vähirakk B-rakk.

**[0025]** Eespool nimetatud antikeha on monokloonne antikeha. Ühe teostusena on antikeha antikehafragment, mis on valitud grupist: Fab, Fab'-SH, Fv, scFv või (Fab')<sub>2</sub> fragment.



**[0026]** Kirjeldatakse CD22 bioloogilises proovis tuvastamise meetodit, meetod hõlmab bioloogilise proovi viimist ühendusse mistahes eespool nimetatud antikehaga tingimustes, mis lubavad antikehal seonduda CD22-ga, ning antikeha ja CD22 vahelise kompleksi moodustumise detekteerimist. Bioloogiline proov võib sisaldada B-rakke. Bioloogiline proov võib pärineda imetajalt, millel kas esineb või kahtlustatakse B-rakkude proliferatiivset häiret, sealhulgas, nendega piirdumata, lümfoomi, mitte-Hodgkin'i lümfoomi (NHL), agressiivset NHL-i, retsidiveerunud agressiivset NHL-i, retsidiveerunud indolentset NHL-i, refraktoorse NHL-i, refraktoorse indolentset NHL-i, kroonilist lümfotsütleukeemiat (CLL), väikerakulist lümfotsütaarse lümfoomi, leukeemiat, karvrakulist leukeemiat (HCL), akuutset lümfotsütleukeemiat (ALL) ja mantelrakulist lümfoomi.

**[0027]** Ühe aspektina kirjeldatakse CD22 suurenenud ekspressiooniga seotud raku proliferatiivse häire diagnoosimise meetodit, mis hõlmab bioloogilise proovi viimist ühendusse mistahes eespool nimetatud antikehaga, CD22 ekspressioonitaseme detekteerimist antikeha CD22-ga seondumise määramise teel ning CD22 ekspressioonitasemete võrdlemist testitavas rakus ja kontrollrakus, seejuures viitab ekspressioonitase, mis on testitavas rakus kõrgem kui kontrollrakus, CD22 suurenenud ekspressiooniga seotud raku proliferatiivsele häirele. Ühe näitena on testitav rakk patsiendilt, kellel kahtlustatakse raku proliferatiivset häiret nagu B-raku proliferatiivne häire. Ühe näitena on raku proliferatiivne häire valitud selliste B-raku häirete seast nagu, nendega piirdumata, lümfoom, mitte-Hodgkin'i lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiveerunud agressiivne NHL, retsidiveerunud indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsütleukeemia (CLL), väikerakuline lümfotsütaarne lümfoom, leukeemia, karvrakuline leukeemia (HCL), akuutne lümfotsütleukeemia (ALL) ja mantelrakuline lümfoom. Ühe näitena hõlmab meetod CD22 ekspressioonitaseme detekteerimist testitava raku pinnal ja CD22 ekspressioonitasemete võrdlemist testitava raku pinnal ja kontrollraku pinnal.

**[0028]** Ühe aspektina kirjeldatakse CD22 ekspressioonitaseme tõusuga rakkudes, nagu B-rakud, seotud raku proliferatiivse häire diagnoosimise meetodit, kus meetod hõlmab bioloogilise proovi viimist ühendusse mistahes eespool nimetatud antikehaga, testitavate rakkudega seondunud antikeha taseme määramist proovis, määrates selleks antikeha seondumise CD22-ga ning võrreldes rakkudega seondunud antikeha taset proovis selle tasemega kontrollrakkudes, kusjuures seondunud antikeha tase on normaliseeritud CD22 ekspresseerivate rakkude arvu suhtes testitavas ja kontrollproovides ja kusjuures ekspressioonitase, mis on

testitavas proovis kõrgem kui kontrollproovis, viitab CD22 suurenenud ekspressiooniga seotud rakkude proliferatiivsele häirele.

**[0029]** Ühe aspektina kirjeldatakse veres või seerumis lahustunud CD22 detekteerimise meetodit, meetod hõlmab B-raku proliferatiivse häire kahtlustusega imetajalt saadud vere- või seerumiproovi viimist ühendusse leiutisekohase CD22-vastase antikehaga ning lahustunud CD22 koguse suurenemise detekteerimist testitavas proovis võrrelduna normaalselt imetajalt saadud vere või seerumi kontrollproovis leituga. Ühe näitena on see detekteerimise meetod kasulik imetaja veres või seerumis lahustunud CD22 taseme tõusuga seotud B-raku proliferatiivse häire diagnoosimise meetodina.

**[0030]** Siin kirjeldatud antikehad hõlmavad tsüsteiini-modifitseeritud antikehasid, kus üks või mitu aminohapet lähteantikehas on asendatud vaba tsüsteiin-aminohappega, nagu on kirjeldatud trükises WO2006/034488 (käesolevasse täielikult viitena kaasatud). Sellisel viisil võib modifitseerida, st muteerida, CD22-vastase antikeha mistahes vormi. Näiteks võib Fab lähteantikehafragmendi modifitseerida tsüsteiini-modifitseeritud Fab-ks, mida järgnevas nimetatakse “tioFab”-ks. Samuti võib monokloonset lähteantikeha modifitseerida “tioMab”-ks. Tuleb märkida, et üks kohtmutatsioon annab tioFab-is ühe modifitseeritud tsüsteiinijäägi, samal ajal kui tioMab-is annab üks kohtmutatsioon kaks modifitseeritud tsüsteiinijääki, sest IgG antikeha on dimeerne. Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastased antikehad hõlmavad monokloonseid antikehasid, humaniseeritud või kimäärseid monokloonseid antikehasid ja antikehade antigeeni siduvaid fragmente, liitpolüpeptiide ja analooge, mis eelistatult seonduvad rakuga seotud CD22 polüpeptiididega. Alternatiivina võib tsüsteiini-modifitseeritud antikeha hõlmata ka antikeha, mis siin esitatud antikehas või Fab-s sisaldab tsüsteiini järjestusi disainimise ja/või antikeha selektsiooni tulemusena, näiteks antikeha disainimise ja selektsiooniga faagdisplei abil või kerge ja/või raske ahela raamistikujärjestuste ja konstantsete piirkondade *de novo* disainimise teel saaduna, ilma et seejuures oleks muudetud lähteantikeha. Tsüsteiini-modifitseeritud antikeha sisaldab ühte või enam vaba tsüsteiin-aminohapet tiolreaktiivsuse väärtusega vahemikus 0,6 kuni 1,0, 0,7 kuni 1,0 või 0,8 kuni 1,0. Vaba tsüsteiin-aminohape on tsüsteiinijääk, mis on inkorporeeritud lähteantikehasse ja mis ei ole disulfidsilla osaks. Tsüsteiini-modifitseeritud antikehad on kasulikud tsütotoksiliste ja/või kujutist tekitavate ühendite sidumiseks modifitseeritud tsüsteiini saiti, näiteks üle maleimiid- või halogenoatsetüülühma. Cys-jäägi tiolfunktsiooni nukleofiilne reaktiivsus maleimiidühma suhtes on ligikaudu 1000 korda suurem kui valgu mistahes muul

aminohappefunktsioonil, näiteks lüsiini aminorühmal või N-terminaalsel aminorühmal. Jodoatsetüül- ja maleimiidreagentide tiolispetsiifiline funktsioon võib reageerida amiinrühmadega, kuid selleks on vajalik kõrgem pH (>9,0) ja pikem reaktsiooniaeg (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London).

**[0031]** Ühe näitena sisaldab tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastane antikeha modifitseeritud tsüsteiini mistahes järgnevas asendis, kus asend kerges ahelas on numereeritud vastavalt Kabat'le (vaadake trükist Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. väljaanne. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) ja asend raskes ahelas (kaasa arvatud Fc-piirkond) vastavalt EL numeratsioonile (vaadake trükist Kabat et al., (1991), *supra*), kusjuures joonisel 17A allajoonimisega tähistatud kerge ahela konstantne piirkond algab asendis 108 (Kabat numeratsioon) ja joonistel 17B ja 17C allajoonimisega tähistatud raske ahela konstantne piirkond algab asendis 118 (EL numeratsioon). Asendile võib olla viidatud ka vastavalt täispika kerge või täispika raske ahela aminohapete läbivatele numeratsioonidele, mis on esitatud joonistel 17A-17C. Vastavalt leiutise ühele teostusele sisaldab CD22-vastane antikeha modifitseeritud tsüsteiini asendis Lc-V205C (Kabat' number: Val 205, läbiv number 210 joonisel 17A, mis on selles asendis modifitseeritud tsüsteiiniks). Kerges ahelas modifitseeritud tsüsteiin on tähistatud rasvases trükis, joonisel 17A kahekordselt allajoonitud tekstis. Ühe teostusena sisaldab CD22-vastane antikeha modifitseeritud tsüsteiini asendis Hc-A118C (EL number: Ala 118, läbiv number 121 joonisel 17B, mis on selles asendis modifitseeritud tsüsteiiniks). Raskes ahelas modifitseeritud tsüsteiin on tähistatud rasvases trükis, joonisel 17B kahekordselt allajoonitud tekstis. Ühe näitena sisaldab CD22-vastane antikeha modifitseeritud tsüsteiini asendis Fc-S400C (EL number: Ser 400, läbiv number Ser 400 joonisel 17C, mis on selles asendis modifitseeritud tsüsteiiniks). Raske ahela Fc-piirkonnas modifitseeritud tsüsteiin on tähistatud rasvases trükis, joonisel 17C kahekordselt allajoonitud tekstis. Teiste näidetena on tsüsteiin modifitseeritud mõnes järgnevatest raske ahela (kaasa arvatud Fc-piirkond) asenditest (vastavalt EL numeratsioonile): 41, 88, 116, 118, 120, 171, 282, 375 või 400. Seega on aminohapete vahetused leiutisekohase CD22-vastase lähteantikeha jaoks: A41C, A88C, S116C, A118C, T120C, A171C, V282C, S375C või S400C. Teiste näidetena on kerge ahela modifitseeritud tsüsteiin mistahes asendis (vastavalt Kabat' numeratsioonile) järgnevatest: 15, 43, 110, 144, 168, 205. Seega on aminohapete vahetused leiutisekohase CD22-vastase lähteantikeha jaoks: V15C, A43C, V110C, A144C, S168C või V205C.

**[0032]** Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastane antikeha sisaldab ühte või enamat vaba tsüsteiini-aminohapet, kusjuures tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastane antikeha seondub CD22 polüpeptiidiga ja on valmistatud protsessis, mis hõlmab CD22-vastase lähteantikeha ühe või enama aminohappejäägi asendamist tsüsteiiniga, kusjuures lähteantikeha sisaldab vähemalt ühte HVR järjestust, mis on valitud grupist:

- (a) HVR-L1 järjestus RSSQSIVHSNGNTFLE (SEQ ID NO: 9) või järjestus RSSQSIVHSVGNTFLE (SEQ ID NO: 10) (joonis 2B),
- (b) HVR-L2 järjestus KVSNRFS (SEQ ID NO: 12) (joonis 2B),
- (c) HVR-L3 järjestus FQGSQFPYT (SEQ ID NO: 14) (joonis 2B),
- (d) HVR-H1 järjestus GYEFSSWMN (SEQ ID NO: 2) (joonis 2A),
- (e) HVR-H2 järjestus GRIYPGDGTNYSGKFKG (SEQ ID NO: 4) (joonis 2A),
- (f) HVR-H3 järjestus DGSSWDWYFDV (SEQ ID NO: 6) (joonis 2A).

**[0033]** Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastane antikeha võib sisaldada aminohapete järjestust, mis on vähemalt ligikaudu 80% identne, alternatiivselt vähemalt ligikaudu 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% või 100% identne tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikehaga, millel on siin esitatud aminohapete järjestus, või tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikeha aminohapete järjestusega, millel puudub siin esitatud signaalpeptiid.

**[0034]** Samuti on käesolevas kirjeldatud eraldatud tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastane antikeha, mis sisaldab aminohapete järjestust, mida kodeerib nukleotiidjärjestus, mis hübridi-seerub komplemendiga DNA molekulist, mis kodeerib (a) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha, millel on siin esitatud täispikk aminohapete järjestus, (b) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha aminohapete järjestust, milles puudub siin esitatud signaalpeptiid, (c) transmembraanse tsüsteiini-modifitseeritud antikehavalgu ekstratsellulaarset domeeni koos siin esitatud signaalpeptiidiga või selleta, (d) mistahes siin esitatud nukleiinhappejärjestusega kodeeritud aminohapete järjestust või (e) mistahes spetsiifiliselt määratletud fragmenti siin esitatud täispikast tsüsteiini-modifitseeritud antikeha aminohapete järjestusest.

**[0035]** Samuti on kirjeldatud eraldatud tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastast antikeha, millel puuduvad N-terminaalne signaaljärjestus ja initsieeriv metioniin ning mida kodeerib nukleiinhappejärjestus, mis kodeerib siin esitatud aminohapete järjestust. Nimetatute saami-

seks vajalikke protseduure on siin samuti kirjeldatud, kusjuures need protseduurid hõlmavad vastavat kodeerivat nukleiinhappemolekuli sisaldavat vektorit sisaldava peremeesraku kultiveerimist tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ekspresseerimiseks sobivates tingimustes ja tsüsteiini-modifitseeritud antikeha eraldamist rakukultuurist.

**[0036]** Samuti on kirjeldatud eraldatud tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastast antikeha, millest on deleteeritud või milles on inaktiveeritud transmembranne domeen. Nimetatute saamiseks vajalikke protseduure on siin samuti kirjeldatud, kusjuures need protseduurid hõlmavad vastavat kodeerivat nukleiinhappemolekuli sisaldavat vektorit sisaldava peremeesraku kultiveerimist tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ekspresseerimiseks sobivates tingimustes ja tsüsteiini-modifitseeritud antikeha eraldamist rakukultuurist.

**[0037]** Samuti on kirjeldatud eraldatud kimäärseid tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastaseid antikehi, mis hõlmavad mistahes siin kirjeldatud tsüsteiini-modifitseeritud antikeha, millega on liidetud heteroloogne (mitte-CD) polüpeptiid. Selliste kimäärsete molekulide näited hõlmavad mistahes siin kirjeldatud tsüsteiini-modifitseeritud antikeha, millega on liidetud heteroloogne (mitte-CD) polüpeptiid, nagu näiteks epitoobi märkjärjestus või immunoglobuliini Fc-piirkond.

**[0038]** Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastane antikeha võib olla monokloonne antikeha, antikeha fragment, kimäärne antikeha, humaniseeritud antikeha, üheaaheline antikeha või antikeha, mis konkureerivalt inhibeerib CD22 polüpeptiidi vastase antikeha seondumist vastava antigeense epitoobiga. Vajadusel võivad antikehad olla konjugeeritud kasvu inhibeeriva või tsütotoksilise agensiga nagu toksiiniga, sealhulgas näiteks mõne auristatiini, antibiootikumi, radioaktiivse isotoobi, nukleolüütilise ensüümi või leiutise kohaselt nendesarnasega. Vastavalt vajadusele võib antikehasid toota CHO rakkudes või bakterirakkudes ja eelistatult inhibeerivad nad rakkudes, millega nad seonduvad, raku kasvu või proliferatsiooni või indutseerivad nende rakkude surma. Diagnostilistel eesmärkidel võivad antikehad olla detekteeritavalt märgistatud, seotud tahkele kandjale või muud sarnast.

**[0039]** Samuti on käesolevas kirjeldatud vektoreid, mis sisaldavad mistahes siin kirjeldatud CD22-vastast antikeha ja tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastast antikeha kodeerivat DNA-d. Samuti on kirjeldatud selliseid vektoreid sisaldavad peremeesrakud. Peremeesrakud võivad olla näiteks CHO rakud, *E. coli* rakud või pärmirakud. Lisaks on kirjeldatud siin kirjeldatud polüpeptiidide saamise protsessi, mis hõlmab peremeesrakkude kultiveerimist

soovitud polüpeptiidide ekspresseerimiseks sobivates tingimustes, ja soovitud polüpeptiidi eraldamist rakukultuurist.

**[0040]** Tsüsteiini-modifitseeritud antikehad võivad olla kasulikud vähiravis ja need hõlmavad rakupinna- ja transmembraansete retseptorite ning kasvajaseoseliste antigeenide (*tumor-associated antigens* - TAA) suhtes spetsiifilisi antikehasid. Selliseid antikehasid võib kasutada kui lihtsalt antikehasid (ei ole konjugeeritud ravim- või märgisüksusega) või antikeha ja ravimi konjugaatidena (*antibody-drug conjugates* – ADC). Leiutisekohaseid tsüsteiini-modifitseeritud antikehasid võib kohtspetsiifiliselt ja tõhusalt siduda tiolreaktiivse reagentiga. Tioolreaktiivne reagent võib olla multifunktsionaalne linker-reagent, püütav märgisreagent, fluorofoor-reagent või ravimi ja linkeri vaheühend. Tsüsteiini-modifitseeritud antikeha võib olla märgistatud detekteeritava märgisega, olla immobiliseeritud tahkes faasis kandjale ja/või olla konjugeeritud ravimüksusega. Tioolreaktiivsuse võib üldiselt anda mistahes antikehale, milles võib teha aminohapete asendamise reaktiivsete tsüsteiinidega kerge ahela piirkondades, mis valitakse järgmiste aminohapete vahemike hulgast: L-10 kuni L-20, L-38 kuni L-48, L-105 kuni L-115, L-139 kuni L-149, L-163 kuni L-173, ning raske ahela piirkondades, mis valitakse järgmiste aminohapete vahemike hulgast: H-35 kuni H-45, H-83 kuni H-93, H-114 kuni H-127 ja H-170 kuni H-184 ning Fc-piirkonnas vahemikes, mis valitakse järgnevatest: H-268 kuni H-291, H-319 kuni H-344, H-370 kuni H-380 ja H-395 kuni H-405, milles aminohapete asendite nummerdamine algab Kabat'i numeratsioonisüsteemi 1. asendist (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) ning jätkub seejärel läbivalt, nagu on avaldatud patendipublikatsioonis WO 2006/034488. Tioolreaktiivsuse võib üldiselt anda antikeha kindlatele domeenidele, nagu kerge ahela konstantne domeen (*light chain constant domain* - C<sub>L</sub>) ja raske ahela konstantsed domeenid C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> ja C<sub>H3</sub>. Tsüsteiiniga asendamisega, mis annavad tulemuseks tiolreaktiivsuse väärtused 0,6 ja enam, võib teha terviklike IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM antikehade raske ahela vastavates konstantsetes α-, δ-, ε-, γ- ja μ-domeenides, kaasa arvatud IgG alamklassides IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA ja IgA<sub>2</sub>. Sellised antikehad ja nende kasutamine on avaldatud patendipublikatsioonis WO 2006/034488.

**[0041]** Eelistatult säilitavad leiutisekohased tsüsteiini-modifitseeritud antikehad oma met-siktüüpi lähteantikehade antigeeni siduvad omadused. Seega on tsüsteiini-modifitseeritud antikehad eelistatult võimelised antigeenidega spetsiifiliselt seonduma. Sellised antigeenid

hõlmavad näiteks kasvajaseoselisi antigeene (TAA), rakupinna retseptorvalke, transmembraanseid valke, signaalvalke, raku elumust reguleerivaid faktoreid, raku prolifererumist reguleerivaid faktoreid, koe arengu või diferentseerumisega seotud molekule (näiteks on teada või arvatakse, et need molekulid panustavad sellesse funktsionaalselt), lümfokiine, tsütokiine, rakutsükli reguleerimisse kaasatud molekule, vaskulogeneesi kaasatud molekule ning angiogeneesiga seotud molekule (näiteks on teada või arvatakse, et need molekulid panustavad sellesse funktsionaalselt). Tsüsteiini-modifitseeritud antikeha võib olla diferentseerumisklastri faktoriks (nt mõni CD-valk, nendega piirdumata, ka CD22). Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastased antikehad säilitavad oma CD22-vastaste lähteantikehade antigeeni siduva võime. Seega on tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastased antikehad võimelised seonduma, eelistatult spetsiifiliselt, CD22 antigeenidega, sealhulgas inimese CD22  $\beta$ - ja/või  $\alpha$ -isovormidega, ja seda ka siis, kui selliseid antigeene ekspresseeritakse raku pinnal, sealhulgas, nendega piirdumata, B-rakkude pinnal.

**[0042]** Antikeha võib konjugeerida ka muude tiolreaktiivsete agensitega, mille reaktiivseks rühmaks on näiteks maleimiid, jodoatsetamiid, püridüüldisulfiid või muu tiolreaktiivne konjugeerimispartner (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc., Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.*, 3: 2, Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London, Means (1990) *Bioconjugate Chem.*, 1: 2, Hermanson, G. trükises *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, lk 40-55, 643-671). Partner võib olla tsütotoksiline agens (nt toksiin, nagu doksorubitsiin või läkakõhatoksiin), fluorofoor nagu fluorestseeruv värv, mis võib olla fluorestseiin või rodamiin, kelaativ agens detekteerimiseks või kiiritusravim metall, peptidüül- või mittepeptidüülmärgis või detekteeritav märgis või organismist eemaldamist modifitseeriv agens nagu mitmesugused polüetüleenglükooli isomeerid, kolmanda ühendiga seonduv peptiid või muu süsivesik või lipofiilne agens.

**[0043]** Veel ühe aspektina võib leiutisekohaseid antikehasid konjugeerida mistahes märgisüksusega, mille võib antikehaga kovalentselt siduda reaktiivse üksuse, aktiveeritud üksuse või tsüsteiini reaktiivse 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). Seotud märgis võib toimida: (i) pakkudes detekteeritavat signaali, (ii) interaktsioonis teise märgisega, et muuta

esimese või teise märgisega pakutavat detekteeritavat signaali, näiteks FRET-i (fluorestsentsi resonantsenergia ülekannet (*fluorescence resonance energy transfer*)), (iii) stabiliseerides interaktsioone või suurendades antigeeni või ligandiga seondumise afiinsust, (iv) mõjutades laengu, hüdrofoobsuse, kuju või muu füüsikalise parameetri kaudu liikuvust, näiteks elektroforeetilist liikuvust, või rakumembraani läbimise võimet, või (v) pakkudes püüdvat üksust, et moduleerida ligandi afiinsust, antikeha/antigeen seondumist või ionset komplekseerumist.

**[0044]** Märgistatud tsüsteinantikehad võivad olla kasutatavad diagnostilistes analüüsides, näiteks huvipakkuva antigeeni ekspresseerumise detekteerimiseks spetsiifilistes rakkudes, kudedes või seerumis. Diagnostilisteks rakendusteks märgistatakse antikeha tavaliselt detekteeritava märgisega. Kättesaadavad on paljud märgiseid, mida üldiselt võib rühmitada järgnevatesse kategooriatesse:

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  $^{213}\text{Bi}$ . Radioisotoobiga märgistatud antikehad on kasutatavad retseptorile suunatud detekteerimiskatsetes. Kasutades meetodeid, mida on kirjeldatud trükises *Current Protocols in Immunology*, 1. ja 2. väljaanne, toimetajad Coligen et al., Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991), võib antikeha märgistada ligandreaagentidega, mis seonduvad, moodustavad kelaadi või komplekseeruvad muul viisil radioisotoopmetalliga selliselt, et reagent on reaktiivne antikehasse disainitud tsüsteiini tioolrühmaga. Kelaativad ligandid, mis võivad komplekseeruda metalliiooniga, hõlmavad järgnevaid: DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA ja TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Radionukliide võib suunata sihtmärgile leiutisekohaste antikeha ja ravimi konjugaatidega kompleksi moodustamise abil (Wu et al., (2005) *Nature Biotechnology*, 23(9): 1137-1146).

**[0045]** Linker-reagente, nagu DOTA-maleimiid (4-maleimidobutüüramidobensüül-DOTA), võib valmistada aminobensüül-DOTA ja isopropüülkloroformaadiga (Aldrich) aktiveeritud 4-maleimidobutüürhappe (Fluka) reaktsioonis, millele järgneb trükises Axworthy et al., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(4): 1802-1807) kirjeldatud protseduur. DOTA-maleimiid-reagendid reageerivad tsüsteiini-modifitseeritud antikehade vabade tsüsteiinidega ning annavad metalliga komplekseeruva ligandi antikehal (Lewis et al., (1998) *Bioconj. Chem.*, 9: 72-86). Kelaativa linkeriga märgistavad reagendid, nagu DOTA-NHS (1,4,7,10-tetraasatsükloododekaan-1,4,7,10-tetraäädikhappe mono(N-hüdrosüsuktsiinimiid)ester) on kaubanduslikult saadavad (Macrocyclics, Dallas, TX). Detekteerides ja kvantifitseerides antikehade progresseeruvat kogunemist kasvajakoes, võib retseptori suunatud kuvamine radio-



nukliididega märgistatud antikehadega anda markeri raja aktiveerimiseks (Albert et al., (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8: 1207-1210). Konjugeeritud radiometallid võivad pärast lüsoosomaalset lagundamist jääda rakusiseseks.

**[0046]** Detekteerimiskatseteks antikeha märgistena sobivaid metall-kelaat komplekse on avaldatud järgnevatel: patendipublikatsioonides US 5342606, US 5428155, US 5316757, US 5480990, US 5462725, US 5428139, US 5385893, US 5739294, US 5750660 ja US 5834456 ning trükistes Hnatowich et al., (1983) *J. Immunol. Methods*, 65: 147-157, Meares et al., (1984) *Anal. Biochem.*, 142: 68-78, Mirzadeh et al., (1990) *Bioconjugate Chem.*, 1: 59-65, Meares et al., (1990) *J. Cancer*, 1990, Suppl. 10: 21-26, Izard et al., (1992) *Bioconjugate Chem.*, 3: 346-350, Nikula et al., (1995) *Nucl. Med. Biol.*, 22: 387-90, Camera et al., (1993) *Nucl. Med. Biol.*, 20: 955-62, Kukis et al., (1998) *J. Nucl. Med.*, 39: 2105-2110, Verel et al., (2003) *J. Nucl. Med.*, 44: 1663-1670, Camera et al., (1994) *J. Nucl. Med.*, 21: 640-646, Ruegg et al., (1990) *Cancer Res.*, 50: 4221-4226, Verel et al., (2003) *J. Nucl. Med.*, 44: 1663-1670, Lee et al., (2001) *Cancer Res.*, 61: 4474-4482, Mitchell, et al., (2003) *J. Nucl. Med.*, 44: 1105-1112, Kobayashi et al., (1999) *Bioconjugate Chem.*, 10: 103-111, Miederer et al., (2004) *J. Nucl. Med.*, 45: 129-137, DeNardo et al., (1998) *Clinical Cancer Research*, 4: 2483-90, Blend et al., (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 18: 355-363, Nikula et al., (1999) *J. Nucl. Med.*, 40: 166-76, Kobayashi et al., (1998) *J. Nucl. Med.*, 39: 829-36, Mardirossian et al., (1993) *Nucl. Med. Biol.*, 20: 65-74, Roselli et al., (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14: 209-20.

(b) Fluorestsentsmärgised on sellised, nagu haruldaste muldmetallide kelaadid (euroopiumi kelaadid), fluorestseiini tüübid, sealhulgas FITC, 5-karboksüfluorestseiin, 6-karboksüfluorestseiin, rodamiini tüübid, sealhulgas TAMRA, dansüül, lissamiin, tsüaniinid, fukoerütriinid, Texas Red ning nende analoogid. Fluorestsentsmärgiseid võib antikehaga konjugeerida näiteks trükises *Current Protocols in Immunology*, *supra*, avaldatud meetodite abil. Fluorestseeruvad värvid ja fluorestseeruvad märgistamisreagendid hõlmavad ka neid, mis on kaubanduslikult saadavad firmadest Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) ja Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

(c) Mitmesugused ensüüm/substraat-märgised on kättesaadavad või avaldatud (US 4275149). Üldiselt katalüüsib ensüüm kromogeense substraadi keemilist muutust, mida võib mõõta mitmesuguste meetoditega. Näiteks võib ensüüm katalüüsida substraadi värvi muutust, mida võib mõõta spektrofotomeetriliselt. Alternatiivina võib ensüüm muuta substraadi fluorest-

sentsi või kemoluminestsentsi. Eespool on kirjeldatud fluorestsentsi muutuse kvantifitseerimise meetodeid. Keemilise reaktsiooniga tekitatakse kemoluminestsents-substraadi ergastatud elektronolek ning seejärel kiirgab see valgust, mida võib mõõta (kasutades näiteks kemoluminomeetrit), või mis on energiadoonoriks fluorestseeruvale aktseptorile. Ensümaatiliste märgiste näited hõlmavad lutsiferaase (nt jaanimardika lutsiferaas ja bakteri lutsiferaas, US 4737456), lutsiferiini, 2,3-dihüdroftalasiindioone, malaadi dehüdrogenaasi, ureat, peroksüdaasi, nagu mädarõika peroksüdaas (*horseradish peroxidase* - HRP), aluselist fosfataasi (*alkaline phosphatase* - AP),  $\beta$ -galaktosidaasi, glükoamülaasi, lüsoosüümi, sahhariidi oksüdaase (nt glükoosi oksüdaasi, galaktoosi oksüdaasi ja glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaasi), heterotsükliite oksüdaase (nagu urikaas ja ksantiini oksüdaas), laktoperoksüdaasi, mikroperoksüdaasi ja nendesarnaseid. Ensüümide antikehadega konjugeerimise meetodeid on kirjeldatud trükises O'Sullivan et al., (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", *Methods in Enzym.* (toimetajad J. Langone ja H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73, 147-166.

**[0047]** Ensüüm-substraat-kombinatsioonide näited hõlmavad näiteks:

- (i) mädarõika peroksüdaasi (HRP) koos substraadiks oleva vesinikperoksiidiga, kusjuures vesinikperoksiid oksüdeerib värvi prekursorit (nt ortofenüleendiamiini (OPD) või 3,3',5,5'-tetrametüülbensidiinhüdrokloriidi (TMB)),
- (ii) aluselist fosfataasi (AP) koos kromogeenseks substraadiks oleva para-nitrofenüülfosfaadiga ning
- (iii)  $\beta$ -D-galaktosidaasi ( $\beta$ -D-Gal) koos kromogeense substraadi (nt p-nitrofenüül- $\beta$ -D-galaktosiidi) või fluorogeense substraadiga 4-metüülumbelliferüül- $\beta$ -D-galaktosiid.

**[0048]** Eriala asjatundjatele on kättesaadavad arvukad muud ensüüm-substraat-kombinatsioonid. Üldiseks ülevaateks vaadake patendipublikatsioone US 4275149 ja US 4318980.

**[0049]** Märgis võib olla kaudselt konjugeeritud aminohappe külghela, aminohappe aktiveeritud külghela või tsüsteiini-modifitseeritud antikeha või sarnastega. Näiteks võib antikeha olla konjugeeritud biotiiniga ning ükskõik millisesse eespool mainitud kolme laia kategooriasse kuuluva märgise võib konjugeerida avidiini või streptavidiiniga või vastupidi. Biotiin seondub selektiivselt streptavidiiniga ning seega võib sellisel kaudsel viisil märgise konjugeerida antikehaga. Alternatiivselt võib märgise kaudseks konjugeerimiseks polüpep-

tiidvariandiga konjugeerida kõigepealt polüpeptiidvariandi väikese hapteeniga (nt digoksiiniga) ning seejärel konjugeerida mõne eelnevalt mainitud erinevatest märgistest hapteenivastase polüpeptiidvariandiga (nt digoksiinivastase antikehaga). Selliselt võib saavutada märgise kaudse konjugeerimise polüpeptiidvariandiga (Hermanson, G. (1996) trükises *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego).

**[0050]** Antikeha võib rakendada mistahes tuntud analüüsimeetodis, nagu ELISA, konkureeriva seondumise analüüsid, otsesed ja kaudsed kihilised analüüsid ja immuunsadestamisanalüüsid (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, lk 147-158, CRC Press, Inc.).

**[0051]** Detekteeritav märgis võib olla kasutatav seondumis- või äratundmissündmuse asukoha määramiseks, selle kujutamiseks ja kvantifitseerimiseks. Märgistatud antikehadega võib detekteerida rakupinna retseptoreid. Veel üheks detekteeritavalt märgistatud antikehade kasutamiseviisiks on partiklipõhine immuunpüüdmissmeetod (*bead-based immunocapture*), mis hõlmab partikli märgistamist fluorestseeruva antikehaga ning fluorestsentssignaali detekteerimist ligandiga seondumisel. Sarnastes seondumise detekteerimise meetodikates kasutatakse antikeha-antigeeni interaktsioonide mõõtmiseks ja detekteerimiseks ka pinna-plasmonresonantsi efekti (*surface plasmon resonance – SPR*).

**[0052]** Detekteeritavad märgised, nagu fluorestseeruvad värvid ja kemoluminesceeruvad 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), annavad detekteeritava signaali ja on üldiselt rakendatavad antikehade märgistamiseks, kus märgistatud antikehad on eelistatult järgmiste omadustega: (i) märgistatud antikeha peaks tekitama väga tugeva signaali koos madala taustamüraga selliselt, et antikehade väikesi koguseid saab tundlikult detekteerida nii rakuvabades kui rakupõhistes analüüsides, ning (ii) märgistatud antikeha peaks olema fotostabiilne selliselt, et fluorestsentssignaali võib vaadelda, jälgida ja salvestada märkimisväärse fotopleegituseta (*photo bleaching*). Rakendusteks, mis hõlmavad märgistatud antikeha seondumist membraanide või rakkude pinnaga, eriti elusate rakkude pinnaga, on märgistel eelistatult (iii) hea lahustuvus vees, et saavutada konjugaadi tõhus kontsentratsioon ja detekteerimise tundlikkus ning (iv) märgistatud antikehad ei ole elusatele rakkudele toksilised, need ei kahjusta rakkude normaalseid ainevahetusprotsesse ega põhjusta enneaegset rakusurma.

**[0053]** Raku fluorestsentsi intensiivsuse vahetu kvantifitseerimine ja fluorestseeruvalt märgistatud sündmuste, näiteks peptiidi ja värvi konjugaatide raku pinnaga seondumise aktide loendamine võib toimuda süsteemi (FMAT<sup>®</sup> 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) abil, mis automatiseerib sega-ja-mõõda tüüpi mitteradioaktiivseid analüüse elusate rakkude või partiklitega (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 retseptoriga seondumise analüüse, immuunpüüdmisanalüüse, fluorestsentsiseoselisi immunosorbentanalüüse (*fluorescence linked immunosorbent assays* - FLISA), kaspaasiga lõikamist (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), apoptoosi (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods, 184: 39-51) ja tsütotoksilisuse analüüse. Üles- või allareguleerimist raku pinnale suunatud molekuli toimetel saab hinnata fluorimeetrilist mikromahus analüüsimise tehnoloogiat kasutades (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem., 271: 143-51).

**[0054]** Märgistatud antikehad on kasutatavad detekteeritavate biomarkerite ja sondidena mitmesugustes biomeditsiinilistes ja molekulaarse detekteerimise meetodites, nagu: (i) MRK (magnetresonants-detekteerimine), (ii) mikroKT (kompuutertomograafia), (iii) SPECT (üksiku footoni emissioon-kompuutertomograafia (*single photon emission computed tomography*)), (iv) PET (positronemissioontomograafia), Chen *et al.*, (2004) Bioconjugate Chem., 15: 41-49, (v) bioluminestsents, (vi) fluorestsents ning (vii) ultraheli. Immunostsintigraafia on detekteerimistoiming, mille puhul loomale või inimpatsiendile manustatakse radioaktiivsete ainetega märgistatud antikehasid ning tehakse pilte kohtadest kehas, kuhu antikeha lokaliseerub (US 6528624). Detekteeritavaid biomarkereid võib objektiivselt mõõta ja hinnata kui farmakoloogiliste reaktsioonide näidikut normaalsete bioloogiliste protsesside, patogeensete protsesside või ravisekkumisele. Biomarkereid võib olla mitut tüüpi. Tüüp 0 on ajaloolised, loomulikud haigusmarkerid ja juba kaua on teada nende korreleerumine tuntud kliiniliste näidustustega, selle näiteks on liigesepõletiku MRI-diagnostika reumatoidartriidi puhul. I tüüpi markerid detekteerivad sekkumise mõju vastavalt toimemehhanismile isegi

siis, kui see mehhanism pole seotud kliinilise väljundiga. II tüüpi markerid, nagu KT-ga mõõdetud luu kulumine reumatoidartriidi puhul, toimivad asendus-mõjutusobjektina, mille puhul biomarkeri või sellest lähtuva signaali muutus ennustab kliinilist kasulikkust, “valideerides” sihtmärgiks olevat reaktsiooni. Seega võivad detekteeritavad biomarkerid pakkuda farmakodünaamilist (FD) raviinfot järgneva kohta: (i) sihtmärkvalgu ekspressioon, (ii) ravimi seondumine sihtmärkvalguga, see tähendab selektiivsus, ning (iii) farmakokineetilised andmed organismist eemaldamise ja poolväärtusaja kohta. Detekteeritavate *in vivo* biomarkerite eelised võrreldes laboris analüüsitavate biomarkeritega hõlmavad järgnevaid: mitteinvasiivne töötlus, kvantifitseeritavus, kogu keha hindamine, korduv, see tähendab mitmes ajapunktis annustamine ja hindamine ning võimalik toimete ülekantavus eelkliinilistest (väikestel loomadel) tulemustest kliinilisteks (inimestel). Mõne rakenduse puhul asendab biodetekteerimine eelkliinilistes uuringutes loomkatseid või vähendab nende arvu.

**[0055]** Peptiidide märgistamise meetodid on hästi tuntud, vaadake trükiseid Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc., Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.*, 3: 2, Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London, Means (1990) *Bioconjugate Chem.*, 1: 2, Glazer et al., (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (toimetajad T. S. Work ja E. Work) American Elsevier Publishing Co., New York, Lundblad, R. L., Noyes, C. M., (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, köited I ja II, CRC Press, New York, Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, toimetaja H. Tschesche, Walter DeGruyter, 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.

**[0056]** Kahe üksusega, piisavalt ligistikku paiknevate fluorestseeruva reporteri ja kustutiga märgistatud peptiidide ja valkude puhul tekib fluorestsentsi resonantsenergia ülekanne (FRET). Reporterrühmad on üldjuhul kindla lainepikkusega valgusega ergastatavad värvid, mis maksimaalse ereduse ja sobiva Stokes'i nihkega kiirgamiseks kannavad energia aktseptor- või kustutirühmale. Fluorestseeruvad värvid hõlmavad laiendatud aromaatsusega molekule, nagu fluorestseiin ja rodamiin ning nende derivaadid. Fluorestseeruv reporter võib

terviklikus peptiidis olla osaliselt või praktiliselt kustutatud kustutiüksusega. Peptiidi lõikamisel peptidaasi või proteaasiga võib detekteeritavalt mõõta fluorestsentsi suurenemist (Knight, C., (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248, 18-34).

**[0057]** Märgistatud antikehasid võib kasutada ka afiinsupuhastamisagensina. Selle toimingu kohaselt immobiliseeritakse tehnika tasemes hästi tuntud toimingute abil märgistatud antikeha tahkele faasile, nagu Sephadex-vaik või filterpaber. Immobiliseeritud antikeha viiakse ühendusse puhastatavat antigeeni sisaldava prooviga ning seejärel pestakse kandjat sobiva lahustiga, mis eemaldab praktiliselt kogu proovis oleva materjali, välja arvatud puhastatava antigeeni, mis on seondunud immobiliseeritud polüpeptiidvariandile. Lõpuks pestakse kandjat veel ühe sobiva lahustiga nagu glütsiinpuhev, mille pH on 5,0, selle pesemise käigus vabaneb antigeen polüpeptiidilt.

**[0058]** Üldjuhul on märgistavatel reagentidel funktsionaalsed rühmad, mis võivad reageerida (i) otseselt tsüsteiini tiolrühmaga tsüsteiini-modifitseeritud antikehas, et moodustuks märgistatud antikeha, (ii) linker-reagendiga, et moodustuks linker-märgis-vaheühend, või (iii) linker-antikehaga, et moodustuks märgistatud antikeha. Märgistavate reagentide funktsionaalsed rühmad hõlmavad: maleimiid-, haloatsetüül-, jodoatsetamiidsuktsiinimidüülester- (nt NHS, N-hüdroksüsuktsiinimiid-), isotiotsüanaat-, sulfonüülkloriid-, 2,6-diklorotriasiinüül-, pentafluorofenüülester- ja fosforamidiitühmi, kuigi kasutada võib ka muid funktsionaalseid rühmi

**[0059]** Üks iseloomulik funktsionaalne reaktiivne rühm on N-hüdroksüsuktsiinimidüülester (NHS), milles karboksüülrühm on asendatud detekteeritava märgisega, nagu biotiin või fluorestseeruv värv. Märgise NHS-estri võib eelnevalt moodustada, eraldada, puhastada ja/või iseloomustada või selle võib moodustada *in situ* ja lasta reageerida antikeha nukleofiilse rühmaga. Üldjuhul aktiveeritakse märgise karboksüülvorm reageerimisel karbodiimiidreagendi, näiteks ditsükloheksüülkarbodiimiidi, diisopropüülkarbodiimiidi, või urooniumreagendi, näiteks TSTU (O-(N-suktsiinimidüül)-N,N,N',N'-tetrametüülurooniumtetrafluoroboraadi), HBTU (O-bensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaadi) või HATU (O-(7-asabensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaadi) või mingi aktivaatori nagu 1-hüdroksübensotriasool (HOBt) ning N-hüdroksüsuktsiinimiidi mõne kombinatsiooniga, et saada märgise NHS-ester. Mõnel juhul võib märgise ja antikeha siduda, aktiveerides märgise *in situ* ja lastes sellel reageerida antikehaga, et ühe etapina

moodustada märgise ja antikeha konjugaat. Muud aktiveerivad ja sidumisreagendid hõlmavad järgnevat: TBTU (2-(1H-bensotriasool-1-üül)-1-1,3,3-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat), TFFH (N,N',N'',N'''-tetrametüüluroonium-2-fluoroheksafluorofosfaat), PyBOP (bensotriasool-1-üüloksütrispürrolidinofoosooniumheksafluorofosfaat), EEDQ (2-etoksü-1-etoksükarbonüül-1,2-dihüdrokinoliin), DCC (ditsükloheksüülkarbodiimid), DIPCDI (diisopropüülkarbodiimid), MSNT (1-(mesitüleen-2-sulfonüül)-3-nitro-1H-1,2,4-triasool ning arüül-sulfonüülhaliidid, näiteks triisopropüülbenseensulfonüülkloriid).

#### Albumiiniga seonduva peptiidi - Fab-i ühendid

**[0060]** Antikeha võib liita albumiiniga seonduva valguga. Plasmavalguga seondumine võib olla tõhus abinõu lühikese poolväärtusajaga molekulide farmakokineetiliste omaduste parandamiseks. Albumiin on kõige valdavam valk plasmas. Seerumi albumiiniga seonduvad peptiidid (*albumin binding peptides* - ABP) võivad muuta nendega liidetud aktiivsete domeenidega valkude farmakodünaamikat, sealhulgas muuta koesse haaramist, läbitavust ja difundeerumist. Neid farmakokineetilisi parameetreid võib moduleerida seerumi albumiiniga seonduva sobiva peptiidi valimisega (US 20040001827). Albumiiniga seonduvate peptiidide seeriaid on tuvastatud faagdisplei meetodil skriinimisega (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). Leiutisekohased ühendid hõlmavad ABP-järjestusi, mida on kirjeldatud järgnevates trükistes: (i) Dennis et al., (2002) J. Biol. Chem., 277: 35035-35043, tabelid III ja IV, lk 35038, (ii) US 20040001827, lõigus [0076] SEQ ID NO: 9-22, ning (iii) WO 01/45746, lehekülgedel 12-13. Albumiiniga seonduvad (ABP) Fab-id kujundatakse, liites albumiiniga seonduva peptiidi näiteks Fab-i raske ahela C-terminusega stöhhiomeetrilises suhtes 1 : 1 (1 ABP / 1 Fab). Hiirtes ja küülikutes on näidatud, et seotus albumiiniga ABP-Fab-ides suurendab antikeha poolväärtusaega enam kui 25 korda. Seega võib eespool mainitud reaktiivseid tsüsteiinijääke sisestada ABP-Fab-idesse ning kasutada kohtspetsiifiliseks konjugeerimiseks tsütotoksiliste ravimitega, millele järgnevad loomkatsed *in vivo*.

**[0061]** Iseloomulikud albumiiniga seonduvad peptiididjärjestused hõlmavad, nendega piirumata, järjestuste SEQ ID NO: 42-46 aminohapete järjestusi:

CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 42
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 43
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 44
RLIEDICLPRWGCLWEDD	SEQ ID NO: 45
DICLPRWGCLW	SEQ ID NO: 46

### Antikeha ja ravimi konjugaadid

**[0062]** Ühe aspektina esitab leiutis immunokonjugaadid või antikeha ja ravimi konjugaadid (ADC), mis sisaldavad antikeha, mis on konjugeeritud tsütotoksilise agensiga, nagu kemo-terapeutiline agens, ravim, kasvu inhibeeriv agens, toksiin (nt bakteriaalsest, taimsest, seen-, või loomsest allikast pärinev ensümaatilisel aktiivne toksiin või selle fragmendid) või radio-aktiivne isotoop (st radiokonjugaat), nagu on defineeritud patendinõudluses. Lisaks esitab leiutis veel ühe aspektina immunokonjugaatide kasutamise meetodid. Immunokonjugaat sisaldab CD22-vastast antikeha, mis on kovalentselt seotud tsütotoksilise agensiga, nagu on defineeritud patendinõudluses.

**[0063]** Antikeha ja ravimi konjugaatide kasutamine tsütotoksiliste või tsütostaatiliste agen-site, see tähendab kasvajakarakke tapvate või inhibeerivate ravimite, paikseks kohaletoime-tamiseks (Syrigos, Epenetos, (1999) *Anticancer Research*, 19: 605-614, Niculescu-Duvaz, Springer, (1997) *Adv. Drg Del. Rev.*, 26: 151-172, US patent 4975278) võimaldab vähiravis ravimüksuse suunatud ülekannet kasvajatesse ning selle rakusisest kogunemist kasvajates siis, kui nende ravimagensite süsteemne manustamine konjugeerimata kujul võib lisaks kas-vajarakkude soovitud eemaldamisele anda tulemuseks vastuvõetamatu toksilisuse taseme normaalsetes rakkudes (Baldwin et al., (1986) *Lancet*, (15. märts, 1986): 603-05, Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," trükises *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al. (toime-tajad), lk 475-506). Seega soovitakse maksimaalset tõhusust koos minimaalse toksilisusega. Nende strateegiate rakendamisel on sobivad nii polükloonsed kui monokloonsed antikehad (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Nendes meetodites kasutatavad ravimid hõlmavad daunomütsiini, doksorubitsiini, metotreksaati ja vindesiini (Rowland et al., (1986) *supra*). Antikeha ja toksiooni konjugaatides kasutatavad toksiidid hõlmavad bakteritoksiine nagu difteeriatoksiin, taimetoksiine nagu ritsiin, väikese molekuliga



toksiine nagu geldanamütsiin (Mandler et al., (2000) *Jour. 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), maitansinoidide (EP 1391213, Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 8618-8623) ja kalihheamütsiini (Lode et al., (1998) *Cancer Res.*, 58: 2928, Hinman et al., (1993) *Cancer Res.*, 53: 3336-3342). Toksiinide tsütotoksilised ja tsütostaatilised toimed võivad mõjuda mehhanismide kaudu, mis hõlmavad tubuliini sidumist, DNA sidumist või topoisomeraasi inhibeerimist. Mõnel tsütotoksilisel ravimil on kalduvus inaktiivsusele või väiksemale aktiivsusele, kui see on konjugeeritud suurte antikehade või retseptorite valguliste ligandidega.

**[0064]** ZEVALIN<sup>®</sup> (ibritumomab tiuksetaan, Biogen/Idex) on antikeha ja radioisotoobi konjugaat, mis koosneb hiire IgG<sub>1</sub> κ monokloonsest antikehast, mis on suunatud normaalsete ja pahaloomuliste B-lümfotsüütide pinnal leiduva antigeeni CD20 vastu, ning radioisotoobist <sup>111</sup>In või <sup>90</sup>Y, mis on seotud tiourea linker-kelaatori kaudu (Wiseman et al., (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.*, 27(7): 766-77, Wiseman et al., (2002) *Blood*, 99(12): 4336-42, Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.*, 20(10): 2453-63, Witzig et al., (2002) *J. Clin. Oncol.*, 20(15): 3262-69). Kuigi ZEVALIN'il on aktiivsus B-rakulise mitte-Hodgini' lümfoomi (NHL) vastu, toob manustamine enamusel patsientidel kaasa tõsised ja kestvad tsütopeeniad. Antikeha ja ravimi konjugaat MYLOTARG<sup>™</sup> (gemtusumab ozogamitsiin, Wyeth Pharmaceuticals), mis koosneb inimese CD33-vastasest antikehast, mis on seotud kalihheamütsiiniga, sai 2000. aastal heakskiidu akuutse müeloidleukeemia ravimiseks injektsiooni teel (*Drugs of the Future*, (2000) 25(7): 686, US patendid nr 4970198, 5079233, 5585089, 5606040, 5693762, 5739116, 5767285, 5773001). Antikeha ja ravimi konjugaat kantusumab mertansiin (Immunogen, Inc.), mis koosneb huC242 antikehast, mis on disulfidlinkeri SPP kaudu seotud maitansinoidravimüksusega DM1, on antigeeni CanAg ekspresseerivate vähkide, nagu käärsoole-, kõhunäärme-, maovähk ja teised, ravimiseks jõudnud II faasi kliiniliste katsetuseni. Antikeha ja ravimi konjugaat MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), mis koosneb eesnäärmespetsiifilise membraaniantigeeni (PSMA) vastasest monokloonsest antikehast, mis on seotud maitansinoidravimüksusega DM1, on arendamisel eesnäärme kasvaja ravimiseks. Auristatiinpeptiidid auristatiin E (AE) ja monometüülauristatiin (MMAE), mis on dolastatiini sünteetilised analoogid, konjugeeriti monokloonsete kimäärsete antikehadega cBR96 (kartsinoomides Lewis Y - spetsiifiline) ja cAC10 (mis on

hematoloogilistes pahaloomulistes kasvajates CD30-spetsiifiline) (Doronina et al., (2003) Nature Biotechnology, 21(7): 778-784), ning need on ravimiarenduses.

**[0065]** Siin kirjeldatakse immunokonjugaatide valmistamiseks kasutatavaid kemoterapeutilisi agenseid. Kasutamised sobivad ensümaatiliselts aktiivsed toksiidid ja nende fragmendid hõlmavad difteeriatoksiini A-ahelat, difteeriatoksiiniga mitteseonduvaid aktiivseid fragmente, eksotoksiini A-ahelat (*Pseudomonas aeruginosa*'st), ritsiini A-ahelat, abriini A-ahelat, modeksiini A-ahelat,  $\alpha$ -sartsiini, *Aleurites fordii* valke, dantiin-valke, *Phytolaca americana* valke (PAPI, PAPII ja PAP-S), *Momordica charantia*'st pärinevat inhibiitorit, kurtsiini, kroitiini, *Sapaonaria officinalis*'est pärinevat inhibiitorit, geloniini, mitogelliini, restriktotsiini, fenomütsiini, enomütsiini ja trikotetseene, vaadake näiteks patendipublikatsiooni WO 93/21232, mis on avaldatud 28. oktoobril 1993. Radiokonjugeeritud antikehade valmistamiseks on kättesaadavad mitmesugused radionukliidid. Näited hõlmavad järgnevaid:  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  ja  $^{186}\text{Re}$ . Antikeha ja tsütotoksilise agensi konjugaadid valmistatakse mitmesuguste valguga seondumise bifunktsionaalsete agensite abil, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditiool)propionaat (SPDP), iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladiipimidaat-HCl), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehüüdid (nagu glutaaraldehüüd), bisasido-ühendid (nagu bis(p-asidobensoüül)heksaandiamiin), bisdiasooniumi derivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluuen-2,6-diisotsüanaat) ja bisaktiivsed fluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Näiteks võib ritsiini immunotoksiini valmistada, nagu on kirjeldatud trükises Vitetta et al., (1987) Science, 238: 1098.  $^{14}\text{C}$ -märgistatud 1-isotiotsüanatobensüül-3-metüüldietüleentriaminopentaäädikhape (MX-DTPA) on iseloomulik kelaativ agens radionukleotiidi konjugeerimiseks antikehaga (WO94/11026).

**[0066]** Samuti peetakse siin võimalikuks antikeha konjugaate ühe või enama väikesemolekulise toksiiniga, nagu kalihheamütsiin, maitansinoidid, dolastatiinid, auristatiinid, trikotetseen ja CC1065, ning nende toksiinide toksiiiniaktiivsusega derivaatidega.

#### Maitansiin ja maitansinoidid

**[0067]** Mõnes teostuses sisaldab leiutisekohane immunokonjugaat antikeha (täispikka või fragmente), mis on konjugeeritud ühe või enama maitansinoidmolekuliga.

[0068] Maitansinoidid on mitoosi inhibiitorid, mis toimivad, inhibeerides tubuliini polümeeriseerumist. Maitansiin eraldati esmalt Ida-Aafrika põõsastaimest *Maytenus serrata* (US patendipublikatsioon 3896111). Järgnevalt avastati, et teatud mikroobid toodavad samuti maitansinoide, nagu maitansinool ja C-3-maitansinoolestrid (US patendipublikatsioon 4151042). Sünteetiline maitansinool ning selle derivaadid ja analoogid on avaldatud näiteks US patendipublikatsioonides 4137230, 4248870, 4256746, 4260608, 4265814, 4294757, 4307016, 4308268, 4308269, 4309428, 4313946, 4315929, 4317821, 4322348, 4331598, 4361650, 4364866, 4424219, 4450254, 4362663 ja 4371533.

[0069] Maitansinoidravimüksused on antikeha ja ravimi konjugaatide valmistamiseks huvipakkuvad üksused, sest need: (i) on suhteliselt hõlpsalt valmistatavad fermenteerimise või fermenteerimissaaduste keemilise muutmise, derivaatimisega, (ii) võimaldavad derivaatimist funktsionaalsete rühmadega, mis sobivad konjugeerimiseks antikehadega mitte-disulfidlinkerite kaudu, (iii) on stabiilsed plasmas, ning (iv) on tõhusad mitmesuguste kasvajarakkude liinide vastu.

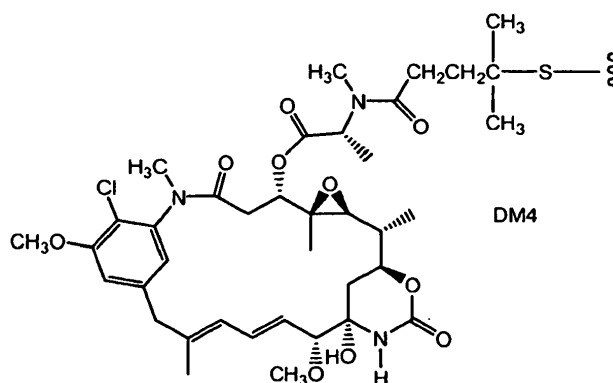
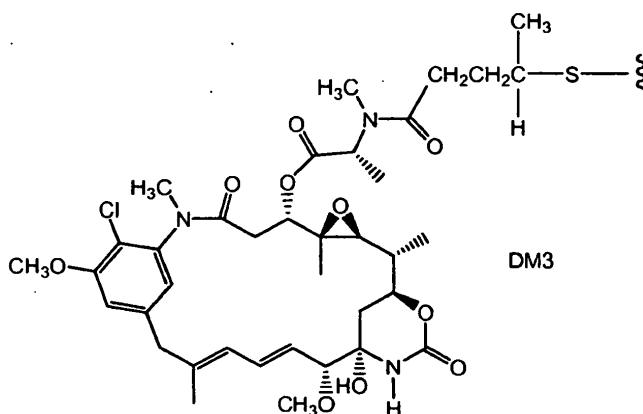
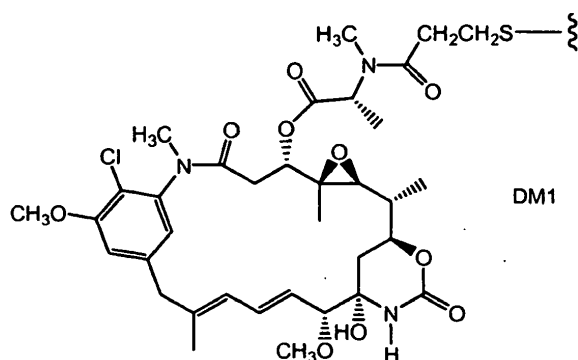
[0071] Maitansiiniühendid, mis sobivad kasutamiseks maitansinoidravimüksustena, on tehnika tasemes hästi tuntud ja neid võib vastavalt tuntud meetoditele eraldada looduslikest allikatest või toota geneetilise muundamise meetodite abil (vaadake Yu et al., (2002) PNAS, 99: 7968-7973), või nendeks võivad olla tuntud meetodite abil sünteetiliselt valmistatud maitansinool ja maitansinooli analoogid.

[0072] Iseloomulikud maitansinoidüksused hõlmavad neid, milles on muudetud aroomaatset tsükkel, nagu on C-19-dekloro- (US 4256746) (valmistatakse ansamütotsiin P2 redutseerimisel liitiumalumiiniumhüdriidiga), C-20-hüdroksü- (või C-20-demetüül-), ±C-19-dekloro- (US patendipublikatsioonid 4361650 ja 4307016) (valmistatakse demetüülimisega, kasutades *Streptomyces*'t või *Actinomyces*'t, või dekloorimisega, kasutades LAH-i) ning C-20-demetoksü-, C-20-atsüloksü- (-OCOR), (±)-dekloromaitansinoidid (US patendipublikatsioon 4294757) (valmistatakse atsüülimisega, kasutades atsüülkloriidi) ning neid, millel on muudatused teistes asendites.

[0072] Iseloomulikud maitansinoidüksused hõlmavad ka neid, milles on järgnevad muudatused: C-9-SH- (US 4424219) (valmistatakse maitansinooli reageerimisel H<sub>2</sub>S või P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>-ga), C-14-alkoksümetüül- (demetoksü/CH<sub>2</sub>OR) (US patendipublikatsioon 4331598), C-14-hüdroksümetüül- või atsüloksümetüül- (CH<sub>2</sub>OH või CH<sub>2</sub>OAc) (US patendipublikatsioon 4450254) (valmistatakse *Nocardia*'st), C-15-hüdroksü/atsüloksü- (US patendipublikatsioon

4364866) (valmistatakse maitansinooli muundamisel *Streptomyces*'e abil), C-15-metoksü- (US patendipublikatsioonid 4313946 ja 4315929) (eraldatud *Trewia nudiflora*'st), C-18-N-demetüül- (US patendipublikatsioonid 4362663 ja 4322348) (valmistatakse maitansinooli demetüülimisel *Streptomyces*'ega) ning 4,5-deoksümaitansinoidid (US patendipublikatsioon 4371533) (valmistatakse maitansinooli redutseerimisel titaantrikloriidi/LAH-ga).

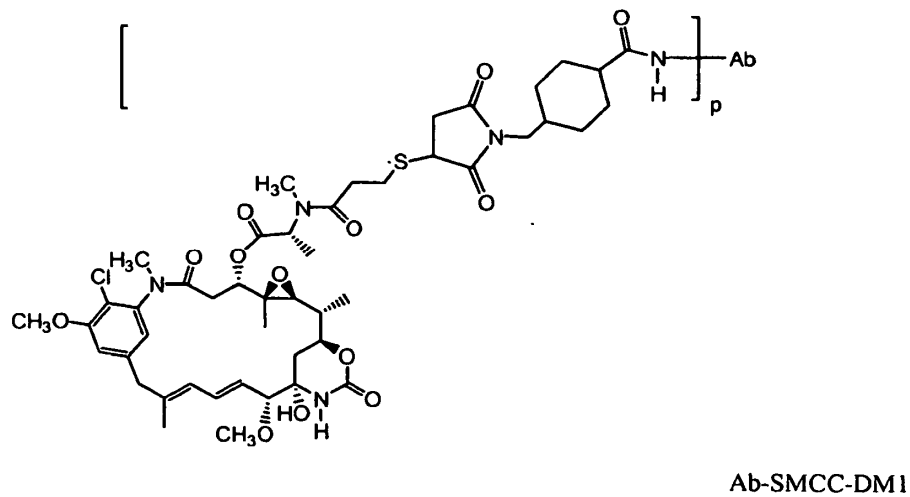
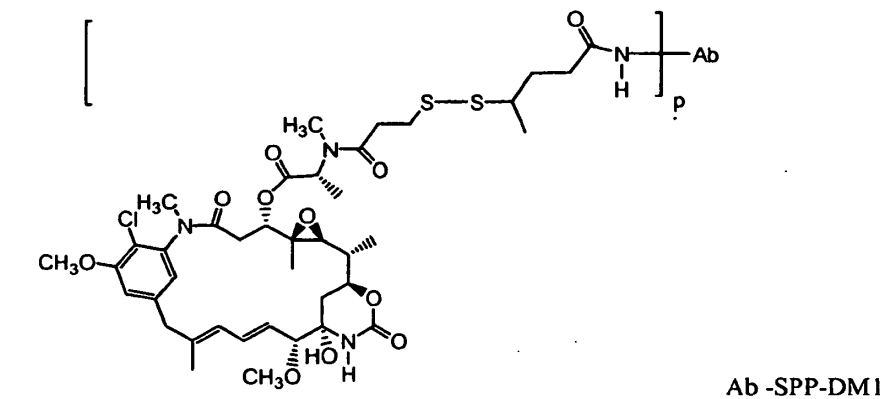
[0073] Maitansinoidravimüksuste iseloomulikud teostused hõlmavad DM1, DM3 ja DM4 ning neil on järgnevad struktuurid:



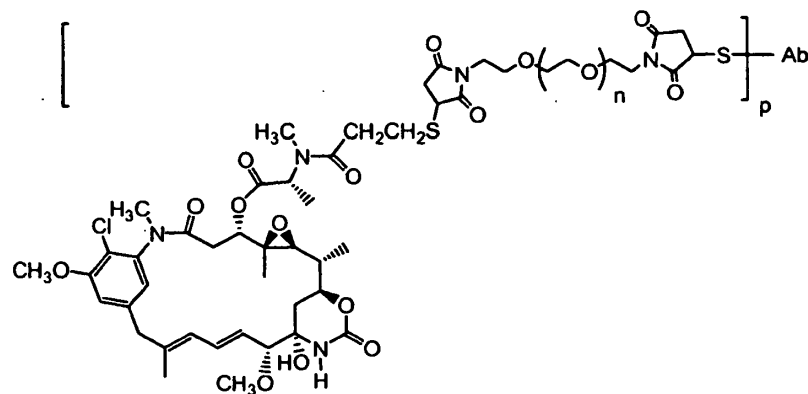
milles laineline joon näitab ravimi väävliatomi kovalentset sidet antikeha ja ravimi konjuugaadi linkeriga (L). HERCEPTIN® (trastusumab, HER2-vastane antikeha), mis on seotud DM1-ga SMCC kaudu, on avaldatud (patendipublikatsioonis WO 2005/037992). Käesoleva

leiuatise kohase antikeha ja ravimi konjugaadi võib valmistada vastavalt siin avaldatud protseduuridele.

[0074] Muudel iseloomulikel maitansinoidi ja antikeha ravimkonjugaatidel on järgnevad struktuurid ja lühendid (kus Ab on antikeha ja p on 1 kuni ligikaudu 8):



[0075] Iseloomulikel antikeha ja ravimi konjugaatidel, milles DM1 on linkeri BMPEO kaudu seotud antikeha tiolrühmaga, on järgnev struktuur ja lühendid:



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

[0076] Maitansinoide sisaldavad immunokonjugaadid, nende valmistamise meetodid ja nende kasutamine ravis on avaldatud näiteks US patendipublikatsioonides 5208020, 5416064, 6441163 ja Euroopa patendipublikatsioonis EP 0 425 235 B1. Trükises Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 8618-8623 (1996) kirjeldatakse immunokonjugaate, mis sisaldavad maitansinoidi tähistusega DM1, mis on seotud inimese pärasoolevähi rakkude vastu suunatud monokloonse antikehaga C242. Leiti, et see konjugaat on käärsoolevähi kultiveeritud rakkudele väga tsütotoksiline ning kasvaja *in vivo* kasvu analüüsis ilmnes selle kasvajakasvatuse aktiivsus. Trükises Chari et al., Cancer Research, 52: 127-131 (1992) kirjeldatakse immunokonjugaate, milles maitansinoid oli disulfiidlinkeri kaudu konjugeeritud hiire antikehaga A7, mis seondub antigeeniga inimese käärsoolekasvaja rakuliinides, või veel ühe hiire monokloonse antikehaga TA.1, mis seondub onkogeeniga HER-2/neu. *In vitro* testiti TA.1 ja maitansinoidi konjugaadi tsütotoksilisust inimese rinnavähi rakuliinil SK-BR-3, mis ekspresseerib raku kohta  $3 \times 10^5$  pinnaantigeeni HER-2 molekuli. Ravimkonjugaat saavutas sama tsütotoksilisuse näidu, mis on vabal maitansinoidravimil, ning seda võis suurendada, suurendades maitansinoidimolekulide arvu antikehamolekuli kohta. A7 ja maitansinoidi konjugaadi puhul ilmnes vähene süsteemne tsütotoksilisus hiirtes.

[0077] Keemiliselt valmistatakse CD22-vastase antikeha ja maitansinoidi konjugaate, sidudes antikeha maitansinoidimolekuliga, ilma et antikeha või maitansinoidimolekuli bioloogiline aktiivsus märkimisväärselt väheneks, vaadake näiteks US patendipublikatsiooni 5208020. On näidatud, et keskmiselt kolmel kuni neljal konjugeeritud maitansinoidimolekulil antikehamolekuli kohta on sihtmärkrakkude tsütotoksilisust võimendav toime, ilma et see mõjaks negatiivselt antikeha funktsioonile või lahustuvusele, ehkki isegi ühe toksiooni/antikehamolekuli puhul võiks eeldada tsütotoksilisuse võimendumist võrreldes konjugeerimata antikeha kasutamisega. Maitansinoidid on tehnika tasemes hästi tuntud ja neid võib sünteesida tuntud meetodite abil või eraldada looduslikest allikatest. Sobivaid maitansinoide on avaldatud näiteks US patendipublikatsioonides 5208020 ja teistes patentides ning mittepatentsetes trükistes, millele siin eespool on viidatud. Eelistatavad maitansinoidid on maitansinool ja maitansinooli analoogid, nagu mitmesugused maitansinooli estrid, milles on muudatused aromaatses tsükli või maitansinoidimolekuli muudes asendites.

[0078] Antikeha ja maitansinoidi konjugaatide valmistamise tehnika tasemes on tuntud palju siduvaid rühmi, mis hõlmavad näiteks US patendipublikatsioonides 5208020 ja 6441163 või Euroopa patendipublikatsioonides 0 425 235 B1, trükistes Chari et al., Cancer Research, 52:

127-131 (1992) ja US patendipublikatsioonis 2005/0169933 A1 avaldatuid. Linker-osana SMCC-d sisaldavaid antikeha ja maitansinoidi konjugaate võib valmistada nii, nagu on avaldatud US patendipublikatsioonis 11/141344, mis on sisse antud 31. mail 2005, "Antibody Drug Conjugates and Methods". Siduvad rühmad hõlmavad disulfiidrühmi, tioeeterrühmi, happetundlikke rühmi, valgustundlikke rühmi, peptidaasitundlikke rühmi või esteraasitundlikke rühmi, nagu on avaldatud eespool nimetatud patentides. Siin kirjeldatakse lisarühmi sidumiseks ja tuuakse nende näiteid.

**[0079]** Antikeha ja maitansinoidi konjugaate võib valmistada, kasutades selleks mitmesuguseid valke siduvaid bifunktsionaalseid agenseid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditiool)propionaat (SPDP), suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat (SMCC), iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüül-adipimidaat-HCl), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehydid (nagu glutaaraldehydid), bisasidoühendid (nagu bis(p-asidobensüül)heksaandiamiin), bisdiasoonium-derivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluen-2,6-diisotsüanaat) ja bisaktiivsed fluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Eriti eelistatavad disulfiidsidet pakkuvad siduvad agensid hõlmavad N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditiool)propionati (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J., 173: 723-737 (1978)) ja N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüültio)pentanoaati (SPP).

**[0080]** Sõltuvalt ühenduse tüübist võib linkeri maitansinoidimolekuliga siduda mitmesugustes asendites. Näiteks estersideme võib moodustada reageerimisel hüdroksüülrühmaga, kasutades tavapäraseid sidumise meetodeid. Reaktsioon võib toimuda asendis C-3, kus on hüdroksüülrühm, asendis C-14, mis on modifitseeritud hüdroksümetüülrühmaga, asendis C-15, mis on modifitseeritud hüdroksüülrühmaga, ning asendis C-20, kus on hüdroksüülrühm. Eelistatud teostusena moodustatakse ühendus maitansinooli või maitansinooli analoogi asendis C-3.

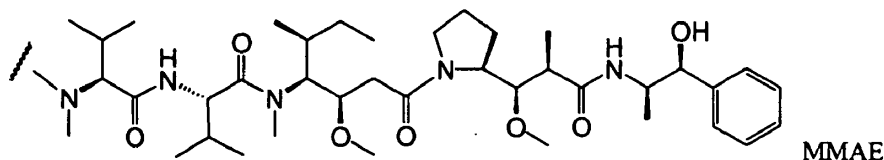
**[0081]** Ühes teostuses on antikeha (täispikk või fragment) konjugeeritud ühe või enama maitansinoidimolekuliga. Immunokonjugaadi ühes teostuses on tsütotoksiline agens D maitansinoid DM1. Immunokonjugaadi ühes teostuses on linker SMCC. Ühes teostuses on antikeha ja linkeri ja ravimi konjugaat siin esitatud CD22-vastane antikeha, mis on üle SMCC linkeri kovalentselt seotud tsütotoksilise agensiga DM1.

### Auristatiinid ja dolastatiinid

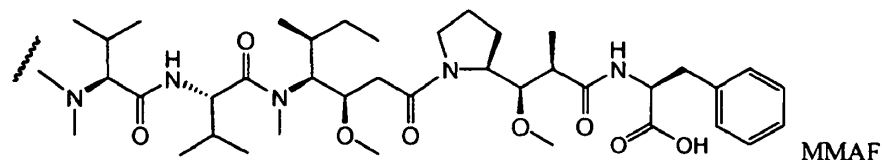
**[0082]** Mõnes teostuses hõlmab leiutisekohane immunokonjugaat antikeha, mis on konjugeeritud dolastatiinide või dolastatiini peptiidsete analoogide ja derivaatidega, milleks on auristatiinid (US patendipublikatsioonid 5635483 ja 5780588). On näidatud, et dolastatiinid ja auristatiinid häirivad mikrotuubulite dünaamikat, GTP hüdrolüüsi ning tuuma- ja raku jagunemist (Woyke et al., (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 45(12): 3580-3584) ning neil on vähivastane (US patendipublikatsioon 5663149) ja seenevastane aktiivsus (Pettit et al., (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 2961-2965). Dolastatiin- või auristatiinravimüksuse võib siduda antikehaga peptiidse ravimüksuse N- (amino-) või C- (karboksüül-) terminuse kaudu (patendipublikatsioon WO 02/088172).

**[0083]** Iseloomulikud auristatiiniteostused hõlmavad N-terminuse kaudu seotud monomeetüülauristatiinüksusi DE ja DF, mis on avaldatud trükises Senter et al., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 45. köide, kokkuvõte nr 623, esitatud 28. märtsil 2004, mis on käesolevasse viitena eriti kaasatud.

**[0084]** Iseloomulik on auristatiiniteostus MMAE (milles laineline joon näitab kovalentset sidet antikeha-ravim konjugaadi linkeriga (L)):

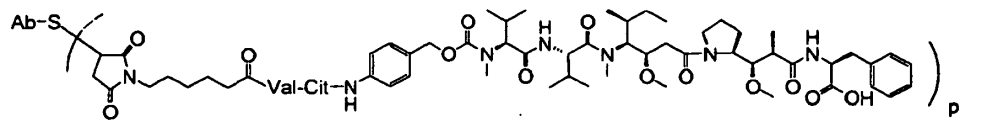


**[0085]** Veel üks iseloomulik auristatiiniteostus on MMAF, milles laineline joon näitab kovalentset sidet antikeha ja ravimi konjugaadi linkeriga (L) (US patendipublikatsioon 2005/0238649):

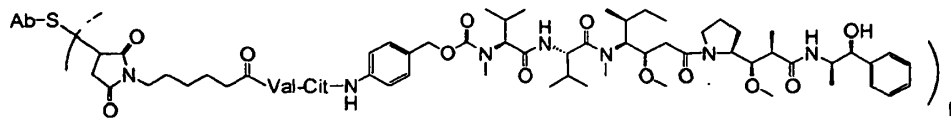


**[0086]** Iseloomulikel lisateostustel, mis hõlmavad MMAE-d või MMAF-i ning mitmesuguseid linkerose (mida kirjeldatakse siin allpool), on järgnevad struktuurid ja lühendid (milles Ab tähendab antikeha ja p on 1 kuni ligikaudu 8):

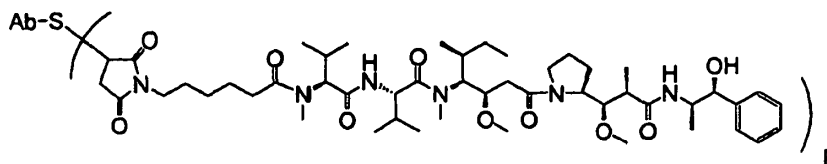




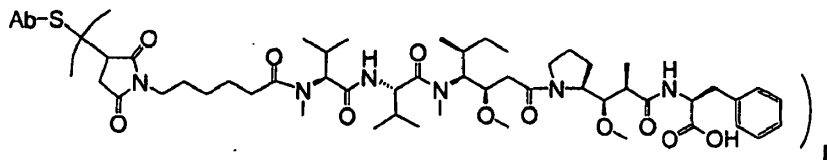
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

[0087] Üldjuhul võib peptiidipõhiseid ravimüksusi valmistada, moodustades kahe või enama aminohappe ja/või peptiidi fragmendi vahele peptiidsideme. Selliseid peptiidsidemeid võib valmistada näiteks vastavalt vedelfaasi-sünteesi meetodile (vaadake trükist E. Schröder, K. Lübke, "The Peptides", 1. köide, lk 76-136, 1965, Academic Press), mis on peptiidikeemia valdkonnas hästi tuntud. Auristatiin- või dolastatiinravimüksused võib valmistada vastavalt järgnevas trükistes toodud meetoditele: US patendipublikatsioonid 5635483 ja 5780588, trükised Pettit et al., (1989) J. Am. Chem. Soc., 111: 5463-5465, Pettit et al., (1998) Anti-Cancer Drug Design, 13: 243-277, Pettit, G. R. et al., Synthesis, 1996, 719-725, Pettit et al., (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 5: 859-863 ning Doronina (2003) Nat. Biotechnol., 21(7): 778-784.

### Kalihheamütsiin

[0088] Muude teostustena hõlmab leiutisekohane immunokonjugaat antikeha, mis on konjugeeritud ühe või enama kalihheamütsiinmolekuliga. Antibiootikumide kalihheamütsiiniperekond on vähem kui pikomolaarsetes kontsentratsioonides võimeline tekitama kaheaheelise DNA katkestusi. Kalihheamütsiiniperekonna konjugaatide valmistamiseks vaadake US patendipublikatsioone 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 ja

5877296 (kõik kuuluvad firmale American Cyanamid Company). Kasutamiseks sobivad kalihheamütsiini struktuursed analoogid hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid:  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-atsetüül- $\gamma_1^I$ , PSAG ja  $\theta_1^I$  (Hinman et al., Cancer Research, 53: 3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research, 58: 2925-2928 (1998) ja firmale American Cyanamid kuuluvad eespool nimetatud US patendid). Veel üks kasvajakavastane ravim, millega antikeha võib konjugeerida, on QFA, mis on folaadivastane agens. Nii kalihheamütsiin kui QFA toimivad raku-siseselt ning ei läbi hõlpsalt plasmamembraani. Seetõttu võimendab nende agensite sissetamine rakku antikehavahendatud internaliseerimise teel tugevalt nende agensite tsütotoksilist efekti.

#### Muud tsütotoksilised agensid

**[0089]** Muud kasvajakavastased agensid, mida võib konjugeerida antikehadega, hõlmavad BCNU-d, streptosoitsiini, vinkristiini, 5-fluorouratsiili ja US patendipublikatsioonides 5053394 ja 5770710 kirjeldatud LL-E33288 kompleksina tuntud agensite perekonna liikmeid ning lisaks esperamütsiini (US patendipublikatsioon 5877296).

**[0090]** Kasutamiseks sobivad ensümaatilistelt aktiivsed toksiinid ja nende fragmendid hõlmavad difteeria A-ahelat, difteeriatoksiini mitteseonduvaid aktiivseid fragmente, eksotoksiini A-ahelat (*Pseudomonas aeruginosa*'st), ritsiini A-ahelat, abriini A-ahelat, modeksiini A-ahelat,  $\alpha$ -sartsiini, *Aleurites fordii* valke, diantiinvalke, *Phytolacca americana* valke (PAPI, PAPII ja PAP-S), *Momordica charantia*'st pärinevat inhibiitorit, kurtsiini, krotiini, *Sapaonaria officinalis*'est pärinevat inhibiitorit, geloniini, mitogelliini, restriktotsiini, fenomütsiini, enomütsiini ning trikotetseene, vaadake näiteks patendipublikatsiooni WO 93/21232, mis on avaldatud 28. oktoobril 1993.

**[0091]** Lisaks peetakse käesoleva leiutise kohaselt võimalikuks immunokonjugaati, mis moodustatakse antikeha ja nukleolüütilise aktiivsusega ühendi (nt ribonukleaasi või DNA endonukleaasi, nagu desoksüribonukleaas, DNAas) vahel.

**[0092]** Kasvaja selektiivseks hävitamiseks võib antikeha sisaldada väga radioaktiivset aatomit. Radiokonjugeeritud antikehade tootmiseks on kättesaadavad mitmesugused radioaktiivsed isotoobid. Nende näited hõlmavad  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  ja Lu radioaktiivseid isotoope. Kui konjugaati kasutatakse detekteerimiseks, siis võib see sisaldada radioaktiivset aatomit stsintigraafilisteks uuringuteks, näiteks  $^{99m}Tc$  või  $^{123}I$  või

spin-märgist, nagu  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ , gadoliinium, mangaan või raud, tuuma magnetresonantsi (TMR) detekteerimiseks (tuntud ka kui magnetresonants kuvamine MRK).

**[0093]** Radio- ja muid märgiseid võib konjugaatidesse sisestada tuntud viisidel. Näiteks võib sobivaid aminohapete prekursoreid kasutades biosünteesida või aminohapete keemilise sünteesiga sünteesida peptiidi, milles vesiniku asemel on näiteks  $^{19}\text{F}$ . Märgiseid, nagu  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  või  $^{123}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  ja  $^{111}\text{In}$ , võib siduda peptiidis oleva tsüsteiinijäägi kaudu.  $^{90}\text{Y}$  võib siduda lüsiinijäägi kaudu.  $^{123}\text{I}$  koosseisu lülitamiseks võib kasutada IODOGEN meetodit (Fraker et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80: 49-57 (1978)). Trükises *Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy* (Chatal, CRC Press, 1989) kirjeldatakse üksikasjalikult muid meetodeid.

**[0094]** Antikeha ja tsütotoksiline agensi konjugaatide valmistamiseks kasutatakse erinevaid valke siduvaid bifunktsionaalseid agenseid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditiool)propionaat (SPDP), suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaad (SMCC), iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladiipimidaat-HCl), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehyüdid (nagu glutaaraldehyüd), bisasidoühendid (nagu bis(p-asidobensüül)heksaandiamiin), bisdiasooniumderivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluen-2,6-diisotsüanaat) ja bisaktiivsed fluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Ritsiini immunotoksiini võib näiteks valmistada selliselt, nagu on kirjeldatud trükises Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987).  $^{14}\text{C}$ -märgistatud 1-isotiotsüanatobensüül-3-metüüldietüleentriaminopentaäädikhape (MX-DTPA) on näitlik kelaativ agens antikeha konjugeerimiseks radionukleotiidiga, vaadake patendipublikatsiooni WO 94/11026. Linker võib olla „lõigatav linker“, mis soodustab tsütotoksilise ravimi vabanemist rakus. Näiteks võib kasutada happe tundlikku linkerit, peptidaasitundlikku linkerit, valgustundlikku linkerit, dimetüüllinkerit või disulfiidi sisaldavat linkerit (Chari et al., *Cancer Research*, 52: 127-131 (1992), US patendipublikatsioon 5208020).

**[0095]** Eriti hõlmavad leiutisekohased ühendid, nendega piirdumata, ADC-sid, mis on valmistatud ristsiduvate reagentidega 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 ja sulfo-SMPB ning SVSB (suktsiinimidüül-(4-vinüülsulfoon)bensoaat), mis on kaubanduslikult saadavad (nt firmast Pierce Biotechnology, Inc.,

Rockford, IL., US), vaadake lehekülgi 467-498 2003-2004 aasta rakenduste käsiraamatus ja kataloogis (*Applications Handbook and Catalog*).

### Antikeha ja ravimi konjugaatide valmistamine

**[0096]** Leiutisekohastes antikeha ja ravimi konjugaatides (ADC) on antikeha (*antibody* - Ab) linkeri (L) kaudu konjugeeritud ühe või enama ravimüksusega (*drug* - D), näiteks ligikaudu 1 kuni ligikaudu 20 ravimüksusega antikeha kohta. Valemi 1 kohase ADC võib orgaanilise keemia reaktsioone, tingimusi ja reagente kasutades valmistada mitmel viisil, mis on eriala asjatundjatele tuntud ja hõlmavad järgnevaid: (1) antikeha nukleofiilse rühma reaktsioon bivalentse linker-reagendiga, et kovalentse sidumisega moodustada Ab-L, ning millele järgneb reageerimine ravimüksusega D, ning (2) ravimüksuse nukleofiilse rühma reaktsioon bivalentse linker-reagendiga, et kovalentse sidumisega moodustada D-L, millele järgneb reageerimine antikeha nukleofiilse rühmaga. Siin kirjeldatakse ADC-de valmistamise lisa-meetodeid.

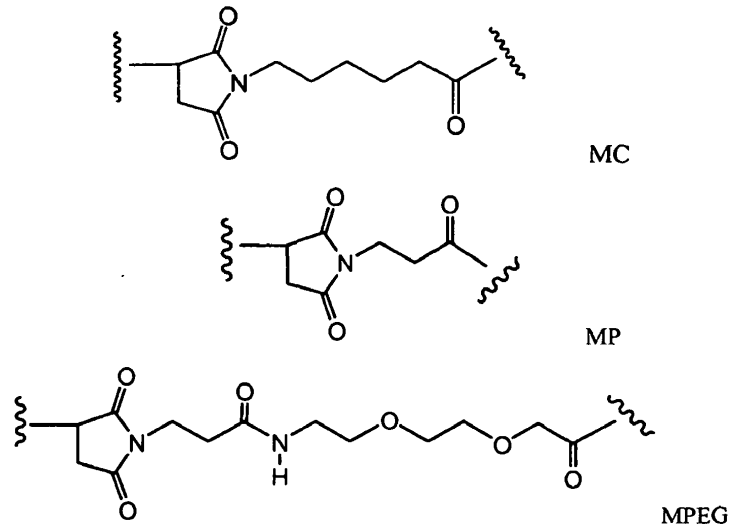


**[0097]** Linker võib koosneda ühest või enamast linker-osast. Iseloomulikud linker-osad hõlmavad järgnevaid: 6-maleimidokaproüül- ("MC"), maleimidopropanoüül- ("MP"), valiintsitrulliin- ("val-cit")alaniin-fenüülalaniin- ("ala-phe"), p-aminobensüülloksükarbonüül- ("PAB"), N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüültio)pentanoaat- ("SPP"), N-suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat- ("SMCC") ja N-suktsiinimidüül-(4-jodotsetüül)aminobensoaat- ("SIAB"). Tehnika tasemes on tuntud veel linkerosi ning mõnda kirjeldatakse siin.

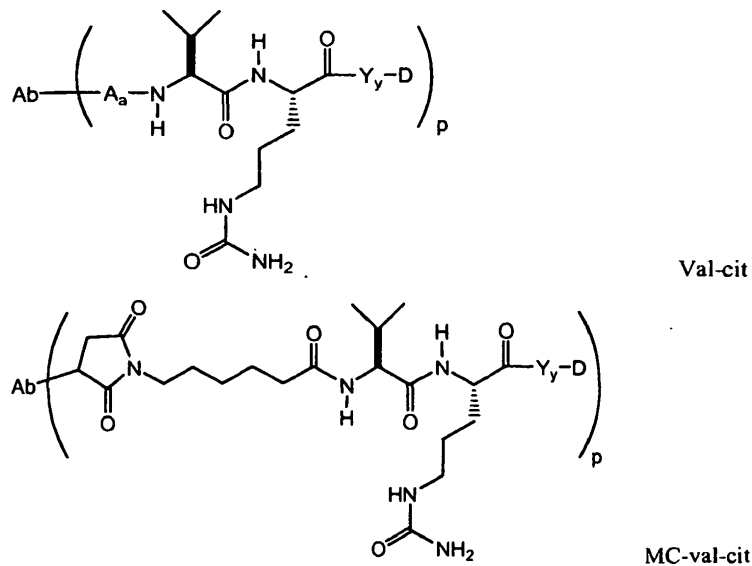
**[0098]** Mõnes teostuses võib linker sisaldada aminohappejääke. Iseloomulikud aminohapetega linkeriosad hõlmavad dipeptiidi, tripeptiidi, tetrapeptiidi või pentapeptiidi. Iseloomulikud dipeptiidid hõlmavad järgnevaid valiin-tsitrulliin (vc või val-cit),alaniin-fenüülalaniin (af või ala-phe). Iseloomulikud tripeptiidid hõlmavad järgnevaid: glütsiin-valiin-tsitrulliin (gly-val-cit) ja glütsiin-glütsiin-glütsiin (gly-gly-gly). Aminohapetega linkeriosades sisalduvad aminohappejäägid hõlmavad looduslikult esinevaid aminohappeid ja ning lisaks minoorseid aminohappeid ja aminohapete analooge nagu tsitrulliin, mida looduslikult ei esine. Aminohapetega

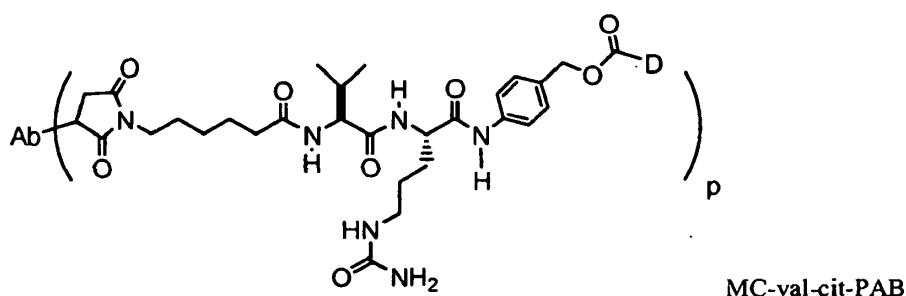
linker-osasid võib kujundada ja optimeerida nende selektiivsuse järgi ensümaatilise lõikamise suhtes konkreetsete ensüümidega, näiteks kasvajaseoselise proteaasi, katepsiini B, C ja D või plasmiinproteaasiga

**[0099]** Allpool on näidatud iseloomulike linker-osa struktuurid (milles laineline joon näitab ADC muude osade kovalentse sidumise kohta):



**[0100]** Iseloomulikud linker-osa ja lühendid hõlmavad lisaks järgnevaid (millel on kujutatud antikeha (Ab) ja linker ning p on 1 kuni ligikaudu 8):





**[0101]** Antikehade nukleofiilsed rühmad hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: (i) N-terminaalsed amiinrühmad, (ii) külgahela amiinrühmad, näiteks lüsiinil, (iii) külgahela tioolrühmad, näiteks tsüsteiinil, ning (iv) suhkru hüdroksüül- või aminorühmad, kui antikeha on glükosüülitud. Amiin-, tiool- ja hüdroksüülrühmad on nukleofiilsed ja kovalentset sidet moodustades on need võimelised reageerima elektrofiilsete rühmadega linkerüksustes ja linkerreagentides, mis hõlmavad järgnevaid: (i) aktiivsed estrid, nagu NHS-estrid, HOBt-estrid, halovormid ja happelised haliidid, (ii) alküül- ja bensüülhaliidid nagu haloatsetamiidid, (iii) aldehüüdid, ketoonid, karboksüül- ja maleimiidrühmad. Kindlatel antikehadel on redutseeritavad ahelatevahelised disulfiidid, see tähendab tsüsteiinsillad. Antikehasid võib linkerreagentidega konjugeerimiseks muuta reaktiivseteks töötlemisel redutseeriva ainega nagu DTT (ditiotreitol). Teoreetiliselt moodustab iga tsüsteiinsild seega kaks reaktiivset nukleofiilset rühma. Antikehasse võib sisestada nukleofiilseid lisarühmi, lastes lüsiinidel reageerida 2-iminotiolaaniga (Traut'i reagentiga), mis annab tulemuseks amiini muundamise tioliks. Antikehasse (või selle fragmenti) võib sisestada reaktiivseid tiolrühmi, sisestades üks, kaks, kolm, neli või enam tsüsteiinijääki (nt valmistades muteeritud antikehasid, mis sisaldavad ühte või enam mittenatiivset tsüsteiinijääki).

**[0102]** Leiutisekohaseid antikeha ja ravimi konjugaate võib valmistada ka, sisestades antikehasse elektrofiilsed üksused, mis võivad reageerida linker-reagenti või ravimi nukleofiilsete asendajatega. Glükosüülitud antikehade suhkruid võib oksüdeerida näiteks oksüdeerivate perjodaatreagentidega, et moodustada aldehüüd- või ketoonrühmi, mis võivad reageerida linker-reagentide või ravimüksuste amiinrühmaga. Selle tulemusel saadavad Schiffi alusega imiinrühmad võivad moodustada stabiilse sideme või olla redutseeritavad näiteks boro-hüdriidreagentidega, et moodustada stabiilseid amiinsidemeid. Ühes teostuses võib glükosüülitud antikeha süsivesikosa reaktsioon galaktoosi oksüdaasi või naatriummetaperjodaadiga anda saagisena karbonüülrühmad (aldehüüdid ja ketoonid) valgu molekulis, millel võib lasta reageerida sobivate rühmadega ravimis (Hermanson, Bioconjugate Techniques). Veel ühes

teostuses võib N-terminaalseid seriini- või treoniinijääke sisaldavatel valkudel lasta reageerida naatriummetaperjodaadiga, mille tulemuseks on aldehüüdi teke esimese aminohappe kohal (Geoghegan, Stroh, (1992) Bioconjugate Chem., 3: 138-146, US 5362852). Sellisel aldehüüdil võib lasta reageerida ravimüksuse või linkeris oleva nukleofiilse rühmaga.

**[0103]** Samuti hõlmavad ravimüksuses olevad nukleofiilsed rühmad, nendega piirdumata, järgnevaid: amiin-, tiol-, hüdroksüül-, hüdrasiid-, oksiim-, hüdrasiin-, tiosemikarbasoon-, hüdrasiinkarboksülaat- ja arüülhüdrasiidrühmad, mis on kovalentset sidet moodustades võimalised reageerima linkerüksustes ja linker-reagentides olevate eletrofiilsete rühmadega, mis hõlmavad järgnevaid: (i) aktiivsed estrid, nagu NHS-estrid, HOBt-estrid, halovormid ja happelised haliidid, (ii) alküül- ja bensüülhaliidid nagu haloatsetamiidid, (iii) aldehüüdid, ketoonid, karboksüül- ja maleimiidrühmad.

**[0104]** Veel ühe aspektina sisaldab antikeha ühte või enamat lüsiinijääki, mida saab keemiliselt modifitseerida, et saada üks või enam sulfhüdrüülrühma. Antikeha seondub linker-osa üle sulfhüdrüülrühma väävliaatomi. Reagentideks, mida võib kasutada lüsiinide modifitseerimiseks on, nendega piirdumata, N-suktsiinimidüül-S-atsetüültoatsetaat (SATA) ja 2-iminotiolaanvesinikkloriid (Traut'i reagent).

**[0105]** Ühe aspektina sisaldab antikeha ühte või enamat suhkrurühma, mida saab keemiliselt modifitseerida, et saada üks või enam sulfhüdrüülrühma. Antikeha seondub linker-osa, näiteks pikendava osaga (*strecher*) üle sulfhüdrüülrühma väävliaatomi, nagu kirjeldati eespool.

**[0106]** Ühe aspektina sisaldab antikeha ühte või enamat suhkrurühma, mida saab oksüdeerida aldehüüdrühmaks (-CHO) (vaadake näiteks trükist Laguzza et al., J. Med. Chem., 1989, 32(3): 548-55). Vastav aldehüüd võib moodustada sideme pikendava osa reaktiivse saidiga. Karbonüülrühmaga reageerimiseks võimaliste pikendava osa reaktiivsete saitide hulka kuuluvad, nendega piirdumata, hüdrasiin ja hüdroksüülamiin. Muid eeskirju valkude modifitseerimiseks, et seejärel kinnitada või siduda valkudega ravimüksus, on kirjeldatud trükises Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, köide 2, John Wiley & Sons (2002).

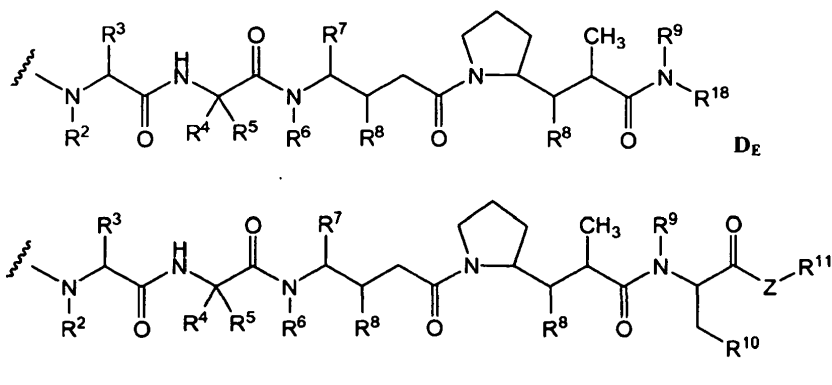
**[0107]** Meetodeid linker- ja ravimüksuste konjugeerimiseks rakule suunatud valkudega, nagu antikehad, immunoglobuliinid või nende fragmendid, on kirjeldatud US patendipublikatsioonides 5208020, 6441163, WO 2005037992, WO 2005081711 ja WO 2006/034488.

**[0108]** Alternatiivselt võib antikeha ja tsütotoksilist agensit sisaldava liitvalgu valmistada näiteks rekombinantsete meetodite või peptiidsünteesiga. DNA ahel võib sisaldada vastavaid

konjugaadi kahte osa kodeerivaid piirkondi, mis on teineteisega külgnevad või eraldatud piirkonnaga, mis kodeerib linkerpeptiidi, mis ei kahjusta konjugaadi soovitud omadusi.

[0109] Veel ühes teostuses on antikeha konjugeeritud „retseptoriga” (nagu streptavidiin), et kasutada seda eelnevas kasvajale suunamises, mille puhul patsiendile manustatakse antikeha ja retseptori konjugaati, millele järgneb mitteseondunud konjugaadi eemaldamine ringlusest, kasutades puhastavat agensit, ning seejärel manustatakse „ligand” (nt avidiin), mis on konjugeeritud tsütotoksilise agensiga (nt radionukleotiidiga).

[0110] Ühes immunokonjugaadi teostuses on tsütotoksiline agens D auristatiin valemiga D<sub>E</sub> või D<sub>F</sub>

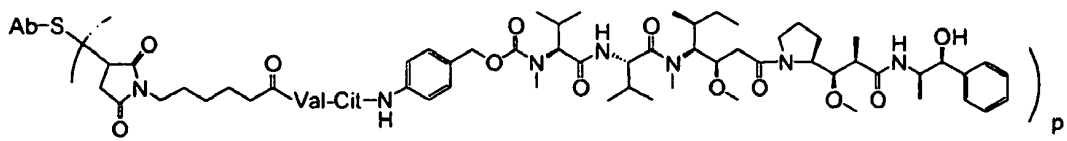


milles R<sup>2</sup> ja R<sup>6</sup> on mõlemad metüülrühmad, R<sup>3</sup> ja R<sup>4</sup> on mõlemad isopropüülrühmad, R<sup>7</sup> on *sec*-butüülrühm ja iga R<sup>8</sup> on sõltumatult valitud CH<sub>3</sub>, O-CH<sub>3</sub>, OH ja H hulgast, R<sup>9</sup> on H, R<sup>10</sup> on arüülrühm, Z on -O- või -NH-, R<sup>11</sup> on H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm või -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub> ja R<sup>18</sup> on -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-arüülrühm ning (d) p on vahemikus ligikaudu 1-8.

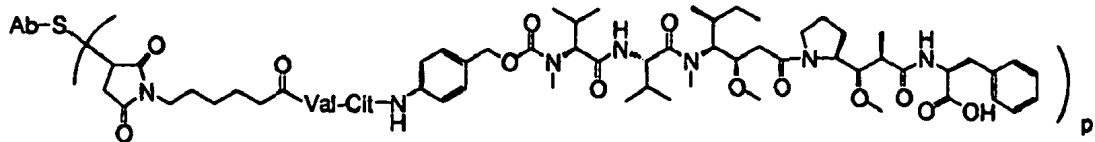
[0111] Mistahes eespool nimetatud immunokonjugaatide jaoks esitatakse lisaks järgnevad teostused. Ühes teostuses on immunokonjugaadil raku tapmise aktiivsus *in vitro* või *in vivo*. Ühes teostuses on linker antikehaga seotud antikehas oleva tiolrühma kaudu. Ühes teostuses on linker lõigatav proteaasiga. Ühes teostuses sisaldab linker dipeptiidi val-cit. Ühes teostuses sisaldab linker p-aminobensüülüksust. Ühes teostuses on p-aminobensüülüksus ravimi ja linkeris oleva proteaasi lõikamiskoha vahel. Ühes teostuses on p-aminobensüülüksus p-aminobensüülüksükarbonüülrühm (PAB). Ühes teostuses sisaldab linker 6-maleimidokaproüülrühma. Ühes teostuses on 6-maleimidokaproüülrühm antikeha ja linkeris oleva proteaasi lõikamiskoha vahel. Eespool toodud teostused võivad esineda üksikult või mistahes omavalhelise kombinatsioonina.

[0112] Ühes teostuses valitakse ravim MMAE ja MMAF-i hulgast. Ühes teostuses on immunokonjugaadi valem





milles Ab on mistahes üks eespool toodud CD22-vastastest antikehadest, S on väevliaatom ja p on vahemikus 2 kuni 5. Ühes teostuses on immunokonjugaadi valem



milles Ab on mistahes üks eespool toodud CD22-vastastest antikehadest, S on väevliaatom ja p on ligikaudu vahemikus 1 kuni ligikaudu 6, ligikaudu 2 kuni ligikaudu 5, ligikaudu 2 kuni ligikaudu 6, ligikaudu 2 kuni ligikaudu 4, ligikaudu 2 kuni ligikaudu 3, ligikaudu 3 kuni ligikaudu 4, ligikaudu 3 kuni ligikaudu 5, ligikaudu 3 kuni ligikaudu 6 või ligikaudu 4 kuni ligikaudu 6.

### Märgistatud antikeha detekteerimise meetodid

**[0113]** Leiutise ühes teostuses võivad tsüsteiini-modifitseeritud antikehad olla detekteerimiskatseteks märgistatud tsüsteiini tiolrühma kaudu radionukliidide, fluorestseeruvate värvide, bioluminestsentsi vallandavate substraatüksuste, kemoluminestsentsi vallandavate substraatüksuste, ensüümide ja muude detekteeritavate märgistega koos diagnostiliste, farmakodünaamiliste ja ravirakendustega. Üldiselt manustatakse märgistatud tsüsteiini-modifitseeritud antikeha, see tähendab “biomarkerit” või “sondi”, elusorganismile, näiteks inimesele, närilisele või muule väikesele loomale, perfuseeritud organismis või koeproovi, süstimise, perfusiooni või suukaudse sissevõtmise teel. Sondi jaotumist detekteeritakse teatud ajavahe- miku kestel ja see esitatakse pildina.

### Tootmisartiklid

**[0114]** Kirjeldatakse tootmisartiklit või “komplekti”, mis sisaldab materjale, mis on kasutatavad eespool kirjeldatud häirete ravimiseks. Tootmisartikkel hõlmab mahutit ja mahutil olevat või sellega seotud etiketti või infolehte. Sobivad mahutid hõlmavad näiteks pudeleid, viaale, süstlaid, mullpakendit jne. Mahutid võivad olla tehtud mitmesugustest materjalidest,

nagu klaas või plast. Mahuti sisaldab seisundi ravimiseks tõhusat antikeha ja ravimi konjugaadi (ADC) kompositsiooni ning sellel võib olla steriilne ligipääsuava (näiteks võib mahuti olla veenisisesel lahuse kott või viaal, millel on hüpodermilise süstlanõelaga läbistatav kork). Vähemalt üks aktiivne aine kompositsioonis on ADC. Etikett või pakendi infoleht näitab, et kompositsiooni kasutatakse valitud seisundi nagu vähk ravimiseks. Alternatiivselt või lisaks võib tootmisartikkel sisaldada veel teist (või kolmandat) mahutit, mis sisaldab farmatseutiliselt vastuvõetavat puhvrit, nagu bakteriostaatiline süstevesi (*bacteriostatic water for injection* - BWFI), fosfaadiga puhverdatud soolalahus, Ringeri lahus ja dekstroosilahus. Lisaks võib see hõlmata muid, kaubanduslikust või kasutaja seisukohast soovitud materjale, hõlmates teisi puhverlahuseid, lahjendeid, filtreid, nõelu ja süstlaid.

#### Farmatseutilised kompositsioonid

**[0115]** Ühe aspektina esitatakse farmatseutiline kompositsioon, mis sisaldab mistahes eespool toodud immunokonjugaati ja farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat, nagu on defineeritud patendiõudluses. Ühe aspektina kasutatakse kompositsiooni B-rakkude proliferatiivse häire ravimise meetodis, kus nimetatud meetod hõlmab farmatseutilise kompositsiooni manustamist indiviidile. Ühes teostuses on B-rakkude proliferatiivse häire valitud grupist, mis hõlmab lümfoomi, mitte-Hodgkin'i lümfoomi (NHL), agressiivset NHL-i, retsidiveerunud agressiivset NHL-i, retsidiveerunud indolentset NHL-i, refraktoorse NHL-i, refraktoorse indolentset NHL-i, kroonilist lümfotsüüt leukeemiat (CLL), väikerakulist lümfotsütaarset lümfoomi, leukeemiat, karvrakulist leukeemiat (HCL), akuutset lümfotsüüt leukeemiat (ALL) ja mantelrakulist lümfoomi. Ühes teostuses on raku proliferatiivne häire seotud CD22 suurenenud ekspressiooniga raku pinnal.

**[0116]** Ühe aspektina esitatakse leiutisekohane immunokonjugaat kasutamiseks raku proliferatsiooni inhibeerimise meetodis, kus see meetod hõlmab raku eksponeerimist mistahes eespool toodud immunokonjugaatidele tingimustes, mis võimaldavad immunokonjugaadi seondumist CD22-ga. Ühes teostuses on B-rakk kasvajakarakk. Ühes teostuses on kasvajakarakk imetaja B-rakk, kus imetajal on või kahtlustatakse B-raku proliferatiivset häiret, mis on valitud grupist, mis hõlmab lümfoomi, mitte-Hodgkin'i lümfoomi (NHL), agressiivset NHL-i, retsidiveerunud agressiivset NHL-i, retsidiveerunud indolentset NHL-i, refraktoorse NHL-i, refraktoorse indolentset NHL-i, kroonilist lümfotsüüt leukeemiat (CLL), väikerakulist lüm-

fotsütaarsed lümfoomi, leukeemiat, karvrakulist leukeemiat (HCL), akuutset lümfotsütleukeemiat (ALL) ja mantelrakulist lümfoomi, rakk on ksenograft. Ühes teostuses toimub eksponeerimine *in vitro*. Ühes teostuses toimub eksponeerimine *in vivo*.

**[0117]** Esitatakse ka CD22-vastase antikeha kasutamise meetod seerumis oleva lahustuva CD22 analüüsimiseks imetajal, kellel on leukeemia või lümfoom, et diagnoosida B-raku leukeemiat või B-raku lümfoomi, et mõõta haiguste kliinilist edasi- või taandarenemist või hinnata kasvaja haiguskoormust või retsidiive. Selliseid meetodeid on kirjeldatud US patendipublikatsioonis 20050244828 (Kreitman, R. J. et al.) kus kasutati CD22-vastast RFB4 antikeha ja PE38 (*Pseudomonas*'e eksotoksiin A fragment 38) toksiini konjugaati (vaadake trükist Kreitman, R. J. et al., NEJM, 345: 241-247 (2001)).

## JOONISTE LÜHIKIRJELDUS

### **[0118]**

**Joonis 1A-1D:** Joonis 1A on CD22 diagramm, kus on näidatud  $\beta$ -isovormi ekstratsellulaarse domeeni seitse immunoglobuliinisarnast domeeni.  $\alpha$ -isovormil puuduvad domeemid 3 ja 4. "TM" tähistab transmembraanset domeeni. Joonisel 1B on kujutatud CD22  $\beta$ -vormi aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 27). CD22  $\alpha$ -vormil puuduvad kaldkirjas näidatud aminohapped (mis kodeerivad domeene 3 ja 4 ekstratsellulaarses domeenis). Valgu küpse vormi ekstratsellulaarne domeen on alla joonitud (SEQ ID NO: 28). Aminohapped 1-21 kujutavad endast küpse vormi küljest äralõigatavat signaaljärjestust. Joonisel 1C on esitatud CD22  $\alpha$ -aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 29). CD22  $\alpha$ -ECD on alla joonitud (SEQ ID NO: 30). Joonisel 1C on esitatud jaava makaagi CD22 aminohapete järjestus (SEQ ID NO: 31). Esimesed 19 aminohapet jaava makaagi järjestuses moodustavad signaaljärjestuse.

**Joonis 2A-2B:** Joonisel 2A on esitatud hiire leiutisekohase 10F4 CD22-vastase antikeha (m10F4) raske ahela varieeruva piirkonna aminohapete järjestus, mis on joondatud humani-seeritud 10F4 versioon 1 antikeha (h10F4v1) ning inimese III alamrühma järjestusega. HVR-d on joonisel märgistatud kastidega (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3). HVR-e ühendavad järjestused on raamistikjärjestused (FR-H1 kuni FR-H4). Numeratsioon järjestustes vastab Kabat'le. CDR-id Kabat'i, Chothia ja kontakt-süsteemi järgi on näidatud kastiga piiratud CDR-ide juures. Joonisel 2B on esitatud hiire leiutisekohase 10F4 CD22-vastase antikeha (m10F4) kerge ahela varieeruva piirkonna aminohapete järjestus, mis on joondatud huma-

niseeritud 10F4 versioon 1 antikehaga (h10F4v1) ning inimese κ I alamrühma järjestusega. Humaniseeritud 10F4 antikeha versioonidel 2 ja 3 (h10F4v2 ja h10F4v3) on ühesugune sekreteeritava küpse vormi aminohapete järjestus. Antikehad h10F4v2 ja h10F4v3 erinevad antikehast h10F4v1 HVR-L1-s aminohappe 28 juures (N28V). HVR-d on joonisel märgistatud kastidega. FR-L1, FR-L2, FR-L3 ja FR-L4 järjestused ühendavad HVR-e (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3). Numeratsioon järjestustes vastab Kabat'le. CDR-id Kabat'i, Chothia ja kontakt-süsteemi järgi on näidatud kastiga piiratud HVR-ide juures.

**Joonistel 3A ja 3B** on näidatud iseloomulikke inimese raske ahela (VH) konsensusraamistiku aktseptorjärjestusi, mis sobivad leiutise praktikasse rakendamiseks, need on esitatud koos järjestuste identifitseerimiskoodidega SEQ ID NO, kusjuures FR koodid (SEQ ID NO) on toodud järjekorras FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4:

- inimese VH alamrühma I konsensus-raamistikujärjestus "A" ilma Kabat CDR-deta (SEQ ID NO: 26, 47, 48, 7)
- inimese VH alamrühma I konsensus-raamistikujärjestused "B," "C," ja "D" ilma laiendatud hüpervarieeruvate piirkondadeta (SEQ ID NO: 50, 51, 52, 7, SEQ ID NO: 50, 51, 52, 7 ja SEQ ID NO: 50, 51, 53, 7)
- inimese VH alamrühma II konsensus-raamistikujärjestus "A" ilma Kabat'i CDR-ideta (SEQ ID NO: 54, 55, 56, 7)
- inimese VH alamrühma II konsensus-raamistikujärjestused "B," "C," ja "D" ilma laiendatud hüpervarieeruvate piirkondadeta (SEQ ID NO: 57, 58, 56, 7, SEQ ID NO: 57, 58, 59, 7 ja SEQ ID NO: 57, 58, 60, 7)
- inimese VH alamrühma III konsensus-raamistikujärjestus "A" ilma Kabat'i CDR-ideta (SEQ ID NO: 61, 62, 63, 7)
- inimese VH alamrühma III konsensus-raamistikujärjestused "B," "C," ja "D" ilma laiendatud hüpervarieeruvate piirkondadeta (SEQ ID NO: 64, 65, 63, 7, SEQ ID NO: 64, 65, 66, 7 ja SEQ ID NO: 64, 65, 67, 7)
- inimese VH 1. aktseptor-raamistikujärjestus "A" ilma Kabat'i CDR-ideta (SEQ ID NO: 68, 62, 69, 7)
- inimese VH aktseptor-raamistikujärjestused "B" ja "C" ilma laiendatud hüpervarieeruvate piirkondadeta (SEQ ID NO: 64, 65, 69, 7 ja SEQ ID NO: 64, 65, 70, 7)

- inimese VH 2 aktseptor-raamistikujärjestus "A" ilma Kabat'i CDR-ideta (SEQ ID NO: 68, 62, 71, 7)
- inimese 2. aktseptor-raamistikujärjestus "B," "C," ja "D" ilma laiendatud hüpervarieerivate piirkondadeta (SEQ ID NO: 64, 65, 71, 7, SEQ ID NO: 64, 65, 72, 7 ja SEQ ID NO: 64, 65, 73, 7).

**Joonistel 4A ja 4B** on näidatud iseloomulikke inimese kerge ahela (VL) konsensusraamistiku aktseptorjärjestusi, mis sobivad leiutise praktikasse rakendamiseks, need on esitatud koos järjestuste identifitseerimiskoodidega:

- inimese VL  $\kappa$  alamrühma I-1 konsensusraamistiku järjestus ( $\kappa v1-1$ ): SEQ ID NO: 74, 75, 76, 77
- inimese VL  $\kappa$  alamrühma I konsensusraamistiku järjestus ( $\kappa v1$ ): SEQ ID NO: 74, 78, 76, 77
- inimese VL  $\kappa$  alamrühma II konsensusraamistiku järjestus ( $\kappa v2$ ): SEQ ID NO: 49, 79, 80, 77
- inimese VL  $\kappa$  alamrühma III konsensusraamistiku järjestus ( $\kappa v3$ ): SEQ ID NO: 81, 82, 83, 77
- inimese VL  $\kappa$  alamrühma IV konsensusraamistiku järjestus ( $\kappa v4$ ): SEQ ID NO: 84, 85, 86, 77

**Joonised 5A ja 5B:** Joonisel 5A on kujutatud inimese natiivse IgG Fc-piirkonna järjestuste humIgG<sub>1</sub> (mitte-A-allotüüp, SEQ ID NO: 38 ja A-allotüüp, mille puhul aminohapete järjestus SREEM järjestuses SEQ ID NO: 38 on muudetud järjestuseks SRDEL), humIgG<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 39), humIgG<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 40) ja humIgG<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 41) joondamist, kus järjestustevahelised erinevused on märgitud tärnidega. Järjestuste kohal olevad numbrid esindavad EL numeratsioonisüsteemi. Samuti on näidatud iseloomulik konstantne  $\kappa$ -ahel. Joonisel 5B on kujutatud humaniseeritud CD22-vastase antikeha 10F4v2 isotüübi IgG1 kerge ja raske ahela täispikki aminohapete järjestusi (varieeruv ja konstantne piirkond). Konstantsed domeenid on esitatud allajoonitud osadena.

**Joonised 6A-6D** näitavad CD22 ADC efektiivsuse erinevaid determinante mõõtvate analüüside tulemusi lümfoomi rakuliinides. Joonis 6A näitab, et CD22 kõrgem tase raku pinnal

on korrelatsioonis madalama anti-CD22-MCC-DM1 IC50-ga (suurem efektiivsus). Joonis 6B näitab, et anti-CD22-MCC-DM1 suurem internaliseerimine on korrelatsioonis madalama anti-CD22-MCC-DM1 IC50-ga. Joonis 6C näitab, et rakkude suurem sisemine tundlikkus vaba ravimi suhtes on korrelatsioonis madalama anti-CD22-MCC-DM1 IC50-ga. Joonis 6D on mikrofoto, millel on näha fluorestseerivalt märgistatud CD22-vastase antikeha internaliseerimine pärast CD22 seondumist raku pinnale.

**Joonised 7A-7B:** Joonisel 7A on kasvaja mahu vähenemise graafik *in vivo* ksenograafi-mudelil, kus on näha, et CD22-vastase antikehade mu10F4-smcc-DM1 ja hu10F4v1-smcc-DM1 manustamine inimese B-rakulise kasvajaga SCID hiirtele vähendas praktiliselt kasvaja mahtu. Ravimi annus oli ligikaudu 4 ja 4,6, vaadake tabelit 4. Joonisel 7B on sarnase uuringu graafik, kus ravimi annus oli veidi väiksem, ligikaudu 2,9 ja 3,0 (vaadake tabelit 5) ning mu10F4-smcc-DM1 ja hu10F4v2-smcc-DM1 efektiivsust võrreldi kontrollantikeha ja konjugeerimata mu10F4-ga. Joonisel 7C on kasvaja mahu vähenemise graafik *in vivo* ksenograafi-mudelil, kus anti-CD22-spp-DM1 manustati vastavalt tabelile 6.

**Joonised 8A ja 8B:** Joonisel 8A on graafik CD22-vastaste antikehade 5E8.1.8-smcc-DM1 ja RFB4-smcc-DM1 manustamisest Ramos' e rakkude ksenograafidele. Joonisel 8B on graafik CD22-vastaste antikehade 5E8.1.8-smcc-DM1 ja RFB4-smcc-DM1 manustamisest BJAB-luc ksenograafidele.

**Joonisel 9** on graafik, mis näitab anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 manustamise suhtelist toimet kasvaja mahule ajas väikeste, keskmiste ja suurte annuste manustamisel.

**Joonisel 10** on graafik, mis näitab anti-CD22(RFB4)-MC-vcPAB-MMAF või anti-CD22(RFB4)-MC-MMAF manustamise suhtelist toimet kasvaja mahule ajas Ramose ksenograafides.

**Joonisel 11** on graafik, mis näitab anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 või anti-CD22-MC-vcPAB-MMAE manustamise suhtelist toimet kasvaja mahule ajas.

**Joonisel 12** on graafik, mis näitab humaniseeritud CD22-vastase 10F4 manustamise suhtelist toimet kasvaja mahule ajas MMAF või DM1 immunokonjugaatide variantidena, nagu on esitatud tabelis 12.

**Joonistel 13A-13C** on graafikud, mis näitavad anti-CD22-smcc-DM1 või anti-CD22-MC-MMAF manustamise suhtelist toimet kasvaja mahule ajas erinevate B-raku lümfoomi ksenograafi-mudelites: SuDHL-4 (Joonis 13A), DoHH2 (Joonis 13B) ja Granta-519 (Joonis 13C).

**Joonisel 14** on näidatud diagrammina näidetes kirjeldatud epitoobi kaardistamiseks deleteeritud CD22 domeenid. Domeenid on nummerdatud 1 kuni 7. “TM” tähistab transmembraanset piirkonda.

**Joonisel 15** on näidatud tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaadid (ADC), kus ravimüksus on seotud modifitseeritud tsüsteiinirühmaga kerges ahelas (LC-ADC), raskes ahelas (HC-ADC) ja Fc-piirkonnas (Fc-ADC).

**Joonisel 16** on näidatud etappe: i) tsüsteiini disulfiid-liitumiste ja ahelasiseste ning ahelatevaheliste disulfiidide vähenemine tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastases antikehas (tioMab) redutseeriva agensi TCEP (tris(2-karboksüetüül)fosfiinvesinikkloriidi) toimel, (ii) osaline oksüdeerumine, st reoksüdeerumine ahelasiseste ning ahelatevaheliste disulfiidide reformeerimisega dhAA (dehüdroaskorbiinhappe) toimel ja (iii) reoksüdeeritud antikeha konjugeerimine ravim-linker vaheühendiga tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaadi (ADC) saamiseks.

**Joonised 17A-17C** kujutavad leiutisekohaste tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastaste antikehade aminohapete järjestusi, kus Fc-piirkonna kerge ahel või raske ahel on valitud aminohappeasendites modifitseeritud tsüsteiiniga. Joonisel 17A on kujutatud CD22-vastase 10F4 variandi kerge ahel, kus valiin Kabat' asendis 205 (asend läbiva numeratsiooni kohaselt: valiin 205) on asendatud tsüsteiiniga. Joonisel 17B on kujutatud CD22-vastase 10F4 variandi raske ahel, kusalaniin EL asendis 118 (asend läbiva numeratsiooni kohaselt:alaniin 121) on asendatud tsüsteiiniga. Joonisel 17C on kujutatud CD22-vastase 10F4 variandi Fc-piirkond, kus seriin EL asendis 400 (asend läbiva numeratsiooni kohaselt: seriin 403) on asendatud tsüsteiiniga. Kõigil joonistel on muudetud aminohape kujutatud rasvases trükis ja kahekordselt alla joonitud. Ühekordne allajoonimine tähistab konstantseid piirkondi. Varieeruvad piirkonnad ei ole alla joonitud.

**Joonised 18A-18E** kujutavad FACS analüüsi tulemusi, mis näitavad, et leiutisekohaste CD22-vastaste tiomabi ja ravimi konjugaatide (TDC) seondumine BJAB-lucs rakkude pinnale ekspresseeritud CD22-ga on tiomabi LC, HC ja Fc variantide ning samuti erinevate ravimite konjugaatide jaoks sarnane.

**Joonisel 19** on graafik, kus on kujutatud kasvaja keskmise mahu ajaline muutus ksenograftimudelil erinevates asendites (LC, HC või Fc) tsüsteiiniga modifitseeritud ja/või erinevate ravimitega (MMAF või MMAE) konjugeeritud CD22-vastaste TDC-dega mõjutamisel. TDC-dega CD22-vastane 10F4-LC-V210C-MCvcPAB-MMAE ja CD22-vastane 10F4-HC-

A121C-MCvcPAB-MMAE-ga mõjutatud ksenograaftmudelite puhul täheldati kasvaja mahu vähenemist uuringu käigus.

**Joonisel 20A** on graafik, kus on kujutatud kasvaja keskmise mahu ajaline muutus inimese mantelrakulise lümfoomi Granta-519 ksenograafis CB17 SCID hiirtes, mida oli mõjutatud raske ahela A118C CD22-vastase TDC-ga, mis oli konjugeeritud erinevate linker-ravimüksustega ja/või mida manustati erinevates annustes, nagu joonisel on näidatud. Selles eksperimendis testitud agensitest osutus kõige efektiivsemaks CD22-vastane 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC. Joonisel 20B on graafik, kus on kujutatud kasvaja keskmise mahu ajaline muutus follikulaarse lümfoomi DOHH2 ksenograafis CB17 SCID hiirtes, mida oli mõjutatud sama raske ahela A118C CD22-vastase TDC-ga, aga suuremas annuses. Testitavatest agensitest osutus kõige efektiivsemaks CD22-vastane 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC. Joonisel 20C on hiirte kehamassi muutumine protsentides DOHH2 ksenograafi uuringus, mis näitab, et uuringu esimese 14 päeva kestel ei esinenud olulist kehamassi muutust.

**Joonistel 21A ja 21 B** on näidatud seerumi AST (aspartaataminotransferaasi) (joonisel 21A) ja seerumi neutrofiilide (joonisel 21B) tasemete muutused päevadel 0 ja 5 pärast lõigatava ja mittelõigatava linkeriga ADC manustamist.

**Joonistel 22A ja 22B** on näidatud graafiliselt perifeersetes B-rakkude ( $CD20^+$  rakud) vähenemist (“väljakurnamist”) jaava makaakidel, kellele manustati 10, 20 ja 30 mg/kg CD22-vastast MMAF-i (joonis 22A) või CD22-vastast DM1-i (joonis 22B).

**Joonistel 23A ja 23B** on näidatud, et  $CD4^+$  lümfotsüütides puuduvad olulised muutused CD22-vastase MMAF-i (joonisel 23A) ja CD22-vastase DM1-e (joonisel 23B) annuste 10, 20 ja 30 mg/kg puhul.

**Joonistel 24A ja 24B** on näidatud jaava makaagi mandlikoe histoloogilisi proove, kus kontrollina kandjaga mõjutatud proovis (joonisel 24A) nähtavad idutee (germinaalse) tsentri B-rakud puuduvad mandlikoe proovis, mis on võetud loomalt, keda mõjutati 10 mg/kg hu10F4v3-SMCC-DM1-ga.

**Joonisel 25A** on diagrammina näidatud põrna follikulite piirkonnad, millest võeti koeproovid uuringuteks, milles näidati, et CD22-vastased ADC-d säästavad B-rakke jaava makaagi puhkavas koes. Poolduvate rakkude kogus makaagi põrna folliikulite germinaalses tsentris vähenes hu10F4v3-MC-MMAF-i annuse 10 mg/kg mõjul (joonistel 25B ja 25C). Mittepoolduvate naiivsete B-rakkude kogus samadel tingimustel ei vähenenud (joonistel 25D ja 25E).



## LEIUTISE TEOSTUSTE DETAILNE KIRJELDUS

**[0119]** Esitatakse eraldatud antikehad, mis seonduvad CD22-ga. Lisaks esitatakse immuno-konjugaadid, mis sisaldavad CD22-vastaseid antikehasid. Lisaks esitatakse tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastased antikehad ning nende immunokonjugaadid. Leiutisekohased antikehad ja immunokonjugaadid on näiteks kasulikud CD22 muutunud, näiteks suurenenud ekspressiooniga seotud häirete diagnoosimisel ja ravis. Teatud teostustes on leiutisekohased antikehad ja immunokonjugaadid kasulikud raku proliferatiivsete häirete nagu kasvaja või vähi diagnoosimisel või ravis. Teatud teostustes on leiutisekohased antikehad ja immunokonjugaadid kasulikud CD22 detekteerimisel, näiteks raku pinnale ekspresseeritava CD22 detekteerimisel.

**[0120]** Esitatakse CD22-vastaseid antikehasid kodeerivad polünukleotiidid. Esitatakse vektorid, mis sisaldavad CD22-vastaseid antikehasid kodeerivaid polünukleotiide ning esitatakse peremeesrakud, mis sisaldavad selliseid vektoreid. Esitatakse ka kompositsioonid, sealhulgas ühte või enam leiutisekohast polünukleotiidi, CD22-vastast antikeha või immunokonjugaati sisaldavaid farmatseutilisi preparaate.

### Üldised tehnikad

**[0121]** Siin kirjeldatud ja viidatud tehnikad ja protseduurid on üldjuhul hästi mõistetavad ja eriala asjatundjate poolt tavaliselt konventsionaalses metodoloogias kasutatavad, näiteks laialdaselt kasutatavad meetodid, mida kirjeldatakse trükistes Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. väljaanne (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., *Current Protocols in Molecular Biology* (toim. F. M. Ausubel jt. (2003)), seeria *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (toim. M. J. MacPherson, B. D. Hames, G. R. Taylor (1995)), Harlow, Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual and Animal Cell Culture* (toim. R. I. Freshney (1987)), *Oligonucleotide Synthesis* (toim. M. J. Gait, 1984), *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (toim. J. E. Cellis, 1998) Academic Press, *Animal Cell Culture* (toim. R. I. Freshney, 1987), *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather, P. E. Roberts, 1998) Plenum Press, *Cell and Tissue Culture: Laboratory*

Procedures (toim. A. Doyle, J. B. Griffiths, D. G. Newell, 1993-8) J. Wiley and Sons, Handbook of Experimental Immunology (toim. D. M. Weir, C. C. Blackwell), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (toim. J. M. Miller, M. P. Calos, 1987), PCR: The Polymerase Chain Reaction, (toim. Mullis et al., 1994), Current Protocols in Immunology (toim. J. E. Coligan et al., 1991), Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999), Immunobiology (C. A. Janeway, P. Travers, 1997), Antibodies (P. Finch, 1997), Antibodies: A Practical Approach (toim. D. Catty, IRL Press, 1988-1989), Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (toim. P. Shepherd, C. Dean, Oxford University Press, 2000), Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow, D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999), The Antibodies (toim. M. Zanetti, J. D. Capra, Harwood Academic Publishers, 1995), ja Cancer: Principles and Practice of Oncology (toim. V. T. DeVita et al., J.B. Lippincott Company, 1993).

## DEFINITSIOONID JA LÜHENDID

### Definitsioonid

**[0122]** "Eraldatud" antikeha on antikeha, mis on identifitseeritud, eraldatud ja/või regenereeritud selle valmistamise keskkonna komponentidest. Looduslikust keskkonnast pärinevad saastekomponendid on materjalid, mis segaksid antikeha kasutamist diagnostilistel või terapeutilistel eesmärkidel ning need võivad hõlmata ensüüme, hormone ja teisi valgulisi või mittevalgulisi lahustuvaid aineid. Eelistatult puhastatakse antikeha (1) suurema kui 95-massiprotsendise puhtuseni Lowry meetodi kohaselt detekteerituna, enimeelistatult puhastatakse antikeha enam kui 99-massiprotsendise puhtuseni, (2) määrani, mis on piisav vahemalt 15 N-terminaalse või sisemise aminohappe järjestuse saamiseks pöörlevate labadega sekvenaatori kasutamisel (3) homogeensuseni SDS-PAGE (naatriumdodetsüülsulfaadi-polüakrüülamiidi-geelelektroforeesi) alusel, redutseerivates või mitteredutseerivates tingimustes, Coomassie Blue või eelistatult hõbedavärvi kasutamisel. Eraldatud aminohape hõlmab ka *in situ* antikehi rekombinantsetes rakkudes, kuna puudub vähemalt üks antikeha loodusliku keskkonna komponentidest. Tavaliselt valmistatakse eraldatud polüpeptiidid või antikeha siiski vähemalt ühe puhastamisetapi abil.

**[0123]** "Eraldatud" nukleiinhappemolekuliks on nukleiinhappemolekul, mis on identifitseeritud ja eraldatud vähemalt veel ühest nukleiinhappemolekulist, millega see on tavaliselt, näiteks nukleiinhappe looduslikus keskkonnas, seotud. Lisaks hõlmab eraldatud nukleiinhappemolekul seda nukleiinhappemolekuli, mis esineb rakkudes, kus tavaliselt seda nukleiinhapet ekspresseeritakse, kuid kus nukleiinhape võib esineda kromosoomiväliselt või kus nukleiinhappe kromosomaalne paiknemine võib olla erinev looduslikes rakkudes esinevast.

**[0124]** "Puhastatud" tähendab, et molekul esineb proovis kontsentratsioonis, mis on vähemalt 95% proovi, milles see sisaldub, massist või vähemalt 98% proovi, milles see sisaldub, massist.

**[0125]** Termin "praktiliselt sarnane" või "praktiliselt sama" tähendab siin kasutatuna piisavalt suurt sarnasust kahe arvvärtuse vahel (millest üks on näiteks seotud leiutisekohase antikeha ja teine referents/võrdlusantikehaga) nii, et eriala asjatundja võiks selles kontekstis, milles bioloogilist karakteristikut antud väärtuste abil mõõdeti (nt Kd-väärtused) erinevust kahe väärtuse vahel pidada väikeseks või bioloogilist ja/või statistilist tähtsust mitteomavaks. Erinevus nende kahe väärtuse vahel on näiteks väiksem kui ligikaudu 50%, väiksem kui ligikaudu 40%, väiksem kui ligikaudu 30%, väiksem kui ligikaudu 20%, väiksem kui ligikaudu 10%, võttes aluseks referents/võrdlusantikeha jaoks saadud väärtuse.

**[0126]** Siin kasutatuna tähistab fraas "oluliselt vähenenud" või "oluliselt erinev" piisavalt suurt erinevuse määra kahe arvulise väärtuse vahel (millest üks on üldjuhul seotud mingi molekuli ja teine on seotud etalon/võrdlusmolekuliga) selliselt, et eriala asjatundja peaks nimetatud väärtustega (nt Kd-väärtustega) mõõdetud bioloogilise omaduse kontekstis nende kahe väärtuse vahelist erinevust statistiliselt oluliseks. Nimetatud kahe väärtuse vaheline erinevus etaloni/võrdlusmolekuli puhul saadud väärtuse funktsioonina on näiteks enam kui ligikaudu 10%, enam kui ligikaudu 20%, enam kui ligikaudu 30%, enam kui ligikaudu 40% ja/või enam kui ligikaudu 50%.

**[0127]** Mõiste „vektor”, nagu seda siin kasutatakse, tähendab nukleiinhappemolekuli, mis on võimeline transportima teist, sellega ühendatud nukleiinhapet. Üheks vektori tüübiks on „plasmiid”, mis tähendab rõngakujulist kaheahelalist DNA silmust, millesse võib ligeerida DNA lisafragmente. Veel üht tüüpi vektor on faagvektor. Veel üht tüüpi vektor on viirusvektor, milles DNA lisafragmente võib ligeerida viiruse genoomi. Teatud vektorid on võimelised autonoomselt replitseeruma peremeesrakus, millesse nad on sisestatud (nt bakteriaalse replikatsiooni alguspunktiga bakteriaalsed vektorid ning imetaja episomaalsed vektorid).

Teised vektorid (nt imetaja mitteepisomaalsed vektorid) suudavad peremeesrakku viiduna integreeruda peremeesraku genoomi ning seega replitseeruvad koos peremehe genoomiga. Veelgi enam, teatud vektorid on võimelised suunama nendega toimivalt ühendatud geenide ekspresseerumist. Selliseid vektoreid nimetatakse siin „rekombinantseteks ekspressioonivektoriteks” (või lihtsalt ”rekombinantseteks vektoriteks”). Üldiselt on rekombinantse DNA meetodites kasutatavad ekspressioonivektorid tihti plasmiidide vormis. Käesoleva kirjelduse kohaselt võivad „plasmiid” ja „vektor” olla kasutusel vaheldumisi, kuna plasmiid on vektori kõige tavalisem vorm.

**[0128]** Siin vahelduvalt kasutatuna tähendab „polünukleotiid” või „nukleiinhape” nukleotiidide mis tahes pikkusega polümeere, hõlmates DNA-d ja RNA-d. Nukleotiidid võivad olla desoksüribonukleotiidid, ribonukleotiidid, modifitseeritud nukleotiidid või alused ja/või nende analoogid või mis tahes substraat, mida saab sisestada polümeeri DNA või RNA polümeraasi või sünteesireaktsiooniga. Polünukleotiid võib sisaldada modifitseeritud nukleotiidide, nagu metüülitud nukleotiidid ja nende analoogid. Olemasolul võib modifikatsioon nukleotiidi struktuuris olla toimunud enne või pärast polümeeri assambleerimist. Nukleotiidide järjestus võib olla katkestatud mittenukleotiidsete osistega. Polünukleotiidi võib pärast sünteesi edasi muuta näiteks märgisega konjugeerimisega. Muud tüüpi muutused hõlmavad näiteks „cap-ide” muutust, ühe või enama looduslikult esineva nukleotiidi asendust analoogiga, nukleotiididevahelisi muutusi, nagu näiteks laenguta sidemete (nt metüülfosfonaatide, fosfotriestrite, fosfoamidaatide, karbamaatide jne puhul) ning laenguga sidemetega (nt fosforotioaatide, fosforoditioaatide jne puhul) vorme, ripatsosi, näiteks valke (nt nukleaase, toksine, antikehasid, signaalpeptiide, polü-L-lüsiini jne) sisaldavaid vorme, interkaleerijaid (nt akridiini, psoraleeni jne), kelaatijaid sisaldavaid (nt metalle, radioaktiivseid metalle, boori, oksüdeerivaid metalle jne), alküüljaid sisaldavaid vorme, muudetud sidemetega (nt alfa-anomeerseid nukleiinhappeid jne) vorme ning ka polünukleotiidi(de) mittemuudetud vorme. Lisaks võivad mis tahes tavaliselt suhkrutes esinevad hüdroksüülrühmad olla asendatud näiteks fosfonaatrühmade, fosfaatrühmadega, olla kaitstud standardsete kaitserühmadega või olla aktiveeritud, et moodustada lisanukleotiididega või olla konjugeeritud tahkete või pooltahkete kandjatega. 5'- ja 3'-terminaalsed OH-rühmad võivad olla fosforüülitud või asendatud amiinide või 1 kuni 20 süsinikuaatomiga orgaaniliste „cap“-i moodustava rühma osadega. Muud hüdroksüülrühmad võivad samuti olla derivaaditud standardsete kaitserühmadega. Polünukleotiidid võivad sisaldada ka riboos- või desoksüriboosuhkrutega

analoogseid vorme, mis on üldiselt tehnika tasemes tuntud, hõlmates näiteks 2'-O-metüül-, 2'-O-allüül-, 2'-fluoro-või 2'-asidoriboosi, karbotsüklilisi suhkruanalooge, alfa-anomeerseid suhkruid, epimeerseid suhkruid, nagu arabiinose, ksülooseid või lüksooseid, püranoosuhkruid, furanoosuhkruid, sedoheptuloose, nende mittetsüklilisi analooge ning aluseta nukleotiidanalooge nagu metüülribosiid. Üks või enam fosfodiesteridemetest võib olla asendatud alternatiivsete ühendavate rühmadega. Mittelimeerivalt hõlmavad need alternatiivsed ühendavad rühmad teostusi, milles fosfaat on asendatud P(O)S-i ("tioaadis"), P(S)S-i ("ditioaadis"), "(O)NR<sub>2</sub>" ("amidaadis"), P(O)R-i, P(O)OR'-i, CO või CH<sub>2</sub>-ga ("formatsetaalis"), milles iga R või R' on sõltumatult H või asendatud või asendamata alküülrühm (1-20 C-ga), sisaldades vajadusel eetersidet (-O-), arüül-, alkenüül-, tsükloalküül-, tsükloalkenüül- või aralküülrühmi. Kõik sidemed polünukleotiidis ei pea olema samasugused. Eelnev kirjeldus rakendub kõigile siin nimetatud polünukleotiididele, hõlmates RNA-d ja DNA-d.

**[0129]** Üldiselt tähendab „oligonukleotiid” siin kasutatuna lühikest, üldiselt üheaheelalist, üldiselt sünteetilist polünukleotiid, mis on üldiselt, kuid mitte tingimata, vähem kui 200 nukleotiid pikkune. Mõisted „oligonukleotiid” ja „polünukleotiid” pole teineteist välistavad. Eelnev polünukleotiidide kirjeldus on võrdselt ja täielikult kohaldatav ka oligonukleotiididele.

**[0130]** Peptiidide või polüpeptiidide järjestuste puhul on "aminohapete järjestuse identsuse protsent (%)" defineeritud kui nende kandidaatjärjestuse aminohapete protsent, mis on identseid teatud peptiidi või polüpeptiidi järjestusega pärast järjestuste joondamist ning vajadusel pärast tühikute sisestamist selleks, et saavutada maksimaalne järjestuste identsuse protsent, seejuures mitte arvestades mistahes konservatiivseid asendusi kui osa järjestuste identsusest. Aminohapete järjestuse identsuse protsendi määramiseks võib joondamise saavutada erinevatel erialadel kohastel viisidel, kasutades näiteks avalikult kättesaadavat arvutitarkvara, nagu BLAST, BLAST-2, ALIGN või Megalign (DNASTAR) tarkvara. Eriala asjatundja võib määrata joondamiseks sobivad parameetrid, sealhulgas mistahes algoritmi maksimaalse joondamise saavutamiseks võrreldud täispikkade järjestuste ulatuses. Siiski on siinsetel eesmärkidel aminohapete järjestuste identsuse väärtused (%) saadud järjestuse võrdlemise arvutiprogrammi ALIGN-2 abil, sealjuures on ALIGN-2 programmi täielik lähtekood esitatud allpool tabelis A. ALIGN-2 järjestuse võrdlemise arvutiprogrammi autoriõigus on kinnitatud firmale Genentech, Inc. ning allpool tabelis A näidatud lähtekood kasutaja dokumentatsiooniga on sisse antud USA autoriõiguse ametis, Washington D.C., 20559, kus see on

registreeritud USA autoriõiguse registreerimisnumbriga TXU510087. ALIGN-2 programm on avalikult kättesaadav firma Genentech, Inc., South San Francisco, California kaudu või koostatav lähtekoodist. ALIGN-2 programm tuleks koostada UNIX operatsioonisüsteemile, eelistatult versiooni digital UNIX V4.0D jaoks. Kõik järjestuse võrdlemise parameetrid on määratud ALIGN-2 programmiga ning ei varieeru.

**[0131]** Olukordades, kus ALIGN-2 rakendatakse aminohapete järjestuse võrdluseks, arvutatakse antud aminohapete järjestuse A aminohapete järjestuse identsus (%) antud aminohapete järjestuse B suhtes, sellega või selle vastu (mida võib alternatiivselt väljendada kui antud aminohapete järjestust A, millel on või mis hõlmab teatud protsenti aminohapete järjestuse identsust antud aminohapete järjestuse B suhtes, sellega või selle vastu) järgnevalt:

$$100 \times X/Y,$$

milles X on järjestuste joondamise programmi ALIGN-2 poolt identsetena arvesse võetud aminohappejääkide arv selle programmi joonduses A ja B jaoks ning Y on B aminohappejääkide koguarv. On mõistetav, et kui aminohapete järjestuse A pikkus pole võrdne aminohapete järjestuse B pikkusega, pole A aminohapete järjestuse identsus (%) B suhtes võrdne B aminohapete järjestuse identsusega (%) A suhtes. Kui ei ole spetsiaalselt teisiti määratud, siis on kõik käesolevas kasutatavad aminohapete järjestuste identsuse väärtused protsentides saadud ALIGN-2 arvutitarkvara abil nii, nagu on kirjeldatud vahetult eelnevas lõigus.

**[0132]** "B-raku pinnamarker" või "B-raku pinnaantigeen" on siin antigeen, mida ekspresseeritakse B-raku pinnal ja mida võib sihtmärgistada sellega seonduva antagonistiga, mis, nendega piirdumata, hõlmab B-raku pinnaantigeeni antikehasid või lahustuvat B-raku pinnaantigeeni vormi, mis on võimeline antagonistlikult seonduva looduslikult esineva B-raku antigeeni ligandiga. Iseloomulikud B-raku pinnamarkerid hõlmavad CD10, CD 19, 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 pinnamarkereid (kirjeldusi vaadake trükises The Leukocyte Antigen Facts Book, 2. väljaanne, 1997, toim. Barclay et al., Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Muud B-raku pinnamarkerid hõlmavad RP105, FcRH2, B-raku CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA ja 239287. Erilist huvi pakuvad sellised B-raku

pinnamarkerid, mida imetaja muude, mitte-B-rakuliste kudedega võrreldes ekspresseeritakse B-rakkudes eelistatult ning mida võidakse ekspresseerida nii B-rakkude eellastes kui ka küpsetes B-rakkudes.

**[0133]** Siin kasutatuna tähendab termin "CD22" mistahes natiivset CD22-e, mis pärineb mistahes selgroogsest, kaasa arvatud imetajad nagu primaadid (nt inimene, jaava makaak (*cyno*)) ja närilised (nt hiired ja rotid), kui ei ole teisiti määratletud. Termin hõlmab "täispikka" protsessimata CD22-e ning samuti CD22 mistahes vormi, mis on saadud selle protsessimisel rakus. Samuti hõlmab termin CD22 looduslikke variante, näiteks splaissimise variante, alleelseid variante ja isovorme. CD22 peamine isovorm (CD22 $\beta$ ) sisaldab 847 aminohapet ja seitse immunoglobuliinisarnast piirkonda oma ekstratsellulaarses domeenis (vaadake trükist Wilson, G. L. et al., *J. Exp. Med.*, 173: 137-146 (1991)). Minoorne isovorm CD22 $\alpha$  sisaldab 647 aminohapet ning sellel puuduvad ekstratsellulaarses domeenis immunoglobuliinisarnased domeenid 3 ja 4 (vaadake trükiseid Stamenkovic, L., Seed, B., *Nature*, 345: 74-77 (1990) ja Wilson et al., (1991), *supra*). CD22 $\beta$  aminohapete järjestus on esitatud joonisel 1B, kus allajoonitud osa on ekstratsellulaarne domeen (ECD) ja kursiivis osa tähistab aminohappeid, mis puuduvad CD22 $\alpha$  ekstratsellulaarses domeenis. Joonisel 1C on kujutatud CD22 $\alpha$  aminohapete järjestust, kus ECD on alla joonitud. Aminohapete järjestus aminohappest 1 aminohappeni 21 on signaaljärjestus, mis on küpselt valgult ära lõigatud. Ühe teostusena ekspresseeritakse CD22 raku pinnal, näiteks normaalse B-raku pinnal või kasvaja B-raku pinnal. Joonisel 1D on kujutatud jaava makaagi CD22 aminohapete järjestus.

**[0134]** "Antikehad" (Ab) ja immunoglobuliinid (Ig) on glükoproteiinid, mille struktuursed tunnused on sarnased. Kui antikehadel on seondumisspetsiifilisus spetsiifilise antigeeniga, siis immunoglobuliinid hõlmavad nii antikehasid kui ka muid antikehalaadseid molekule, millel üldjuhul puudub antigeeni-spetsiifilisus. Viimati mainitud tüüpi polüpeptiide toodetakse madalatel tasemetel näiteks lümfisüsteemi poolt ning suurenenud tasemetel müeloomide poolt.

**[0135]** Mõisteid „antikeha” ja „immunoglobuliin” on siin kasutatud vahelduvalt kõige laiemas mõttes ning need hõlmavad monokloonseid antikehi (nt täispikki või intaktseid monokloonseid antikehi), polükloonseid antikehi, multivalentseid antikehi, multispetsiifilisi antikehi (nt bispetsiifilisi antikehi juhul, kui neil on soovitud bioloogiline aktiivsus) ja need võivad hõlmata ka teatud antikehafragmente (nagu siin on detailsemalt kirjeldatud). Antikeha

võib olla kimäärne, inimese antikeha, humaniseeritud ja/või afiinsusküpsuseni viidud antikeha.

**[0136]** Mõiste “CD22-vastane antikeha” või “antikeha, mis seondub CD22-ga”, tähendab antikeha, mis on võimeline seonduma CD22-ga piisava afiinsusega selliselt, et see antikeha on kasutatav diagnostilise ja/või raviagensina CD22-e sihtmärgistamiseks. Eelistatult on CD22-vastase antikeha seondumise määr mittesarnase, CD22-st erineva valguga väiksem kui ligikaudu 10% antikeha seondumisest CD22-ga, mõõdetuna näiteks radioimmuunanalüüsiga (RIA). Teatud teostustes on antikehal, mis seondub CD22-ga, dissotsiatsioonikonstant ( $K_d$ )  $\leq 1 \mu\text{M}$ ,  $\leq 100 \text{ nM}$ ,  $\leq 10 \text{ nM}$ ,  $\leq 1 \text{ nM}$  või  $\leq 0,1 \text{ nM}$ . Teatud teostustes seondub CD22-vastane antikeha CD22 epitoobiga, mis on erinevate liikide CD22-valkude seas konserveerunud.

**[0137]** Antikeha “varieeruv piirkond” või “varieeruv domeen” tähendab antikeha raske või kerge ahela aminoterminaalset domeeni. Raske ahela varieeruv domeen võib olla tähistatud kui “VH”. Kerge ahela varieeruv domeen võib olla tähistatud kui “VL”. Need domeenid on üldiselt antikeha kõige varieeruvamad osad ning sisaldavad antigeeni siduvaid saite.

**[0138]** Termin "varieeruv" viitab faktile, et varieeruvate domeenide teatud segmendid erinevates antikehades erinevad järjestuste poolest ulatuslikult ja neid kasutatakse iga konkreetse antikeha seandumisel antigeeniga ning nende spetsiifilisuse järgi iga konkreetse antigeeni suhtes. Siiski ei ole varieeruvus antikehade varieeruvates domeenides ühtlaselt jaotunud. Varieeruvus on nii kerge kui ka raske ahela varieeruvates domeenides kontsentreerunud kolme segmenti, mida nimetatakse komplementaarsust määravateks piirkondadeks (CDR-d) või hüpervarieeruvateks piirkondadeks (HVR-d). Varieeruvate domeenide enamkonserveerunud osad nimetatakse raamistikuks (FR). Kerge ja raske ahela varieeruvad domeenid sisaldavad kumbki nelja FR-piirkonda, mis suure osas on  $\beta$ -lehe konfiguratsioonis ning mis on ühendatud kolme CDR-ga, mis moodustavad  $\beta$ -lehe struktuure ühendavad lingud ning mis mõnel juhul moodustavad osa  $\beta$ -lehe struktuurist. Kumbagi ahela CDR-d hoitakse FR-piirkondade poolt üksteisega tihedalt lähestikku ning koos teisel ahelal asuvate CDR-dega osalevad nad antigeeni siduva saidi moodustamises (vaadake Kabat' et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Konstantsed domeenid ei osale vahetult antikeha seandumises antigeeniga, vaid täidavad erinevaid efektorfunktsioone, nagu antikeha osalemine antikehast sõltuvas rakulises toksilisuses.



[0139] Tuginedes konstantsete domeenide aminohapete järjestustele võib selgroogse looma mistahes liikidest pärinevate antikehade (immunoglobuliinide) kergeid ahelaid liigitada ühte kahest selgelt eristuvast tüübist, mida nimetatakse kapa ( $\kappa$ ) ja lambda ( $\lambda$ ).

[0140] Sõltuvalt antikehade (immunoglobuliinide) raskete ahelate konstantsete domeenide aminohapete järjestusest võib neid liigitada erinevatesse klassidesse. Immunoglobuliinide peamisi klasse on viis: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM, ning mitmeid neist võib edasi jagada alamklassidesse (isotüüpidesse), näiteks IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA ja IgA<sub>2</sub>. Erinevatele antikehade klassidele vastavaid raske ahela konstantseid domeene nimetatakse vastavalt  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ja  $\mu$ . Erinevate immunoglobuliinide klasside alamühikulised struktuurid ja kolmemõõtmelised konfiguratsioonid on hästi tuntud ja üldiselt kirjeldatud näiteks trükises Abbas et al., Cellular and Mol. Immunology, 4. väljaanne (2000). Antikeha võib olla osa suuremast liitmolekulist, mis moodustub antikeha kovalentsel või mittekovalentsel seondumisel ühe või enama muu valgu või peptiidiga.

[0141] Mõisteid “täispikk antikeha”, “terviklik antikeha” ja “kogu antikeha” kasutatakse siin samas tähenduses, et tähistada antikeha, mis on praktiliselt oma terviklikus vormis, ning mitte antikeha fragmente, nagu on määratletud allpool. Need mõisted tähendavad konkreetselt antikeha, mille rasked ahelad sisaldavad Fc-piirkonda.

[0142] „Antikeha fragmendid” hõlmavad ainult osa terviklikust antikehast, sealjuures säilitab see osa vähemalt ühe, enamuse või kõik funktsioonid, mis normaalselt on selle osaga seotud, kui see paikneb terves antikehas. Ühes teostuses sisaldab antikeha fragment tervikliku antikeha antigeeniseoselist saiti ning säilitab seega antigeeniga seondumise võime. Veel ühes teostuses säilitab antikeha fragment, näiteks selline, mis sisaldab Fc-piirkonda, vähemalt ühe bioloogilise toime, nagu FcRn sidumine, antikeha poolväärtusaja moduleerimine, ADCC funktsioon ning komplemendi sidumine, mis normaalselt on seotud Fc-piirkonnaga, kui see on terves antikehas. Ühes teostuses on antikeha fragment monovalentne antikeha, mille poolväärtusaeg *in vivo* on praktiliselt sama mis tervel antikehal. Näiteks võib selline antikeha fragment sisaldada antigeeni siduvat õlga, mis on ühendatud Fc-järjestusega, millel on võime tagada fragmendi stabiilsus *in vivo*.

[0143] Antikehade lõikamisel papaiiniga tekib kaks identset, ühe antigeeni siduva saidiga fragmenti, mida nimetatakse "Fab"-fragmentideks, ja järelejääv "Fc"-fragment, mille nimetus peegeldab selle fragmendi võimet hõlpsasti kristalluda. Pepsiiniga töötlemine annab F(ab)<sub>2</sub>

fragmendi, millel on kaks antigeeniga seonduvat saiti ja mis on jätkuvalt võimeline antigeeniga ristseonduma.

**[0144]** "Fv" on antikeha minimaalne fragment, mis sisaldab täielikku antigeeniseoselist saiti. Ühes teostuses koosneb Fv kaheaahelaline tüüp ühe raske ahela varieeruva domeeni ja ühe kerge ahela varieeruva domeeni tihedalt ja mittekovalentselt seotud dimeerist. Fv üheaahelalises tüübis (scFv-s) võivad ühe raske ahela varieeruv domeen ja ühe kerge ahela varieeruv domeen olla omavahel painduva peptiidlinkeri abil kovalentselt seotud nii, et kerged ja rasked ahelad saavad seonduda „dimeerseks“ struktuuriks, mis on analoogne kaheaahelalises Fv tüübis esinevaga. Sellises konfiguratsioonis interakteeruvad mõlema varieeruva domeeni kolm hüpervarieeruvat piirkonda, määrates antigeeni siduva saidi VH-VL dimeeri pinnal. Kuus CDR-i koos annavad antikehale antigeeni sidumise spetsiifilisuse. Siiski on isegi ühel varieeruv domeenil (või poolel Fv-st, mis sisaldab ainult kolme antigeenispetsiifilist CDR-i) võime antigeeni ära tunda ja sellega seonduda, kuigi seondumise afiinsus on madalam kui tervikliku antigeeni siduva saidi puhul.

**[0145]** Fab fragment sisaldab kerge ja raske ahela varieeruvaid domeene ning kerge ahela konstantset domeeni ning raske ahela esimest konstantset domeeni (CHI). Fab' fragmendid erinevad Fab fragmentidest mõne jäägi lisandumise poolest raske ahela CHI domeeni karboksüterminuses, nende hulgas on üks või enam tsüsteiini antikeha liigendpiirkonnast. Fab'-SH tähendab siin Fab', milles konstantse domeeni tsüsteini jäägid (jäägid) kannavad vaba tiolrühma. F(ab')<sub>2</sub> antikeha fragmendid saadi algselt kui Fab' fragmentide paar, mille vahel on liigendi tsüsteiinid. On teada ka teisi antikeha fragmentide keemilise sidumise viise.

**[0146]** Antikeha fragmendid "üheaahelaline Fv" ehk "scFv" sisaldavad antikeha VH- ja VL-domeene, kusjuures need domeenid esinevad ühe polüpeptiidahelana. Üldjuhul sisaldab scFv-polüpeptiid lisaks polüpeptiidlinkerit VH- ja VL-domeenide vahel, mis võimaldab scFv fragmendil moodustada soovitud struktuuri antigeeni sidumiseks. Ülevaateks scFv kohta vaadake Pluckthun'i tööd trükises *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113. köide, toimetajad Rosenberg ja Moore, Springer-Verlag, New York, lk 269-315 (1994).

**[0147]** Termin "diakehad" tähendab siin kahe antigeenisidumise saidiga väikeseid antikehafragmente, mis ühe ahelana (VH-VL) sisaldavad teineteisega seotud raske ahela varieeruvat domeeni (VH) ja kerge ahela varieeruvat domeeni (VL). Kasutades linkerit, mis on liialt lühike selleks, et võimaldada paari moodustumist sama ahela kahe domeeni vahel, sunnitakse need domeenid moodustama paari teise ahela komplementaarsete domeenidega ja looma kaks

antigeeni siduvat saiti. Diakehad võivad olla bivalentsed või bispetsiifilised. Diakehi kirjeldatakse üksikasjalikumalt näiteks trükistes EP 404097, WO 93/11161, Hudson et al., (2003) Nat. Med., 9: 129-134 ja Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993). Trükises Hudson et al., (2003) Nat. Med., 9: 129-134 on kirjeldatud ka triakehasid ja tetra-kehasid.

**[0148]** Termin "monokloonne antikeha" tähendab siin kasutatuna antikeha, mis on saadud praktiliselt homogeensest antikehade populatsioonist, see tähendab, et üksikud antikehad, millest populatsioon koosneb, on identsed, välja arvatud võimalikud mutatsioonid, see tähendab looduslikult esinevad mutatsioonid, mida võib olla vähestes kogustes. Seega näitab laiend „monokloonne“ antikeha tunnust, et see ei ole eristuvate antikehade segu. Teatud teostustes hõlmab selline monokloonne antikeha sihtmärgiga seonduvat polüpeptiidjärjestust sisaldavat antikeha, kusjuures sihtmärgiseoseline polüpeptiidjärjestus saadi toiminguga, mis hõlmab üksiku sihtmärki siduva polüpeptiidi valimist mitme polüpeptiidjärjestuse hulgast. See valimistoiming võib olla unikaalse klooni valimine mitme klooni hulgast, nagu hübriidoomi kloonide puul, faagi kloonid või rekombinantse DNA kloonid. Tuleb mõista, et valitud sihtmärgiseoselist järjestust võib edasiselt muuta, näiteks selleks, et parendada selle tootmist rakukultuuris, vähendada selle immunogeensust *in vivo*, valmistada multispetsiifiline antikeha jne, ning tuleb mõista, et muudetud sihtmärgiseoselist järjestust sisaldav antikeha on samuti selle leiutise kohane monokloonne antikeha. Erinevalt polükloonsete antikehade preparaatidest, mis sisaldavad erinevaid, erinevate determinantide (epitopide) vastu suunatud antikehasid, on monokloonsete antikehade valmistamisega saadud iga monokloonne antikeha suunatud üksiku determinandi vastu antigeenis. Lisaks spetsiifilisusele on monokloonsed antikehad kasulikud seetõttu, et tavaliselt ei ole need saastunud muude immunoglobuliinidega.

**[0149]** Laiend "monokloonne" antikeha tunnuseks näitab, et see on saadud praktiliselt homogeensete antikehade populatsioonist ning seda laiendit ei tõlgendata nõudena toota antikeha mingi kindla meetodi abil. Näiteks võib käesoleva leiutise kohaselt kasutatavaid monokloonseid antikehasid valmistada erinevate meetodite abil, mis hõlmavad näiteks hübriidoomimeetodit (nt Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. väljaanne, 1988), Hammerling et al., trükises: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, NY, 1981)), rekombinantse DNA meetodeid (vaadake nt US patendipublikatsiooni 4816567),

faagdisplei meetodil põhinevaid tehnoloogiaid (vaadake nt Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991), Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1992), Sidhu et al., *J. Mol. Biol.*, 338(2): 299-310 (2004), Lee et al., *J. Mol. Biol.*, 340(5): 1073-1093 (2004), Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (34): 12467-12472 (2004) ja Lee et al., *J. Immunol. Methods*, 284(1-2): 119-132(2004) ning tehnoloogiaid, mida kasutatakse inimese antikehade või nende sarnaste antikehade valmistamiseks loomades, kellel on osa või kõik inimese immunoglobuliini lookustest või geenidest, mis kodeerivad inimese immunoglobuliinide järjestusi (vaadake nt US patendipublikatsioon WO 98/24893, WO 96/34096, WO 96/33735 ja WO 91/10741, trükiseid Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993), Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993), Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993), US patendipublikatsioon 5545807, 5545806, 5569825, 5625126, 5633425 ja 5661016, trükiseid Marks et al., *Bio.Technology*, 10: 779-783 (1992), Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994), Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994), Fishwild et al., *Nature Biotechnol.*, 14: 845-851 (1996), Neuberger, *Nature Biotechnol.*, 14: 826 (1996) ja Lonberg, Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

**[0150]** Siin hõlmavad monokloonsed antikehad spetsiifiliselt „kimäärsed” antikehasid, milles osa raskest ja/või kergest ahelast on identne või homoloogne vastavate järjestustega konkreetsest liigist pärinevates või konkreetseesse antikeha klassi või alamklassi kuuluvates antikehades, kuid ülejäänud ahel(ad) on identne (identsed) või homoloogne (homoloogsed) vastavate järjestustega mõnest teisest liigist pärinevates või muusse antikeha klassi või alamklassi kuuluvates antikehades, ning lisaks selliste antikehade fragmente, kui neil on soovitud bioloogiline aktiivsus (US patendipublikatsioon 4816567 ja Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

**[0151]** Mitte-inimese (nt hiire) antikehade „humaniseeritud” vormid on kimäärsed antikehad, mis sisaldavad minimaalselt mitte-inimese immunoglobuliini järjestust. Ühes teostuses on humaniseeritud antikeha inimese immunoglobuliin (retsipientantikeha), milles retsiipiendi hüpervarieeruva piirkonna jääke on asendatud jääkidega inimesest erineva liigi, nagu hiir, rott, küülik või inimesest erinev primaat, hüpervarieeruvast piirkonnast (doonorantikehast), millel on soovitud spetsiifilisus, afiinsus ja/või võimekus. Mõnel juhul on inimese immunoglobuliini raamistikupiirkonna (FR) jäägid asendatud vastavate mitte-inimese päritoluga jääkidega. Lisaks võivad humaniseeritud antikehad sisaldada jääke, mida ei leidu retsiipientantikehas ega doonorantikehas. Neid modifikatsioone võib teha antikeha võimekuse edasi-

seks suurendamiseks. Üldjuhul hõlmab humaniseeritud antikeha praktiliselt vähemalt ühte, üldjuhul kahte tervet varieeruvat domeeni, milles kõik või praktiliselt kõik hüpervarieeruvad lingud vastavad mitte-inimese immunoglobuliinile ning kõik või praktiliselt kõik FR-id on inimese immunoglobuliini järjestusega. Humaniseeritud antikeha sisaldab vajadusel vähemalt osa immunoglobuliini konstantsest piirkonnast (Fc), tavaliselt inimese immunoglobuliini konstantsest piirkonnast. Lisadetaile vaadake trükistest 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). Vaadake ka järgnevaid ülevaateartikleid ning neis tsiteeritud viiteid: Vaswani, 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).

**[0152]** „Inimese antikeha” on selline antikeha, millel on inimeses toodetavale antikehale vastav aminohapete järjestus ja/või mis on valmistatud mistahes siin avaldatud inimese antikehade valmistamise meetodi abil. Selline inimese antikeha määratlus välistab spetsiifiliselt need humaniseeritud antikehad, mis sisaldavad mitte-inimesest pärinevaid antigeeni siduvaid jääke.

**[0153]** Termin "hüpervarieeruv piirkond", "HVR" või "HV" tähendab siin antikeha varieeruva domeeni piirkondi, mille järjestused on hüpervarieeruvad ja/või moodustavad struktuurselt määratletud lingusid. Üldiselt sisaldavad antikehad kuut hüpervarieeruvat piirkonda, kolm VH-s (H1, H2, H3) ja kolm VL-s (L1, L2, L3). Natiivsetes antikehades on kuuest hüpervarieeruvast piirkonnast suurima mitmekesisusega H3 ja L3 ning eriti H3-l arvatakse olevat unikaalne roll antikehade täpse spetsiifilisuse tagamises (Xu et al., (2000) *Immunity*, 13: 37-45, Johnson, Wu, (2003) *Methods in Molecular Biology*, 248: 1-25 (toim. Lo, Human Press, Totowa, NJ)). Tõepoolest on kaamellaste sugukonda kuuluvate loomade looduslikult esinevad antikehad, mis koosnevad ainult raskest ahelast, funktsionaalsed ja stabiilsed ka kerge ahelata (Hamers-Casterman et al., (1993) *Nature*, 363: 446-448, Sheriff et al., (1996) *Nature Struct. Biol.*, 3: 733-736).

**[0154]** Kasutusel on suur arv hüpervarieeruva piirkonna üldkirjeldusi ja need on käesolevasse kaasatud. Kabat' komplementaarsust määravad piirkonnad (*Complementarity Determining Regions*, CDR-d) põhinevad järjestuse varieeruvusel ja need on tavaliselt kasutusel (Kabat' et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Seevastu

Chothia viitab struktuursete lingude paiknemisele (Chothia, Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987)). AbM tarkvara hüpervarieeruvad piirkonnad kujutavad endast kompromissi Kabat' CDR-ide ja Chothia struktuursete lingude vahel ning neid kasutatakse Oxford Molecular Ltd. AbM antikehade modelleerimise tarkvaras. "Kontakt"-hüpervarieeruvad piirkonnad põhinevad kättesaadavate komplekssete kristallstruktuuride analüüsil. Allpool on esitatud kõigi nende hüpervarieeruvate piirkondade aminohappejäägid.

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	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat' numeratsioon)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia numeratsioon)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

**[0155]** Hüpervarieeruvad piirkonnad võivad hõlmata "laiendatud hüpervarieeruvaid piirkondi" järgnevalt: 24-36 või 24-34 (L1), 46-56 või 50-56 (L2) ja 89-97 (L3) VL-s ja 26-35 (H1), 50-65 või 49-65 (H2) ja 93-102, 94-102 või 95-102 (H3) VH-s. Varieeruva domeeni jäägid on kõigis neis definitsioonides nummerdatud vastavalt Kabat' et al., *supra*. Kabat' numeratsiooni kohaselt on leiutisekohaste CD22-vastaste antikehade 10F4 hüpervarieeruvad HVR-H1 ja HVR-H2 piirkonnad H26-H35 ja H49-H65.

**[0156]** ""Raamistiku"- või "FR"-jäägid on need varieeruva domeeni jäägid, mis ei ole siin defineeritud hüpervarieeruva piirkonna jäägid.

**[0157]** Mõiste "varieeruva domeeni jäägi nummerdamine Kabat'i järgi" või "aminohappe asendi nummerdamine Kabat'i järgi" ning nende variatsioonid tähendavad numeratsiooni-süsteemi, mida raske ahela varieeruvate domeenide või kerge ahela varieeruvate domeenide jaoks on kasutatud trükises Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Seda numeratsioonisüsteemi kasutades võib tegelik lineaarne aminohapete järjestus sisaldada

vähem aminohappeid või lisaaminohappeid vastavalt lühendamisele või insertsioonile varieeruva domeeni FR- või HVR-piirkonnas. Näiteks võib raske ahela varieeruv domeen sisaldada üksiku aminohappe insertsiooni pärast H2-piirkonna jääki 52 (jääk 52a vastavalt Kabat'i süsteemile) ning inserteeritud jääke pärast raske ahela FR-piirkonna jääki 82 (nt jäägid 82a, 82b ja 82c jne vastavalt Kabat'i süsteemile). Jääkide numeratsiooni Kabat'i järgi võib antud antikeha jaoks määrata, joondades antikeha järjestuse homoloogsed piirkonnad Kabat'i järgi nummerdatud "standard"-järjestusega.

**[0158]** "Vaba tsüsteiin" tähendab lähteantikehasse disainitud tsüsteiinijääki, millel on tiolrühm (-SH), mis pole paardunud ega muul viisil osa molekulidevahelisest või molekulisisesest disulfiidsillast.

**[0159]** Mõiste "tiolreaktiivsuse väärtus" on vabade tsüsteiinide reaktiivsuse kvantitatiivne iseloomustus. Tiolreaktiivsuse väärtus on tsüsteiini-modifitseeritud antikehas olevate vabade, tiolreaktiivse reagentiga reageerivate tsüsteiinide protsentuaalne osakaal, ning see on teisendatud selliselt, et tema maksimaalne väärtus on 1. Näiteks tsüsteiini-modifitseeritud antikehas oleval vaba tsüsteiinil, mis biotiinmürgistatud antikeha moodustamiseks reageerib tiolreaktiivse reagentiga, nagu biotiin-maleimiidreagent, 100% saagisega, on tiolreaktiivsuse väärtus 1,0. Mõnel tsüsteiini-modifitseeritud antikehas oleval vabal tsüsteiinil, mis reageerib tiolreaktiivse reagentiga 80% saagisega, on tiolreaktiivsuse väärtus 0,8. Mõnel sellesse või mõnda muusse lähteantikehasse sisestatud tsüsteiinil, mis üldse ei reageeri tiolreaktiivse reagentiga, on tiolreaktiivsuse väärtus 0. Konkreetse tsüsteiini tiolreaktiivsuse väärtust võib määrata ELISA-analüüsi, massispektroskoopia, vedelikukromatograafia, autoradiograafia või muude kvantitatiivsete analüütiliste testidega. Tiolreaktiivsed reagentid, mis võimaldavad püüda tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ning võrrelda ja kvantifitseerida tsüsteiini reaktiivsust, hõlmavad järgnevalt: biotiin-PEO-maleimiid ((+)-biotinüül-3-maleimidopropioonamidüül-3,6-dioksaoktaiindiamiin, Oda et al., (2001) Nature Biotechnology, 19: 379-382, Pierce Biotechnology, Inc.) biotiin-BMCC, PEO-jodoatestüül-biotiin, jodoatestüül-LC-biotiin ja biotiin-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.) ning  $N\alpha$ -(3-maleimidüülpropionüül)biotsütiin (MPB, Molecular Probes, Eugene, OR). Muud kaubanduslikud allikad biotinüülimise ning bifunktsionaalsete ja multifunktsionaalsete linker-reagentide jaoks hõlmavad firmasid Molecular Probes, Eugene ja Sigma, St. Louis, MO.

**[0160]** "Lähteantikeha" on antikeha, mis sisaldab aminohapete järjestust, milles üks või enam aminohappejääki asendatakse ühe või enama tsüsteiinijäägiga. Lähteantikeha võib

sisaldada natiivset või metsiktüüpi järjestust. Võrreldes antikeha muude natiivsete, metsiktüüpi või muudetud vormidega võib lähteantikehas olla aminohapete järjestuse eelnevaid muudatusi (nagu lisandused, deletsioonid ja/või asendused). Lähteantikeha võib olla suunatud huvipakkuva sihtmärkantigeeni, näiteks bioloogiliselt olulise polüpeptiidi vastu. Võimalikuks peetakse mittepolüpeptiidsete (nagu kasvajaseoselised glükolipiid-antigeenid, vaadake trükist US 5091178), antigeenide vastu suunatud antikehasid.

**[0161]** Käesolevas kasutatud lühendid ja nende definitsioonid on järgmised: BME on  $\beta$ -merkaptotetanool, Boc on N-(t-butoksükarbonüülrühm), cit on tsitrulliin (2-amino-5-karbamiidopentaanhape), dap on dolaproiin, DCC on 1,3-ditsükloheksüülkarbodiimid, DCM on diklorometaan, DEA on dietüülamiin, DEAD on dietüül-asodikarboksülaad, DEPC on dietüül-fosforüülsüanidaad, DIAD on diisopropüül-asodikarboksülaad, DIEA on N,N-diisopropüül-etüülamiin, dil on dolaisoleutsiin, DMA on dimetüülsetamiid, DMAP on 4-dimetüül-aminopüridiin, DME on etüüleenglükooldimetüüleeter (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 elektro-pihustus-massispektromeetria (*electrospray mass spectrometry*), EtOAc on etüülatsetaat, Fmoc on N-(9-fluoreenüülmetoksükarbonüülrühm), gly on glütsiin, HATU on O-(7-asabenso-triasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat, HOBt on 1-hüdroksüben-sotriasool, HPLC on kõrgsurvevedelikukromatograafia (*high pressure liquid chromatography*), ile on isoleutsiin, lys on lüsiin, MeCN (CH<sub>3</sub>CN) on atsetonitriil, MeOH on metanool, Mtr on 4-anisüüldifenüülmetüülrühm (või 4-metoksütritüülrühm), nor on (1S,2R)-(+)-norefedriin, PBS on fosfaadiga puhverdatud soolalahus (pH 7,4), PEG on polüetüleen-glükool, Ph on fenüülrühm, Pnp on p-nitrofenüülrühm, MC on 6-maleimidokaproüülrühm, phe on L-fenüülalaniin, PyBrop on bromo-tris-pürrolidinofoosooniumheksafluorofosfaat, SEC on suuruskromatograafia (*size-exclusion chromatography*), Su on suktsiinimiid, TFA on trifluoroäädikhape, TLC on õhukese kihi kromatograafia (*thin layer chromatography*), UV on ultraviolet ning val on valiin.

**[0162]** “Afiinsusküpsuseni viidud” antikeha on selline, mille ühes või enamas HVR-is on üks või enam muudatust, mis viivad antikeha ja antigeeni vahelise afiinsuse suurenemisele võrreldes lähteantikehaga, milles seda muutust (neid muutusi) ei leidu. Ühes teostuses on



küpsete antikehade afiinsus sihtmärkantigeeni suhtes nanomolaarse või isegi pikomolaarse väärtusega. Afiinsusküpsuseni viidud antikehi valmistatakse tehnika tasemes tuntud meetodite abil. Marks ja kaastöölised kirjeldavad trükises *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992) afiinsusküpsuseni viimist VH ja VL domeenide segamise teel. HVR-i ja/või raamistiku-jääkide 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): 3310-3319 (1995) ning Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992).

**[0163]** “Blokeeriv” antikeha või “antagonist”-antikeha on selline antikeha, mis inhibeerib või vähendab seotava antigeeni bioloogilist aktiivsust. Teatud blokeerivad antikehad või antagonist-antikehad inhibeerivad antigeeni bioloogilise aktiivsuse olulisel määral või täielikult.

**[0164]** Siin kasutatuna on “agonistantikeha” antikeha, mis jäljendab vähemalt ühte huvipakkuva polüpeptiidi funktsionaalset aktiivsust.

**[0165]** Antikeha "efektorfunktsioonid" tähendavad bioloogilisi aktiivsusi, mis on omistatavad antikeha Fc-piirkonnale (natiivse järjestusega Fc-piirkonnale või Fc-piirkonna aminohapete järjestuse variandile) ning need varieeruvad koos antikeha isotüübiga. Antikeha efektorfunktsioonide näited hõlmavad C1q sidumist ja komplemendist sõltuvat tsütotoksilisust, Fc-retseptoriga seondumist, antikehast sõltuvat rakuvahendatud tsütotoksilisust (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* – ADCC-d), fagotsütoosi, rakupinna retseptorite (nt B-raku retseptori) mahareguleerimist ning B-raku aktiveerimist.

**[0166]** Termin "Fc-retseptor" ehk "FcR" kirjeldab retseptorit, mis seondub antikeha Fc-piirkonnaga. Mõnes teostuses on FcR inimese natiivse järjestuse FcR. Mõnes teostuses on eelistatav FcR selline, mis seondub IgG antikehaga (gamma-retseptor) ning hõlmab retseptorite FcγRI, FcγRII ja FcγRIII alamklasse, kaasa arvatud nende retseptorite alleelseid variante ja alternatiivselt splaissitud vorme. FcγRII-retseptorid hõlmavad FcγRIIA-d ("aktiveeriv retseptor") ja FcγRIIB-d ("inhibeeriv retseptor"), millel on sarnased aminohapete järjestused, mis erinevad peamiselt nende retseptorite tsütoplasmaatilistes domeenides. 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) (vaadake trükist M.

Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 203-234 (1997). FcR-ide kohta on ülevaade trükistes Ravetch, Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-92 (1991), Capel et al., *Immunomethods*, 4: 25-34 (1994) ja de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126: 330-41 (1995). Muud FcR-d, kaasa arvatud need, mida identifitseeritakse tulevikus, hõlmatakse samuti terminiga "FcR".

**[0167]** Termin "Fc-retseptor" ehk "FcR" hõlmab ka neonataalset retseptorit FcRn, mis vastutab ema IgG-de ülekande eest lootele (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117: 587 (1976) ja Kim et al., *J. Immunol.*, 24: 249 (1994)) ja reguleerib immunoglobuliinide homöostaasi. Meetodid FcRn seondumise mõõtmiseks on tuntud (vaadake näiteks Ghetie, 1997, Hinton, 2004). Inimese FcRn-ga *in vivo* seondumise määra ja inimese FcRn-i kõrge affiinsusega siduvate polüpeptiidide poolväärtusaega seerumis saab määrata näiteks transgeenses hiires või inimese transfekteeritud rakuliinides, mis ekspresseerivad inimese FcRn-I, või primaatides, kellele on manustatud Fc-variantset polüpeptiidi.

**[0168]** Trükises WO 00/42072 (Presta) kirjeldatakse antikehade variante, millel on suurenenud või vähenenud võime seonduda FcRs-ga. Vaadake ka trükist Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 9(2): 6591-6604 (2001).

**[0169]** "Inimese efektorrakud" on leukotsüüdid, mis ekspresseerivad ühte või enam FcR-i ja täidavad efektorfunktsioone. Mõnes teostuses ekspresseerivad rakud vähemalt FcγRIII ja täidavad ADCC efektorfunktsiooni. ADCC-d vahendavate inimese leukotsüütide näited hõlmavad perifeerse vere mononuklearseid rakke (PBMC), loomulikke tapjarakke (NK), monotsüüte, tsütotoksilisi T-rakke ja neutrofiile. Efektorrakke võib eraldada looduslikust allikast, näiteks verest.

**[0170]** "Antikehast sõltuv rakuline tsütotoksilisus" ehk ADCC viitab tsütotoksilisuse vormile, mille puhul sekreteeritud Ig, mis on seondunud teatud tsütotoksilistel rakkudel (nt loomulikel tapjarakkudel (*Natural Killer*, NK), neutrofiilidel ja makrofaagidel) olevate Fc-retseptoritega (FcR-ga), võimaldab nendel tsütotoksilistel efektorrakkudel spetsiifiliselt seonduda antigeeni kandva sihtmärkrakuga ja järgnevalt tappa sihtmärkrakk tsütotoksiinidega. ADCC-d vahendavad peamised rakud, NK-rakud, ekspresseerivad ainult FcγRIII, samal ajal kui monotsüüdid ekspresseerivad FcγRI, FcγRII ja FcγRIII. Fc ekspressioon hematopoeetilistel rakkudel on kokku võetud trükise Ravetch, Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-492 (1991) leheküljel 464 tabelis 3. Huvipakkuva molekuli ADCC aktiivsuse hindamise võib läbi viia *in vitro* ADCC-testi abil, näiteks sellise testi abil, mida on kirjeldatud US patendipublikatsioonides 5500362 või 5821337 või Presta US patendipublikatsioonis 6737056. Sellisteks

testideks sobivad efektorrakud hõlmavad perifeerse vere mononukleaarseid rakke (PBMC) ja loomulikke tapjarakke (NK). Huvipakkuva molekuli ADCC aktiivsust võib alternatiivselt või lisaks hinnata *in vivo*, näiteks loomudelil nagu sellisel, mis on esitatud trükises Clynes et al., PNAS USA, 95: 652-656 (1998).

**[0171]** „Komplementist sõltuv tsütotoksilisus" ehk "CDC" viitab sihtmärkraku lüüsilise komplemendi manulusel. Komplemendi klassikalise raja aktiveerimise initsieerib komplemendisüsteemi esimese komponendi (C1q) sidumine (sobiva alamklassi) antikehadega, mis on seotud neile vastavate antigeenidega. Komplemendi aktivatsiooni hindamiseks võib teha CDC testi näiteks nii, nagu on kirjeldatud trükises Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996).

**[0172]** Fc-piirkonnas muudetud aminohapete järjestusega polüpeptiidide variante ning suurendatud või vähendatud C1q sidumise võimet on kirjeldatud US patendipublikatsioonides 6194551B1 ja WO 99/51642. Vaadake samuti Idusogie et al., J. Immunol., 164: 4178-4184 (2000).

**[0173]** Termin "Fc-piirkonda sisaldav polüpeptiid" viitab polüpeptiidile nagu antikeha või immuno adhesiin, mis sisaldab Fc-piirkonda. Fc-piirkonna C-terminaalse lüsiini (EL numeratsioonisüsteemi kohaselt jääk 447) võib eemaldada näiteks peptiidi puhastamise käigus või polüpeptiidi kodeeriva nukleiinhappe rekombinantse modifitseerimise käigus. Sellele vastavalt võib leiutisekohane kompositsioon, mis sisaldab Fc-piirkonda hõlmavat polüpeptiidi, sisaldada polüpeptiide koos jäägiga K447 või polüpeptiide, millest kõik jäägid K447 on eemaldatud, või segu polüpeptiididest, millest K447 on eemaldatud või eemaldamata.

**[0174]** "Inimese aktseptorraamistik" on käesoleva leiutise eesmärkide kohaselt raamistik, mis sisaldab VL- või VH-raamistiku aminohapete järjestust, mis on saadud inimese immunoglobuliiniraamistikust või inimese konsensusraamistikust. Inimese aktseptorraamistik, mis "on saadud" inimese immunoglobuliiniraamistikust või inimese konsensusraamistikust, võib sisaldada nendega samasugust aminohapete järjestust või võib sisaldada varem olemas olnud aminohapete muutusi. Mõnes teostuses on varasemate muutuste arv 10 või väiksem, 9 või väiksem, 8 või väiksem, 7 või väiksem, 6 või väiksem, 5 või väiksem, 4 või väiksem, 3 või väiksem või 2 või väiksem. Kui varem olemas olnud muutused on VH-piirkonnas, siis eelistatult on need ainult kolmes, kahes või ühes asenditest 71H, 73H ja 78H, näiteks võivad aminohapete jäägid neis asendites olla 71 A, 73T ja/või 78A. Ühes teostuses on VL inimese

aktseptorraamistik järjestuse poolest identne inimese VL immunoglobuliiniraamistiku järjestuse või inimese konsensusraamistiku järjestusega.

[0175] "Inimese konsensusraamistik" on raamistik, mis esindab kõige sagedamini esinevaid aminohappejääke inimese immunoglobuliini VL- või VH-raamistiku järjestuste valikus. Üldiselt on inimese immunoglobuliini VL- või VH-raamistiku järjestuste valik tehtud varieeruvate domeenide järjestuste alamrühmast. Üldiselt on järjestuste alamrühm Kabat' et al. tööle (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) vastav alamrühm. Ühes teostuses on VL jaoks selleks alamrühmaks kappi I, nagu trükises Kabat' et al., *suppra*. Ühes teostuses on VH jaoks selleks alamrühmaks alamrühm III, nagu trükises Kabat' et al., *suppra*.

[0176] VH alamrühma III konsensusraamistik" sisaldab konsensusjärjestust, mis on saadud Kabat' et al., *suppra*, raske ahela varieeruva alamrühma III aminohapete järjestustest. Ühes teostuses sisaldab VH alamrühma III konsensusraamistiku aminohapete järjestus vähemalt osa kõikidest või tervikuna kõiki järgmistest järjestustest:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, SEQ ID NO:1)-HVR-H1-  
WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, SEQ ID NO:3)-HVR-H2-  
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (FR-H3, SEQ ID NO:5)-HVR-H3-  
WGQGTLLVTVSS (FR-H4, SEQ ID NO:7).

[0177] "VL alamrühma 1 konsensusraamistik" sisaldab konsensusjärjestust, mis on saadud Kabat' et al., *suppra*, kerge ahela varieeruva kappi alamrühma I aminohapete järjestustest. Ühes teostuses sisaldab VL alamrühma 1 konsensusraamistiku aminohapete järjestus vähemalt osa kõikidest või tervikuna kõiki järgmistest järjestustest:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (FR-L1, SEQ ID NO:8)-HVR-L1-  
WYQKPKGKAPKLLIY (FR-L2, SEQ ID NO:11)-HVR-L2-  
GVPSRFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC (FR-L3, SEQ ID NO:13)-HVR-L3-  
FGQGTKVEIK (FR-L4, SEQ ID NO:15).

[0178] "Sekretsiooni signaaljärjestus" või "signaaljärjestus" tähendab nukleinhappejärjestust, mis kodeerib lühikest signaalpeptiidi, mida võib kasutada huvipakkuva värskest sünteesitud valgu suunamiseks läbi rakumembraani, tavaliselt läbi prokarüootide sisemise membraani või sisemise ja välimise membraani. Selliselt sekreteeritakse huvipakkuv valk nagu

immunoglobuliini kerge või raske ahela polüpeptiid prokarüootse peremeesraku periplasmasse või kultiveerimiskeskonda. Sekretsiooni signaaljärjestusega kodeeritav signaalpeptiid võib olla peremeesrakkudele endogeenne või need võivad olla eksogeensed, hõlmates ekspresseeritava polüpeptiidi natiivseid signaalpeptiide. Tavaliselt asuvad sekretsiooni signaaljärjestused ekspresseeritava polüpeptiidi aminoterminuses ning tavaliselt eemaldatakse need biosünteesi ja polüpeptiidi tsütoplastmast sekreteerimise vahel ensümaatilisel. Seega küpses saaduses signaalpeptiidi tavaliselt ei esine.

**[0179]** Üldiselt tähendab “seondumisafiinsus” kõigi üksiku molekuli (nt antikeha) seondumiskoha ja selle seondumispartneri (nt antigeeni) vaheliste mittekovalentsete interaktsioonide summaarset tugevust. Kui pole osutatud teisiti, siis siin kasutatuna tähendab “seondumisafiinsus” olemuslikku seondumisafiinsust, mis peegeldab 1 : 1 interaktsiooni sidumispaari liikmete (nt antikeha ja antigeeni) vahel. Molekuli X afiinsust oma partneri Y suhtes võib üldjuhul väljendada dissotsiatsioonikonstandi ( $K_d$ ) abil. Afiinsust võib mõõta tehnika tasemes tuntud harilike meetoditega, mis hõlmavad siin kirjeldatuid. Madala afiinsusega antikehad seonduvad antigeeniga üldiselt aeglaselt ja kalduvad hõlpsalt dissotsieeruma, samas kui suure afiinsusega antikehad seonduvad antikehaga kiiremini ja kalduvad jääma pikemalt seondunuks. Tehnika tasemes on tuntud erinevad seondumisafiinsuse mõõtmise meetodid ja neist kõiki võib kasutada käesoleva leiutise eesmärkidel. Järgnevalt on kirjeldatud spetsiifilisi illustreerivaid teostusi.

**[0180]** Ühes teostuses mõõdetakse leiutisekohast “ $K_d$ ” või “ $K_d$ -väärtust” radiomärgistatud antigeeni seondumise analüüsi (RIA) teel, mõõtes huvipakkuva antikeha Fab-versiooni ja selle antigeeni seondumist, nagu siin kirjeldatakse järgmise testi jaoks: Fab-ide seondumise afiinsust antigeeni suhtes mõõdetakse lahuses, tasakaalustades Fab-i märgistamata antigeeni minimaalse kontsentratsiooniga tiitrimisriidade juuresolekul  $^{125}\text{I}$ -märgistatud antigeeniga ning püüdes seejärel seondunud antigeeni Fab-vastase antikehaga kaetud plaadile (Chen et al., (1999) *J. Mol. Biol.*, 293: 865-881). Analüüsi tingimuste väljatöötamisel kaetakse mikrotiiterplaadid (Dynex) üle öö Fab-vastase antikehaga (Cappel Labs), mille kontsentratsioon 50 mM naatriumkarbonaadi lahuses (pH 9,6) on 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ning blokeeritakse järgnevalt 2% (mass mahu kohta) veise seerumi albumiiniga PBS-is toatemperatuuril (ligikaudu 23 °C) 2 kuni 5 tundi. Mitteabsorbeerival plaadil (Nunc #269620) segatakse 100 pM või 26 pM  $^{125}\text{I}$ -märgistatud antigeeni huvipakkuva Fab-i (nt VEGF-vastase antikeha hindamisel trükises Presta et al., (1997) *Cancer Res.*, 57: 4593-4599, Fab-12-e) lahjenduste reaga. Seejärel inku-

beeritakse huvipakkuvat Fab-i üle öö, kuid inkubeerimine võib kesta pikemalt (nt ligikaudu 65 tundi), et kindlustada tasakaaluoleku saavutamine. Seejärel kantakse segud üle püüdmiss-plaadile, inkubeerimiseks toatemperatuuril (nt üks tund). Eemaldatakse lahus ja plaate pestakse 8 korda 0,1% Tween-20 lahusega PBS-is. Kui plaadid on kuivanud, lisatakse süvendi kohta 150 µl stshintillanti (MicroScint-20, Packard) ja plaate loetakse  $\gamma$ -loenduriga Topcount (Packard) 10 minutit. Konkureeriva seondumise analüüsimisel valitakse iga Fab-i jaoks kontsentratsioonid, mis annavad 20% või vähem maksimaalsest seondumisest.

**[0181]** Veel ühe teostuse kohaselt mõõdetakse  $K_d$  või  $K_d$ -väärtust pinna-plasmonresonantsanalüüsi abil, kasutades süsteemi BIAcore™-2000 või BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), immobiliseeritud antigeeniga CM5-kiipidel ja ligikaudu 10 vastusühikuga (*response units* - RU) temperatuuril 25 °C. Lühidalt öeldes aktiveeritakse karbometüülitud dekstraanist biosensorkiibid (CM5, BIAcore® Inc.) vastavalt tarnija juhistele N-etuül-N'-(3-dimetüülaminopropüül)karbodiimiidhüdrokloriidi (EDC) ja N-hüdroksütsütsiinimiidiga (NHS). Antigeen lahjendatakse 10 mM naatriumatsetaadis, pH 4,8, kontsentratsioonini 5 µg/ml (ligikaudu 0,2 µM) enne sisestamist voolutuskiirusega 5 µl minutis, et saavutada ligikaudu 10 vastusühikut (RU) seondunud valku. Antigeeni sisestamise järel sisestatakse 1 M etanoolamiin, et blokeerida mittereageerinud rühmad. Kineetika mõõtmisteks sisestatakse Fab-i kahekordsete lahjenduste rida (0,78 nM kuni 500 nM) PBS-is, milles on 0,05% Tween 20 (PBST), 25 °C juures voolutuskiirusega ligikaudu 25 µl minutis. Assotsiatsioonikiirused ( $k_{on}$ ) ja dissotsiatsioonikiirused ( $k_{off}$ ) arvutatakse, kasutades lihtsat, üks ühega seondumise Langmuir'i mudelit (tarkvara BIAcore® Evaluation Software versioon 3.2), sobitades samaaegselt assotsiatsiooni ja dissotsiatsiooni sensogrammid. Dissotsiatsiooni tasakaalukonstant ( $K_d$ ) arvutatakse kui  $k_{off}/k_{on}$ , vaadake näiteks trükist Chen, Y. et al., (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881. Kui eespool toodud pinna-plasmonresonantsanalüüsis assotsiatsioonikiirus on suurem kui  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , siis määratakse assotsiatsioonikiirus fluorestsentsi kustutamise meetodi abil, mille kohaselt spektrofotomeetriga, nagu *stop-flow* varustuse ja segatava küvetiga spektrofotomeeter (Aviv Instruments) või seeria 8000 spektrofotomeeter (ThermoSpectronic), mõõdetakse antigeeni suurenevate kontsentratsioonide juuresolekul 25 °C juures fluorestsentskiirguse intensiivsuse suurenemist või vähenemist (ergastamine = 295 nm, kiirgamine = 340 nm, spektririba laius = 16 nm) antigeenivastase antikeha (Fab-i vormis) puhul, mille kontsentratsioon PBS-is, mille pH on 7,2, on 20 nM.

[0182] Leiutise kohaselt võib ka “assotsiatsioonikiiruse”, “assotsieerumise kiiruse”, “seostumiskiiruse” või “ $k_{on}$ ” määrata eespool kirjeldatud viisil, kasutades süsteemi BIAcore™-2000 või BIAcore™-3000 (BIAcore®, Inc., Piscataway, NJ).

[0183] „Häire” on mistahes seisund või haigus, mille puhul ravi leiutisekohase aine/molekuli või meetodiga võiks olla kasulik. See hõlmab kroonilisi ja akuutseid häireid, sealhulgas neid patoloogilisi seisundeid, mille puhul imetajal on eelsoodumus kõne all olevale häirele. Siin ravitavate häirete mittepiiravad näited hõlmavad vähiseisundeid, nagu B-rakkude proliferatiivseid häireid ja/või B-raku kasvajaid, näiteks lümfoom, mitte-Hodgkin'i lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiveerunud agressiivne NHL, retsidiveerunud indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsüüt leukeemia (CLL), väikerakuline lümfotsütaarne lümfoom, leukeemia, karvrakuline leukeemia (HCL), akuutne lümfotsüüt leukeemia (ALL) ja mantelrakuline lümfoom.

[0184] Terminid „raku proliferatiivne häire” ja „proliferatiivne häire” tähendavad häireid, mis on teatud määral seotud raku ebanormaalse proliferatsiooniga. Ühes teostuses on raku proliferatiivne häire vähk.

[0185] Siin kasutatuna tähendab „kasvaja” igasugust neoplastilist rakukasvu ja proliferatsiooni, nii hea- kui pahaloomulist, ning kõiki vähieelseid ja vähirakke ja -kudesid. Mõisted „vähk”, „vähi-”, „raku proliferatiivne häire”, „proliferatiivne häire” ja „kasvaja” ei ole siin üksteist välistavad.

[0186] Terminid „vähk” ja „kantseroosne” tähendavad või kirjeldavad füsioloogilist seisundit imetajatel, mida tüüpiliselt iseloomustatakse rakkude reguleerimatu kasvu/proliferatsiooniga. Vähkide näited hõlmavad, nendega piirdumata, kantseroosseid B-rakkude proliferatsiooniga seotud haigusi, kusjuures B-rakkude proliferatsiooniga seotud haigus on valitud järgnevatest: lümfoom, mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiveerunud agressiivne NHL, retsidiveerunud indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsüüt leukeemia (CLL), väike lümfotsüüt lümfoom, leukeemia, karvrakuline leukeemia (HCL), akuutne lümfotsüüt leukeemia (ALL) ja mantelrakuline lümfoom. Teised vähktõved hõlmavad näiteks kartsinoomi, lümfoomi (nt Hodgkini ja mitte-Hodgkini lümfoomi), blastoomi, sarkoomi ja leukeemiat. Selliste vähkide täpsemad näited hõlmavad lame-rakulist vähki, väikerakulist kopsuvähki, mitteväikerakulist kopsuvähki, kopsu adenokartsinoomi, kopsu lamerakk-kartsinoomi, kõhukelmevähki, hepatotsellulaarset vähki, seedetrakti-vähki, pankreasevähki, glioomi, emakakaelavähki, munasarjavähki, maksavähki, põievähki,

hepatoomi, rinnavähki, käärsoolevähki, kolorektaalvähki, endomeetriumi- või emakakartsinoomi, süljenäärme kartsinoomi, neeruvähki, maksavähki, eesnäärmevähki, häbemevähki, kilpnäärmevähki, maksakartsinoomi, leukeemiat ja teisi lümfoproliferatiivseid haigusi, ning mitmesuguseid pea- ja kaelavähi tüüpe.

**[0187]** „B-rakuline pahaloomuline haigus” hõlmab siin järgnevaid: mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), sealhulgas väikese riskiga / follikulaarne NHL, väikese riskiga lümfotsütaarne (SL) NHL, vahepealse riskiga / follikulaarne NHL, vahepealse riskiga difuusne NHL, suure riskiga immunoblastiline NHL, suure riskiga lümfoblastiline NHL, suure riskiga väikeste lõhestumata rakkudega NHL, massiivne NHL, mantelrakuline lümfoom, AIDS-iga seotud lümfoom ja Waldenströmi makroglobulineemia, mitte-Hodgkini lümfoom (NHL), lümfotsüdrohke Hodgkini tõbi (LPHD), väike lümfotsüüt lümfoom (SLL), krooniline lümfotsüüt leukeemia (CLL), indolentne NHL, sealhulgas retsidi veerunud indolentne NHL ja rituksimabiravile allumatu indolentne NHL, leukeemia, sealhulgas akuutne lümfoblastleukeemia (ALL), krooniline lümfotsüüt leukeemia (CLL), karvrakuline leukeemia, krooniline müeloblastleukeemia, mantelrakuline lümfoom ja teised pahaloomulised verehaigused. Selliseid pahaloomulisi haigusi võib ravida B-raku pinnamarkeritega nagu CD22-vastased antikehad. Selliseid haigusi on siin kavas ravida B-raku pinnamarkeri nagu CD22-vastane antikeha manustamisega ja see hõlmab konjugeerimata („palja”) antikeha või tsütotoksilise ainega konjugeeritud antikeha manustamist, nagu siin on avaldatud. Selliseid haigusi on siin kavas ravida ka kombineeritud raviga, mis hõlmab leiutisekohase C22-vastase antikeha või C22-vastase antikeha ja ravimi konjugaadi manustamist kombinatsioonis teise antikeha või antikeha ja ravimi konjugaadi, teise tsütotoksilise aine, kiiritusravi või muu raviga, mida kasutatakse samaaegselt või seeriatena. Leiutises näitena toodud ravimeetodis manustatakse leiutisekohast CD22-vastast antikeha kombinatsioonis CD20-vastase antikeha, immunoglobuliini või selle CD20-ga seonduva fragmendiga kas koos või järjestikku. CD20-vastane antikeha võib olla paljas antikeha või antikeha ja ravimi konjugaat. Kombineeritud ravi teostuses on CD22-vastane antikeha leiutisekohane antikeha ja CD20-vastane antikeha on Rituxan® (rituksimab).

**[0188]** Termin „mitte-Hodgkini lümfoom” või „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, mida siin kasutatud termin hõlmab, näidete hulka kuuluvad kõik juhud, mida



vastava ala asjatundja (nt onkoloog või patoloog) saab identifitseerida tehnika tasemest tuntud klassifikatsiooniskeemide järgi, näiteks vastavalt skeemile Revised European-American Lymphoma (REAL), mida on kirjeldatud trükises Color Atlas of Clinical Hematology (3. väljaanne), toim. A. Victor Hoffbrand ja John E. Pettit (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Vaadake eriti loetelusid joonistel 11.57, 11.58 ja 11.59. Spetsiifiliste näidete hulka kuuluvad, nendega piirdumata, retsidiveerunud või refraktoorne NHL, aeglasekasvuline (*front-line*) NHL, III/IV staadiumi NHL, keemiaravile resistentne NHL, eellasrakuline B-lümfoblastleukeemia ja/või -lümfoom, väike lümfotsüüt-lümfoom, krooniline B-rakuline lümfotsüüt-leukeemia ja/või prolümfotsüüt-leukeemia ja/või väike lümfotsüüt-lümfoom, B-rakuline prolümfotsüüt-lümfoom, immunotsütoom ja/või lümfoplasmotsüüt-lümfoom, lümfoplasmotsüüt-lümfoom, marginaaltsooni B-rakklümfoom, põrna marginaaltsooni lümfoom, ekstranodulaarne marginaaltsooni MALT lümfoom, nodulaarne marginaaltsooni lümfoom, karvrakuline leukeemia, plasmatsütoom ja/või plasmarakk-müeloom, aeglasekasvuline / follikulaarne lümfoom, vahepealse kasvuga / follikulaarne NHL, mantelrakuline lümfoom, tsentroblast-tsentrotsüüt-lümfoom (follikulaarne), vahepealse kasvuga difuusne NHL, difuusne suur-B-rakklümfoom, agressiivne NHL (sealhulgas agressiivne *front-line* NHL ja agressiivne retsidiveerunud NHL), NHL, mis retsidiveerub pärast autoloogsete tüvirakkude siirdamist või on nende suhtes refraktoorne, primaarne mediastiinumi suur-B-rakklümfoom, primaarne efüsiooni tüüpi lümfoom, kiirekasvuline immunoblastiline NHL, kiirekasvuline lümfoblastiline NHL, kiirekasvuline väikeste lõhestumata rakkudega NHL, massiivne NHL, Burkitti lümfoom, eellasrakuline (perifeerne) suurerakuline granulaarne lümfotsüüt-leukeemia, seenjas mükoos ja/või Sezary sündroom, naha (kutaansed) lümfoomid, anaplastiline suurrakuline lümfoom, angiotsentriline lümfoom.

**[0189]** „Autoimmuunhaigus” tähendab siin haigust või häiret, mis on põhjustatud indiviidi enda kude või organite poolt ja on suunatud nende vastu, või segregeeruvad või avalduvad nendega koos, või nendest tulenev haigusseisund. Paljude nende autoimmuun- ja põletikuliste haiguste puhul võivad esineda mitmed kliinilised ja laboratoorsed markerid, mis hõlmavad, nendega piirdumata, hüpergammaglobulineemiat, autoantikehade kõrgeid tasemeid, antigeeni-antikeha kompleksi ladestusi kudedes, mille puhul saab abi kortikosteroid- või immunosupressiivsest ravist, ning lümfoidrakkude agregate kahjustatud kudedes. Piirdumata ühegi B-rakkude vahendatud autoimmuunhaigusi puudutava teooriaga arvatakse, et B-rakud avaldavad inimeste autoimmuunhaiguste puhul patogeenset toimet paljude mehhanismiradade

kaudu, mis hõlmavad autoantikehade tootmist, immuunkompleksi moodustumist, dendriit- ja T-rakkude aktivatsiooni, tsütokiinide sünteesi, otsest kemokiinide vabanemist ja idutsentrite loomist ektoopilisele neolümfogeneesile. Kõik need rajad võivad erineval määral osaleda autoimmuunhaiguste patoloogias.

**[0190]** „Autoimmuunhaigus” võib olla organispetsiifiline haigus (nt immuunvastus on spetsiifiliselt suunatud organsüsteemi, nagu endokriinsüsteem, hematopoeetiline süsteem, nahk, kardiopulmonaalne süsteem, seedetrakt ja maksasüsteem, neerusüsteem, kilpnääre, kõrvad, neuromuskulaarne süsteem, kesknärvisüsteem jne) või süsteemne haigus, mis kahjustab paljusid organsüsteeme (nt süsteemne erütematoosluupus (SLE), reumatoidartriit, polümüosiit jms). Eelistatult hõlmavad sellised haigused autoimmuunseid reumatoloogilisi haigusi (nagu reumatoidartriit, Sjögreni sündroom, sklerodermia, luupus, nagu SLE ja luupusnefriit, polümüosiit/dermatomüosiit, krüoglobulineemia, antifosfolipiid-antikeha sündroom ja psoriaatiline artriit), autoimmuunseid seedetrakti ja maksahaigusi (nagu põletikulised soolehaigused (nt haavandiline koliit ja Crohni tõbi), autoimmuungastriit ja pernitsioosne aneemia, autoimmuunhepatiit, primaarne sapitsirroos, primaarne skleroseeriv kolangiit ja tsöliaakia), vaskuliiti (nagu ANCA-negatiivne vaskuliit ja ANCA-ga seotud vaskuliit, sealhulgas Churg-Straussi vaskuliit, Wegeneri granulomatoos ja mikroskoopiline polüangiit), autoimmuunseid neuroloogilisi haigusi (nagu hulgiskleroos, opsokloonuse-müokloonuse sündroom, raskekujuline müasteenia, nägemisnärv neuromüeliit, Parkinsoni tõbi, Alzheimeri tõbi ja autoimmuunsed polüneuropaatiad), neeruhaigusi (nagu glomerulonefriit, Goodpasture'i sündroom ja Bergeri tõbi), autoimmuunseid nahahaigusi (nagu psoriaas, urtikaaria, lööbed, harilik pemfigus, villpemfigoid ja naha erütematoosluupus), verehaigusi (nagu trombotsütopeeniline purpur, trombootiline trombotsütopeeniline purpur, vereülekandejärgne purpur ja autoimmuunne hemolüütiline aneemia), ateroskleroosi, uveiiti, autoimmuunseid kuulmishäireid (nagu sisekõrvahäire ja kuulmise kadumine), Behçeti tõbe, Raynaud' sündroomi, organitransplantaati ja autoimmuunsed endokriinhaigusi (nagu diabeediga seotud autoimmuunhaigused, nagu insuliinisõltuv diabeet (IDDM), Addisoni tõbi ja autoimmuunne kilpnäärmehaigus (nt Gravesi tõbi ja türeoidiit)). Eelistatumalt hõlmavad sellised haigused näiteks reumatoidartriiti, haavandilist koliiti, ANCA-ga seotud vaskuliiti, luupust, hulgiskleroosi, Sjögreni sündroomi, Gravesi tõbe, IDDM-i, pernitsioosset aneemiat, türeoidiiti ja glomerulonefriiti.

**[0191]** Teiste siin määratletud autoimmuunhaiguste, mis mõnedel juhtudel hõlmavad eespool loetletuid, spetsiifiliste näidete hulka kuuluvad, nendega piirdumata, artriit (äge ja krooniline,

reumatoidartriit, sealhulgas juveniile reumatoidartriit ja selle staadiumid, nagu reumatoid-sünoviit, podagra või podagraline artriit, äge immunoloogiline artriit, krooniline põletikuline artriit, degeneratiivne artriit, II tüüpi kollageeni põhjustatud artriit, infektsioosne artriit, Lyme'i artriit, proliferatiivne artriit, psoriaatiline artriit, Stilli tõbi, spondüoartriit, osteoartriit, krooniline progresseeruv artriit, deformeeriv artriit, krooniline primaarne polüartriit, reaktiivne artriit, menopausist tingitud artriit, östrogeenivaegusest tingitud artriit ja anküloseeriv spondüliit/reumatoidspondüliit), autoimmuunne lümfoproliferatiivne haigus, põletikulised hüperproliferatiivsed nahahaigused, psoriaas, nagu naastuline psoriaas, tilkpsoriaas, mädavillpsoriaas ja küunte psoriaas, atopia, sealhulgas atoopilised haigused, nagu heinapalavik ja Jobi sündroom, dermatiit, sealhulgas kontaktdermatiit, krooniline kontaktdermatiit, eksfoliatiivne dermatiit, allergiline dermatiit, allergiline kontaktdermatiit, lööbed (*hives*), herpetiformne dermatiit, nummulaarne dermatiit, seborröadermatiit, mittespetsiifiline dermatiit, primaarne ärritav kontaktdermatiit ja atoopiline dermatiit, X-liiteline hüper-IgM sündroom, allergilised intraokulaarsed põletikulised haigused, urtikaaria, nagu krooniline allergiline urtikaaria ja krooniline idiopaatiline urtikaaria, sealhulgas krooniline autoimmuunurtikaaria, müosiit, polümüosiit/dermatomüosiit, juveniilne dermatomüosiit, toksiline epidermaalne nekrolüüs, sklerodermia (sealhulgas süsteemne sklerodermia), sklerooos, nagu süsteemne sklerooos, hulgisklerooos (*sclerosis multiplex*, SM), nagu spino-optiline SM, primaarne progresseeruv SM (PPSM) ja ägenemiste ja remissioonidega SM (RRSM), progresseeruv süsteemne sklerooos, aterosklerooos, arteriosklerooos, dissemineerunud sklerooos, ataksiline sklerooos, nägemisnärvi neuromüeliit (NMO), põletikuline soolehaigus (IBD) (nt Crohni tõbi, autoimmuunsed seedetraktihaigused, seedetraktipõletik, koliit, nagu haavandiline koliit (*colitis ulcerosa*), mikroskoopiline koliit, kollagenoosne koliit, polüpoosne koliit, nekrotiseeriv enterokoliit ja transmuraalne koliit ning autoimmuunne põletikuline soolehaigus), soolepõletik, gangrenoosne püodermia, nodoosne erüteem, primaarne skleroseeriv kolangiit, respiratoorse distressi sündroom, sealhulgas täiskasvanu või akuutse respiratoorse distressi sündroom (ARDS), meningiit, kogu uueva või selle osa põletik, iriit, koroidiit, autoimmuunne hematoloogiline haigus, transplantaadi hülgamisreaktsioon, angioödeem, nagu pärilik angioödeem, kraniaalnärvi kahjustus, nagu meningiidi puhul, rasedusherpes, raseduspemfigoid, munandikotikihelus, autoimmuunne enneaegne munasarjapuudulikkus, autoimmuunhaigusest tingitud äkiline kuulmiskadu, IgE-vahendatud haigused, nagu anafülaksia ja allergiline ning atoopiline riniit, entsefaliit, nagu Rasmusseni entsefaliit ja limbiline ja/või ajutüve entsefaliit,

uveiit, nagu eesmine uveiit, äge eesmine uveiit, granulomatoosne uveiit, mittegranulomatoosne uveiit, fakoanafülaktiline uveiit, tagumine uveiit või autoimmuunuveiit, glomerulonefriit (GN) koos nefrootilise sündroomiga ja ilma, nagu krooniline või äge glomerulonefriit, nagu primaarne GN, immuunsüsteemi vahendatud GN, membranoosne GN (membranoosne nefropaatia), idiopaatiline membranoosne GN või idiopaatiline membranoosne nefropaatia, membrano- või membranoosne proliferatiivne GN (MPGN), sealhulgas I tüüpi ja II tüüpi ning kiiresti progresseeruv GN (RPGN), proliferatiivne nefriit, autoimmuunne polüglandulaarne endokriinne puudulikkus, balaniit, sealhulgas plasmarakuline balaniit, balanopostiit, anulaarerüteem, krooniline erüteem, mitmekujuline erüteem, rõngasgranuloom, läikiv lihhen, skleroseeriv ja atroofiliseks muutuv lihhen, krooniline neurodermatiit, nõelakujulise sarvestumusega lihhen, lame lihhen, lamelliline ihtüoos, epidermolüütiline hüperkeratoos, premaaliigne keratoos, gangrenoosne püodermia, allergilised seisundid ja reaktsioonid, toiduallergiad, ravimiallergiad, putukaallergiad, harvaesinevad allergilised haigused, nagu mastotsütoos, allergiline reaktsioon, ekseem, sealhulgas allergiline või atoopiline ekseem, asteatootiline ekseem, düshidrootiline ekseem ja vesikulaarne palmoplantaarne ekseem, astma, nagu bronhiaalastma, bronhiaalastma (*asthma bronchiale*) ja autoimmuunastma, T-rakkude infiltratsiooniga ja krooniliste põletikureaktsioonidega seotud haigusseisundid, võõrantigeenide vastased immuunreaktsioonid, nagu ema ja loote reesuskonflikt (*fetal ABO blood groups during pregnancy*), krooniline põletikuline kopsuhaigus, autoimmuunmüokardiit, leukotsüütide adhesioonidefekt, luupus, sealhulgas luupusnefriit, luupustserebriit, laste luupus, mitte-renaalne luupus, ekstrarenaalne luupus, diskoidne luupus ja diskoidne erütematoosluupus, luupusalopeetsia, SLE, nagu naha SLE või alaäge naha SLE, neonataalne luupuse sündroom (NLE) ja dissemineerunud erütematoosluupus, juveniilne (I tüüpi) diabeet, sealhulgas laste IDDM, täiskasvanueas algav diabeet (II tüüpi diabeet), autoimmuundiabeet, idiopaatiline suhkruhaigus, diabeetiline retinopaatia, diabeetiline nefropaatia, diabeetiline koliit, diabeetiline suurte arterite haigus, tsütokiinide ja T-lümfotsüütide vahendatud, ägeda ja hilistüüpi ülitundlikkusega seotud immuunreaktsioonid, tuberkuloos, sarkoidoos, granulomatoos, sealhulgas lümfomatoosne granulomatoos, agranulotsütoos, vaskuliidid (sealhulgas suurte veresoonte vaskuliit, nagu reumaatiline polümüalgia ja hiidrakuline (Takayasu) arteriit, keskmiste veresoonte vaskuliit nagu Kawasaki tõbi ja nodoosne polüarteriit / nodoosne periarteriit, immuunvaskuliit, KNS vaskuliit, kutaanne vaskuliit, ülitundlikkusest tingitud vaskuliit, nekrotiseeriv vaskuliit, nagu fibrinoidne nekrotiseeriv vaskuliit ja süsteemne nekro-

tiseeriv vaskuliit, ANCA-negatiivne vaskuliit ja ANCA-ga seotud vaskuliit, nagu Churugi-Straussi sündroom (CSS), Wegeneri granulomatoos ja mikroskoopiline polüangiit), tempo-raalarteriit, aplastiline aneemia, autoimmuunne aplastiline aneemia, Coombs-positiivne aneemia, Diamondi-Blackfani aneemia, hemolüütiline aneemia või immuunne hemolüütiline aneemia, sealhulgas autoimmuunne hemolüütiline aneemia (AIHA), pernitsioosne aneemia (*anaemia pemiciosa*), Addisoni tõbi, erütroblastopeenia või puhas punavereliblaaplaasia (*pure red cell anemia*, PRCA), VIII faktor vaegus, A-hemofilia, autoimmuun(sed)ne neutropeenid, tsütopeenid, nagu pantsütopeenid, leukopeenia, leukotsüütide diapedeesiga seotud haigused, KNS põletikulised haigused, Alzheimeri tõbi, Parkinsoni tõbi, hulgiorgankahjustuse sündroom, nagu septitseemia, trauma või hemorraagiajärgsed, antigeeni-antikeha kompleksi vahendatud haigused, antibasaalmembraani glomerulonefriit, antifosfolipiidse antikeha sündroom, motoneuriit, allergiline neuriit, Behçeti tõbi/sündroom, Castlemani sündroom, Goodpasture'i sündroom, Raynaud' sündroom, Sjögreni sündroom, Stevensi-Johnsoni sündroom, pemfigoid või pemfigus, nagu villpemfigoid, armistuv pemfigoid (limaskestade), naha pemfigoid, harilik pemfigus, paraneoplastiline pemfigus, lehtketendav pemfigus, limaskestapemfigus ja erütematoosne pemfigus, omandatud bulloosepidermolüüs, silmapõletik, eelistatult allergiline silmapõletik, nagu allergiline konjunktiviit, lineaarne IgA haigus (bulloosne dermatoos), autoimmuunne konjunktiviitipõletik, autoimmuunsed polüendokrinopaatiad, Reiteri tõbi või sündroom, autoimmuunhaigusest tingitud terminiline kahjustus, preeklampsia, immuunkompleks-haigused, nagu immuunkompleks-nefriit, antikeha vahendatud nefriit, närvipõletikuga seotud haigused, polüneuropaatiad, krooniline neuropaatia, nagu IgM polüneuropaatia või IgM-vahendatud neuropaatia, trombotsütopeenid (nagu esineb näiteks müokardiinfarktiga patsientidel), sealhulgas trombootiline trombotsütopeeniline purpur (TTP), vereülekandejärgne purpur (PTP), hepariini põhjustatud trombotsütopeenid ja autoimmuunne või immuunvahendatud trombotsütopeenid, sealhulgas näiteks idiopaatiline trombotsütopeeniline purpur (ITP), kaasa arvatud krooniline või akuutne ITP, skleriit, nagu idiopaatiline kerataskleriit, episkleriit, munandite ja munasarja autoimmuunhaigus, sealhulgas autoimmuunne munandipõletik ja munasarjapõletik, primaarne hüpötüreoidism, hüpoparatüreoidism, autoimmuunsed endokriinhaigused, sealhulgas türeoidiit, nagu autoimmuuntüreoidiit, Hashimoto tõbi, krooniline türeoidiit (Hashimoto türeoidiit) või alaäge türeoidiit, autoimmuunne kilpnäärmehaigus, idiopaatiline hüpötüreoidism, Gravesi tõbi, Gravesi silmahaigus (oftalmopaatia või kilpnäärmeiga seotud oftalmopaatia), polüglandulaarsed sündroomid, nagu autoim-

muunsed polüglandulaarsed sündroomid, näiteks I tüüpi (või polüglandulaarsed endokriinpaatilised sündroomid), paraneoplastilised sündroomid, sealhulgas neuroloogilised paraneoplastilised sündroomid, nagu Lamberti-Eatoni müasteeniline sündroom või Eatoni-Lamberti sündroom, jäikussündroom, entsefalomüeliit, nagu allergiline entsefalomüeliit (*encephalomyelitis allergica*) ja eksperimentaalne allergiline entsefalomüeliit (EAE), raskekujuline müasteenia, nagu tümoomiga seotud raskekujuline müasteenia, väikeaju degeneratsioon, neuromüotoonia, opsokloonus või opsokloonuse-müokloonuse sündroom (OMS) ja sensoorne neuropaatia, multifokaalne motoorne neuropaatia, Sheehani sündroom, autoimmuunhepatiit, krooniline hepatiit, lupoidhepatiit, hiidrakuline hepatiit, krooniline aktiivne hepatiit või autoimmuunne krooniline aktiivne hepatiit, pneumoniit, nagu lümfoidne interstitsiaalne pneumoniit (LIP), oblitereeruv bronhioliit (mitte transplantaadist tingitud) vs NSIP, Guillaini-Barré sündroom, Bergeri tõbi (IgA nefropaatia), idiopaatiline IgA nefropaatia, lineaarne IgA dermatoos, äge febriline neutrofiilne dermatoos, sarvkihialune mädavilliline dermatoos, möödud akantolüütiline dermatoos, tsirroos, nagu primaarne sapitsirroos ja pneumonotsirroos, autoimmuunne enteropaatiline sündroom, tsöliaakia (*coeliac disease*), tsöliaakiline spruu (gluteeni enteropaatia), refraktoorne spruu, idiopaatiline spruu, krüoglobulineemia, nagu segatüüpi krüoglobulineemia, amülotroofiline lateraalskleroos (ALS, Lou Gehrigi haigus), koronaararterihaigus, autoimmuunne kõrvahaigus, nagu autoimmuunne sisekõrvahaigus (AIED), autoimmuunne kuulmiskaotus, polükondriit, nagu refraktoorne või retsidiveeruv polükondriit, kopsualveoolide proteinoos, keratiit, nagu Cogani sündroom / mittesüfiliitiline interstitsiaalne keratiit, Belli paralüüs, Sweeti tõbi/sündroom, autoimmuunne roosvistik, võõtohatisest tingitud valu, amüloidoos, mittekantseroosne lümfotsütoos, primaarne lümfotsütoos, mis hõlmab monokloonset B-rakklümfotsütoosi (nt healoomulist monokloonset gammapaatiat ja healoomulist monokloonset gammapaatiat, MGUS), perifeerne neuropaatia, paraneoplastiline sündroom, kanalopaatiad, nagu epilepsia, migreen, arütmia, lihashaigused, kurtus, pimesus, perioodiline paralüüs ja KNS-i ionikanalitega seotud haigusseisundid, autism, põletikuline müopaatia, fokaalne või segmentaalne või fokaalsegmentaalne glomeruloskleroos (FSGS), endokriinne oftalmopaatia, uveoretiniit, korioretiniit, autoimmuunne maksahaigus, fibromüalgia, polüglandulaarpuudulikkus, Schmidti sündroom, neerupealise põletik, mao atroofia, preseniildementsus, demüeliniseerivad haigused, nagu autoimmuunsed demüeliniseerivad haigused ja krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, Dressleri sündroom, koldeline alopeetsia, täielik alopeetsia, CREST-sündroom (katsinoos,

Raynaud' fenomen, söögitoru peristaltikahäired, sklerodaktüülia, teleangiektasiasia), meeste ja naiste autoimmuunne viljatus, mis on tingitud näiteks spermatoosididevastastest antikehadest, segatüüpi sidekoehaigus, Chagasi tõbi, reumaatiline palavik, korduv raseduse katkemine, farmerikops, mitmekujuline erüteem, kardiotoomiajärgne sündroom, Cushingi sündroom, linnukasvajata kops, allergiline granulomatoosne angiit, healoomuline lümfotsüütangiit, Alporti sündroom, alveoliit, nagu allergiline alveoliit ja fibroseeriv alveoliit, interstitsiaalne kopsuhaigus, vereülekande reaktsioon, leepira, malaaria, parasitaarsed haigused, nagu leišmaniasis, trüpanosomiaas, skistosomiaas, askariaas, aspergilloos, Sampteri sündroom, Caplani sündroom, dengue palavik, endokardiit, endomüokardiaalne fibroos, difuusne interstitsiaalne kopsufibroos, interstitsiaalne kopsufibroos, fibroseeriv mediastiniit, kopsufibroos, idiopaatiline kopsufibroos, tsüstiline fibroos, endoftalmiit, krooniline reljeefne erüteem, loote erütroblastoos, eosinofiilne fastsiit, Shulmani sündroom, Felty sündroom, filariaas, tsükliit, nagu krooniline tsükliit, heterokroomne tsükliit, iridotsükliit (akuutne või krooniline) või Fuchi tsükliit, Henochi-Schonleini purpur, inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV) nakkus, SCID, omandatud immuunpuudulikkuse sündroom (AIDS), ECHO-viirusnakkus, sepsis (süsteemse põletikuvastuse sündroom (SIRS)), endotokseemia, pankreatiit, türetoksikoos, parvoviirusnakkus, punetiseviirusnakkus, vaksineerimisjärgsed sündroomid, kaasasündinud punetised, Epstein-Barr viirusnakkus, mumps, Evani sündroom, autoimmuunne sugunäärmete puudulikkus, Sydenhami korea, streptokokknakkuse järgne nefriit, oblitereeruv tromboangiit, türetoksikoos, seljaajukuive, korioidiit, hiidrakuline polümüalgia, krooniline ülitundlikkuspneumoniit, konjunktiviit, nagu kevadine konjunktiviit, kuiv keratokonjunktiviit ja epideemiline keratokonjunktiviit, idiopaatiline nefriitiline sündroom, healoomuline perekondlik minimaalsete muutustega nefropaatia, isheemia-reperfusioonikahjustus, transplanteeritud organi reperfusioon, võrkkesta autoimmuunhaigus, liigesepõletik, bronhiit, krooniline obstruktiivne hingamisteede/kopsuhaigus, silikoos, suuhaavandid, aftoosne stomatiit, arteriosklerootilised haigused (ajuveresoonte puudulikkus), nagu arteriosklerootiline entsefalopaatia ja arteriosklerootiline retinopaatia, aspermioogenees, autoimmuunhemolüüs, Boeck'i tõbi, krüoglobulineemia, Dupuytreni kontraktuur, fakoanafülaalne endoftalmia, allergiline enteriit, leeprast tingitud sõlmjas erüteem, idiopaatiline näoparalüüs, krooniline väsimussündroom, reumapalavik, Hammani-Richi tõbi, sensoneuraalne kuulmiskadu, paroksüsmaatiline hemoglobiinuuria, hüpogonadism, regionaalne ileiit, leukopeenia, nakkuslik mononukleosis, müeliit, primaarne idiopaatiline müksödeem, nefroos, sümpaatiline silmapõletik, vastasündinu

silmapõletik, nägemisnärvi neuriit, granulomatoosne munandipõletik, pankreatiit, äge polüradikuliit, gangrenoosne püodermia, Quervaini türeoidiit, omandatud põrnaatroofia, mittepahaloormuline tümoom, lümfollikulaarne tüümusepõletik, vitiliigo, toksilise šoki sündroom, toidumürgistus, T-rakkude infiltratsiooniga seotud haigusseisundid, leukotsüütide adhesioonipuudulikkus, tsütokiinide ja T-lümfotsüütide vahendatud, akuutset ja hilistüüpi ülitundlikkusega seotud immuunreaktsioonid, leukotsüütide diapedeesiga seotud haigused, hulgiorgankahjustuse sündroom, antigeeni-antikeha kompleksi vahendatud haigused, antibasaalmembraani glomerulonefriit, autoimmuunsed polüendokrinopaatiad, munasarjapõletik, primaarne müksödeem, autoimmuunne atroofiline gastriit, reumaatilised haigused, segatüüpi sidekoehaigus, nefrootiline sündroom, insuliit, polüglandulaarpuudulikkus, autoimmuunsed polüglandulaarsed sündroomid, sealhulgas I tüüpi polüglandulaarne sündroom, täiskasvanueas algav idiopaatiline hüpoparathüroidism (AOIH), kardiomüopaatia nagu dilateeriv kardiomüopaatia, omandatud bulloosepidermolüüs (EBA), hemokromatoos, müokardiit, nefrootiline sündroom, primaarne skleroseeriv kolangiit, mädane või mittemädane sinusiit, akuutne või krooniline sinusiit, etmoidaalne, frontaalne, maksillaarne või sfenoidne sinusiit, allergiline sinusiit, eosinofiilidega seotud haigused, nagu eosinofiilia, eosinofiilsed kopsuinfiltraadid, eosinofiilia-müalgia sündroom, Loffleri sündroom, krooniline eosinofiilne pneumoonia, troopiline kopsueosinofiilia, bronhopneumooniline aspergilloos, eosinofiile sisaldav aspergilloom või granuloom, anafülaksia, spondüloartropaatiad, seronegatiivsed spondüloartriidid, autoimmuunne polüendokrinopaatia, skleroseeriv kolangiit, skleriit, episkleriit, krooniline mukokutaanne kandidoos, Brutoni sündroom, transitoorne vastsündinu hüpogammaglobulineemia, Wiskotti-Aldrichi sündroom, ataksia-teleangiiektaasia sündroom, angiiektaasia, autoimmuunsed kollageenhaigused, reumatism nagu krooniline reumatoidartriit, lümfadeniit, veresoonte-vererõhu regulatsiooni häire, koekahjustus, kardiovaskulaarne isheemia, hüperalgeesia, neeruisheemia, ajuisheemia ja vaskularisatsiooniga seotud haigused, allergilised ülitundlikkusreaktsioonid, glomerulonefriidid, reperfusioonikahjustus, isheemiline reperfusioonikahjustus, müokardi või teiste kudede reperfusioonikahjustus, lümfomatoosne trahheobronhiit, põletikulised dermatoosid, ägedad põletikukomponentidega dermatoosid, hulgiorganpuudulikkus, bulloossed haigused, neerukoore nekroos, äge mädane meningiit või teised kesknärvisüsteemi põletikulised haigused, silma- ja silmakoopa põletikulised haigused, granulotsüütide ülekandega seotud sündroomid, tsütokiinide põhjustatud toksilisus, narkolepsia, äge raskekujuline põletik, krooniline kontrollimatu põletik, püeliit, endarteriaalne hüperplaasia, pepti-



line haavand, valvuliit ja endometriosis. Selliseid haigusi kavatakse siin ravida B-rakkude pinnamarkeri, nagu CD22, vastase antikeha manustamisega ja see hõlmab konjugeerimata („palja”) antikeha või tsütotoksilise ainega konjugeeritud antikeha manustamist, nagu siin on avaldatud. Selliseid haigusi kavatakse siin ravida kombineeritud raviga, mis hõlmab leiutisekohast C22-vastast antikeha või C22-vastase antikeha ja ravimi konjugaati kombinatsioonis teise antikeha, teise tsütotoksilise aine, kiiritusravi või muu raviga, mida kasutatakse samaaegselt või järjestikku.

**[0192]** Siin kasutatuna tähendab „ravi” (ja selle variatsioonid, nagu „ravima“ või „ravimine”) kliinilist sekkumist, püüdega muuta ravitava indiviidi või raku loomulikku käekäiku, ning seda võib teostada profülaktiliselt või kliinilise patoloogia esinemise ajal. Ravi soovitud mõjud hõlmavad haiguse ilmnemise või taastekke ärahoidmist, sümptomite leevendamist, haiguse mistahes otsese või kaudse patoloogilise tagajärje vähendamist, metastaaside ärahoidmist, haiguse progresseerumiskiiruse vähendamist, haiguse seisukorra parendamist või leevendamist, remissiooni või paranenud prognoosi. Mõnes teostuses kasutatakse leiutisekohaseid antikehasid haiguse või häire arenemise edasilükkamiseks või haiguse või häire progresseerumise aeglustamiseks.

**[0193]** „Indiviid” on selgroogne. Teatud teostustes on selgroogne imetaja. Imetajad hõlmavad, nendega piirdumata, farmiloomi (nagu veised), spordis kasutatavaid loomi, lemmikloomi (nagu kassid, koerad ja hobused), primaate, hiiri ja rotte. Teatud teostustes on imetaja inimene.

**[0194]** „Toimiv kogus” tähendab soovitud ravi- või profülaktilise tulemuse saavutamiseks vajalike annuste ja vajalike ajaperioodide mõttes toimivat kogust.

**[0195]** Leiutisekohase aine/molekuli „ravivalt toimiv kogus” võib varieeruda vastavalt sellistele teguritele nagu haiguse seisukord, indiviidi vanus, sugu ja mass ning aine/molekuli võime kutsuda indiviidil esile soovitud vastust. Ravivalt toimiv kogus tähendab kogust, mille puhul kasulikud ravitoimed kaaluvad üles aine/molekuli mistahes mürgised või kahjulikud toimed. „Profülaktiliselt toimiv kogus” tähendab soovitud profülaktilise tulemuse saavutamiseks toimivat kogust annuste ja vajalike ajaperioodide mõttes. Kuna profülaktilist annust kasutatakse subjektidel enne haigust või selle varasemas staadiumis, on profülaktiliselt toimiv kogus tavaliselt, kuid mitte tingimata, väiksem kui ravivalt toimiv kogus.

**[0196]** Siin kasutatuna tähendab mõiste „tsütotoksiline agens” ainet, mis inhibeerib või hoiab ära mingi rakufunktsiooni ja/või põhjustab raku surma või hävinemise. Mõiste hõlmab

radioaktiivseid isotoope (nt 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> ja Lu radioaktiivsed isotoobid), kemoterapeutilisi agenseid, näiteks metotreksaati, adriamütsiini, *Vinca* alkaloide (vinkristiini, vinblastiini, etoposiidi), doksorubitsiini, melfalaani, mitomütsiin C, kloorambutsiili, daunorubitsiini või muid interkaleerivaid agenseid, ensüüme ja nende fragmente nagu nukleolüütillised ensüümid, antibiootikume ja toksine, nagu väikese molekuliga toksiinid või bakteriaalse, fungaalse, taimse või loomse päritoluga ensümaatilistelt aktiivsed toksiinid, sealhulgas nende fragmendid ja/või variandid, toksine, kasvu inhibeerivaid agenseid, ravimüksusi ning allpool kirjeldatud mitmesuguseid kasvaja- või vähivastaseid agenseid. Muid tsütotoksilisi agenseid on kirjeldatud allpool. Tumoritsiidne agens põhjustab kasvajakude hävimist.

**[0197]** „Toksiin” on mistahes aine, mis on võimeline kahjustama rakukasvu või proliferatsiooni.

**[0198]** „Kemoterapeutiline agens” on vähivastis kasutatav keemiline ühend. Kemoterapeutiliste agensite näited hõlmavad alküülivaid agenseid, nagu tiotepa ja tsüklofosfamiid CYTOXAN<sup>®</sup>, alküülsulfonaate, nagu busulfaan, improsulfaan ja piposulfaan, asiridiine, nagu bensodopa, karbokvoon, meturedopa ja uredopa, etüleeniimiine ja metüülmelamiine, mis hõlmavad altretamiini, trietüleeniimiini, trietüleenfosforamiidi, trietüleentiofosforamiidi ja trimetüülomelamiini, atsetogeniini (peamiselt bullatatsiini ja bullatatsinooni), delta-9-tetrahydrokannabinooli (dronabinooli, MARINOL), β-lapahhooni, lapahhooni, kolhitsiine, betuliinhapet, kamptotetsiini (sealhulgas sünteetilisi analooge topotekaani (HYCAMTIN), CPT-11 (irinotekaan, CAMPTOSAR<sup>®</sup>), acetüülkamptotetsiini, skopolektiini ja 9-aminokamptotetsiini), brüostatiini, kallüstatiini, CC-1065 (sealhulgas selle sünteetilisi analooge adoselesiini, karselesiini ja biselesiini), podofüllotoksiini, podofüllihapet, teniposiidi, krüptofütsiine (täpsemalt krüptofütsiin 11 ja krüptofütsiin 8), dolastatiini, duokarmütsiini (sealhulgas sünteetilisi analooge KW-2189 ja CB1-TM1), eleuterobiini, pankratistatiini, sarkodiktüüni, spongistatiini, lämmastikipriite, nagu kloorambutsiil, kloornafasiin, kolofosfamiid, estramustiin, ifosfamiid, meklooretamiin, meklooretamiinoksiidvesinikkloriid, mefalaan, novembiikiin, fenesteriin, prednimustiin, trofosfamiid, uratsüülipriit, nitrosouureid, nagu karmustiin, klorosototsiin, fotemustiin, lomustiin, nimustiin ja ranimustiin, antibiootikume, nagu enediüün-antibiootikumid (nt kaliheamütsiin, eriti kaliheamütsiin γII ja kaliheamütsiin ωII (vaadake nt Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)), dünemütsiini, sealhulgas dünemütsiini A, esperamütsiini, ja lisaks neokartsinostatiini kromofoori ja sarnase kromo-

valgu enediüüni antibiootilisi kromofore), aklatsinomüsiine, aktinomüsiini, autramüsiini, asaseriini, bleomüsiine, kaktinomüsiini, karabitsiini, karminomüsiini, kartsinofiliini, kromomüsiine, daktinomüsiini, daunorubitsiini, detorubitsiini, 6-diaso-5-okso-L-norleutsiini, doksorubitsiini ADRIAMYCIN® (sealhulgas morfolinodoksorubitsiini, tsüanomorfolinodoksorubitsiini, 2-pürrolinodoksorubitsiini ja desoksüdoksorubitsiini), epirubitsiini, esorubitsiini, idarubitsiini, martsellomüsiini, mitomüsiine, nagu mitomüsiin C, mükofenoolhape, nogalamüsiin, olivomüsiinid, peplomüsiin, porfiromüsiin, puromüsiin, kvelamüsiin, rodorubitsiini, streptonigriini, streptosotsiini, tubertsidiini, ubenimeksi, sinostatiini, zorubitsiini, anti-metaboliite, nagu metotreksaat ja 5-fluorouratsüül (5-FU), foolhappe analooge, nagu denopteriin, metotreksaat, pteropteriin, trimetreksaat, puriini analooge, nagu fludarabiin, 6-merkaptopuriin, tiamipüriin, tioguaaniin, pürimidiini analooge, nagu antsitabiin, asatsitidiin, 6-asauridiin, karmofuur, tsüarabiin, didesoksüüridiin, doksifluridiin, enotsitabiin, floksuridiin, androgeene, nagu kalusteroon, dromostanoloonpropionaat, epitiostanool, mepitiostaan, testolaktoon, adrenaliinidevastaseid agenseid, nagu aminoglutetimiid, mitotaan, trilostaan, foolhappega täiendajaid nagu froliinhape, atseglatooni, aldofosfamiidglükosiidi, aminolevuliinhapet, eniluratsüüli, amsakriini, bestrabutsiili, bisantreeni, edatraksaati, defofamiini, demekoltsiini, diasikvooni, elfornitiini, elliptiinatsetaati, epotilooni, etoglutsiidi, galliumnitraati, hüdroksüüreat, lentinaani, lonidainiini, maitansinoide, nagu maitansiin ja ansamitotsiinid, mitoguasooni, mitoksantrooni, mopidanmooli, nitraeriini, pentostatiini, fenameti, pirarubitsiini, losoksantrooni, 2-etüülhüdrasiidi, prokarbasiini, PSK® polüsahhariidi kompleksi (JHS Natural Products, Eugene, OR), rasoksaani, risoksiini, sisofiraani, spirogermaaniumi, tenuasoonhapet, triasikvooni, 2,2',2''-triklorotrietüülamiini, trikotetseene (eriti T-2 toksiini, verrakuriin A, roridiin A ja anguidiin), uretaani, vindesiini (ELDISINE®, FILDESIN®), dakarbasiini, mannomustiini, mitobronitooli, mitolaktooli, pipobromaani, gatsütoosiini, arabinosiidi ("Ara-C"), tsüklofosfamiidi, tiotepat, taksoide, näiteks TAXOL® paklitakseeli (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), kremofoorivaba paklitakseeli albumiini-modifitseeritud nanoosakeste preparaati ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) ja dotsetakseeli TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Prantsusmaa), kloorambutsiili, gemtsitabiini (GEMZAR®), 6-tioguaaniini, merkaptopuriini, metotreksaati, plaatina analooge, nagu tsisplatiin ja karboplatiin, vinblastiini (VELBAN®), plaatina, etoposiidi (VP-16), ifosfamiidi, mitoksantrooni, vinkristiini (ONCOVIN®), oksaliplatiini, leukovoviini, vinorelbiini (NAVELBINE®), novantrooni, edatreksaati, daunomüsiini, aminopteriini, iband-

ronaati, topoisomeraasi inhibiitorit RFS 2000, difluorometlülornitiini (DMFO), retinoide nagu retinoehape, kapetsitabiini (XELODA<sup>®</sup>) ning mistahes eespool nimetatute farmatseutiliselt vastuvõetavaid sooli, happeid või derivaate ning lisaks kahe või enama eelnimetatu kombinatsioone, nagu CHOP, mis on tsüklofosfamiidi, doksorubitsiini, vinkristiini ja prednisolooni kombineeritud ravi lühend, ja FOLFOX, mis on 5-FU ja lekovoviiniga kombineeritud oksaplatiini (ELOXATIN<sup>™</sup>) ravirežiimi lühend.

**[0199]** Samuti on selle definitsiooniga hõlmatud antihormonaalsed agensid, mis toimivad kasvaja kasvule soodustavalt mõjuda võivate hormoonide toimet reguleerides, vähendades, tõkestades või inhibeerides, ning need agensid on tihti süsteemses või kogu organismi ravivas vormis. Need agensid võivad ka ise olla hormoonid. Näited hõlmavad östrogeenidevastased agenseid ja selektiivseid östrogeenireseptori modulaatoreid (*selective estrogen receptor modulators* – SERM-e), sealhulgas näiteks tamoksifeeni (sealhulgas tamoksifeeni NOLVADEX<sup>®</sup>), raloksifeeni EVISTA<sup>®</sup>, droloksifeeni, 4-hüdroksütamoksifeeni, trioksifeeni, keoksifeeni, LY 117018, onapristooni ja toremifeeni FARESTON<sup>®</sup>, progesteronidevastaseid agenseid, östrogeenireseptori mahareguleerijaid (*estrogen receptor down-regulators* – ERD-e), agenseid, mis toimivad munasarju maha surudes või välja lülitades, nagu luteiniseerivat hormooni vabastava hormooni (*lutinizing hormone-releasing hormone* - LHRH) agonistid, nagu leuproliidatsetaat LUPRON<sup>®</sup> ja ELIGARD<sup>®</sup>, gosereliinatsetaat, busereliinatsetaat ja triptereliin, muid androgeenidevastaseid agenseid, nagu flutamiid, nilutamiid ja bikalutamiid, ning aromataasi inhibiitoreid, nagu näiteks 4(5)-imidasoolid, aminoglutetimiid, megestroolatsetaat MEGASE<sup>®</sup>, eksemestaan AROMASIN<sup>®</sup>, formestaan, fadrosool, vorosool RIVISOR<sup>®</sup>, letrosool FEMARA<sup>®</sup> ja anastrosool ARIMIDEX<sup>®</sup>, mis inhibeerivad ensüümi aromataas, mis reguleerib östrogeeni tootmist neerupealsetes näärmetes. Lisaks hõlmab selline kemoterapeutiliste agensite määratlus bisfosfonaate, nagu klodronaat (näiteks BONEFOS<sup>®</sup> või OSTAC<sup>®</sup>), etidronaat DIDROCAL<sup>®</sup>, NE-58095, soledroonhape/soledronaat ZOMETA<sup>®</sup>, alendronaat FOSAMAX<sup>®</sup>, pamidronaat AREDIA<sup>®</sup>, tiludronaat SKELID<sup>®</sup> või risedronaat ACTONEL<sup>®</sup>, ning lisaks troksatsitabiini (tsütosiini analoogi 1,3-dioksolaannukleosiidi), antisenss-oligonukleotiide, täpsemalt neid, mis inhibeerivad abherantsete rakkude proliferatsiooniga seotud signaaliradade geenide, nagu näiteks PKC- $\alpha$ , Raf, H-Ras ja epidermaalse kasvufaktori retseptor (EGF-R), ekspressiooni, vaktsiine, nagu vaktsiin THERATOPE<sup>®</sup> ja geeniteraapia vaktsiinid, näiteks vaktsiin ALLOVECTIN<sup>®</sup>, vaktsiin LEUVECTIN<sup>®</sup> ja vaktsiin VAXID<sup>®</sup>, topoisomeraas I inhibiitorit LURTOTECAN<sup>®</sup>, mRH-d

ABARELIX<sup>®</sup>, lapatiniibditosülaati (ErbB-2 ja EGFR kaksik-türosiinkinaasi väikese molekuli inhiibitor, tuntud ka kui GW572016), ning mistahes eespool nimetatute farmatseutiliselt vastuvõetavaid sooli, happeid või derivaate.

**[0200]** Siin kasutatuna tähendab „kasvu inhibeeriv agens” ühendit või kompositsiooni, mis inhibeerib *in vitro* või *in vivo* raku (nagu CD22 ekspresseeriv rakk) kasvu. Seega võib kasvu takistav agens olla selline, mis praktiliselt vähendab S-faasis olevate rakkude (nagu CD22 ekspresseerivad rakud) protsenti. Kasvu inhibeerivate agensite näited hõlmavad agenseid, mis tõkestavad rakutsükli progresseerumist (S-faasist erinevas kohas), nagu agensid, mis indutseerivad G1 seiskumist ja M-faasi seiskumist. Klassikalised M-faasi tõkestajad hõlmavad vinka alkaloide (vinkristiini ja vinblastiini), taksaane ning topoisomeraas II inhiibitoreid, nagu doksorubitsiin, epirubitsiin, daunorubitsiin, etoposiid ja bleomütsiin. Agensid, mis seiskavad G1, mõjuvad ka S-faasi seiskajatena, näiteks DNA-d alküülivad agensid, nagu tamoksifeen, prednisoon, dakarbasiin, meklooretamiin, tsisplatiin, metotreksaat, 5-fluorouratsüül ja ara-C. Lisainfot võib leida trükisest The Molecular Basis of Cancer, toim. Mendelsohn ja Israel, peatükk 1, pealkirjaga "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", autorid Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), eriti lk 13. Taksaanid (paklitakseel ja dotsetakseel) on jugapuust saadavad vähivastased ravimid. Euroopa jugapuust saadav dotsetakseel (TAXOTERE<sup>®</sup>, Rhone-Poulenc Rorer) on paklitakseeli (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb) poolsünteesiline analoog. Paklitakseel ja dotsetakseel käivitavad mikrotoubulite assambleerumise tubuliini dimeeridest ning stabiliseerivad mikrotoubuleid, hoides ära nende depolümeeriseerumise ja põhjustades mitoosi inhibeerimise rakkudes.

**[0201]** Termin “rakusisene metaboliit” tähendab ühendit, mis tekib antikeha ja ravimi konjugaadist (ADC-st) rakusisese metaboolse protsessi või reaktsiooni tagajärjel. Metaboolne protsess või reaktsioon võib olla ensümaatiline protsess, nagu ADC peptiidlinkeri proteolüütiline lõikamine või funktsionaalse rühma, nagu hüdrasoon, ester või amiid, hüdroolüüs. Rakusisesed metaboliidid hõlmavad, nendega piirdumata, antikehasid ja vabasid ravimeid, mis on läbi teinud rakusisese lõikamise pärast rakku sisenemist, sinna difundeerumist, assimileerumist või rakku transportimist.

**[0202]** Mõisted “rakusiseselt lõigatud” ja “rakusisene lõikamine” tähendavad raku sees toimuvaid metaboolseid protsesse või reaktsioone antikeha ja ravimi konjugaadis (ADC-s), kusjuures ravimüksuse (D) ja antikeha (Ab) vaheline kovalentne side, see tähendab linker,

lõhutakse ning selle tulemuseks on raku sees antikehalt dissotsieerunud vaba ravim. Seega on ADC lõigatud üksused rakusisesed metaboliidid.

**[0203]** Termin “biosaadavus” tähendab patsiendile manustatud ravimi antud koguse süsteemset kättesaadavust (st tasemeid veres/plasmas). Biosaadavus on absoluutne mõiste, mis näitab nii manustatud ravimiannuse vormist sõltuvat üldises ringluses olemise aega (kiirust) kui ka üldisse ringluses jõudnud ravimi üldkogust (ulatust).

**[0204]** Termin “tsütotoksiline aktiivsus” tähendab antikeha ja ravimi konjugaadi või antikeha ja ravimi konjugaadi rakusisesese metaboliidi rakku tapvat, tsütostaatilist või kasvu inhibeerivat mõju. Tsütotoksilist aktiivsust võib väljendada  $IC_{50}$ -väärtusena, mis on kontsentratsioon (molaarne või massi järgi) ühikmahu kohta, mille puhul on elumus pooltel rakkudest.

**[0205]** “Alküülrühm” on  $C_1$ - $C_{18}$ -süsivesinik, mis hõlmab normaalseid, sekundaarseid, tertsiaalseid või tsüklilisi süsinikuaatomeid. Näited on metüül- (Me,  $-CH_3$ ), etüül- (Et,  $-CH_2CH_3$ ), 1-propüül- (n-Pr, n-propüül-,  $-CH_2CH_2CH_3$ ), 2-propüül- (i-Pr, i-propüül-,  $-CH(CH_3)_2$ ), 1-butüül- (n-Bu, n-butüül-,  $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-metüül-1-propüül- (i-Bu, i-butüül-,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-butüül- (s-Bu, s-butüül-,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 2-metüül-2-propüül- (t-Bu, t-butüül-,  $-C(CH_3)_3$ ), 1-pentüül- (n-pentüül-,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-pentüül- ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$ ), 3-pentüül- ( $-CH(CH_2CH_3)_2$ ), 2-metüül-2-butüül- ( $-C(CH_3)_2CH_2CH_3$ ), 3-metüül-2-butüül- ( $-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$ ), 3-metüül-1-butüül- ( $-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-metüül-1-butüül- ( $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 1-heksüül- ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-heksüül- ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-heksüül- ( $-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$ ), 2-metüül-2-pentüül- ( $-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-metüül-2-pentüül- ( $-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 4-metüül-2-pentüül- ( $-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$ ), 3-metüül-3-pentüül- ( $-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$ ), 2-metüül-3-pentüül- ( $-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$ ), 2,3-dimetüül-2-butüül- ( $-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$ ), 3,3-dimetüül-2-butüülrühmad ( $-CH(CH_3)-C(CH_3)_3$ ).

**[0206]** Siin kasutatuna tähendab termin “ $C_1$ - $C_8$ -alküülrühm” sirge ahelaga või hargnenud, küllastunud või küllastumata süsivesinikku, milles on 1 kuni 8 süsinikuaatomit. Esindavad “ $C_1$ - $C_8$ -alküül”-rühmad hõlmavad, nendega piirdumata, metüül-, etüül-, n-propüül-, n-butüül-, n-pentüül-, n-heksüül-, n-heptüül-, n-oktüül-, n-nonüül- ja n-detsüülrühmi, samas kui hargnenud  $C_1$ - $C_8$ -alküülrühmad hõlmavad, nendega piirdumata, isopropüül-, *sec*-butüül-, isobutüül-, *tert*-butüül-, isopentüül-, 2-metüülbutüülrühma, küllastumata  $C_1$ - $C_8$ -alküülrühmad hõlmavad, nendega piirdumata, vinüül-, allüül-, 1-butenüül-, 2-butenüül-, isobutüleenüül-,

1-pentenüül-, 2-pentenüül-, 3-metüül-1-butenüül-, 2-metüül-2-butenüül-, 2,3-dimetüül-2-butenüül-, 1-heksüül-, 2-heksüül-, 3-heksüül-, atsetüleenüül-, propüünüül-, 1-butünüül-, 2-butünüül-, 1-pentünüül-, 2-pentünüül-, 3-metüül-1-butünüülrühmi, metüül-, etüül-, propüül-, isopropüül-, n-butüül-, isobutüül-, *sec*-butüül-, *tert*-butüül-, n-pentüül-, isopentüül-, neopentüül-, n-heksüül-, isoheksüül-, 2-metüülipentüül-, 3-metüülipentüül-, 2,2-dimetüülipentüül-, 2,3-dimetüülipentüül-, 2,2-dimetüülipentüül-, 2,3-dimetüülipentüül-, 3,3-dimetüülipentüül-, 2,3,4-trimetüülipentüül-, 3-metüüliheksüül-, 2,2-dimetüüliheksüül-, 2,4-dimetüüliheksüül-, 2,5-dimetüüliheksüül-, 3,5-dimetüüliheksüül-, 2,4-dimetüülipentüül-, 2-metüüliheptüül-, 3-metüüliheptüül-, n-heptüül-, isoheptüül-, n-oktüül- ja isooktüülrühmi. C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm võib olla asendatud ühe või enama rühmaga, mis hõlmavad, nendega piirdumata järgnevaid: -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-), -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', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halogeen, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> ja -CN, milles iga R' on sõltumatult valitud H, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül- ja arüülrühma hulgest.

**[0207]** "Alkenüülrühm" on C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>-süsivesinik, mis sisaldab normaalseid, sekundaarseid, tertsiaalseid või tsüklilisi süsinikuaatomeid koos vähemalt ühe küllastumatus saidiga, milleks on süsinik-süsinik sp<sup>2</sup>-kaksiksides. Näited hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: etüleen- või vinüül- (-CH=CH<sub>2</sub>), allüül- (-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), tsüklopentenüül- (-C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>) ja 5-heksenüülrühm (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>).

**[0208]** "Alkünüülrühm" on C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>-süsivesinik, mis sisaldab normaalseid, sekundaarseid, tertsiaalseid või tsüklilisi süsinikuaatomeid koos vähemalt ühe küllastumatus saidiga, milleks on süsinik-süsinik sp-kolmikside. Näited hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: atsetüleen- (-C≡CH) ja propargüülrühm (-CH<sub>2</sub>C≡CH).

**[0209]** "Alküleenrühm" tähendab küllastunud, hargnenud või sirge ahelaga või tsüklilist 1-18 süsinikuaatomiga süsivesinikrühma, milles on kaks ühevalentset rühmade tsentrit, mis on saadud vesinikuaatomite eemaldamisega lähtealkaani sama või kahe erineva süsinikuaatomi juurest. Tüüpilised alküleenrühmad hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: metüleen- (-CH<sub>2</sub>-) 1,2-etüül- (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,3-propüül- (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ja 1,4-butüülrühm (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) ja nendesarnased.

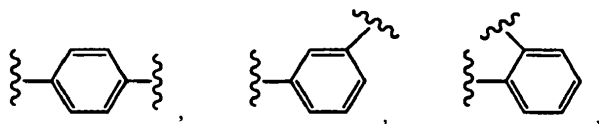
**[0210]** "C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alküleenrühm" on sirge ahelaga küllastunud süsivesinikurühm valemiga -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>-. C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-alküleenrühmade näited hõlmavad metüleen-, etüleen-, propüleen-, butüleen-, pentüleen-, heksüleen-, heptüleen-, otsütüleen-, nonüleen- ja dekaleenrühma.

[0211] “Alkenüleenrühm” tähendab küllastumata, hargnenud või sirge ahelaga või tsüklilist 2-18 süsinikuaatomiga süsivesinikrühma, milles on kaks monovalentset rühmade tsentrit, mis on saadud vesinikuaatomite eemaldamisega lähtealkeeni sama või kahe erineva süsinikuaatomi juurest. Tüüpilised alkenüleenrühmad hõlmavad, sellega piirdumata, 1,2-etüleenrühmi (-CH=CH-).

[0212] “Alkünüleenrühm” tähendab küllastumata, hargnenud või sirge ahelaga või tsüklilist 2-18 süsinikuaatomiga süsivesinikrühma, milles on kaks monovalentset rühmade tsentrit, mis on saadud vesinikuaatomite eemaldamisega lähtealküüni sama või kahe erineva süsinikuaatomi juurest. Tüüpilised alkünüleenrühmad hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: atsetüleen- (-C≡C-), propargüül- (-CH<sub>2</sub>C≡C-) ja 4-pentünüülrühm (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡C-).

[0213] “Arüülrühm” tähendab karbotsüklilist aromaatsset rühma. Arüülrühmade näited hõlmavad, nendega piirdumata, fenüül-, naftüül- ja antratsenüülrühma. Karbotsükliline aromaadne rühm või heterotsükliline aromaadne rühm võib olla asendamata või asendatud ühe või enama rühmaga, mis, nendega piirdumata, hõlmavad järgnevaid: C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-), 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, -halogeen, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> ja -CN, milles iga R' on sõltumatult valitud H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül- ja arüülrühma hulgast.

[0214] “Arüleenrühm” on arüülrühm, milles on kaks kovalentset sidet ja need võivad olla orto-, meta- või parakonfiguratsioonis, nagu on näidatud järgmistes struktuurides:



kus fenüülrühm võib olla asendamata või asendatud kuni nelja rühmaga, mis, nendega piirdumata, hõlmavad järgnevaid: -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-), 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, -halogeen, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> ja -CN, milles iga R' on sõltumatult valitud H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül- ja arüülrühma hulgast.

[0215] “Arüülalküülrühm” tähendab atsüklilist alküülrühma, milles üks süsinikuaatom, mis on seotud vesinikuaatomiga ja mis tavaliselt on terminaalne või sp<sup>3</sup>-süsinikuaatom, on asendatud arüülrühmaga. Tüüpilised arüülalküülrühmad hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: bensüül-, 2-fenüületaani-1-üül-, 2-fenüületeeni-1-üül-, naftüülmetüül-, 2-naftüületaani-1-üül-, 2-naftüületaani-1-üül-, naftobensüül- ja 2-naftofenüületaani-1-üülrühm. Arüülalküülrühm sisaldab 6 kuni 20 süsinikuaatomit, näiteks on arüülalküülrühma alküülüksuses, mis



hõlmab alkanüül-, alkenüül- ja alkünüülrühmi, 1 kuni 6 süsinikuaatomit, ning arüülüksuses on 5 kuni 14 süsinikuaatomit.

**[0216]** “Heteroarüülalküülrühm” tähendab atsüklilist alküülrühma, milles üks vesinikuaatom, mis on seotud süsinikuaatomiga, mis tavaliselt on terminaalne või  $sp^3$ -süsinikuaatom, on asendatud heteroarüülrühmaga. Tüüpilised heteroarüülalküülrühmad hõlmavad, nendega piirdumata, 2-bensimidazolüülmetüül- ja 2-furüületüülrühma ja nendesarnaseid. Heteroarüülalküülrühm sisaldab 6 kuni 20 süsinikuaatomit, näiteks on heteroarüülalküülrühma alküülüksuses, mis hõlmab alkanüül-, alkenüül- ja alkünüülrühmi, 1 kuni 6 süsinikuaatomit, ning heteroarüülüksuses on 5 kuni 14 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ja S hulgast. Heteroarüülalküülrühma heteroarüülüksus võib olla monotsükkel, milles on 3 kuni 7 tsükliliiget (2 kuni 6 süsinikuaatomit) või bitsükkel, milles on 7 kuni 10 tsükliliiget (4 kuni 9 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ja S hulgast), näiteks bitsüklo[4,5]-, -[5,5]-, -[5,6]- või -[6,6]-süsteem.

**[0217]** “Asendatud alküülrühm”, “asendatud arüülrühm” ja “asendatud arüülalküülrühm” tähendavad vastavalt alküül-, arüül- ja arüülalküülrühmi, milles üks või enam vesinikuaatomit on üksteisest sõltumatult asendatud asendajaga. Tüüpilised asendajad hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: -X, -R, -O<sup>-</sup>, -OR, -SR, -S<sup>-</sup>, -NR<sub>2</sub>, -NR<sub>3</sub>, =NR, -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R, -OS(=O)<sub>2</sub>OR, -S(=O)<sub>2</sub>NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO<sub>2</sub>R, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=S)NR<sub>2</sub>, -C(=NR)NR<sub>2</sub>, milles iga X on sõltumatult halogeen F, Cl, Br või I ning iga R on sõltumatult H, C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>-alküül-, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-arüülrühm, C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>-heterotsükkel, kaitserühm või eelravimüksus. Eespool kirjeldatud alküleen-, alkenüleen- ja alkünüleenrühmad võivad samuti olla sarnaselt asendatud.

**[0218]** “Heteroarüülrühm” ja “heterotsükkel” tähendavad tsüklilist süsteemi, milles üks või enam tsükliatomitest on heteroaatom, näiteks lämmastik, hapnik ja väävel. Heterotsükliline rühm sisaldab 1 kuni 20 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ja S hulgast. Heterotsükkel võib olla monotsükkel, milles on 3 kuni 7 tsükliliiget (2 kuni 6 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ja S hulgast) või bitsükkel, milles on 7 kuni 10 tsükliliiget (4 kuni 9 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ja S hulgast), näiteks bitsüklo[4,5]-, -[5,5]-, -[5,6]- või -[6,6]-süsteem.

[0219] Heterotsükleid on kirjeldatud trükistes Paquette, Leo A., "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), eriti peatükkides 1, 3, 4, 6, 7 ja 9, "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 kuni käesolevani), konkreetsetel köidetes 13, 14, 16, 19, ja 28, ning trükises J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

[0220] Mittepiiravalt hõlmavad heterotsüklike näited järgnevaid: püridüül-, dihidropüridüül-, tetrahidropüridüül- (piperidüül-), tiasolüül-, tetrahidrotiofenüül-, oksüdeeritud väävlige tetrahidrotiofenüül-, pürimidinüül-, furanüül-, tienüül-, pürrolüül-, pürasolüül-, imidasolüül-, tetrasolüül-, bensofuranüül-, tianaftalenüül-, indolüül-, indolenüül-, kinolinüül-, isokinolinüül-, bensimidazolüül-, piperidinüül-, 4-piperidonüül-, pürrolidinüül-, 2-pürrolidonüül-, pürrolinüül-, tetrahydrofuranüül-, bistetrahydrofuranüül-, tetrahidropüranüül-, bistetrahidropüranüül-, tetrahydrokinolinüül-, tetrahydroisokinolinüül-, dekahydrokinolinüül-, oktahydroisokinolinüül-, 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-, 4aH-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 isatinoöülrühm.

[0221] Mittepiiravate näidetena on süsiniksidemega heterotsükliid seotud püridiini asendis 2, 3, 4, 5 või 6, püridasini asendis 3, 4, 5 või 6, pürimidiini asendis 2, 4, 5 või 6, pürasiini asendis 2, 3, 5 või 6, furaani asendis 2, 3, 4 või 5, tetrahydrofuraani, tiofuraani, tiofeeni, pürrooli või tetrahidropürrooli asendis 2, 3, 4 või 5, oksasooli, imidasooli või tiasooli asendis 2, 4 või 5, isoksasooli, pürasooli või isotiasooli asendis 3, 4 või 5, asiridiini asendis 2 või 3, asetidiini asendis 2, 3 või 4, kinoliini asendis 2, 3, 4, 5, 6, 7 või 8 või isokinoliini asendis 1, 3, 4, 5, 6, 7 või 8. Veel tüüpilisemalt hõlmavad süsiniksidemega heterotsükliid järgnevaid: 2-püridüül-, 3-püridüül-, 4-püridüül-, 5-püridüül-, 6-püridüül-, 3-püridasinüül-, 4-püridasinüül-, 5-püridasinüül-, 6-püridasinüül-, 2-pürimidinüül-, 4-pürimidinüül-, 5-pürimidinüül-,

6-pürimidinüül-, 2-pürasinüül-, 3-pürasinüül-, 5-pürasinüül-, 6-pürasinüül-, 2-tiasolüül-, 4-tiasolüül- või 5-tiasolüülrühm.

**[0222]** Mittepiiravate näidetena on lämmastiksidemega heterotsükliid 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, 1H-indasooli asendis 1, isoindooli või isoindoliini asendis 2, morfoliini asendis 4 ning karbasooli või  $\beta$ -karboliini asendis 9. Veel tüüpilisemalt hõlmavad lämmastiksidemega heterotsükliid järgnevaid: 1-asiridüül-, 1-asetedüül-, 1-pürrolüül-, 1-imidasolüül-, 1-pürasolüül- ja 1-piperidinüülrühm.

**[0223]** “C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükkel” tähendab aromaatsset või mittearomaatsset C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükliit, milles üks kuni neli tsükli süsinikuaatomitest on sõltumatult asendatud heteroatomiga, mis on valitud aatomeid O, S ja N sisaldavast rühmast. C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükleid esindavad näited hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: bensofuranüül-, bensotiofeen-, indolüül-, benso-pürasolüül-, kumarinüül-, isokinolinüül-, pürrolüül-, tiofenüül-, furanüül-, tiasolüül-, imidasolüül-, pürasolüül-, triasolüül-, kinolinüül-, pürimidinüül-, püridinüül-, püridonüül-, pürasiinüül-, püridasinüül-, isotiasolüül-, isoksasolüül- ja tetrasolüülrühm. C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükkel võib olla asendamata või asendatud kuni seitsme rühmaga, mis hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-), 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, -halogeen, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> ja -CN, milles iga R' on sõltumatult valitud H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül- ja arüülrühma hulgast.

**[0224]** “C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükkel” tähendab eespool määratletud C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükliit rühma, milles heterotsükliit rühma vesinikuaatomitest üks on asendatud mingi sidemega. C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükkel võib olla asendamata või asendatud kuni kuue rühmaga, mis hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-), 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, -halogeen, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> ja -CN, milles iga R' on sõltumatult valitud H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül- ja arüülrühma hulgast.

**[0225]** “Karbotsükkel” tähendab küllastunud või küllastumata tsükliit molekuli, milles on monotsükliit 3 kuni 7 süsinikuaatomit või bitsükliit 7 kuni 12 süsinikuaatomit. Monotsükliit karbotsükliit on 3 kuni 6 tsükliit aatomit, veel tüüpilisemalt 5 kuni 6 tsükliit aatomit. Bitsükliit karbotsükliit on 7 kuni 12 tsükliit aatomit, mis on paigutatud bitsüklo[4,5]-

-[5,5]-, -[5,6]- või -[6,6]-süsteemina, või 9 kuni 10 tsüklaatomit, mis on paigutatud bitsüklo[5,6]- või -[6,6]-süsteemina. Monotsükliiliste karbotsükliite näited hõlmavad järgnevaid: tsüklopropüül-, tsüklobutüül-, tsüklopentüül-, 1-tsüklopent-1-eenüül-, 1-tsüklopent-2-eenüül-, 1-tsüklopent-3-eenüül-, tsükloheksüül-, 1-tsükloheks-1-eenüül-, 1-tsükloheks-2-eenüül-, 1-tsükloheks-3-eenüül-, tsükloheptüül- ja tsüklooktüülrühm.

**[0226]** “C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükkel” on 3-, 4-, 5-, 6-, 7- või 8-liikmeline küllastunud või küllastumata karbotsükkel. C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükleid esindavad, nendega piirdumata, järgnevad: tsüklopropüül-, tsüklobutüül-, tsüklopentüül-, tsüklopentadienüül-, tsükloheksüül-, tsükloheksenüül-, 1,3-tsükloheksadienüül-, 1,4-tsükloheksadienüül-, tsükloheptüül-, 1,3-tsükloheptadienüül-, 1,3,5-tsükloheptatrienüül-, tsüklooktüül- ja tsüklooktadienüülrühm. C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükkel võib olla asendamata või asendatud ühe või enama rühmaga, mis, nendega piirdumata hõlmavad järgnevaid: -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-), 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, -halogeen-, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> ja -CN, milles iga R' on sõltumatult valitud H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül- ja arüülrühma hulgast.

**[0227]** “C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükkel” tähendab eespool defineeritud C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükliilist rühma, milles üks karbotsükliilise rühma vesinikuaatomitest on asendatud mingi sidemega.

**[0228]** “Linker” tähendab keemilist üksust, mis sisaldab kovalentset sidet või aatomite ahelat, mis seovad antikeha kovalentselt ravimüksusega. Erinevates teostustes hõlmavad linkerid divalentset rühma, nagu alküüldiüül-, arüüldiüül-, heteroarüüldiüülrühma, üksuseid nagu -(CR<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O(CR<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, korduvaid alküloksü- (nt polüetüleenoksü-, PEG-, polümetüleenoksü-) ja alküülaminoüksusi (nt polüetüleenamino-, Jeffamine™) ning dihappe estreid ning amiide, sealhulgas suktsinaati, suktsiinamiidi, diglükolaati, malonaati ja kaproamiidi.

**[0229]** Termin “kiraalne” tähistab molekule, mis ei kattu oma peegelpilt-partneriga, samas kui termin “mittekiraalne” tähistab molekule, mis kattuvad oma peegelpilt-partneriga.

**[0230]** Termin “stereoisomeerid” tähendab ühendeid, millel on identne keemiline koostis, kuid mis erinevad aatomite või rühmade ruumilise paigutuse poolest.

**[0231]** “Diastereomeer” tähendab kahe või enama kiraalsustsentriga stereoisomeeri ning need molekulid ei ole üksteise peegelpildid. Diastereomeeridel on erinevad füüsikalised omadused, näiteks sulamistemperatuurid, keemistemperatuurid, spektriomadused ja reaktiivsused. Diastereomeeride segusid võib lahutada kõrge lahutusvõimega analüütiliste protseduuride, nagu elektroforees ja kromatograafia, abil.

[0232] “Enantiomeerid” tähendavad ühendi kahte stereoisomeeri, mille peegelpildid ei ole kattuvad.

[0233] Siin kasutatavad stereokeemilised definitsioonid ja konventsioonid järgivad üldiselt trükiseid S. P. Parker, toim., McGraw-Hill, Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York ning Eliel, E., Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Mitmed orgaanilised ühendid esinevad optiliselt aktiivsetes vormides, see tähendab neil on võime pöörata polariseeritud valguse tasandit. Optiliselt aktiivse ühendi kirjeldamisel kasutatakse eesliiteid D ja L või R ja S, et tähistada molekuli absoluutset konfiguratsiooni selle kiraalse(te) tsentri(te) ümbruses. Eesliiteid d ja l või (+) ja (-) rakendatakse, et tähistada ühendiga pööratud polariseeritud valguse pööramise suunda, kusjuures (-) või l tähendab, et ühend on vasakule pöörav (levorotatoorne). Ühend eesliitega (+) või d on paremale pöörav (dekstrotatoorne). Antud keemilise struktuuri aspektist on need stereoisomeerid identsed, välja arvatud see, et molekulid on üksteise peegelpildid. Spetsiifiline stereoisomeer võib olla nimetatud ka enantiomeeriks ning selliste isomeeride segu nimetatakse sageli enantiomeerseks seguks. Enantiomeeride segu suhtes 50 : 50 nimetatakse ratseemiliseks seguks või ratsemaadiks, mis võib esineda siis, kui keemilises reaktsioonis või protsessis ei ole stereoselektiivsust või stereospetsiifilisust. Mõisted “ratseemiline segu” ja “ratsemaat” tähendavad kahe enantiomeerse liigi ekvimolaarset segu ja sellel puudub optiline aktiivsus.

[0234] “Lahkuv rühm” tähendab funktsionaalset rühma, mida võib asendada mõne muu funktsionaalse rühmaga. Kindlad lahkuvad rühmad on tehnika tasemes hästi tuntud ja nende näited hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: haliid (nt kloriid, bromiid, jodiid), metaansulfonüül- (mesüül-), p-tolueensulfoon- (tosüül-), trifluorometüülsulfonüül- (triflaat-) ja trifluorometüülsulfonaatrühm.

### Lühendid

LINKERI KOMPONENDID:

[0235]

MC = 6-maleimidokaproüülrühm

Val-Cit või "vc" = valiin-tsitrulliin (iseloomulik dipeptiid proteaasiga lõigatavas linkeris)

tsitrulliin = 2-amino-5-ureidopentanoonhape

PAB = p-aminobensüülloksükarbonüülrühm (“lõikuva (*self immolative*)” linkerosa näide)

Me-Val-Cit = N-metüül-valiin-tsitrulliin (milles linker-peptiidsidet on muudetud, et hoida ära selle lõikamist katepsiiniga B)

MC(PEG)6-OH = maleimidokaproüül-polüetüleenglükool (võib siduda antikeha tsüsteiini-dega)

SPP = N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüültio)pentanoaat

SPDP = N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditio)propionaat

SMCC = suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaad

IT = iminotiolaan

#### TSÜTOTOKSILISED RAVIMID:

MMAE = monometüülauristatiin E (molekulmass = 718)

MMAF = auristatin E (MMAE) variant fenüülalaniiniga ravimi C-terminuses (molekulmass = 731,5)

MMAF-DMAEA = MMAF koos DMAEA-ga (dimetüülaminoetüülamiiniga), mis on amiidsidemega seotud C-terminaalse fenüülalaniiniga (molekulmass = 801,5)

MMAF-TEG = MMAF koos tetraetüleenglükooliga, mis esterdatud fenüülalaniiniga

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

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

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

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

**[0236]** Lisaks on kasutatud järgmisi lühendeid, mille definitsioonid on järgmised: AE on auristatiin E, Boc on N-(t-butoksükarbonüülrühm), cit on tsitrulliin (2-amino-5-karbamidopentanoonhape), dap on dolaproiin, DCC on 1,3-ditsükloheksüülkarbodiimid, DCM on diklorometaan, DEA on dietüülamiin, DEAD on dietüülalodikarboksülaad, DEPC on dietüülfosforüülsüanidaad, DIAD on diisopropüülalodikarboksülaad, DIEA on N,N-diisopropüületüülamiin, dil on dolaisoleutsiin, DMA on dimetüülsetamiid, DMAP on 4-dimetüülaminopüridiin, DME on etüüleenglükooldimetüüleeter (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 ditiotreitool, EDCI on 1-(3-dimetüülaminopropüül)-3-etüülkarbodiimiidvesinikkloriid, EEDQ on 2-etoksü-1-etoksükarbonüül-1,2-dihüdrokinoiin, ES-MS on elektropihustus-massispektromeetria (*electrospray mass spectrometry*), EtOAc on etüülatsetaat, Fmoc on N-(9-fluoreenüülmetoksükarbonüülrühm), gly on glütsiin, HATU on O-(7-asabensotriasool-1-üül)-N,N,N',N'-tetrametüülurooniumheksafluorofosfaat, HOBt on 1-hüdrosübensotriasool, HPLC on kõrgsurvevedelikukromatograafia (*high pressure liquid chromatography*), ile on isoleutsiin, lys on lüsiin, MeCN (CH<sub>3</sub>CN) on atsetonitriil, MeOH on metanool, Mtr on 4-anisüüldifenüülmetüülrühm (või 4-metoksütritüülrühm), nor on (1S,2R)-(+)-norefedriin, PBS on fosfaadiga puhverdatud soolalahus (pH 7,4), PEG on polüetüleenglükool, Ph on fenüülrühm, Pnp on p-nitrofenüülrühm, MC on 6-maleimidokaproüülrühm, phe on L-fenüülalaniin, PyBrop on bromo-tris-pürrolidinofosfooniumheksafluorofosfaat, SEC on suurus-kromatograafia (*size-exclusion chromatography*), Su on suktsiinimiid, TFA on trifluoroäädikhape, TLC on õhukese kihi kromatograafia (*thin layer chromatography*), UV on ultravioletkiirgus ning val on valiin.

## KOMPOSITSIOONID JA NENDE VALMISTAMISE MEETODID

**[0237]** Kirjeldatakse CD22-ga seonduvaid antikehasid. Esitatakse CD22-vastaseid antikehasid sisaldavaid immunokonjugaadid. Leiutisekohased antikehad ja immunokonjugaadid on näiteks kasutatavad CD22 muutunud, näiteks suurenenud ekspressiooniga seotud häirete diagnoosmiseks või ravimiseks. Leiutisekohased antikehad või immunokonjugaadid on kasulikud raku proliferatiivse häire nagu vähk diagnoosimiseks või ravimiseks.

### CD22-vastased antikehad

**[0238]** Ühe aspektina esitab leiutis antikehad, mis seonduvad CD22-ga. Kirjeldatakse antikehasid, mis seonduvad inimesest ja jaava makaagist (*cyno*) pärineva CD22 küpse vormiga. Ühes näitena on inimese CD22 küpsel vormil aminohapete järjestus SEQ ID NO: 27. Inimese küpse peamise isovormi ekstratsellulaarne domeen sisaldab seitset Ig-sarnast domeeni ja selle aminohapete järjestus on SEQ ID NO: 28. Teiseks näitena on esitatud inimese minoorne CD22 isovorm, milles puuduvad ekstratsellulaarsed domeenid 3 ja 4 ja mille aminohapete

järjestuseks on SEQ ID NO: 29. Minoorse isovormi ekstratsellulaarse domeeni aminohapete järjestus on SEQ ID NO: 30. Jaava makaagi CD22 aminohapete järjestus on SEQ ID NO: 31. Mõnes näites seondub CD22-vastane antikeha CD22 küpse vormiga, mis on ekspresseeritud raku pinnal. Mõnes näites inhibeerib antikeha, mis seondub CD22 küpse vormiga, mis on ekspresseeritud raku pinnal, raku kasvu. Mõnes näites seondub CD22-vastane antikeha CD22 küpse vormiga, mis on ekspresseeritud raku pinnal ning inhibeerib raku prolifererumist. Mõnes näites seondub CD22-vastane antikeha CD22 küpse vormiga, mis on ekspresseeritud raku pinnal ning indutseerib raku surma. Mõnes näites seondub CD22-vastane antikeha CD22 küpse vormiga, mis on ekspresseeritud vähirakkude pinnal. Mõnes näites seondub CD22-vastane antikeha CD22 küpse vormiga, mis võrreldes samast koest pärinevate normaalsete rakkudega on vähirakkude pinnal üleekspresseeritud. Mõnes näites on CD22-vastane antikeha konjugeeritud tsütotoksiini või detekteeritava märgisega ning seondub CD22-ga raku pinnal. Mõnes näites inhibeerib antikeha-toksiini konjugaat raku kasvu. Mõnes näites võimaldab antikeha ja detekteeritava märgise konjugaat oma pinnal CD22-d ekspresseeriva raku *in vitro* või *in vivo* tuvastamist.

**[0239]** Ühe aspektina on CD22-vastane antikeha monokloonne antikeha. Ühe aspektina on CD22-vastane antikeha antikeha fragment, näiteks Fab, Fab'-SH, Fv, scFv või (Fab')<sub>2</sub> fragment. Ühe aspektina on CD22-vastane antikeha kimäärne, humaniseeritud või inimese antikeha. Ühe aspektina on mistahes siin kirjeldatud CD22-vastane antikeha puhastatud antikeha.

**[0240]** Siin esitatakse iseloomulikke monokloonseid antikehasid, mis pärinevad faagikogust. Kogu skriinimiseks kasutatud antigeen oli polüpeptiid, millel on aminohapete järjestus SEQ ID NO: 28 või SEQ ID NO: 30, mis vastab CD22 $\beta$  ja CD22 $\alpha$  rakuvälistele domeenidele (ECD-dele). Kõik skriinimisel leitud antikehad on viidud afiinsusküpsuseni.

**[0241]** Ühe aspektina esitatakse monokloonsed antikehad, mis seondumises CD22-ga konkureerivad hiire antikehaga 10F4.4.1, humaniseeritud antikehadega 10F4v1 ja v3 ja hiire antikehaga 5E8.1.8. Esitatakse ka monokloonsed antikehad, mis seonduvad sama epitoobiga kui hiire antikeha 10F4.4.1, humaniseeritud antikehad 10F4v1 ja v3 ja hiire antikeha 5E8.1.8.

**[0242]** Esitatakse CD22-vastaseid antikehasid kodeerivad polünukleotiidid. Esitatakse CD22-vastaseid antikehasid kodeerivaid polünukleotiide sisaldavad vektorid. Esitatakse selliseid vektoreid sisaldavad peremeesrakud. Esitatakse CD22-vastaseid antikehasid või CD22-vastaseid antikehasid kodeerivaid polünukleotiide sisaldavad kompositsioonid. Leiutiseko-



hane kompositsioon on farmatseutiline preparaat raku proliferatiivse häire, nagu need, mida siin on loetletud, ravimiseks.

#### Antikeha manustamine ja preparaatide koostamine

**[0243]** CD22-vastast antikeha või CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaati (mis, nendega piirdumata, hõlmavad leiutisekohast CD22-vastase tiomabi ja ravimi konjugaati) võib manustada kombineerituna B-raku pinnaantigeeni antagonistiga. Manustamine “kombineerituna” ühe või enama täiendava terapeutilise agensiga hõlmab samaaegset ja mistahes järjekorras läbiviidavat järjestikulist manustamist. Ühe näitena on manustamine samaaegne või järjestikune. Teise näitena on manustamine samaaegne, kaasnev või manustamine koos samas preparaadis. Ühe näitena on B-raku pinnaantigeeni antagonist antikeha või selle antigeeniga seonduv fragment. Ühe näitena on B-raku pinnaantigeeni antagonist antikeha ja ravimi konjugaat.

**[0244]** Kui see on antud näidustuse ravimisel vajalik, siis võivad leiutisekohased preparaadid sisaldada enam kui ühte aktiivset ühendit, eelistatult on täiendavate aktiivsustega ühendid sellised, mis üksteist vastastikku ei mõjuta. Näiteks võib osutada soovitavaks CD22-vastasele antikehale, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaadile või CD22-ga seonduvale oligopeptiidile samasse preparaati lisada täiendav antikeha, näiteks mõni teine CD22-vastane antikeha, mis seondub CD22-e polüpeptiidil mõne muu epitoobiga, või teine antikeha, mis seondub mõne muu B-raku pinnaantigeeniga või teine antikeha, millel on mõni muu sihtmärk nagu kasvufaktor, mis mõjutab teatud vähi kasvu. Alternatiivselt või lisaks eelnevale võib koostis sisaldada veel kemoterpeutilist agensit, tsütotoksilist agensit, tsütokiini, kasvu inhibeerivat agensit, antihormonaalset agensit ja/või kardioprotektanti. Sellised molekulid on kombinatsioonis esindatud kogustes, mis on soovitud eesmärkide saavutamisel efektiivsed.

**[0245]** Sõltuvalt vähi arengu staadiumist hõlmab vähiravi käesoleval ajal järgmisi raviseid või nende kombinatsioone: kasvujalalise koe kirurgiline eemaldamine, kiiritusravi ja keemiaravi. Ravi CD22-vastase antikeha, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaadi või CD22-ga seonduva oligopeptiidiga võib olla eriti soovitav vanemate patsientide puhul, kes ei talu hästi keemiaravi toksilisust ja kõrvaltoimeid ning haiguse metastaatilise staadiumi puhul, kus kiiritusravil on piiratud tulemuslikkus. Kasvajale suunatud leiutisekohased CD22-vastased antikehad, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaadid või CD22-ga seonduvad oligopep-

tiidid on kasulikud CD22-e ekspresseerivate vähkide leevendamisel haiguse esmase diagnoosimise järgselt või nende retsidiveerumisel. Ravirakendustes võib CD22-vastaseid antikehasid, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaate või CD22-ga seonduvaid oligopeptiide kasutada üksi või kombinatsioonis, näiteks koos hormoonide, antiangiogeenide või radioaktiivselt märgistatud ühenditega või koos kirurgia, krüoterapia ja/või kiiritusraviga. CD22-vastased antikehasid, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaate või CD22-ga seonduvaid oligopeptiidide võib manustada koos teiste tavapäraste ravivormidega, kas järjestikku, enne või pärast tavapära ravi. Käesoleva vähi ravimise või leevendamise meetodi kohaselt võib patsiendile CD22-vastaseid antikehasid, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaate või CD22-ga seonduvaid oligopeptiide manustada koos ühe või enama eelnevalt kirjeldatud kemoterapeutilise agensi manustamisega. CD22-vastast antikeha, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaati või CD22-ga seonduvat oligopeptiidi manustatakse koos kemoterapeutilise agensi terapeutiliselt efektiivse annusega. Teise näitena manustatakse CD22-vastast antikeha, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaati või CD22-ga seonduvat oligopeptiidi keemiaraviga ühendatult selleks, et tõsta kemoterapeutilise agensi aktiivsust ja efektiivsust. Physicians' Desk Reference (PDR, andmebaas) esitab erinevate vähkide ravimisel kasutatud annused nende agensite jaoks. Nende eespool nimetatud terapeutiliselt efektiivsete kemoterapeutiliste agensite annustamisskeem ja annused sõltuvad ravitavast vähist, haiguse ulatusest ja teistest faktoritest, mis on teada erialale spetsialiseerunud arstile ja mida arst saab hinnata.

**[0246]** Ühe eraldi näitena manustatakse patsiendile CD22-vastane antikeha, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaat või CD22-ga seonduv oligopeptiid, mis on konjugeeritud tsütotoksilise agensiga. Eelistatult internaliseeritakse CD22 valguga seotud konjugaat raku poolt, mis suurendab immunokonjugaadi raviefektiivsust selle vähiraku tapmisel, millega ta seondub. Ühe näitena on tsütotoksiline agens suunatud vähiraku nukleiinhappele või mõjutab seda. Tsütotoksiliste agensite näiteid on eespool kirjeldatud ning need hõlmavad auristatiine, maitansinoide, kalihheamütsiine, ribonukleaase ja DNA endonukleaase või nende bioloogiliselt aktiivseid derivaate.

**[0247]** CD22-vastaseid antikehasid, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaate või CD22-ga seonduvaid oligopeptiide või nimetatute konjugaate toksiiniga manustatakse inimesele kui patsiendile tuntud meetodite kohaselt nagu intravenoosne manustamine, näiteks booluse või pideva infusioonina mingi ajavahemiku kestel, intramuskulaarse, intraperitoneaalse, intratserebrospinaalse, subkutaanse, intraartikulaarse, intrasünoviaalse, intratekaalse, oraalse,

toopilise või inhalatiivse manustamise teel. Eelistatud on antikeha, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaadi või oligopeptiidi intravenoosne või subkutaanne manustamine.

**[0248]** CD22-vastaste antikeha, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaadi või oligopeptiidide manustamisega võib kombineerida muid raviskeeme. Kombineeritud manustamine hõlmab koosmanustamist eraldi preparaadidena või ühe preparaadina, järjestikust manustamist igas järjekorras, kusjuures eelistatult tekib ajaperiood, mille kestel mõlemad (või kõik) aktiivsed agensid on samaaegselt bioloogiliselt aktiivsed. Eelistatult tekib sellise kombineeritud ravi tulemusel sünergiline efekt.

**[0249]** Samuti võib osutada soovitavaks kombineerida CD22-vastase antikeha või antikehade, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaatide või oligopeptiidide manustamine sellise antikeha manustamisega, mis on suunatud mõne muu antud vähiga seotud kasvajaantigeeni või B-raku pinnaantigeeni vastu.

**[0250]** Veel ühe näitena hõlmavad terapeutilised ravimeetodid CD22-vastase antikeha (või antikehade), CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaadi (konjugaatide) või oligopeptiidi(de) ja ühe või enama kemoterapeutilise agensi või kasvu inhibeeriva agensi kombineeritud manustamist, sealhulgas kombineeritud manustamist erinevate kemoterapeutiliste agensite segudega. Kemoterapeutilised agensid hõlmavad järgmisi: estramustiinfosfaat, prednimustiin, tsisplatiin, 5-fluorouratsüül, melfalaan, tsüklofosfamiid, hüdroksüurea ja hüdroksüureataksaanid (nagu paklitakseel ja doksetakseel), ja/või antratsükliin-antibiootikume, samuti selliste agensite kombinatsioone nagu, nendega piirdumata, CHOP või FOLFOX. Selliseks keemiaraviks sobivate preparaatide valmistamise ja annustamise skeeme võib kasutada vastavalt tootja juhistele või kogunud praktik võib need empiirilisel määral määrata. Samuti on selliseks keemiaraviks sobivate preparaatide valmistamise ja annustamise skeeme kirjeldatud trükises Chemotherapy Service, toim., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

**[0251]** Antikeha manustatakse mistahes sobival viisil, sealhulgas parenteraalselt, toopliselt, subkutaanselt, intraperitonaalselt, intrapulmonaalselt, intranasaalselt ja/või intralesionaalselt. Parenteraalsed infusioonid hõlmavad intramuskulaarset, intravenoosset, intraarteriaalset, intraperitonaalset või subkutaanset manustamist. Sobivaks on peetud ka intratekaalset manustamist (vaadake näiteks US patendipublikatsiooni 2002/0009444, Grillo-Lopez, A, Concerning intrathecal delivery of a CD20 antibody). Eelistatud on intravenoosne või subkutaanne annustamine.

[0252] Teise medikamendi võib manustada enne ja/või pärast terapeutilist antikeha või immunoadhesiini, selline kombineeritud manustamine hõlmab eraldi preparaatide või ühe farmatseutilise preparaadina koosmanustmist ning järjestikust manustamist mõlemas järjekorras, kusjuures eelistatult tekib ajavahemik, mille kestel mõlemad (või kõik) aktiivsed agensid on samaaegselt bioloogiliselt aktiivsed.

[0253] Kuigi autoimmuunhaiguste ravis võib terapeutilist CD22-vastast antikeha, CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaati, immunoadhesiini või muud bioloogilist ravimit manustada ainsa agensina, kombineeritakse üldjuhul terapeutilist antikeha või immunoadhesiini ühe või enama täiendava medikamendiga (medikamentidega). Näiteks RA ja teiste autoimmuunhaiguste puhul kombineeritakse antikeha, immunoadhesiin või bioloogiline ravim eelistatult mistahes ühe või enama immunosupressiivse agensi, kemoterapeutilise agensi, BAFF antagonisti, integriini antagonisti või antikehade ja/või tsütokiinidega, mida kirjeldati eespool definitsioonide lõigus, mistahes ühe või enama haigust modifitseeriva antireumaatilise ravimiga (DMARD), nagu hüdroksüklorokviin, sulfasalasiin, metotreksaat, leflunomiid, asatiopriin, D-peniitsillamiin, kuld (peroraalne), kuld (intramuskulaarne), minotsükliin, tsüklosporiin, *Staphylococcus*'e valgu A immunoadsorptsiooni, intravenoosse immunoglobuliini (IVIG), mittesteroidsete põletikuvastaste ravimite (NSAID), glükokortikoidide (näiteks koos injekterides), kortikosteroidi (näiteks metüülprednisolooni ja/või prednisooni), folaadi, kasvajakasvatsuse nekroosifaktori (TNF) antagonisti, näiteks etanertsept/ENBREL™, infliksimab/REMICADE™, D2E7 (Knoll) või CDP-870 (Celltech), IL-1R antagonisti (nt Kineret), IL-10 antagonisti (nt Ilodecakin), vere hüübimise modulaatori (nt WinRho), IL-6 antagonist/anti-TNF (CBP 1011), CD40 antagonisti (nt IDEC 131), Ig-Fc retseptori antagonisti (MDX33), immunomodulaatori (nt talidomiidi või ImmuDyn), anti-CD5 antikeha (nt H5g1.1), makrofaagi inhibiitori (nt MDX 33), kostimulatiivse blokeerija (nt BMS 188667 või tolerimabi), komplemendi inhibiitori (nt h5G1.1, 3E10 või lagunemist kiirendava faktori vastase antikeha (DAF) antikeha), IL-2 antagonisti (zxSMART), EGFR inhibiitori (vaadake definitsiooni eespool), türosiinkinaasi inhibiitori (vaadake definitsiooni eespool), anti-angiogeense agensi (nt VEGF antikeha nagu bevakisumab), CD22 antikehade, nagu LL2 või epratusumab (LYMPHOCIDE®, Immunomedies), kaasa arvatud epratusumab Y-90 (Juweid et al. Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995)), Abiogen'i CD22 antikeha (Abiogen, Italy), CMC 544 (Wyeth/Celltech), kombotoksi (UT Soutwestern), BL22 (NIH) ja LympoScan Tc99 (Immunomedics), EpCAM antikeha nagu 17-1A (PANOREX®),  $\alpha\beta 3$  antikeha (nt

VITAXIN®, Medimmune), CD37 antikeha nagu TRU 016 (Trubion), IL-21 antikeha (Zymogenetics/Novo Nordisk), B-raku vastase antikeha (Impheron), B-rakule suunatud MAb (Immunogen/Aventis), ID09C3 (Morphosys/GPC): LymphoRad 131 (HGS), Lym-1 antikeha Y-90 (USC), LIF 226 (Enhanced Lifesci.): BAFF antikeha (nt WO 03/33658), BAFF retseptori antikeha (nt WO 02/24909), BR3 antikeha, Blys antikeha nagu belimumab, LYMPHOSCD22-B™, anti-Lym-1 Oncolym (USC/Peregrine), ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen), gomiliksima (Idex 152, Biogen Idec), IL-6 retseptori antikeha nagu atlisumab (ACTEMRA™: Chugai/Roche), IL-15 antikeha nagu HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen), kemokiini retseptori antikeha nagu CCR2 antikeha (nt MLN 1202, Millienium), komplemendivastase antikeha nagu C5 antikeha (nt ekulisumab, 5G1.1, Alexion), inimese immunoglobuliini peroraalse preparaadi (nt IgPO, Protein Therapeutics), IL-12 antikeha nagu ABT-874 (CAT/Abbott), teneliksimumab (BMS-224818), B-raku vaktsiin, DN-BAFF (Xencor), CRx-119 (CombinatoRx), Amgen'i BAFF antagonist, pentostatiini (Pfizer), IC-485 (ICOS), kemokiini antagonist, nagu T-487 (Tularik) või retikuloos (AVR-118), SCO-323 (SCIOS), integriini antagonist 683699, Tanabe, NGD-2001-1 (Neurogen), SCIO-469 (SCIOS), BIRB-796 (Boehringer Ingelheim), VX702, VX850 (Vertex), leukotrieeni B-4 antagonist (nagu amelubunt, BIIL-284, BI), mikrotoubuli modulaatori (Paxceed, Angiotech), proteaasi inhibiitori (MBS561392, BMS), AGIX-4207 (Atherogenics), ISIS-104838 (ISIS/Elan), MFG-IRAP (Univ. Pitt.), IL-1 Trap (RGN-303, Regeneron/Novartis), oprelvekiini (Wyeth), everolimuse (Certican, Novartis), ameviiivi (Biogen Idec), ORG-39141 (Organon), FK-506 (Fujisawa) ja IL-2 antagonistiga (takrolimus, Fujisawa).

**[0254]** Järgnevalt on iseloomulikke CD22-vastaseid antikehi kirjeldatud detailselt.

### *1. Spetsiifilised CD22-vastased antikehad*

**[0255]** Siin on kirjeldatud antikehi, mis sisaldavad vähemalt ühte, kahte, kolme, nelja, viit või kuut HVR-i, mis on valitud järgmiste seast: (a) HVR-H1, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 4, (c) HVR-H3, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 6, (d) HVR-L1, mis sisaldab mistahes aminohapete järjestust järjestuste SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23 seast, (e) HVR-L2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 12 ja (f) HVR-L3, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 14.

**[0256]** Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab vähemalt ühte, vähemalt kahte või kõiki kolme VH HVR järjestust, mis on valitud järgmiste seast: (a) HVR-H1, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 4, (c) HVR-H3, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 6. Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab HVR-H1, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 2, CD22-vastast antikeha, mis sisaldab HVR-H2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 4. Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab HVR-H3 mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 6,

CD22-vastast antikeha, mis sisaldab järjestust HVR-H3, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 6 ja järjestust HVR-H1, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 2,

CD22-vastast antikeha, mis sisaldab järjestust HVR-H3, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 6 ja järjestust HVR-H2, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 4,

CD22-vastast antikeha, mis sisaldab järjestust HVR-H1, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 2 ja järjestust HVR-H2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 4,

CD22-vastast antikeha, mis sisaldab järjestust HVR-H1, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 2, järjestust HVR-H2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 4 ja järjestust HVR-H3, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 6.

**[0257]** Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab vähemalt ühte, vähemalt kahte või kõiki kolme VL HVR järjestust, mis on valitud järjestustest (a) HVR-L1, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 9 või SEQ ID NO: 10, (b) HVR-L2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 12 ja (c) HVR-L3, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 14, CD22-vastast antikeha, mis sisaldab järjestust HVR-L1, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 9, CD22-vastast antikeha, mis sisaldab järjestust HVR-L1, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 10, CD22-vastast antikeha, mis sisaldab järjestust HVR-L1, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestustest SEQ ID NO: 19-23, HVR-L1 võib sisaldada aminohapete järjestust SEQ ID NO: 9, kus N28 on asendatud V-ga (N28V aminohappeasendus, mis annab järjestuse SEQ ID NO: 10), aminohapete järjestust SEQ ID NO: 9, kus N28 on asendatud A-ga (N28A aminohappeasendus, mis annab

järjestuse SEQ ID NO: 19), aminohapete järjestust SEQ ID NO: 9, kus N28 on asendatud Q-ga (N28Q aminohappeasendus, mis annab järjestuse SEQ ID NO: 20), aminohapete järjestust SEQ ID NO: 9, kus N28 on asendatud S-ga (N28S aminohappeasendus, mis annab järjestuse SEQ ID NO: 21), aminohapete järjestust SEQ ID NO: 9, kus N28 on asendatud D-ga (N28D aminohappeasendus, mis annab järjestuse SEQ ID NO: 22), aminohapete järjestust SEQ ID NO: 9, kus N28 on asendatud I-ga (N28I aminohappeasendus, mis annab järjestuse SEQ ID NO: 23). Samuti kirjeldatakse siin CD22-vastast antikeha, mis sisaldab HVR-L1, mis sisaldab mistahes aminohapete järjestust järjestustest SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23, kus HVR-L1 on mistahes järjestus järjestustest SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 või 23 ja aminohape asendis N30 (asparagiin asendis 30) on asendatud A-ga (N30A aminohappeasendus) või HVR-L1 on mistahes järjestus järjestustest SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 või 23 ja aminohape asendis N30 (asparagiin asendis 30) on asendatud Q-ga (N30Q aminohappeasendus).

**[0258]** Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab (a) HVR-H3, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 6 ja (b) HVR-L3, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 14. Mõnel juhul sisaldab CD22-vastane antikeha lisaks (a) HVR-H1, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 2 ja HVR-H2, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 4.

**[0259]** Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab (a) HVR-H3, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 6 ja (b) HVR-L2, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 12. Mõnel juhul sisaldab CD22-vastane antikeha lisaks (a) HVR-H1, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 2 ja HVR-H2, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 4.

**[0260]** Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab (a) HVR-H3, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 6 ja (b) HVR-L1, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 ja 23. Mõnel juhul sisaldab CD22-vastane antikeha lisaks (a) HVR-H1, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 2 ja HVR-H2, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 4. Mõnel juhul sisaldavad aminohapete järjestused SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 või 23 N30A või N30Q aminohappeasendust. Mõnel juhul sisaldab CD22-vastane antikeha lisaks HVR-L2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 12. Mõnel juhul sisaldab CD22-vastane antikeha lisaks HVR-L3, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 14.

**[0261]** Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab (a) HVR-H1, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 2, (b) HVR-H2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ

ID NO: 4, (c) HVR-H3, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 6, (d) HVR-L1 mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestustest SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23, (e) HVR-L2, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 12 ja HVR-L3, SEQ ID NO: 14. Mõnel juhul on aminohapete järjestus SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 või 23 valitud kui HVR-L1 ja on modifitseeritud aminohappeasendusega N30A või N30Q.

**[0262]** Ühe aspektina käsitleb leiutis CD22-vastast antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 16 (vaadake joonist 2A, h10F4v1). CD22-vastane antikeha võib sisaldada kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 17 (vaadake joonist 2B, h10F4v1). Ühe aspektina käsitleb leiutis CD22-vastast antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 18 (vaadake joonist 2B, h10F4v3).

**[0263]** CD22-vastane antikeha võib sisaldada raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 34 (vaadake joonist 2A, m10F4). CD22-vastane antikeha võib sisaldada kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 35 (vaadake joonist 2B, m 10F4).

**[0264]** Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab 1, 2, 3, 4, 5 või 6 HVR järjestust antikehast 10F4.4.1, mida toodab hübriidoom, mis on säilitamisel ATCC-s (Ameerika kultuuride kollektsioon, *American Type Culture Collection*) säiliku numbriga PTA-7621,

CD22-vastast antikeha, mis sisaldab 1, 2, 3, 4, 5 või 6 HVR järjestust antikehast 5E8.1.8, mida toodab hübriidoom, mis on säilitamisel ATCC-s säiliku numbriga PTA-7620.

**[0265]** CD22-vastane antikeha võib sisaldada mistahes sobivat varieeruva domeeni raamistikujärjestust tingimusel, et antikeha säilitab võime seonduda CD22-ga. Nii näiteks sisaldavad leiutisekohased CD22-vastased antikehad mõnel juhul inimese raske ahela raamistiku alamrühma III konsensusjärjestust. Nende antikehade ühe näitena sisaldab raske ahela raamistiku konsensusjärjestus asendendust (asendusi) asendites 71, 73 ja/või 78. Nende antikehade ühe näitena on asendis 71 A, asendis 73 on T ja/või asendis 78 on A. Ühes näites sisaldavad need antikehad huMAb4D5-8 raske ahela varieeruva domeeni raamistikujärjestust, näiteks SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 (vastavalt FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4). huMAb4D5-8 kaubanduslikult tuntud kui HERCEPTIN<sup>®</sup>, on HER2-vastane antikeha firmalt Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA, millele on viidatud ka US patendipublikatsioonides 6407213 ja 5821337 ning trükises Lee et al., *J. Mol. Biol.*, (2004), 340(5): 1073-93. Ühes



sellises näites sisaldavad antikehad lisaks veel inimese KI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust. Ühes sellises näites sisaldavad need antikehad huMAb4D5-8 kerge ahela varieeruva domeeni raamistikujärjestust, näiteks SEQ ID NO: 8, 1, 13, 15 (vastavalt FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4).

**[0266]** Ühe näitena sisaldab CD22-vastane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab raamistikujärjestust ja hüpervarieeruvaid piirkondi, kus raamistikujärjestus sisaldab FR-H1-FR-H4 järjestusi vastavalt SEQ ID NO: 1, 3, 5 ja 7, HVR H1 sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 2, HVR-H2 sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 4 ja HVR-H3 sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 6. Ühe näitena sisaldab CD22-vastane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab raamistikujärjestust ja hüpervarieeruvaid piirkondi, kus raamistikujärjestus sisaldab FR-L1-FR-L4 järjestusi vastavalt SEQ ID NO: 8, 11, 13 ja 15, HVR-L1 sisaldab aminohapete järjestusi, mis on valitud järjestuste SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 ja 23 seast, kus mistahes järjestus järjestustest SEQ ID NOS: 9-10 või 19-23 võib sisaldada N30A või N30Q aminohappeasendust, HVR-L2 sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 12 ja HVR-L3 sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 14. Nende antikehade ühe näitena sisaldab raske ahela varieeruv domeen järjestust SEQ ID NO: 16 ja kerge ahela varieeruv domeen sisaldab järjestust SEQ ID NO: 17 või 18.

**[0267]** Mõnes näites sisaldab CD22-vastane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab aminohapete järjestust, millel on vähemalt 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% või 99% suurune järjestustevaheline identsus aminohapete järjestusega SEQ ID NO: 16. Mõnes näites sisaldab aminohapete järjestust, millel on vähemalt 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% või 99% suurune järjestustevaheline identsus, referentsjärjestusega võrreldes asendusi, insertioone või deletsioone, kuid seda aminohapete järjestust sisaldav antikeha säilitab CD22 sidumise võime. Mõnes näites on järjestuses SEQ ID NO: 16 kokku 1 kuni 10 aminohapet asendatud, inserteeritud või deleteeritud. Mõnes näites esinevad asendused, insertioonid või deletsioonid piirkondades, mis on väljaspool HVR-e (st FR-des). Mõnes näites sisaldab CD22-vastane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 16.

**[0268]** Mõnes näites esitab leiutis CD22-vastase antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, nagu see on esitatud allpool.

I Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro  
Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
 Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe  
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 113 (SEQ ID NO:16)

(HVR jäägid on alla joonitud).

[0269] Mõnes näites sisaldavad raske ahela HVR ja FR järjestused järgnevat:

HVR-H1 (Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn, SEQ ID NO: 2)

HVR-H2 (Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly, SEQ ID NO: 4)

HVR-H3 (Asp Gly Ser Ser Trp Asp Tyr Phe Asp Val, SEQ ID NO: 6)

FR-H1 (Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg  
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser, SEQ ID NO:1)

FR-H2 (Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val, SEQ ID NO: 3)

~~FR-H3 (Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser  
 Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg, SEQ ID NO:5)~~

FR-H4 (Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser, SEQ ID NO: 7)

[0270] Mõnes näites esitab leiutis CD22-vastase antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvate domeeni, nagu see on esitatud allpool.

I Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn  
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

108 (SEQ ID NO:17)

(HVR jäägid on alla joonitud ja asend N28 on rasvases trükis)  
või

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val  
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser  
Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
108 (SEQ ID NO:18)

(HVR HVR jäägid on alla joonitud ja asend N28 on rasvases trükis)

[0271] Mõnes näites sisaldavad kerge ahela HVR järjestused järgnevat:

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:9)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 10)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 19)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 20)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 21)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 22)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:23)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:32)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:33)

HVR-L2 (Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser, SEQ ID NO: 12)

HVR-L3 (Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr, SEQ ID NO: 14).

[0272] Mõnes näites sisaldavad kerge ahela FR järjestused järgnevat:

FR-L1 (Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys, SEQ ID NO:8);

FR-L2 (Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr, SEQ ID NO:11);

FR-L3 (Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys, SEQ ID NO:13)

FR-L4 (Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys SEQ ID NO: 15).

**[0273]** Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab aminohapete järjestust, millel on vähemalt 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% või 99% suurune järjestuse identsus aminohapete järjestusega, mis on valitud järjestustest SEQ ID NO: 17 või 18. Mõnes näites sisaldab aminohapete järjestus, millel on referentsjärjestusega võrreldes vähemalt 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% või 99% suurune järjestuse identsus, asendusi, insertioone või deletsioone, kuid seda aminohapete järjestust sisaldav antikeha säilitab CD22 sidumise võime. Mõnes näites on järjestustes SEQ ID NO: 17 või 18 kokku 1 kuni 10 aminohapet asendatud, inserteeritud või deleteeritud. Mõnes näites esinevad asendused, insertioonid või deletsioonid piirkondades, mis on väljaspool HVR-e (st FR-des). Mõnes näites sisaldab CD22-vastane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 17 või 18.

**[0277]** Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab (a) raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab aminohapete järjestust, millel on vähemalt 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% või 99% suurune järjestuse identsus aminohapete järjestusega, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 16, ja (b) kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab aminohapete järjestust, millel on vähemalt 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% või 99% suurune järjestuse identsus aminohapete järjestusega, mis on valitud järjestustest SEQ ID NO: 17 või 18. Mõnes näites sisaldab aminohapete järjestus, millel on referentsjärjestusega võrreldes vähemalt 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% või 99% suurune järjestuse identsus, asendusi, insertioone või deletsioone, kuid seda aminohapete järjestust sisaldav antikeha säilitab CD22 sidumise võime. Mõnes näites on referentsjärjestuses kokku 1 kuni 10 aminohapet asendatud, inserteeritud või deleteeritud. Mõnes

näites esinevad asendused, insertsioonid või deletsioonid piirkondades, mis on väljaspool HVR-e (st FR-des). Mõnes näites sisaldab CD22-vastane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab aminohapete järjestust SEQ ID NO: 16, ja kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab aminohapete järjestust, mis on valitud järjestusest SEQ ID NO: 18.

**[0275]** Siin on kirjeldatud CD22-vastast antikeha, mis sisaldab (a) ühte, kahte või kolme VH HVR-i, mis on valitud joonisel 2A esitatute seast, ja/või (b) ühte, kahte või kolme VL HVR-i, mis on valitud joonisel 2B esitatute seast, ja CD22-vastast antikeha, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mis on valitud joonisel 2A esitatute seast, ja kerge ahela varieeruvat domeeni, mis on valitud joonisel 2B esitatute seast.

**[0276]** Nagu siin on kirjeldatud, võib CD22-vastane antikeha sisaldada 1, 2, 3, 4, 5 või 6 hüpervarieeruvat piirkonda antikehast 5E8.1.8, mida toodab ATCC-sse säilikuna nr PTA-7620 deponeeritud hübriidoom.

## 2. Antikeha fragmendid

**[0277]** Käesolev leiutis hõlmab ka antikeha fragmente. Antikeha fragmente võib valmistada traditsioonilisel viisil, nagu ensüümiga lõikamine või rekombinantsed meetodid. Teatud asjaoludel on eeliseid pigem antikeha fragmentide kui terviklike antikehade kasutamisel. Fragmentide väiksemad mõõtmed võimaldavad nende kiiremat eemaldamist organismist ja annavad parema ligipääsu tahketele kasvajatele. Ülevaateks antikeha teatud fragmentide kohta vaadake trükist Hudson et al., (2003) Nat. Med., 9: 129-134.

**[0278]** Antikeha fragmentide tootmiseks on välja töötatud mitmesuguseid meetodeid. Traditsiooniliselt saadakse need fragmendid intaktsete antikehade proteolüütilise lõikamise teel (vaadake nt trükiseid Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24: 107-117 (1992) ja Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)). Siiski, tänapäeval võivad rekombinantsed peremeesrakud neid fragmente otse toota. Antikeha Fab, Fv ja scFv fragmente võib ekspresseerida ja sekreteerida *E. coli* rakkudest, võimaldades seega nende fragmentide suurte koguste hõlpsat tootmist. Antikeha fragmente võib eraldada faagi antikehakogudest, mida on kirjeldatud eespool. Alternatiivselt võib Fab'-SH fragmente koguda otseselt *E. coli*'st ning keemiliselt kokku siduda, et moodustada F(ab')<sub>2</sub> fragmente (Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)). Vastavalt veel ühele lähenemisele võib F(ab')<sub>2</sub> fragmente eraldada vahetult rekombinantse peremeesraku kultuurist. Fab ja F(ab')<sub>2</sub> fragmenti, millel on suure-

nenud poolväärtusaeg *in vivo* ja mis sisaldavad päästeretseptoriga (*salvage receptor*) seonduvat epitoopi, on kirjeldatud US patendipublikatsioonis nr 5869046. Muud meetodid antikeha fragmentide tootmiseks on erialal praktiseerijale ilmsed. Teatud teostustes on antikeha üheaahelaline Fv fragment (scFv), vaadake US patendipublikatsioone WO 93/16185, 5571894 ja 5587458. Fv ja sFv on ainsad intaktsete kombineeruvate saititega antikeha fragmendid, millel puuduvad konstantsed piirkonnad ning mis seega võivad olla sobivad mittespetsiifilise sidumise vähendamiseks *in vivo* kasutamisel. Võib konstrueerida ka scFv liitvalke, ühendades efektorvalgu kas scFv amino- või karboksüterminusega, vaadake trükist Antibody Engineering, toim. Borrebaeck, *supra*. Antikeha fragment võib olla ka „lineaarne antikeha“, nagu on kirjeldatud näiteks US patendipublikatsioonis 5641870. Sellised lineaarsed antikehad võivad olla monospetsiifilised või bispetsiifilised.

### 3. Humaniseeritud antikehad

[0279] Leiutis hõlmab humaniseeritud antikehi. Tehnika tasemes on tuntud erinevad meetodid inimesest erinevast liigist (mitte-inimesest) pärinevate antikehade humaniseerimiseks. Näiteks võib humaniseeritud antikehas olla üks või enam aminohappejääki, mis pärinevad mitte-inimesest. Need aminohappejäägid, mis ei pärine inimesest, on sageli tähistatud kui „importjäägid“, mis üldjuhul võetakse varieeruvast „import“-domeenist. Humaniseerimist võib põhiliselt teostada Winteri ja kaastöötajate (Jones et al., (1986) Nature, 321: 522-525, Riechmann et al., (1988) Nature, 332: 323-327, Verhoeyen et al., (1988) Science, 239: 1534-1536) meetodil, asendades hüpervarieeruva piirkonna järjestused inimese antikeha vastavate järjestustega. Seega on sellised „humaniseeritud“ antikehad kimäärsed antikehad (US patendipublikatsioon 4816576), milles praktiliselt vähem kui pool inimese intaktsest varieeruvast domeenist on asendatud vastava mitte-inimese järjestusega. Praktikas on humaniseeritud antikehad üldjuhul inimese antikehad, milles mõned hüpervarieeruva piirkonna jäägid ja võimalik, et mõned FR-i jäägid, on asendatud näriliste antikehade analoogsetest saitidest pärinevate jääkidega.

[0280] Antigeensuse vähendamisel võib oluliseks osutada humaniseeritud antikehade valmistamiseks kasutatavate inimese varieeruvate domeenide valik, seda nii kerge kui raske ahela puhul. Vastavalt niinimetatud „parima sobitumise“ meetodile skriinitakse närilise antikeha varieeruva domeeni järjestust inimese tuntud varieeruvate domeenide järjestuste

täieliku kogu vastu. Seejärel loetakse hiire järjestusele kõige sarnasem inimese järjestus inimese raamistikuks humaniseeritud antikehas (Sims et al., (1993) J. Immunol., 151: 2296, Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol., 196: 901). Veel ühe meetodi kohaselt kasutatakse konkreetset raamistikku, mis tuletatakse kõikide antud alamrühma kuuluvate inimese antikehade kergete või raskete ahelate konsensusjärjestusest. Sama raamistikku võib kasutada mitme erineva humaniseeritud antikeha jaoks (Carter et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285, Presta et al., (1993) J. Immunol., 151: 2623).

**[0281]** Lisaks on oluline, et antikehad humaniseeritakse nii, et säilib kõrge afiinsus antigeeni suhtes ja teised kasulikud bioloogilised omadused. Selle eesmärgi saavutamiseks valmistatakse ühe meetodi kohaselt humaniseeritud antikehad pärast lähtejärjestuste ja mitmete kontseptuaalsete humaniseeritud produktide analüüsi protsessi, kus kasutatakse lähte- ja humaniseeritud järjestuste kolmedimensionaalseid mudeleid. Immunoglobuliini kolmedimensionaalsed mudelid on üldkättesaadavad ja eriala asjatundjale tuntud. Olemas on arvuti-programmid, mille abil saab illustreerida ja esitada võimalikke kolmedimensionaalseid konformatsioonilisi struktuure, mille moodustavad valitud immunoglobuliini kandidaatjärjestused. Selliste esitluste uurimine võimaldab analüüsida jääkide võimalikku rolli immunoglobuliini kandidaatjärjestuse funktsioneerimises, st nende jääkide analüüsi, mis mõjutavad kandidaatimmunoglobuliini võimet seonduda oma antigeeniga. Sel viisil saab FR jäägid valida ja kombineerida need retsipient- ja importjärjestustest nii, et saavutatakse antikeha soovitud karakteristikud nagu suurenenud afiinsus sihtmärkantigeeni(de) suhtes. Üldjuhul on vahetult ja kõige olulisemalt antigeeni seondumise mõjutamisega seotud hüpervarieeruva piirkonna jäägid.

#### *4. Inimese antikehad*

**[0282]** Inimese CD22-vastaseid antikehasid võib konstrueerida, kombineerides Fv klooni varieeruva domeeni järjestust (järjestusi), mis on valitud inimesest saadud faagidisplei kogudest, inimese tuntud konstantse domeeni järjestusega (järjestustega), nagu eespool kirjeldati. Alternatiivselt võib leiutisekohaseid inimese monokloonseid CD22-vastaseid antikehasid valmistada hübriidomeetodi abil. On kirjeldatud inimese müeloomi ja hiire-inimese heteromüeloomi rakuliine, mis sobivad inimese monokloonsete antikehade valmistamiseks, näiteks trükistes Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984), Brodeur et al., Monoclonal

Antibody Production Techniques and Applications, lk. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) ja Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).

[0283] Nüüd on võimalik valmistada transgeenseid loomi (nt hiiri), mis pärast immuni-seerimist on endogeense immunoglobuliinootmise puududes võimelised tootma inimese antikehade täielikku valimit. Nii näiteks on kirjeldatud, et antikeha raske ahela ühineva piirkonna (JH) geeni homosügootne deletsioon kimäärsetes ja iduteeliini mutantsetes hiirtes viib endogeense antikehatootmise täielikule inhibeerimisele. Inimese iduteeliini immunoglobuliini geenide kogumi ülekandmine sellisesse iduteeliini mutantsetesse hiirsesse annab antigeeni poolt indutseeritava inimese antikehade produtseerimise hiires. Vaadake näiteks trükiseid Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993), Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993), Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993).

[0284] Selliste inimese antikehade saamiseks mitte-inimese, näiteks närilise antikehadest, kus inimese antikehal on samasugused aafiinsused ja spetsiifilisused kui mitte-inimese lähteantikehal, võib kasutada geenijärjestuse ümberkorraldamist (*gene shuffling*). Selle meetodi, mida nimetatakse ka „epitoobi imprintimiseks“, kohaselt asendatakse eespool kirjeldatud faagidisplei tehnikate abil saadud mitte-inimese antikeha fragmendi raske või kerge ahela varieeruv piirkond inimese V domeeni geenide valimiga, luues sellega populatsiooni mitte-inimese ahela / inimese ahela scFv või Fab kimääridest. Selektioon antigeeniga võimaldab eraldada mitte-inimese ahela / inimese ahela kimäärsed scFv või Fab fragmendid, kus inimese ahel taastab antigeeni seondumissaidi, mille hävitas vastava mitte-inimese ahela eemaldamine faagidisplei primaarses kloonis, st epitoop juhib (imprindib) inimese ahela partneri valikul. Kui protsessi korratakse selleks, et eemaldada allesjäänud mitte-inimese ahel, siis saadakse inimese antikeha (vaadake patendipublikatsiooni PCT WO 93/06213, avaldatud 1. aprillil 1993). Erinevalt traditsioonilisest mitte-inimese antikehade humaniseerimisest CDR-siirdamise teel annab see tehnika täielikult inimese antikehad, milles ei ole mitte-inimese päritoluga FR või CDR jääke.

#### *Bispetsiifilised antikehad*

[0285] Bispetsiifilised antikehad on monokloonsed, eelistatult inimese või humaniseeritud antikehad, millel on seondumise spetsiifilisus vahemalt kahe erineva antigeeni suhtes. Teatud näidetes on bispetsiifilised antikehad inimese või humaniseeritud antikehad. Teatud näidetes



on üks seondumise spetsiifilisus CD22 jaoks ja teine mistehes muu antigeeni jaoks. Teatud näidetes võivad mõned bispetsiifilised antikehad seonduda CD22 kahe erineva epitoobiga. Bispetsiifilisi antikehi võib kasutada ka tsütotoksiliste ainete lokaliseerimiseks CD22 ekspresseerivatel rakkudel. Sellistel antikehadel on üks õlg, mis seob CD22-e, ja teine õlg, mis seob tsütotoksilise aine, näiteks saporini, anti-interferooni- $\alpha$ , vinka alkaloidi, ritsiini A-ahela, metotreksaadi või radioaktiivse isotoobiga märgistatud hapteni. Selliseid antikehi võib saada täispikkade antikehade või antikehafragmentidena (nt  $F(ab')_2$ -bispetsiifilised antikehadena).

**[0286]** Bispetsiifiliste antikehade valmistamise meetodid on tehnika tasemes tuntud. Bispetsiifiliste antikehade valmistamine põhineb traditsiooniliselt kahe immunoglobuliini raske ja kerge ahela paari koekspressioonil, kusjuures nendel kahel ahelal on erinev spetsiifilisus (Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Immunoglobuliinide raskete ja kergete ahelate juhusliku valimise tõttu tekitavad need hübriidoomid (kvadroomid) 10 erineva antikehamolekuli võimaliku segu, millest ainult ühel on korrektne bispetsiifiline struktuur. Korrektse molekuli puhastamine, mis viiakse tavaliselt läbi affiinsuskromatograafia etappide abil, on üsna vaevaline ja produktide saagised on madalad. Sarnaseid meetodeid on kirjeldatud patendipublikatsioonis WO 93/08829 ja trükises Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

**[0287]** Eelnevast erineva meetodi kohaselt liidetakse soovitud seondumisspetsiifilisusega antikeha varieeruvad domeenid (antikeha-antigeeni sidumise saidid) immunoglobuliini konstantse domeeni järjestustega. Eelistatult liidetakse immunoglobuliini raske ahela konstantse domeeniga, mis sisaldab vähemalt osa liigendi, CH<sub>2</sub>- ja CH<sub>3</sub>-piirkondi. Eelistatakse, et vähemalt ühel liitmisel osaleks esimese raske ahela konstantne piirkond (CH<sub>1</sub>), mis sisaldab kerge ahela sidumiseks vajalikku saiti. Immunoglobuliini raske ahela liitvalke ja soovi korral immunoglobuliini kerget ahelat kodeerivad DNA-d sisestatakse eraldi ekspressioonivektoritesse ja kotransfekteeritakse sobivasse peremeesorganismi. See tagab suure paindlikkuse kolme polüpeptiidfragmendi vastastikuste proportsioonide reguleerimisel neis teostustes, kus optimaalseid saagiseid tagavaks konstrueerimiseks kasutatakse kolme polüpeptiidahelat ebavõrdses vahekorras. Kahte või kõiki kolme polüpeptiidahelat kodeerivad järjestused võib siiski sisestada ühte ekspressioonivektorisse, kui vähemalt kahe polüpeptiidahela võrdses vahekorras ekspresseerimise tulemusel saadakse kõrged saagised või kui suhtel ei ole erilist tähtsust.

**[0288]** Selle meetodi näitena luuakse bispetsiifilised antikehad hübriidse immunoglobuliini raskest ahelast, mis tagab esimese seondumisspetsiifilisuse ühes õlas, ja hübriidse antikeha raske ahela ja kerge ahela paarist (mis tagab teise seondumisspetsiifilisuse) teises õlas. Leiti, et see asümmeetriline struktuur hõlbustab soovitud bispetsiifilise ühendi eraldamist soovimatutest immunoglobuliiniahela kombinatsioonidest, kuna immunoglobuliini kerge ahela olemasolu ainult bispetsiifilise molekuli ühes pooles tagab kerge puhastamise. See meetod on avaldatud patendipublikatsioonis WO 94/04690. Bispetsiifiliste antikehade valmistamise kohta vaadake üksikasjalikumalt näiteks trükisest Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

**[0289]** Veel ühe meetodi kohaselt võib tekitada antikehamolekulide paari vahelise piirpinna, et maksimeerida rekombinantsest rakukultuurist saadavate heterodimeeride osakaalu. Eelistatult sisaldab piirpind vähemalt osa antikeha konstantse domeeni CH3-piirkonnast. Selle meetodi kasutamisel asendatakse esimese antikehamolekuli piirpinna aminohappe üks või enam väikest külghelat suuremate külghelatega (nt türosiini või trüptofaaniga). Teise antikehamolekuli piirpinnas luuakse suur(t)e külghela(te)ga identse või sarnase suurusega kompenseerivad "tühikud" aminohappe suurte külghelate asendamise teel väiksematega (ntalaniini või treoniiniga). See loob mehhanismi heterodimeeri saagise suurendamiseks soovimatute lõpp-produktide nagu homodimeerid arvelt.

**[0290]** Bispetsiifilised antikehad hõlmavad ka ristseotud või "heterokonjugeeritud" antikehi. Heterokonjugaadis võib näiteks üks antikehadest olla seotud avidiini, teine biotiiniga. Eeldatakse, et sellised antikehad suunavad immuunsüsteemi rakud soovimatute rakkude vastu (US patendipublikatsioon 4676980) ja HIV-nakkuse raviks (US patendipublikatsioonid WO 91/00360 ja WO 92/200373 ja Euroopa patendipublikatsioon 0308936). Heterokonjugeerunud antikehi võib valmistada mistahes sobivate ristsidumise meetodite kasutamise teel. Sobivad ristsiduvad ained on tehnika tasemes hästi tuntud ja avaldatud US patendipublikatsioonis 4676980 koos mõnede ristsidumise meetoditega.

**[0291]** Kirjanduses on kirjeldatud ka meetodeid bispetsiifiliste antikehade valmistamiseks antikeha fragmentidest. Bispetsiifilisi antikehi võib näiteks valmistada keemilise sidumise abil. Brennan et al. (*Science*, 229: 81 (1985)) kirjeldavad meetodit, milles F(ab')<sub>2</sub> fragmentide valmistamiseks lõigatakse intaktsed antikehad proteolüütiliselt. Need fragmendid redutseeritakse ditiooli komplekseeriva aine naatriumarseniidi manulusel naaberditioolide stabiliseerimiseks ja molekulidevaheliste disulfiidide moodustumise vältimiseks. Tekitatud Fab' frag-

mendid muudetakse seejärel tionitrobensoaatderivaatideks (TNB-derivaatideks). Bispetsiifilise antikeha moodustamiseks muudetakse järgnevalt üks Fab'-TNB derivaatidest merkaptotüülamiiniga redutseerides Fab'-tiooliks ning segatakse see seejärel teise Fab'-TNB derivaadiga. Valmistatud bispetsiifilise antikehi võib kasutada ensüümide selektiivseks immobiliseerimiseks.

**[0292]** Hiljutine areng võimaldab Fab'-SH fragmentide vahetut saamist *E. coli*'st ja võimaldab neid bispetsiifiliste antikehade moodustamiseks keemiliselt siduda. Shalaby et al. (J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)) kirjeldavad täielikult humaniseeritud bispetsiifilise antikeha F(ab')<sub>2</sub>-molekulide valmistamist. Iga Fab' fragment sekreteeriti *E. coli*'st eraldi ja seoti keemiliselt *in vitro* bispetsiifilise antikeha moodustamiseks. Selliselt moodustatud bispetsiifiline antikeha oli võimeline seonduma HER2-retseptorit üleekspressseerivate rakkude ja inimese normaalste T-rakkudega, samuti vallandama inimese tsütotoksiliste lümfotsüütide lüütilise aktiivsuse inimese rinnanäärme kasvaja sihtmärkide vastu.

**[0293]** Samuti on kirjeldatud erinevaid bispetsiifiliste antikehafragmentide valmistamise ja eraldamise meetodeid otse rekombinantsest rakukultuurist. Bispetsiifilise heterodimeere on näiteks valmistatud leutsiini "tõmbluku" abil (Kostelny et al., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)). Leutsiini tõmblukk-peptiidid Fos- ja Jun-valkudest seoti geenide liitmise teel kahe erineva antikeha Fab'-osadega. Monomeeride tekkimiseks redutseeriti antikeha homodimeere liigendpiirkonnas ning seejärel reoksüdeeriti antikeha heterodimeeride moodustamiseks. Seda meetodit saab kasutada ka antikeha homodimeeride moodustamiseks. Alternatiivse mehhanismi bispetsiifiliste antikehafragmentide valmistamiseks on pakunud Hollinger et al. kirjeldatud "diakehade" tehnoloogia (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)). Fragmentid sisaldavad raske ahela varieeruvat domeeni (VH-d), mis on seotud kerge ahela varieeruva domeeniga (VL-ga) linkeri abil, mis on liialt lühike, võimaldamaks kahe domeeni vahelist paardumist samal ahelal. Seega sunnitakse ühe fragmendi VH- ja VL-domeenid paarduma teise fragmendi komplementaarsete VL- ja VH-domeenidega, seeläbi moodustatakse kaks antigeeni siduvat saiti. On esitatud ka teine bispetsiifiliste antikehafragmentide valmistamise strateegia, kus kasutatakse üheaheelalisi Fv(sFv) dimeere. Vaadake trükist Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994).

**[0294]** Peetakse võimalikuks ka enam kui kahe valentsiga antikehi. Näiteks võib valmistada trispetsiifilise antikehi (Tutt et al., J. Immunol., 147: 60 (1991)).

## 6. Multivalentset antikehad

[0295] Seda antigeeni ekspresseeriv rakk, millega antikeha seondub, võib multivalentse antikeha internaliseerida (ja/või kataboliseerida) kiiremini kui kahevalentse antikeha. Leiutisekohased antikehad võivad olla kolme või enama antigeeni sidumissaidiga (nagu tetra-valentsed antikehad) multivalentset antikehad (mis on IgM klassist erinevad), mida saab kergesti toota antikeha polüpeptiidahelaid kodeeriva nukleiinhappe rekombinantse ekspresiooni abil. Multivalentne antikeha võib sisaldada dimeriseerumisdomeeni ja kolme või enam antigeeni sidumissaiti. Eelistatud dimeriseerumisdomeen sisaldab Fc-piirkonda või liigendpiirkonda (või koosneb sellest). Selle stsenaariumi puhul sisaldab antikeha Fc-piirkonda ja kolme või enam antigeeni sidumissaiti Fc-piirkonnast aminotermi suunas. Teatud näidetes sisaldab multivalentne antikeha kolme kuni ligikaudu kaheksat, aga eelistatult nelja antigeeni sidumise saiti (või koosneb nendest). Multivalentne antikeha sisaldab vähemalt ühte polüpeptiidahelat (näiteks kahte polüpeptiidahelat), kus polüpeptiidahel(ad) sisaldab (sisaldavad) kahte või enam varieeruvat domeeni. Näiteks võib (võivad) polüpeptiidahel(ad) sisaldada VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, kus VD1 on esimene varieeruv domeen, VD2 on teine varieeruv domeen, Fc on Fc-piirkonna üks polüpeptiidahel, X1 ja X2 tähendavad aminohapet või polüpeptiidi ning n on 0 või 1. Näiteks võib (võivad) polüpeptiidahel(ad) sisaldada VHCH1- paindliku linkerit - VH-CH1-Fc-piirkonna ahelat või VH-CH1-VH-CH1-Fc-piirkonna ahelat. Lisaks sisaldab siin eelistatud multivalentne antikeha täiendavalt vähemalt kahte (eelistatult nelja) kerge ahela varieeruva domeeni polüpeptiidi. Multivalentne antikeha võib siin sisaldada näiteks ligikaudu kahte kuni ligikaudu kaheksat kerge ahela varieeruva domeeni polüpeptiidi. Siin vaadeldavad kerge ahela varieeruva domeeni polüpeptiidid sisaldavad kerge ahela varieeruvat domeeni ning vajadusel täiendavalt CL-domeeni.

## 7. Ühe domeeniga antikehad

[0296] Antikeha võib olla ühe domeeniga antikeha. Ühe domeeniga antikeha on üks polüpeptiidahel, mis sisaldab kõike või osa raske ahela varieeruvast domeenist või kõike või osa kerge ahela varieeruvast domeenist. Teatud näidetes on ühe domeeniga antikeha inimese ühe domeeniga antikeha (Domantis, Inc., Waltham, MA, vaadake nt US patendipublikatsiooni

6248516 B1). Ühe näitena võib ühe domeeniga antikeha koosneda antikeha raske ahela kogu varieeruvast domeenist või selle osast.

#### 8. Antikehade variandid

**[0297]** Mõnes näites esinevad siin kirjeldatud antikehade aminohapete järjestuse modifikatsioon(id). Näiteks võib olla soovitatav parendada antikeha sidumisafiinsust ja/või teisi bioloogilisi omadusi. Antikeha aminohapete järjestuse variandid valmistatakse sobivate nukleotiidimuutuste sisseviimise abil antikeha nukleiinhappesse või siis peptiidsünteesi abil. Selliste modifikatsioonide hulka kuuluvad näiteks antikeha aminohapete järjestuse jääkide deletsioonid ja/või insertioonid ja/või asendused. Lõppkonstrukti saamiseks võib teha igasuguseid deletsioonide, insertioonide ja asenduste kombinatsioone eeldusel, et lõppkonstruktil on soovitud omadused. Aminohappemuutused võib käsitletava antikeha aminohapete järjestusse sisestada ka järjestuse valmimise ajal.

**[0298]** Kasulikku meetodit antikeha nende konkreetsete jääkide või piirkondade identifitseerimiseks, mis on eelistatud mutageneesikohad, nimetatakse „skaneerivaks alaniinmutageneesiks“, nagu on kirjeldanud Cunningham ja Wells (Science, 244: 1081-1085 (1989)). Siin identifitseeritakse sihtmärgiks olev jääk või jääkide rühm (näiteks laenguga aminohapped, nagu Arg, Asp, His, Lys ja Glu) ja asendatakse need neutraalse või negatiivse laenguga aminohappes (kõige eelistatumalt alaniini või polüalaniiniga), et mõjutada aminohapete interaktsiooni antigeeniga. Neid aminohapete asukohti, millel on funktsionaalne tundlikkus asenduste suhtes, parendatakse täiendavate või teiste variantide sisseviimisega asendussaitidesse või nende asemele. Seega, kui aminohapete järjestuse variandi sisseviimise sait on ette määratud, siis mutatsiooni loomus iseenesest ei pea olema ette määratud. Näiteks mutatsiooni toimimise analüüsimiseks antud saidis viiakse läbi sihtmärgiks oleva koodoni või piirkonna skaneerimine alaniiniga või juhuslik mutagenees ning skriinitakse ekspresseeritud immunoglobuliine soovitud aktiivsuse suhtes.

**[0299]** Aminohapete järjestuse insertioonide hulka kuuluvad amino- ja/või karboksüterminaalsed liitmised, mille pikkus ulatub ühest jäägist polüpeptiidideni, mis sisaldavad sadat või enamat jääki, samuti ühe või mitme aminohappejäägi järjestusesisesed insertioonid. Terminaalsete insertioonide näidete hulka kuulub N-terminaalse metionüüljäägiga antikeha. Teiste antikehamolekulide insertioonivariantide hulka kuuluvad antikeha N- või C-termi-

nuse liitmine ensüümi (näiteks ADEPT-iga) või polüpeptiidiga, mis suurendab antikeha poolväärtusaega seerumis.

**[0300]** Teatud juhtudel muudetakse antikeha selleks, et suurendada või vähendada antikeha glükosüülituse taset. Polüpeptiidide glükosüülimine on tavaliselt kas N-seoseline või O-seoseline. N-seoseline glükosüülimine tähendab süsivesikuosa ühendamist asparagiinijäägi külghelaga. Süsivesikuosa asparagiini külghelaga ensümaatilise ühendamise äratundmisjärjestused on tripeptiidjärjestused asparagiin-X-seriin ja asparagiin-X-treoniin, kus X on mistahes aminohape, välja arvatud proliin. Seega loob ükskõik kumba tripeptiidjärjestuse esinemine polüpeptiidis potentsiaalse glükosüülimissaidi. O-seoseline glükosüülimine tähendab ühe suhkrutest, N-atsetüülgalaktoosamiini, galaktoosi või ksüloosi, ühendamist hüdroksüamino- happega, enamasti seriini või treoniiniga, ehkki võib kasutada ka 5-hüdroksüproliini või 5-hüdroksülüsiini.

**[0301]** Glükosüülimissaitide lisamine antikehale või nende eemaldamine antikehalt toimub tavaliselt aminohapete järjestuse muutmise teel nii, et üks või enam eespool nimetatud tripeptiididest (N-seoseliste glükosüülimissaitide puhul) kas tekib või kaob. Muudatuse võib teha ka lähteantikeha järjestusele ühe või enama seriini- või treoniinijäägi lisamise, deleteerimise või sellega (nendega) asendamise abil (O-seoseliste glükosüülimissaitide puhul).

**[0302]** Kui antikeha sisaldab Fc-piirkonda, võib sellega seotud süsivesikut muuta. Näiteks on US patendipublikatsioonis 2003/0157108 (Presta, L.) kirjeldatud antikehi, mille Fc-piirkonnaga on seotud küps süsivesikustruktuur, milles puudub fukoos. Vaadake ka US patendipublikatsiooni 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Antikehi, mille Fc-piirkonnaga seotud süsivesikustruktuuris on poolitav N-atsetüülgalakoosamiin (GlcNAc), kirjeldatakse patendipublikatsioonides WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.) ja US 6602684 (Umana et al.). Antikehi, mis on süsivesikustruktuuris vähemalt ühe galaktoosijäägi kaudu seotud Fc-piirkonnaga, esitletakse patendipublikatsioonis WO 1997/30087 (Patel et al.). Vaadake samuti patendipublikatsioone WO 1998/58964 (Raju, S.) ja WO 1999/22764 (Raju, S.), kus käsitletakse Fc-piirkonnaga seotud muudetud süsivesikustruktuuriga antikehi. Vaadake ka US patendipublikatsiooni 2005/0123546 (Umana et al.), kus käsitletakse modifitseeritud glükosüülimisega antigeeni siduvaid molekule.

**[0303]** Teatud näidetes sisaldab glükosüülimise variant Fc-piirkonda, kus Fc-piirkonnaga seotud süsivesikustruktuuris puudub fukoos. Sellised variandid on parendanud ADCC funktsiooni. Vajadusel sisaldab Fc-piirkond lisaks veel ühte või enam aminohapete asendust, mis

täiendavalt parendavad ADCC funktsiooni, näiteks asendused Fc-piirkonna asendites 298, 333 ja/või 334 (jäakide EU numeratsioon). “Defukosüülitud” või “fukoosivabade” antikehadega seotud näiteid kirjeldatakse US patendipublikatsioonis 2003/0157108, WO 2000/61739, WO 2001/29246, 2003/0115614, 2002/0164328, 2004/0093621, 2004/0132140, US 2004/0110704, 2004/0110282, 2004/0109865, WO 2003/085119, WO 2003/084570, WO 2005/035586, WO 2005/035778, WO2005/053742 ja trükistes Okazaki et al., J. Mol. Biol., 336: 1239-1249 (2004), Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., 87: 614 (2004). Defukosüülitud antikehi tootvate rakuliinide näidete hulka kuuluvad Lec13 CHO rakud, mis on defektsed valgu fukosüülimise suhtes (Ripka et al., Arch Biochem. Biophys., 249: 533-545 (1986), US patendipublikatsioon 2003/0157108 A1 (Presta, L) ja WO 2004/056312 A1 (Adams et al.), eriti näide 11 ja *knockout* rakuliinid nagu alfa-1,6-fukosüültransferaasi geeni *FUT8 knockout* CHO rakud (Yamane-Ohnuki et al., Biotech Bioeng., 87: 614 (2004)).

**[0304]** Ühes teostuses on antikeha muudetud, et suurendada selle poolväärtusaega seerumis. Antikeha poolväärtusaja suurendamiseks seerumis võib antikeha (eriti antikeha fragmendi) koosseisu liita päästeretseptoriga seonduva epitoobi, nagu näiteks on kirjeldatud US patendipublikatsioonis 5739277. Siin kasutatuna tähistab termin „päästeretseptoriga seonduv epitoop“ IgG molekuli (nt IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, või IgG<sub>4</sub>) Fc-piirkonna epitoopi, mis vastutab IgG molekuli poolväärtusaja suurenemise eest seerumis *in vivo* (US patendipublikatsioonid 2003/0190311, 6821505, 6165745, 5624821, 5648260, 6165745, 5834597).

**[0305]** Lisaks on üheks antikeha tüübiks aminohappe asendusega variant. Neis variantides on vähemalt üks aminohappejäak antikehamolekulis asendatud erineva aminohappega. Asendusliku mutageneesi saitidest on suurimat huvi pakkuvateks hüpervarieeruvad piirkonnad, kuid ka muudatusi FR-s on kaalutletud. Tabelis 1 on pealkirja „Eelistatud asendused“ all toodud konservatiivsed asendused. Kui sellised asendused viivad soovitud muutusteni bioloogilises aktiivsuses, võib sisse viia olulisemaid muutusi, mis on tabelis tähistatud kui „Näitlikud asendused“, mida allpool on kirjeldatud viitega aminohapete klassidele, ning neidprodukte skriinida.

TABEL 1

Algne jääk	Näitlikud asendused	Eelistatud asendused
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val

Algne jääk	Näitlikud asendused	Eelistatud asendused
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleutsiin	Leu
Leu (L)	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleutsiin	Leu

**[0306]** Olulised antikeha bioloogiliste omaduste muutused kaasnevad selliste asenduste valimisega, mis erinevad tugevalt oma mõju poolest säilitada (a) polüpeptiidi selgroo struktuuri asenduse piirkonnas, näiteks lehe või heeliksi konformatsioonina, (b) molekuli laengut või hüdrofoobsust sihtmärksaidis või (c) külghelate mahtu. Aminohappeid võib jagada rühmadeks vastavalt külghelata sarnastele omadustele (vaadake A. L. Lehninger, Biochemistry, teine väljaanne, lk 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) mittepolaarsed: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) laenguta polaarsed: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) happelised: Asp (D), Glu (E)
- (4) aluselised: Lys (K), Arg (R), His(H)



**[0307]** Alternatiivselt võib looduslikke jääke jagada rühmadesse vastavalt nende külghelate sarnastele omadustele:

- (1) hüdrofoobsed: norleutsiin, Met, Ala, Val, Leu, Ile,
- (2) neutraalsed hüdrofiilsed: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln,
- (3) happelised: Asp, Glu,
- (4) aluselised: His, Lys, Arg,
- (5) jäägid, mis mõjutavad ahela orientatsiooni: Gly, Pro, ja
- (6) aromaatsed: Trp, Tyr, Phe.

**[0308]** Mittekonservatiivsed asendused nõuavad ühe klassi liikme asendust mõne teise klassi liikmega. Sellised asendatud jäägid võib sisse viia ka konservatiivsete asenduste saitidesse või ka ülejäänud (mittekonserveerunud) saitidesse.

**[0309]** Üks tüüp asendusvariante hõlmab lähteantikeha (nt humaniseeritud või inimese antikeha) ühe või enama hüpervarieeruva piirkonna jääkide asendamist. Üldiselt on edasiseks arendamiseks valitud lõppvariant (variandid) lähteantikehadega võrreldes muudetud (nt parendatud) bioloogiliste omadustega. Selliste asendusvariantide saamise sobiv tee hõlmab afiinsusküpsenist faagidisplay abil. Lühidalt, mitmed hüpervarieeruva piirkonna saidid (nt 6-7 saiti) muteeritakse, et saada kõik võimalikud aminohapete asendused igas saidis. Sel viisil saadud antikehad esitletakse niitja faagi partiklitelt kui liitvalgud vähemalt osaga faagi kattevalgust (st M13 geeni III produktiga), mis on pakitud igasse partiklisse. Faagi poolt esitletud variantide bioloogiline aktiivsus (nt seondumise aktiivsus) skriinitakse. Selleks, et identifitseerida hüpervarieeruva piirkonna modifitseerimise kandidaatsaidid, võib läbi viiaalaniin-skaneeriva mutageneesi, et kindlaks teha, millised hüpervarieeruva piirkonna jäägid osalevad olulistena antigeeni sidumisel. Alternatiivselt või lisaks eelnevale võib osutada kasulikuks antigeeni-antikeha kompleksi kristallstruktuuri uurimine, et identifitseerida kontaktpunktid antigeeni ja antikeha vahel. Sellised kontakteeruvad jäägid ja naaberjäägid on kandidaadid asenduste tegemiseks siin kirjeldatud tehnikate abil. Kui sellised variandid on loodud, siis allutatakse variantide paneel skriinimisele tehnika tasemes tuntud meetodite abil, kaasa arvatud siin kirjeldatud, ning edasiseks arendamiseks võib valida antikehad, millel on ühe või enama olulise testi tulemusena tuvastatud parendatud omadused.

[0310] Aminohapete järjestuste variante kodeerivaid nukleiinhappemolekule valmistatakse mitme erineva, tehnika tasemes tuntud meetodi kohaselt. Need meetodid hõlmavad, nendega piirdumata, looduslikust allikast eraldamist (looduslikult esinevate aminohapete järjestuste variantide puhul) või valmistamist oligonukleotiidi-vahendatud (või kohtspetsiifilise) mutageneesi, PCR mutageneesi ja kasset-mutageneesi teel antikeha varem valmistatud variandist või mittevariantsest versioonist.

[0311] Võib osutada soovitavaks sisestada antikehade Fc-piirkonda üks või enam aminohappe muutust, et seeläbi luua Fc-piirkonna variant. Fc-piirkonna variant võib sisaldada inimese Fc-piirkonna järjestust (nt inimese IgG1, IgG2, IgG3 või IgG4 Fc-piirkond), mis sisaldab aminohappe modifikatsiooni (nt asendust) ühes või enamas aminohapete asendis, kaasa arvatud linkeri tsüsteiinis.

[0312] Vastavuses siinse kirjelduse ja erialaste teadmistega võib leida, et mõnel juhul võiks antikeha sisaldada ühte või enam muutust võrreldes vastava metsiktüüpi antikehaga, näiteks Fc-piirkonnas. Sellised antikehad säilitaksid siiski olulisel määral samad terapeutilise kasulikkuse jaoks nõutavad karakteristikud, nagu on nende metsiktüüpi analoogidel. Näiteks arvatakse, et Fc-piirkonnas võib teha teatud muutusi, mis annaksid tulemuseks C1q-ga seondumise ja/või komplemendist sõltuva tsütotoksilisuse (CDC) muutumise (st kas suurenemise või vähenemise), näiteks nii, nagu on kirjeldatud patendipublikatsioonis WO 99/51642. Vaadake ka trükist Duncan & Winter, *Nature*, 322: 738-40 (1988) ja US patendipublikatsioone 5648260, 5624821 ja WO 94/29351, mis käsitlevad teisi näiteid Fc-piirkonna variantidest. Patendipublikatsioonides WO 00/42072 (Presta) ja WO 2004/056312 (Lowman) kirjeldatakse antikehavariante, millel on suurenenud või vähenenud seondumine FcR-dega. Nende patendipublikatsioonide sisu on spetsiifiliselt kaasatud käesolevasse viitena. Vaadake samuti trükist Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 9(2): 6591-6604 (2001). Antikehad, millel on pikenenud poolväärtusaeg ja parendatud seondumine neonataalse Fc-retseptoriga (FcRn), mis vastutab ema IgG-de transpordi eest lootele (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117: 587 (1976) ja Kim et al., *J. Immunol.*, 24: 249 (1994)), on kirjeldatud US patendipublikatsioonis 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Need antikehad sisaldavad Fc-piirkonda, milles on üks või enam asendust, mis parendavad Fc-piirkonna seondumist FcRn-ga. Polüpeptiidi variante muudetud Fc-piirkonna aminohapete järjestuse ja suurenenud või vähenenud võimega seonduda C1q-ga on kirjeldatud patendipublikatsioonides US 6194551B1 ja WO 99/51642. Vaadake ka trükist Idusogie et al., *J. Immunol.*, 164: 4178-4184 (2000).

**[0313]** Siin on kirjeldatud antikehasid, mis sisaldavad modifikatsioone Fc-polüpeptiidide piirpinnal, mis sisaldab Fc-piirkonda, kusjuures need modifikatsioonid soodustavad ja/või edendavad heterodimeriseerumist. Need modifikatsioonid hõlmavad väljaulatuva osa sisseviimist esimesesse Fc-polüpeptiidi ja süvendi sisseviimist teise Fc-polüpeptiidi, kusjuures väljaulatuv osa positsioneerub süvendisse ja soodustab selliselt esimese ja teise Fc-polüpeptiidi vahelise kompleksi moodustumist. Selliste modifikatsioonidega antikehade valmistamise meetodid on erialas tuntud, näiteks on neid kirjeldatud US patendipublikatsioonis 5731168.

### *9. Antikeha derivaadid*

**[0314]** Lisaks võib leitud kohasid antikehasid modifitseerida nii, et nad sisaldaksid täiendavaid mittevalgulisi rühmi, mis on erialas tuntud ja kergesti kättesaadavad. Eelistatult on antikeha derivaatimiseks sobivad rühmad vees lahustuvad polümeerid. Vees lahustuvate polümeeride näideteks on, nendega piirdumata, polüetüleenglükool (PEG), etüleenglükooli/propüleenglükooli kopolümeerid, karboksümetüülselluloos, dekstraan, polüvinüülalkohol, polüvinüülpürrolidoon, polü-1,3-dioksolaan, polü-1,3,6-trioksaan, etüleenimaleanhüdrüüdi kopolümeer, polüaminohapped (kas homopolümeerid või juhuslikud kopolümeerid) ja dekstraan või polü(n-vinüülpürrolidoon)polüetüleenglükool, propüleenglükooli homopolümeerid, polüpropüleenoksiidi/etüleenoksiidi kopolümeerid, polüoksütüülitud polüoolid (nt glütserool), polüvinüülalkohol ja nende segud. Polüetüleenglükooli propioon-aldehüüdil võib tootmises olla eeliseid, kuna see on vees stabiilne. Polümeer võib olla mistahes molekulmassiga ja võib olla hargnenud või mittehargnenud. Antikehaga seotud polümeeride arv võib varieeruda ning juhul, kui seotud on enam kui üks polümeer, võivad need olla samad või erinevad molekulid. Üldjuhul võib derivaatimiseks kasutatud polümeeride arvu ja/või tüübi määrata kaalutluste põhjal, mis, nendega piirdumata, hõlmavad parendatava antikeha täpsemaid omadusi või funktsioone, kas antikeha derivaati hakatakse kasutama ravis kindlaksmääratud tingimustes jne.

**[0315]** Veel ühe näitena esitatakse antikeha ja mittevalgulise jäägi konjugaadid, mida võib kiirgusele eksponeerides selektiivselt kuumutada. Ühe näitena on mittevalguline üksus süsiniku nanotoru (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 102: 11600-11605 (2005)). Kiirgus võib olla mistahes lainepikkusega ning hõlmab mittepiiravalt lainepikkusi, mis ei kahjusta tavalisi

rakke, kuid mis kuumutavad mittevalgulise üksuse temperatuurini, kus rakud, mis asuvad antikeha-mittevalgulise üksuse kõrval, tapetakse.

### Mõned antikehade valmistamise meetodid

#### *1. Mõned hübriidoomil baseeruvad meetodid*

**[0316]** Leiutisekohased CD22-vastaseid monokloonseid antikehasid võib valmistada hübridoomimeetodil, mida esimesena kirjeldati trükises Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975) või need võib valmistada rekombinantse DNA tehnikate abil (US patendipublikatsioon 4816567).

**[0317]** Hübridoomimeetodi kohaselt immuniseeritakse sobivat peremeeslooma, nagu hiir või hamster, et saada lümfotsüüdid, mis toodavad või on võimelised tootma antikehi, mis seonduvad spetsiifiliselt immuniseerimiseks kasutatud valguga. CD22-vastased antikehad tekivad loomades üldjuhul mitmete CD22 ja adjuvandi subkutaansete (sc) või intraperitoneaalsete (ip) injektsioonide toimetel. CD22 võib valmistada tehnika tasemes tuntud meetodite abil, mõnda neist on siin järgnevalt kirjeldatud. Näiteks võib CD22 valmistada rekombinantselt. Ühes teostuses immuniseeritakse loomad CD22 derivaadiga, mis sisaldab CD22 ekstratsellulaarset osa, millega on liidetud immunoglobuliini raske ahela Fc-osa. Ühes teostuses immuniseeritakse loomad CD22-IgG1 liitvalguga. Ühes teostuses immuniseeritakse loomad immunogeensete CD22 derivaatidega monofosforüül-lipiidi A (MPL) / trehaloosdikrünomükolaadi (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) lahuses ja lahus injekteeeritakse intradermaalselt paljudesse kohtadesse. Kaks nädalat hiljem immuniseerimist korratakse. 7 kuni 14 päeva hiljem võetakse loomadelt verd ja seerumis määratakse CD22-vastane tiiter. Immuniseerimist korratakse seni, kuni tiitri väärtus jõuab platoole.

**[0318]** Alternatiivina võib lümfotsüüte immuniseerida *in vitro*. Hübridoomiraku saamiseks liidetakse seejärel lümfotsüüdid müeloomirakkudega, kasutades selleks sobivat liitmisagensit nagu polüetüleenglükool (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, lk 59-103 (Academic Press, 1986)).

**[0319]** Selliselt valmistatud hübriidoomirakud külvatakse ja kasvatatakse sobivas kultuuri-söötmes, mis eelistatult sisaldab ühte või enamat agensit, mis inhibeerivad mitteliitunud vanemlike müeloomirakkude kasvu või ellujäämist. Näiteks kui vanemlikes müeloomirakkudes puudub ensüüm hüpoksantiin-guaaniinfosforibosültransferaas (HGPRT või HPRT),

siis sisaldab hübriidoomide sööde tüüpilisel juhul hüpoksantiini, aminopteriini ja tümidiini (HAT sööde), need ained takistavad HGPRT-puudulikkusega rakkude kasvu

**[0320]** Eelistatud müeloomirakud on sellised, mis liituvad efektiivselt, toetavad stabiilselt kõrgetasemelist antikehatootmist valitud antikeha-tootvate rakkude poolt ja on tundlikud söötme nagu HAT sööde suhtes. Selliste rakkude näideteks on, nendega piirdumata, hiire müeloomirakud, nagu need, mis on saadud hiire kasvajatelt MOPC-21 ja MPC-11, mis on saadavad Stalki instituudi rakkude jaotamise keskusest (*Salk Institute Cell Distribution Center*) San Diegos, Kalifornias, USA-s, ja SP-2 või X63-Ag8-653 rakud, mis on saadavad Ameerika kultuuride kollektsioonist (*American Type Culture Collection*) Rockville'is Marylandis, USA-s. Inimese monokloonsete antikehade saamiseks sobivatena on kirjeldatud ka inimese müeloomi ja hiire-inimese heteromüeloomi rakuliine (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984), Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, lk 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

**[0321]** Kultuurisöödet, milles hübriidoomirakud kasvavad, testitakse CD22-vastaste monokloonsete antikehade tootmise suhtes. Eelistatult määratakse hübriidoomirakkude poolt toodetavate monokloonsete antikehade seondumisspetsiifilisus immunosadestamise teel või *in vitro* seondumise testi, nagu radioimmunosordtest (RIA) või ensüümipõhise immuunsorbtsioon-testi (ELISA) abil. Monokloonse antikeha seondumise afiinsust võib määrata näiteks Scatchard'i analüüsi abil (Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980)).

**[0322]** Kui on identifitseeritud need hübriidoomirakud, mis toodavad soovitud spetsiifilisuse, afiinsuse ja/või aktiivsusega antikehi, võib kloonid subkloonida piiratud lahjendamise protseduuride abil ja kasvatada neid standardsete meetodite kohaselt (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, lk 59-103 (Academic Press, 1986)). Selleks eesmärgiks sobivate kultuurisöötmete hulka kuuluvad näiteks D-MEM või RPMI-1640 sööde. Lisaks võib hübriidoomirakke kasvatada *in vivo* astsiitkasvajatena loomades. Subkloonide poolt sekreteeritavad monokloonsed antikehad eraldatakse sobival viisil kultuurisöötimest, astsiitvedelikust või seerumist, kasutades tavalisi immunoglobuliini puhastamise protseduure, nagu näiteks A-valgu-sefaroosi- või hüdroksüapatiit-kromatograafia, geelelektroforees, dialüüs või afiinsuskromatograafia.

## 2. Mõned kogu skriinimise meetodid

**[0323]** Leiutisekohaseid CD22-vastaseid antikehasid võib valmistada kombinatoorsete kogude abil, skriinides sünteetiliste antikehade kloonide sobiva aktiivsuse või aktiivsuste suhtes. Nii näiteks on tehnika tasemes teada mitmeid faagidisplei kogude loomise ja nende kogude skriinimise meetodeid soovitud seondumiskarakteristikutega antikehade leidmiseks. Neid meetodeid on ülevaetlikult kirjeldatud trükises Hoogenboom et al., (2001) *Methods in Molecular Biology*, 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ) ja teatud teostustena trükises Lee et al., (2004) *J. Mol. Biol.*, 340: 1073-1093.

**[0324]** Põhimõtteliselt valitakse sünteetiliste antikehade kloonid, skriinides faagikogusid, mis sisaldavad faage, mis esitlevad antikeha varieeruva piirkonna (Fv) erinevaid fragmente, mis on liidetud faagi kattevalguga. Sellised faagikogusid skriinitakse soovitud antigeeni suhtes afiinsuskromatograafia abil. Fv fragmente ekspresseerivad kloonid, mis on võimelised seonduma soovitud antigeeniga, adsorbeeruvad sellele antigeenile ja eraldatakse seeläbi kogus leiduvatest mitteseonduvatest kloonidest. Seonduvad kloonid elueeritakse seejärel antigeenilt ja täiendavate antigeenile adsorbeerimise / antigeenilt elueerimise tsüklite abil võib neid edasi rikastada. Mistahes leiutisekohast CD22-vastast antikeha võib valmistada, disainides sobiva antigeeni skriinimise protseduuri, et valida huvipakkuv faagikloon ja seejärel konstrueerida täispikk CD22-vastane antikeha, kasutades huvipakkuva faagiklooni Fv järjestusi ning sobivaid konstantse piirkonna (Fc) järjestusi, mida on kirjeldatud trükises Kabat' et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. väljaanne, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), köited 1-3.

**[0325]** Mõnes teostuses moodustatakse antikeha antigeeni siduv domeen kahest varieeruvast (V) piirkonnast pikkusega ligikaudu 110 aminohapet, üks pärineb kergest ahelast (VL) ja teine raskest ahelast (VH), kumbki neist esitleb kolme hüpervarieeruvat lingu või komplemентаarsust määravat piirkonda (CDR-id). Varieeruvaid piirkondi saab esitleda faagil, seda kas üheahelaliste Fv (scFv) fragmentidena, milles VH ja VL on kovalentselt seotud lühikese painduva peptiidi kaudu või Fab fragmentidena, milles nad mõlemad on liidetud konstantse domeeniga ja interakteeruvad mittekovalentselt, nagu on kirjeldatud trükises Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Siin kasutamisel viidatakse faagikloonidele, mis kodeerivad scFv-d, ja faagikloonidele, mis kodeerivad Fab-d, koos kui „Fv faagikloonidele“.

**[0326]** VH ja VL geenide valimid võib eraldi kloonida polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil ja rekombineerida need juhuslikul moel faagikogudesse, mida võib siis skriinida antikeha siduvate kloonide suhtes nii, nagu seda on kirjeldatud trükises Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Immuniseeritud allikatest pärinevatest kogudest leitakse immunogeeni suhtes kõrge afiinsusega antikehasid vajaduseta konstrueerida hübriidoome. Alternatiivina võib kloonida naiivse valimi, et saada üks inimese antikehade allikas laia spektri mitte-enese- ja ka enesevastastest antikehadest ilma igasuguse immuniseerimiseta, nii nagu seda kirjeldasid Griffiths et al. (*EMBO J.*, 12: 725-734 (1993)). Lisaks võib naiivse kogu valmistada ka sünteetiliselt, kloonides ümberkorraldusteta V-geeni segmendid tüvirakkudest ja kasutades PCR praimereid, mis sisaldavad juhuslikke järjestusi, et kodeerida kõrge varieeruvusega CDR3 piirkondi ja viia ümberkorraldused läbi *in vitro* nii, nagu seda kirjeldasid Hoogenboom ja Winter (*J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)).

**[0327]** Mõnes teostuses kasutatakse niitjaid faage antikehafragmentide esitlemiseks minoorse kattevalguga pIII liitmise teel. Antikehafragmente võib esitleda üheaahelaliste Fv fragmentidena, milles VH- ja VL-domeenid on samal polüpeptiidahelal ühendatud painduva polüpeptiidvahelüli abil näiteks nii, nagu kirjeldasid Marks et al. (*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)), või Fab fragmentidena, milles üks ahel on liidetud pIII-ga ja teine sekreteeritakse bakteriaalse peremeesraku periplasmasse, kus ta assambleeritakse Fab-kattevalguga struktuuri, mida esitletakse faagi pinnal, asendades mõned metsiktüüpi kattevalgud näiteks nii, nagu kirjeldati trükises Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

**[0328]** Üldjuhul saadakse antikeha geeni fragmente kodeerivad nukleiinhapped inimeselt või loomadelt kogutud immuunrakkudest. Kui soovitakse saada CD22-vastaste kloonidega rikastatud kogu, immuniseeritakse indiviid CD22-ga, et saada antikehavastus, ning kogu loomiseks kogutakse põrnarakud ja/või ringlevad B-rakud või muud perifeerse vere lümfotsüüdid (PBL). Eelistatud teostuses saadakse CD22-vastaste kloonidega rikastatud inimese antikeha geenifragmentide kogu, tekitades CD22-vastase antikehavastuse transgeenses hiires, kes kannab inimese funktsionaalse immunoglobuliini geeni valimit (ja kellel puudub endogeenne funktsionaalne antikehade valmistamise süsteem) nii, et CD22-ga immuniseerimine indutseerib selliste B-rakkude tekke, mis toodavad inimese CD22-vastaseid antikehasid. Inimese antikehasid tootva transgeense hiire saamist kirjeldatakse allpool.

**[0329]** Täiendava CD22-vastaselt reageerivate rakkude populatsioonidega rikastamise võib saavutada, kasutades sobivat skriinimisprotseduuri, et eraldada B-rakud, mis ekspresseerivad

CD22-spetsiifilist membraaniga seotud antikeha, näiteks rakkude lahutamist CD22-afiinsus-kromatograafiaga või rakkude adsorptsiooni fluorokroomiga märgistatud CD22-le, millele järgneb läbivooluga aktiveeritud rakkude sorteerimine (FACS).

**[0330]** Alternatiivina annab mitteimmuniseeritud doonori põrnarakkude ja/või B-rakkude või muude PBL-de kasutamine parema esindatuse võimalikust antikehade valimist ja võimaldab antikehakogu konstrueerimise iga loomaliigi (inimese ja mitte-inimese) jaoks ka siis, kui CD22 ei ole selles antigeenne. Nende kogude jaoks, mis hõlmavad *in vitro* antikeha geeni konstruktsioone, kogutakse tüvirakud indiviidilt, et saada nukleiinhapped, mis kodeerivad ümberkorraldusteta antikeha geeni segmente. Huvipakkuvaid immuunrakke võib saada erinevatelt loomaliikidelt, nagu inimene, hiir, rott, jäneselised, huntlased, koeralised, kaslased, sead, veised, hobused ja linnuliigid jt.

**[0331]** Antikeha varieeruva geeni segmente (sealhulgas VH- ja VL-segmente) kodeerivad nukleiinhapped eraldatakse huvipakkuvatest rakkudest ja amplifitseeritakse. Ümberkorraldustega VH- ja VL-geenide kogu puhul võib soovitud DNA saada, eraldades genoomse DNA või mRNA lümfotsüütidest ja seejärel amplifitseerides PCR abil, kasutades praimereid, mis vastavad ümberkorraldatud VH- ja VL-geenide 5'- ja 3'-otstele, nagu on kirjeldatud trükises Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), tehes sellega ekspresiooniks erinevate V-geenide valimid. V-geene võib amplifitseerida cDNA-st ja genoomsest DNA-st, kasutades äraspidiseid praimereid küpset V-domeeni kodeeriva eksoni 5'-otsast ja päripidiseid praimereid, mis tuginevad J-segmendile, nagu on kirjeldatud trükistes Orlandi et al., (1989) ja Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989). Siiski võivad cDNA-st amplifitseerimisel äraspidised praimerid tugineda ka juhteksonile, nagu on kirjeldatud trükises Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), ja päripidised praimerid võivad olla valitud konstantsest piirkonnast, nagu on kirjeldatud trükises Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Komplementaarsuse suurendamiseks võivad praimerid olla degeneratiivsed, nagu on kirjeldanud Orlandi et al., (1989) või Sastry et al., (1989). Eelistatult maksimeeritakse kogu mitmekesisus, kasutades PCR praimereid, mis on suunatud igale V-geeni perekonnale, et amplifitseerida kõik kättesaadavad VH ja VL variandid, mis esinevad immuunraku nukleiinhappeproovis, nagu on kirjeldatud Marks et al. meetodis (J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)) või Orum et al. meetodis (Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)). Amplifitseeritud DNA kloonimiseks ekspresioonivektoritesse võib PCR praimerisse sisetada ühe otsa (amplikoni) märgisena haruldased restriksioonisaigid, nagu on kirjeldanud



Orlandi et al. (1989), või amplifitseerides edasi märgistatud praimeriga, nagu on kirjeldatud trükises Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991).

**[0332]** Sünteetiliselt ümberkorraldatud V-geenide valimid võib *in vitro* saada V-geenide segmentidest. Enamik inimese VH-geeni segmentidest on kloonitud ja sekveneeritud (raporteeritud trükises Tomlinson et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)) ja kaardistatud (esitatud trükises Matsuda et al., *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993), neid kloonitud segmente (sealhulgas kõiki peamisi H1 ja H2 lingu konformatsioone) võib PCR praimerite abil kasutada erinevate VH-geeni valimite saamiseks, mis kodeerivad erineva järjestuse ja pikkusega H3 lingusid, nagu on kirjeldatud trükises Hoogenboom, Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). VH valimeid võib valmistada ka nii, et kogu järjestuste erisus on fokuseeritud ühesuguse pikkusega pikka H3 lingu, nagu on kirjeldatud trükises Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Inimese V $\kappa$  ja V $\lambda$  segmendid on kloonitud ja sekveneeritud (esitatud trükises Williams, Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) ja neid saab kasutada sünteetiliste kerge ahela valimite tegemiseks. Sünteetilised V-geeni valimid, mis põhinevad VH ja VL erineval kokkuvoltimisel ja L3 ja H3 pikkustel, kodeerivad suure struktuurse mitmekesisusega antikehasid. Pärast V-geeni kodeerivate DNA-de amplifitseerimist võib iduteeliini V-geeni segmendid *in vitro* ümber korraldada vastavalt Hoogenboom'i ja Winter'i meetoditele (*J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)).

**[0333]** Antikehafragmentide valimeid võib konstrueerida, kombineerides VH- ja VL-geenide valimid mitmel erineval viisil. Iga valimi võib luua erinevas vektoris ja vektorid *in vitro* rekombineerida näiteks nii, nagu on kirjeldatud trükises Hogrefe et al., *Gene*, 128: 119-126 (1993), või VH- ja VL-geenide valimid võib viia kokku *in vivo* kombinatoorse infektsiooni abil, näiteks vastavalt loxP süsteemile, mida on kirjeldatud trükises Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). *In vivo* rekombinatsiooni kasutava lähenemise puhul kasutatakse ära Fab fragmentide kahe-ahelalisus, et ületada kogu suuruse piiranguid, mis on tingitud *E. coli* transformatsiooni efektiivsusest. Naiivsed VH ja VL valimid kloonitakse eraldi, üks fagemiidi ja teine faagivektorisse. Kaks kogu kombineeritakse seejärel, nakatades fagemiidi sisaldavaid baktereid faagiga nii, et iga rakk sisaldab erinevat kombinatsiooni ja kogu suurus on piiratud ainult olemasolevate rakkude arvuga (ligikaudu 10<sup>12</sup> klooni). Mõlemad vektorid sisaldavad *in vivo* rekombineerumise signaali nii, et VH- ja VL-geenid rekombineeruvad üheks replikoniks ja pakitakse koos faagi virioonidesse. Need väga suured

kogud võimaldavad saada suure arvu erinevaid antikehasid, millel on kõrge afiinsus ( $K_d^{-1}$  ligikaudu  $10^8$  M).

**[0334]** Alternatiivselt võib valimid järjestikku kloonida samasse vektorisse näiteks nii, nagu on kirjeldatud trükises Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991) või assambleerida PCR abil ja siis kloonida näiteks nii, nagu on kirjeldatud trükises Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). PCR abil assambleerimist võib kasutada ka VH ja VL DNA-de ühendamiseks painduvat peptiidvahelüli kodeeriva DNA-ga, et saada üheaheelalise Fv (scFv) valimid. Veel ühe tehnoloogia, „PCR abil rakus assambleerimise“ abil võib kombineerida VH- ja VL-geenid lümfotsüütides PCR abil ja siis kloonida seotud geenide valimid nii, nagu on kirjeldatud trükises Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

**[0335]** Naiivsete kogude (kas looduslike või sünteetiliste) poolt toodetud antikehade afiinsus võib olla mõõdukas ( $K_d^{-1}$  ligikaudu  $10^6$  kuni  $10^7$  M<sup>-1</sup>), kuid afiinsusküpsemist võib järele aimata ka *in vitro*, konstrueerides sekundaarsed kogud ja valides neist uuesti nii, nagu on kirjeldatud trükises Winter et al. (1994), *supra*. Näiteks võib sisse viia juhuslikud mutatsioonid *in vitro*, kasutades vigadele kalduvat polümeraasi (esitatud trükises Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)), Hawkins et al. meetodi kohaselt (J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)) või Gram et al. meetodit (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992)) kasutades. Lisaks võib afiinsusküpsemise läbi viia ühe või enama CDR-i juhusliku muteerimise teel, näiteks kasutades huvipakkuvat CDR-i ühendavate juhuslikku järjestust sisaldavate praimeritega PCR-i valitud üksikutes Fv kloonides ja skriinides suurema afiinsusega kloone. Patendipublikatsioonis WO 96/07754 (avaldatud 14 märtsil 1996) kirjeldati meetodit mutageensei indutseerimiseks immunoglobuliini kerge ahela komplementaarsust määravas piirkonnas, et luua kerge ahela geenide kogu. Veel üheks efektiivseks lähenemiseks on faagidisplei abil valitud VH- ja VL-domeenide rekombineerimine looduslikult esinevate V-domeenide variantide valimitega, mis on saadud immuniseerimata doonoritelt, ja skriinida suurema afiinsuse järgi mitmes ahela ümberkorraldamise tsükliks, nagu on kirjeldatud trükises Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). See tehnika võimaldab toota antikehasid ja antikehade fragmente, mille afiinsused on ligikaudu  $10^9$  M või väiksemad.

**[0336]** Kogude skriinimine võib toimuda erinevate tehnika tasemest tuntud meetodite abil. Näiteks võib CD22 kasutada adsorptsiooniplaatide süvendite katmiseks, ekspresseerida peremeesrakkudes, mis on fikseeritud adsorptsiooniplaatidele või kasutada rakkude sorteerimisel

või konjugeerida biotiiniga streptavidiiniga kaetud kerade abil kinnipüüdmiseks või kasutada mistahes muu tehnika tasemest tuntud meetodi kohaselt faagidisplei kogude skriinimisel.

**[0337]** Faagi kogu proovid viiakse immobiliseeritud CD22-ga ühendusse sellistes tingimustes, mis on sobivad vähemalt osa faagipartiklite sidumiseks adsorbendiga. Tavaliselt valitakse need tingimused, sealhulgas pH, ioontugevus, temperatuur ja nendesarnased nii, et nad sarnaneksid füsioloogiliste tingimustega. Tahkele faasile seotud faagid pestakse ja elueeritakse happega näiteks nii, nagu on kirjeldatud trükises Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), või alusega näiteks nii, nagu on kirjeldatud trükises Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), või CD22 antigeeni konkureerijaga, näiteks protseduuri abil, mis sarnaneb Clackson et al. antigeeniga konkureerimise meetodiga (Nature, 352: 624-628 (1991)). Faage võib ühes valikutsüklis rikastada 20–1000 korda. Peale selle võib faage kasvatada bakterikultuuris ja allutada edasistele selektsioonitsüklitele.

**[0338]** Selektiooni efektiivsus sõltub paljudest faktoritest, sealhulgas dissotsiatsiooni kineetikast pesemise käigus ja sellest, kas arvukad antikehafragmendid ühel faagil saavad samaaegselt seonduda antigeeniga. Kiire dissotsiatsioonikineetikaga antikehad (need, millel on nõrk seondumise afiinsus) võib säilitada, kui kasutatakse lühiajalist pesemist, multivalentset faagidispleid ja suurt antigeeni tihedust tahkel faasil. Suur tihedus mitte ainult ei stabiliseeri faagi multivalentsete interaktsioonide kestel, vaid ka soodustab dissotsieerunud faagi taas-seondumist. Madala dissotsiatsioonikineetikaga antikehade (ja nende, millel on kõrge seondumise afiinsus) selektsiooni võib soodustada pikaajalise pesemise ja monovalentse faagidisplei abil nii, nagu on kirjeldatud trükises Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990) ja patendipublikatsioonis WO 92/09690, samuti antigeeniga katmise madala tiheduse abil, nagu on kirjeldatud trükises Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

**[0339]** On võimalik teha valik CD22 suhtes erineva afiinsusega faagiantikehade vahel, seda isegi selliste afiinsuste puhul, mis erinevad vähe. Siiski, juhuslik mutatsioon valitud antikehas (näiteks mõne eespool kirjeldatud afiinsusküpsuse selekteerimistehnika alusel valitud) põhjustab tõenäoliselt paljude mutantide tekke, neist mutantidest enamus seondub antigeeniga ja vähestel on seejuures kõrgem afiinsus. Kui CD22 on piirav, siis võivad harvaesinevad kõrge afiinsusega faagid osutada väljatõrjututeks. Selleks, et säilitada kõik kõrgema afiinsusega mutantid, võib faage inkubeerida biotinüülitud CD22 ülehulgas, aga seejuures peab biotinüülitud CD22 kontsentratsioon olema madalama molaarsusega kui sihtmärgi molaarne afiinsuskonstant CD22 suhtes. Kõrge afiinsusega seonduvad faagid võib siis püüda streptavi-

diiniga kaetud paramagneetiliste kerade abil. Selline „tasakaaluline kinnipüüdmine“ võimaldab selekteerida antikehi vastavalt nende seondumise afiinsusele tundlikkusega, mis võimaldab eraldada mutantseid kloone, mille afiinsus on ainult kaks korda kõrgem kui suures ülehulgas olevate madalama afiinsusega kloonide afiinsus. Samuti võib muuta tahkele faasile seotud faagide pesemise tingimusi, et selekteerida faage dissotsiatsioonikineetika alusel.

**[0340]** CD22-vastaseid kloone võib selekteerida ka aktiivsuse järgi. Mõnel juhul seonduvad CD22-vastased antikehad CD22-d loomulikult ekspresseerivate elusatele rakkudele või blokeerivad CD22 ligandi ja CD22 vahelise seondumise, kuid ei blokeeri CD22 ligandi ja teise valgu vahelist seondumist. Sellistele CD22-vastastele antikehadele vastavaid Fv kloone võib selekteerida (1) eraldades CD22-vastased kloonid faagi kogus, nagu eespool kirjeldati, ja vajadusel amplifitseerides eraldatud faagikloonide populatsiooni, kasvatades selle populatsiooni üles sobivas bakteriaalses peremehes, (2) selekteerides CD22 ja teise valgu, mille vastu vastavalt blokeerivat ja mitteblokeerivat aktiivsust soovitakse saavutada, (3) adsorbeerides CD22-vastased faagikloonid immobiliseeritud CD22-le, (4) kasutades teise valgu ülehulka, elueerimaks kõik ebasoovitavad kloonid, mis tunnevad ära CD22-seondumise determinantid, mis kattuvad või on samad teise valgu seondumise determinantidega ja (5) elueerides kloonid, mis pärast etappi (4) jäid adsorbeerunuks. Vajadusel võib kloone soovitud blokeeriva/mitteblokeeriva omaduse suhtes edasi rikastada, korrates selleks üks või enam korda siin kirjeldatud seleksiooniprotseduure.

**[0341]** Hübridoomi abil saadud monokloonseid antikehi kodeeriva DNA või leiutisekohased faagidisplei Fv kloonid võib realselt eraldada ja sekveneerida tavapäraste protseduuride abil (nt kasutades oligonukleotiidprimereid, mis on disainitud spetsiifiliselt amplifitseerima huvipakkuvaid raske ja kerge ahela kodeerivaid järjestusi hübridoomist või faagi DNA-matrisilt). Eraldatud DNA võib paigutada ekspressioonivektoritesse, mis seejärel transfekteeritakse peremeesrakkudesse, nagu *E. coli* rakud, ahvi COS rakud, Hiina hamstri munasarja (CHO) rakud või müeloomirakud, mis muul viisil ei tooda immunoglobuliinvalku, et saavutada soovitud monokloonsete antikehade süntees rekombinantsetes peremeesrakkudes. Ülevaadete hulka, mis kirjeldavad antikeha kodeeriva DNA rekombinantset ekspressiooni bakteris, kuuluvad trükised Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) ja Pluckthun, *Immunol. Revs*, 130: 151 (1992).

**[0342]** Leiutisekohaseid Fv kloone kodeerivat DNA-d võib kombineerida tuntud DNA järjestustega, mis kodeerivad raske ahela ja/või kerge ahela konstantseid piirkondi (nt võib

vastavad järjestused leida trükisest Kabat' et al., *supra*), et moodustada kloonid, mis kodeerivad täispikki või osalisi raskeid ja/või kergeid ahelaid. On oluline, et sel eesmärgil võib kasutada mistahes isotüübi konstantseid piirkondi, sealhulgas IgG, IgM, IgA, IgD ja IgE konstantseid piirkondi ja et selliseid konstantseid piirkondi võib saada inimeselt või mistahes loomaliigilt. Ühe looma (nagu inimese) varieeruvast domeenist saadud Fv klooni DNA liitmisel teise loomaliigi konstantse piirkonna DNA-ga moodustuva „hübriidi“ täispika raske ahela ja/või kerge ahela kodeeriva(ad) järjestus(ed) on siin hõlmatud „kimäärse“ või „hübriidse“ antikeha definitsiooni. Mõnes teostuses liidetakse inimese varieeruva piirkonna DNA-st saadud Fv kloon inimese konstantse piirkonna DNA-ga, moodustades sel viisil kodeeriv(ad) järjestus(ed) inimese kõigi täis- või osalise pikkusega raskete ja/või kergete ahelate jaoks.

**[0343]** Leiutisekohasest hübriidomist saadud CD22-vastast antikeha kodeerivat DNA-d võib ka modifitseerida, näiteks asendades inimese raske ja kerge ahela konstantsete domeenide kodeerivate järjestustega homoloogsed hiire järjestused, mis pärinevad hübriidoomi kloonist (nt Morrison et al. meetodi kohaselt (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984))). Lisaks võib hübriidomist või Fv kloonist saadud antikeha või selle fragmenti kodeeriva DNA täiendavalt modifitseerida, sidudes immunoglobuliini kodeeriva järjestusega kovalentselt kõik või osa mitte-immunoglobuliini tüüpi polüpeptiidi kodeerivast järjestusest. Sel viisil valmistatakse „kimäärsed“ või „hübriidseid“ antikehad, millel on leiutisekohaste Fv kloonist või hübriidoomikloonist saadud antikehade seondumisspetsiifilisus.

### 3. Vektorid, peremeesrakud ja rekombinantse tehnoloogia meetodid

**[0344]** Leiutisekohase rekombinantse antikeha valmistamiseks eraldatakse seda kodeeriv DNA ja sisestatakse edasise kloonimise (DNA amplifitseerimise) või ekspresseerimise eesmärgil replitseeruvasse vektorisse. Antikeha kodeeriva DNA eraldamine ja sekveneerimine on tavapäraseid meetodeid kasutades lihtne (nt kasutades oligonukleotiidsonde, mis on võimalised spetsiifiliselt seonduma antikeha kerget ja rasket ahelat kodeerivatele geenidele). Saadaval on palju vektoreid. Vektori valik sõltub osaliselt peremeesrakust, mida kavatakse kasutada. Üldiselt on eelistatud peremeesrakkudeks prokarüootsed või eukarüootsed (ime-taja) rakud. Arvestatakse, et iga isotüübi konstantseid piirkondi, sealhulgas IgG, IgM, IgA,

IgD ja IgE konstantseid piirkondi, võib kasutada sellel eesmärgil ja et selliseid konstantseid piirkondi võib saada inimeselt või mistahes loomaliigilt.

### Antikehade valmistamine prokarüootseid rakke kasutades

#### *Vektori konstrueerimine*

[0345] Leiutisekohase antikeha polüpeptiidkomponente kodeerivaid polünukleotiidide järjestusi võib saada standardsete rekombinatsioonitehnikate abil. Soovitud polünukleotiidide järjestused võib eraldada ja sekveneerida antikeha tootvast rakust nagu näiteks hübridoomirakk. Alternatiivselt võib polünukleotiidid sünteesida, kasutades nukleotiidide süntesaatorit või PCR tehnikat. Saadud polüpeptiide kodeerivad järjestused sisestatakse rekombinantssesse vektorisse, mis on võimeline replitseeruma ja ekspresseerima heteroloogseid polünukleotiidide prokarüootsetes peremeestes. Käesoleva leiutise eesmärgil võib kasutada paljusid kättesaadavaid ja tehnika tasemes tuntud vektoreid. Sobiva vektori valik sõltub peamiselt vektorisse sisestatavate nukleiinhapete suurusest ja peremeesrakust, kuhu vektor transformeeritakse. Iga vektor sisaldab sõltuvalt oma funktsioonist (amplifikatsioon või heteroloogse polünukleotiidi ekspressioon või mõlemad) ja sobivusest peremeesrakuga, kus ta asub, mitmesuguseid komponente. Üldjuhul on vektori komponentideks, nendega piirdumata, replikatsiooni alguskoht, selektsioonimarkeri geen, promootor, ribosoomiga seondumise sait (RBS), signaaljärjestus, heteroloogne nukleiinhappe insert ja transkriptsiooni termineerimise järjestus.

[0346] Üldiselt kasutatakse peremeesrakkude puhul plasmiidvektoreid, mis sisaldavad replikoni ja kontrolljärjestusi, mis pärinevad liikidest, mis sobivad peremeesrakuga. Tavaliselt sisaldab vektor replikatsioonisaiti ning markeerivaid järjestusi, mis võimaldavad transformeeritud rakkude fenotüüpilist selektsiooni. Näiteks transformeeritakse *E. coli* rakke tavaliselt plasmiidiga pBR322, see on *E. coli* liigilt saadud plasmiid. pBR322 sisaldab gene, mis kodeerivad ampitsilliini- (Amp) ja tetratsükliini-(Tet)resistentsust, mis seega võimaldab transformeeritud rakke kergesti identifitseerida. pBR322, selle derivaadid või muud mikroobsed plasmiidid või bakteriofaag võivad ka sisaldada promootoreid või olla modifitseeritud nii, et nad sisaldavad promootoreid, mida mikroobne organism saab kasutada endogeensete valkude ekspresseerimiseks. Näiteid teatud antikehade ekspresseerimiseks kasutatud pBR322 derivaatide kohta on kirjeldatud trükises Carter et al., US patendipublikatsioon 5648237.

**[0347]** Lisaks võib antud peremeesse transformeerimisel vektorina kasutada peremees-mikroorganismiga sobivaid replikoni ja kontrolljärjestusi sisaldavaid faag-vektoreid. Näiteks bakteriofaagi nagu  $\lambda$ GEM.TM.-11 võib kasutada rekombinantse vektori valmistamiseks, mida saab kasutada vastuvõtlike peremeesrakkude nagu *E. coli* LE392 transformeerimiseks.

**[0348]** Ekspressioonivektor võib sisaldada kaks või enam promootori/tsistroni paari, mis kodeerivad mõlemat polüpetiidkomponenti. Promootor on mittetransleeritav regulatoorne järjestus, mis asub ülalpool (5')-tsistronit, mille ekspressiooni ta moduleerib. Prokarüootsed promootorid jagunevad üldjuhul kahte klassi: indutseeritavad ja konstitutiivsed. Indutseeritav promootor on selline, mis initsieerib tema kontrolli all oleva tsistroni transkriptsioonitaseme suurenemise vastusena muutustele kultiveerimise tingimustes, näiteks vastusena toitainete olemasolule või puudumisele või temperatuurimuutusele.

**[0349]** Hästi on teada suur hulk promootoreid, mille tunnevad ära erinevad potentsiaalsed peremeesrakud. Valitud promootori võib toimivalt ühendada kergelt või rasket ahelat kodeeriva tsistroni DNA-ga, eemaldades promootori restriksiooniensüümiga lõikamise teel algsest DNAST ja sisestades eraldatud promootori leiutisekohasesse vektorisse. Nii natiivse promootori järjestust kui ka paljusid heteroloogseid promootoreid võib kasutada sihtmärkgeenide otseseks amplifitseerimiseks ja/või ekspresseerimiseks. Mõnes teostuses on kasutatud heteroloogseid promootoreid, sest võrreldes natiivse sihtmärkpolüpeptiidi promootoriga võimaldavad need tavaliselt tugevamat transkriptsiooni ja ekspresseeritud sihtmärkgeeni suuremaid saagiseid.

**[0350]** Prokarüootsete peremeeste puhul kasutamiseks sobivate promootorite hulka kuuluvad PhoA promootor,  $\beta$ -galaktamaasi ja laktoosi promootorite süsteemid, trüptofaani (trp) promootori süsteem ja hübriidsed promootorid, nagu tac- või trc-promootorid. Siiski on sobivad ka teised promootorid, mis on bakterites funktsionaalsed (nagu teised tuntud bakteriaalsed või faagipromootorid). Nende nukleotiidjärjestused on avaldatud, mis võimaldab eriala asjatundjal neid toimivalt lüüesid kergelt ja rasket ahelat kodeerivatele tsistronitele (Siebenlist et al., (1980) Cell, 20: 269), kasutades vajalike restriksioonisaitide tekitamiseks linkereid või adaptoreid.

**[0351]** Leiutise ühe aspektina sisaldab iga rekombinantse vektori tsistron sekretsioonisignaali järjestuse komponenti, mis juhib ekspresseeritud polüpeptiidi translatseerimist membraanile. Üldjuhul võib see signaaljärjestus olla vektori komponent või see võib olla ka osa sihtmärkpolüpeptiidi DNA-st, mis on sisestatud vektorisse. Leiutise eesmärkide kohaselt vali-

tud signaaljärjestus peaks olema selline, mis peremeesraku poolt ära tuntakse ja protsessitakse (st lõigatakse välja signaalpeptidaasi poolt). Nende prokarüootsete peremeesrakkude puhul, mis ei tunne ja ei protsessi signaaljärjestust, mis on natiivne heteroloogsetele polüpeptiididele, asendatakse see signaaljärjestus prokrüootse signaaljärjestusega, mis on valitud näiteks grupist, kuhu kuuluvad aluseline fosfataas, penitsilinaas, Ipp või termostabiilse enterotoksiini II (STII) liiderjärjestused, LamB, PhoE, PelB, OmpA ja MBP. Ühe aspektina on ekspressioonisüsteemi mõlemas tsistronis kasutatavad signaaljärjestused STII signaaljärjestused või nende variandid.

**[0352]** Veel ühe aspektina võib leiutisekohane immunoglobuliinide tootmine toimuda peremeesraku tsütoplasmas ja ei vaja seetõttu signaaljärjestuse olemasolu igas tsistronis. Selle kohaselt ekspresseeritakse, volditakse ja assambleeritakse immunoglobuliini kerge ja raske ahel funktsionaalseks immunoglobuliiniks tsütoplasmas. Teatud peremees-rakuliinides (nt *E. coli* *trxB*-liinis) soodustavad tsütoplasmaatilised tingimused disulfiidsildade moodustamist, mis võimaldab ekspresseeritud valgu subühikute õiget kokkuvoltimist ja assambleerimist (Proba, Plückthun, Gene, 159: 203 (1995)).

**[0353]** Samuti võib antikehade tootmiseks kasutada ekspressioonisüsteemi, milles ekspresseeritavate polüpeptiidosaade kvantitatiivset suhet võib moduleerida, et sekreteeritavate ja õigesti assambleeritud antikehade saagis oleks maksimaalne. Selline moduleerimine on vähemalt osaliselt võimalik polüpeptiidosaade translatsioonilise tugevuse samaaegse moduleerimise abil.

**[0354]** Ühte translatsioonilise tugevuse moduleerimise meetodit on US patendipublikatsioon nr 5840523 kirjeldanud Simmons et al.. Selle kohaselt kasutatakse tsistronis translatsiooni initsieerimise piirkonna (*translational initiation region* - TIR) variante. Antud TIR-i jaoks võib valmistatada rea aminohapete või nukleiinhappejärjestuse variante, mille translatsiooniline tugevus on mingis vahemikus, esitades sel moel kohase viisi selle teguri häälestamiseks, et saada spetsiifilise ahela soovitud ekspressioonitase. TIR-i variante võib valmistada tavapäraste mutageneesimeetoditega, mille tulemuseks on koodonite muutused, mis võivad muuta aminohapete järjestust. Teatud teostustes on muutused nuklotiidjärjestuses vaikivad. Muutused TIR-is võivad hõlmata näiteks muutusi Shine-Dalgarno järjestuste arvus või vahekauguses koos muutustega signaaljärjestuses. Üks muteeritud signaaljärjestuste saamise meetod on tekitada kodeeriva järjestuse alguses “koodonpank”, mis ei muuda signaaljärjestuse aminohapete järjestust (st muutused on vaikivad). Selleks võib muuta nukleo-



tiidi iga koodoni kolmandas asendis, lisaks on mõnel aminohappel, nagu leutsiin, seriin ja arginiin, mitu võimalust ka esimese ja teise asendi jaoks, mis võimaldab panga tegemisel lisada keerukust. Seda mutageneesimeetodit on üksikasjalikult kirjeldatud trükises Yansura et al., (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol., 4: 151-158.

**[0355]** Ühes teostuses valmistatakse komplekt vektoreid, kus iga tsistroni jaoks oma TIR-i tugevuste vahemik. Selle piiratud komplekt võimaldab iga ahela ekspressioonitaseme ja ka soovitud antikehaproduktide saagiste võrdlemist TIR-i tugevuste erinevate kombinatsioonide puhul. TIR-i tugevust võib määrata reportergeeni ekspressioonitaseme kvantifitseerimise abil, nagu üksikasjalikult on kirjeldanud Simmons et al. US patendipublikatsioonis 5840523. Translatsioonilise tugevuse võrdlusele tuginedes valitakse individuaalsed sobivad TIR-id leiutisekohastes ekspressioonivektori konstruktsioonides kombineerimiseks.

**[0356]** Leiutisekohaste antigeenide ekspresseerimiseks sobivad prokarüootsed peremeesrakud hõlmavad arhebaktereid ja eubaktereid, nagu on gram-negatiivseid või gram-positiivseid organismid. Kasutatavate bakterite näited hõlmavad järgnevaid: *Escherichia* (nt *E. coli*), *Bacilli* (nt *B. subtilis*), *Enterobacteria*, perekonna *Pseudomonas* liigid (nt *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* või *Paracoccus*. Ühes teostuses kasutatakse gram-negatiivseid liike. Ühes teostuses kasutatakse leiutisekohaste peremeesrakkudena *E. coli* rakke. *E. coli* tüvede näited hõlmavad järgnevaid: tüvi W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 2. köide (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), lk 1190-1219, ATCC säiliku number 27325) ja selle derivaadid, sealhulgas tüvi 33D3, millel genotüüp on *W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTA(nmpc-fepE) degP41 kanR* (US patendipublikatsioon nr 5639635). Sobivad on ka teised tüved ja nende derivaadid, nagu *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31537) ja *E. coli* RV308 (ATCC 31608). Need näited on pigem illustreerivad kui piiravad. Meetodid derivaatide saamiseks mistahes eespool mainitud, määratletud genotüübiga bakterist on tehnika tasemes tuntud ja kirjeldatud näiteks trükises Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990). Üldiselt on sobiva bakteri valimisel vaja arvestada replikoni replitseeritavust bakterirakkudes. Näiteks on *E. coli*, *Serratia* või *Salmonella* liigid sobivad peremehena kasutamiseks siis, kui replikonina kasutatakse selliseid hästi tuntud plasmide nagu pBR322, pBR325, pACYC 177 või pKN410. Tüüpilisel juhul võiks peremeesrakk sekreteerida minimaalses koguses proteolüütilisi ensüüme ning soovi korral võib rakukultuuri kaasata lisaks proteaasi inhibiitoreid.

### Antikeha tootmine

[0357] Peremeesrakud transformeeritakse eespool kirjeldatud vektoritega ja kultiveeritakse tavalisel toitesöötmel, mida on sobivalt modifitseeritud promootorite indutseerimiseks, transformantide seleksiooniks või soovitud järjestusi kodeerivate geenide amplifitseerimiseks.

[0358] Transformatsioon tähendab DNA sisestamist prokarüootsesse peremeesse nii, et see DNA on replitseeritav, seda kas kromosoomivälise elemendi või kromosomaalse integrandina. Sõltuvalt kasutatavast peremeesrakust viiakse transformatsioon läbi antud rakkudele sobivate standardsete tehnikate abil. Kaltsiumkloriidi kasutamise teel kaltsiumiga mõjutamist rakendatakse üldjuhul nende bakterirakkude puhul, mis sisaldavad olulist rakuseina barjääri. Ühes teises transformeerimise meetodis kasutatakse polüetüleenglükooli/DMSO-d. Veel üheks tehnikaks on elektroporatsioon.

[0359] Leiutisekohaste polüpeptiidide tootmiseks kasutatavad prokarüootsed rakud kasvatakse tehnika tasemes tuntud söötmel, mis on sobiv valitud peremeesrakkude kultiveerimiseks. Sobivate söödet näited hõlmavad Luria puljongit (LB) koos vajalike lisatoitainetega. Mõnes teostuses sisaldab sööde ka seleksiooniagensit, mis on valitud vastavalt ekspresioonivektori konstruktsioonile, et lubada selektiivselt kasvada neil prokarüootsetel rakkudel, mis sisaldavad vektorit. Näiteks ampitsiliini lisatakse nende rakkude kasvusöötmele, mis ekspresseerivad ampitsiliini resistentsuse geeni.

[0360] Süsiniku, lämmastiku ja anorgaanilise fosfaadi allikate kõrval võib sobivates kontsentratsioonides lisada mistahes vajalikke toitaineid, lisades neid ükshaaval või segudes teiste lisandite või söötmetega nagu kompleksne lämmastikuallikas. Vajadusel võib kultiveerimis-sööde sisaldada ühte või enam redutseerivat agensit, mis on valitud grupist: glutatioon, tsüsteiin, tsüstamiin, tioglükollaat, ditioerütrtool ja ditiotreitool.

[0361] Prokarüootseid peremeesrakke kultiveeritakse sobival temperatuuridel. *E. coli* kasvuks sobib näiteks temperatuurivahemik 20 °C kuni ligikaudu 39 °C, enameelistatult vahemik 25 °C kuni ligikaudu 37 °C, veel enam eelistatult ligikaudu 30 °C. Söötme pH võib olla igasugune pH vahemikus 5 kuni ligikaudu 9, sõltudes peamiselt peremehe organismist. *E. coli* jaoks on pH eelistatult vahemikus 6,8 kuni ligikaudu 7,4 ja enameelistatult 7,0.

[0362] Kui leiutisekohases ekspresioonivektoris kasutatakse indutseeritavat promootorit, siis indutseeritakse valgu ekspresioon tingimustel, mis sobivad promootori aktiveerimiseks.

Ühe aspektina kasutatakse polüpeptiidide transkriptsiooni kontrollimiseks PhoA promootoreid. Sellele vastavalt kultiveeritakse transformeeritud peremeesrakke piiratud fosfaadisisaldusega induktsioonisöötmes. Eelistatult on piiratud fosfaadisisaldusega sööde C.R.A.P. sööde (vaadake nt trükist Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263: 133-147). Vastavalt kasutatud vektori konstruktsioonile võib kasutada mitmeid teisi indutseerijaid, mis on tehnika tasemes tuntud.

**[0363]** Ühes teostuses sekreteeritakse ekspresseeritud polüpeptiidid peremeesrakkude periplasmasse ja kogutakse sealt. Tavaliselt hõlmab valgu kogumine mikroorganismide lõhkumist, üldjuhul selliste vahenditega nagu osmootne šokk, sonikeerimine või lüüs. Kui rakud on lõhutud, siis eemaldatakse rakutükid või terved rakud tsentrifuugimise või filtrimise teel. Edasi võib valke puhastada näiteks aafiinsuskromatograafia abil. Alternatiivselt võib valgud transportida kultuurisöötmesse ja eraldada sealt. Rakud võib kultuurist eemaldada ja kultuuri supernatandi filtrida ning kontsentreerida toodetud valkude edasiseks puhastamiseks. Ekspresseeritud polüpeptiide võib edasi eraldada ja identifitseerida tavapäraselt, kasutades tuntud meetodeid nagu polüakrüülamiidgeelelektroforees (PAGE) ja *Western blot*.

**[0364]** Ühe aspektina toimub antikehade tootmine suures mahus fermentatsiooniprotsessi käigus. Rekombinantsete valkude tootmiseks on saadaval erinevad suuremahulise poolpideva fermentatsiooni protseduurid. Suuremahuliste fermentatsioonide puhul on maht vähemalt 1000 liitrit, eelistatult vahemikus ligikaudu 1000 kuni 100000 liitrit. Neis fermenterites kasutatakse segamistiivikuid hapniku ja toitainete, eriti glükoosi (eelistatud süsiniku-/energiaallikas) jaotamiseks. Väikesemahuline fermentatsioon tähendab üldjuhul fermentatsiooni sellises fermentoris, mille maht ei ületa ligikaudu 100 liitrit ja mis võib olla mahuga vahemikus 1 liiter kuni ligikaudu 100 liitrit.

**[0365]** Fermentatsiooniprotsessis indutseeritakse valgu ekspressioon tüüpilisel juhul pärast seda, kui rakud on sobivates tingimustes kasvanud soovitud tiheduseni, näiteks OD<sub>550</sub> väärtuseni ligikaudu 180-220, sel juhul on rakud varases statsionaarses faasis. Kasutada võib erinevaid indutseerijaid vastavalt kasutatava vektori konstruktsioonile, nagu on teada tehnika tasemes ja eespool kirjeldatud. Rakud võivad olla enne indutseerimist ka lühemat aega kasvanud. Rakke indutseeritakse tavaliselt 12-50 tundi, kuigi võib kasutada ka lühemaid või pikemaid indutseerimisaegu.

**[0366]** Saagise ja kvaliteedi parendamiseks võib leütisekohaste polüpeptiidide tootmisel modifitseerida erinevaid fermentatsioonitingimusi. Näiteks selleks, et parendada sekreteeri-

tud antikeha polüpeptiidide korralikku assambleerimist ja kokkuvoltimist, võib kasutada prokarüootsete peremeesrakkude kotransformeerimist täiendavate vektoritega, mis ekspresseerivad üle tugivalke (*chaperone protein*) nagu Dsb valgud (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD ja/või DsbG) või FkpA (peptidüülprolüül-cis,trans-isomeraas, millel on tugivalgu aktiivsus). On näidatud, et tugivalgud soodustavad bakteriaalses peremeesrakus toodetud heteroloogsete valkude korralikku kokkuvoltimist ja nende lahustuvust (Chen et al., (1999) J. Biol. Chem., 274: 19601-19605, Georgiou et al., US patendipublikatsioon 6083715, Georgiou et al., US patendipublikatsioon 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).

**[0367]** Ekspresseeritud heteroloogsete valkude (eriti selliste, mis on proteolüütiliselt tundlikud) proteolüüsi minimeerimiseks võib käesolevas leiutises kasutada peremehe selliseid tüvesid, milles puuduvad proteolüütilised ensüümid. Näiteks võib peremeesraku tüvesid modifitseerida, et saada mutatsioon(id) geenides, mis kodeerivad tuntud bakteriaalseid proteaase, nagu proteaas III, OmpT, DegP, Tsp, proteaas I, proteaas Mi, proteaas V, proteaas VI ja nende kombinatsioonid. Mõned *E. coli* proteaasipuudulikkusega tüved on kättesaadavad ja neid on kirjeldatud näiteks trükistes Joly et al., (1998), *supra*, Georgiou et al., US patendipublikatsioon 5264365, Georgiou et al., US patendipublikatsioon 5508192, Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996).

**[0368]** Ühes teostuses kasutatakse leiutisekohases ekspressioonisüsteemis peremeesrakku-dena *E. coli* tüvesid, mis on proteolüütilisete ensüümide puudulikkusega ja mis on transformeeritud plasmiididega, mis ekspresseerivad üle ühte või enam tugivalku.

#### *Antikeha puhastamine*

**[0369]** Ühes teostuses puhastatakse siin saadud antikeha-valku täiendavalt, et saada preparaadid, mis on piisavalt homogeensed järgnevates testides ja rakendustes kasutamiseks. Kasutada võib tehnika tasemes tuntud standardseid valkude puhastamise meetodeid. Iseloomulikeks puhastamismeetoditeks on järgmised: fraktsioneerimine immunoafiinsus- või ioonivahetuskolonnil, etanooliga sadestamine, pöördfaasi-HPLC, kromatograafia silikageelil või katioonvahetajavaigul nagu DEAE, kromatofokuseerimine, SDS-PAGE, ammooniumsulfaadiga sadestamine ja geel-filtrimine näiteks Sephadex G-75 abil.

[0370] Ühe aspektina kasutatakse antikehaproduktide immunoafiinsus-puhastamiseks tahkele faasile immobiliseeritud A-valku. A-valk on 41 kD suurune *Staphylococcus aureus*'e raku-seina valk, mis seondub kõrge afiinsusega antikehade Fc-piirkonnale (Lindmark et al., (1983) J. Immunol. Meth., 62: 1-13). Tahkeks faasiks, millele A-valk on immobiliseeritud, võib olla kolonn, mis sisaldab klaas- või silikageelpinda, või kontrollitud poorisuurusega klaaskolonn või silikageelikolonn. Mõnes teostuses on kolonn kaetud reagentiga nagu glütserool, et ennetada võimalike mittespetsiifiliste lisandite seondumist.

[0371] Puhastamise esimese etapina võib eespool kirjeldatud viisil rakukultuurist saadud preparaadi kanda immobiliseeritud A-valguga tahkele faasile, et võimaldada huvipakkuval antikehal spetsiifiliselt seonduda A-valguga. Seejärel tuleks tahket faasi pesta, et eemaldada tahke faasiga mittespetsiifiliselt seondunud lisandid. Lõpuks kogutakse huvipakkuv antikeha tahkelt faasilt elueerimise teel.

#### *Antikehade valmistamine eukariootseid rakke kasutades*

[0372] Üldjuhul kuuluvad vektori komponentide hulka, nendega piirdumata, üks või enam järgmistest komponentidest: signaaljärjestus, replikatsiooni alguskoht, üks või enam markergeeni, võimendaja-element, promootor ja transkriptsiooni termineerimise järjestus.

#### *Signaaljärjestuse komponent*

[0373] Eukariootses peremehes kasutatav vektor võib sisaldada ka signaaljärjestust või muud polüpeptiidi, millel on spetsiifiline lõikamissait küpse valgu N-terminuses või huvipakkuvas polüpeptiidis. Valitud heteroloogne signaaljärjestus on selline, mille peremeesrakk ära tunneb ja mida ta protsessib (st lõikab signaalpeptidaasiga). Ekspresserimiseks imetajarakkudes on kättesaadavad imetajate signaaljärjestused, samuti viraalsed sekreteerimise liiderjärjestused, näiteks *Herpes simplex*'i gD signaal. Sellise eelühendi piirkonna DNA on antikeha kodeeriva DNA-ga ligeeritud õiges lugemisraamis.

*Replikatsiooni alguspunkt*

[0374] Üldjuhul ei ole replikatsiooni alguspunkti komponent imetajate ekspressioonivektorites vajalik. Näiteks SV40 alguspunkti kasutatakse üldjuhul ainult seepärast, et see sisaldab varast promootorit.

*Seleksioonigeeni komponent*

[0375] Ekspressiooni- ja kloonimisvektorid võivad sisaldada seleksioonigeeni, mida nimetatakse ka selekteeritavaks markeriks. Tüüpilised seleksioonigeenid kodeerivad valke, mis (a) annavad resistentsuse antibiootikumide või teiste toksiinide suhtes, näiteks ampitsilliini, neomütsiini, metotreksaadi või tetratsükliini suhtes, (b) kompenseerivad auksotroofset puudulikkust, kui see on oluline (c) varustavad rakke komplekssoötmes puuduvate kriitiliste toitainetega.

[0376] Ühes seleksiooniskeemi näites kasutatakse peremeesraku kasvu peatamiseks ravimit. Need rakud, mida transformeeriti edukalt heteroloogse geeniga, toodavad valku, mis tagab ravimiresistentsuse, ja seega jäävad nad seleksioonirežiimis ellu. Sellise dominantse seleksiooni näidetes kasutatakse neomütsiini, mükofenoolhapet ja hügromütsiini.

[0377] Veel üheks imetaja rakkudele sobiva selekteeritava markeri näiteks on sellised, mis võimaldavad identifitseerida rakke, mis on kompetentsed antikeha nukleiinhapet vastu võtma, nagu DHFR, tümidiinkinaas, metallotioneiin-I ja -II, eelistatult primaatide metallotioniini geenid, adenosiindeaminaas, ornitiindekarboksülaas jt.

[0378] Näiteks identifitseeritakse mõnes teostuses kõigepealt rakud, mis on transformeeritud DHFR seleksioonigeeniga, kultiveerides selleks kõiki transformante kultiveerimissöötmes, mis sisaldab metotreksaati (Mtx), mis on DHFR-i konkureeriv antagonist. Mõnes teostuses, kui kasutatakse metsiktüüpi DHFR-i, on sobivaks peremeesrakuks hiina hamstri munasarjarakkude (CHO) rakuliin, millel puudub DHFR aktiivsus (nt ATCC CRL-9096).

[0379] Alternatiivselt saab peremeesrakke (eriti metsiktüüpi peremehi, mis sisaldavad endogeenset DHFR-i), mis on transformeeritud või kotransformeeritud DNA järjestustega, mis kodeerivad antikeha, metsiktüüpi DHFR valku ja veel ühte selekteeritavat markerit nagu aminoglükosiid 3'-fosfotransferaasi (APH), selekteerida raku kasvu järgi söötmes, mis sisal-

dab selekteeritava markeri jaoks selektsiooniagensit nagu aminoglükosiidne antibiootikum, näiteks kanamütsiin, neomütsiin või G418. Vaadake US patendipublikatsiooni nr 4965199.

### *Promootor-komponent*

**[0380]** Tavaliselt sisaldavad ekspressiooni- ja kloonimisvektorid promootorit, mille peremeesorganism ära tunneb, ning see on toimivalt ühendatud leiutisekohast polüpeptiidi (nt antikeha) kodeeriva nukleiinhappega. Promootorjärjestused eukarüootide jaoks on tuntud. Näiteks on peaaegu kõigil eukarüootsetel geenidel AT-rikas piirkond, mis paikneb ligikaudu 25 kuni 30 alust ülalpool transkriptsiooni initsieerimise saiti. Veel üks järjestus, mis paljudes geenides asub 70 kuni 80 aluse võrra transkriptsiooni initsieerimise saidist ülalpool, on piirkond CNCAAT, kus N võib olla mistahes nukleotiid. Enamuse eukarüootsete geenide 3'-otsas on järjestus AATAAA, mis võib olla signaal polü-A saba lisamiseks kodeeriva järjestuse 3'-otsa. Teatud teostustes võivad mistahes või kõik need järjestused olla sobival viisil sisestatud eukarüootsetesse ekspressioonivektoritesse.

**[0381]** Transkriptsiooni vektoritelt kontrollivad imetaja-peremeesrakus näiteks promootorid, mis on saadud selliste viiruste genoomidest nagu polüoomi viirus, *fowlpox* viirus, adenoviirus (nagu adenoviirus 2), veise papilloomiviirus, lindude sarkoomiviirus, tsütomegaloviirus, retroviirus, B-hepatiidiviirus ja ahviviirus (*Simian*) 40 (SV40), hetroloogsetest imetajate promootoritest näiteks aktiini promootor või immunoglobuliini promootor, kuumašoki promootorid, juhul kui need promootorid on peremeheraku süsteemidega sobivad.

**[0382]** SV40 viiruse varased ja hilised promootorid saadakse tavaliselt SV40 restriksiooni-fragmendina, mis sisaldab ka viraalset replikatsiooni alguspunkti. Inimese tsütomegaloviiruse varane promootor saadakse tavaliselt HindIII restriksioonifragmendina. US patendipublikatsioonis 4419446A esitatakse süsteem DNA ekspresseerimiseks imetajate peremeesrakkudes, kus vektorina kasutatakse veise papilloomiviirust. Selle süsteemi modifikatsiooni kirjeldatakse US patendipublikatsioonis 4601978. Vaadake ka trükist Reyes et al., *Nature*, 297: 598-601 (1982), kus kirjeldatakse inimese  $\beta$ -interferooni cDNA ekspresseerimist hiire rakkudes *Herpes simplex*'i viiruse tümidiinkinaasi promootori kontrolli all. Alternatiivselt võib promootorina kasutada Rous'i sarkoomiviiruse pikka terminaalset kordust.

*Võimendajaelement-komponent*

**[0383]** Antikeha polüpeptiidi kodeeriva DNA transkriptsiooni kõrgemates eukarüootides saab sageli suurendada, kui vektorisse sisestatakse võimendajajärjestus. Imetajate geenides (globiinis, elastaasis, albumiinis,  $\alpha$ -fötovalgus ja insuliinis) on nüüd teada mitmeid võimendajajärjestusi. Siiski kasutatakse tavaliselt võimendajat, mis pärineb eukarüootse raku viirusest. Näited hõlmavad SV40 võimendajat replikatsiooni alguspunkti mahajääval ahelal (bp 100-270), tsütomegaloviiruse varase promootori võimendajat, polüoomi võimendajat replikatsiooni alguspunkti mahajääval ahelal ja adenoviiruste võimendajaid. Vaadake ka trükist Yaniv, Nature, 297: 17-18 (1982), kus käsitletakse võimendajaelemente eukarüootsete promootorite aktiveerimiseks. Võimendaja võib sisestada vektorisse nii 5'- kui ka 3'-suunas antikeha polüpeptiidi kodeeriva järjestuse suhtes, eelistatult paikneb ta promootorist 5'-suunas.

*Transkriptsiooni termineerimise komponent*

**[0384]** Eukarüootsetes peremeesrakkudes kasutatavad ekspressioonivektorid sisaldavad tüüpilisel juhul ka järjestusi, mis on vajalikud transkriptsiooni termineerimiseks ja mRNA stabiliseerimiseks. Sellised järjestused on tavaliselt saadavad 5'- ja mõnel juhul 3'- mitte-transleeritavatest piirkondadest eukarüootses või viraalses DNA-s või cDNA-s. Need piirkonnad sisaldavad nukleotiidide segmente, mis transkribeeritakse polüadenüülitud fragmentidena antikeha kodeeriva mRNA mittetransleeritavas osas. Üheks kasulikuks transkriptsiooni termineerimise komponendiks on veise kasvuhormooni polüadenüülimise piirkond. Vaadake patendipublikatsiooni WO94/11026 ja seal esitatud ekspressioonivektorit.

*Peremeesrakkude selektsioon ja transformatsioon*

**[0385]** Siin kirjeldatud vektorites paikneva DNA kloonimiseks või ekspresseerimiseks sobivad peremeesrakud hõlmavad siin kirjeldatud kõrgemate eukarüootide rakke, sealhulgas selgroogsete rakke. Selgroogsete rakkude paljundamine kultuuris (koekultuuris) on muutunud rutiinseks protseduuriks. Kasulike imetajast peremehe rakuliinide nädeteks on ahvi neeru CV1-liin, mis on transformeeritud SV40-ga (COS-7, ATCC CRL 1651), inimese embrüo-



naalne neeruliin (293 või 293 rakud, mis on subkloonitud kasvatamiseks suspensiooni-kultuuris (Graham et al., J. Gen. Virol., 36: 59 (1977)), beebi-hamstri neerurakud (BHK, ATCC CCL 10), Hiina hamstri munasarjarakud/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)), hiire Sertoli (tugi-)rakud (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)), ahvi neerurakud (CV1 ATCC CCL 70), Aafrika roheahvi neerurakud (VERO-76, ATCC CRL-1587), inimese emakakaetakartsinoomi rakud (HELGA, ATCC CCL 2), koera neerurakud (MDCK, ATCC CCL 34), buffalo roti maksarakud (BRL 3A, ATCC CRL 1442), inimese kopsurakud (W 138, ATCC CCL 75), inimese maksarakud (Hep G2, HB 8065), hiire piimanäärme kasvaja rakud (MMT 060562, ATCC CCL51), TRI rakud (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383: 44-68 (1982)), MRC 5 rakud, FS4 rakud ja inimese hepatoomi rakuliin (Hep G2).

**[0386]** Antikeha tootmiseks transformeeritakse peremeesrakud eespool kirjeldatud ekspresiooni- või kloonimisvektoritega ja kultiveeritakse tavalises toitainetesöötmes, mida on sobivalt modifitseeritud promootorite indutseerimiseks, transformantide selekteerimiseks või soovitud järjestusi kodeerivate geenide amplifitseerimiseks.

#### *Peremeesrakkude kultiveerimine*

**[0387]** Antikeha tootvaid peremeesrakke võib kultiveerida mitmetes erinevates söötmetes. Kaubanduslikult saadavad söötmed nagu Ham'i F10 (Sigma), *Minimal Essential Medium* ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) ja *Dulbecco's Modifitseeritud Eagle's Medium* ((DMEM), Sigma) on peremeesrakkude kultiveerimiseks sobivad. Lisaks võib peremeesrakkude kasvatamiseks kasutada mistahes söödet, mida on kirjeldatud trükistes Ham et al., Meth. Enz., 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem., 102: 255 (1980), US patendipublikatsioonides 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 või 5122469, WO 90/03430, WO 87/00195 või US patendipublikatsioonis Re.30985. Igale neist söötmetest võib vajadusel lisada hormone ja/või teisi kasvufaktoreid (nagu insuliin, transferriin või epidermaalne kasvufaktor), soolasisid (nagu naatriumkloriid, kaltsium, magneesium ja fosfaat), puhverlahuseid (nagu HEPES), nukleotiide (nagu adenosiin ja tümidiin), antibiootikume (nagu ravim GENTAMYCIN™), mikroelemente (defineeritud kui anorgaanilised ühendid, mis tavaliselt esinevad mikromolaarsetes lõppkontsentratsioonides) ja glükoosi või sellega ekvivalentset energiaallikat. Mistahes muid vajalikke lisandeid võib samuti lisada eriala asjatundjale tuntud

sobivates kontsentratsioonides. Kultiveerimise tingimused, nagu temperatuur, pH ja sarnased, on samasugused, nagu eespool kasutati ekspresseerimiseks valitud peremeesrakkude jaoks, ja need on tavalisele eriala asjatundjale ilmsed.

### *Antikeha puhastamine*

**[0388]** Rekombinantsete tehnikate kasutamisel võib antikeha toota intratsellulaarselt või sekreteerida otse söötmesse. Kui antikeha toodetakse intratsellulaarselt, siis esimese etapina eemaldatakse näiteks tsentrifuugimise või ultrafiltrimise teel osakestest koosnev praht, mis koosneb kas peremeesrakkudest või nende lüüsitud fragmentidest. Kui antikeha sekreteeritakse söötmesse, siis üldjuhul kontsentreeritakse sellistest ekspresioonisüsteemidest saadavad supernatandid kõigepealt kaubanduses saadava valgu kontsentreerimise filtri abil, näiteks Amicon'i või Millipore Pellicon ultrafiltrimise vahendi abil. Kõikides eespool kirjeldatud etappides võib proteolüüsi inhibeerimiseks söötmele lisada proteaasi inhibiitorit nagu PMSF ning kahjulike lisandite kasvu ennetamiseks võib lisada antibiootikume.

**[0389]** Rakkudest valmistatud antikehakoostitsiooni võib puhastada, kasutades näiteks hüdroksüülapatiitkromatograafiat, geelelektroforeesi, dialüüsi ja afiinsuskromatograafiat, seejuures on eelistatud puhastamise tehnikaks afiinsuskromatograafia. A-valgu sobivus afiinsusligandiks sõltub antikehas esineva immunoglobuliini Fc-domeeni liigist ja isotüübist. A-valku võib kasutada nende antikehade puhastamiseks, mis põhinevad inimese  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  või  $\gamma 4$  raskel ahelal (Lindmark et al., J. Immunol. Meth., 62: 1-13 (1983)). G-valku soovitatakse kõigi hiire isotüüpide jaoks ja inimese  $\gamma 3$  jaoks (Guss et al., EMBO J., 5: 15671575 (1986)). Maatriksiks, millele afiinsusligand on seotud, on kõige sagedamini agaros, kuid saadaval on ka teised maatriksid. Mehaaniliselt stabiilsed maatriksid, nagu kontrollitud poorisuurusega klaas või polü(stüreendivinüül)benseen, võimaldavad suuremaid voolukiirusi ja lühemaid protsessimise aegu, kui seda on võimalik saavutada agarosil. Kui antikeha sisaldab CH3-domeeni, sobib puhastamiseks Bakerbond ABX™ vaik (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ). Sõltuvalt puhastatavast antikehast on kasutatavad ka teised valgu puhastamise tehnikad, nagu fraktsioneerimineioonivahetajakolonnil, etanooliga sadestamine, pöördfaasi-HPLC, silika-geelikromatograafia, kromatograafia hepariin-SEPHAROSE™ abil, kromatograafia aniooni- või kationivahetajavaigul (nagu polüaspartaathappe kolonnil), kromatofokuseerimine, SDS-PAGE ja ammooniumsulfaadiga sadestamine.

[0390] Pärast esialgse puhastamise mistahes etappi (etappe) võib huvipakkuvat antikeha ja lisandeid sisaldava segu allutada madala pH juures hüdrofoobse interaktsiooni kromatograafiale, kasutades elueerimiseks puhverlahust pH-ga vahemikus ligikaudu 2,5-4,5, eelistatult madala soolakontsentratsiooniga (nt ligikaudu 0-0,25 M soola).

[0391] Üldiselt on antikehade valmistamise mitmesugused meetodid, eesmärgiga kasutada neid uurimistöös, testimisel ja kliinilises rakenduses, tehnika tasemes hästi välja töötatud ning need on kooskõlas eespool kirjeldatud meetoditega ja/või kohandatavad eriala asjatundja poolt konkreetse huvipakkuva antikeha jaoks.

### *Immunokonjugaadid*

[0392] Samuti esitatakse leiutises immunokonjugaadid (vahelduvalt nimetatud ka „antikeha ja ravimi konjugaatideks“ või „ADC“), mis sisaldavad mõnda siin kirjeldatud CD22-vastastest antikehadest, mis on konjugeeritud tsütotoksilise agensiga, nagu kemoterapeutiline agens, ravim, kasvu inhibeeriv agens, toksiin (nt ensümaatiliselt aktiivne bakterite, seene, taimse või loomse päritoluga toksiin või nende fragmendid) või radioaktiivne isotoop (st radiokonjugaat).

[0393] Teatud teostustes sisaldab immunokonjugaat CD22-vastast antikeha ja kemoterapeutilist agensit või muud toksiooni. Immunokonjugaatide valmistamiseks kasutatavaid kemoterapeutilisi agenseid on siin kirjeldatud (nt eespool). Samuti võib kasutada ensümaatiliselt aktiivseid toksine ja nende fragmente ning ka neid on siin kirjeldatud.

[0394] Teatud teostustes sisaldab immunokonjugaat CD22-vastast antikeha ja ühte või enamat väikese molekuliga toksiooni, mis hõlmavad, nendega piirdumata, väikese molekuliga ravimeid, nagu kalihheamütsiin, maitansinoid, dolastatiin, auristatiin, trikotetseen ja CC1065, ning nende ravimite tsütotoksilise aktiivsusega derivaate. Selliste immunokonjugaatide näidete üksikasju kirjeldatakse lisaks allpool.

### *1. Iseloomulikud immunokonjugaadid*

[0395] Leiutisekohased immunokonjugaadid (või “antikeha ja ravimi konjugaadid” (“ADC”)) võivad olla allpool toodud valemiga I, mille kohaselt CD22-vastane antikeha on

konjugeeritud (st kovalentselt seotud) ühe või enama ravimüksusega (D), vajadusel linkeri (L) kaudu.



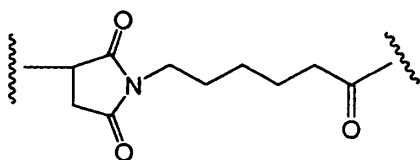
[0396] Vastavalt eelnevale võib CD22-vastane antikeha olla ravimiga konjugeeritud vahetult või üle linkeri. Valemis I on  $p$  keskmine ravimüksuste arv antikeha kohta, mis võib ulatuda ligikaudu ühest kuni ligikaudu 20 ravimüksuseni antikeha kohta ning teatud teostustes võib see ulatuda ligikaudu ühest kuni ligikaudu 8 ravimüksuseni antikeha kohta.

#### Iseloomulikud linkerid

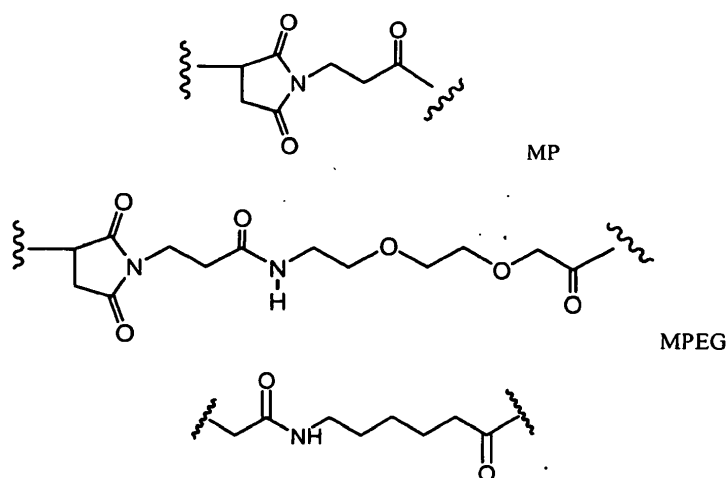
[0397] Siin on kirjeldatud iseloomulikke linkereid ja ravimüksusi. Linker võib sisaldada ühte või enam linkerkomponenti. Iseloomulikud linkeri komponendid hõlmavad järgnevaid: 6-maleimidokaproül- ("MC"), maleimidopropanoüülrühm ("MP"), valiin-tsitruilliin ("val-cit" või "vc"),alaniin-fenüülalaniin ("ala-phe"),  $p$ -aminobensüüloksükarbonüülrühm ("PAB"),  $N$ -suktsiinimidüül-4-(2-püridüültio)pentanoaat ("SPP"),  $N$ -suktsiinimidüül-4-( $N$ -maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat ("SMCC") ja  $N$ -suktsiinimidüül-(4-jodoatsetüül)aminobensoaat ("SIAB") ja etüleenoksü- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -rühm ühe või enama korduva üksusena ("EO" või "PEO"). Tehnika tasemes on tuntud erinevad linkeri komponendid, millest mõnda siin kirjeldatakse.

[0398] Linker võib olla „lõigatav linker“, mis soodustab ravimi vabanemist rakus. Näiteks võib kasutada happetundlikku linkerit (nt hüdrasooni), proteaasitundlikku (nt peptidaasitundlikku) linkerit, valgustundlikku linkerit, dimetüüllinkerit või disulfiidi sisaldavat linkerit (Chari et al., Cancer Research, 52: 127-131 (1992), US patendipublikatsioon nr 5208020).

[0399] Mõnes teostuses võib linkerkomponent sisaldada „pikendusüksust“ ("*stretcher unit*"), mis ühendab antikeha mõne muu linkerikomponendi või ravimüksusega. Iseloomulikud pikendusüksused on esitatud allpool (kus laineline joon tähendab antikehaga kovalentselt seondumise saite):



MC



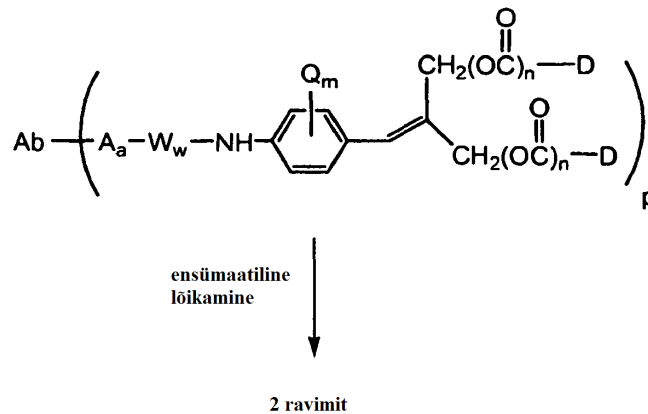
[0400] Mõnes teostuses võib linkerikomponent sisaldada aminohappeüksust. Ühes sellises teostuses võimaldab aminohappeüksus linkeri lõikamist proteaasiga, soodustades seeläbi ravimi vabanemist immunokonjugaadist pärast intratsellulaarsetele proteaasidele, nagu lüso-somaalsed ensüümid, eksponeerumist. Vaadake ka näiteks trükist Doronina et al., (2003) Nat. Biotechnol., 21: 778-784. Iseloomulikeks aminohappeüksuste näideteks on, nendega piirdumata, dipeptiid, tripeptiid, tetrapeptiid või pentapeptiid. Dipeptiidide näited hõlmavad valiini-tsitrulliini (vc või val-cit) jaalaniini-fenüülalaniini (af või ala-phe). Tripeptiidide näited hõlmavad järgmisi: glütsiin-valiin-tsitrulliini (gly-val-cit) ja glütsiin-glütsiin-glütsiin (gly-gly-gly). Aminohappeüksus võib sisaldada selliseid aminohappejääke, mis esinevad looduslikult, ning ka minoorsete aminohapete jääke ja looduslikult mitteesinevate aminohapete nagu tsitrulliini jääke. Aminohappeüksuseid võib disainida ja optimeerida nende ensümaatilise lõikamise selektiivsust teatud ensüümide, näiteks kasvajaseoselise proteaasi, katepsiin B, C ja D või plasmiinproteaasi suhtes.

[0401] Mõnes teostuses võib linkerikomponent sisaldada vahelüliüksust (*spacer*), mis seob antikeha ravimüksusega, seda kas vahetult või üle pikendusüksuse ja/või aminohappeüksuse. Vahelüliüksus võib olla lõhustuv (*self-immolative*) ja mittelõhustuv (*non self-immolative*). Mittelõhustuv vahelüliüksus on selline, mille puhul osa või kogu vahelüliüksus jääb ravimüksusega seotuks pärast ADC ensümaatilist (nt proteolüütilist) lõikamist. Mittelõhustuvate vahelüliüksuste näited hõlmavad, nendega piirdumata, glütsiin-vahelüliüksust ja glütsiin-glütsiin-vahelüliüksust. Võimalikud on ka muud peptiididest vahelüliüksused, mida saab ensümaatiliselt lõigata järjestusest sõltuvalt. Näiteks glütsiin-glütsiin-vahelüliüksust sisaldava ADC ensümaatiline lõikamine kasvajaseoselise proteaasiga annab glütsiin-glütsiin-ravim-

üksuse, mis vabaneb ADC küljest. Ühes sellises teostuses allutatakse glütsiin-glütsiin-ravimüksus kasvajakas eraldi hüdroolüüsile, mille käigus glütsiin-glütsiin-vahelüliüksus lõigatakse ravimüksuse küljest.

**[0402]** Lõhustuv vahelüliüksus võimaldab vabastada ravimüksuse nii, et eraldi hüdroolüüsimise etapp ei ole vajalik. Teatud teostustes sisaldab linkerkomponendi vahelüliüksus p-aminobensüülühikut. Ühes sellises teostuses on p-aminobensüülalkohol üle amiidsideme seotud aminohappeüksusega ning bensüülalkoholi ja tsütotoksilise agensi vahel paikneb karbamaat, metüülkarbamaat või karbonaat. Vaadake näiteks trükist Hamann et al., (2005) *Expert Opin. Ther. Patents*, (2005) 15: 1087-1103. Ühes teostuses on vahelüliüksuseks p-aminobensüülalkohol (PAB). Teatud teostustes on p-aminobensüülühiku fenüleenosa asendatud Qm-ga, kus Q on C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül)rühm, halogeen, nitro- või tsüanorühm ja m täisarv vahemikus 0-4. Lõhustuvate vahelülide muud näited hõlmavad, nendega piirdumata, p-aminobensüüloksükarbonüülrühmaga elektroonselt sarnaseid aromaatsid ühendeid (vaadake näiteks US patendipublikatsiooni 2005/0256030 A1), nagu 2-aminoimidiasool-5-metanooli derivaadid (Hay et al., (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9: 2237) ja orto- või para-aminobensüülatsetaalid. Kasutada võib vahelülisid, mis amiidsideme hüdroolüüsil alluvad tsüklistamisele, nagu 4-aminovõihappe asendatud ja asendamata amiidid (Rodrigues et al., (1995) *Chemistry Biology*, 2: 223), sobivalt asendatud bitsüklo[2.2.1]- ja bitsüklo[2.2.2]-süsteemid (Storm et al., (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, 94: 5815) ja 2-aminofenüülpropioonihappe amiidid (Amsberry et al., (1990) *J. Org. Chem.*, 55: 5867). Amiini sisaldavate, glütsiini juures asendatud ravimite (Kingsbury et al., (1984) *J. Med. Chem.*, 27: 1447) elimineerimine on samuti ADC-des kasutamiseks sobivate lõhustuvate vahelülide näideteks.

**[0403]** Ühes teostuses on vahelüliüksus hargnenud ahelaga bis(hüdroksümetüül)stüreen-(BHMS)-ühik, mis on kujutatud allpool ning mida võib kasutada mitme ravimi liitmiseks ja vabastamiseks



kus Q on C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm), halogeen, nitro- või tsüanorühm, m on täisarv vahemikus 0-4, n on 0 või 1, p on vahemikus 1 kuni ligikaudu 20.

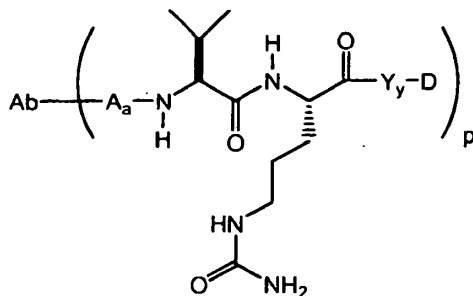
**[0404]** Linker võib sisaldada mistahes ühte või enamat eespool nimetatud linkerkomponentidest. Teatud teostustes vastab linker järgnevas ADC valemis II (kandilistes sulgudes) esitatule

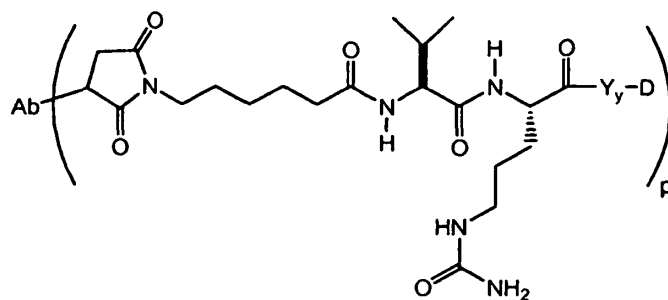


valem II,

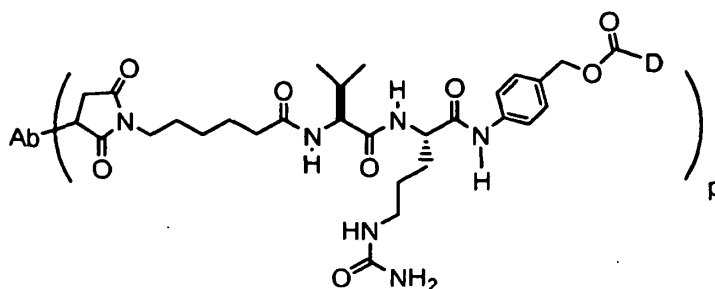
kus A on pikendusüksus ja a on täisarv vahemikus 0 kuni 1, W on aminohappeüksus ja w on täisarv vahemikus 0 kuni 12, Y on vahelüliüksus ja y on 0, 1, või 2 ning Ab, D ja P on defineeritud samuti kui eespool valemis I. Selliste linkerite iseloomulikke näiteid on kirjeldatud US patendipublikatsioonis 20050238649 A1, mis on kaasatud käesolevasse viitena.

**[0405]** Iseloomulikke linkerkomponente ja nende kombinatsioone on valemiga II ADC-de kontekstis kujutatud allpool





MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

[0406] Linkerkomponente, sealhulgas pikendusüksuseid, vahelüüksuseid ja aminohappeüksuseid, võib sünteesida erialas tuntud meetodite abil nagu on kirjeldatud US patendipublikatsioonis US 2005-0238649 A1.

#### Iseloomulikud ravimüksused

#### Maitansiin ja maitansinoidid

[0407] Mõnes teostuses sisaldab immunokonjugaat leutisekohast antikeha, mis on konjugeeritud ühe või enama maitansinoidimolekuliga. Maitansinoidid on mitotootilised inhibiitorid, mis toimivad tubuliini polümerisatsiooni inhibeerides. Maitansiin eraldati esmalt Ida-Aafrika põõsast *Maytenus serrata* (US patendipublikatsioon nr 3896111). Seejärel avastati, et teatud mikroobid toodavad samuti maitansinoide, nagu maitansinool ja C-3-maitansinooli estrid (US patendipublikatsioon 4151042). Sünteetilist maitansinooli ning selle derivaate ja analooge on kirjeldatud näiteks US patendipublikatsioonides 4137230, 4248870, 4256746, 4260608, 4265814, 4294757, 4307016, 4308268, 4308269, 4309428, 4313946, 4315929, 4317821, 4322348, 4331598, 4361650, 4364866, 4424219, 4450254, 4362663 ja 4371533.

[0408] Maitansinoid-ravimüksused pakuvad huvi antikeha ja ravimi konjugaatides kasutamise aspektist, sest need: (i) on suhteliselt hõlpsalt valmistatavad fermenteerimise või fermenteerimissaaduste keemilise muutmise või derivaatimise teel, (ii) võimaldavad derivaati-



mist funktsionaalsete rühmadega, mis sobivad konjugeerimiseks antikehadega mitte-disulfiidlinkerite kaudu, (iii) on stabiilsed plasmas ning (iv) on tõhusad mitmesuguste kasvaja-rakuliinide vastu.

**[0409]** Maitansiiniühendid, mis on sobivad kasutamiseks maitansinoidravimüksustena, on tehnika tasemes hästi tuntud ja neid võib vastavalt tuntud meetoditele eraldada looduslikest allikatest või toota geneetilise modifitseerimise meetodite abil (vaadake Yu et al., (2002) PNAS, 99: 7968-7973). Maitansinooli ja maitansinooli analooge võib tuntud meetodite abil valmistada ka sünteetiliselt.

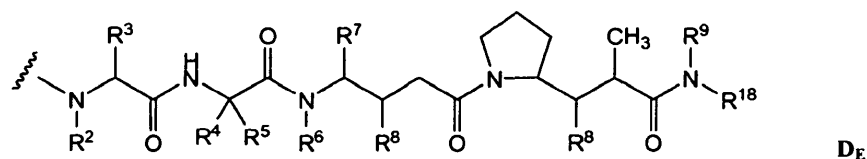
**[0410]** Iseloomulikud maitansinoidüksused hõlmavad DM1, DM3 ja DM4, nagu siin on kirjeldatud.

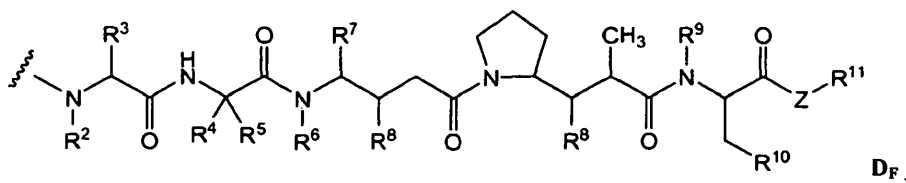
#### Auristatiinid ja dolastatiinid

**[0411]** Mõnes teostuses sisaldab immunokonjugaat leiutisekohast antikeha, mis on konjugeeritud dolastatiinide või dolastatiini peptiidsete analoogide ja derivaatidega, näiteks auristatiiniga (US patendipublikatsioonid nr 635483, 578058). On näidatud, et dolastatiinid ja auristatiinid häirivad mikrotuubulite dünaamikat, GTP hüdrolüüsi ja tuuma- ja raku jagunemist (Woyke et al., (2001) Antimicrob. Agents and Chemother., 45(12): 3580-3584) ning neil on vähivastane (US patendipublikatsioon 5663149) ja antifungaalne aktiivsus (Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother., 42: 2961-2965). Dolastatiin- või auristatiinravimüksuse võib siduda antikehaga peptiidse ravimüksuse N- (amino-) või C- (karboksüül-) terminuse kaudu (US patendipublikatsioon WO 02/088172).

**[0412]** Iseloomulikud auristatiinteostused hõlmavad N-terminuse kaudu seotud monometüülauristatiinüksusi DE ja DF, mis on avaldatud trükises Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, 45. köide, kokkuvõte nr 623, esitatud 28. märtsil 2004.

**[0413]** Peptiidse ravimüksuse võib valida allpool toodud valemitest D<sub>E</sub> ja D<sub>F</sub>





milles laineline joon ühendites D<sub>E</sub> ja D<sub>F</sub> osutab antikeha või antikeha-linkerkomponendi kovalentse sidumise saidile, ning on igas asendis sõltumatult valitud järgnevatest:

R<sup>2</sup> on valitud järgnevatest: H ja C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm,

R<sup>3</sup> on valitud järgnevatest: H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükluül-, arüül-, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-arüül-, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükluül-), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluül- ja C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluülrühm),

R<sup>4</sup> on valitud järgnevatest: H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükluül-, arüül-, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-arüül-, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükluül-), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluül- ja C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluülrühm),

R<sup>5</sup> on valitud järgnevatest: H ja metüülrühm,

või R<sup>4</sup> ja R<sup>5</sup> moodustavad ühiselt karbotsükli valemiga -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>-, milles R<sup>a</sup> ja R<sup>b</sup> on sõltumatult valitud H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül- ja C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükluülrühma hulgast ning n on valitud järgnevatest: 2, 3, 4, 5 ja 6,

R<sup>6</sup> on valitud järgnevatest: H ja C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm,

R<sup>7</sup> on valitud järgnevatest: H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükluül-, arüül-, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-arüül-, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükluül-), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluül- ja C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluülrühm),

R<sup>9</sup> on valitud järgnevatest: H ja C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm,

R<sup>10</sup> on valitud järgnevatest: arüül- või C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluülrühm,

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

R<sup>11</sup> on valitud järgnevatest: H, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-alküül-, arüül-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluülrühm, -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-R<sup>14</sup> või -(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>,

m on täisarv vahemikus 1-1000,

R<sup>13</sup> on C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm,

R<sup>14</sup> on H või C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm,

iga R<sup>15</sup> esinemise korral on see sõltumatult H, -COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H või -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm,

iga R<sup>16</sup> esinemise korral on see sõltumatult H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküülrühm või -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH,

$R^{18}$  on valitud järgnevatest:  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arüül-,  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ -heterotsükliül-) ja  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ -karbotsükliülrühm), ning  $n$  on täisarv vahemikus 0 kuni 6.

[0414] Ühes teostuses on  $R^3$ ,  $R^4$  ja  $R^7$  sõltumatult isopropüül- või *sec*-butüülrühmad ning  $R^5$  on H või metüülrühm. Iseloomulikus teostuses on  $R^3$  ja  $R^4$  kumbki isopropüülrühm,  $R^5$  on H ja  $R^7$  on *sec*-butüülrühm.

[0415] Veel ühes teostuses on  $R^2$  ja  $R^6$  on kumbki metüülrühm ja  $R^9$  on H.

[0416] Veel ühes teostuses on  $R^8$  alati  $-OCH_3$ .

[0417] Iseloomulikus teostuses on  $R^3$  ja  $R^4$  kumbki isopropüülrühm,  $R^2$  ja  $R^6$  on kumbki metüülrühm,  $R^5$  on H,  $R^7$  on *sec*-butüülrühm,  $R^8$  on alati  $-OCH_3$  ja  $R^9$  on H.

[0418] Ühes teostuses on Z  $-O-$  või  $-NH-$ .

[0419] Ühes teostuses on  $R^{10}$  arüülrühm.

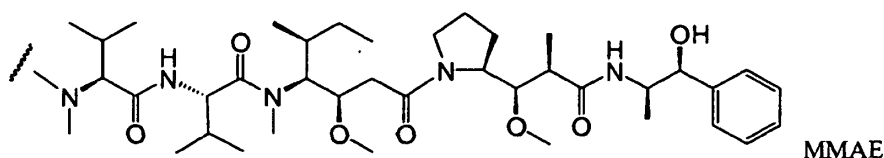
[0420] Iseloomulikus teostuses on  $R^{10}$  fenüülrühm.

[0421] Iseloomulikus teostuses, kui Z on  $-O-$ , on  $R^{11}$  H, metüül- või t-butüülrühm.

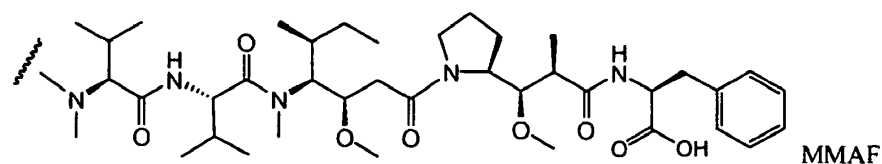
[0422] Ühes teostuses, kui Z on  $-NH$ , on  $R^{11}$   $-CH(R^{15})_2$ , milles  $R^{15}$  on  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$  ja  $R^{16}$  on  $C_1-C_8$ -alküülrühm või  $-(CH_2)_n-COOH$ .

[0423] Veel ühes teostuses, kui Z on  $-NH$ , on  $R^{11}$   $-CH(R^{15})_2$ , milles  $R^{15}$  on  $-(CH_2)_n-SO_3H$ .

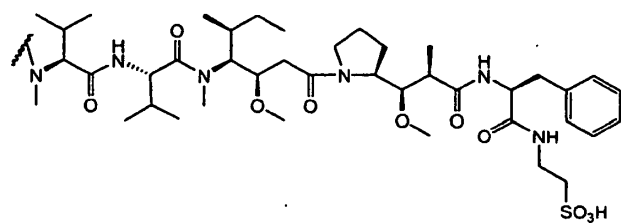
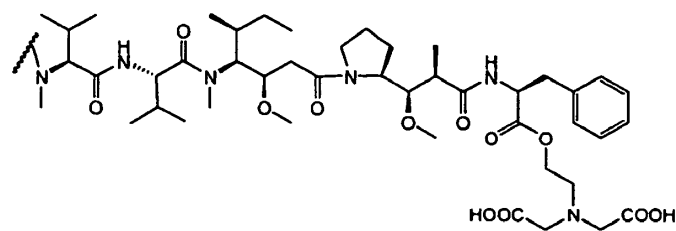
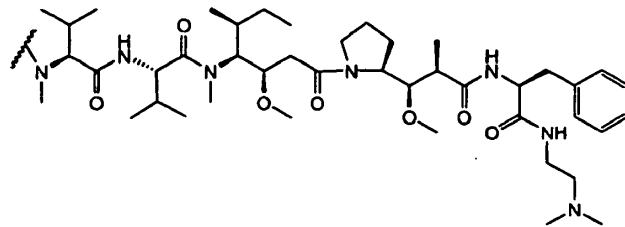
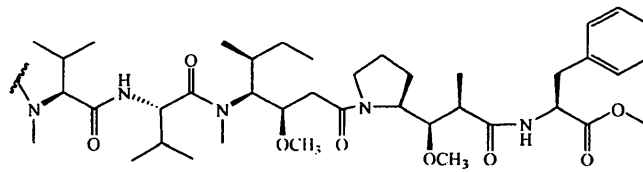
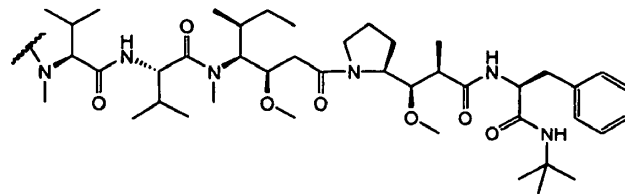
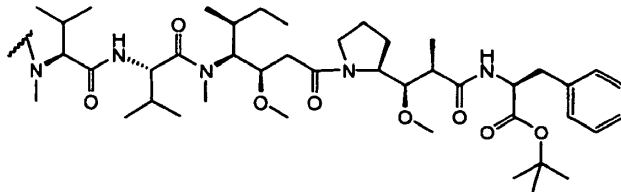
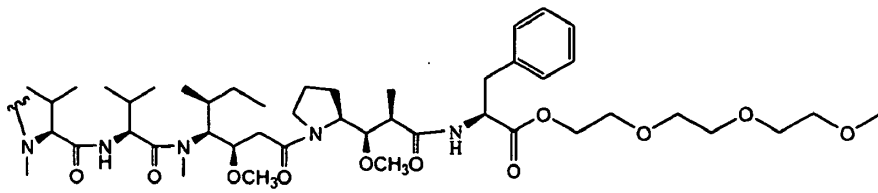
[0424] Valemile  $D_E$  vastav iseloomulik auristatiiniteostus on MMAE, milles laineline joon näitab kovalentset sidumist antikeha ja ravimi konjugaadi linkeriga (L):

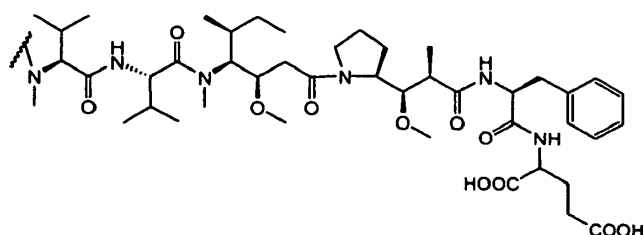


[0425] Valemile  $D_F$  vastav iseloomulik auristatiiniteostus on MMAF, milles laineline joon näitab kovalentset sidumist antikeha ja ravimi konjugaadi linkeriga (L) (vaadake US patendipublikatsiooni 2005/0238649 ja trükist Doronina et al., (2006) Bioconjugate Chem., 17: 114-124):

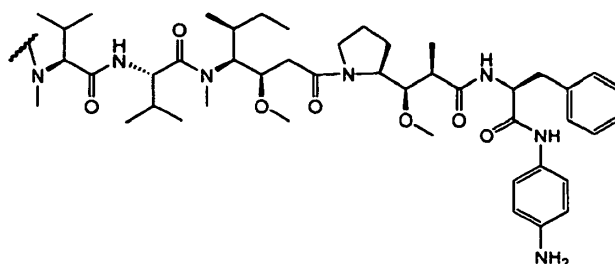


[0426] Muud ravimüksused hõlmavad järgnevaid MMAF-i derivaate, milles laineline joon näitab kovalentset sidumist antikeha ja ravimi konjugaadi linkeriga (L)



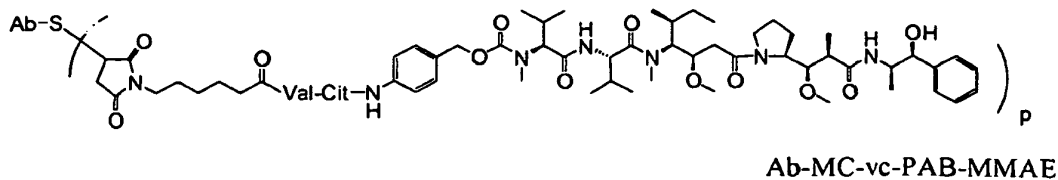
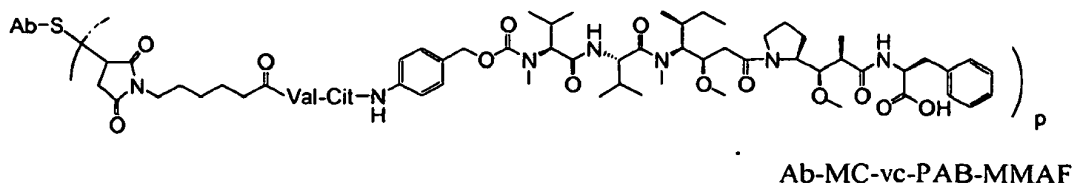


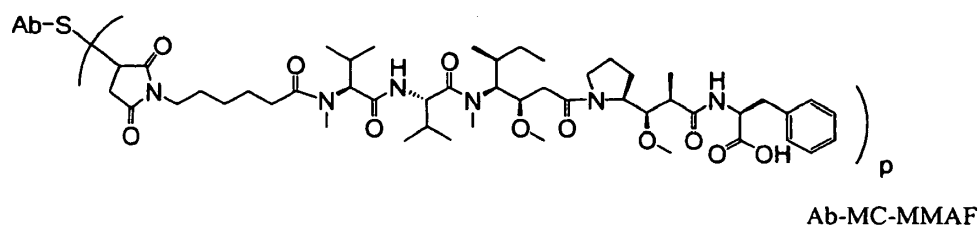
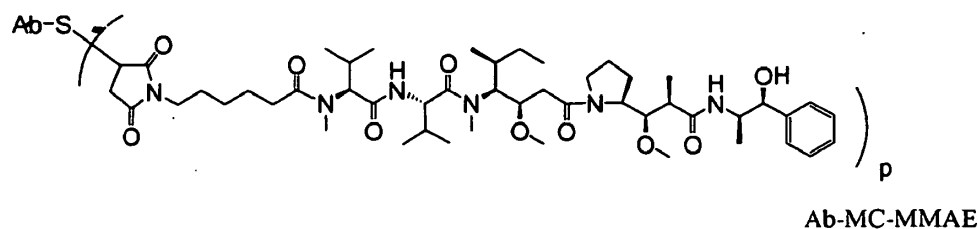
ja



[0427] Ühe eripära kohaselt võivad ravimüksusele asendis R<sup>11</sup> olla kinnitatud hüdrofiilsed rühmad, mis, nendega piirdumata, hõlmavad trietüleenglükooli estreid (TEG-e). Järgimata mingit konkreetset teooriat võib väita, et hüdrofiilsetest rühmadest on abi ravimüksuse sisenemisel rakku ja ravimüksuse aglomeerumise ärahoidmisel.

[0428] Valemile I vastavate auristatiini/dolastatiini või nende derivaate sisaldavate ADC-de iseloomulikke teostusi on kirjeldatud US patendipublikatsioonis 2005-0238649 A1 ja trükises Doronina et al., (2006) Bioconjugate Chem., 17: 114-124. Valemile I vastavate, MMAE-d või MMAF-i ja erinevaid linkerkomponente sisaldavate ADC-de iseloomulikel teostustel on järgnevad struktuurid ja lühendid (milles “Ab” on antikeha, p on 1 kuni ligikaudu 8, Val-Cit” on dipeptiid valiin-tsitrulliin ning “S” on väävliaatom:





**[0429]** Lisaks hõlmavad valemile I vastavad, MMAF-i ja erinevaid linkerkomponente sisaldavad ADC-de iseloomulikud teostused ka Ab-MC-PAB-MMAF-i ja Ab-PAB-MMAF-i. On huvipakkuv, et nende immunokonjugaatide puhul, mis sisaldavad antikehaga proteolüütiliselt mittelõigatava linkeri abil seotud MMAF-i, on aktiivsus võrreldav nende immunokonjugaatide aktiivsusega, mis sisaldavad antikehaga proteolüütiliselt lõigatava linkeri abil seotud MMAF-i, vaadake trükist Doronina et al., (2006) *Bioconjugate Chem.*, 17: 114-124. Arvatakse, et sellistel juhtudel põhjustab ravimi vabanemist antikeha lagunemine rakus.

**[0430]** Tüüpilisel juhul võib peptiidipõhiseid ravimüksusi valmistada, moodustades peptiidside kahe või enama aminohappe ja/või peptiidifragmendi vahele. Selliseid peptiidsideid võib valmistada näiteks vastavalt vedelfaasi sünteesi meetodile (vaadake trükist E. Schröder, K. Lübke, "The Peptides", 1. köide, lk 76-136, 1965, Academic Press), mis on peptiidikeemia valdkonnas hästi tuntud. Auristatiini/dolastatiiniravimüksuseid võib valmistada vastavalt järgnevas trükistes toodud meetoditele: US patendipublikatsioon 2005/0238649 A1, US patendipublikatsioon nr 5635483, US patendipublikatsioon nr 5780588, Pettit et al., (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 5463-5465, Pettit et al., (1998) *Anti-Cancer Drug Design*, 13: 243-277, Pettit, G. R. et al., *Synthesis*, 1996: 719-725, Pettit et al., (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 5: 859-863 ning Doronina, (2003) *Nat. Biotechnol.*, 21 (7): 778-784.

**[0431]** Täpsemalt, valemile D<sub>F</sub> vastavaid auristatiin/dolastatiin-ravimüksusi, nagu MMAF ja selle derivaadid, võib valmistada US patendipublikatsioonis 2005-0238649 A1 ja trükises Doronina et al., (2006) *Bioconjugate Chem.*, 17: 114-124 kirjeldatud meetodite abil. Valemile D<sub>E</sub> vastavaid auristatiini/dolastatiini-ravimüksuseid, nagu MMAE ja selle derivaadid, võib valmistada trükises Doronina et al., (2003) *Nat. Biotech.*, 21: 778-784 kirjeldatud meetodite abil. Ravim ja linkerüksuseid MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF ja

MC-vc-PAB-MMAE on sobiv sünteesida rutiinsete meetodite abil nii, nagu on kirjeldatud näiteks trükises Doronina et al., (2003) Nat. Biotech., 21: 778-784 ja US patendipublikatsioonis US 2005/0238649 A1, ning seejärel konjugeerida need huvipakkuva antikehaga.

### Ravimikoormus

**[0432]** Ravimikoormus on esitatud väärtusega  $p$  ja see on ravimühikute keskmine arv antikeha kohta valemile I vastavas molekulis. Ravimikoormus võib olla vahemikus 1 kuni 20 ravimüksust (D) antikeha kohta. Valemile I vastavad ADC-d hõlmavad 1 kuni 20 ravimüksusega konjugeeritud antikehade kogusid. Konjugeerimisreaktsioonides saadavate ADC preparaatide keskmist ravimüksuste arvu antikeha kohta võib iseloomustada tavapärasel viisil, näiteks massispektroskoopia, ELISA-analüüsi ja HPLC abil. Samuti võib määrata ADC kvantitatiivse jaotuse  $p$  väärtuse järgi. Mõnel juhul võib saavutada homogeense ADC, mille puhul  $p$  on kindla väärtusega, eraldades, puhastades ja iseloomustades need ADC-d teistsuguse ravimikoormuse tasemega ADC-de hulgast sellisel viisil nagu pöördfaasi-HPLC või elektroforees.

**[0433]** Mõne antikeha ja ravimi konjugaadi jaoks võib  $p$  väärtus olla piiratud sidumiskohade arvuga antikehas. Näiteks sidumisel tsüsteiini tiolrühmaga, nagu eespool toodud iseloomulikes teostustes, võib antikehas olla ainult üks või mitu tsüsteiini tiolrühma või selles võib olla ainult üks või mitu piisavalt reaktiivset tiolrühma, mille kaudu võib linkeri siduda. Teatud teostustes võib suurem ravimikoormus, näiteks  $p > 5$ , põhjustada teatud antikeha ja ravimi konjugaatide agregeerumist, mittelahustuvust, toksilisust või rakumembraani läbimise võime kaotamist. Teatud teostustes on leiutisekohase ADC ravimikoormuse tase vahemikus 1 kuni ligikaudu 8, ligikaudu 2 kuni ligikaudu 6, ligikaudu 3 kuni ligikaudu 5, ligikaudu 3 kuni ligikaudu 4, ligikaudu 3,1 kuni ligikaudu 3,9, ligikaudu 3,2 kuni ligikaudu 3,8, ligikaudu 3,2 kuni ligikaudu 3,7, ligikaudu 3,2 kuni ligikaudu 3,6, ligikaudu 3,3 kuni ligikaudu 3,8 või ligikaudu 3,3 kuni ligikaudu 3,7. Tõepoolest on kindlate ADC-de puhul näidatud, et optimaalne ravimüksuste suhe antikeha kohta võib olla väiksem kui 8 ning see võib olla ligikaudu 2 kuni ligikaudu 5, vaadake US patendipublikatsiooni 2005-0238649 A1 (mis on käesolevasse täielikult viitena kaasatud).

**[0434]** Teatud teostustes konjugeeritakse konjugeerimisreaktsiooni käigus antikehaga väiksem kui teoreetiliselt maksimaalne arv ravimüksusi. Antikeha võib näiteks sisaldada lüsiini-

jääke, mis ei reageeri ravimi ja linkeriga vaheühendi või linker-reagendiga, nagu on kirjeldatud allpool. Üldiselt ei sisalda antikehad palju vabu ja reaktiivseid tsüsteiini tiolrühmi, mida võib siduda ravimüksusega, tegelikult on enamus tsüsteiinijääke antikehades disulfiidsildade koosseisus. Teatud teostustes võib antikeha redutseerida redutseeriva agensiga, nagu ditio-treitol (DTT) või trikarbonüületüülfosfiin (TCEP), osalise või täieliku redutseerimise tingimustes, et tekitada reaktiivseid tsüsteiini tiolrühmi. Teatud teostustes allutatakse antikeha denatureerivatele tingimustele, et avada reaktiivseid nukleofiilseid rühmi, nagu lüsiin ja tsüsteiin.

**[0435]** ADC koormust (ravimi/antikeha suhet) võib kontrollida erineval viisil: (i) ravimi ja linkeriga vaheühendi või linker-reagendi molaarse ühelaadiga piiramisega antikeha suhtes, (ii) konjugeerimisreaktsiooni aja või temperatuuri piiramisega, (iii) luues tsüsteiini tiolrühma modifitseerimiseks osalised või piiravad redutseerimistingimused, (iv) kujundades rekombinantsete meetodite abil antikeha aminohapete järjestuse selliselt, et linkeriga ja ravimi sidumiste arvu ja/või asendi kontrollimiseks muudetakse tsüsteiinijääkide arvu ja asendit (nagu tioMab-is või tioFab-is, mida valmistatakse siin ja patendipublikatsioonis WO 2006/034488 (mis on käesolevasse täielikult viitena kaasatud) kirjeldatud viisil).

**[0436]** On mõisteteav, et kui enam kui üks nukleofiilset rühma reageerib ravimi ja linkeriga vaheühendiga või linker-reagendiga ja sellele järgneb reaktsioon ravimüksus-reagendiga, siis on saadav produkt ADC-ühendite segu, milles mõnel juhul on antikehaga seotud üks või enam ravimüksust. Antikeha kohta seotud ravimüksuste keskmise arvu selles segus saab arvutada kahekordse, antikeha- või ravimspetsiifilise, ELISA-analüüsi tulemuste alusel. Üksikuid ADC-molekule võib segus tuvastada massispektroskoopia abil ning lahutada HPLC-ga, näiteks hüdrofoobse vastasmõju kromatograafia abil (vaadake nt trükiseid Hamblett, K. J. et al., "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," kokkuvõtte nr 624, Ameerika vähiuuringute ühingu (*American Association for Cancer Research*) aastakoosolek 2004, 27.-31. märts 2004, Proceedings of the AACR, 45. köide, märts 2004, Alley, S. C. et al., "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," kokkuvõtte nr 627, Ameerika vähiuuringute ühingu aastakoosolek 2004, 27.-31. märts 2004, Proceedings of the AACR, 45. köide, märts 2004). Teatud teostustes võib ühe koormusväärtusega ja homogeense ADC eraldada konjugeerimissegust elektroforeesi või kromatograafia abil.



### Mõned immunokonjugaatide valmistamise meetodid

[0437] Valemile I vastavat ADC-d võib valmistada mitmel viisil, kasutades selleks eriala asjatundjatele tuntud orgaanilise keemia reaktsioone, tingimusi ja reagente, mis hõlmavad järgnevaid: (1) antikeha nukleofiilse rühma reaktsioon bivalentse linker-reagendiga, et kovalentse sideme kaudu moodustada Ab-L, millele järgneb reaktsioon ravimüksusega D, ning (2) ravimüksuse nukleofiilse rühma reaktsioon bivalentse linker-reagendiga, et kovalentse sideme kaudu moodustada D-L, millele järgneb reaktsioon antikeha nukleofiilse rühmaga. Iseloomulike meetodeid valemile I vastava ADC valmistamiseks viimatinimetatud viisil on kirjeldatud US patendipublikatsioonis 20050238649 A1 (mis on käesolevasse täielikult viitena kaasatud).

[0438] Antikehade nukleofiilsed rühmad hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: (i) N-terminaalsed aminorühmad, (ii) külgahela aminorühmad, näiteks lüsiinil, (iii) külgahela tioolrühmad, näiteks tsüsteiinil ning (iv) suhkru hüdroksüül- või aminorühmad, kui antikeha on glükosüülitud. Amino-, tiool- ja hüdroksüülrühmad on nukleofiilsed ja võimelised kovalentse sideme moodustamiseks reageerima eletrofiilsete rühmadega linkerüksustes ja linker-reagentides, mis hõlmavad järgnevaid: (i) aktiivsed estrid, nagu NHS-estrid, HOBt-estrid, haloformaadid ja happelised haliidid, (ii) alküül- ja bensüülhaliidid nagu haloatsetamiidid, (iii) aldehydid, ketoonid, karboksüül- ja maleimiidrühmad. Teatud antikehades leidub redutseeritavaid ahelatevahelisi disulfiidrühmi, see tähendab tsüsteiinsildu. Linker-reagentidega konjugeerimiseks võib antikehasid muuta reaktiivseteks, töödeldes neid selleks redutseeriva agensiga nagu DTT (ditiotreitool) või trikarbonüületüülfosfiin (TCEP) selliselt, et antikeha on kas täielikult või osaliselt redutseeritud. Teoreetiliselt moodustab iga tsüsteiinsild kaks reaktiivset nukleofiilset rühma. Alternatiivselt võib sulfhüdrüülrühmi antikehasse sisestada lüsiinijääkide modifitseerimise teel, näiteks lüsiini reaktsioonis 2-iminotiolaaniga (Traut'i reagentiga), mille tulemuseks on amiini muundumise tiooliks. Antikehasse võib lisada reaktiivseid tioolrühmi, sisestades üks, kaks, kolm, neli või enam tsüsteiinijääki (nt valmistades antikeha variante, mis sisaldavad ühte või enamat mittenatiivset tsüsteiinijääki).

[0439] Leiutisekohaseid antikeha ja ravimi konjugaate võib valmistada ka antikeha elektrofiilse rühma, nagu aldehyd- või ketoonkarbonüülrühma reaktsioonil linker-reagendi või ravimi nukleofiilse rühmaga. Linker-reagentis kasutatavad nukleofiilsed rühmad hõlmavad, nendega piirdumata, hüdrasiid-, oksiiim-, amino-, hüdrasiin-, tiosemikarbasoon-, hüdrasiin-

karboksülaat- ja arüülhüdrasiidrühma. Ühes teostuses on antikeha modifitseeritud linker-reagendi või ravimi nukleofiilsete asendajatega reageerimiseks võimeliste elektrofiilsete üksuste sisestamise teel. Veel ühes teostuses võivad glükosüülitud antikehade suhkru olla oksüdeeritud näiteks oksüdeerivate perjodaatreagentidega, et moodustada aldehüüd- või ketoonrühmi, mis võivad reageerida linker-reagentide või ravimüksuste aminorühmaga. Reaktsiooniproduktina saadavad Schifffi aluse imiinrühmad võivad moodustada stabiilse sideme või neid võib redutseerida näiteks borohüdriidreagentidega, et moodustada stabiilsed amiinsidemed. Ühes teostuses võib glükosüülitud antikeha süsivesikosa reaktsioon galaktoosi oksüdaasi või naatriummetaperjodaadiga anda saagiseks karbonüülrühmad (aldehüüdi ja ketooni) antikehas, millel võib lasta reageerida sobivate rühmadega ravimis (Hermanson, Bioconjugate Techniques). Veel ühes teostuses võib N-terminaalset seriini- või treoniinjääki sisaldavatel valkudel lasta reageerida naatriummetaperjodaadiga, saades esimese aminohappe asemel tulemuseks aldehüüdi (Geoghegan, Stroh, (1992) Bioconjugate Chem., 3: 138-146, US patendipublikatsioon 5362852). Sellisel aldehüüdil võib lasta reageerida ravimüksuses või linkeris oleva nukleofiilse rühmaga.

**[0440]** Ravimüksuse nukleofiilsed rühmad hõlmavad, nendega piirdumata, järgnevaid: amiin-, tiol-, hüdroksüül-, hüdrasiid-, oksiiim-, hüdrasiin-, tiosemikarbasoon-, hüdrasiin-karboksülaat- ja arüülhüdrasiidrühmad, mis on kovalentset sidet moodustades võimelised reageerima linkerüksuste ja linker-reagentide elektrofiilsete rühmadega, mis hõlmavad järgnevaid: (i) aktiivsed estrid, nagu NHS-estrid, HOBt-estrid, haloformaadid ja happelised haliidid, (ii) alküül- ja bensüülhaliidid nagu haloatsetamiidid, (iii) aldehüüdid, ketoonid, karboksüül- ja maleimiidrühmad.

**[0441]** Mittepiiravalt võivad leiutisekohased ühendid hõlmata ADC-sid, mis on valmistatud ristsiduvate reagentide 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 ja sulfo-SMPB ning SVSB (suktsiinimidüül-(4-vinüülsulfoon)bensoaat) abil, need ühendid on kaubanduslikult saadavad (nt firmast Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., US), vaadake lehekülgi 467-498 2003-2004 aasta rakenduste käsiraamatus ja kataloogis (Applications Handbook and Catalog).

**[0442]** Antikeha ja tsütotoksilist agensit sisaldavad immunokonjugaadid võivad olla valmistatud erinevate valku siduvate bifunktsionaalsete agensite, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditio)propionaat (SPDP), suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsüklohek-

saan-1-karboksülaad (SMCC), iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladiipimidaat-HCl), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehüüdid (nagu glutaaraldehüüd), bisasidoühendid (nagu bis(p-asidobensüül)heksaandiamiin), bisdiasooniumderivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluuen-2,6-diisotsüanaat) ja bisaktiivsed fluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen) abil. Ritsiini immunotoksiini võib näiteks valmistada nii, nagu on kirjeldatud trükises Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). <sup>14</sup>C-märgistatud 1-isotiotsüanatobensüül-3-metüüldietüleentriaminopentaäädikhape (MX-DTPA) on näitlik kelaativ agens radionukleotiidi konjugeerimiseks antikehaga, vaadake patendipublikatsiooni WO 94/11026.

**[0443]** Alternatiivina võib antikeha ja tsütotoksilist agensit hõlmava liitvalgu valmistada näiteks rekombinantsete meetodite või peptiidisünteesi abil. Rekombinantne DNA-molekul võib sisaldada konjugaadi antikeha ja tsütotoksilisi osasid kodeerivaid piirkondi, mis külgevad teineteisega või on eraldatud piirkonnaga, mis kodeerib konjugaadi soovitud omadusi mittekahjustavat linkerpeptiidi.

**[0444]** Veel ühes teostuses võib antikeha konjugeerida „retseptoriga” (nagu streptavidiin), et kasutada seda antikeha eelsuunamises kasvajale, selle meetodi kohaselt manustatakse patsiendile esmalt antikeha ja retseptori konjugaat ning seejärel, kasutades organismist eemaldavat agensit, eemaldatakse mitteseondunud konjugaat ringlusest ning manustatakse „ligand” (nt avidiin), mis on konjugeeritud tsütotoksilise agensiga (nt radionukleotiidiga).

#### *Immunokonjugaatide näited – tioantikeha ja ravimi konjugaadid*

#### CD22-vastaste tsüsteiini-modifitseeritud antikehade valmistamine

**[0445]** Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastaste antikehade ja lähteantikehade aminohapete järjestuste variante kodeerivat DNA-d võib valmistada mitmete meetodite abil, mis, nendega piirdumata, hõlmavad looduslikust allikast eraldamist (juhul kui aminohapete järjestuse variant esineb looduslikult), valmistamist kohtspetsiifilise (või oligonukleotiidivahendatud) 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) trükises PCR Protocols, lk 177-183, Academic Press, Ito et al., (1991) Gene, 102: 67-70,

Bernhard et al., (1994) *Bioconjugate Chem.*, 5: 126-132 ja Vallette et al., (1989) *Nuc. Acids Res.*, 17: 723-733) ja kassett-mutageneesi abil (Wells et al., (1985) *Gene*, 34: 315-323) polüpeptiidi kodeeriva DNA varemvalmistatud preparaadist. Protokollid, reagentikomplektid ja reagentid mutageneesi läbiviimiseks on kaubanduslikult saadavad, näiteks QuikChange® Multi Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Üksikmutatsioone võib genereerida ka oligonukleotiidivahendatud mutageneesi teel, kasutades PCR-l põhinevas mutageneesis maatriksina 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). Rekombinantseid antikehavariante saab konstrueerida ka restriksioonifragmentide manipuleerimise teel või kattuva pikenduse PCR-ga, kasutades selleks sünteetilisi oligonukleotiidide. Mutageensed praimerid kodeerivad asendust (asendusi) tsüsteiini koodoniga. Selliseid tsüsteiiniga modifitseeritud antikehasid kodeeriva DNA valmistamiseks võib rakendada standardseid mutageneesitehnikaid (Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 ja Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993).

**[0446]** Faagidisplei tehnoloogiat (McCafferty et al., (1990) *Nature*, 348: 552-553) võib kasutada inimese CD22-vastaste antikehade ja antikehafragmentide *in vitro* valmistamiseks immuniseerimata doonorite immunoglobuliini varieeruva (V) domeeni geenivalimist. Selle tehnika kohaselt kloonitakse antikeha V-domeeni geenid raamistikus niitja faagi kas peamise või minoorse kattevalgu geeni, nagu M13 või fd, ja esitletakse funktsionaalsete antikehafragmentidena faagipartikli pinnal. Kuna niitjas partikkel sisaldab faagi genoomi üheaahelalist DNA koopiat, siis kaasneb antikeha funktsionaalsetel omadustel põhineva selektsiooniga ka selekteeritud omadustega antikeha kodeeriva geeni selektsioon. Seega jälgendab faag mõningaid B-raku 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 patendipublikatsioonid 5565332, 5573905, 5567610 ja 5229275).

**[0447]** CD22-vastaseid antikehasid võib keemiliselt sünteesida oligopeptiidide tuntud sünteesimeetodite abil või valmistada ja puhastada rekombinantse tehnoloogia abil. Vastavaid aminohapete järjestusi või nende osasid võib valmistada vahetu peptidisünteesi teel,

kasutades tahke faasi 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* võib valgusüntees toimuda manuaalselt või automatiseeritult. Automatiseeritud süntees tahkel faasil võib toimuda näiteks t-BOC-i või Fmoc-ga kaitstud aminohapete ja Applied Bisystems'i valgusüntesaatori (Foster City, CA) kasutamisel vastavalt tootja juhenditele. CD22-vastase antikeha või CD22 polüpeptiidi erinevad osad võib ükshaaval keemiliselt sünteesida ning soovitud CD22-vastase antikeha või CD22 polüpeptiidi saamiseks kombineerida saadud osad keemiliste või ensümaatiliste meetodite abil.

**[0448]** Antikeha fragmentide tootmiseks on välja töötatud mitmesuguseid meetodeid. Traditsiooniliselt saadakse need fragmendid intaktsete antikehade proteolüütilise lõikamise teel (vaadake nt trükiseid Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24: 107-117 (1992) ja Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)) või toodetakse vahetult rekombinantsetes peremeesrakkudes. CD22-vastase antikeha Fab, Fv ja scFv fragmente võib ekspresseerida ja sekreteerida *E. coli* rakkudest, mis võimaldab nende fragmentide suurte koguste hõlpsat tootmist. Antikeha fragmente võib eraldada faagi antikehakogudest, mida on kirjeldatud eespool. Alternatiivselt võib Fab'-SH fragmente koguda vahetult *E. coli*'st ning keemiliselt F(ab')<sub>2</sub> fragmentideks kokku siduda (Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)) või F(ab')<sub>2</sub> fragmente võib eraldada vahetult rekombinantse peremeesraku kultuurist. CD22-vastane antikeha võib olla üheaahelaline (scFv) Fv fragment (vaadake patendipublikatsioone WO 93/16185, US 5571894 ja 5587458). CD22-vastane antikeha fragment võib olla ka „lineaarne antikeha“ (US patendipublikatsioon 5641870). Sellised lineaarsed antikehad võivad olla monospetsiifilised või bispetsiifilised.

**[0449]** Allpool esitatud kirjelduses käsitletakse eelkõige CD22-vastaste antikehade valmistamist CD22-vastast antikeha kodeerivat nukleiinhapet sisaldava vektoriga transformeeritud või transfekteeeritud rakkude kultiveerimise teel. CD22-vastast antikeha kodeeriva DNA võib saada cDNA kogust, mis on valmistatud koest, mis arvatakse sisaldavat ja detekteeritaval tasemel ekspresseerivat CD22-vastase antikeha mRNA-d. Sellele vastavalt võib inimese CD22-vastase antikeha või CD22 polüpeptiidi DNA-d otstarbekohaselt saada inimese koest valmistatud cDNA kogust. CD22-vastast antikeha kodeeriva geeni või saada ka genoomsest kogust või tuntud sünteesimeetodeid kasutades (nt automatiseeritud nukleiinhappesüntees).

**[0450]** Disainimis-, selekteerimis- ja valmistamismeetodid võimaldavad saada CD22-vastaseid tsüsteiini-modifitseeritud antikehasid, mis on reaktiivsed elektrofiilse funktsio-

naalse rühma suhtes. Lisaks võimaldavad need meetodid saada konjugeeritud antikehaühendeid nagu antikeha ja ravimi konjugaat (ADC), kus ravimühend on konjugeeritud määratud, disainitud ja valitud kohtades. Antikeha pinnal olevad reaktiivsed tsüsteiinijäägid võimaldavad ravimüksust spetsiifiliselt konjugeerida tiolreaktiivse rühma, näiteks maleimiidi või haloatsetüüli kaudu. Tsüsteiinijäägi funktsionaalse tiolrühma nukleofiilne reaktiivsus maleimiidrühma suhtes on ligikaudu 1000 korda suurem kui mistahes muul valgus esineval aminohappe funktsionaalsel rühmal, nagu lüsiinijääkide aminorühm või N-terminaalne aminorühm. Tiool-spetsiifilised funktsionaalsed rühmad jodoatsetüül- ja maleimiidreagentides võivad reageerida amiinrühmadega, kuid selleks on vajalik suurem pH väärtus ( $> 9,0$ ) ja pikemad reaktsiooniajad (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London). Vaba tiolrühma kogust valgus võib hinnata Ellmanni standardse analüüsiga. Disulfiidseotud pentameeri näide on immunoglobuliin M, samas kui immunoglobuliin G on subühikuid siduvate sisemiste disulfiidsildadega valgu näiteks. Selliste valkude puhul on vaba reaktiivse tioli tekitamiseks vajalik disulfiidsildade redutseerimine reagentiga, nagu ditiotreitool (DTT) või selenool (Singh et al., (2002) *Anal. Biochem.*, 304: 147-156) Selle lähenemise tulemuseks võib olla antikeha tertsialse struktuuri ja antigeeniga seondumise spetsiifilisuse kadumine.

**[0451]** PHESELECTOR (faag-ELISA reaktiivsete tiolrühmade valimiseks) analüüs võimaldab antikehades leiduvate reaktiivsete tsüsteiinirühmade tuvastamist faag-ELISA formaadis, olles sellega abiks tsüsteiini-modifitseeritud antikehade kujundamisel (patendipublikatsioon WO 2006/034488). Tsüsteiini-modifitseeritud antikehaga kaetakse plaadi süvendid, sellele järgneb inkubeerimine faagipartiklitega, HRP-ga märgistatud sekundaarse antikeha lisamine ning neeldumise detekteerimine. Faagil esitletavaid mutantseid valke saab skriinida kiirel, lihtsal ja suure läbilaskevõimega viisil. Kasutades sama lähenemist võib tsüsteiini-modifitseeritud antikehade kogusid toota ja allutada valikule seondumise järgi, et tuvastada juhuslikes antikehade või muude valkude valk-faag kogudes sobivate reaktiivsete vaba tsüsteiini saitide liitumist. See meetod hõlmab faagil esitletud muteeritud tsüsteiiniga valkude reageerimist afiinsusreagenti või samuti tiolreaktiivse reporterrühmaga.

**[0452]** PHESELECTOR-analüüs võimaldab skriinida antikehades esinevaid reaktiivseid tiolrühmi. Iseloomulik on variandi A121C tuvastamine selle meetodi abil. Tõhusalt võib otsida tervest Fab-molekulist, et tuvastada enam reaktiivsete tiolrühmadega TioFab-i variante. Detekteerimaks ja kvantifitseerimaks lahusti ligipääsu polüpeptiidi aminohappejää-

kidele, rakendati pinna suhtelise ligipääsetavuse parameetrit. Pinna ligipääsetavust võib väljendada pindalana ( $\text{\AA}^2$ ), mille võib viia ühendusse lahustimolekuli, näiteks veega. Vee poolt hõivatav ruum on ligilähedaselt kera, mille raadius on 1,4  $\text{\AA}$ . Vabalt on kättesaadav või litsentseeritav (CCP4 sekretär, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, Ühendkuningriik, Faks: (+44) 1925 603825 või saadav internetist: [www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html](http://www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)) kristallograafiliste programmide tarkvarapakett CCP4 Suite, milles rakendatakse algoritme valgu iga aminohappe pinna ligipääsetavuse arvutamiseks, kui on teada selle valgu röntgenkristallograafiliselt saadud koordinaadid ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst., D50: 760-763). Kaheks iseloomulikuks tarkvaramooduliks, millega teostatakse pinna ligipääsetavuse arvutusi, on "AREAIMOL" ja "SURFACE", mis tuginevad trükises B. Lee, F. M. Richards, (1971) J. Mol. Biol., 55: 379-400 avaldatud algoritmidele. AREAIMOL defineerib lahustile ligipääsetava valgu pinna kerakujulise sondi (mis esindab lahustimolekuli) keskpaiga asukohana, kui see sond veereb üle valgu Van der Waals'i pinna. AREAIMOL arvutab lahustile ligipääsetava pindala, tekitades pinnapunktid laiendatud keral iga aatomi juures (aatomi keskpaigast kaugusel, mis on võrdne aatomi ja sondi raadiuste summaga) ning kõrvaldades need, mis jäävad naaberaatomitega seotud samasugustesse keradesse. AREAIMOL leiab lahustile ligipääsetava pindala PDB-koordinaatfailis olevatele aatomitele ning summeerib ligipääsetava pindala jäägi, ahela või kogu molekuli jaoks. Ligipääsetavad pindalad (või pindalade erinevused) üksikute aatomite jaoks võib kirjutada pseudo-PDB-väljundfaili. AREAIMOL eeldab iga elemendi jaoks ühte raadiust ning tunneb ära ainult piiratud arvu erinevaid elemente.

**[0453]** AREAIMOL ja SURFACE annavad absoluutse ligipääsetavuse, see tähendab ruutongströmide ( $\text{\AA}^2$ ) arvu. Pinna suhteline ligipääsetavus arvutatakse võrdluses standardse etalonolekuga, mis on mingile polüpeptiidi aminohappele omane. Etalonolekuks on tripeptiid Gly-X-Gly, milles X on huvipakkuv aminohape ja etalonolek peaks olema "laiendatud" konformatsioon, see tähendab selline, nagu on  $\beta$ -ahelates. Laiendatud konformatsioon annab maksimaalse ligipääsu X-le. Arvutatud ligipääsetav pindala jagatakse ligipääsetava pindalaga etalonolekus tripeptiidis Gly-X-Gly ning saadakse jagatis, mis on suhteline ligipääsetavus. Ligipääsetavus protsentides saadakse suhtelise ligipääsetavuse korrutamisel sajaga. Pinna ligipääsetavuse arvutamiseks on kasutatav veel üks iseloomulik algoritm, mis tugineb programmi xsae moodulile SOLV (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel) ja mis arvutab polüpeptiidi röntgenanalüüsi koordinaatide alusel mingi aminohappe jäägi suhtelise ligipää-

setavuse kerakujulisele veemolekulile. Tuginedes kättesaadavale informatsioonile kristallstruktuuri kohta (Eigenbrot et al., (1993) *J. Mol. Biol.*, 229: 969-995), saab pinna suhtelise ligipääsetavuse arvutada antikeha iga aminohape jaoks.

**[0454]** Tsüsteiini-modifitseeritud antikehasid kodeeriv DNA on hõlpsalt eraldatav ja sekveeeritav tavapäraste protseduuride abil (nt kasutades oligonukleotiidsone, mis on võimelised spetsiifiliselt seonduma hiire antikehade kergeid ja raskeid ahelaid kodeerivate geenidega). Sellise DNA allikaks on hübridoomirakud. Monokloonsete antikehade sünteesiks rekombinantsetes peremeesrakkudes võib kord juba eraldatud DNA sisestada ekspressioonivektoritesse, mis seejärel transfekteeritakse peremeesrakkudesse, nagu *E. coli* rakud, ahvi COS-rakud, hiina hamstri munasarja (CHO) rakud või muud imetajate peremeesrakud nagu müeloomirakud (US patendipublikatsioonid 5807715, 2005/0048572, 2004/0229310), mis muul viisil antikehavalku ei tooda.

**[0455]** Pärast disainimist ja selekteerimist võib tsüsteiini-modifitseeritud antikehasid, näiteks tioFab-e, milles on modifitseeritud, suure reaktiivsusega ja paardumata tsüsteiinijäägid, toota: (i) ekspresseerides neid bakteriaalses, näiteks *E. coli*, süsteemis (Skerra et al., (1993) *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262, Pluckthun, (1992) *Immunol. Revs.*, 130: 151-188) või imetaja rakukultuuri süsteemis (WO 01/00245), näiteks hiina hamstri munasarjarakkudes (CHO), ning (ii) puhastades harilikke valgupuhastamise meetodite abil (Lowman et al., (1991) *J. Biol. Chem.*, 266(17): 10982-10988).

**[0456]** Modifitseeritud tsüsteiini tiolrühmad reageerivad elektrofiilsete linker-reagentide ja ravimi ja linkeri vaheühenditega, moodustades tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ja ravimi konjugaate ning teisi märgistatud tsüsteiini-modifitseeritud antikehasid. Tsüsteiini-modifitseeritud antikehade tsüsteiinijääkidel, mis esinevad lähteantikehades ning on paardunud ja moodustavad ahelasiseseid või ahelatevahelisi disulfiidsidemeid, ei ole reaktiivseid tiolrühmi (kuni neid pole töödeldud redutseeriva agensiga) ning need ei reageeri elektrofiilsete linker-reagentide ja ravimi ja linkeri vaheühenditega. Uus, modifitseeritud tsüsteiinijääk võib jääda paardumata ning olla võimeline reageerima, see tähendab konjugeeruma elektrofiilse linker-reagenti ja ravimi ja linkeri vaheühendiga nagu ravim-maleimiid. Iseloomulikud ravimi ja linkeri vaheühendid hõlmavad järgnevaid: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE ja MC-vc-PAB-MMAF. Kergete ja raskete ahelate kujundatud tsüsteiinijääkide struktuursed asendid numereeritakse vastavalt järjestikuse numeratsioonisüsteemile. N-terminusest alustades korreleerub see järjestikune numeratsioonisüsteem Kabat'i numeratsiooni-



süsteemiga (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), kuid erineb Kabat'i numeratsioonisüsteemist (alumine rida) insertioonide poolest, mis on märgitud kui a, b, c. Kabat'i numeratsioonisüsteemi kasutades võib tegelik lineaarne aminohapete järjestus sisaldada vähem aminohappeid või sisaldada lisaaminohappeid vastavalt varieeruva domeeni FR-i või CDR-i lühendamisele või lisatud insertioonidele. Tsüsteiiniga modifitseeritud raske ahela variantsed saidid on tähistatud järjekohase numeratsiooni ja Kabat'i numeratsiooniskeemiga.

**[0457]** Ühes teostuses valmistatakse CD22-vastane tsüsteiini-modifitseeritud antikeha protseduuriga, mis hõlmab:

- (a) CD22-vastase lähteantikeha ühe või mitme aminohapejäägi asendamist tsüsteiiniga, ning
- (b) CD22-vastase tsüsteiini-modifitseeritud antikeha tiolreaktiivsuse määramist, lastes tsüsteiini-modifitseeritud antikehal reageerida tiolreaktiivse reagentiga.

**[0458]** Tsüsteiinantikeha võib tiolreaktiivse reagenti suhtes olla reaktiivsem kui lähteantikeha.

**[0459]** Vabad tsüsteiinijäägid võivad paikneda rasketes või kergetes ahelates või konstantsetes või varieeruvates domeenides. Antikehafragmendi, näiteks Fab-i, võib samuti modifitseerida ühe või enama tsüsteiiniga, asendades antikehafragmendi aminohappeid, et saada tsüsteiini-modifitseeritud antikehafragmente.

**[0460]** Samuti kirjeldatakse siin CD22-vastase tsüsteiini-modifitseeritud antikeha valmistamise meetodit, mis hõlmab:

- (a) CD22-vastasesse lähteantikehasse ühe või mitme tsüsteiinijäägi sisestamist, et valmistada CD22-vastane tsüsteiini-modifitseeritud antikeha, ning
- (b) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha tiolreaktiivsuse määramist tiolreaktiivse reagenti suhtes,

mille kohaselt tsüsteiinkujundatud antikeha on tiolreaktiivse reagenti suhtes reaktiivsem kui lähteantikeha.

**[0461]** Tsüsteiini-modifitseeritud antikeha valmistamise meetodi etapp (a) võib hõlmata:

- (i) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha kodeeriva nukleiinhappe muteerimist,
- (ii) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ekspresseerimist, ning
- (iii) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha eraldamist ja puhastamist.

**[0462]** Tsüsteiini-modifitseeritud antikeha valmistamise meetodi etapp (b) võib hõlmata tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ekspresseerimist viiruspartiklil, mis valitakse faagi- või fagemiidipartiklite seast.

**[0463]** Tsüsteiini-modifitseeritud antikeha valmistamise meetodi etapp (b) võib hõlmata ka:

- (i) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha reageerimist tiolreaktiivse afiinsusreagendiga, et saada afiinsusmargistatud tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ning
- (ii) afiinsusmargistatud tsüsteiini-modifitseeritud antikeha seondumise mõõtmist püüd-  
miskeskkonnaga.

**[0464]** Veel üheks näiteks on meetod suure reaktiivsuse ja paardumata tsüsteiinidega tsüsteiini-modifitseeritud antikehade tiolreaktiivsuse skriinimiseks, mis hõlmab:

- (a) lähteantikehasse ühe või mitme tsüsteiinijäägi sisestamist, et saada CD22-vastane tsüsteiini-modifitseeritud antikeha,
- (b) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha reageerimist tiolreaktiivse afiinsusreagendiga, et saada afiinsusmargistatud tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ja
- (c) afiinsusmargistatud tsüsteiini-modifitseeritud antikeha seondumise mõõtmist püüd-  
miskeskkonnaga ning
- (d) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha tiolreaktiivsuse määramist tiolreaktiivse reagendi suhtes.

**[0465]** Tsüsteiini-modifitseeritud antikehade skriinimise meetodi etapp (a) võib hõlmata:

- (i) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha kodeeriva nukleiinhappe muteerimist,
- (ii) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ekspresseerimist ning

(iii) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha eraldamist ja puhastamist.

**[0466]** Tsüsteiini-modifitseeritud antikehade skriinimise meetodi etapp (b) võib hõlmata tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ekspresseerimist viiruspartiklil, mis valitakse faagi- või fagemiidipartiklite seast.

**[0467]** Tsüsteiini-modifitseeritud antikeha skriinimise meetodi etapp (b) võib hõlmata ka:

- (i) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha reageerimist tiolreaktiivse afiinsusreagendiga, et saada afiinsusmargistatud tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ning
- (ii) afiinsusmargistatud tsüsteiini-modifitseeritud antikeha seondumise mõõtmist püüd-  
miskeskonnaga.

#### CD22-vastase 10F4 IgG variantide modifitseerimine tsüsteiiniga

**[0468]** Tsüsteiin sisestati raske ahela asendisse 118 (EU numeratsioon) (järjestikuse numeratsiooni kohaselt ekvivalentne raske ahela asendile 121) täispikkadesse kimäärsetesse monokloonsetesse CD22-vastastesse lähteantikehadesse siin kirjeldatud tsüsteiiniga modifitseerimise meetodite kohaselt.

**[0469]** Lähteantikeha, "std CD22-vastane Hu 10F4v3 Fc" (raske ahela järjestus: SEQ ID NO: 88, kerge ahela järjestus: SEQ ID NO: 87, joonis 5B) modifitseeriti tsüsteiiniga ja saadi "A118C tio-hu-CD22-vastane 10F4v3" (raske ahela järjestus: SEQ ID NO: 92, kerge ahela järjestus: SEQ ID NO: 91, joonis 17), "S400C tio-hu-anti-CD22 10F4v3" (raske ahela järjestus: SEQ ID NO: 93, kerge ahela järjestus: SEQ ID NO: 91, joonis 17) või "V205C tio anti-CD22 10F4v3" (raske ahela järjestus: SEQ ID NO: 88, kerge ahela järjestus: SEQ ID NO: 91, joonis 5B ja 17).

**[0470]** Need tsüsteiini-modifitseeritud monokloonsed antikehad ekspresseeriti CHO (Hiina hamstri munasarjarakud) rakkudes transientse fermentatsiooniga söötmes, mis sisaldas 1 mM tsüsteiini.

Tsüsteiini-modifitseeritud märgistatud CD22-vastased anti kehad

**[0471]** CD22-vastased tsüsteiini-modifitseeritud anti kehad võivad olla kohtspetsiifiliselt ja tõhusalt seotud tioolreaktiivse reagentiga. Tioolreaktiivne reagent võib olla multifunktsionaalne linker-reagent, püüdev, see tähendab afiinsusreagent, märgistav reagent (nt biotiin-linker-reagent), detekteeritav märgis (nt fluorofoorreagent), immobiliseeriv tahkes faasis reagent (nt SEPHAROSE™, polüstüreen või klaas) või ravimi ja linkeri vaheühend. Üheks tioolreaktiivse reagenti näiteks on N-etiüülmaleimiid (NEM). Iseloomuliku teostusena saadakse tioFab-i reageerimisel biotiin-linker-reagentiga biotinüülitud tioFab, mille abil võib tuvastada ja mõõta modifitseeritud tsüsteiini jäägi esinemist ja reaktiivsust. TioFab-i reageerimisel multifunktsionaalse linker-reagentiga saadakse funktsionaalse linkeriga tioFab, mis võib edasi reageerida ravimüksusreagenti või muu märgisega. TioFab-i reageerimine ravimi ja linkeri vaheühendiga annab tioFab-i ja ravimi konjugaadi.

**[0472]** Üldiselt võib siin kirjeldatud iseloomulikke meetodeid rakendada anti kehade identifitseerimisel ja tootmisel ning veel üldisemalt võib siin kirjeldatud modifitseerimis- ja skriinimisetappide rakendamise abil identifitseerida ja toota muid valke.

**[0473]** Sellist lähenemist võib rakendada, et konjugeerida muid tioolreaktiivseid agenseid, milles reaktiivseks rühmaks on näiteks maleimiid, jodoatsetamiid, püridüüldisulfiid või muu tioolreaktiivne konjugeerimispartner (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc., Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.*, 3: 2, Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London, Means (1990) *Bioconjugate Chem.*, 1: 2, Hermanson, G. trükises *Bioconjugate Techniques*, (1996) Academic Press, San Diego, 40-55, 643-671). Tioolreaktiivne reagent võib olla ravimüksus, fluorofoor nagu fluorestseeruv värv, mis võib olla fluorestsein või rodamiin, kelaativ agens detekteerimiseks või kiiritusravi-metall, peptidüül- või mittepeptidüülmärgis või detekteeritav märgis või ringlusest eemaldamist muutev agens nagu polüetüleenglükooli mitmesugused isomeerid, peptiid, mis seondub mingi kolmanda komponendiga või muu süsivesik või lipofiilne agens.

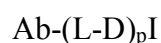
CD22-vastaste tsüsteiini-modifitseeritud antikehade kasutamine

[0474] CD22-vastased tsüsteiini-modifitseeritud antikehad ja nende konjugaadid võivad leida kasutust ravi- ja/või diagnostiliste agensitena. Lisaks esitab käesolev leiutus ühe või enama B-raku häirega seotud sümptomi vältimise, mõjutamise, ravimise või leevendamise meetodid. Eriti esitab käesolev leiutus ühe või enama raku proliferatsiooniga seotud häire nagu vähk, näiteks lümfoom, mitte-Hodgkin'i lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiveerunud agressiivne NHL, retsidiveerunud indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsütleukeemia (CLL), väikerakuline lümfotsütaarne lümfoom, leukeemia, karvrakuline leukeemia (HCL), akuutne lümfotsütleukeemia (ALL) ja mantelrakuline lümfoom, vältimise, mõjutamise, ravimise või leevendamise meetodid. Lisaks esitab käesolev leiutus CD22-ga seotud häirete või selliste häirete tekkeks soodumuse diagnoosimise meetodid, samuti eelistatult B-rakkudega seotud CD22 polüpeptiididega seonduvate antikehade ja antigeeniga seonduvate antikehafragmentide identifitseerimise meetodid.

[0475] Leiutise järgmine aspekt on suunatud tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikeha kasutamisele ravimi valmistamiseks, mis on kasulik B-rakuga seotud häiretest tingitud seisundi ravimisel.

Tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ja ravimi konjugaadid (tio-antikeha ja ravimi konjugaadid)

[0476] Leiutise veel üheks aspektiks on antikeha ja ravimi konjugaat, mis sisaldab tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastast antikeha (Ab) ja auristatiin-ravimüksust (D), kus tsüsteiini-modifitseeritud antikeha on üle ühe või enama vaba tsüsteiin-aminohappe linkerjäägiga (L) seotud D külge, ühend vastab valemile I



valem I,

kus p on 1, 2, 3 või 4 ja kus tsüsteiini-modifitseeritud antikeha on valmistatud protsessis, mis hõlmab CD22-vastase lähteantikeha ühe või enama aminohappejäägi asendamist ühe või enama vaba tsüsteiin-aminohappega.

[0477] Joonisel 10 on esitatud tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaatide (ADC) teostused, kus auristatiin-ravimüksus on seotud modifitseeritud tsüsteiini rühmaga kerges ahelas (LC-ADC), raskes ahelas (HC-ADC) ja Fc-piirkonnas (Fc-ADC).

[0478] Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaatide potentsiaalne kasulikkus hõlmab suurenenud ohutust (suurem terapeutiline indeks), paremaid PK parameetreid, antikeha ahelasiseste disulfiidsildade säilitamisest tulenevat võimalikku konjugaadi stabiliseerimist ja selle sidumisel aktiivse konformatsiooni säilimist, ravimi konjugeerimise saitide defineerimist ja homogeensemata produkti saamist tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ja ravimi konjugaatide valmistamisel tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ja ravimilinkeri-reagentidega konjugeerimise teel.

### Linkerid

[0479] "Linker", "linkerühik" või "link" tähendab keemilist üksust, mis sisaldab kovalentset sidet või aatomite ahelat, mis seob antikeha kovalentselt ravimüksusega. Erinevates teostustes on siin linker tähitatud kui L. "Linker" (L) on bifunktsionaalne või multifunktsionaalne üksus, mida võib kasutada ühe või enama ravimüksuse (D) ja antikehahühiku (Ab) sidumisel valemiga I antikeha ja ravimi konjugaatide (ADC) saamiseks. Antikeha ja ravimi konjugaate (ADC) on otstarbekas valmistada ravimi ja antikehaga sidumiseks sobiva reaktiivse funktsiooniga linkeri abil. Tsüsteiini-modifitseeritud antikeha (Ab) tsüsteiini tiolrühm võib moodustada sideme linker-reagendi, ravimüksuse või ravimi ja linkeri vaheühendi elektrofiilse funktsionaalrühmaga.

[0480] Ühe aspektina on linkeris reaktiivne sait, milles on elektrofiilne rühm, mis on reaktiivne antikehas sisalduva nukleofiilse tsüsteiini suhtes. Antikeha tsüsteiini tiolrühm on reaktiivne linkeri elektrofiilse rühma suhtes ja moodustab linkeriga kovalentse sideme. Mittepäärtavalt hõlmavad kasulikud elektrofiilsed rühmad maleimiid- ja haloatsetamiidrühmi.

[0481] Linkerid hõlmavad divalentseid rühmi, nagu alküüldiüül-, arüleen-, heteroarüleenrühm, üksuseid nagu  $(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ , korduvaid alküloksü- (nt polüetüleenoksü-, PEG-, polümetüleenoksü-) ja alküülaminoüksusi (nt polüetüleenamino-, Jeffamine<sup>TM</sup>) ning dihappestreid ning amiide, sealhulgas suktsinaati, suktsiinamiidi, diglükolaati, malonaati ja kaproamiidi.

[0482] Tsüsteini-modifitseeritud antikehad reageerivad linker-reagentide või ravimi ja linkeri vaheühenditega, elektrofiilsete funktsionaalsete rühmadega nagu maleimiid või  $\alpha$ -halokarbonüülrühm trükises Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry, 15(4): 765-773 leheküljel 766 kirjeldatud konjugeerimismeetodi kohaselt ja vastavalt näites x toodud protokollile.

[0483] Linkerid võivad koosneda ühest või enamast linkerkomponendist. Iseloomulikud linkeri komponendid hõlmavad järgnevaid: 6-maleimidokaproüül- ("MC"), maleimidopropaanüülrühm ("MP"), valiin-tsitrulliin ("val-cit" või "vc"),alaniin-fenüülalaniin ("ala-phe"), p-aminobensüloksükarbonüülrühm ("PAB"), N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüültio)pentanoaat ("SPP"), N-suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat ("SMCC") ja N-suktsiinimidüül(4-jodoatsetüül)aminobensoaat ("SIAB") ja ühe või enama korduva üksusena ("EO" või "PEO") etüleenoksü-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-rühm. Tehnika tasemes on tuntud ka muud linkeri komponendid, millest mõnda siin kirjeldatakse.

[0484] Ühes teostuses on ADC linkeril L valem



milles

- A on pikendusüksus (*stretcher unit*), mis on kovalentselt seotud antikeha (Ab) tsüsteini jäägi tiolrühmaga, ja a on 0 või 1,
- iga W on sõltumatult aminohappeüksus,
- w on sõltumatult täisarv vahemikus 0 kuni 12,
- Y on vaheliüksus, mis on kovalentselt seotud ravimüksusega, ning
- y on 0, 1 või 2

### Pikendusühik

[0485] Pikendusühik (-A-) on olemasolu korral võimeline siduma antikehaühiku aminohappeüksusega (-W-). Sellest aspektist vaadatuna sisaldab antikeha (Ab) funktsionaalset rühma, mis võib moodustada sideme pikendusühiku funktsionaalse rühmaga. Võimalikud antikehas kas looduslikult leiduvad või keemilise manipulatsiooniga sisseviidud kasulikud funktsionaalsed rühmad hõlmavad, nendega piirdumata, sulfhüdrüül (-SH), amino-, hüdroksüül- ja

karboksürühmi, karbohüdraadi anomeerseid hüdroksüülrühmi ja karboksüülrühma. Ühe aspektina on antikeha funktsionaalseteks rühmadeks sulfhüdrüül- või aminorühm. Sulfhüdrüülrühmi võib genereerida molekulisisese disulfüüdsideme redutseerimisega antikehas. Alternatiivselt võib sulfhüdrüülrühmi genereerida antikeha lüsiinijäägi aminorühma reaktsioonis 2-iminotiolaaniga (Traut'i reagentiga) või mõne muu sulfhüdrüülrühma genereeriva agensi abil. Ühes teostuses sisaldab antikeha tsüsteiini vaba tiolrühma, mis võib moodustada sideme pikendusühiku elektrofiilse funktsionaalse rühmaga. Valemiga I esitatud konjugaatidele iseloomulikke pikendusühikuid kirjeldavad valemid II ja III, kus Ab-, -W-, -Y-, -D, w ja y vastavad eespool defineeritule, ning R<sup>17</sup> on kahevalentne rühm, mis valitakse järgnevatest: -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükluül-, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, arüleen-, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-arüleen-, arüleen-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükluül-), (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsükluül)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluül-, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluül-), (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsükluül)-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)-NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)-NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>- ja (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>C(O)NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-, milles R<sup>b</sup> on H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alküül-, fenüül- või bensüülrühm, ning r on sõltumatult täisarv vahemikus 1-10.

**[0486]** Arüleenrühm hõlmab 6-20 süsinikuaatomiga kahevalentset aromaatsset süsivesinikrühma, mis on saadud kahe aatomi eemaldamisega aromaatsse tsükli süsteemist. Tüüpilised arüleenrühmad hõlmavad, nendega piirdumata, benseenist saadud rühmi, asendatud benseeni, naftaleeni, antratseeni, bifenüüli ja sarnaseid.

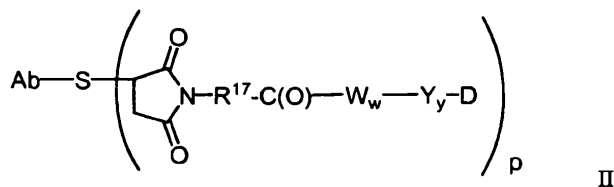
**[0487]** Heterotsükluülrühmad hõlmavad tsükliilist süsteemi, milles üks või enam tsükliiaatomitest on heteroaatom, näiteks lämmastik, hapnik ja väävel. Heterotsükluülrühm sisaldab 1 kuni 20 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ja S seast. Heterotsükkel võib olla monotsükkel, milles on 3 kuni 7 tsükliiliiget (2 kuni 6 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ja S seast), või bitsükkel, milles on 7 kuni 10 tsükliiliiget (4 kuni 9 süsinikuaatomit ja 1 kuni 3 heteroaatomit, mis on valitud N, O, P ja S seast), 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), eriti peatükkides 1, 3, 4, 6, 7 ja 9, "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 kuni käesolevani), eriti köidetes 13, 14, 16, 19 ja 28 ning trükises J. Am. Chem. Soc., (1960) 82: 5566.

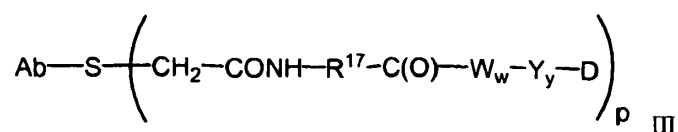


[0488] Näitena, ning nendega piirdumata, hõlmavad heterotsükliid järgnevaid: püridüül-, dihydropüridüül-, tetrahydropüridüül- (piperidüül-), tiasolüül-, tetrahydrotiofenüül-, oksüdeeritud väävlige tetrahydrotiofenüül-, pürimidinüül-, furanüül-, tienüül-, pürrolüül-, pürasolüül-, imidasolüül-, tetrasolüül-, bensofuranüül-, tianaftalenüül-, indolüül-, indolenüül-, kinolinüül-, isokinolinüül-, bensimidazolüül-, piperidinüül-, 4-piperidonüül-, pürrolidinüül-, 2-pürrolidonüül-, pürrolinüül-, tetrahydrofuranüül-, bistetrahydrofuranüül-, tetrahydropüranüül-, bistetrahydropüranüül-, tetrahydrokinolinüül-, tetrahydroisokinolinüül-, dekahydrokinolinüül-, oktahydroisokinolinüül-, 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-, 4aH-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 isatinoöülrühm.

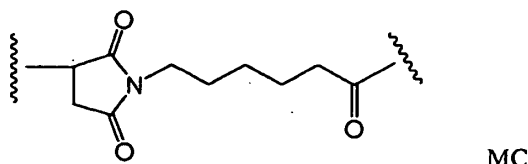
[0489] Karbotsükliülrühmad hõlmavad küllastunud või küllastumata tsükliilist molekuli, milles on monotsükliina 3 kuni 7 süsinikuaatomit või bitsükliina 7 kuni 12 süsinikuaatomit. Monotsükliilistes karbotsükliites on 3 kuni 6 tsükliiaatomit, veel tüüpilisemalt on neis 5 kuni 6 tsükliiaatomit. Bitsükliilistes karbotsükliites on 7 kuni 12 tsükliiaatomit, mis on korrastatud bitsüklo[4,5]-, -[5,5]-, -[5,6]- või -[6,6]-süsteemina, või on 9 kuni 10 tsükliiaatomit, mis on korrastatud bitsüklo[5,6]- või -[6,6]-süsteemina. Monotsükliiliste karbotsükliite näited hõlmavad järgnevaid: tsüklopropüül-, tsüklobutüül-, tsüklopentüül-, 1-tsüklopent-1-eenüül-, 1-tsüklopent-2-eenüül-, 1-tsüklopent-3-eenüül-, tsükloheksüül-, 1-tsükloheks-1-eenüül-, 1-tsükloheks-2-eenüül-, 1-tsükloheks-3-eenüül-, tsükloheptüül- ja tsüklooktüülrühm.

[0490] Tuleb mõista, et isegi seal, kus seda pole sõnaselgelt märgitud, on valemile I vastavate ADC-de kõigi iseloomulike teostuste nagu II-IV puhul, sõltuvalt modifitseeritud tsüsteiinijääkide arvust, antikehaga ühendatud 1-4 ravimüksust ( $p = 1-4$ ).

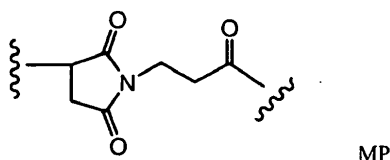




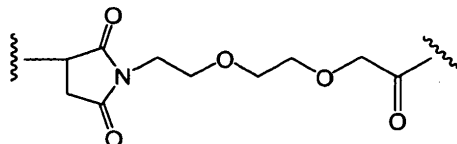
[0491] Üks valemile II vastav illustreeriv pikendusüksus on saadud malemidokaproüül-  
rühmast (MC), milles R<sup>17</sup> on -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-



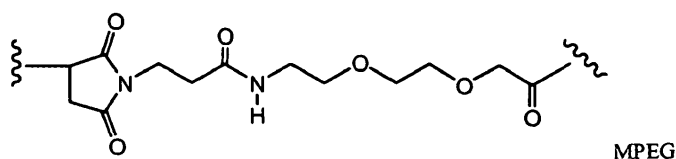
[0492] Üks valemile II vastav illustreeriv pikendusüksus on saadud malemidopropanoüül-  
rühmast, milles R<sup>17</sup> on -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-



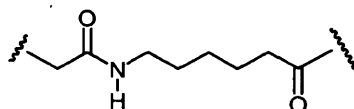
[0493] Veel üks valemile II vastav illustreeriv pikendusüksus, milles R<sup>17</sup> on -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-  
CH<sub>2</sub>- ja r on 2, on



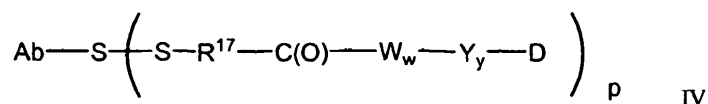
[0494] Veel üks valemile II vastav illustreeriv pikendusüksus, milles R<sup>17</sup> on (CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>C(O)-  
NR<sup>b</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-, milles R<sup>b</sup> on H ja iga r on 2, on



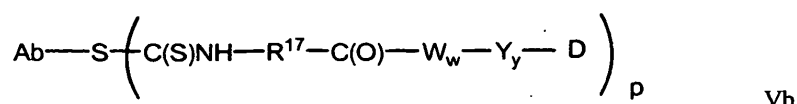
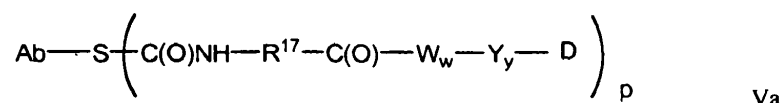
[0495] Üks valemile III vastav illustreeriv pikendusüksus, milles R<sup>17</sup> on -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, on



[0496] Veel ühes teostuses on pikendusüksus seotud tsüsteiini-modifitseeritud antikehaga  
disulfiidsideme kaudu, mis asub antikehase modifitseeritud tsüsteiini väävliatomi ja piken-  
dusüksuse väävliatomi vahel. Seda teostust esindav pikendusüksus on kujutatud valemiga  
IV, milles R<sup>17</sup>, Ab-, -W-, -Y-, -D, w ja y vastavad eespool defineeritule



[0497] Veel ühes teostuses sisaldab pikendusüksuse tioolreaktiivne rühm funktsionaalset rühma, mis võib moodustada sideme antikehas oleva tsüsteiini vaba tioolrühmaga. Tioolreaktiivsete funktsionaalsete rühmade näited hõlmavad, nendega piirdumata, maleimiid- ja  $\alpha$ -haloatsetüülrühmi, aktiveeritud estreid, nagu suktsiinimiidestrid, 4-nitrofenüülestrid, pentafluorofenüülestrid, tetrafluorofenüülestrid, anhüdriide, happekloriide, sulfonüülkloriide, isotsüanaate ja isotiotsüanaate. Seda teostust esindavad pikendusüksused on kujutatud valemita Va ja Vb, milles  $R^{17}$ , Ab-, -W-, -Y-, -D, w ja y vastavad eespool defineeritule

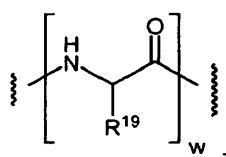


[0498] Veel ühes teostuses võib linker olla dendriitset tüüpi linker enam kui ühe ravimüksuse kovalentseks sidumiseks antikehaga hargneva, multifunktsionaalse linkerüksuse kaudu (Sun et al., (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 12: 2213-2215, Sun et al., (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11: 1761-1768, King (2002) Tetrahedron Letters, 43: 1987-1990). Dendriitsed linkerid võivad suurendada ravimi molaarset suhet antikeha suhtes, see tähendab koormust (*loading*), mis on seotud ADC võimekusega. Seega kui tsüsteiini-modifitseeritud antikehal on ainult üks tsüsteiini reaktiivne tioolrühm, võib mitmeid ravimüksusi siduda dendriitse linkeri kaudu.

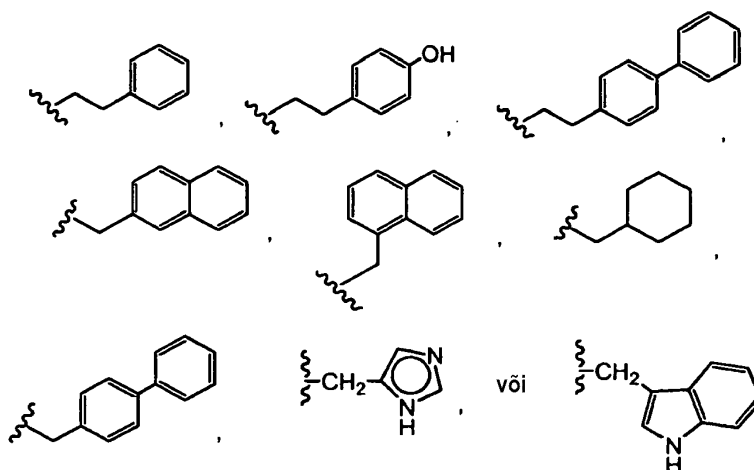
### Aminohappeüksus

[0499] Linker võib sisaldada aminohappejääke. Olemasolu korral seob aminohappeüksus (-W<sub>w</sub>-) leiutisekohases tsüsteiini-modifitseeritud antikeha-ravimi konjugaadis (ADC) antikeha (Ab) ravimüksusega (D).

[0500] -W<sub>w</sub>- on dipeptiid-, tripeptiid-, tetrapeptiid-, pentapeptiid-, heksapeptiid-, heptapeptiid-, oktapeptiid-, nonapeptiid-, dekapeptiid-, undekapeptiid- või dodekapeptiidüksus. Aminohappeüksuses sisalduvad aminohappejäägid hõlmavad looduslikult esinevaid ning ka minoorseid aminohappeid ja looduslikult mitteesinevaid aminohapete analooge nagu tsitrulliin. Iga -W-üksus on üksteisest sõltumatult esitatav allpool nurksulgudes toodud valemiga, kus w on täisarv vahemikus 0 kuni 12



milles  $R^{19}$  on vesinik, metüül-, isopropüül-, isobutüül-, *sec*-butüül-, bensüül-, p-hüdroksübensüülrühm,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ , 2-püridüülmetüül-, 3-püridüülmetüül-, 4-püridüülmetüül-, fenüül-, tsükloheksüülrühm



**[0501]** Kui  $R^{19}$  ei ole vesinik, siis on süsinikuaatom, millega  $R^{19}$  on seotud, kiraalne. Iga süsinikuaatom, millega  $R^{19}$  on seotud, on sõltumatult (S)- või (R)-konfiguratsioonis või ratseemiline segu. Seega võivad aminohappeüksused olla enantiomeerselt puhtad, ratseemilised või diastereomeersed.

**[0502]** Iseloomulikud aminohappeüksused  $-W_w-$  hõlmavad dipeptiidi, tripeptiidi, tetrapeptiidi või pentapeptiidi. Iseloomulikud dipeptiidid hõlmavad järgnevaid: valiin-tsitrulliin (vc või val-cit),alaniin-fenüülalaniin (af või ala-phe). Iseloomulikud tripeptiidid hõlmavad järgnevaid: glütsiin-valiin-tsitrulliin (gly-val-cit) ning glütsiin-glütsiin-glütsiin (gly-gly-gly). Aminohapejäägid, mis sisaldavad aminohappe-linkerkomponenti, hõlmavad looduslikult esinevaid ning samuti ka minoorseid aminohappeid ja aminohapete analooge nagu tsitrulliin, mida looduslikult ei esine.

**[0503]** Aminohappeüksust võib ensümaatiliselts lõigata ühe või enama ensüümiga, sealhulgas kasvajasoseliste proteaasidega, et vabastada ravimüksus (-D), mis ühes teostuses protoonitakse vabanemisel *in vivo*, mis annab ravimi (D). Aminohapetega linkerkomponente võib

disainida ja optimeerida vastavalt nende selektiivsusele ensümaatilise lõikamise suhtes konkreetsete ensüümide toimel, näiteks kasvajakuseoselise proteaasi, katepsiinide B, C ja D või plasmiinproteaasiga lõikamise suhtes.

### Vahelüliüksus

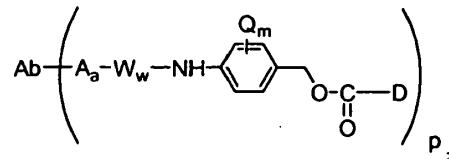
**[0504]** Olemasolu korral ( $y = 1$  või  $2$ ) seob vahelüliüksus ( $-Y_y$ -) aminohappeüksuse ( $-W_w$ -) ravimüksusega siis, kui aminohappeüksus on olemas ( $w = 1-12$ ). Alternatiivselt seob vahelüliüksus pikendusüksuse ravimüksusega siis, kui aminohappeüksus puudub. Vahelüliüksus seob ravimüksuse antikehaüksusega ka siis, kui puudub nii aminohappeüksus kui pikendusüksus ( $w, y = 0$ ). Vahelüliüksuseid on kahte peamist tüüpi: lõhustuv (*self-immolative*) ja mittelõhustuv (*non self-immolative*). Mittelõhustuv vahelüliüksus on selline, mille puhul osa või kogu vahelüliüksus jääb seotuks ravimüksusega pärast aminohappeüksuse lõikamist, eriti ensümaatilist lõikamist, antikeha ja ravimi konjugaadist või ravimüksuse ja linkeri konjugaadist. Kui glütsiin-glütsiin-vahelüliüksust või glütsiin-vahelüliüksust sisaldav ADC lõigatakse kasvajakuseoselise proteaasi, vähirakuseoselise proteaasi või lümfotsüüdiseoselise proteaasi abil, lõigatakse  $Ab-A_a-W_w$ -st glütsiin-glütsiin-ravimüksus või glütsiin-ravimüksus. Ühes teostuses leiab sihtmärkrakus aset sõltumatu hüdrolyüsireaktsioon, millega lõigatakse glütsiini-ravimüksuse side ja vabastatakse ravim.

**[0505]** Veel ühes teostuses on  $-Y_y$ - p-aminobensüülkarbamoylüksus (PAB), mille fenüleenosa on asendatud  $Q_m$ -ga, milles Q on  $C_1-C_8$ -alküül-,  $O-(C_1-C_8$ -alküül)-, halogeen-, nitro- või tsüanorühm ning m on täisarv vahemikus 0-4.

**[0506]** Mittelõhustuva vahelüliüksuse ( $-Y$ -) iseloomulikud teostused on  $-Gly-Gly$ -,  $-Gly$ -,  $-Ala-Phe$ -,  $-Val-Cit$ -.

**[0507]** Ühes teostuses esitatakse ravimüksuse ja linkeri konjugaat või ADC, milles vahelüliüksus puudub ( $y = 0$ ), või selle farmatseutiliselt vastuvõetav sool või solvaat.

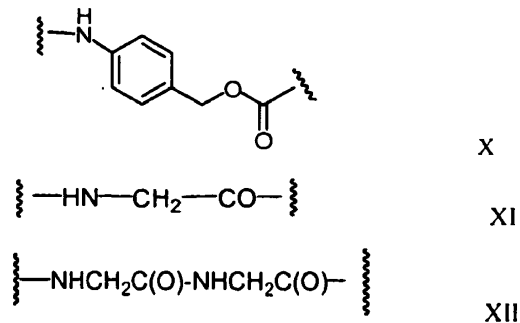
**[0508]** Alternatiivselt võib lõhustuvat vahelüliüksust sisaldav ADC vabastada D. Ühes teostuses on  $-Y$ - PAB-rühm, mis on  $-W_w$ -ga seotud PAB-i aminorühma lämmastikuaatomi kaudu ja on vahetult karbonaat-, karbamaat- või eeterühma kaudu ühendatud D-ga ning vastavalt on ADC-l iseloomulik struktuur



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 ja p on vahemikus 1-4.

[0509] Lõhustuvate vahelülide muud näited hõlmavad, nendega piirdumata, PAB-rühmaga elektroonselt sarnaseid aromaatsed ühendeid, nagu 2-aminoimidasool-5-metanooli derivaadid (Hay et al., (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9: 2237), heterotsüklilised PAB-i analoogid (US 2005/0256030), β-glükuroniid (WO 2007/011968) ja orto- või para-aminobensüülatsetaalid. Kasutada võib vahelülisid, mis alluvad amiidsideme hüdrolyüsile tsüklistamisele, nagu 4-aminovõihappe asendatud ja asendamata amiidid (Rodrigues et al., (1995) *Chemistry Biology*, 2: 223), sobivalt asendatud bitsüklo[2.2.1]- ja bitsüklo[2.2.2]-süsteemid (Storm et al., (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, 94: 5815) ja 2-aminofenüülpropioonhappe amiidid (Amsberry et al., (1990) *J. Org. Chem.*, 55: 5867). Glütsiini juures asendatud amiini sisaldavate ravimite elimineerimine (Kingsbury et al., (1984) *J. Med. Chem.*, 27: 1447) on samuti ADC-des kasutatava lõhustuva vahelüüksuse näiteks.

[0510] Iseloomulikke vahelüüksuseid (-Y<sub>y</sub>-) esindavad valemid X-XII

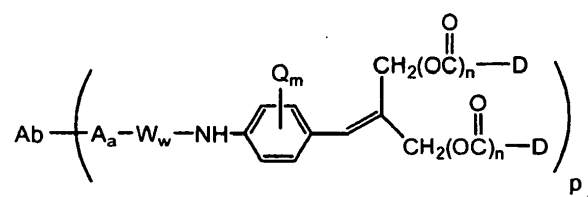


### Dendriitsed linkerid

[0511] Veel ühes teostuses võib linker L olla dendriitset tüüpi linker enam kui ühe ravimüksuse kovalentseks sidumiseks antikehaga hargneva, multifunktsionaalse linkerüksuse 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 suhet antikeha suhtes, see tähendab koormust, mis on seotud ADC võimekusega. Seega, kui tsüsteiini-modifitseeritud antikehal on ainult üks tsüsteiiniireaktiivne

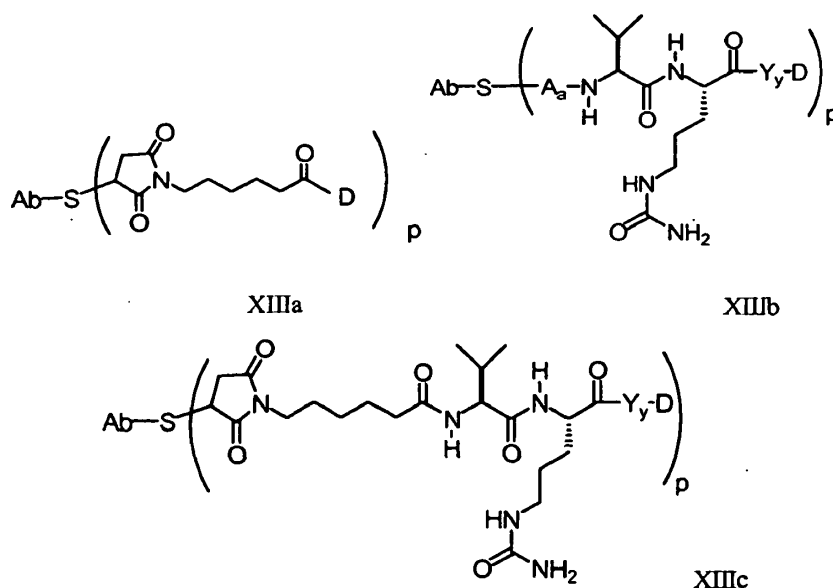
tiolrühm, võib mitmeid ravimüksusi siduda dendriitse linkeri kaudu. Hargnenud dendriitsete linkerite iseloomulikud teostused hõlmavad 2,6-bis(hüdroksümetüül)-p-kresooli ja 2,4,6-tris(hüdroksümetüül)fenooli dendrimeerseid üksusi (WO 2004/01993, Szalai et al., (2003) J. Amer. Chem. Soc., 125: 15688-15689, Shamis et al., (2004) J. Amer. Chem. Soc., 126: 1726-1731, Amir et al., (2003) Angew. Chem. Int. Ed., 42: 4494-4499).

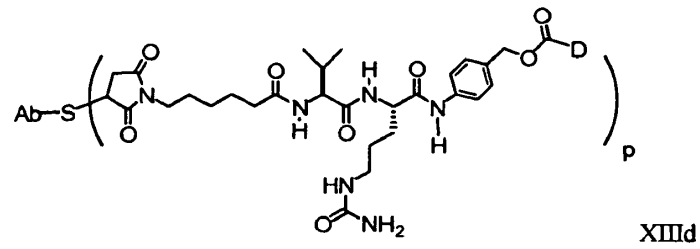
[0512] Ühes teostuses on vahelüliüksus hargnenud bis(hüdroksümetüül)stüreen (BHMS), mida võib kasutada mitme ravimi liitmiseks ja vabastamiseks ning mille struktuur on



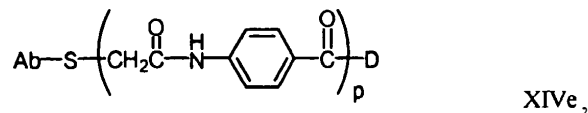
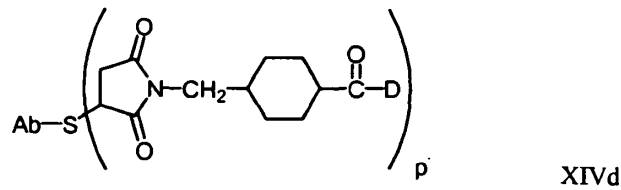
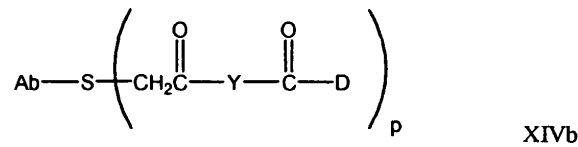
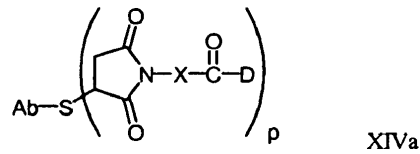
mis sisaldab dendrimeerüksust 2-(4-aminobensülideen)propaan-1,3-diool (WO 2004/043493, de Groot et al., (2003) Angew. Chem. Int. Ed., 42: 4490-4494), milles Q on C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül-, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alküül)-, halogeen-, nitro- või tsüanorühm, m on täisarv vahemikus 0-4, n on 0 või 1 ja p on vahemikus 1-4.

[0513] Valemile I vastavate antikeha ja ravimi konjugaatühendite iseloomulikud teostused hõlmavad ühendeid valemitega XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit) ja XIIId (MC-val-cit-PAB):

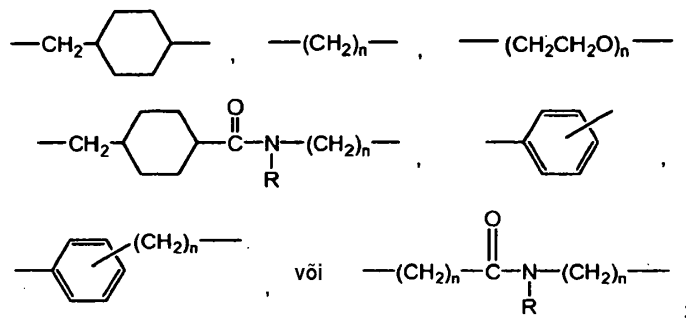




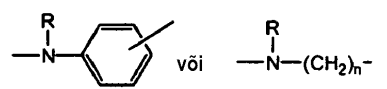
[0514] Lisaks hõlmavad valemile I vastavate antikeha ja ravimi konjugaatühendite iseloomulikud teostused ühendeid valemitega XIVa-e



milles X on



Y on



kus R on sõltumatult H või C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alküülrühm ning n on 1 kuni 12.



[0515] Veel ühes teostuses sisaldab linker funktsionaalset reaktiivset rühma, milles on nukleofiilne rühm, mis on reaktiivne antikehas oleva elektrofiilse rühma suhtes. Kasutatavad elektrofiilsed rühmad antikehas hõlmavad, nendega piirdumata, aldehüüdi ja ketooni tüüpi karbonüülühmi. Linkeri nukleofiilse rühma heteroaatom võib reageerida antikeha elektrofiilse rühmaga ja moodustada antikehaüksusega kovalentse sideme. Kasutatavad nukleofiilsed rühmad antikehas hõlmavad, nendega piirdumata, hüdrasiid-, oksiim-, amino-, hüdrasiin-, tiosemikarbasoon-, hüdrasiinkarboksülaad- ja arüülhüdrasiidrühma. Antikeha elektrofiilne rühm pakub sobivat saiti linkeriga seondumiseks.

[0516] Üldjuhul võib peptiidi tüüpi linkereid valmistada, moodustades peptiidsideme kahe või enama aminohappe ja/või peptiidifragmendi vahel. Selliseid peptiidsidemeid võib luua näiteks vedelfaasi sünteesi meetodi kohaselt (E. Schröder, K. Lübke, (1965) "The Peptides", 1. köide, lk 76-136, Academic Press), mis on peptiidikeemia valdkonnas hästi tuntud. Linkervaheühendeid võib koostada vahelüli-, pikendus- ja aminohappeüksuseid hõlmavate reaktsioonide mistahes kombinatsiooni või järjestuse abil. Vahelüli-, pikendus- ja aminohappeüksustes võib kasutada reaktiivseid funktsionaalseid rühmi, mis oma olemuselt on elektrofiilsed, nukleofiilsed või vabaradikaalsed. Reaktiivsed funktsionaalsed rühmad hõlmavad, nendega piirdumata, karboksüül-, hüdroksüül-, para-nitrofenüülkarbonaat- ja isotiotsüanaatrühmi ning lahkuvaid rühmi, nagu O-mesüül-, O-tosüül-, -Cl, -Br, -I või maleimiid-rühmad.

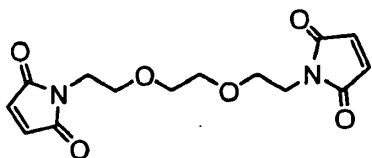
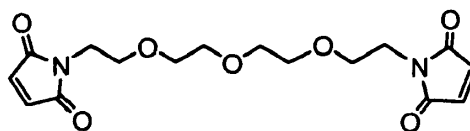
[0517] Veel ühes teostuses võib linker olla asendatud rühmadega, mis moduleerivad lahustuvust või reaktiivsust. Näiteks võib laetud asendaja, nagu sulfonaat ( $-\text{SO}_3^-$ ) või ammoonium, suurendada reagenti lahustuvust vees ning soodustada linker-reagenti sidumisreaktsiooni antikeha või ravimüksusega või soodustada Ab-L-i (antikeha-linker-vaheühendi) sidumisreaktsiooni D-ga või D-L-i (ravimi ja linkeri vaheühendi) sidumisreaktsiooni Ab-ga, sõltuvalt ADC valmistamiseks kasutatavast sünteesirajast.

### Linker-reagendid

[0518] Antikeha ja auristatiini konjugaate võib valmistatud erinevate bifunktsionaalsete linker-reagentide, 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

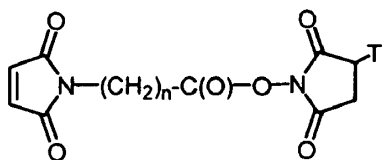
(nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehüüdid (nagu glutaaraldehüüd), bisasidoühendid (nagu bis(p-asidobensüül)heksaandiamiin), bisdiasooniumi derivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluuen-2,6-diisotsüanaat) ja bisaktiivsed fluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen) abil.

[0519] Antikeha ja ravimi konjugaate võib valmistada ka järgmiste linker-reagentide abil: 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), sealhulgas ka bismaleimiid-reagendid: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)<sub>3</sub> ja BM(PEO)<sub>4</sub>, mis on kaubanduslikult saadaval firmast Pierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 U.S.A, U.S.A.: 1-800-874-3723, rahvusvaheline: +815-968-0747. Bis-maleimiidreagendid võimaldavad siduda tsüsteiini-modifitseeritud antikeha tiolrühma seda rühma sisaldava ravimüksuse, määrgise või linkeri vaheühendiga, seda kas järjestikku või kaasnevalt. Lisaks maleimiididele hõlmavad tsüsteiini-modifitseeritud antikeha tiolrühma, ravimüksuse, määrgise või linkeri vaheühendi suhtes reaktiivsed rühmad järgmisi: jodoatsetamiid, bromoatsetamiid, vinüülpüridiin, disulfiid, püridüüldisulfiid, isotsüanaat ja isotiotsüanaat.

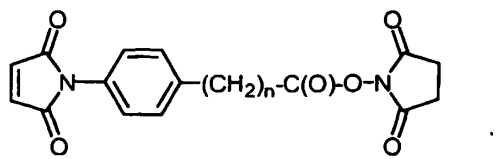
BM(PEO)<sub>3</sub>BM(PEO)<sub>4</sub>

[0520] Kasulikke linker-reagente võib leida ka muudest kaubanduslikest allikatest, nagu Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO), või võib neid sünteesida trükistes Toki et al., (2002) J. Org. Chem., 67: 1865-1872, Walker, M. A., (1995) J. Org. Chem., 60: 5352-5355, Frisch et al., (1996) Bioconjugate Chem., 7: 180-186 ning US patendipublikatsioonides 6214345, WO 02/088172, 2003130189, 2003096743, WO 03/026577, WO 03/043583 ja WO 04/032828 kirjeldatud protseduuride kohaselt.

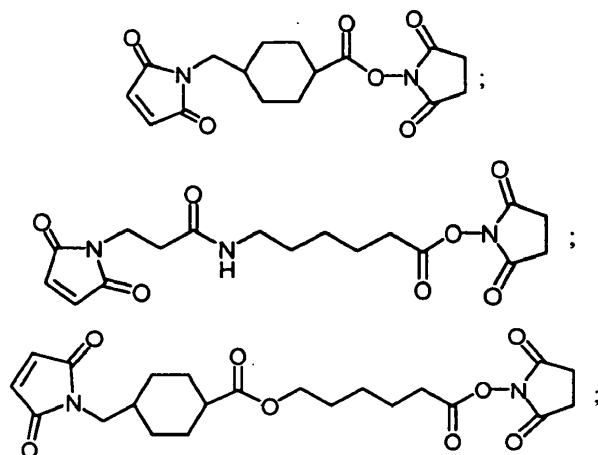
[0521] Valemiga (IIIa) pikendusühikuid võib linkerisse sisestada järgmiste linker-reagentide reaktsioonil aminohappeüksuse N-terminusega



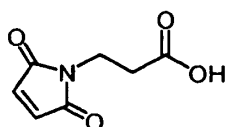
milles n on täisarv vahemikus 1-10 ja T on H või  $-\text{SO}_3\text{Na}$ ,



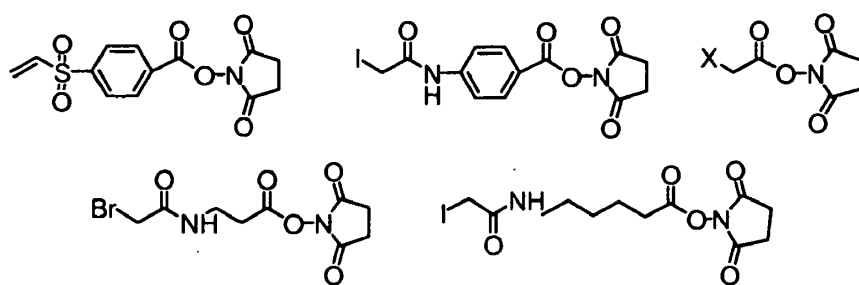
milles n on täisarv vahemikus 0-3,



ja

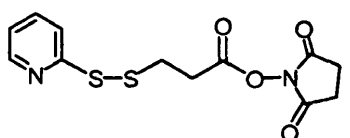


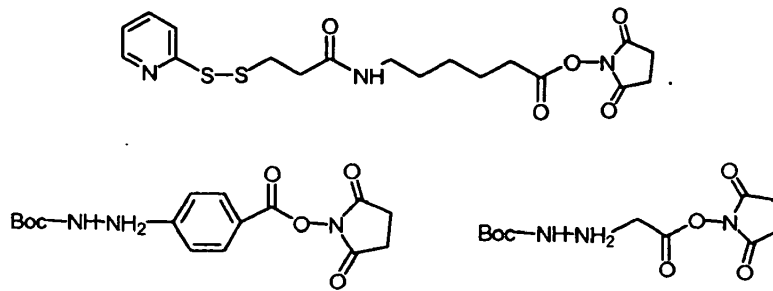
[0522] Pikendusühikuid võib linkerisse sisestada järgmiste bifunktsionaalsete reagentide reaktsioonis aminohappeüksuse N-terminusega



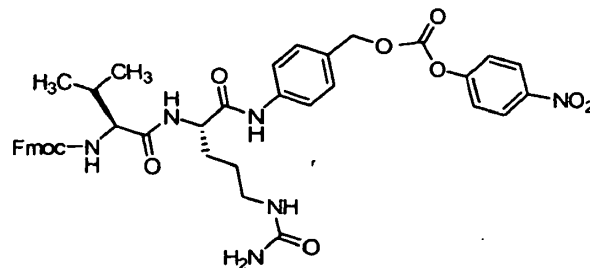
milles X on Br või I.

[0523] Pikendusühikuid võib linkerisse sisestada ka järgmiste bifunktsionaalsete reagentide reaktsioonis aminohappeüksuse N-terminusega

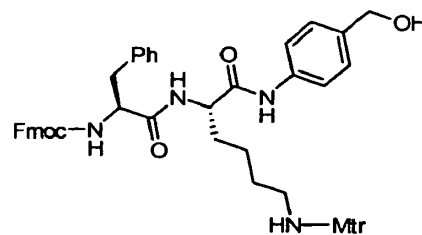




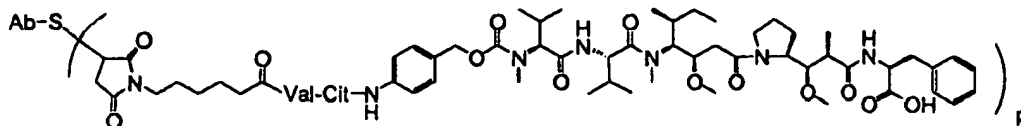
[0524] Iseloomulik valiin-tsitrulliin (val-cit või vc) dipeptiidne linker-reagent, millel on maleimiidne pikendusühik ja para-aminobensüülkarbamoyülne (PAB) iselõhustuv vahelüli, on struktuuriga



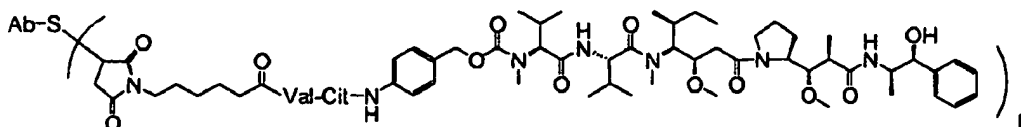
[0525] Iseloomuliku fe-lüs (Mtr, mono-4-metoksütritüül-) dipeptiidse linker-reagendi, millel on maleimiidne pikendusühik ja PAB iselõhustuv vahelüli, võib valmistada trükises Dubowchik et al., (1997) Tetrahedron Letters, 38: 5257-60 kirjeldatud viisil ja sellel on järgmine struktuur



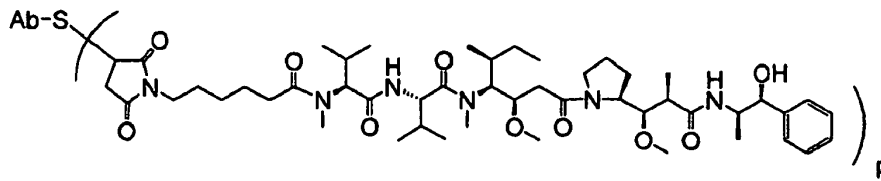
[0526] Iseloomulikud antikeha ja ravimi konjugaatide ühendid hõlmavad järgmiseid:



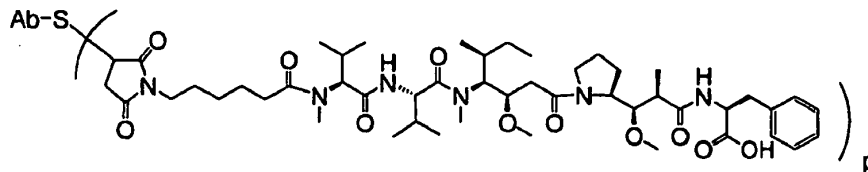
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF, milles Val on valiin, Cit on tsitrulliin, p on 1, 2, 3 või 4 ja Ab on tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastane antikeha.

#### Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastaste antikehade ja ravimi konjugaatide valmistamine

**[0527]** Valemile I vastavat ADC-d võib valmistada mitmel viisil, kasutades selleks eriala asjatundjatele tuntud orgaanilise keemia reaktsioone, tingimusi ja reagente, mis hõlmavad järgnevat: (1) tsüsteiini-modifitseeritud antikeha tsüsteiinirühma reaktsioon linker-reagentiga antikeha ja linkeri vaheühendi Ab-L moodustamiseks kovalentse sideme kaudu, millele järgneb reaktsioon aktiveeritud ravimüksusega D, ning (2) ravimüksuse nukleofiilse rühma reaktsioon linker-reagentiga, et kovalentse sideme kaudu moodustada ravimi ja linkeri vaheühend D-L, millele järgneb reaktsioon tsüsteiini-modifitseeritud antikeha tsüsteiinirühmaga. Konjugeerimismeetodeid (1) ja (2) võib valemiga L antikeha ja ravimi konjugaatide valmistamiseks kasutada erinevate tsüsteiini-modifitseeritud antikehade, ravimüksuste ja linkerite puhul.

**[0528]** Antikeha tsüsteiini tioolrühmad on nukleofiilsed ja võimelised moodustama kovalentse sideme, reageerides linkeri ja ravimi ja linkeri vaheühendite elektrofiilsete rühmadega, mis hõlmavad järgmiseid: (i) aktiivsed estrid, nagu NHS estrid, HOBt estrid, haloformaadid ja happehaliidid, (ii) alküül- ja bensüülhaliidid, nagu haloastseetamiidid, (iii) aldehüüdid, ketoonid, karboksüülrühmad ja maleimiidrühmad ja (iv) disulfiidid, sealhulgas pürüüldisulfiidid üle sulfiidi vahetuse. Ravimüksuse nukleofiilsed rühmad hõlmavad, nendega piirdumata, amiin-, tiool-, hüdroksüül-, hüdrasiid-, oksiim-, hüdrasiin-, tiosemikarbasoon-, hüdrasiinkarboksülaat- ja arüülhüdrasiidrühmi, mis linkerüksuste ja linker-reagentide elektrofiilsete rühmadega reageerides on võimelised moodustama kovalentse sideme.

**[0529]** Tsüsteiini-modifitseeritud antikehasid võib muuta linker-reagentidega konjugeerimiseks reaktiivseks, töödeldes neid redutseeriva agensiga, nagu DTT (Clelandi reagent, ditioneetool) või TCEP (tris(2-karboksüetüül)fosfiinhüdrokloriid, Getz et al., (1999) Anal. Biochem., 273: 73-80, Soltec Ventures, Beverly, MA), millele järgneb reoksüdeerimine ahelasiseste ja ahelatevaheliste disulfiidsidemete taastamiseks. Näiteks redutseeritakse CHO-rakkudes ekspresseeritud täispikki monokloonseid tsüsteiini-modifitseeritud antikehasid (tioMab) TCEP-i ligikaudu 50-kordse ülehluga 37 °C juures kolm tundi, et redutseerida tsüsteiiniaduktides disulfiidsidemed, mis võivad moodustuda uena sisestatud tsüsteiinijääkide ja kultiveerimiskeskkonnas leiduva tsüsteiini vahele. Redutseeritud tioMab lahjendatakse, kantakse 10 mM naatriumatsetaadis, pH 5, HiTrap S kolonnile, ning elueeritakse PBS-ga, mis sisaldab 0,3 M naatriumkloriidi. Lähteantikehas (Mab) leiduvate tsüsteiinijääkide vahelised disulfiidsidemed taastatakse vasksulfaadi (CuSO<sub>4</sub>) lahja (200 nM) vesilahusega toatemperatuuril üle öö. Alternatiivina on tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ahelasiseste disulfiidrühmade taastamisel pärast tsüsteinaduktide reduktiivset lõikamist tõhusaks oksüdandiks dehüdroaskorbiinhape (DHAA). Võib kasutada ka teisi oksüdante, see tähendab oksüdeerivaid agenseid, ning tehnika tasemes tuntud oksüdeerivaid tingimusi. Ümbritseva õhuga oksüdeerimine on samuti tõhus. Selles mõõdukas ja osalises uuesti oksüdeerimise etapis moodustuvad ahelasisesed disulfiidid tõhusalt ja suure täpsusega, säilitades uena sisestatud tsüsteiinijääkide tiolrühmad. Lisatakse ligikaudu 10-kordses ülehlugas ravimi ja linkeri vaheühendit, näiteks MC-vc-PAB-MMAE-d, segatakse ja lastakse toatemperatuuril seista ligikaudu tund, et toimuks konjugeerumine ja moodustuks antikeha ja ravimi konjugaat. Konjugeerimissegu filtritakse geelil, kantakse HiTrap S kolonni ja elueeritakse, et eemaldada ravimi ja linkeri vaheühendi ülehulk ja muud lisandid.

**[0530]** Joonisel 12 on üldkujul näidatud protsessi rakukultuuris ekspresseeritud tsüsteiini-modifitseeritud antikeha ettevalmistamisel konjugeerimiseks. Kui rakukultuuri sööde sisaldab tsüsteiini, võivad uue sisestatud tsüsteiin-aminohappe ja söötmes leiduva tsüsteiini vahel moodustuda disulfiidaduktid. Need tsüsteinaduktid, mis joonisel 12 on iseloomuliku tioMab-i jaoks (vasakul) kujutatud ringina, peab konjugeerimiseks sobivate reaktiivsete tsüsteiini-modifitseeritud antikehade saamiseks redutseerima. Tsüsteinadukte, eeldatavalt mitmesuguste ahelasiseste disulfiidsidemetega, lõigatakse antikeha redutseeritud vormi saamiseks reduktiivselt selliste redutseerivate agensitega nagu TCEP. Paardunud tsüsteiinide vahelised ahelasisesed disulfiidsidemed taastatakse osalise oksüdeerimise tingimustes vask-

sulfaadi või DHAA-ga või eksponeerimisega ümbritsevas hapnikus. Uued sisestatud, modifitseeritud ja paardumata tsüsteiinijäägid jäävad kättesaadavaks linker-reagentide või ravimi ja linkeri vaheühenditega reageerimiseks, et moodustada leiutisekohaseid antikehakonjugaate. TioMab-ide ekspresseerimisel imetaja rakuliinides saadakse modifitseeritud tsüsteiiniga –S-S-sideme moodustumise tulemusel väliselt konjugeeritud tsüsteiniaduktid. Seetõttu töödeldakse puhastatud tioMab-e redutseerimise ja uuesti oksüdeerimise protsesside käigus, nagu on kirjeldatud näites x, et saada reaktiivsed tioMab-id. Neid tioMab-e kasutatakse maleimiidi sisaldavate tsütotoksiliste ravimite, fluorofooride ja muude märgistega konjugeerimisel.

#### Skriinimismeetodid

**[0531]** Samuti kirjeldatakse CD22 polüpeptiidi detekteerimise meetodit proovide puhul, milles kahtlustatakse CD22 polüpeptiidide esinemist, meetod hõlmab proovi eksponeerimist tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastasele antikehale või selle antikeha ja ravimi konjugaadile, mis seondub CD22 polüpeptiidiga, ning tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastasele antikeha või selle antikeha ja ravimi konjugaadi proovis sisalduva CD22-ga seondumise detekteerimist, kusjuures sellise seondumise esinemine on indikaatoritks CD22 esinemisele proovis. Vajadusel võib proov sisaldada rakke (mis võivad olla vähirakud), milles kahtlustatakse CD22 ekspressiooni. Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastane antikeha või selle antikeha ja ravimi konjugaat, mida selles meetodis kasutatakse, võib olla detekteeritavalt märgistatud, seotud tahkele kandjale või muud sarnast.

**[0532]** Veel üheks näiteks on imetaja kasvaja diagnoosimise meetod, kus meetod hõlmab (a) imetaja koerakke sisaldava testproovi viimist kontakti tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikeha või selle antikeha ja ravimi konjugaadiga, mis seonduvad CD22 polüpeptiidiga, ja (b) tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikeha või selle antikeha ja ravimi konjugaadi ja testproovis sisalduva CD22 polüpeptiidi vahelise kompleksi tekkimise detekteerimist, kusjuures sellise kompleksi moodustumine on indikaatoritks kasvaja olemasolule imetajas. Vajadusel on tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastane antikeha või selle antikeha ja ravimi konjugaat detekteeritavalt märgistatud, seotud tahkele kandjale või muud sarnast ja/või koerakkude testproov on võetud indiviidilt, kellel kahtlustatakse halvaloomulise kasvaja esinemist.

### Antikeha ja ravimi konjugaatide metaboliidid

[0533] Samuti kirjeldatakse siin käsitletud ADC-ühendite *in vivo* metaboolseid produkte. Sellised produktid võivad tekkida näiteks manustatud ühendi oksüdeerumisel, redutseerumisel, hüdrolüüsil, amiidimisel, esterdamisel, ensüümiga lõikamisel ja muu sarnase tagajärjel. Sellele vastavalt kirjeldatakse ühendeid, mis tekivad protsessis, mis hõlmab siin kirjeldatud ühendi imetajaga kontakti viimist ajavahemikuks, mis on piisav selle ühendi metaboolse produkti tekkimiseks.

[0534] Üldjuhul tuvastatakse metaboolsed saadused, valmistades radiomärgistatud (nt  $^{14}\text{C}$ - või  $^3\text{H}$ -ga) ADC, manustades selle detekteeritava annuse (nt enam kui 0,5 mg/kg) parenteraalselt loomale, nagu rott, hiir, merisiga, ahv, või inimesele, võimaldades metaboliseerumisel toimida piisavalt pika ajavahemiku kestel (üldjuhul ligikaudu 30 sekundit kuni ligikaudu 30 tundi) ning eraldades ADC muundamisproduktid uriinist, verest või muust bioloogilisest proovist. Neid produkte võib hõlpsalt eraldada, sest need on märgistatud (märgistamata produkte võib eraldada, kasutades antikehasid, mis seonduvad metaboliidis säilunud epitoopidega). Metaboliitide struktuur määratakse tavapärasel viisil, näiteks MS, LC/MS või TMR analüüsiga. Üldiselt viiakse metaboliitide analüüs läbi samal viisil, nagu toimuvad tavapärased ravimi metabolismiuuringud, mis on eriala asjatundjatele hästi tuntud. Kuni neid muudel juhtudel *in vivo* ei leidu, on metaboolsed produktid kasutatavad diagnostilistes analüüsides leiutisekohaste ADC-ühendite raviannuste määramiseks.

### Farmatseutilised preparaadid

#### Antikeha ja ravimi konjugaatide, sealhulgas tiolantikeha ja ravimi konjugaatide manustamine

[0535] Leiutisekohaseid antikeha ja ravimi konjugaate (ADC), sealhulgas tiolantikeha ja ravimi konjugaate, võib manustada mistahes antud ravitava seisundi puhul sobival viisil. Üldjuhul manustatakse ADC parenteraalselt, see tähendab infusiooni teel, subkutaanselt, intramuskulaarselt, intravenoosselt, intradermaalselt, intratekaalselt ja epiduraalselt.



**[0536]** Ühes teostuses manustatakse nende vähkide ravimiseks antikeha ja ravimi konjugaati veenisisesse infusiooni teel. Infusiooni teel manustatav annus on vahemikus  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $10000 \mu\text{g}/\text{m}^2$  annuse kohta, üldiselt üks annus nädalas ning kokku üks, kaks, kolm või neli annust. Alternatiivselt võib annustatav vahemik olla ligikaudu  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , ligikaudu  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $800 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , ligikaudu  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $600 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , ligikaudu  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , ligikaudu  $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , ligikaudu  $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $300 \mu\text{g}/\text{m}^2$ , ligikaudu  $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$  ning ligikaudu  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$ . Haigussümptomite leevendamiseks või vähendamiseks võib annuse manustada kord päevas, 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 vahelduvalt. Annustamine võib jätkuda mistahes avaldatud intervallides, kuni kasvaja või ravitava lümfoomi või leukeemia sümptomid taanduvad. Manustamine võib jätkuda pärast sümptomite taandumise või leevenemise saavutamist, kui selline taandumine või leevenemine on sellise jätkuva manustamise abil pikendatav.

**[0537]** Samuti kirjeldatakse siin autoimmuunhaiguse leevendamise meetodit, mis hõlmab autoimmuunhaiguse all kannatavale patsiendile siin kirjeldatud humaniseeritud 10F4-antikeha ja ravimi konjugaadi terapeutiliselt toimiva annuse manustamist. Eelistatud teostuses manustatakse antikeha intravenoosselt või subkutaanselt. Antikeha ja ravimi konjugaati manustatakse intravenoosselt annuses vahemikus ligikaudu  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $100 \text{mg}/\text{m}^2$  annuse kohta ja ühes erilises teostuses on annus  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu  $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$ . Haigussümptomite leevendamiseks või vähendamiseks võib annuse manustada kord päevas, 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 vahelduvalt. Annustamine võib jätkuda mistahes avaldatud intervallides, kuni kasvaja või ravitava lümfoomi või leukeemia sümptomid taanduvad. Manustamine võib jätkuda pärast sümptomite taandumise või leevenemise saavutamist, kui selline taandumine või leevenemine on sellise jätkuva manustamise abil pikendatav.

**[0538]** Siin kirjeldatakse ka B-raku häire ravimise meetodit, mis hõlmab B-raku häire, nagu B-raku proliferatiivse häire (kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata, lümfoom ja leukeemia) või autoimmuunhaiguse all kannatavale patsiendile siin kirjeldatud humaniseeritud 10F4 antikeha terapeutiliselt toimiva koguse manustamist, kusjuures antikeha ei ole konjugeeritud

tsütotoksilise molekuli või detekteeritava molekuliga. Tavaliselt manustatakse antikeha annustes vahemikus ligikaudu 1  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  kuni ligikaudu 1000  $\text{mg}/\text{m}^2$ .

**[0539]** Samuti kirjeldatakse siin farmatseutilisi preparaate, mis sisaldavad vähemalt ühte leiutisekohast CD22-vastast antikeha ja/või vähemalt ühte selle immunokonjugaati ja/või vähemalt ühte leiutisekohast CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaati. Mõnes teostuses sisaldab farmatseutiline preparaat: 1) CD22-vastast antikeha ja/või CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaati ja/või selle immunokonjugaati ja 2) farmatseutiliselt sobivat kandjat. Mõnes teostuses sisaldab farmatseutiline preparaat 1) CD22-vastast antikeha ja/või selle immunokonjugaati ja vajadusel 2) vähemalt ühte täiendavat terapeutilist agensit.

**[0540]** Leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati või leiutisekohase antikeha ja ravimi konjugaati sisaldavate säilitatavate farmatseutiliste preparaatide valmistamiseks segatakse soovitud puhtusastmega antikeha või antikeha ja ravimi konjugaat vabalt valitud farmatseutiliselt vastuvõetavate kandjate, abiainete või stabiliseerijatega (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. väljaanne, toimetaja Osol, A. (1980)) vesilahuste või lüofiliseeritud või muude kuivatatud preparaatide vormis. Vastuvõetavad kandjad, abiained või stabiliseerijad ei ole kasutatavates annustes ja kontsentratsioonides toksilised ning need hõlmavad puhvreid, nagu fosfaat ja tsitraat, histidiini ja muid orgaanilisi happeid, antioksidante, sealhulgas askorbiinhapet ja metioniini, säilitusaineid (nagu okta-detsüüldimetüülbensüülammooniumkloriid, heksametooniumkloriid, bensalkooniumkloriid, bensetooniumkloriid, fenool, butüül- või bensüülalkohol, alküülparabeenid, nagu metüül- või propüülparabeen, katehool, resortsinool, tsükloheksanool, 3-pentanool ja m-kresool), väikese molekulmassiga (vähem kui ligikaudu 10 jääki) polüpeptiide, valke, nagu seerumi albumiin, želatiin või immunoglobuliinid, hüdrofiilseid polümeere nagu polüvinüülpürrolidoon, aminohappeid, nagu glütsiin, glutamiin, asparagiin, histidiin, arginiin või lüsiin, monosahhariide, disahhariide ja muid süsivesikuid, sealhulgas glükoosi, mannoosi või dekstriine, kelaatavaid agenseid nagu EDTA, suhkruid, nagu sahharoos, mannitool, trehhaloos või sorbitool, sooli moodustavad vastasioone nagu naatrium, metallikomplekse (nt Zn-valk komplekse) ning/või mitteioonseid pindaktiivseid aineid, nagu TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> või polüetüleenglükool (PEG). Üldiselt on *in vivo* manustamiseks kasutatavad farmatseutilised preparaadid steriilsed. See on hõlpsalt saavutatav filtrimisega läbi steriilse filtrimise membraanide.

**[0541]** Aktiivsed koostisosad võivad olla suletud mikrokapslitesse, mis on valmistatud näiteks koatservatsioonimeetodite või interfatsiaalse polümeriseerimise teel, vastavalt näiteks

hüdrosümetüütselluloos- või želatiinmikrokapslite ja polü(metüülmetakrülaat)mikrokapslitena, või olla sisestatud kolloidsetesse ravimi kohalettoimetamise süsteemidesse (nt liposoomidesse, albumiini mikrokeradesse, mikroemulsioonidesse, nanoosakesesse ja nanokapslitesse) või makroemulsioonidesse. Selliseid tehnikaid on kirjeldatud trükises Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. väljaanne, Osol, A. toim. (1980).

**[0542]** Võib valmistada toimeainet viivitatult vabastavaid preparaate. Toimeainet viivitatult vabastavate sobivate preparaatide näited hõlmavad leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati sisaldavate tahkete hüdrofoobsete polümeeride poolläbilaskvaid matrikseid, mis on kindla kujuga, näiteks kilede või mikrokapslite vormis. Toimeainet viivitatult vabastavate matriksite näited hõlmavad polüestereid, hüdrokeele (näiteks polü(2-hüdrosüetüülmetakrülaati) või polü(vinüülalkoholi)), polülaktiide (US patendipublikatsioon 3773919), L-glutamiinhappe ja  $\gamma$ -etüül-L-glutamaadi kopolümeere, mittelagunevat etüleenvinüülatsetaati, lagunevaid piimhappe-glükoolhappe kopolümeere, nagu LUPRON DEPOT™ (piimhappe-glükoolhappe kopolümeerist ja leuproliidatsetaadist koosnevad süstitavad mikrokerakesed) ning polü-D-(-)-3-hüdrosüvõihapet. Kuigi mõned polümeerid, nagu etüleenvinüülatsetaat ja piimhappe-glükoolhappe, on võimelised molekule vabastama enam kui 100 päeva, vabastavad hüdrokeelid tavaliselt valke lühemate ajavahemike kestel. Kui kapseldatud antikehad või immunokonjugaadid jäävad kehasse pikaks ajaks, võivad need 37 °C juures niiskusega kokkupuutumise tõttu denatureeruda või agregeeruda, mille tulemuseks on bioloogilise aktiivsuse kadu ja võimalikud muutused immunogeensuses. Sõltuvalt mehhanismist võib stabiliseerimiseks välja töötada otstarbekohaseid strateegiaid. Näiteks kui avastatakse, et agregeerumise mehhanismiks on molekulivahelise S-S-sideme moodustumine tio-disulfiidi vahetuse kaudu, võib stabiliseerimise saavutada sulfhüdrüüljääkide modifitseerimise, happelistest lahustest lüofiliseerimise, niiskusesisalduse kontrollimise, sobivate lisandite kasutamise ning spetsiifiliste polümeermaatriksite kompositsioonide väljatöötamisega.

#### Antikeha ja ravimi konjugaadiga ravimine

**[0543]** Peetakse võimalikuks, et käesoleva leiutise kohaseid antikeha ja ravimi konjugaate (ADC-sid) võib kasutada erinevate haiguste või häirete, näiteks iseloomulikult kasvaja antigeeni üleekspressiooniga kaasnevate haiguste või häirete raviks. Iseloomulikud seisundid või hüperproliferatiivsed häired hõlmavad hea- või pahaloolumulisi kasvaja, leukee-

miat ja lümfoidseid pahaloomulisi kasvajaid. Muud haigused hõlmavad neuroni-, gliia-, astrotsüüdi-, ajuripatsi-, näärme-, makrofaagi-, epiteeli-, strooma-, blastotseelihäireid, põletikulisi, angiogeenseid ja immunoloogilisi häireid, sealhulgas autoimmuunhäireid.

**[0544]** Loomamudelites ja rakupõhistes analüüsides tuvastatud ADC-ühendeid võib edasi testida kõrgemates primaatides, kellel on kasvajakud, ning inimese kliinilistes uuringutes. Võib kujundada inimese kliinilisi uuringuid, et testida leiutisekohase monokloonse CD22-vastase antikeha või leiutisekohase immunokonjugaadi tõhusust patsientidel, kellel on B-raku proliferatiivne häire, sealhulgas, nendega piirdumata, lümfoom, mitte-Hodgkin'i lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiveerunud agressiivne NHL, retsidiveerunud indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsüüt leukeemia (CLL), väikerakuline lümfotsütaarne lümfoom, leukeemia, karvrakuline leukeemia (HCL), akuutne lümfotsüüt leukeemia (ALL) ja mantelrakuline lümfoom. Võib disainida kliinilise uuringu tuntud raviskeemide, nagu kiiritus- ja/või keemiaravi, sealhulgas tuntud keemiaravi- ja/või tsütotoksilisi agensite ja ADC-de koosmõju tõhususe hindamiseks.

**[0545]** Üldjuhul on ravitavaks haiguseks või häireks hüperproliferatiivne haigus, nagu B-raku proliferatiivne häire ja/või B-raku kasvaja. Siin ravitavad vähid hõlmavad, nendega piirdumata, B-raku proliferatiivseid häireid grupist: lümfoom, mitte-Hodgkin'i lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiveerunud agressiivne NHL, retsidiveerunud indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsüüt leukeemia (CLL), väikerakuline lümfotsütaarne lümfoom, leukeemia, karvrakuline leukeemia (HCL), akuutne lümfotsüüt leukeemia (ALL) ja mantelrakuline lümfoom.

**[0546]** Vähk võib hõlmata CD22 ekspresseerivaid rakke selliselt, et leiutisekohane ADC on võimeline seonduma vähirakuga. CD22 ekspresseerumise detekteerimiseks vähis on saadaval mitmesugused diagnostilised/prognostilised analüüsid. Ühes teostuses võib CD22 üleekspressiooni analüüsida IHC-ga. Kasvaja biopsiast pärinevad ja parafiini sisestatud koelõigud võib allutada IHC-analüüsile ja hinnata CD22-valgu värvumuse kriteeriumeid värvumise määra aspektist ja sellest aspektist, millises osas uuritud kasvajakud värvuvad.

**[0547]** Haiguse ärahoidmiseks või ravimiseks sobiv ADC annus sõltub ravitava haiguse tüübist, nagu on defineeritud eespool, haiguse raskusastmest ja selle kulust, sellest, kas molekuli manustatakse preventiivsetel või ravieesmärkidel, eelnevast ravist, patsiendi haigusloost ja reageerimisest antikehale ning raviarsti vabast valikust. Molekul sobib manustamiseks patsiendile ühekordselt või raviseeriatena. Sõltuvalt haiguse tüübist ja tõsidusest on

molekuli algne kandidaatannus ligikaudu 1 µg/kg kuni 15 mg/kg (nt 0,1-20 mg/kg) manustamiseks patsiendile näiteks kas ühe või enama eraldi manustamise või pideva infusioonina. Tüüpiline päevase annuse vahemik võiks olla ligikaudu 1 µg/kg kuni ligikaudu 100 mg/kg või enam, sõltudes eespool mainitud teguritest. Iseloomulik ADC annusevahemik patsiendile manustamisel on ligikaudu 0,1 kuni ligikaudu 10 mg patsiendi kehamassi ühe kilogrammi kohta.

**[0548]** Sõltuvalt seisundist jätkatakse mitu päeva või kauem vältavate korduvate manustamiste puhul ravi seni, kuni saavutatakse haigussümptomite soovitud mahasurumine. Iseloomulik annustamisskeem hõlmab ligikaudu 4 mg/kg algse laadimisannuse manustamist, millele järgneb CD22-vastase (ErbB2-vastase) antikeha nädalane säilitusannus ligikaudu 2 mg/kg. Kasulikeks võivad osutada muud annustamisskeemid. Sellise ravi kulgemine on lihtsalt jälgitav tavapäraste meetodite ja analüüside abil.

#### Kombineeritud ravi

**[0549]** Leiutisekohast antikeha ja ravimi konjugaati (ADC) võib kombineerida farmatseutilises kombineeritud preparaadis või annustada kombineeritud raviskeemina koos vähemalt ühe lisäühendiga, millel on vähivastased omadused. Eelistatult on sellel farmatseutilises kombineeritud preparaadis või kombineeritud raviskeemis kasutataval teisel ühendil kombinatsiooni ADC-ga kokkusobivad omadused nii, et nad ei mõjuta teineteist ebasoodsalt..

**[0550]** Teine ühend võib olla kemoterapeutiline agens, tsütotoksiline agens, tsütokiin, kasvu inhibeeriv agens, antihormonaalne agens ja/või kardioprotektant. Sellised molekulid esinevad kombinatsioonis soovitavalt toimivates kogustes. Leiutisekohast ADC-d sisaldav farmatseutiline kompositsioon võib sisaldada ka kemoterapeutilisi agenseid, nagu tubuliini moodustumise inhibiitor, topoisomeraasi inhibiitor või DNA siduja, nende ravivalt toimivas koguses.

**[0551]** Ühe aspektina on esimene ühend leiutisekohane CD22-vastane ADC ning teine ühend on CD22-vastane antikeha (lihtsalt antikeha või ADC). Ühes teostuses on teine ühend CD22-vastane antikeha rituksimab (Rituxan®) või 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Kombineeritud immuunravis CD22-vastaste ADC-dega on kasulikuks antikehaks, sellega piirdumata, veel VEGF-vastane antikeha (nt Avastin®).

**[0552]** Leiutisekohaselt tuvastatud vähivastase agensi manustamisega koos võib kombineerida muid raviskeeme, mis hõlmavad, nendega piirdumata, kiiritusravi ja/või lüüsi ja

perifeerse vere siirdamisi ning/või tsütotoksilist agensit, kemoterapeutilist agensit või kasvu inhibeerivat agensit. Ühes sellises teostuses on kemoterapeutiline agens selline agens või kombinatsioon sellistest agensitest, nagu näiteks tsüklofosfamiid, hüdroksüdaunorubitsiin, adriamütsiin, doksorubitsiin, vinkristiin (Oncovin™), prednisoloon, CHOP, CVP või COP või immuunravimid, nagu CD20-vastane (nt Rituxan®) või VEGF-vastane (nt Avastin®) immuunravim. Kombineeritud ravi võib manustada üheaegse või järjestikuse režiimina. Järjestikusel manustamisel võib kombinatsiooni manustada kahe või enama manustamisega. Kombineeritud manustamine hõlmab koos manustamist, kasutades eraldi preparaate või üht farmatseutilist preparaati, ning järjestikust, mistahes järjekorras manustamist, kusjuures eelistatult esineb ajavahemik, millal mõlemad (või kõik) aktiivsed agensid avaldavad oma bioloogilisi aktiivsusi samaaegselt.

**[0553]** Ühes teostuses võib ADC-ga ravimine hõlmata siin tuvastatud vähivastase agensi ning ühe või enama kemoterapeutilise agensi või kasvu inhibeeriva agensi kombineeritud manustamist, mis hõlmab erinevate kemoterapeutiliste agensite kokteilide koos manustamist. Keemiaraviagensid hõlmavad taksaane (nagu paklitakseel ja dotsetakseel) ja/või antra-tsükliin-antibiootikume. Selliste kemoterapeutiliste agensite valmistamine ja nende annustamise skeemide koostamine toimub vastavalt tootjate juhistele või eriala asjatundja poolt empiirilisel määratud viisil. Sellise keemiaravi preparaatide valmistamist ja nende annustamise skeeme on kirjeldatud ka trükises „Chemotherapy Service“, (1992), toimetaja M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

**[0554]** Mistahes eespool koos manustamiseks sobivatena nimetatud agensite annused on kas tavaliselt kasutatavad või neist madalamad, arvesse võttes uudse agensi ja muude kemoterapeutiliste agensite ja ravide koostoimet (sünergia).

**[0555]** Kombineeritud ravi võib anda “sünergia” ja olla “sünergiline”, mis tähendab, et toime, mis saavutatakse toimeainete üheskoos kasutamiseega on suurem kui nende ühendite eraldi kasutamisest saadavate toimete summa. Sünergilise efekti võib saavutada, kui toimeained on: (1) koos valmistatud ning samaaegselt manustatud või kohale toimetatud kombineeritud ühikannuspreparaadis, (2) kohale toimetatud vahelduvalt või paralleelselt eraldi preparaatidena, või (3) mõne muu skeemiga. Vahelduva ravi käigus toimeainet kohale toimetades võib sünergilise mõju saavutada, kui ühendid manustatakse või toimetatakse kohale järjestikku, näiteks erinevate süstimistega, kasutades erinevaid süstlaid. Üldiselt manustatakse vahelduva ravi puhul iga toimeaine toimiv annus järjestikku, see tähendab jada-

misi, samas kui kombineeritud ravis manustatakse kahe või enama toimeaine toimivad annused koos.

#### Antikeha ja ravimi konjugaatide metaboliidid

[0556] Samuti kirjeldatakse siin käsitletud ADC-ühendite *in vivo* metaboolseid produkte. Sellised produktid võivad tekkida näiteks manustatud ühendi oksüdeerumisel, redutseerumisel, hüdrolüüsil, amiidimisel, esterdamisel, ensüümiga lõikamisel ja muu sarnase tagajärjel. Sellele vastavalt kirjeldatakse ühendeid, mis tekivad protsessis, mis hõlmab siin kirjeldatud ühendi imetajaga kontakti viimist ajavahemikuks, mis on piisav selle ühendi metaboolse produkti tekkimiseks.

[0557] Tavaliselt tuvastatakse metaboolsed saadused, valmistades radiomärgistatud (nt  $^{14}\text{C}$ - või  $^3\text{H}$ -ga) ADC, manustades selle detekteeritava annuse (nt enam kui 0,5 mg/kg) parenteraalselt loomale, nagu rott, hiir, merisiga, ahv, või inimesele, võimaldades ainevahetusel toimuda piisava ajavahemiku kestel (üldjuhul ligikaudu 30 sekundit kuni ligikaudu 30 tundi) ning eraldades ADC muundamisproduktid uriinist, verest või muust bioloogilisest proovist. Neid produkte võib hõlpsalt eraldada, sest need on märgistatud (teisi produkte võib eraldada, kasutades antikehasid, mis seonduvad metaboliidis säilunud epitoopidega). Metaboliitide struktuur määratakse tavapärasel viisil, näiteks MS, LC/MS või TMR analüüsiga. Üldiselt viiakse metaboliitide analüüs läbi samal viisil, nagu toimuvad tavapärased ravimi metabolismiuuringud, mis on eriala asjatundjatele hästi tuntud. Kuni neid muudel juhtudel *in vivo* ei leidu, on metaboolsed produktid kasutatavad diagnostilistes analüüsides leiutisekohaste ADC-ühendite raviannuste määramiseks

#### Muud CD22-vastaste antikehade ja immunokonjugaatide kasutamise meetodid

##### *Diagnostilised meetodid ja detektsioonimeetodid*

[0558] Leiutisekohased CD22-vastased antikehad ja immunokonjugaadid on kasutatavad CD22 detekteerimiseks bioloogilises proovis. Siin kasutatuna hõlmab termin “detekteerimine” kvantitatiivset või kvalitatiivset detekteerimist. Bioloogiline proov võib teatud teostustes hõlmata rakku või kudet. Teatud teostustes hõlmavad sellised koed normaalseid ja

vähikudesid, mis võrreldes muude kudedega ekspresseerivad CD22 kõrgemal tasemel, näiteks B-rakud ja/või B-rakkudega seotud koed.

**[0559]** Ühe aspektina esitatakse bioloogilises proovis CD22 detekteerimise meetod. Teatud teostustes hõlmab meetod bioloogilise proovi viimist ühendusse CD22-vastase antikehaga tingimustes, mis võimaldavad CD22-vastase antikeha seondumist CD22-ga, ning CD22-vastase antikeha ja CD22 vahelise kompleksi moodustumise detekteerimist.

**[0560]** Ühe aspektina esitatakse CD22 suurenenud ekspressiooniga seotud häire detekteerimise meetod. Teatud teostustes hõlmab meetod testitava raku ühendusse viimist CD22-vastase antikehaga, testitava raku CD22 ekspressioonitaseme määramist (kvantitatiivselt või kvalitatiivselt) CD22-vastase antikeha CD22-ga seondumise detekteerimise teel ning testitava raku CD22 ekspressioonitaseme võrdlemist kontrollraku (nt testitava rakuga samast koest pärineva normaalse raku või raku, mis ekspresseerib CD22 sellise normaalse rakuga võrreldaval tasemel) CD22 ekspressioonitasemega, kusjuures testitava raku kõrgem CD22 ekspressioonitase võrreldes kontrollrakuga näitab CD22 suurenenud ekspresseerumisega seotud häire esinemist. Testitava raku võib saada indiviidist, kellel arvatakse olevat CD22 suurenenud ekspresseerumisega seotud häire. Häire võib olla raku proliferatiivne häire, nagu vähk või kasvaja.

**[0561]** Iseloomulikud raku proliferatiivsed häired, mida leiutisekohast antikeha kasutades võib diagnoosida, hõlmavad B-raku häiret ja/või B-raku proliferatiivset häiret, sealhulgas, nendega piirdumata, lümfoomi, mitte-Hodgkin'i lümfoomi (NHL), agressiivset NHL-i, retsidiveerunud agressiivset NHL-i, retsidiveerunud indolentset NHL-i, refraktoorse NHL-i, refraktoorse indolentset NHL-i, kroonilist lümfotsüüt leukeemiat (CLL), väikerakulist lümfotsütaarse lümfoomi, leukeemiat, karvrakulist leukeemiat (HCL), akuutset lümfotsüüt leukeemiat (ALL) ja mantelrakulist lümfoomi.

**[0562]** Teatud teostustes hõlmab eespool kirjeldatud diagnoosimise või detekteerimise meetod seondumise detekteerimist CD22-vastase antikeha ja raku pinnal ekspresseeritud CD22 vahel või CD22-vastase antikeha ja oma pinnal CD22 ekspresseerivast rakust saadud membraanipreparaadis ekspresseeritud CD22 vahel. Teatud teostustes hõlmab meetod raku ühendusse viimist CD22-vastase antikehaga tingimustes, mis võimaldavad CD22-vastase antikeha seondumist CD22-ga, ning CD22-vastase antikeha ja raku pinnal oleva CD22 vahel moodustuva kompleksi detekteerimist. Iseloomulik analüüs CD22-vastase antikeha ja raku pinnal ekspresseeritud CD22 seondumise detekteerimiseks on "FACS"-analüüs.



[0563] CD22-vastaste antikehade CD22-ga seondumise detekteerimiseks võib kasutada teatud muid meetodeid. Sellised meetodid hõlmavad, nendega piirdumata, tehnika tasemes hästi tuntud antigeeni sidumise analüüse, nagu *Western blot*, radioimmuunanalüüsid, ELISA (ensüümiseoseline immunosorbentanalüüs), kihilised („sandwich“) immuunanalüüsid, immuunsadestamisanalüüsid, fluorestsents-immuunanalüüsid, A-valgu immuunanalüüsid ja immunohistokeemia (IHC).

[0564] Teatud teostustes on CD22-vastased antikehad märgistatud. Märgised hõlmavad, nendega piirdumata, märgiseid või üksusi, mida võib detekteerida vahetult (nagu fluorestsents-, kromofoor-, elektrontihedad, kemoluminestsents- ja radioaktiivsed märgised) ning lisaks üksusi, nagu ensüümid või ligandid, mida detekteeritakse kaudselt, näiteks ensüümreaktsiooni või molekulaarse vastasmõju kaudu. Iseloomulikud märgised hõlmavad, nendega piirdumata, radioisotoope  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  ja  $^{131}\text{I}$ , fluorofore, nagu haruldaste muldmetallide kelaadid või fluorestsein ja selle derivaadid, rodamiin ja selle derivaadid, dansüüli, umbelliferooni, lutsiferaase (nt jaanimardika lutsiferaasi ja bakteri lutsiferaasi, US patendipublikatsioon 4737456), lutsiferiini, 2,3-dihüdroftalasiindiooni, mädarõika peroksüdaasi (HRP), aluselist fosfataasi,  $\beta$ -galaktosidaasi, glükoamülaasi, lüsoosüümi, sahhariidi oksüdaase, näiteks glükoosi oksüdaasi, galaktoosi oksüdaasi ja glükoos-6-fosfaadi dehüdrogenaasi, heterotsükliisi oksüdaase, nagu urikaas ja ksantiini oksüdaas, seotuna ensüümiga, nagu HRP, laktoperoksüdaas või mikroperoksüdaas, mille puhul kasutatakse vesinikperoksiidi, et oksüdeerida värvi prekursorit, biotiini/avidiini, spin-märgiseid, bakteriofaagi märgiseid või stabiilseid vabu radikaale ning nendesarnaseid.

[0565] Teatud teostustes on CD22-vastased antikehad immobiliseeritud lahustumatule maatriksile. Immobiliseerimine toob kaasa CD22-vastase antikeha eraldamise mistahes CD22-st, mis jääb vabana lahusesse. Tavaliselt toimub see CD22-vastase antikeha muutmise lahustumatuks enne analüüsi, näiteks adsorbeerimisega vees lahustumatule maatriksile või pinnale (Bennich et al., US patendipublikatsioon 3720760), või kovalentse sidumisega (nt glutaaraldehüüdiga ristsidumist kasutades) või muudetakse CD22-vastane antikeha lahustumatuks pärast kompleksi moodustumist CD22-vastase antikeha ja CD22 vahel näiteks immuunsadestamisega.

[0566] Mistahes eespool toodud diagnoosimise või detekteerimise meetodeid võib rakendada, kasutades CD22-vastase antikeha asemel või sellele lisaks leiutisekohast immunkonjugaati.

*Ravimeetodid*

**[0567]** Leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati võib kasutada näiteks *in vitro*, *ex vivo* ja *in vivo* ravimeetodites. Ühe aspektina esitab leiutis *in vivo* või *in vitro* rakukasvu või prolifereerumise inhibeerimise meetodi, see meetod hõlmab raku eksponeerimist CD22-vastasele antikehale või selle immunokonjugaadile tingimustes, mis võimaldavad immunokonjugaadi seondumist CD22-ga. “Rakukasvu või prolifereerumise inhibeerimine” tähendab rakukasvu või prolifereerumise vähenemist vähemalt 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% või 100% ning see hõlmab rakusurma indutseerimist. Teatud teostustes on rakk kasvajarakk. Teatud teostustes on rakk B-rakk. Teatud teostustes on rakk ksenograft, nagu siin on näitena esitatud.

**[0568]** Ühe aspektina kasutatakse leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati, et ravida või ära hoida B-raku proliferatiivset häiret. Teatud teostustes on raku proliferatiivne häire seotud CD22 ekspressiooni kõrge taseme ja/või aktiivsusega. Näiteks on teatud teostustes B-raku proliferatiivne häire seotud CD22 suurenenud ekspressiooniga B-raku pinnal. Teatud teostustes on B-raku proliferatiivne häire kasvaja või vähk. Leiutisekohaste antikehade või immunokonjugaatidega ravitavate B-raku proliferatiivsete häirete näited hõlmavad, nendega piirdumata, lümfoomi, mitte-Hodgkin'i lümfoomi (NHL), agressiivset NHL-i, retsiveerunud agressiivset NHL-i, retsiveerunud indolentset NHL-i, refraktoorse NHL-i, refraktoorse indolentset NHL-i, kroonilist lümfotsüüt leukeemiat (CLL), väikerakulist lümfotsütaarse lümfoomi, leukeemiat, karvrakulist leukeemiat (HCL), akuutset lümfotsüüt leukeemiat (ALL) ja mantelrakulist lümfoomi.

**[0569]** Ühe aspektina esitatakse B-raku proliferatiivse häire ravimise meetodid, mis hõlmavad indiviidile CD22-vastase antikeha või selle immunokonjugaadi toimiva koguse manustamist. Teatud teostustes hõlmab B-raku proliferatiivse häire ravimise meetod indiviidile CD22-vastast antikeha või selle immunokonjugaati ja vajadusel vähemalt ühte täiendavat terapeutilist agensit, nagu on esitatud allpool, sisaldava farmatseutilise preparaadi toimiva koguse manustamist. Teatud teostustes hõlmab raku proliferatiivse häire ravimise meetod indiviidile farmatseutilise preparaadi toimiva koguse manustamist, kus see farmatseutiline preparaat sisaldab: 1) immunokonjugaati, mis sisaldab CD22-vastast antikeha ja tsütotoksilist

agensit ja, vajadusel 2) vähemalt ühte täiendavat terapeutilist agensit, nagu need, mis on esitatud allpool.

**[0570]** Ühe aspektina võivad vähemalt mõned leiutisekohased CD22-vastased antikehad või immunokonjugaadid seonduda CD22-ga, mis pärineb inimesest erinevast liigist. Vastavalt võib leiutisekohaseid CD22-vastaseid antikehasid või immunokonjugaate kasutada CD22-ga sidumiseks näiteks CD22 sisaldavas rakukultuuris, inimestes või muudes imetajates (nt šimpansi, paaviani, marmorseti, jaava makaagi ja reesusmakaagi, koera, sea, roti või hiire puhul), kelle CD22-ga leiutisekohane CD22-vastane antikeha või immunokonjugaat on rist-reageeriv. Ühes teostuses võib CD22-vastast antikeha või immunokonjugaati kasutada suunamiseks B-rakkude CD22-le, viies antikeha või immunokonjugaadi kontakti CD22-ga, et moodustuks antikeha-antigeeni või immunokonjugaadi-antigeeni kompleks selliselt, et immunokonjugaadiga konjugeeritud tsütotoksiin pääseb ligi raku sisemusele. Ühes teostuses on CD22 inimese CD22.

**[0571]** Ühes teostuses võib CD22-vastast antikeha või immunokonjugaati kasutada CD22 sidumise meetodis indiviidil, kellel on CD22 suurenenud ekspresseerumise või aktiivsusega seotud häire, kus see meetod hõlmab indiviidile antikeha või immunokonjugaadi manustamist selliselt, et indiviidis olev CD22 seotakse. Ühes teostuses internaliseeritakse seondunud antikeha või immunokonjugaat CD22 ekspresseerivasse B-rakku. Ühes teostuses on CD22 inimese CD22 ja indiviid on inimindiviid. Alternatiivselt võib indiviid olla imetaja, kes ekspresseerib CD22, millega CD22-vastane antikeha seondub. Lisaks võib imetaja olla imetaja, kellesse CD22 on sisestatud (nt CD22 manustamise või CD22 kodeeriva transgeeni ekspresseerimisega).

**[0572]** CD22-vastast antikeha või immunokonjugaati võib inimesele manustada ravieesmärkidel. Lisaks võib CD22-vastast antikeha või immunokonjugaati manustada inimesest erinevale imetajale, kes ekspresseerib CD22, millega antikeha ristreageerib (nt primaadi, koera, sea, roti või hiire CD22) veterinaarsetel eesmärkidel või kui inimese haiguse loomamudelile. Viimati mainitud seisukohast võivad need loomamudelid olla kasulikud leiutisekohaste antikehade või immunokonjugaatide ravitõhususe hindamisel (nt manustatavate annuste ja ajavahemike testimiseks).

**[0573]** Leiutisekohaseid antikehasid või immunokonjugaate võib ravis kasutada üksi või kombineerituna muude kompositsioonidega. Näiteks võib leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati manustada koos vähemalt ühe lisa-raviagensi ja/või adjuvandiga. Teatud teos-

tustes on lisa-raviagens tsütotoksiline agens, kemoterapeutiline agens või kasvu inhibeeriv agens. Ühes sellises teostuses on kemoterapeutiline agens selline agens või agensite kombinatsioon, nagu näiteks tsüklofosfamiid, hüdroksüdaunorubitsiin, adriamütsin, doksorubitsiin, vinkristiin (Oncovin™), prednisoloon, CHOP, CVP või COP või immuunravim, nagu CD20-vastane (nt Rituxan®) või VEGF-vastane (nt Avastin®) antikeha, kus kombineeritud ravi on kasulik kasvajate ja/või B-raku häirete nagu B-raku proliferatiivsed häired, sealhulgas lümfoom, mitte-Hodgkin'i lümfoom (NHL), agressiivne NHL, retsidiveerunud agressiivne NHL, retsidiveerunud indolentne NHL, refraktoorne NHL, refraktoorne indolentne NHL, krooniline lümfotsütleukeemia (CLL), väikerakuline lümfotsütaarne lümfoom, leukeemia, karvrakuline leukeemia (HCL), akuutne lümfotsütleukeemia (ALL) ja mantelrakuline lümfoom, ravis.

**[0574]** Sellised eespool toodud kombineeritud ravid hõlmavad kombineeritud manustamist (milles kaks või enam raviagensit on kaasatud samasse või eraldi preparaatis) ning eraldi manustamist, mille puhul leiutisekohase antikeha või immunokonjugaadi manustamine võib toimuda enne, samaaegselt ja/või pärast lisa-raviagensi ja/või adjuvandi manustamist. Leiutisekohaseid antikehasid ja immunokonjugaate võib kasutada ka kombineerituna kiiritusraviga.

**[0575]** Antikeha või immunokonjugaati (ning mistahes täiendavat terapeutilist agensit) manustatakse mistahes sobival viisil, sealhulgas parenteraalselt, subkutaanselt, intraperitoneaalselt, intrapulmonaalselt, intranasaalselt ja/või kui soovitakse paikset ravi, siis intralesionaalselt. Parenteraalsed infusioonid hõlmavad intramuskulaarset, intravenoosset, intraarteriaalset, intraperitoneaalset või subkutaanset manustamist. Lisaks manustatakse antikeha või immunokonjugaati pulseeriva infusiooni teel, eriti antikeha või immunokonjugaadi vähenevate annustega. Annustamine võib toimuda mistahes selleks sobival viisil, näiteks injektsiooni teel, näiteks intravenoosse või subkutaanse injektsiooni teel sõltuvalt sellest, kas manustamise on lühiajaline või krooniline.

**[0576]** Leiutisekohaseid antikehasid või immunokonjugaate valmistatakse, annustatakse ja manustatakse kooskõlas hea meditsiinilise tavaga. Selles kontekstis arvesse võetavad tegurid hõlmavad konkreetset ravitavat häiret, konkreetset ravitavat imetajat, antud patsiendi kliinilist seisundit, häire põhjust, agensi kohaletoimetamise kohta, manustamise meetodit, manustamise ajakava ning muid tegureid, mis on praktiseerivatele medikutele tuntud. Antikeha või immunokonjugaat ei pea olema, kuid vajadusel on valmistatud koos ühe või enama agensiga, mida kaasajal kasutatakse kõne all olevat häire preventsiiooniks või raviks. Selliste

muude agensite toimiv kogus sõltub preparaadis esineva antikeha või immunokonjugaadi kogusest, häire või ravi tüübist ning muudest teguritest, mille üle on arutletud eespool. Üldiselt kasutatakse neid siin kirjeldatud annustes ja samade manustamisteede kaudu, või ligikaudu 1 kuni 99% ulatuses siin kirjeldatud annustest või mistahes annustes ja mistahes manustamisviisil, mis on empiiriliselts/kliiniliselt leitud olevat sobiv.

**[0577]** Haiguse ennetamiseks või ravimiseks sobiv leutisekohase antikeha või immunokonjugaadi (mida kasutatakse üksi või kombineerituna ühe või enama lisa-raviagensiga nagu kemoterapeutilised agensid) annus sõltub ravitava haiguse tüübist, antikeha või immunokonjugaadi tüübist, haiguse tõsidusest ja kulust, sellest, kas antikeha või immunokonjugaati manustatakse ennetaval või ravival eesmärgil, eelnevast ravist, patsiendi haigusloost ja reageerimisest antikehale või immunokonjugaadile ning raviarsti vabast valikust. Antikeha või immunokonjugaat sobib manustamiseks patsiendile ühekordselt või raviseeriatena. Sõltuvalt haiguse tüübist ja tõsidusest on antikeha või immunokonjugaadi algne kandidaatannus ligikaudu 1 µg/kg kuni 100 mg/kg (nt 0,1-20 mg/kg) manustamiseks patsiendile näiteks ühe või enama eraldi manustamise või pideva infusioonina. Üks tüüpiline päevane annusevahemik võiks ulatuda ligikaudu 1 µg/kg kuni ligikaudu 100 mg/kg või enam, sõltudes eespool mainitud teguritest. Sõltuvalt seisundist jätkub mitme päeva kestel või kauem kestvate manustamiste puhul ravimine seni, kuni ilmneb haigusnähtude soovitud mahasurumine. Üks antikeha või immunokonjugaadi iseloomulik annustamine võiks olla ligikaudu vahemikus 0,05 mg/kg kuni ligikaudu 10 mg/kg. Seega võib patsiendile manustada antikeha või immunokonjugaati ühe või enama annusena koguses ligikaudu 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg või 10 mg/kg (või nende mistahes kombinatsiooni). Selliseid annuseid võib manustada perioodiliselt, näiteks iga nädal või kolme nädala tagant (nt selliselt, et patsient saab ligikaudu kaks kuni ligikaudu kakskümmend või näiteks ligikaudu kuus antikeha või immunokonjugaadi annust). Manustada võib algse suurema laadimisannuse, millele järgneb üks või enam väiksemat annust. Iseloomulik annustamisskeem hõlmab ligikaudu 4 mg/kg algse laadimisannuse manustamist, millele järgneb antikeha nädalane säilitusannus ligikaudu 2 mg/kg. Siiski võib kasutada muid annustamisskeeme. Selle ravi edu on lihtsalt jälgitav, kasutades tavapäraseid meetodeid ja analüüse.

*Analüüsid*

[0578] Leiutisekohaseid CD22-vastaseid antikehasid ja immunokonjugaate võib tehnika tasemes tuntud mitmesuguste analüüsidega iseloomustada nende füüsikaliskeemiliste omaduste ja/või bioloogiliste aktiivsuste järgi.

Aktiivsuse analüüsid

[0579] Ühe aspektina esitatakse testid bioloogilise aktiivsusega CD22-vastaste antikehade või nende immunokonjugaatide detekteerimiseks. Bioloogiline aktiivsus võib hõlmata näiteks võimet inhibeerida rakukasvu või prolifereerumist (nt “raku tapmise” aktiivsust) või võimet indutseerida rakusurma, sealhulgas programmeeritud rakusurma (apoptoosi). Esitatakse ka antikehad ja immunokonjugaadid, millel on selline bioloogiline aktiivsus *in vivo* ja/või *in vitro*.

[0580] Teatud teostustes testitakse CD22-vastase antikeha või immunokonjugaadi võimet inhibeerida rakukasvu või prolifereerumist *in vitro*. Rakukasvu või prolifereerumise inhibeerimise analüüsid on tehnika tasemes hästi tuntud. Siin on kirjeldatud teatud raku prolifereerumise analüüse, milles mõõdetakse raku elumust, tuues näidetena “raku tapmise” analüüsid. Üks selline analüüs on CellTiter-Glo™ raku elumuse luminescentsanalüüs (*Luminescent Cell Viability Assay*), mille komplekt on kaubanduslikult saadav firmast Promega Madison, WI). Selle analüüsiga määratakse elusate rakkude arv kultuuris, tuginedes metaboolselt aktiivsete rakkude indikaatoriks oleva ATP kvantifitseerimisele, vaadake trükiseid Crouch et al., (1993) *J. Immunol. Meth.*, 160: 81-88 ja US patendipublikatsiooni 6602677. Analüüsi võib teostada 96 või 384 süvendi formaadis, mis teeb selle sobivaks automaatsel suure läbilaskevõimega skriinimisel (*high-throughput screening* - HTS), vaadake trükist Cree et al., (1995) *AntiCancer Drugs*, 6: 398-404. Analüüsiprotseduur hõlmab ühe reagenti (reagent CellTiter-Glo®) lisamist otse kultiveeritavatele rakkudele. Selle tulemuseks on rakkude lüüsumine ja lutsiferaasireaktsioonis tekkiv luminescentsignaali tugevus on võrdeline ATP kogusega, mis omakorda on võrdeline kultuuris olevate elusate rakkude arvuga. Andmed võib salvestada luminomeetri ja CCD kaamera abil. Luminescentsväljund väljendatakse suhteliste valgusühikutena (*relative light units* - RLU).

**[0581]** Veel üheks rakuproliferatsiooni analüüsiks on “MTT analüüs”, mis on kolorimeetiline analüüs, millega mõõdetakse 3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiidi oksüdeerumist formasaaniks mitokondriaalse reduktaasi toimel. Sarnaselt analüüsiga CellTiter-Glo™ näitab see analüüs rakukultuuris olevate metaboolselt aktiivsete rakkude arvu, vaadake näiteks trükiseid Mosmann, (1983) J. Immunol. Meth., 65: 55-63 ja Zhang et al., (2005) Cancer Res., 65: 3877-3882.

**[0582]** Ühe aspektina testitakse CD22-vastase antikeha võimet indutseerida rakusurma *in vitro*. Rakusurma indutseerimise analüüs on tehnika tasemes hästi tuntud. Mõnes teostuses mõõdetakse nende analüüsidega näiteks membraanse terviklikuse kadu, mida näitab propiidiumjodiidi (PI), trüpaansinise (vaadake trükist Moore et al., (1995) Cytotechnology, 17: 1-11) või 7AAD omastamine. Iseloomulikus PI omastamise analüüsis kultiveeritakse rakke Dulbecco Modified Eagle Medium (D-MEM) : Ham'i F-12 (50 : 50) söötmes, millele on lisatud kuumusega inaktiveeritud 10% FBS (Hyclone) ja 2 mM L-glutamiini. Seega teostatakse analüüs komplemendi ja immuunefektor-rakkudeta. Rakud külvatakse 100 x 20 mm tassidele tihedusega  $3 \times 10^6$  rakku tassi kohta ning neil lastakse kinnituda üle öö. Sööde eemaldatakse ja asendatakse kas ainult värske söötmega või söötmega, mis sisaldab erinevates kontsentratsioonides antikeha või immunokonjugaati. Rakke inkubeeritakse 3-päevase ajavahemiku kestel. Pärast töötlust pestakse rakkude monokihid PBS-ga ja rakud võetakse tassi küljest trüpsiiniga lahti. Seejärel tsentrifugeeritakse rakke kiirusega 1200 pööret minutis 4 °C juures 5 minutit ja sade resuspendeeritakse 3 ml külmas  $\text{Ca}^{2+}$ -seondumispuhvril (10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) ning alikvoositakse 12 x 75 mm tuubidesse (1 ml tuubi kohta, 3 tuubi töötlushümas), millel on 35 mm rakukurn-korgid et eemaldada rakkude klompe. Seejärel lisatakse tuubidesse PI (10 µg/ml). Proovide analüüsiks kasutatakse voolutsütomeetrit FACSCAN™ ja tarkvara FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). PI omastamise järgi identifitseeritakse antikehad või immunokonjugaadid, mis statistiliselt olulisel tasemel indutseerivad rakusurma.

**[0583]** Ühe eripära kohaselt testitakse CD22-vastase antikeha või immunokonjugaadi võimet indutseerida apoptoosi (programmeeritud rakusurma) *in vitro*. Apoptoosi indutseerivate antikehade või immunokonjugaatide jaoks iseloomulik analüüs on anneksiini sidumise analüüs. Anneksiini sidumise analüüsis kultiveeritakse ja külvatakse rakud tassidele samal viisil, nagu kirjeldati eelmises lõigus. Sööde eemaldatakse ja asendatakse kas ainult värske söötmega või söötmega, mis sisaldab 0,001 kuni 10 µg/ml antikeha või immunokonjugaati. Pärast kolm

päeva kestvat inkubeerimist pestakse rakkude monokihid PBS-ga ja rakud võetakse tassi küljest trüpsiiniga lahti. Seejärel rakke tsentrifugeeritakse, resuspendeeritakse  $Ca^{2+}$ -seondumispuhvis ning alikvooditakse tuubidesse, nagu on kirjeldatud eelmises lõigus. Seejärel lisatakse tuubidesse märgistatud anneksiin (nt anneksiin V-FITC) (1  $\mu$ g/ml). Proovide analüüsimiseks kasutatakse voolutsütomeetrit FACSCAN™ ja tarkvara FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Identifitseeritakse antikehad või immunokonjugaadid, mis kontrolliga võrreldes indutseerivad anneksiini sidumist statistiliselt olulisel tasemel. Veel üks iseloomulik analüüs apoptoosi indutseerivate antikehade või immunokonjugaatide jaoks on histooni-DNA kompleksi kolorimeetiline ELISA-analüüs genoomse DNA nukleosoomisese lagunemise detekteerimiseks. Selliseks analüüsiks võib kasutada näiteks rakusurma detekteerimise (*Cell Death Detection*) ELISA komplekti (Roche, Palo Alto, CA).

**[0584]** Mistahes eespool toodud *in vitro* analüüsides kasutamiseks sobivad rakud hõlmavad rakke või rakuliine, mis ekspresseerivad CD22 looduslikult, või neid, mida on modifitseeritud CD22 ekspresseerima. Sellised rakud hõlmavad kasvajakasvajakke, mis samast koest pärinevate normaalsete rakkudega võrreldes ekspresseerivad üle CD22-e. Sellised rakud hõlmavad ka rakuliine (sealhulgas kasvajakaku liine), mis ekspresseerivad CD22, ning rakuliine, mis normaalselt CD22 ei ekspresseeri, kuid on transfekteeritud CD22 kodeeriva nukleiinhappega.

**[0585]** Ühe aspektina testitakse CD22-vastase antikeha või selle immunokonjugaadi võimet inhibeerida rakukasvu või proliferatsiooni *in vivo*. Teatud teostustes testitakse CD22-vastase antikeha või selle immunokonjugaadi võimet inhibeerida kasvaja kasvu *in vivo*. Selliseks testimiseks võib kasutada *in vivo* mudelsüsteeme nagu ksenograaftimudelid. Iseloomulikus ksenograaftisüsteemis sisestatakse inimese kasvajakasvajakud sobivasse inimesest erinevasse immuunpuudulikkude looma, näiteks SCID-hiirde. Loomale manustatakse leiutisekohast antikeha või immunokonjugaati. Mõõdetakse antikeha või immunokonjugaadi võimet inhibeerida või vähendada kasvaja kasvu. Eespool toodud ksenograaftisüsteemi teatud teostustes on inimese kasvajakasvajakud inimpatiendist pärinevad kasvajakasvajakud. Sellised ksenograaftimudelite valmistamiseks kasutatavad rakud hõlmavad inimese leukeemia ja lümfoomi rakuliine, mis, nendega piirdumata, hõlmavad BJAB-luc rakke (EBV-negatiivne Burkitt'i lümfoomi rakuliin, mis on transfekteeritud lutsiferaasi reportergeeniga), Ramos'e rakke (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), Raji rakke (ATCC, Manassas, VA, CCL-86), SuDHL-4 rakke (DSMZ, Braunschweig, Saksamaa, AAC 495), DoHH2 rakke (vaadake trükiseid 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 rakke (vaadake trükist Jadayel, D. M. et al., Leukemia, 11(1): 64-72 (1997)). Teatud teostustes sisestatakse inimese kasvajakarakud inimesest erinevasse sobivalt immuunpuudulikku looma subkutaanse injektoerimise teel või siirdamisega sobivasse kohta nagu piimanäärme rasvapadi.

#### Seondumise testid ja muud testid

**[0586]** Ühe aspektina testitakse CD22-vastase antikeha võimet seonduda oma antigeeniga. Kindlates teostustes testitakse näiteks CD22-vastase antikeha võimet seonduda eksogeense või endogeense CD22-ga, mida ekspresseeritakse raku pinnal. Selliseks testimiseks võib kasutada FACS analüüsi.

**[0587]** Ühe eripära kohaselt võib kasutada konkureerimisanalüüsi, et identifitseerida monokloonset antikeha, mis CD22-ga seondumisel konkureerib hiire 10F4.4.1 antikeha, humaniseeritud 10F4v1 antikeha, humaniseeritud 10F4v3 antikeha ja/või hiire 5EB.1.8 antikehaga. Teatud teostustes seondub selline konkureeriv antikeha sama epitoobiga (nt lineaarse epitoobi või konformatsioonilise epitoobiga) nagu 10F4.4.1 antikeha, humaniseeritud 10F4v1 antikeha, humaniseeritud 10F4v3 antikeha ja/või hiire 5EB.1.8 antikeha. Iseloomulikud konkureerimisanalüüsid hõlmavad, nendega piirdumata, rutiinseid analüüse, nagu need, mida esitatakse trükises Harlow, Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual 14. peatükk, (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Antikehaga seonduva epitoobi kaardistamise iseloomulike meetodeid esitatakse detailselt trükises Morris, (1996) "Epitope Mapping Protocols" trükises Methods in Molecular Biology, 66. köide (Humana Press, Totowa, NJ). Kahte antikeha peetakse sama epitoobiga seonduvateks siis, kui neist kumbki tõkestab teise seondumist 50% ulatuses või enam.

**[0588]** Iseloomulikus konkureerimisanalüüsis inkubeeritakse immobiliseeritud CD22 lahuses, mis sisaldab märgistatud esimest antikeha, mis seondub CD22-ga (nt hiire 10F4.4.1 antikeha, humaniseeritud 10F4v1 antikeha, humaniseeritud 10F4v3 antikeha ja/või hiire 5EB.1.8 antikeha) ning märgistamata teist antikeha, mille võimet konkureerida CD22-ga seondumises esimese antikehaga testitakse. Teine antikeha võib esineda hübriidoomi supernatandis. Kontrollina inkubeeritakse immobiliseeritud CD22 lahuses, mis sisaldab märgistatud esimest antikeha, kuid ei sisalda märgistamata teist antikeha. Pärast inkubeerimist tingimustes, mis võimaldavad esimese antikeha seondumist CD22-ga, eemaldatakse seondumata

antikeha ülehulk ja mõõdetakse immobiliseeritud CD22-ga seotud märgise kogus. Kui võrreldes kontrollprooviga on immobiliseeritud CD22-ga seotud märgise kogus testitavas proovis oluliselt vähenenud, näitab see, et teine antikeha konkureerib esimese antikehaga seondumises CD22-ga. Teatud teostustes paikneb immobiliseeritud CD22 raku pinnal või membraanipreparaadis, mis on saadud CD22 oma pinnal ekspresseerivast rakust.

**[0589]** Ühe eripära kohaselt võib CD22-vastaseid antikehasid täiendavalt iseloomustada analüüsiseeriatega, mis hõlmavad, nendega piirdumata, N-terminaalset sekveneerimist, aminohapete analüüsi, mittedenatureerivat suuruseraldus-kõrgsurve-vedelikukromatograafiat (HPLC), massispektromeetriat, ionivahetuskromatograafiat ja papaiiniga lõikamist.

**[0590]** Samuti kirjeldatakse siin modifitseeritud antikeha, millel on mõned, kuid mitte kõik efektorfunktsioonid, mis muudavad selle antikeha soovitud kandidaadiks paljudes rakendustes, kus oluline on antikeha poolväärtusaeg *in vivo*, aga mõned efektorfunktsioonid (nt komplement ja ADCC) on mittevajalikud või kahjulikud. Teatud teostustes mõõdetakse antikeha Fc-piirkonna aktiivsusi, tagamaks ainult soovitud omaduste säilumise. Võib teostada tsütotoksilisuse analüüsi *in vitro* ja/või *in vivo*, et kinnitada CDC ja ADCC aktiivsuste vähenemist/ammendumist. Näiteks võib teostada Fc-retseptoriga (FcR) sidumise analüüsi, tagamaks, et antikehal puudub seondumine FcγR-ga (seega tõenäoliselt puudub ADCC aktiivsus), kuid on säilinud võime seonduda FcRn-ga. Primaarsed ADCC-d vahendavad rakud on NK rakud, mis ekspresseerivad ainult FcγRIII, samas kui monotsüüdid ekspresseerivad FcγRI, FcγRII ja FcγRIII. FcR-de ekspresseerumine vereloomerakkudes on kokku võetud trükise Ravetch, Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-92 (1991) tabelis 3 leheküljel 464. Huvipakkuva molekuli ADCC aktiivsuse hindamise *in vitro* analüüsi näidet on kirjeldatud US patendipublikatsioonides 5500362 ja 5821337. Nendes testides kasulikeks efektorrakkudeks on perifeerse vere mononukleaarsed rakud (PBMC) ja tapjarakud (NK). Alternatiivselt või lisaks eelnevale võib huvipakkuva molekuli ADCC aktiivsust testida *in vivo*, näiteks loomamudelil, nagu on kirjeldatud trükises Clynes et al., *PNAS (USA)*, 95: 652-656 (1998). Võib läbi viia ka C1q-ga seondumise analüüsi, kinnitamaks, et antikeha pole võimeline seonduma C1q-ga ja seega puudub sellel CDC aktiivsus. Komplementi aktiveerimise hindamiseks võib läbi viia CDC analüüsi, näiteks nagu on kirjeldatud trükises Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202: 163 (1996). FcRn-ga seondumise ja *in vivo* organismist eemaldamise / poolväärtusaja määramise võib samuti teostada, kasutades tehnika tasemes tuntud meetodeid.

## NÄITED

[0591] Järgnevad leiutisekohaste meetodite ja kompositsioonide näited. On mõistetav, et eespool pakutud üldise kirjelduse järgi võib praktikas rakendada mitmesuguseid muid teostusi.

Näide 1: Hiire inimese CD22-vastaste monokloonsete antikehade valmistamine

[0592] Valmistati spetsiifiliselt inimese CD22-ga seonduvad hiire monokloonsed antikehad. Kuuenädalased emased BALB/c hiired immuniseeriti käppa inimese puhastatud his-8 märgisega CD22 ekstratsellulaarse domeeniga, kust puudusid domeenid 3 ja 4 (SEQ ID NO: 30 (ECD) pluss järjestus GRAHHHHHHHH C-terminuses) või his-8 märgisega CD22 ekstratsellulaarse domeeniga, mis sisaldas domeene 1-7 (SEQ ID NO: 28 (ECD) pluss eespool esitatud His järjestuse märgis) Ribi adjuvandis. Üks ja kolm nädalat pärast esialgset injektiooni tehti samal viisil järgnevad injektioonid. Kolm päeva pärast viimast injektiooni eemaldati kubeme ja põlveõõne lümfisõlmed, koguti kokku ja valmistati üksikute rakkude suspensioon, surudes koe selleks läbi terasvõrgu. Rakud liideti hiire müeloomiga nagu P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) suhtes 4 : 1 kõrge glükoosisisaldusega DMEM-s, mis sisaldas 50% (mass/maht) polüetüleenglükooli 4000. Liidetud rakud külvati tihedusega  $2 \times 10^5$  rakku süvendi kohta 96 süvendiga koekultuuriplaatidele. 24 tundi hiljem lisati selektiivne HAT sööde (hüpoksantiin/aminopteriin/tümidiin, Sigma, #H0262). Viisteist päeva pärast liitmist testiti ensüümiseoselise immunosorbtsioonimeetodi (ELISA) abil inimese CD22 suhtes spetsiifiliste antikehade esinemist kasvavate rakkude supernatentides.

[0593] Hiire inimese CD22-vastased monokloonsed antikehad 10F4.4.1 (mu 10F4) ja 5E8.1.8 (mu 5E8) valiti edasisteks uuringuteks rakupõhiste testide abil ja plaatidel testimise teel, testid näitasid, et need antikehad seonduvad inimese CD22-ga spetsiifiliselt. Teste on kirjeldatud siin järgnevates lõikudes.

[0594] ELISA-l põhinevad testid: CD-vastase antikeha skriinimine ELISA abil toimus järgnevalt kirjeldatud viisil, kusjuures kõik inkubeerimised toimusid toatemperatuuril. Testplaadid (Nunc Immunoplate) kaeti kaks tundi puhastatud CD22-ga 50 mM naatriumkarbonaat-puhvril, pH 9,6, blokeeriti seejärel 30 minutit 0,5% veise seerumi albumiini sisaldavas

fosfaatpuhverdatud soolalahuses (PBS) ja pesti neli korda 0,005% Tween 20 sisaldava PBS-ga (PBST). Lisati testitavate antikehade supernatandid ja inkubeeriti raputades kaks tundi, seejärel pesti neli korda PBST-ga. Plaatide ilmutamiseks lisati süvendi kohta 100 µl lahust, mis sisaldas 10 mg o-fenüleendiamiindivesinikkloriidi (Sigma, #P8287) ja 10 µl 30% vesinikperoksiidi lahust 25 ml fosfaat-tsitraat puhvril, pH 5,0, ning plaate inkubeeriti 15 minutit. Reaktsioon peatati 2,5 M väävelhappe lisamisega koguses 100 µl süvendi kohta. Andmed saadi plaatide lugemisel automatiseeritud ELISA plaadilugejal, absorptsioon registreeriti lainepikkusel 490 nm.

#### Näide 2: FACS-l põhinevad testid inimese CD22-vastaste monokloonsete antikehade (Mab) analüüsiks

**[0595]** Inimese CD22 ekspresseerivaid CHO rakke inkubeeriti koos CD22-vastase hübriidoomi supernatandiga 100 µl FACS-puhvril (0,1% BSA, 10 mM naatriumasiidi PBS-s, pH 7,4) 30 minutit temperatuuril 4 °C, millele järgnes üks pesemine FACS-puhvriga. CD22-vastase (antikeha) seondunud kogus määrati, inkubeerides antikeha/raku segu alikvooti polükloonse FITC-iga konjugeeritud kitse või küüliku hiirevastase IgG-ga (Accurate Chem. Co., Westbury, NY) (hiire testi antikehade puhul) või kitse või küüliku inimesevastase IgG-ga (humaniseeritud antikehade puhul) 30 minutit temperatuuril 4 °C, millele järgnes kolm pesemist FACS-puhvriga.

#### Näide 3: Humaniseeritud CD22-vastaste antikehade valmistamine

**[0596]** Saadi humaniseeritud 10F4 antikehad, milles hüpervarieeruva piirkonna (HVR) aminohapete jäägid (siin vahelduvalt viidatud kui komplementaarsust määravad piirkonnad või CDR-d) olid kohtspetsiifilise mutageneesi teel modifitseeritud (Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, (1987), 154: 367-382) ja saadi kaks varianti, humaniseeritud 10F4v1 ja humaniseeritud 10F4v2 (neile on siin viidatud ka vastavalt kui "10F4v1," "hu10F4v1," "10F4v2" või "hu10F4v2"). Kolmas variant, humaniseeritud 10F4v3 ("10F4v3" või "hu10F4v3"), mida on kasutatud mõnes siin kirjeldatud uuringus, on samasuguste kerge ja raske ahela aminohapete järjestustega küpse valguga nagu hu10F4v2-l, kuid sisaldab erinevat signaaljärjestust valguga ekspresseerimiseks kasutatud vektoris.

[0597] Hiire 10F4 antikeha humaniseerimine toimus siin kirjeldatud viisil. Lühidalt, hiire 10F4 kerge ja raske ahela hüpervarieeruvad piirkonnad klooniti konsensusraamistiku modifitseeritud järjestusse, et saada joonistel 2A ja 2B kujutatud kerge ja raske ahela hüpervarieeruvate piirkondade aminohapete järjestused. Alternatiivseid kerge ja raske ahela raamistikujärjestusi, mida võib kasutada leiutisekohaste antikehade raamistikujärjestustena, on kujutatud joonistel 3 ja 4.

[0598] 10F4 antikeha humaniseerimiseks kasutati monovalentse Fab-g3 displei vektori (pV0350-2B) fagemiidi, millel on *phoA* promootori kontrolli all kaks avatud lugemisraami, valdavalt sellisena, nagu on kirjeldatud trükises Lee et al., J. Mol. Biol., 340: 1073-93 (2004). Esimene avatud lugemisraam sisaldas *E. coli* kuumastabiilset STII signaaljärjestust valgu sekreteerimiseks, mis oli liidetud aktseptori, kerge ahela järjestuse VL- ja CH1-domeenidega. Teine avatud lugemisraam sisaldas STII signaaljärjestust, mis oli liidetud aktseptori, raske ahela järjestuse VH- ja CH1-domeenidega, millele järgnes faagi kärbitud minoorne kattevalk P3.

[0599] Hiire10F4 VH- ja VL-domeenid (vastavalt SEQ ID NO: 89 ja 90) joondati vastavalt inimese alamrühma III konsensusdomeeniga VH (huIII) (SEQ ID NO: 24) ja inimese konsensusdomeeniga kapp I (huK1) (SEQ ID NO: 25). Konsensusraamistiku järjestusse sisestati hiire inimese CD22-vastase MAb 10F4 hüpervarieeruvate piirkondade HVR-d (vahelduvalt siin viidatud ka kui komplementaarsust määravad piirkonnad, CDR) järgmiselt: Mu 10F4 antikeha kerge ahela HRV-d (HVR-L1 (Kabat' asendid 24-34), HVR-L2 (Kabat' asendid 50-56) ja HVR-L3 (Kabat' asendid 89-97) sisestati inimese kapp I (huKI) konsensusjärjestuse antikeha raamistikku, saades humaniseeritud 10F4v1 kerge ahela (SEQ ID NO: 17, joonis 2B). Mu 10F4 antikeha raske ahela HVR-d (HVR-H1 (Kabat' asendid 26-35), HVR-H2 (Kabat' asendid 49-65) ja HVR-H1 (Kabat' asendid 95-102)) sisestati inimese alamrühma III (humIII) modifitseeritud konsensus-VH domeeni, mis erineb humIII järjestusest kolmes asendis: kasutati R71A, N73T ja L78A (vaadake trükist Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992)), et saada humaniseeritud 10F4v1 raske ahela varieeruv piirkond (SEQ ID NO: 16, joonis 2A). HVR-de geneetiline modifitseerimine akseptorraamistikusse toimus Kunkel'i mutageneesi teel, kusjuures iga hüpervarieeruva piirkonna jaoks kasutati eraldi oligonukleotiidi. Kõikide kloonide järjestused määrati standardsete DNA sekveneerimise tehnikate abil. Joonistel 2A ja 2B kujutatud hüpervarieeruvad piirkonnad ja raamistikupiirkonnad on numereeritud vastavalt Kabat'le (Kabat et al. (1991), *supra*). Kerge

ja raske ahel sekveneeriti ja huKI, humIII, hiire 10F4, humaniseeritud 10F4v1 ja humaniseeritud 10F4v2 varieeruvate piirkondade (kaasa arvatud HVR-d ja raamistikupiirkonnad (FR-d)) aminohapete järjestused on esitatud joonistel 2A ja 2B. Humaniseeritud 10F4v3 antikeha ja 10F4v2 antikeha aminohapete järjestused on identsed.

**[0600]** Antikeha, antikeha fragmendi, VL-domeeni või VH-domeeni variantseid aminohapete järjestusi kodeerivaid nukleiinhappemolekule võib valmistada mitmete erialal tuntud meetodite abil. Need meetodid hõlmavad, nendega piirdumata, eraldamist looduslikust allikast (juhul, kui leiduvad looduslikult esinevad aminohapete järjestuste variandid) või valmistamist oligonukleotiidide poolt vahendatud (või kohtspetsiifilise) mutageneesi teel, PCR mutageneesi abil ja kassett-mutageneesi abil antikeha, antikeha fragmendi, VL-domeeni või VH-domeeni varem valmistatud variandist või mittevariantsest versioonist. Näiteks võib luua kogusid eesmärgiga leida VL jaoks kättesaadavad aminohapete asendid VH-s ning vajadusel ühes või enamas CDR-s, et asendada aminohape Kunkeli meetodi abil variantse aminohapega. Vaadake, näiteks trükist Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, (1987), 154: 367-382 ning siin esitatud näiteid. Samuti on näidetes allpool kirjeldatud juhuslike järjestuste genereerimist.

**[0601]** Leiutisekohase polüpeptiidi CDR- (HVR-) või FR-piirkonna antud asendi jaoks hõlmab oligonukleotiidide järjestus ühte või enam disainitud koodonite komplekti. Koodoni komplekt on erinevate kolmiknukleotiidide järjestuste kogum, mida kasutatakse, et kodeerida soovitud variantset aminohapet. Koodonikomplekte võib esitada, kasutades konkreetsete nukleotiidide või nukleotiidide ekvimolaarsete segude tähistamiseks sümboleid, nagu allpool on näidatud IUB koodide puhul.

## IUB KOODID

### **[0602]**

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)

N (A või C või G või T)

**[0603]** Näiteks koodonis DVK võib D olla nukleotiid A või G või T, V võib olla A või G või C, ning K võib olla G või T. See koodonikomplekt võib esitleda 18 erinevat koodonit ja kodeerida aminohappeid Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly ja Cys

**[0604]** Oligonukleotiidi- või praimerikomplekte võib sünteesida standardsete meetodite abil. Näiteks tahkel kandjal võib sünteesida oligonukleotiidide komplekti, mis sisaldab kõiki koodonite komplektiga pakutavaid nukleotiitriplettide kombinatsioone esindavaid järjestusi, mis kodeerivad soovitud aminohapete rühma. Tehnika tasemes on hästi tuntud oligonukleotiidid, mille kindlatesse asenditesse on lülitatud nukleotiidi “kõdumine”. Selliseid kindlate koodonikomplektidega nukleotiidide komplekte võib sünteesida nukleiinhappe kaubanduslike süntesaatorite abil (saadavad näiteks firmast Applied Biosystems, Foster City, CA) või neid võib saada kaubandusest (nt firmast Life Technologies, Rockville, MD). Seega hõlmab konkreetsete koodonite komplektiga oligonukleotiidide sünteesitud komplekt mitmeid erinevaid järjestusi ning need erinevused kujundab terviklikuks järjestuseks kasutatud koodonikomplekt. Leiutisele vastavalt kasutatavatel oligonukleotiididel on järjestused, mis võimaldavad hübridiseerimist varieeruva domeeni matriits-nukleiinhappega ning kloonimise eesmärkidel sisaldavad need ka restriктаaside lõikamissaite.

**[0605]** Ühe meetodi kohaselt võib variantseid aminohappeid kodeerivaid nukleiinhappeid luua oligonukleotiidivahendatud mutageneesi teel. See meetod on tehnika tasemes hästi tuntud ja seda on kirjeldatud trükises Zoller et al., 1987, *Nucleic Acids Res.*, 10: 6487-6504. Lühidalt, variantseid aminohappeid kodeerivad nukleiinhapped saadakse soovitud koodonite komplekte kodeeriva oligonukleotiidide komplekti hübridiseerimisel matriits-DNA-ga, kusjuures see matriits on varieeruva piirkonna matriits-nukleiinhappejärjestust sisaldava plasmidi üheaahelaline vorm. Pärast hübridiseerimist kasutatakse DNA polümeraasi, et sünteesida

täielikult matriitsi teine, komplementaarne ahel, mille koosseisu liidetakse seega oligonukleotiidpraimer, mis sisaldab oligonukleotiidikomplektiga pakutavaid koodonikomplekte.

**[0606]** Üldiselt kasutatakse oligonukleotiidide pikkusega vähemalt 25 nukleotiidi. Optimaalses oligonukleotiidis on mõlemal pool mutatsiooni kodeerivat nukleotiidi (mutatsioone kodeerivaid nukleotiide) 12 kuni 15 matriitsiga täielikult komplementaarset nukleotiidi. See kindlustab oligonukleotiidide õige hübridiseerumise üheaahelalise matriits-DNA-molekuliga. Sellised oligonukleotiidid on tehnika tasemes tuntud meetodite abil hõlpsalt sünteesitavad, nagu on kirjeldatud trükises Crea et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75: 5765 (1978).

**[0607]** Matriits-DNA saadakse vektorite abil, mis pärinevad bakteriofaagi M13 vektoritest (kaubanduslikult saadavad vektorid M13mp18 ja M13mp19 on sobivad) või vektoritega, mis sisaldavad üheaahelalise faagi replikatsiooni alguspunkti, nagu on kirjeldatud trükises Viera et al., Meth. Enzymol., 153: 3 (1987). Seega võib muteeritava DNA sisestada ühte nendest vektoritest, et saada üheaahelaline matriits. Üheaahelalise matriitsi valmistamist on kirjeldatud trükises Sambrook et al., millele on eespool viidatud, peatükkides 4.21-4.41.

**[0608]** Natiivse DNA järjestuse muutmiseks hübridiseeritakse oligonukleotiid sobivates hübridiseerimistingimustes üheaahelalise matriitsiga. Seejärel lisatakse DNA-d polümeriseeriv ensüüm, tavaliselt T7 DNA polümeraas või DNA polümeraasi I Klenow'i fragment, et sünteesida matriitsi komplementaarne ahel, kasutades sünteesipraimerina oligonukleotiidi. Seega moodustub heterodupleksmolekul selliselt, et DNA üks ahel kodeerib geeni 1 muteeritud vormi ja teine ahel (algne matriits) kodeerib geeni 1 natiivset, muutmata järjestust. Seejärel transformeeritakse see heterodupleksmolekul sobivasse peremeesrakku, milleks tavaliselt on mõni prokarüoot nagu *E. coli* JM101. Pärast rakkude kasvatamist kantakse need agarosplaatile ja skriinitakse, kasutades <sup>32</sup>P-fosfaadiga radiomärgistatud oligonukleotiidpraimerit, et detekteerida muteeritud DNA-d sisaldavad bakterikolooniad.

**[0609]** Vahetult eespool kirjeldatud meetodit võib muuta nii, et valmistatakse homodupleksmolekul, milles plasmidi mõlemad ahelad sisaldavad mutatsiooni (mutatsioone). Muudatused meetodis on järgmised: üheaahelisel oligonukleotiidil lastakse paarduda üheaahelalise matriitsiga, nagu on kirjeldatud eespool. Segule kolmest desoksüribonukleotiidist, milleks on desoksüriboadenosiin (dATP), desoksüriboguanosiin (dGTP) ja desoksüribotümidiin (dTTP), lisatakse modifitseeritud nukleotiid tidesoksüribotsütosiin, lühendatult dCTP-(aS) (saadaval firmast Amersham). Saadud segu lisatakse matriits-oligonukleotiidkompleksile. DNA polümeraasi lisamisel sellele segule sünteesitakse DNA ahel, mis on identne matriitsiga, välja



arvatud muteeritud alused. Lisaks sisaldab uus DNA ahel dCTP asemel nukleotiidi dCTP-(aS), mis kaitseb ahelat restriiktaasiga lõikamise eest. Pärast kaheaahelalise heterodupleksi matriitsahela lõikamist sobiva restriiktaasiga võib muteeritavat saiti (saite) sisaldavas piirkonnas matriitsahela lagundada nukleaasiga ExoIII või mõne muu sobiva nukleaasiga. Seejärel reaktsioon peatatakse, et säiliks molekul, mis on ainult osaliselt üheaahelaline. Seejärel moodustatakse kaheaahelaline DNA-homodupleks, kasutades DNA polümeraasi kõigi nelja desoksüribonukleotiidtrifosfaadi, ATP ja DNA ligaasi juuresolekul. Selle homodupleksmolekuli võib seejärel transformeerida sobivasse peremeesrakku.

**[0610]** Nagu eespool osutati, on oligonukleotiidikomplekti järjestus piisava pikkusega, et hübridiseeruda matriits-nukleiinhappega, ning samuti võib see, kuigi mitte tingimata, sisaldada restriksioonisaite. Matriits-DNA võib saada vektorite abil, mis pärinevad bakteriofaagi M13 vektoritest või vektoritega, mis sisaldavad üheaahelalise faagi replikatsiooni alguspunkti, nagu on kirjeldatud trükises Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153: 3 (1987). Seega peab muteeritava DNA sisestama ühte nendest vektoritest, et saada üheaahelaline matriits. Üheaahelalise matriitsi valmistamist on kirjeldatud trükise Sambrook et al., *supra*, peatükkides 4.21-4.41.

**[0611]** Vastavalt veel ühele meetodile võib valmistada kogu ülespoole ja allapoole ulatuvate oligonukleotiidide kompleksidest, kus igas kompleksis on mitmeid erineva järjestusega oligonukleotiide, ning need erinevused tulenevad oligonukleotiidide järjestuses esinevatest koodonikomplektidest. Ülespoole ja allapoole ulatuvate oligonukleotiidide komplekte võib koos varieeruva domeeni matriits-nukleiinhappejärjestusega kasutada polümeraasi ahelreaktsioonis, et valmistada PCR-i produktide "kogu". PCR-i produkte võib nimetada "nukleiinhappekassettideks", kuna neid võib liita muude sugulas- või suguluses mitteolevate nukleiinhapete järjestusega, näiteks viiruse kattevalkude ja dimeriseerumisdomeenidega, kasutades selleks molekulaarbioloogias välja töötatud meetodeid.

**[0612]** Oligonukleotiidikomplekte võib kasutada polümeraasi ahelreaktsioonis, kasutades matriitsina varieeruva domeeni matriits-nukleiinhappejärjestust, et luua nukleiinhappekassette. Varieeruva domeeni matriits-nukleiinhappejärjestus võib olla mistahes osa immunoglobuliini raske ahela nukleiinhappejärjestusest, mis sisaldab sihtmärk-nukleiinhappejärjestusi (st nukleiinhappejärjestusi, mis kodeerivad aminohappeid, mida soovitakse asendada). Varieeruva piirkonna matriits-nukleiinhappejärjestus on osa kaheaahelalisest DNA-molekulist, millel on esimene nukleiinhappeahel ja sellega komplementaarne teine nukleiinhappeahel.

Varieeruva domeeni matriits-nukleiinhappejärjestus sisaldab vähemalt osa varieeruvast domeenist ja selles on vähemalt üks CDR. Mõnel juhul sisaldab varieeruva domeeni matriits-nukleiinhappejärjestus enam kui ühte CDR-i. Varieeruva domeeni matriits-nukleiinhappejärjestusest ülespoole jääv osa ja allapoole jääv osa võivad olla sihtmärgiks ülespoole ulatuva oligonukleotiidikomplekti ja allapoole ulatuva oligonukleotiidikomplekti liikmetega hübridiseerumisel.

**[0613]** Esimene, ülespoole ulatuv praimerkomplekti oligonukleotiid, võib hübridiseeruda esimese nukleiinhappeahelaga, ning teine, allapoole ulatuv praimerkomplekti oligonukleotiid, võib hübridiseeruda teise nukleiinhappeahelaga. Oligonukleotiidpraimerid võivad sisaldada ühte või enam koodonikomplekti ning olla kujundatud hübridiseeruma osaga varieeruva piirkonna matriits-nukleiinhappejärjestusest. Selliste oligonukleotiidide kasutamisega võib PCR-i produkti (st nukleiinhapekassetti) PCR-i abil sisestada kaks või enam koodonite komplekti. Oligonukleotiidpraimer, mis hübridiseerub antikeha varieeruvat domeeni kodeeriva nukleiinhappemolekuli piirkondadega, sisaldab osi, mis kodeerivad aminohappe asendamisel sihtmärgiks olevaid CDR-i jääke.

**[0614]** Ülespoole ja allapoole ulatuvad oligonukleotiidikomplektid võib sünteesida ka selliselt, et nad sisaldaksid oma oligonukleotiidjärjestuses restriksioonisaite. Restriksioonisaavidid võivad hõlbustada nukleiinhapekassettide (st PCR-produktide) sisestamist täiendavaid antikehajärjestusi sisaldavasse ekspressioonivektorisse. Ühes teostuses disainitakse restriksioonisaavidid nii, et nad hõlbustaksid nukleiinhapekassettide kloonimist kõrvalisi nukleiinhappejärjestusi sisestamata või algse CDR-i või raamistiku nukleiinhappejärjestusi eemaldamata.

**[0615]** PCR-ga saadud aminohapete soovitud asendusi sisaldava kerge või raske ahela osalise või tervikliku järjestuse ekspresseerimiseks võib nukleiinhapekassetid kloonida mistahes sobivasse vektorisse. Vastavalt leiutises detailselt kirjeldatud meetoditele kloonitakse nukleiinhapekassett vektorisse, mis võimaldab toota kerge või raske ahela osalist või terviklikku järjestust, mis on liidetud viiruse kattevalgu osalise või tervikliku järjestusega (st saadakse liitvalk) ning mida esitletakse partikli või raku pinnal. Kuigi saadaval on mitut tüüpi vektoreid, mida võib kasutada selle leiutise praktikasse rakendamisel, on eelistatavateks vektoriteks fagemiidvektorid, kuna neid võib suhteliselt lihtsalt konstrueerida ning hõlpsalt ampifitseerida. Üldiselt sisaldavad fagemiidvektorid erinevaid komponente, mis hõlmavad promotoreid, signaaljärjestusi, geene fenotüübijärgseks seleksiooniks, replikatsiooni alguspunkti ning muid vajalikke komponente, mis on tuntud eriala asjatundjatele.

**[0616]** Konkreetse aminohapete kombinatsiooni variandi ekspresseerimisel sisaldab nukleiinhappekassett järjestust, mis on võimeline kodeerima raske või kerge ahela varieeruva domeeni tervikut või osa ning on võimeline kodeerima aminohapete variantide kombinatsioone. Neid aminohapete variante või aminohapete variantide kombinatsioone sisaldavate antikehade tootmiseks koguna võib nukleiinhappekassetid sisestada ekspressioonivektorisse, mis sisaldab täiendavat antikehajärjestust, näiteks kerge ja raske ahela varieeruvate või konstantsete domeenide tervikut või osa. Need täiendavad antikehajärjestused võivad olla ka liidetud muude nukleiinhappejärjestustega, nagu on järjestused, mis kodeerivad viiruse kattevalke, ning seeläbi võimaldada liitvalgu tootmist.

Näide 4: Varieeruva piirkonna järjestuse määramine

**[0617]** Hiire ja humaniseeritud 10F4 monokloonsete antikehade nukleiinhapete ja aminohapete järjestused määrati standardsete meetodite abil. Hiire inimese CD22-vastase antikeha 10F4.41 monokloonseid antikehi tootvatest hübriidomirakkudest ekstraheeriti totaalne RNA firma Qiagen (Saksamaa) reagentide komplekti abil. Varieeruv kerge (VL) ja varieeruv raske (VH) domeen amplifitseeriti RT-PCR abil, kasutades degeneratiivseid praimereid. Päripidised praimerid olid spetsiifilised N-terminaalsete aminohapete järjestustele antikeha VL ja VH piirkondades. Sellele vastavalt olid kerge ahela ja raske ahela äraspidised praimerid disainitud paarduma konstantse kerge (CL) ja konstantse raske domeeniga 1 (CH1), mis erinevatel liikidel on väga konservatiivsed. Amplifitseeritud VH ja VL klooniti imetajaraku ekspressioonivektorisse pRK (Shields et al., J. Biol. Chem., 276: 659-04 (2000)). Insertide polünukleotiidjärjestuse määramiseks kasutati tavalisi sekveneerimismeetodeid. Hiire kimmäärse 10Fa ja humaniseeritud 10F4.v1 ja humaniseeritud 10F4v2 kerge ja raske ahela varieeruvate piirkondade aminohapete järjestused on esitatud joonistel 2A ja 2B.

**[0618]** Humaniseeritud 10F4v1 modifitseeriti veel HVR-L1 asendis 28 (N28) (SEQ ID NO: 9) (vaadake joonist 2B). Asparagiinijääk selles asendis asendati valiini jäägiga (N28V), et saada HVR-L1 (SEQ ID NO: 10) hu10F4v2 ja hu10F4v3 variantidele, millel leiti suurenenud seondumise aktiivsus. Need variandid sisaldavad ühesuguseid küpse antikeha varieeruva ja konstantse domeeni järjestusi ning erinevad ainult signaaljärjestuse poolest, mis puudub leiutisekohases küpses antikehas.

**[0619]** Täiendavad aminohapete järjestuste modifikatsioonid tehti hu10F4v1 hüpervarieeruva piirkonna HVR-L1 ühe või mõlema aminohappe Asn28 (N28) ja/või Asn30 (N30) juures (vaadake joonist 2B). Kuna N28 ja N30 on võimalikud deamiinimise saidid, testiti aminohapete muutusi nendes saitides. Näiteks asendati asparagiin asendis 28 (N28) alternatiivselt kas A, Q, S, D, V või I-ga ja asparagiin asendis 30 (N30) asendati alternatiivselt kas A või Q-ga. Leiutisekohased aminohapete vahetused HVR-L1 domeenis on toodud tabelis 2 koos nende konkureerimisvõime testimisel faagi ELISA testis (IC50) standardsete protseduuride abil saadud seondumisaktiivsustega.

Tabel 2

Asenduste variandid 10F4v1 antikehas		
Aminohappe muutus HVR-L1-s, joonis 2B	HVR-L1 SEQ ID NO	Seondumisafiinsus (nM)
ei ole muutust (N28, N30)	9	8
N28A, N30	19	8
N28Q, N30	20	7,3
N28S, N30	21	12
N28D, N30	22	12
N28V, N30	10	7,3
N28I, N30	23	9,8
N28, N30A	32	7,7
N28, N30Q	33	10

**[0620]** Humaniseeritud 10F4 antikeha inimese täispikkade IgG versioonide saamiseks subkloonitakse rasked ja kerged ahelad eraldi eespool kirjeldatud pRK plasmiididesse (Gorman, C. M. et al., (1990), DNA Protein Eng. Tech., 2: 3). Sobivad raske ja kerge ahela plasmiidid (sõltuvalt soovitud järjestuse muutus(t)est) kotransfekteeritakse adenoviirusega transformeeritud inimese embrüonaalsesse neerurakuliini, mis on tuntud kui liin 293 (Graham, F. L. et al., (1977), J. Gen. Virol., 36: 59), kasutades seejuures kõrge efektiivsusega protseduuri (Graham et al., *supra* & Gorman, C. M., Science, 221: 551). Sööde vahetatakse seerumivaba söötme vastu ja kogutakse kord päevas kuni viie päeva kestel. Antikehad puhastatakse ühendatud supernatantidest A-valgu - Sepharose CL-4B (Pharmacia) abil. Elueeritud antikeha

puhver vahetatakse G25-l filtrimise teel PBS-i vastu, kontsentreeritakse ultrafiltrimisega Centriprep-30 või Centricon-100 (Millipore) abil ja säilitatakse temperatuuril 4 °C. Antikeha kontsentratsiooni määramiseks kasutatakse totaalset IgG-seondumisega ELISA-t.

**[0621]** Iseloomulikud leiutisekohased IgG raske ahela konstantsed domeenid on kujutatud joonisel 5A. Iseloomulik inimese kerge ahela κ konstantne domeen sisaldab näiteks  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV  
 TEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHDVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID  
 NO: 37).

h10F4v2 täispikk aminohapete järjestus on esitatud joonisel 5B, kus kerge ja raske ahela konstantsed piirkonnad on tähistatud allajoonimisega. h10F4v1, v2 ja v3 antikehad on IgG1 isotüübist.

#### CD22-vastaste antikehade iseloomustamine

##### Näide 5: epitoobi kaardistamine

**[0622]** CD22 epitoobid, millele seonduvad antikehad 10F4.4.1 ja 5E8.1.8, määrati järgmiste protseduuride abil. CD22 järjestused, millel puudusid erinevused seitsmest peamisest CD22 isovormile (CD22β) omasest immunoglobuliinisarnasest domeenist, klooniti ja transformeeriti stabiilseks ekspresseerimiseks rakkudesse. Näiteks CD22 variandid, millel puudus domeen I (Δ1), domeen 2 (Δ2) või domeenid 3 ja 4 (Δ3,4), klooniti, transformeeriti CHO rakkudesse ja ekspresseeriti neil rakkudel. Kontrollrakud ekspresseerisid CD22β. Deletsioonide tegemiseks kasutati Stratagene QuikChange XL™ reagentidekomplekti. Domeeni 1 deleteerimiseks deleteeriti aminohapped 22-138, domeeni 2 deleteerimiseks deleteeriti aminohapped 139-242 ja deletsioonid domeenides 3 ja 4 olid kättesaadavad minoorse isovormina CD22α (aminohapete 241-417 deletsioon). Kõik aminohapete numbrid vastavad Wilsoni jt täispika lätemolekuli CD22β numeratsioonile (vaadake joonist 1 trükises Wilson, G. L. et al., J. Exp. Med., 173: 137-146 (1991)). Joonisel 14 on deleteeritud domeenide diagramm. Seondumine määrati läbivoolutsütomeetri abil, kasutades kontrollina isotüüpi. 10F4.4.1 seondumine määrati kitse hiirevastase IgG Alexa 488 abil. 5E8.1.8 seondumine määrati kitse biotinüleeritud hiirevastast IgG pluss streptavidiini PE-d kasutades. Hiire 10F4.4.1 või hiire 5E8.1.8 antikehadega seondumist vähendav toime teatud ECD domeenide puudumisel viitas

sellele, et antikeha seondub nende domeenidega. Hiire 10F4.4.1 ja 5E8.1.8 seondumise karakteristikud olid antud tingimustes ühesugused. Kumbki neist ei seondunud CD22-ga, milles puudus domeen 1 või domeen 2, ja mõlemad seondusid CD22-ga, mis sisaldas domeene 1 ja 2, kuid milles puudusid domeenid 3 ja 4. Selle meetodi abil tuvastati, et 10F4.4.1 ja 5E8.1.8 seonduvad inimese CD22-s domeenidega 1 ja 2 aminohappest 22 kuni aminohappeni 240 järjestuses SEQ ID NO: 27 (vaadake Wilson, G. L. et al., (1991) *supra*).

#### Näide 6: Lahustunud antigeeniga seondumise iseloomustamine

**[0623]** Afinsus hiire ja humaniseeritud 10F4 antikeha seondumisel lahustuva CD22 ekstratsellulaarse domeeniga (EDC) määrati pinnaplasmon-resonantsi mõõtmise teel, kasutades BIACORE® 3000 süsteemi (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). Lühidalt, karbometüülitud dekstraanist biosensorkiibid (CM5, BIAcore® Inc.) aktiveeriti vastavalt tarnija juhistele N-etuül-N'-(3-dimetüülaminopropüül)karbodiimiidhüdrokloriidi (EDC) ja N-hüdroksütsükliinimiidiga (NHS). Aktiveeritud kiibid kaeti (hiire või humaniseeritud) CD22-vastase IgG antikehaga 10F4, lahjendades viimast kontsentratsioonini 5 µg/ml 10 mM naatriumatsetaadis, pH 4,8, enne sisestamist voolutuskiirusega 5 µl minutis, et saavutada ligikaudu 500 vastusühikut (RU) seondunud antikeha. Seejärel sisestati mittereageerinud rühmade blokeerimiseks 1 M etanoolamiin. Kineetika mõõtmisteks sisestati inimese CD22β-ECD His-märgistatud lahustuva antigeeni kahekordsete lahjenduste rida (ligikaudu 500 nM kuni ligikaudu 0,78 nM) PBS-is, millele oli lisatud 0,05% Tween 20, ning mõõdeti temperatuuril 25 °C voolutuskiirusega ligikaudu 30 µl minutis. Assotsiatsioonikiirused ( $k_{on}$ ) ja dissotsiatsioonikiirused ( $k_{off}$ ) arvutati, kasutades lihtsat, üks ühega seondumise Langmuir'i mudelit (tarkvara BIAevaluation Software versioon 3.2). Dissotsiatsiooni tasakaalukonstant ( $K_d$ ) arvutati kui  $k_{off}/k_{on}$ . Kontrollina kasutati CD22-vastast antikeha RFB4 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, kataloogi nr CBL147). Selle eksperimendi tulemused on esitatud allpool tabelis 2.

Tabel 2

CD22-vastase antikeha afiinsus inimese lahustuva CD22-ga seandumisel (BIACORE® analüüs)			
Kloon	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	Kd (nM)
hiire 10F4	0,19	2,8	15
kimäärne 10F4	0,26	4,2	16
humaniseeritud 10F4v1	0,18	3,5	19
humaniseeritud 10F4v2	0,32	2,5	7,8
kontroll RFB4	0,33	1,4	4,2

### Näide 7: Raku pinnaantigeeniga seandumise afiinsuse iseloomustamine

**[0624]** Konkureeriva seandumise testi abil uuriti hiire 10F4.4.1 ja humaniseeritud 10F4v1 ja 10F4v2 ning CHO rakkude pinnal ekspresseeritava inimese ja jaava makaagi (*cyno*) CD22 seandumise afiinsust. Lühidalt, CHO rakud ekspresseerisid stabiilselt inimese täispikka CD22 (SEQ ID NO: 27) või jaava makaagi (*cyno*) CD22-e (SEQ ID NO: 31). CD22-vastane antikeha (hiire või humaniseeritud 10F4v1 või v2) jodeeriti Iodogen® [<sup>125</sup>I] reagentiga eriaktiivsuseni ligikaudu 10 µCi/µg. Rakupõhine konkureeriva seandumise test viidi läbi määrgistamata CD22-vastase antikeha lahjenduste seeriaga. Antikehadel võimaldati seonduda rakkudega 4 tunni kestel temperatuuril 4 °C. Antikehade seandumise afiinsus määrati standardse Scatchard'i testi kohaselt, kasutades mittelineaarse kõvera lähendamise programmi (vaadake näiteks Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220-239, 1980). Selle eksperimendi tulemused on esitatud allpool tabelis 3.

Tabel 3

10F4 monokloonsete antikehade ning inimese ja jaava makaagi CD22 seandumise afiinsus		
Antikeha	Inimese CD22 Kd (nM)	Jaava makaagi CD22 Kd (nM)
Mu 10F4.4.1	2,4	2,3
Hu 10F4v1*	1,1, 1,7	1,4, 1,8
Hu 10F4v2	1,6	2,1
*kordustega testid		

[0625] Tulemused näitavad, et hiire ja humaniseeritud 10F4 antikehad seonduvad ligikaudu ekvivalentse afiinsusega inimese ja jaava makaagi CD22-ga, mis on ekspresseeritud CHO rakkude pinnal.

Näide 8: CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaatide valmistamine

[0626] CD22-vastaste ADC-de valmistamiseks konjugeeriti CD22-vastased antikehad RFB4, hiire 5E8, hiire 10F4, humaniseeritud 10F4v1, humaniseeritud tioMAb 10F4v1 (tio-10F4v1), humaniseeritud 10F4v2 ja humaniseeritud 10F4v3 järgmiste ravimi ja linkeri üksustega: spp-DM1, smcc-DM1, MC-vc-PAB-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF, MC-MMAE ja MC-MMAF, mille ravimi- ja linkeriüksuseid on kirjeldatud siin ja patendipublikatsioonides WO 2004/010957, avaldatud 5. veebruaril 2004 ja WO2006/034488, avaldatud 9. septembril 2005 (mõlemad patendinõudlused on käesolevasse kaasatud viitena täielikult). Enne konjugeerimist redutseeriti antikehad osaliselt TCEP-ga, kasutades selleks standardseid meetodeid vastavalt patendipublikatsioonis WO 2004/010957 kirjeldatud metodoloogiale. Osaliselt redutseeritud antikehad konjugeeriti eespool loetletud ravimi ja linkeri üksustega, kasutades selleks standardseid meetodeid vastavalt trükises Doronina et al., (2003) Nat. Biotechnol., 21: 778-784 ja patendipublikatsioonis US 2005/0238649 A1 kirjeldatud metodoloogiale. Lühidalt, osaliselt redutseeritud antikehad kombineeriti ravimi ja linkeri üksustega, lubades üksustel konjugeeruda tsüsteiinijääkidega. Konjugatsioonireaktsioonid peatati ja ADC-d puhastati. Ravimikoormus (ravimi üksuste keskmine arv antikeha kohta) määrati iga ADC jaoks HPLC abil. Teised ADC-de valmistamisel kasulikud linkerid hõlmavad, nendega piirdumata, järgmiseid: 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 ja SVSB (suktsiinimidüül-(4-vinüülsulfoon)bensoaat), kaasa arvatud bis-maleimiidreagendid: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)<sub>3</sub> ja BM(PEO)<sub>4</sub>.

[0627] CD22-vastaseid ADC-sid valmistatakse ka antikeha lüsiinijäägiga konjugeerimise teel. Antikeha lüsiinid muudetakse sulfhüdrüülrühmadeks, kasutades selleks näiteks Traut'i reagenti (Pierce Chemical Co.), nagu siin on kirjeldatud. Saadud sulfhüdrüülrühmad võivad ADC-de moodustamiseks reageerida linkerite või linkeri-ravimi molekulidega. Alternatiivselt valmistatakse ADC-sid CD22-vastase antikeha lüsiini reaktsioonis linkeriga SPP (N-sukt-



siinimidüül-4-(2'-püridüülditio)pentanoaadiga), mis võib juba olla kinnitatud ravimi molekulile või mis võib järgnevalt reageerida ravimi molekuliga nagu maitansinoid. Näiteks antikeha modifitseeritakse reaktsioonis SPP-ga, sellele järgneb konjugeerimine f-ga, nagu on kirjeldatud trükises Wang, L. et al., Protein Science, 14: 2436-2446 (2005), mis on käesolevasse kaasatud viitena täielikult. CD22-vastase antikeha lüsiinijääkidel võib pH 7-9 juures lasta reageerida ka linkeriga SMCC (Pierce Chemical Co.) nii, et SMCC amiini-reaktiivne N-hüdrosüsuksiinimiid (NHS ester) moodustab antikehaga stabiilse amiidsideme. SMCC sulfhüdrüüli-reaktiivsel maleimiidrühmal lastakse pH 6,5-7,5 juures reageerida DM1 sulfhüdrüülrühmaga (vaadake Pierce Chemical Co., piercenet.com), et moodustuks ADC. Lüsiini- või tsüsteiinijäägid annavad linkeri-ravimiga reageerides ADC-d, mis ravimikoormusena sisaldavad keskmiselt ligikaudu 1-8 ravimimolekuli antikeha kohta, alternatiivselt 1-6, 1-4, 1-3 või 1-2 linkeri-ravimi molekuli antikeha kohta.

**[0628]** Vastavalt sellele meetodile valmistati ADC-d anti-CD22(RFB4)-SMCC-DM1 ja anti-GP120-SMCC-DM1, kusjuures RFB4-smcc-DM1 valmistati ravimi madala (1,95), keskmise (3,7) ja kõrge (6,75) kooemusega variantidena. Anti-GP120-smcc-DM1 valmistati kõrge (6,1) ravimikoormusega. Need ADC-d olid *in vivo* efektiivsed, nagu siin allpool on näidatud näites 9 ja tabelis 9.

#### Näide 9: CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaatide efektiivsus

##### Efektiivsuse determinantide uuringud *in vitro*

**[0629]** Määrati CD22-vastaste ADC-de (või TDC-de) efektiivsuse determinandid lümfoomiraku liinis. On teada, et B-rakkude pinnal ekspresseeritud CD22 internaliseeritakse pärast seondumist oma ligandi(de) või antikehadega (Sato, S. et al., Immunity, 5: 551-562 (1996)). Selleks, et testida kas ja millisel määral CD22 ekspressiooni tase B-raku pinnal ja/või CD22 internaliseerimine mõjutavad efektiivsust, viidi läbi järgnevalt kirjeldatud *in vitro* uuringud.

**[0630]** Inimese CD22 ekspressioon raku pinnal erinevates lümfoomirakkude liinides. Kultiveeriti ning koguti kasvu logaritmilises faasis 19 lümfoomiraku liini, mis ekspresseerisid erineval tasemel oma pinnal CD22. Rakud resuspendeeriti FACS pesemispuhvrivis (PBS, 0,5% veise seerumi albumiini, 0,1% naatriumasiidi), mis sisaldas 100 µg/ml hiire normaalset IgG-d ja sama koguse inimese normaalset IgG-d ning mida hoiti jääl.

Ligikaudu  $1 \times 10^6$  rakku / 100  $\mu$ l värviti anti-huCD22 APC (mIgG1, kloon RFB4, Southern Biotech #9361-11) või hiire IgG1 APC isotüübiga (BD Pharmingen #555751) 30 minutit jääl. Surnud rakud värviti 7-AAD-ga (BD Pharmingen #559925). Andmed saadi BD FacsCalibur™ läbivoolutsütomeetril ja neid analüüsiti FlowJo™ tarkvara abil. IC50 väärtus hu10F4v3-SMCC-DM1 või vabade ravimite (DM1, MMAF või MMAE) jaoks määrati, kultiveerides lümfoomirakke eespool kirjeldatud viisil, kogudes rakud kasvu logaritmilises faasis ja külvates 96 süvendiga plaadile iga süvendi kohta 5000 rakku 90  $\mu$ l kultuurisöötmes. Detekteeritavas vahemikus valmistati ADC ja vaba ravimi lahjenduste seeriad (alates 300  $\mu$ g/ml ADC jaoks või 90 nM vaba ravimi jaoks ning lahjendades kuni testitava objekti praktilise nullväärtuseni). Lahjendatud ADC või ravimi 10  $\mu$ l suurused alikvoodid lisati rakke sisaldavatesse süvenditesse ja inkubeeriti 3 päeva temperatuuril 37 °C. Igasse süvendisse lisati 100  $\mu$ l CellTiter Glo™ ning inkubeeriti 30 minutit. Kemoluminestsents detekteeriti ning andmeid analüüsiti Prism™ tarkvara abil. Tulemused on esitatud joonisel 6A, millel on näha, et CD22 kõrged tasemed raku pinnal korreleeruvad hu10F4v3-SMCC-DM1 madala IC50-ga (suurem efektiivsus). Joonis 6C näitab, et tugevam korrelatsioon esineb rakkude seesmise vaba ravimi tundlikkuse ja ADC IC50 vahel.

**[0631]** hu10F4v3-SMCC-DM1 internaliseerimine määrati FACS testi abil. Lühidalt, lümfoomirakud värviti standardse tehnika abil CD22-FITC (RFB4)-ga hu10F4v3-SMCC-DM1 juuresolekul ning inkubeeriti 20-30 minutit jääl. Selleks, et määrata CD22 tasemeid raku pinnal pärast algset värvimist, pesti rakke külmas RPMI / 10% FBS söötmes, lisati 200  $\mu$ l eelsoojendatud RPMI / 10% FBS-i ja inkubeeriti temperatuuril 37 °C 15 minutit. Lisati 80  $\mu$ l värvimispuhvrit ja 20  $\mu$ l kuumaga inaktiveeritud hiire normaalset seerumit (HI NMS), seejärel inkubeeriti jääl 15 minutit. Lisati anti-DM1-Alexa-647, inkubeeriti jääl 20-30 minutit ning rakud pesti ja fikseeriti enne FACS testi 200  $\mu$ l PBS / 1% paraformaldehüüdiga. Pinnapealse ja sisemise CD22 värvumise määramiseks pärast algset värvimist pesti rakud külma RPMI / 10% FBS-ga, lisati eelsoojendatud RPMI / 10% FBS ja inkubeeriti rakke 15 minutit temperatuuril 37 °C. Seejärel pesti rakke FACS-i pesemisreagendiga (Wash) ja fikseeriti fikseerimisreagendiga A (Dako™ #k2311) 15 minutit toatemperatuuril ning korrati seda etappi fikseerimisreagendiga B (Dako™). Lisati värvimispuhver ja HI NMS ning rakusegu inkubeeriti jääl 15 minutit. Lisati fikseerimisreagent B, sellele järgnes anti-DM1-Alexa-647 lisamine ja inkubeerimine toatemperatuuril 20-30 minuti kestel. Rakud pesti FACS pesemisreagendis ja fikseeriti PBS / 1% paraformaldehüüdis. FACS test viidi läbi

kõigi rakusegudega (pind, pind pärast internaliseerimist ja sisemine värvimine), kasutades BD FACS Calibur™ läbivoolutsütomeetrit ning analüüsides tulemusi FlowJo™ tarkvara abil. Tulemused on esitatud joonisel 6B, millel on näha, et suured internaliseeritud DM1 kogused korreleeruvad madala IC50-ga (suurem efektiivsus), ja joonisel 6D, millel internaliseeritud DM1 on visualiseeritud fluorestsentsmikroskoopia abil.

#### In vivo efektiivsuse uuringud

[0632] Toksiiniga konjugeeritud või konjugeerimata CD22-vastaste monokloonsete antikehade kasvaja mahtu *in vivo* vähendava toime efektiivsuse testimiseks kasutati järgmist protokollit.

[0633] SCID hiiri inokuleeriti subkutaanselt külje sisse  $2 \times 10^7$  inimese B-rakulise lümfoomi rakuliini rakuga. Kasutatud rakkudeks olid inimese Burkitt'i lümfoomi rakuliinide Daudi, Ramos ja Raji rakud (saadaval kollektsioonist *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) ja muude B-raku liinide rakud, sealhulgas U-698-M rakud ja Su-DHL-4 rakud (saadaval DSMZ-s, Braunschweig, Saksamaa, Su-DHL-4 olid transfekteeritud lutsiferaasi reportergeeniga), DoHH2 rakud (Kluin-Neilemans, H. C., (1991), *supra*) ja Granta-519 (mantelrakulise lümfoomi rakud, Jadayel, D. M. et al., *Leukemia*, 11(1): 64-72 (1997)) ja BJAB-luc rakud (BJAB inimese B-rakulise lümfoblastoidi liinist, mis ekspresseerib lutsiferaasi reportergeeni). Kui kasvajakud saavutasid keskmiseks kasvaja mahuks vahemiku 100-200 mm<sup>3</sup>, jagati hiired rühmadesse ning päeval 0 manustati neile intravenoosse injektsiooni teel toksiiniga konjugeeritud või konjugeerimata antikeha, nagu allpool on näidatud tabelites 4-16.

#### CD22-vastaste antikehade ja maitansiinravimi konjugaadid vähendavad B-rakulise kasvaja mahtu

[0634] Kuuekümne viiele SCID hiirele injektsiooni külje sisse subkutaanselt  $2 \times 10^7$  BJAB-luc rakku mahus 0,2 ml hiire kohta. Rakud olid suspendeeritud HBSS-s. Kui kasvaja keskmine maht ulatus vahemikku 100-200 mm<sup>3</sup>, jagati hiired juhuslikult nelja rühma, igas rühmas 9 hiirt ning neile manustati I.V. üks kord (sabaveeni kaudu) allpool tabelis 4 toodud CD22-vastane antikeha või kontrollantikeha.

Tabel 4

Kasvaja mahu vähenemine antikeha <i>in vivo</i> manustamise järgselt						
Manustatud antikeha	TI	PR	CR	Ab annus (mg/kg)	DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
anti-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4,2	200	3,2
mu10F4-smcc-DM1	9/9	2	0	3,0	200	4,6
hu10F4v2-smcc-DM1	9/9	0	0	3,4	200	4,0
hu10F4v1	9/9	0	0	3,4	---	---

"TI" - kasvaja olemasolu viimases ajapunktis igas rühmas, murru nimetaja näitab kasvajaga loomade arvu rühmas ja murru jagaja loomade koguarvu rühmas. "PR" tähendab nende loomade arvu, kelle kasvaja vähenes 50-99% selle esialgsest mahust. "CR" tähistab nende loomade arvu, kes saavutasid täieliku remissiooni.

[0635] Igas manustamisrühmas jälgiti kasvaja keskmist mahtu 32 päeva kestel pärast antikeha injekeerimist. Kasvaja mõõtmed määrati kaliipriga. Toksiiniga konjugeeritud antikeha efektiivsust võrreldi kontrollantikeha ja konjugeerimata antikehade efektiivsusega. Tulemused on esitatud joonisel 7A. Hiire ja humaniseeritud 10F4v1-smcc-DM1 monokloonsed antikehad pidurdasid oluliselt kasvaja kasvu võrreldes konjugeerimata CD22-vastase antikeha ja mittespetsiifilise kontrollantikehaga.

[0636] Kasutades eespool toodud protokolliga võrreldi toksiiniga konjugeeritud humaniseeritud 10F4v2 antikeha toksiiniga konjugeeritud hiire ja konjugeerimata humaniseeritud antikehaga, nagu allpool on esitatud tabelis 5.

Tabel 5

Kasvaja mahu vähenemine antikeha <i>in vivo</i> manustamise järgselt						
Manustatud antikeha	TI	PR	CR	Ab annus (mg/kg)	DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
anti-Her2- smcc-DM1	9/9	0	0	4,2	200	3,2
mu10F4-smcc-DM1	7/9	1	2	4,7	200	2,9
hu10F4v2-smcc-DM1	8/9	1	1	4,5	200	3,0
hu10F4v2	9/9	0	0	4,5	---	---

"TI" - kasvaja olemasolu viimases ajapunktis igas rühmas, murru nimetaja näitab kasvajaga loomade arvu rühmas ja murru jagaja loomade koguarvu rühmas. "PR" tähendab nende loomade arvu, kellel kasvaja vähenes 50-99% selle esialgsest mahust. "CR" tähistab nende loomade arvu, kes saavutasid täieliku remissiooni.

[0637] Igas manustamisrühmas jälgiti kasvaja keskmist mahtu 32 päeva kestel pärast antikeha injekeerimist. Kasvaja mõõtmed määrati kaliipriga. Toksiiniga konjugeeritud antikeha efektiivsust võrreldi kontrollantikeha ja konjugeerimata antikehade efektiivsusega. Tulemused on näidatud joonisel 7B. Hiire 10F4-smcc-DM1 ja humaniseeritud 10F4v2-smcc-DM1 monokloonsed antikehad pidurdasid oluliselt kasvaja kasvu võrreldes konjugeerimata CD22-vastase antikeha ja mittespetsiifilise kontrollantikehaga.

[0638] CD22-vastane antikeha konjugeeriti DM I-ga üle SPP linkeri või SMCC linkeri siin kirjeldatud konjugeerimismeetodite abil. Konjugeerimata CD20-vastane antikeha oli positiivseks kontrolliks ja toksiini konjugaadid anti-HER2-spp-DM1 ja anti-HER2-smcc-DM1 olid negatiivseteks kontrollideks. Kaheksakümnele SCID hiirele injekeeriti külje sisse subkutaanselt  $2 \times 10^7$  BJAB-luc rakku mahus 0,2 ml hiire kohta. Rakud olid suspendeeritud HBSS-s. Kui kasvaja keskmine maht ulatus vahemikku 100-200  $\text{mm}^3$ , grupeeriti hiired juhuslikult kuude rühma, igas rühmas 10 hiirt ning neile manustati intravenoosselt testitavat või kontrollantikeha. Annuseid manustati kord nädalas, kokku kolm annust. Vaadake tabelit 6.

Tabel 6

Kasvaja mahu vähenemine antikeha <i>in vivo</i> manustamise järgselt		
Manustatud antikeha	Ab annus (mg/kg)	DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )
anti-Her2-spp-DM1*	4	214
anti-Her2-smcc-DM1**	6,9	405
anti-CD22-spp-DM1*	5	214
anti-CD22-spp-DM1	2,5	107
anti-CD22-smcc-DM1**	10	405
konjugeerimata CD22-vastane Ab	10	---
* ühesugune ravimikoormus		
** ühesugune ravimikoormus		

**[0639]** Kasvaja keskmist mahtu hinnati kolme nädala kestel kaks korda nädalas ja seejärel üks kord nädalas, kokku 8 nädalat. Kasvajate mahu muutumine ajas (joonis 7C) näitab, et anti-CD22-spp-DM1 annustes 214 ja 107  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  DM1 ning anti-CD22-smcc-DM1 annuses 405  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  omasid kõik BJAB-luc ksenograaft-kasvajate puhul tugevat ja võrreldavat kasvavastast aktiivsust. Kõigil CD22-vastase ADC rühmade puhul täheldati täielikku vastust.

**[0640]** CD22-vastased antikehad RFB4, 5E8 ja 7A2 konjugeeriti DM1-ga üle SMCC linkeri, kasutades siin kirjeldatud konjugeerimismeetodeid. Negatiivse kontrollina kasutati toksiiniga konjugeeritud antikeha anti-HER2-smcc-DM1 (millele siin vahelduvalt viidatakse kui HER-smcc-DM1 või kui HER2-smcc-DM1).

**[0641]** Uuriti nende antikehade võimet vähendada kasvaja mahtu SCID hiirte erinevates ksenograaftides. Ksenograaft-kasvajate valmistamiseks kasutati B-rakulise lümfoomi rakulii-nide Ramos ja BJAB-luc rakke. Kõigi ksenograaftide puhul injekeeriti SCID hiirtele  $5 \times 10^6$  inimese B-rakulise lümfoomi Ramos rakku subkutaanselt külje sisse mahus 0,1 ml hiire kohta (või  $2 \times 10^7$  BJAB-luc rakku mahus 0,2 ml). Rakud olid suspendeeritud HBSS-s. Kui kasvaja keskmine maht ulatus vahemikku 100-200  $\text{mm}^3$ , grupeeriti hiired juhuslikult rühma-desse, igas rühmas 8-10 hiirt, ning igale hiirele manustati intravenoosselt üks kord testitavat või kontrollantikeha. DM1 ravimikoormus normaliseeriti kõigis rühmades väärtuseni 200  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ , määrates sellega DM1 manustatava doosi. Kasvaja keskmist mahtu hinnati nelja nädala kestel kaks korda nädalas. Tulemused on esitatud allpool vastavalt tabelites 7 ja 8 ning joonistel 8A ja 8B.

Tabel 7

Ramos'e ksenograft-kasvaja mahu vähenemine antikeha <i>in vivo</i> manustamise järgselt		
Manustatud antikeha	Ab annus (mg/kg)	DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )
anti-HER2-smcc-DM1	4,2	200
anti-CD22(7A2)-smcc-DM1	3,8	200
anti-CD22(5E8)-smcc-DM1	3,8	200
anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1	3,2	200

Tabel 8

BJAB-luc ksenograft-kasvaja mahu vähenemine antikeha <i>in vivo</i> manustamise järgselt			
Manustatud antikeha	Ab annus (mg/kg)	DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
anti-HER2- smcc-DM1	4,2	200	3,2
anti-CD22 (7A2)-smcc-DM1	3,8	200	3,6
anti-CD22(5E8)-smcc-DM1	3,8	200	3,6
anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1	3,2	200	4,25

[0642] Need tulemused näitavad, et CD22-smcc-DM1-vastase antikeha ja ravimi konjugaadid vähendavad praktiliselt B-rakulise kasvajate mahtu Ramos'e ja BJAB-luc ksenograftides, seda võrrelduna kontrollantikehade või konjugeerimata CD22-vastaste antikehadega.

[0643] Uuriti antikeha ravimikoormuse (keskmine ühe antikehaga konjugeeritud ravimimolekulide arv antikehade populatsioonis) mõju antikeha ja ravimi konjugaadi anti-CD22-smcc-DM1 võimele vähendada kasvaja mahtu SCID hiirte BJAB-luc ksenograftides. Saja neljakümnele SCID hiirele injekteeriti külje sisse subkutaanselt  $2 \times 10^7$  BJAB-luc rakku mahus 0,2 ml hiire kohta. Rakud olid suspendeeritud HBSS-s. Kui kasvaja keskmine maht ulatus vahemikku 100-200  $\text{mm}^3$ , grupeeriti hiired juhuslikult rühmadesse, igas rühmas 8-10 hiirt, ning igale hiirele manustati üks kord intravenoosselt testitavat või kontrollantikeha. Anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 populatsioonid, kus ravimikoormus oli madal, keskmine või kõrge (keskmine ravimikoormus vastavalt 1,95, 3,7 või 6,75 konjugeeritud DM1 molekuli antikeha kohta), manustati testitavate antikehadena. Konjugeerimata RFB4 antikeha ja anti-GP120-smcc-DM1 (kõrge ravimikoormus) olid kontrollideks. Antikeha ja ravimi konjugaatide

(testitavad ja kontrollid) annused normaliseeriti annuseks 5mg/kg valgu järgi. Linker oli anti-kehadega konjugeeritud üle lüsiinijääkide, vaadake tabelit 9.

Tabel 9

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , BJAB-luc ksenograftid, anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 manustamine			
Manustatud antikeha	Ab annus (mg/kg)	DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
anti-CD22(RFB4) (konjugeerimata antikeha)	10	--	--
anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (madal)	5	144	1,95
anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (keskmine)	5	273	3,7
anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (kõrge)	5	497	6,75
anti-GP120-smcc-DM1 (kõrge)	5	449	6,1

[0644] Samal tasemel valguannuse (5 mg/kg) puhul vähendas kõrge ravimikoormusega (6,75 DM1 molekuli antikeha molekuli kohta) anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 manustamine kasvaja mahtu veidi enam kui keskmise ravimikoormusega (3,7) antikeha ja ravimi konjugaadi manustamine, seejuures ei erinenud madala ravimikoormusega antikeha ja ravimi konjugaadi manustamise tulemus kontrollantikeha või konjugeerimata antikeha toimest. Tulemused on esitatud joonisel 9.

#### CD22-vastase antikeha ja auristatiinravimi konjugaadid vähendavad B-rakulise kasvaja mahtu

[0645] Uuriti CD22-vastase antikeha ja auristatiini MMAF ravimi konjugaadi toimet kasvaja mahule hiire ksenograftides. CD22-vastane antikeha (RFB4) ja GP120-vastane kontrollantikeha konjugeeriti MMAF-ga üle MC-vcPAB linkeri või üle MC linkeri, kasutades siin kirjeldatud meetodeid. SCID hiirtele injekteeriti külje sisse subkutaanselt  $5 \times 10^6$  Ramos'e raku mahus 0,2 ml hiire kohta. Rakud olid suspendeeritud HBSS-s. Kui kasvaja keskmine maht ulatus vahemikku 100-200  $\text{mm}^3$ , grupeeriti hiired juhuslikult rühmadesse, igas rühmas 8-10 hiirt, ning igale hiirele manustati üks kord intravenoosselt testitavat või kontrollanti-



keha. Tabelis 10 on esitatud hiirtele manustatud ravimi annus, ravimikoormus (ravimi suhe) ja antikeha annus.

Tabel 10

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , Ramos'e ksenograftid, anti-CD22(RFB4)-MMAF konjugaadi manustamine			
Manustatud antikeha	MMAF annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
anti-CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAF	405	6,6	4,2
anti-CD22(RFB4)-MC-MMAF	405	6,9	4,0
anti-GP 120-MCvcPAB-MMAF	405	5,8	4,8
anti-GP120-MC-MMAF	405	5,9	4,7

[0646] Ramos'e RA1 ksenograftides olid Anti-CD22-MC-MMAF ja anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAF aktiivused võrreldavad. Tulemused on esitatud joonisel 10.

[0647] Uuriti CD22-vastase antikeha ja auristatiini MMAE ravimi ning antikeha ja DM1 ravimi konjugaatide toimet kasvajate mahule hiire ksenograftides. CD22-vastane antikeha (RFB4) ja GP120-vastane kontrollantikeha konjugeeriti MMAE-ga üle MC-vcPAB linkeri või üle MC linkeri või DM1-ga üle SMCC linkeri, kasutades siin kirjeldatud meetodeid. SCID hiirtele injekteeriti külje sisse subkutaanselt  $5 \times 10^6$  Ramos'e rakku mahus 0,1 ml hiire kohta. Rakud olid suspendeeritud HBSS-s. Kontrollina manustati PBS-i. Kui kasvaja keskmine maht ulatus vahemikku 100-200  $\text{mm}^3$ , grupeeriti hiired juhuslikult rühmadesse, igas rühmas 8-10 hiirt, ning igale hiirele manustati üks kord intravenoosselt testitavat või kontrollantikeha. Tabelis 11 on esitatud hiirtele manustatud ravimi annus, ravimikoormus (ravimi suhe) ja antikeha annus.

Tabel 11

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , Ramos'e ksenograftid, anti-CD22(RFB4)-MMAE ja DM1 konjugaatide manustamine			
Manustatud antikeha	MMAF või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
anti-GP120-smcc-DM1	405	6,7	4,1
anti-CD22(RFB4)- smcc-DM1	405	6,5	4,25
anti-GP120-MCvcPAB-MMAE	405	6,0	4,7
antiCD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAE	405	6,3	4,5
PBS	--	--	--

[0648] Anti-CD22-MCvcPAB-MMAE demonstreeris Ramos RA1 ksenograftides tugevat kasvavastast aktiivsust. Anti-CD22-MCvcPAB-MMAE aktiivsus oli suurem kui antiCD22-smcc-DM1 aktiivsus. Kontroll-ADC, anti-GP120-MCvcPAB-MMAE, ei olnud olulisel määral aktiivne. Tulemused on esitatud joonisel 11.

[0649] Uuriti CD22-vastase antikeha ja auristatiini MMAF ravimi ning antikeha ja DM1 ravimi konjugaatide toimet kasvajate mahule hiire ksenograftides. Manustati CD22-vastaseid antikehi hu10F4v2-MC-MMAF, hu10F4v2-smcc-DM1 ja tio-10F4v1-MC-MMAF ning võrreldi nende toimet kasvaja mahule. Kontrollantikehadeks olid anti-Her2-MC-MMAF ja anti-Her2-smcc-DM1. SCID hiirtele injekeeriti külje sisse subkutaanselt  $2 \times 10^7$  BJAB-luc rakku mahus 0,2 ml hiire kohta. Rakud olid suspendeeritud HBSS-s. Kui kasvaja keskmine maht ulatus vahemikku 100-200  $\text{mm}^3$ , grupeeriti hiired juhuslikult rühmadesse, igas rühmas 8-10 hiirt, ning igale hiirele manustati üks kord intravenoosselt testitavat või kontrollantikeha. "Tio" tähendab tioMab-i, nagu siin on kirjeldatud, milles linker ja ravimüksus on antikehaga konjugeeritud üle tsüsteiiniks modifitseeritud saidi antikehas. Tabelis 12 on esitatud hiirtele manustatud ravimi annus, ravimikoormus (ravimi suhe) ja antikeha annus.

Tabel 12

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , BJAB-luc ksenograftid, Hu10F4 MMAF ja DM1 konjugaatide manustamine			
Manustatud antikeha	MMAF või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
anti-Her2-MC-MMAF	100	1,1	6,3
hu10F4v2-MC-MMAF	100	2,0	3,4
hu10F4v2-MC-MMAF	50	1,0	3,4
tio-hu10F4v1-MC-MMAF	100	4,6	1,5
tio-hu10F4v1-MC-MMAF	50	2,3	1,5
anti-Her2-smcc-DM1	200	4,2	3,2
hu10F4v2-smcc-DM1	200	4,5	3,0
hu10F4v2-smcc-DM1	100	2,3	3,0

**[0650]** Hu10F4v2 ADC-d demonstreerisid BJAB-luc ksenograftides tugevat kasvjavastast aktiivsust. Tulemused on esitatud joonisel 12.

**[0651]** Eespool kirjeldatud eksperimentides kasutatud protseduuride abil uuriti hu10F4v3-smcc-DM1 ja -MC-MMAF ADC-de erinevate annuste efektiivsust erinevates ksenograftides. SuDHL4-luc, DoHH2 ja Granta-519 ksenograftid valmistati nii, nagu siin eespool kirjeldati. Kui kasvaja maht ulatus vahemikku 100-200 mm<sup>3</sup>, grupeeriti hiired juhuslikult rühmadesse, igas rühmas 8-10 hiirt, ning igale hiirele manustati üks kord intravenoosselt testitavat või kontrollantikeha. Tabelites 13A-13C on esitatud hiirtele manustatud ravimi annus, ravimikoormus (ravimi suhe) ja antikeha annus ning tulemused on esitatud joonistel 13A-13C.

Tabel 13A

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , Hu10F4v3 MMAF ja DM1 konjugaatide manustamine SuDHL-4-luc ksenograftides			
Manustatud antikeha	MMAF või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
anti-Her2-smcc- DM1	600	11,9	3,3
hu10F4v3-smcc- DM1	600	13,6	2,9
hu10F4v3-smcc- DM1	300	6,8	2,9
anti-Her2-MC- MMAF	600	9,9	4,0

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , Hu10F4v3 MMAF ja DM1 konjugaatide manustamine SuDHL-4-luc ksenograaftides			
Manustatud antikeha	MMAF või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
hu10F4v3-MC- MMAF	600	13,3	3,0
hu10F4v3-MC- MMAF	300	6,6	3,0

Tabel 13B

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , Hu10F4v3 MMAF ja DM1 konjugaatide manustamine DoHH2 ksenograaftides			
Manustatud antikeha	MMAF või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
anti-Her2-smcc-DM1	600	11,9	3,3
hu10F4v3-smcc-DM1	600	11,8	3,35
hu10F4v3-smcc-DM1	300	5,9	3,35
anti-Her2-MC-MMAF	600	9,9	4,0
hu10F4v3-MC-MMAF	600	13,1	3,04
hu10F4v3-MC-MMAF	300	6,6	3,04
konjugeerimata hu10F4v3	--	13,1	--

Tabel 13C

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , Hu10F4v3 MMAF ja DM1 konjugaatide manustamine Granta-519 ksenograaftides			
Manustatud antikeha	MMAF või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
anti-Her2-smcc-DM1	300	5,9	3,3
hu10F4v3-smcc-DM1	300	5,9	3,35
hu10F4v3-smcc-DM1	150	2,9	3,35
anti-Her2-MC-MMAF	300	4,9	4,0
hu10F4v3-MC-MMAF	300	6,6	3,04
hu10F4v3-MC-MMAF	150	3,3	3,04
konjugeerimata hu 10F4v3	--	6,6	--

[0652] CD22-vastased hu10F4v3-smcc-DM1 ja -MC-MMAF ADC-d demonstreerisid kõikides ksenograaftimudelites tugevat kasvjavastast aktiivsust.

#### Näide 10: Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastaste antikehade valmistamine

[0653] Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastaste antikehade valmistamine toimus siin kirjeldatud viisil. 10F4v3 antikeha kodeerivat DNA-d, millel oli samasugused varieeruvad ja konstantsed järjestused nagu antikehal 10F4v2 (kerge ahel SEQ ID NO: 87 ja raske ahel SEQ ID NO: 88, joonis 5B), muteeriti siin kirjeldatud meetodite abil, et modifitseerida kerge ahel, raske ahel või raske ahela Fc-piirkond. Kerget ahelat kodeeriv DNA muteeriti kerge ahela Kabat' asendis 205 valiini asendamiseks tsüsteiiniga (läbivas numeratsioonis asend 210), nagu on näidatud joonisel 17A (humaniseeritud antikeha 10F4v3 tiomab-i kerge ahela SEQ ID NO: 91). Rasket ahelat kodeeriv DNA muteeriti raske ahela EL asendis 118alaniini asendamiseks tsüsteiiniga (läbivas numeratsioonis asend 121), nagu on näidatud joonisel 17B (humaniseeritud antikeha 10F4v3 tiomab-i raske ahela SEQ ID NO: 92). Fc-piirkond muteeriti seriini asendamiseks tsüsteiiniga EL asendis 400 raske ahela Fc-piirkonnas (läbivas numeratsioonis asend 403), nagu on näidatud joonisel 17C (raske ahela SEQ ID NO: 93).

#### Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastaste antikehade ettevalmistamine konjugeerimiseks redutseerimise ja reoksüdeerimise teel

[0654] CHO rakkudes ekspresseeritud täispikad tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastased monokloonsed antikehad (tioMab-id) lahustatakse 500 mM naatriumboraadis ja 500 mM naatriumkloriidis ligikaudu pH 8,0 juures ja redutseeritakse ligikaudu 50-100-kordse 1 mM TCEP (tris(2-karboksüetüül)fosfiinvasinikkloriidi, Getz et al., (1999) Anal. Biochem., 273: 73-80, Soltec Ventures, Beverly, MA) ülehulga juuresolekul ligikaudu 1-2-tunni kestel temperatuuril 37 °C. Redutseeritud tioMab lahjendatakse ja kantakse HiTrap S kolonni 10 mM naatriumatsetaadis, pH 5, ning elueeritakse 0,3 M naatriumkloriidi sisaldava PBS-ga. Elueeritud redutseeritud tioMab-i mõjutatakse 2 mM dehüdroaskorbiinhappega (dhAA) pH 7 juures 3 tundi või 2 mM vasksulfaadiga (CuSO<sub>4</sub>) vees üle öö toatemperatuuril. Oksüdeerimine ümbritsevas õhus võib samuti olla efektiivne. Puhver vahetatakse Sephadex G25 vaigul, kasutades elueerimiseks 1 mM DTPA sisaldusega PBS-i. Tioli/Ab suhte kindlakstegemiseks

määratakse redutseeritud antikeha kontsentratsioon lahuse neeldumisvõime põhjal 280 nm juures ning reaktsioonis DTNB-ga (Aldrich, Milwaukee, WI) ja tiooli kontsentratsioon reaktsioonijärgse neeldumise põhjal 412 nm juures,.

Näide 11: Tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastaste antikehade ja ravimi konjugaatide valmistamine tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastaste antikehade ja ravimiga seotud linkerite konjugeerimise teel

**[0655]** Pärast näites 10 kirjeldatud redutseerimise ja reoksüdeerimise protseduure lahustatakse tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastane antikeha PBS-s (fosfaadiga puhverdatud soolalahuses) ning jahutatakse jääl. Auristatiinravimi ja linkeri vaheühend, nagu MC-MMAE (maleimidokaproül-monometüülauristatiin E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE või MC-val-cit-PAB-MMAF, milles leidub tioolreaktiivseid funktsionaalseid rühmi nagu maleimidorühm koguses, mis on võrdne ligikaudu 1,5 molaarekvivalendiga antikehas modifitseeritud tsüsteiinide suhtes, lahustatakse atsetonitriili ja veega lahjendatud DMSO-s ning lisatakse jahutatud redutseeritud ja reoksüdeeritud antikehale PBS-s. Ligikaudu ühe tunni pärast lisatakse reaktsiooni peatamiseks ja antikeha mittereageerinud tioolrühmade kaitsmiseks ülehulgas maleimiidi. Reaktsioonisegu kontsentreeritakse ultrafiltrimisega tsentrifuugil ning tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaadi puhastamiseks ning soolade eemaldamiseks elueeritakse konjugaati PBS-s läbi G25 vaigu ning filtritakse steriilsetes tingimustes läbi 0,2 µm filtreid, seejärel külmutatakse säilitamiseks.

**[0656]** Hu10F4v3HC(A118C) tiomab-BMPEO-DM1 preparaati valmistati järgmiselt: hu10F4v3HC(A118C) tiomab-i vaba tsüsteiin modifitseeriti bismaleimidoreagendiga BM(PEO)<sub>4</sub> (Pierce Chemical), jättes antikeha pinnale reageerimata maleimidorühma. Selleks lahustati BM(PEO)<sub>4</sub> 50% etanooli/vee segus 10 mM kontsentratsioonini ja lisati BM(PEO)<sub>4</sub> kümnekordses molaarses ülehulgas lahusele, mis sisaldas hu4D5Fabv8-(V110C)tioFab-i fosfaadiga puhverdatud soolalahuses ligikaudses kontsentratsioonis 1,6 mg/ml (10 µM) ning reaktsioonil lasti toimuda 1 tund. Liigne BM(PEO)<sub>4</sub> eemaldati geelfiltrimise teel (HiTrap kolonn, Pharmacia) 30 mM tsitraadis, pH 6, koos 150 mM NaCl puhvriga. hu4D5Fabv8-(V110C)tioFab-BMPEO vaheühendile lisati ligikaudu kümnekordses ülehulgas DM1, mis oli lahustatud dimetüülatsetaadis (DMA). Ravimüksuse reagenti lahustamiseks võib kasutada ka dimetüülformamiidi (DMF). Reaktsioonisegul lasti reageerida üle öö, enne kui reageerimata

ravim eemaldati geelfiltrimise või dialüüsiga PBS-i. Kõrgmolekulaarsete agregaatide eemaldamiseks ja puhastatud hu10F4v3HC(A118C)tiomab-BMPEO-DM1-i saamiseks kasutati geelfiltrimist S200 kolonnidel PBS-s.

**[0657]** Sarnaste protokollide kohaselt valmistati ka kontroll-HC (A118C) MAb-MC-MMAF, kontroll-HCtioMAb-MC-MMAF, kontroll-HCtioMAb-MCvcPAB-MMAE ja kontroll-HCtioMab-BMPEO-DM1.

**[0658]** Eespool toodud protokollide kohaselt valmistati ja testiti järgmisi tsüsteiini-modifitseeritud CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaate:

tio-hu-tio-HC-10F4v3-MC-MMAF, konjugeerides A118C tio-hu-10F4v3 ja MC-MMAF, tio-hu-tio-HC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE, konjugeerides A 118C tio-hu-10F4v3 ja MC-val-cit-PAB-MMAE, tio-hu-HC-10F4v3-bmpeo-DM1, konjugeerides A 118C tio-hu-HC-10F4v3 ja bmpeo-DM1, tio-hu-LC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE, konjugeerides V205C tio-hu-LC-10F4v3 ja MC-val-cit-PAB-MMAE, and tio-hu-Fc-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE, konjugeerides S400C tio-hu-Fc-10F4v3 ja MC-val-cit-PAB-MMAE.

Näide 12: Tsüsteiini-modifitseeritud tioMab-i ja ravimi konjugaatide rakupinna antigeenidele seondumise afiinsuse iseloomustamine

**[0659]** Tio hu10F4v3 ja ravimi konjugaatide afiinsus BJAB-luc rakkude pinnal ekspresseeritud CD22-ega seondumise suhtes määrati FACS analüüsi teel. Lühidalt, ligikaudu  $1 \times 10^6$  rakku mahus 100  $\mu$ l viidi kontakti erinevas kogustes ühega järgmistest CD22-vastaste tioMab-i ja ravimi konjugaatidest: tio-hu-LC(V205C)10F4v3-MCvcPAB-MMAE, tio-hu-Fc(S400C)10F4v3-MCvcPAB-MMAE, tio-hu-HC(A118C)10F4v3-MCvcPAB-MMAE, tio-hu-HC(A118C)10F4v3-MC-MMAF või tio-hu-HC(A118C)10F4v3-BMPEO-DM1 (vaadake vastavalt jooniseid 18A-18E). Raku pinnaga seondunud CD22-vastase antikeha detekteerimiseks kasutati kitse biotinüülitud huFc-vastast antikeha pluss streptavidiin-PE-d. Joonistelt 18A-18E on näha, et antigeeniga seondumine oli kõikide testitud tiomab-i ja ravimi konjugaatide puhul ligikaudu ühesugune.

Näide 13: Test CD-22-vastase tio Mab-i ja ravimi konjugaatide kasvajat *in vivo* vähendava toime määramiseks

**[0660]** Siin näites 9 esitatud protseduuri abil testiti näite 11 kohaselt valmistatud tiomab-i ja ravimi konjugaatide võimet vähendada B-rakulise kasvaja mahtu ksenograaftimudelites. Granta-519-rakulise ksenograaftkasvajaga SCID hiirtele manustati päeval 0 kontroll- ja CD22-vastase humaniseeritud 10F4v3 tiomabi ja ravimi konjugaate tabelis 14 allpool toodud annustes. Kontroll-HC(A118C) tiomab oli HER2 4D5 vastane antikeha.

Tabel 14

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , tio-hu-10F4v3-MMAE ja -MMAF konjugaatide manustamine Granta-519 ksenograaftides			
Manustatud antikeha	MMAF või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
tio-kontroll-HC(A118C)-MC-MMAF	100	3,99	1,65
tio-kontroll-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	4,33	1,55
tio-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	100	3,41	1,95
tio-10F4v3-LC(V205C)-MCvcPAB-MMAE	100	4,23	1,6
tio-10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	3,76	1,8
tio-10F4v3-Fc(S400C)-MCvcPAB-MMAE	100	4,23	1,6

**[0661]** Selle eksperimendi tulemused on esitatud joonisel 19. tio-10F4v3-LC-(V205C)-MCvcPAB-MMAE ja tio-10F4v3-HC(A 118C)-MCvcPAB-MMAE tiomab-i ja ravimi konjugaatide manustamine tabelis 14 esitatud annustes kutsus uuringu kestel esile kasvaja mahu vähenemise.

**[0662]** Lisaks testiti Granta-519 ksenograaftides CB17 SCID hiirtel sama protokolliga kohaselt veel muid tiomab-i ja ravimi konjugaate, nendes testides kasutati senisest erinevaid ravimi annuseid. Kontrollantikeha või kontroll-tiomab oli anti-HER2 4D5 antikeha või HC(A118C) tiomab. Tulemused on esitatud allpool tabelis 15.



Tabel 15

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , tio-hu-10F4v3 MMAE, MMAF ja DM1 konjugaatide manustamine Granta-519 ksenograaftides			
Manustatud antikeha	MMAF või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
10F4v3-MC-MMAF	150	3,2	3,1
tio-kontroll-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10,3	1,9
tio-10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	150	5,2	1,9
tio-10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10,4	1,9
tio-kontroll-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	6,5	1,55
tio-10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	5,3	1,9
tio-10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	75	2,7	1,9
tio-kontroll-HC(A118C)-MC-MMAF	150	5,2	1,9
tio-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	150	5,1	1,95
tio-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	75	2,6	1,95

**[0663]** Selle eksperimendi tulemused on esitatud joonisel 20A. Tio-10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE tiomabi ja ravimi konjugaadi manustamine annustes 150 ja 75  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  kutsus uuringu kestel esile kasvaja keskmise mahu vähenemise. Samas uuringus määrati igas annustamisrühmas kehamassi muutumine protsentides uuringu esimese seitsme päeva kestel. Joonisel 20B esitatud tulemused näitavad, et nende tiomabi ja ravimi konjugaatide manustamine ei kutsunud selle aja kestel esile kehamassi vähenemist.

**[0664]** Kasutades samu ksenograaftiuuringute protokolle, nagu on kasutatud eespool esitatud näidetes, ning varieerides TDC-sid ja manustatavaid annuseid, uuriti TDC-de efektiivsust follikulaarse lümfoomi DOHH2 ksenograaftides CB17 SCID hiirtes. TDC-d ja annused on esitatud allpool tabelis 16.

Tabel 16

Kasvaja mahu vähenemine <i>in vivo</i> , tio-hu-10F4v3 MMAE, MMAF ja DM1 konjugaatide manustamine DOHH2 ksenograaftides			
Manustatud antikeha	MMAF või DM1 annus ( $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )	Ab annus (mg/kg)	Ravimi suhe (ravimüksusi Ab kohta)
10F4v3-MC-MMAF	300	6,4	3,1
tio-kontroll-HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	21,9	1,79
tio-10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	20,8	1,9
tio-10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10,4	1,9
tio-kontroll-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	26,0	1,55
tio-10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	21,4	1,9
tio-10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	300	10,7	1,9
tio-kontroll-HC(A118C)-MC-MMAF	600	20,8	1,9
tio-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	600	20,4	1,95
tio-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	300	10,2	1,95

[0665] Joonisel 20C on graafik, millel kujutatakse kasvaja keskmise mahu muutumist ajas follikulaarse lümfoomi DOHH2 ksenograaftis CB17 SCID hiirtes, kellele manustati samu raske ahela A118C CD22-vastaseid TDC-sid, kuid suuremates annustes, nagu on toodud tabelis 16. Selles uuringus osutus kõige efektiivsemaks testitavaks agensiks anti-CD22 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC. Siiski täheldati selles eksperimendis suurendatud annuste puhul ka kontrollkonjugaadi anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE teatavat efektiivsust. Selle aktiivsuse võiks seostada ravimi vabanemisega ringluses olevalt ADC-lt. Testitavad CD22-vastased hu10F4-HC(A118C)-MC-MMAF ja BMPEO-DM1 demonstreerisid vahepealset efektiivsust ja vastavuses nende linkerite suurema stabiilsusega oli mitteseonduvate HER2-vastaste kontrollide aktiivsus madal. Joonisel 20D on kujutatud hiirte kehamassi muutus protsentides DOHH2 ksenograafti uuringus, mis näitab, et uuringu esimese 14 päeva kestel ei esinenud kehamassi suurusel olulisi muutusi.

Näide 14: CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaatide ohutus rottidel ja jaava makaakidel

**[0666]** CD22-vastane hu10F4 antikeha ristreageerib jaava makaagi (*cyno*) CD22-ga afiinsusega, mis on võrdne reaktsiooniga inimese CD22-ga. CD22-vastane hu10F4 antikeha ei ristreageeri roti CD22-ga. Tulenevalt eelöeldust testiti CD22-vastase antikeha ja ravimi konjugaatide sihtmärgist mittesõltuvat ja sihtmärgist sõltuvat ohutust ja toksilisust vastavalt rotil ja jaava makaagil.

Ohutus ja toksilisus rottidel

**[0667]** Ohutust ja toksilisust rottide jaoks testiti kahes uuringus. Ühes uuringus manustati rottidele päeval 1 intravenoosselt hu10F4v3-SMCC-DM1, -SPP-DM1, -MC-vc-PAB-MMAE või -MC-MMAF konjugaate, milles ravim oli seotud üle lõhustatava linkeri (-vc- või -spp-) või mittelõhustatava linkeri (MC või SMCC (samuti viidatud kui MCC)). Kontrollina manustati kandjat. Vereproovid farmakokineetiliseks analüüsiks koguti päeval 5 ja päeval 12 (nekropsia käigus). Kliiniline jälgimine ja kehamassi mõõtmine toimusid vähemalt kolm korda nädalas. Toksilisuse indikaatorina jälgiti seerumi AST (aspartaataminotransferaasi) taset. Seerumi AST tase tõusis päeval 5 võrrelduna päevaga 0 neil rottidel, kellele oli manustatud 20 mg/kg hu10F4v3-vcMMAE või hu10F4v3-SPP-DM1, mis mõlemad sisaldasid lõhustatavaid linkereid (joonis 21A). Neutrofiilide tasemed tõusid päeval 5 võrrelduna päevaga 0 neil rottidel, kellele oli manustatud 20 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF või hu10F4v3-MCC-DM1 (mittelõhustatavaid linkereid, joonis 21B). Neutrofiilide tasemed langesid päeval 5 võrrelduna päevaga 0 neil rottidel, kellele oli manustatud hu10F4v3-vc-MMAE või hu10F4v3-SPP-DM1. Suurenenud seerumi AST ja vähenenud neutrofiilide arv rottidel, kellele manustati lõhustatavaid linkereid sisaldavaid ADC-sid, viitab selliste ADC-de suurenenud toksilisusele.

**[0668]** Samas rottide uuringus annustati päeval 1 kuuest rotist koosnevatele gruppidele 20, 40 või 60 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF või hu10F4v3-SMCC-DM1 ning jälgiti loomi 12 päeva. Neil loomadel, kellele manustati hu10F4v3-MC-MMAF-i, ei täheldatud ühtegi järgmistest indikaatoritest: kehamassi vähenemine, seerumi maksaensüümide taseme tõus, trombotsüütide või neutrofiilide vähenemine. Rottidel, kellele manustati hu10F4v3-SMCC-DM1, täheldati pöörduvat kehamassi kaotust ja pöörduvat seerumi maksaensüümide taseme tõusu

annuste 40 ja 60 mg/kg puhul, kusjuures 60 mg/kg puhul täheldati pöörduvat neutrofiilide taseme langust ja põgusat trombotsüütide arvu vähenemist.

#### Ohutus ja toksilisus jaava makaakidel

**[0669]** CD22-vastaste ADC-de ohutuse ja toksilisuse hindamiseks primaadimudelil jagati 30 jaava makaaki järgmistesse mõjutamisrühmadesse: kontroll kandjaga (6 looma), hu10F4v3-SMCC-DM1 annustes 2, 4 ja 6 mg/m<sup>2</sup> ravimiannust (võrdne 0, 10, 20 ja 30 mg/kg antikeha annusega, 4 looma rühmas iga annuse puhul) ja hu10F4v3-MC-MMAF annustes 2, 4 ja 6 mg/m<sup>2</sup> (4 looma rühmas iga annuse puhul). Annused manustati loomadele päeval 1 ja päeval 22. Hinnati loomade kehamassi muutust, toitumist ja viiteid patoloogiale. Toksikoloogiliste, farmakodünaamiliste ja ravimivastaste antikehade efektide hindamiseks koguti ja analüüsiti vereproove. Pooled loomadest igas rühmas tapeti päeval 25 ja teine pool päeval 43 ning koguti koeproovid.

**[0670]** Mitte kummaski ADC rühmas ei täheldatud märgatavat kehamassi muutumist. Seerumi maksaensüümide AST (aspartaataminotransferaasi), ALT (aminotransferaasi) ja GGT (gamma-glutamüültranspeptidaasi) taset testiti erialal tuntud stanadardmeetodite kohaselt. Seerumi maksaensüümide pöörduvat tõusu täheldati loomadel, kellele annuses 30 mg/kg oli manustatud ühte kahest ADC-st, kuigi DM1 rühmas tõusis ALT tase ja MMAF rühmas AST ja GGT tase. Istmikunärvi degeneratsioon oli minimaalne kuni nõrk DM1 rühmas kahel loomal neljast annuse 20 mg/kg puhul ja neljal loomal neljast annuse 30 mg/kg manustamisel. MMAF rühmas oli annuse 30 mg/kg puhul ühel loomal neljast minimaalne istmikunärvi degeneratsioon. Erinevate organite kudet uuriti mikroskoopiliselt. Kahel loomal neljast MMAF rühmas, kellele manustati annus 30 mg/kg, leiti tundmatu mõjuga kahjustused kopsus, mida ei täheldatud DM1 rühmas.

**[0671]** Perifeersete B-rakkude vähenemine (*depletion*) hu10F4v3-MC-MMAF ja -SMCC-DM1 ADC-de toimel määrati, mõõtes jaava makaakidel, kellele oli testitavat agensit manustatud päeval 0 ja päeval 22, CD20<sup>+</sup> rakkude taset veres 43 päeva kestel. Perioodiliselt uuringu käigus kogutud verd testiti FACS meetodil, kasutades fluorestsentsiga märgistatud CD20-vastast antikeha. CD22-vastased MMAF ja DM1 ADC-d vähendavad jaava makaagi perifeersete B-rakkude hulka, nagu on näha joonisel 22A (MMAF rühm) ja joonisel 22B (DM1 rühm). Teiste lümfotsüütide populatsioonide puhul olulist MMAF või DM1 toimet ei tähel-

datud, nagu on näha joonistel 23A ja 23B, kus on näidatud, et CD4<sup>+</sup> rakkude hulk sama ajaperioodi kestel praktiliselt ei vähenenud.

**[0672]** Võrreldes kontrolliga vähendas Hu10F4v3-SMCC-DM1 idutee tsentri B-rakkude hulka jaava makaagi mandliproovides, nagu võib näha mikrofotodel joonistel 24A ja 24B. Iseloomulikud idutee tsentrid on tähistatud ringiga joonisel 24A. Täielik idutee tsentri B-rakkude eemaldamine on täheldatav annuse 10mg/kg tasemel, nagu võib näha joonisel 24B. Samasugused tulemused saadi pärast hu10F4v3-MC-MMAF ADC manustamist samades tingimustes.

**[0673]** Hu10F4v3-MC-MMAF annuses 10 mg/kg vähendas jaava makaakidel jagunevate B-rakkude kogust põrna folliikulite idutee tsentrites, vaadake diagrammi joonisel 25A ja koe mikrofotosid joonistel 25B ja 25C. Samasugused tulemused saadi pärast hu10F4v3-SMCC-DM1 ADC testimist samades tingimustes. Idutee tsentrid on joonisel 25C Ki-67 värvi toimel näha tumedate piirkondadena ja on nähtavad kui värvusetu alad, mis on ümbritsetud tumedate piirkondadega joonisel 25D, kus värvimiseks on kasutatud detekteeritavalt märgistatud IgD-vastast antikeha. Idutee tsentrite kadumine anti-10F4v3-MC-MMAF toimel toimunud idutee tsentri B-rakkude hulga vähenemise tagajärjel on näidatud joonistel 25C ja 25E. Seega toimivad need antimitootilised ravimid proliferereervate B-rakkude populatsioonidele.

**[0674]** Säilitamiseks kollektsioonis American Type Culture Collection, PO Box 1549, Manassas, VA, 20108, USA (ATCC) on deponeeritud järgmised hübriidoomid.

Rakuliinid	ATCC säiliku number	Üleandmise kuupäev
hübriidoom 10F4.4.1	PTA-7621	26. mai 2006
hübriidoom 5E8.1.8	PTA-7620	26. mai 2006

**[0675]** Need säilikud deponeeriti mikroorganismide patendiekspertiisiks deponeerimise rahvusvahelise tunnustamise Budapesti lepingu tingimuste kohaselt. Deponeerimine tagab eluvõimelise rakuliini säilitamise vähemalt 30 aasta kestel deponeerimise kuupäevast arvates. Need rakuliinid tehakse ATCC poolt kättesaadavaks vastavalt Budapesti lepingu ning Genentech, Inc. ja ATCC vahel sõlmitud lepingu tingimustele, mis tagavad nende rakuliinide püsiva ja piiramata avaliku kättesaadavuse pärast asjakohase US patendi väljastamist või pärast US või välisriigi patendinõudluse avalikustamist, ükskõik milline neist varem avalikustatakse, ning mis tagab nende rakuliinide kättesaadavuse neile, kes on USA Patendi ja Kaubamärgi Erivolniku poolt selleks volitatud vastavalt 35 USC §122 ja sellele vastavate

Eriroliniku poolt kehtestatud reeglite kohaselt (kaasa arvatud 37 CFR §1.14, eriti viitega lõigule 886 OG 638).

**[0676]** Käesoleva nõudluse volitatud esindaja nõustub sellega, et kui deponeeritud rakuliinid peaksid kaduma minema või hävima nende kultiveerimisel selleks sobivates tingimustes, siis asendatakse need kadumisest või hävimisest teatavaks saamisel kohe sama rakuliini näidisega. Deponeeritud rakuliinide kättesaadavust ei tule tõlgendada litsentsina leiutise praktiseerimiseks vastuolus õigustega, mis on tagatud mistahes valitsuse volitustega vastavalt selle riigi patendiseadustele.

**[0677]** Kuigi käesolevat leiutist on kirjeldatud teatud detailides, esituse selgema mõistmise huvides leiutist illustreerides ja näiteid tuues, ei tule neid kirjeldusi ja näiteid mingil määral tõlgitseda leiutise ulatust piiravatena.

#### JÄRJESTUSTE LOETELU

##### **[0678]**

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> ANTIKEHAD JA IMMUNOKONJUGAADID NING NENDE KASUTAMINE

<130> P2262R1

<140> PCT/US07/69889

<141> 2007-05-29

<150> US 60/911,829

<151> 2007-04-13

<150> US 60/908, 941

<151> 2007-03-29

<150> US 60/809, 328

<151> 2006-05-30

<160> 93

<210> 1

<211> 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 1

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; 2

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 2

Gly	Tyr	Glu	Phe	Ser	Arg	Ser	Trp	Met	Asn
				5					10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 3

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				5					10			
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				5					10			

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 4

Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Ser	Gly	Lys
1				5					10					15
Phe Lys Gly														

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 5

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; 6

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 6

Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
				5					10	

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud





&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 11

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 12

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser 5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 13

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; 14

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

<213> kunstlik järjestus

<220>

<223> järjestus on sünteesitud

<400> 14

Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr  
5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> kunstlik järjestus

<220>

<223> järjestus on sünteesitud

<400> 15

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
5 10

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> kunstlik järjestus

<220>

<223> järjestus on sünteesitud

<400> 16

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Glu	Phe	Ser
				20					25					30
Arg	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45

Arg	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr
				50					55					60
Ser	Gly	Lys	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	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp
				95					100					105
Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				110					115					120

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 17

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	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val
				20					25					30
His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
				35					40					45
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
				50					55					60
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
				65					70					75
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
				80					85					90
Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gln	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln
				95					100					105
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
				110										

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 18

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	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val
				20					25					30
His	Ser	Val	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
				35					40					45
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
				50					55					60
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
				65					70					75
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
				80					85					90
Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gln	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln
				95					100					105
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
				110										

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 19

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu
1				5					10					15
Glu														

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 20

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Gln	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu
1				5					10					15

Glu

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

**Glu**

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 22

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu
1				5					10					15

Glu

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 23

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ile	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu
1				5					10					15

Glu

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 24

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										

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 25

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

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 26

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

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 847

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*



&lt;400&gt; 27

```

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
  1                5                10                15
Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
                20                25                30
Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
                35                40                45
Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
                50                55                60
Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
                65                70                75
Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
                80                85                90
Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
                95                100                105
Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
                110                115                120
Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
                125                130                135
Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
                140                145                150
Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
                155                160                165
Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
                170                175                180
Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
                185                190                195
Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
                200                205                210
Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
                215                220                225
Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
                230                235                240
Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val
                245                250                255
Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser
                260                265                270
Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser
                275                280                285
Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr
                290                295                300
Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val
                305                310                315

```

Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala  
 320 325 330

Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu  
 335 340 345

Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu  
 350 355 360

Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly  
 365 370 375

Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His  
 380 385 390

Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly  
 395 400 405

Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys  
 410 415 420

Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly  
 425 430 435

Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser  
 440 445 450

Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro  
 455 460 465

Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr  
 470 475 480

Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser  
 485 490 495

Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val  
 500 505 510

Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val  
 515 520 525

Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln  
 530 535 540

Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln  
 545 550 555

Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser  
 560 565 570

Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp  
 575 580 585

Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met  
 590 595 600

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr  
 605 610 615

Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe  
 620 625 630  
 Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg  
 635 640 645  
 Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln  
 650 655 660  
 Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu  
 665 670 675  
 Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val  
 680 685 690  
 Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly  
 695 700 705  
 Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly  
 710 715 720  
 Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys  
 725 730 735  
 Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly  
 740 745 750  
 Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu  
 755 760 765  
 Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser  
 770 775 780  
 Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr  
 785 790 795  
 Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val  
 800 805 810  
 Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu  
 815 820 825  
 Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val  
 830 835 840  
 Asp Tyr Val Ile Leu Lys His  
 845

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 660

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 28

Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly  
 20 25 30  
 Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys

	35		40		45
Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys	50		55		60
Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly	65		70		75
Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu	80		85		90
Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu	95		100		105
Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe	110		115		120
Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu	125		130		135
Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro	140		145		150
Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala	155		160		165
Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg	170		175		180
Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile	185		190		195
Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn	200		205		210
Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro Lys Leu Glu Ile	215		220		225
Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg Glu Gly Asp Ser Val	230		235		240
Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr Thr	245		250		255
Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr	260		265		270
Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser Gly Lys	275		280		285
Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser Glu	290		295		300
Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val	305		310		315
Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe	320		325		330
Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp	335		340		345

Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val  
 350 355 360  
 His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys  
 365 370 375  
 Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala  
 380 385 390  
 Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile  
 395 400 405  
 Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser  
 410 415 420  
 Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp  
 425 430 435  
 Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys  
 440 445 450  
 Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Arg  
 455 460 465  
 Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val  
 470 475 480  
 Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu  
 485 490 495  
 Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe  
 500 505 510  
 Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn  
 515 520 525  
 Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile  
 530 535 540  
 Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser  
 545 550 555  
 Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr  
 560 565 570  
 Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val  
 575 580 585  
 Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn  
 590 595 600  
 Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser  
 605 610 615  
 Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val  
 620 625 630  
 Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly  
 635 640 645  
 Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro  
 650 655 660

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 647

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 29

```

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
 1          5          10          15
Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
 20          25          30
Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
 35          40          45
Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
 50          55          60
Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
 65          70          75
Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
 80          85          90
Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
 95          100         105
Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
 110         115         120
Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
 125         130         135
Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
 140         145         150
Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
 155         160         165
Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
 170         175         180
Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
 185         190         195
Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
 200         205         210
Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
 215         220         225
Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
 230         235         240
Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile
 245         250         255
Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser

```

	260		265		270
Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp					
	275		280		285
Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp					
	290		295		300
Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser					
	305		310		315
Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp					
	320		325		330
Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly					
	335		340		345
Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys					
	350		355		360
Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys					
	365		370		375
Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly					
	380		385		390
Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser					
	395		400		405
Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg					
	410		415		420
Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala					
	425		430		435
Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr					
	440		445		450
Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln					
	455		460		465
Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr					
	470		475		480
Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu					
	485		490		495
Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg					
	500		505		510
Val Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala					
	515		520		525
Ile Cys Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser					
	530		535		540
Gln Gln Gly Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val					
	545		550		555
Arg Asn Lys Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His					
	560		565		570

Ser Leu Gly Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr  
 575 580 585  
 Thr Thr Leu Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp  
 590 595 600  
 Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp  
 605 610 615  
 Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Thr Met  
 620 625 630  
 Arg Thr Ser Phe Gln Ile Phe Gln Lys Met Arg Gly Phe Ile Thr  
 635 640 645  
 Gln Ser

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 483

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 30

Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly  
 20 25 30  
 Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys  
 35 40 45  
 Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys  
 50 55 60  
 Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly  
 65 70 75  
 Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu  
 80 85 90  
 Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu  
 95 100 105  
 Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe  
 110 115 120  
 Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu  
 125 130 135  
 Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro  
 140 145 150  
 Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala  
 155 160 165  
 Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg  
 170 175 180



Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile  
 185 190 195  
 Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn  
 200 205 210  
 Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Pro Pro Lys Lys Val Thr  
 215 220 225  
 Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val  
 230 235 240  
 Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg  
 245 250 255  
 Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly  
 260 265 270  
 Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala  
 275 280 285  
 Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala  
 290 295 300  
 Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile  
 305 310 315  
 Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln  
 320 325 330  
 Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp  
 335 340 345  
 Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe  
 350 355 360  
 Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val  
 365 370 375  
 Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu  
 380 385 390  
 Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly  
 395 400 405  
 Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser  
 410 415 420  
 Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn  
 425 430 435  
 Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro  
 440 445 450  
 Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn  
 455 460 465  
 Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr  
 470 475 480  
 Tyr Ser Pro

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 846

&lt;212&gt; PRT

<213> *Pan troglodytes*

&lt;400&gt; 31

Met	His	Leu	Leu	Gly	Pro	Trp	Leu	Leu	Leu	Leu	Glu	Tyr	Leu	Ala	1	5	10	15
Phe	Ser	Asp	Ser	Ser	Lys	Trp	Asn	Ile	Glu	His	Pro	Gly	Thr	Ile	20	25	30	
Tyr	Ala	Trp	Glu	Gly	Ala	Cys	Ile	Trp	Val	Pro	Cys	Thr	Tyr	Arg	35	40	45	
Val	Leu	Asp	Gly	Ala	Leu	Glu	Thr	Phe	Ile	Leu	Phe	His	Asn	Pro	50	55	60	
Glu	Tyr	Asn	Gln	Asn	Met	Ser	Lys	Phe	Glu	Gly	Thr	Arg	Leu	Tyr	65	70	75	
Glu	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Gly	Gln	Lys	Arg	Val	80	85	90	
Gln	Phe	Leu	Gly	Asn	Lys	Ile	Asn	Asn	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser	Ile	95	100	105	
His	Pro	Val	His	Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Arg	Met	110	115	120	
Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Lys	Trp	Met	Glu	Arg	Ile	His	Leu	Asn	Val	125	130	135	
Ser	Glu	Arg	Pro	Phe	Pro	Pro	Arg	Ile	Gln	Leu	Pro	Pro	Lys	Leu	140	145	150	
Gln	Glu	Ser	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asn	Phe	Ser	155	160	165	
Cys	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Ile	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Leu	Glu	Gly	Ala	170	175	180	
Pro	Met	Arg	Gln	Ala	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Ser	Leu	Ser	Thr	Lys	185	190	195	
Ser	Val	Phe	Thr	Arg	Ser	Glu	Leu	Lys	Phe	Ser	Pro	Gln	Trp	Ser	200	205	210	
His	His	Gly	Lys	Ile	Val	Thr	Cys	Glu	Leu	His	Asp	Val	Asp	Gly	215	220	225	
Lys	Val	Leu	Ser	Glu	Asp	Thr	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Lys	His	Thr	230	235	240	
Pro	Lys	Leu	Thr	Ile	Glu	Val	Thr	Pro	Asn	Glu	Thr	Ile	Val	Arg	245	250	255	
Lys	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Lys	Val	Asn	Ser	Ser	Asn	260	265	270	

Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Asp Ile Pro Leu  
 275 280 285

Lys Glu Gln Asn Thr Leu Met Leu Thr Leu His Glu Val Thr Lys  
 290 295 300

Ser Gln Thr Gly Thr Tyr Cys Cys Arg Val Ser Asn Asp Val Gly  
 305 310 315

Pro Ala Thr Ser Glu Lys Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro  
 320 325 330

Glu Pro Ser Arg Val Gln Ile Ser Gln Ser Pro Ala Val Glu Gly  
 335 340 345

Ser Glu Val Asn Phe Leu Cys Ile Ser Pro Ala Asn Pro Leu Pro  
 350 355 360

Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Val Gln Gly Arg  
 365 370 375

Thr Glu Lys Gln Phe Gln Ile Gln Lys Ile Leu Pro Trp His Ala  
 380 385 390

Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Ile Gly Glu  
 395 400 405

Arg Gly Pro Gly Thr Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys  
 410 415 420

Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr Pro Ile Arg Glu Gly Asp  
 425 430 435

Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ile Val  
 440 445 450

Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser  
 455 460 465

Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile Gly Trp Asn Asn Thr Ala  
 470 475 480

Val Ala Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro  
 485 490 495

Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Ala Pro Arg Gly Val Arg Val Arg  
 500 505 510

Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Leu Val Ser  
 515 520 525

Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe  
 530 535 540

Phe Trp Glu Lys Asn Gly Ser Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu  
 545 550 555

Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys  
 560 565 570

Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr  
 575 580 585  
 Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser  
 590 595 600  
 Gln Gly Asn Gln Val Met Glu Gly Lys Thr Ala Ile Leu Thr Cys  
 605 610 615  
 Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Tyr Ser Tyr Ala Trp Phe Asp  
 620 625 630  
 Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Arg Met Leu Arg Leu  
 635 640 645  
 Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly  
 650 655 660  
 Thr Asn Arg Val Gly Lys Gly His Ser Pro Leu Ile Thr Leu Thr  
 665 670 675  
 Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val Gly  
 680 685 690  
 Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Met Cys Gly Phe  
 695 700 705  
 Lys Val Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly Leu  
 710 715 720  
 Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys  
 725 730 735  
 Val Arg Arg Thr Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys  
 740 745 750  
 Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Ala Thr Leu Arg  
 755 760 765  
 Phe Pro Glu Thr Asn Thr Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Thr Ser  
 770 775 780  
 Glu Leu Gln Arg Leu Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr  
 785 790 795  
 Ser Val Leu Gln Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile  
 800 805 810  
 Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile  
 815 820 825  
 Gln Phe Gly Phe Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp  
 830 835 840  
 Tyr Val Ile Val Lys His  
 845

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

<223> järjestus on sünteesitud

<400> 32

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ile	Gly	Ala	Thr	Phe	Leu
1				5					10					15
Glu														

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> kunstlik järjestus

<220>

<223> järjestus on sünteesitud

<400> 33

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Phe	Leu
1				5					10					15
Glu														

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> kunstlik järjestus

<220>

<223> järjestus on sünteesitud



&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 847

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 36

Met	His	Leu	Leu	Gly	Pro	Trp	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Glu	Tyr
1				5					10					15
Leu	Ala	Phe	Ser	Asp	Ser	Ser	Lys	Trp	Val	Phe	Glu	His	Pro	Glu
				20					25					30
Thr	Leu	Tyr	Ala	Trp	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Trp	Ile	Pro	Cys	Thr
				35					40					45
Tyr	Arg	Ala	Leu	Asp	Gly	Asp	Leu	Glu	Ser	Phe	Ile	Leu	Phe	His
				50					55					60
Asn	Pro	Glu	Tyr	Asn	Lys	Asn	Thr	Ser	Lys	Phe	Asp	Gly	Thr	Arg
				65					70					75
Leu	Tyr	Glu	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Glu	Gln	Lys
				80					85					90
Arg	Val	Gln	Phe	Leu	Gly	Asp	Lys	Asn	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser
				95					100					105
Ile	His	Pro	Val	His	Leu	Asn	Asp	Ser	Gly	Gln	Leu	Gly	Leu	Arg
				110					115					120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn  
 125 130 135  
 Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu  
 140 145 150  
 Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe  
 155 160 165  
 Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly  
 170 175 180  
 Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile  
 185 190 195  
 Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp  
 200 205 210  
 Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp  
 215 220 225  
 Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His  
 230 235 240  
 Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val  
 245 250 255  
 Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser  
 260 265 270  
 Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser  
 275 280 285  
 Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr  
 290 295 300  
 Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val  
 305 310 315  
 Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala  
 320 325 330  
 Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu  
 335 340 345  
 Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu  
 350 355 360  
 Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly  
 365 370 375  
 Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His  
 380 385 390  
 Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly  
 395 400 405  
 Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys  
 410 415 420  
 Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly



	425		430		435
Asp Thr Val Thr	Leu Ser Cys Asn Tyr	Asn Ser Ser Asn Pro Ser			
	440		445		450
Val Thr Arg Tyr	Glu Trp Lys Pro His	Gly Ala Trp Glu Glu Pro			
	455		460		465
Ser Leu Gly Val	Leu Lys Ile Gln Asn	Val Gly Trp Asp Asn Thr			
	470		475		480
Thr Ile Ala Cys	Ala Arg Cys Asn Ser	Trp Cys Ser Trp Ala Ser			
	485		490		495
Pro Val Ala Leu	Asn Val Gln Tyr Ala	Pro Arg Asp Val Arg Val			
	500		505		510
Arg Lys Ile Lys	Pro Leu Ser Glu Ile	His Ser Gly Asn Ser Val			
	515		520		525
Ser Leu Gln Cys	Asp Phe Ser Ser Ser	His Pro Lys Glu Val Gln			
	530		535		540
Phe Phe Trp Glu	Lys Asn Gly Arg Leu	Leu Gly Lys Glu Ser Gln			
	545		550		555
Leu Asn Phe Asp	Ser Ile Ser Pro Glu	Asp Ala Gly Ser Tyr Ser			
	560		565		570
Cys Trp Val Asn	Asn Ser Ile Gly Gln	Thr Ala Ser Lys Ala Trp			
	575		580		585
Thr Leu Glu Val	Leu Tyr Ala Pro Arg	Arg Leu Arg Val Ser Met			
	590		595		600
Ser Pro Gly Asp	Gln Val Met Glu Gly	Lys Ser Ala Thr Leu Thr			
	605		610		615
Cys Glu Ser Asp	Ala Asn Pro Pro Val	Ser His Tyr Thr Trp Phe			
	620		625		630
Asp Trp Asn Asn	Gln Ser Leu Pro His	His Ser Gln Lys Leu Arg			
	635		640		645
Leu Glu Pro Val	Lys Val Gln His Ser	Gly Ala Tyr Trp Cys Gln			
	650		655		660
Gly Thr Asn Ser	Val Gly Lys Gly Arg	Ser Pro Leu Ser Thr Leu			
	665		670		675
Thr Val Tyr Tyr	Ser Pro Glu Thr Ile	Gly Arg Arg Val Ala Val			
	680		685		690
Gly Leu Gly Ser	Cys Leu Ala Ile Leu	Ile Leu Ala Ile Cys Gly			
	695		700		705
Leu Lys Leu Gln	Arg Arg Trp Lys Arg	Thr Gln Ser Gln Gln Gly			
	710		715		720
Leu Gln Glu Asn	Ser Ser Gly Gln Ser	Phe Phe Val Arg Asn Lys			
	725		730		735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly  
 740 745 750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu  
 755 760 765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser  
 770 775 780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr  
 785 790 795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val  
 800 805 810

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu  
 815 820 825

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val  
 830 835 840

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His  
 845

<210> 37

<211> 42

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn  
 20 25 30

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
 35 40

<210> 38

<211> 218

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 38

Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
1				5					10					15
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
				20					25					30
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys
				35					40					45
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
				50					55					60
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
				65					70					75
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
				80					85					90
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				95					100					105
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				110					115					120
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
				125					130					135
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
				140					145					150
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
				155					160					165
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				170					175					180
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				185					190					195
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
				200					205					210
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
				215										

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 39

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 1 5 10 15  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 20 25 30  
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 35 40 45  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 50 55 60  
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val  
 65 70 75  
 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 80 85 90  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 95 100 105  
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 110 115 120  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 125 130 135  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 140 145 150  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 155 160 165  
 Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 170 175 180  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 185 190 195  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 200 205 210  
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 215

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 40

Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
1				5					10					15
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
				20					25					30
Thr	Cys	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe
				35					40					45
Lys	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
				50					55					60
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val
				65					70					75
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
				80					85					90
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				95					100					105
Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				110					115					120
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
				125					130					135
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
				140					145					150
Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro
				155					160					165
Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
				170					175					180
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	Phe	Ser	Cys
				185					190					195
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser
				200					205					210
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
				215										

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 218

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*





&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 46

Asp	Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Trp	Gly	Cys	Leu	Trp
				5					10	

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 47

Trp	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
				5					10				

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 48

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
1				5					10					15
Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30
Ala	Arg													

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 49



280

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  
 20

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 50

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  
 20 25

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 51

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 5 10

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 52

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met  
 1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

Ala

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 53

Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
1				5					10					15
Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 54

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

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 55

Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
				5					10				

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 56

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
1				5					10					15
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30
Ala	Arg													

&lt;210&gt; 57

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 57

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					
				20					25					

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> .58

Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				5					10			

<210> 59

<211> 31

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
1				5					10					15
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30
Ala														

<210> 60

<211> 30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
1				5					10					15
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 61

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

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 62

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser
				5					10				

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 63

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
1				5					10					15
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30
Ala	Arg													

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 64

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; 65

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 65

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
				5					10			

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 66

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
1				5					10					15
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

Ala

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 67

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
1				5					10					15
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				20					25					30

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 68

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

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 69

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														

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 70

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														

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*







&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 79

Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 80

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr
				20					25					30
Tyr	Cys													

&lt;210&gt; 81

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 81

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							
				20										

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 82

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 83

Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
1				5					10					15
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr
				20					25					30
Tyr	Cys													

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 84

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							
				20										

&lt;210&gt; 85

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 85

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 86

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Cys

&lt;210&gt; 87

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 87

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 Ser Ser Gln Ser Ile Val  
 20 25 30  
 His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 35 40 45  
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 65 70 75  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr  
 80 85 90  
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln  
 95 100 105  
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val  
 110 115 120  
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala  
 125 130 135  
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys  
 140 145 150  
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 155 160 165  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
 170 175 180  
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys  
 185 190 195  
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 200 205 210  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 88

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	Glu	Phe	Ser	20	25	30	
Arg	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	50	55	60	
Ser	Gly	Lys	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	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp	95	100	105	
Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	110	115	120	
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	125	130	135	
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	140	145	150	
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	155	160	165	
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	170	175	180	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	185	190	195	
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	200	205	210	
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	215	220	225	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	230	235	240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	245	250	255	

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 320 325 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 335 340 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 440 445 450

<210> 89

<211> 120

<212> PRT

<213> kunstlik järjestus

<220>

<223> järjestus on sünteesitud

<400> 89

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly  
 1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser  
 20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Arg  
 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr  
 50 55 60

Ser	Gly	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
				65					70					75
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Val	Asp
				80					85					90
Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp
				95					100					105
Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				110					115					120

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 90

Asp	Ile	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu
1				5					10					15
Gly	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val
				20					25					30
His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro
				35					40					45
Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
				50					55					60
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
				65					70					75
Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val
				80					85					90
Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gln	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly
				95					100					105
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
				110										

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 91

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	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	20	25	30	
His	Ser	Val	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	35	40	45	
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	50	55	60	
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	65	70	75	
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	80	85	90	
Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gln	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	95	100	105	
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	110	115	120	
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	125	130	135	
Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	140	145	150	
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	155	160	165	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	170	175	180	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	185	190	195	
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Cys	200	205	210	
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	215									

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 92

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	Glu	Phe	Ser
				20					25					30
Arg	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr
				50					55					60
Ser	Gly	Lys	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 Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp  
 95 100 105  
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 120  
 Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser  
 125 130 135  
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 140 145 150  
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala  
 155 160 165  
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 170 175 180  
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 185 190 195  
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 200 205 210  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 215 220 225  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 290 295 300  
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 305 310 315  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 320 325 330  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 335 340 345  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 350 355 360  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 365 370 375

Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
				380					385					390
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
				395					400					405
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				410					415					420
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
				425					430					435
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
				440					445					450

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; kunstlik järjestus

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; järjestus on sünteesitud

&lt;400&gt; 93

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	Glu	Phe	Ser
				20					25					30
Arg	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr
				50					55					60
Ser	Gly	Lys	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	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp
				95					100					105
Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				110					115					120
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
				125					130					135
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
				140					145					150
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala
				155					160					165
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				170					175					180
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser

	185		190		195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	200		205		210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys	215		220		225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	230		235		240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	245		250		255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260		265		270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275		280		285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	290		295		300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	305		310		315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	320		325		330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	335		340		345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu	350		355		360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	365		370		375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	380		385		390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly	395		400		405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	410		415		420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	425		430		435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	440		445		450

**PATENDINÕUDLUS**

1. Immunokonjugaat, mis sisaldab antikeha või selle antigeeni siduvat fragmenti, mis on kovalentselt seotud tsütotoksilise agensiga, kusjuures antikeha või selle antigeeni siduv fragment on monokloonne antikeha või selle antigeeni siduv fragment, mis seondub CD22-ga ja sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni aminohapete järjestusega SEQ ID NO: 16 ja kerge ahela varieeruvat domeeni aminohapete järjestusega SEQ ID NO: 18 ning kusjuures antikeha või selle antigeeni siduv fragment sisaldab lisaks tsüsteiini kerge ahela asendis 205, mille nummerdus vastab Kabat' nummerdussüsteemile, või raske ahela asendis 118, mille nummerdus vastab EU nummerdussüsteemile.

2. Immunokonjugaat vastavalt nõudluspunktile 1, kusjuures antikeha:

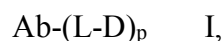
- (i) sisaldab rasket ahelat, millel on vähemalt 90% järjestuse identsus aminohapete järjestusega SEQ ID NO: 88,
- (ii) sisaldab kerget ahelat, millel on vähemalt 90% järjestuse identsus aminohapete järjestusega SEQ ID NO: 87,
- (iii) sisaldab täispikka rasket ahelat aminohapete järjestusega SEQ ID NO: 88 ja täispikka kerget ahelat aminohapete järjestusega SEQ ID NO: 87, või
- (iv) on täispikk antikeha, milles raske ahel on aminohapete järjestusega SEQ ID NO: 88 ja kerge ahel on aminohapete järjestusega SEQ ID NO: 87.

3. Immunokonjugaat vastavalt nõudluspunktile 1 või 2, kusjuures antikeha sisaldab:

- (i) rasket ahelat, mille järjestus on valitud mis tahes järjestustest SEQ ID NO: 88 või 92,
- (ii) kerget ahelat, mille järjestus on valitud järjestustest SEQ ID NO: 87 või 91,
- (iii) kerget ahelat järjestusega SEQ ID NO: 87 ja rasket ahelat järjestusega SEQ ID NO: 92, või
- (iv) kerget ahelat järjestusega SEQ ID NO: 91 ja rasket ahelat järjestusega SEQ ID NO: 88.

4. Immunokonjugaat vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 3, kusjuures CD22 on imetaja CD22.

5. Immunokonjugaat vastavalt nõudluspunktile 4, kusjuures CD22 on inimese CD22.
6. Immunokonjugaat vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 3, kusjuures antikeha seondub epitoobiga CD22 järjestuse SEQ ID NO: 27 aminohapete 22-240 piirkonnas.
7. Immunokonjugaat vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 6, kusjuures antigeeni siduv antikeha fragment on valitud Fab, Fab'-SH, Fv, scFv või (Fab')<sub>2</sub> fragmentide seast.
8. Immunokonjugaat vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 7, kusjuures tsütotoksiline agens on valitud toksiini, kemoterapeutilise agensi, ravimiüksuse, antibiootikumi, radioaktiivse isotoobi ja nukleolüütilise ensüümi seast.
9. Immunokonjugaat vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 8, kusjuures immunokonjugaat on valemiga Ab-(L-D)<sub>p</sub>, kus
- (a) Ab on mis tahes nõudluspunktis 1 kuni 7 defineeritud antikeha,
  - (b) L on ühte või enam linkerkomponenti sisaldav linker,
  - (c) D on ravimiüksus.
10. Immunokonjugaat vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 9, kusjuures antikeha on kovalentselt seotud auristatiin- või maitansinoid-ravimiüksusega, moodustades nii antikeharavimi konjugaadi.
11. Immunokonjugaat vastavalt nõudluspunktile 10, mis sisaldab antikeha (Ab) ja auristatiin- või maitansinoid-ravimiüksust (D), kusjuures tsüsteiini abil konstrueeritav antikeha on ühe või enama vaba tsüsteinaminohappe kaudu seotud linkerüksuse (L) abil D-ga, ühend on seejuures valemiga I



milles p on 1, 2, 3 või 4.

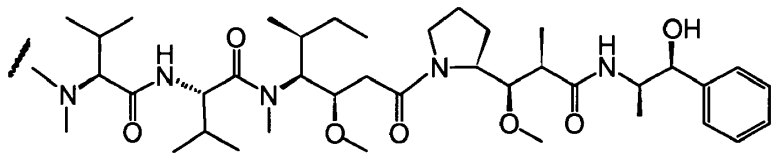
11. Immunokonjugaat vastavalt nõudluspunktile 11, kusjuures

(i) p on 2,

(ii) L on SMCC, SPP, BMPEO, MC-val-cit-PAB või MC, või

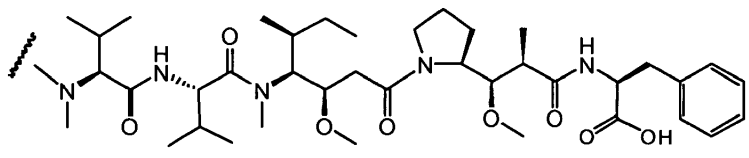
(iii) D on

(a) MMAE struktuuriga



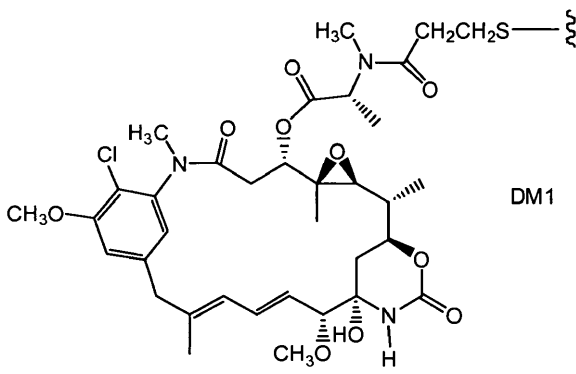
milles laineline joon näitab seondumiskohta linkeriga L,

(b) MMAF struktuuriga



milles laineline joon näitab seondumiskohta linkeriga L, või

(c) DM1 struktuuriga



milles laineline joon näitab seondumiskohta linkeriga L.

13. Immunokonjugaat vastavalt nõudluspunktile 11, kusjuures L on valemiga



milles

A on pikendusüksus, mis on kovalentselt seotud tsüsteiini abil konstrueeritud antikeha

(Ab) tsüsteiini tiolrühmaga,

a on 0 või 1,

iga W on sõltumatult aminohappeüksus,

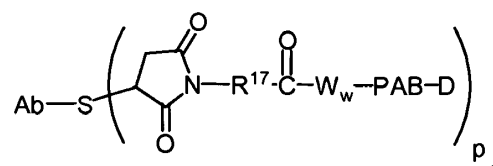
w on arv vahemikust 0 kuni 12,

Y on vahelüliüksus, mis on kovalentselt seotud ravimiüksusega, ja

y on 0, 1 või 2.

#### 14. Immunokonjugaat vastavalt nõudluspunktile 13

(i) valemiga

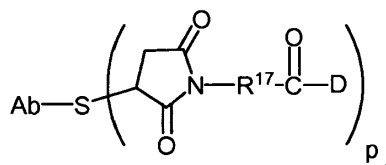


milles PAB on para-aminobensüülkarbamoiülrühm ja R17 on kahevalentne rühm, mis on valitud järgmistest:  $-(\text{CH}_2)_r$ -, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsüklüül-,  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_r$ -, arüleen-,  $-(\text{CH}_2)_r$ -arüleen-,  $-\text{arüleen}-(\text{CH}_2)_r$ -,  $-(\text{CH}_2)_r$ -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsüklüül)-, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-karbotsüklüül)- $(\text{CH}_2)_r$ -, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsüklüül-,  $-(\text{CH}_2)_r$ -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-heterotsüklüül)-,  $-(\text{C}_3\text{-C}_8\text{-heterotsüklüül})-(\text{CH}_2)_r$ -,  $-(\text{CH}_2)_r\text{-C(O)NRb}(\text{CH}_2)_r$ -,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2$ -,  $-(\text{CH}_2)_r\text{-C(O)NRb}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -,  $-(\text{CH}_2)_r\text{-C(O)NRb}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2$ -,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-C(O)NRb}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-C(O)NRb}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2$ - ja  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-C(O)NRb}(\text{CH}_2)_r$ -, milles Rb on H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alküül-, fenüül- või bensüülrühm ja r on sõltumatult arv vahemikust 1 kuni 10,

(ii) milles Ww on valiin-tsitrulliin,

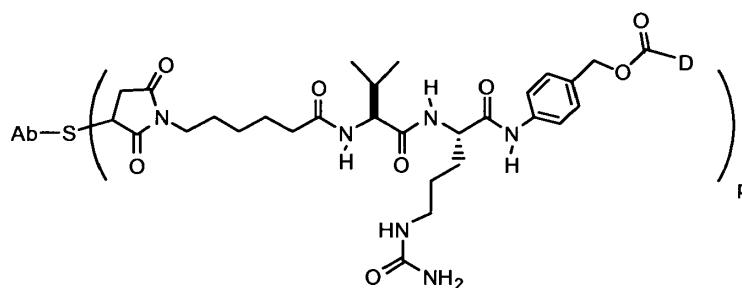
(iii) milles R17 on  $-(\text{CH}_2)_5$ - või  $-(\text{CH}_2)_2$ -,

(iv) valemiga



või

(v) valemiga



15. Immunokonjugaat vastavalt nõudluspunktile 11, kusjuures

(i) L on MC-vc-PAB ja D on MMAE või MMAF, või

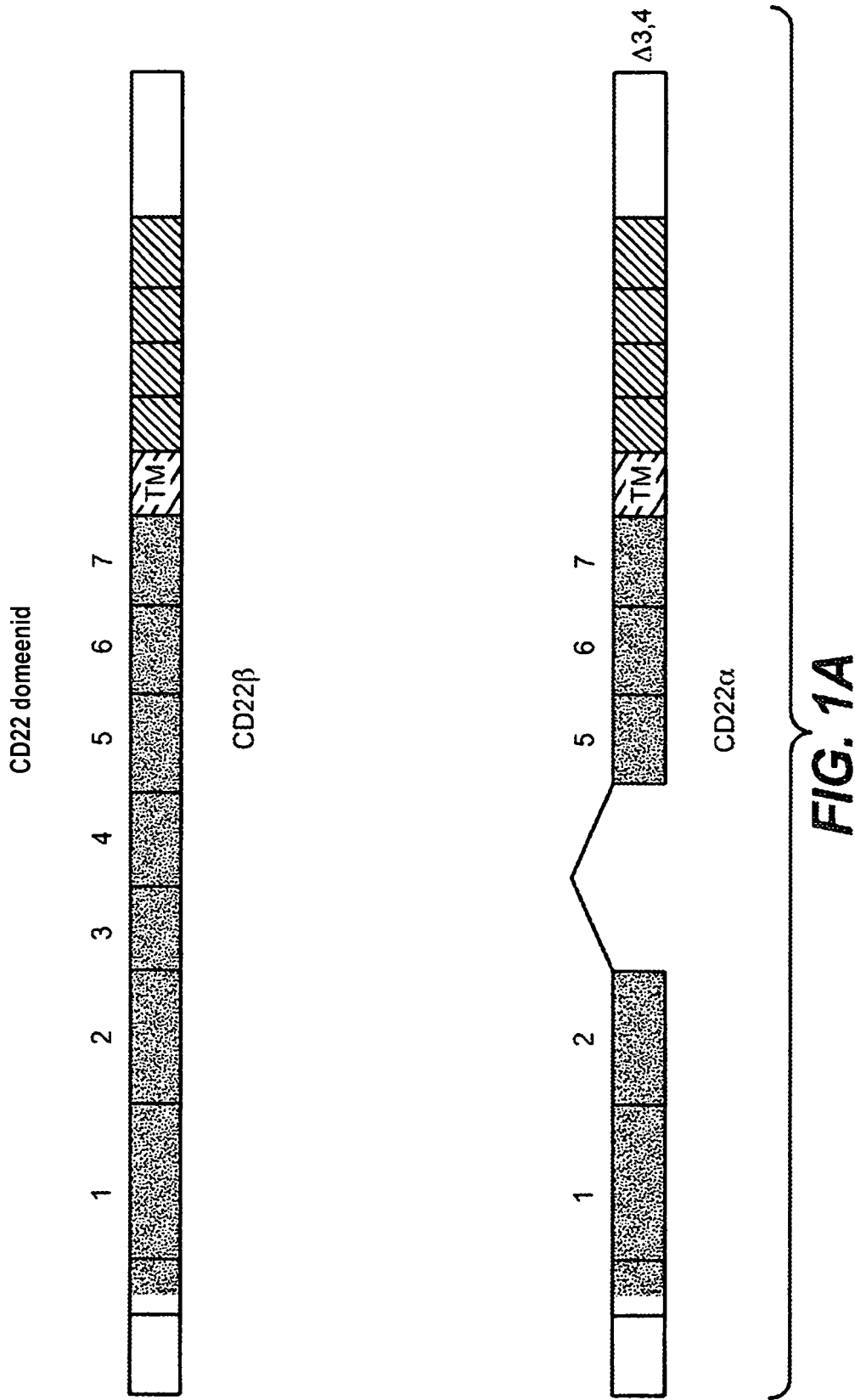
(ii) Ab sisaldab kergelt ahelat järjestusega SEQ ID NO: 87 ja rasket ahelat järjestusega SEQ ID NO: 92, nagu on defineeritud nõudluspunktis 3 (ii), või kergelt ahelat järjestusega SEQ ID NO: 91 ning rasket ahelat järjestusega SEQ ID NO: 88, nagu on defineeritud nõudluspunktis 3 (iv), ja L on MC-vc-PAB ning D on MMAE.

16. Farmatseutiline kompositsioon, mis sisaldab mis tahes nõudluspunktile 1 kuni 15 vastavat immunokonjugaati ja farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat.

17. Farmatseutiline kompositsioon vastavalt nõudluspunktile 16 kasutamiseks B-raku proliferatiivse häire ravimise meetodis.

18. Farmatseutiline kompositsioon vastavalt nõudluspunktile 16 kasutamiseks vastavalt nõudluspunktile 17, kusjuures B-rakuline proliferatiivne häire on valitud lümfoomi, mitte-Hodgkin'i lümfoomi (NHL), agressiivse NHL-i, retsidiiveerunud agressiivse NHL-i, retsidiiveerunud indolentse NHL-i, refraktoorse NHL-i, refraktoorse indolentse NHL-i, kroonilise lümfotsüüt leukeemia (CLL), väikerakulise lümfotsütaarse lümfoomi, leukeemia, karvrakulise leukeemia (HCL), akuutse lümfotsüüt leukeemia (ALL) ja mantelrakulise lümfoomi seast.





2/31

1 mhl1gpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh  
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr  
 121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlc cllnfscygy piqlqwlleg  
 181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh  
 241 tpkleikvtp sdalvregds vtmtcevsss npeyttvswl kdqtsikkqn tftlnirevt  
 301 kdqsgkyccq vsndvqpggrs eevflqvqya pepstvqilh spavegsqve flcmslanpl  
 361 ptnytwyhng kemqgrteek vhipkiipwh agtyscvaen ilgtqgrgpg aeldvqyppk  
 421 kvttvignpm piregdtvtl scnynsnps vtryewkphg aweepsigvl kicnvqwdnt  
 481 tiacarcnsw cswaspvaln vqyaprdvrv rkikplseih sgnsvsigcd fssshpkevg  
 541 ffwekngrll gkesqlnfdi ispedagsys cwvnsigqt askawtlevl yaprrlrsvm  
 601 spgdqvmegk satltcesda nppvshytwf dwncqslphh sqkrllepvk vqhsqaywcc  
 661 gtnsvgkgrs plstltvyys petigrrvav glgscilali laicqiklqr rwrkrtqsgg  
 721 lqenssgqsf fvrnkvrta plsegphslg cynpmmedgi syttlrpem niprtgdaes  
 781 semqrprtc ddtvtysalh krqvgyenv ipdfpedegi hyseliqfgv gerpqaqenv  
 841 dyvilkh (SEQ ID NO: 27)

**FIG. 1B**

1 mhl1gpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh  
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr  
 121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlc cllnfscygy piqlqwlleg  
 181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh  
 241 ppkkvttviq nmpiregdt vtlsnynss npsvtryewk phgaweeps lgvkicnvqg  
 301 dnttiacaac nswcswaspv alnvqyaprd vvrkikpls eihsgnsvsl qcdfssshpk  
 361 evqffwekngr rllgkesqln fdispedag syscwvnsi gqtaskawtl evlyaprrlr  
 421 vsmppgdqvm egksatlce sdanppvshy twfdwnqsl pyhsqkrlrle pvkvqhsqay  
 481 wccgtnsvgk grsplstltv yspetigrr vavglgscila ililaicqik lqrrwrkrtq  
 541 qqglqenssg qsfvrnkvr rraplsegph slgcynpmme dgisyttlrp pemniprtgd  
 601 aessemqrpp pdcddvtys alhkrqvgtm rtsfqifqkm rgitqs (SEQ ID NO:29)

**FIG. 1C**

MHL1GPWLL1LLEYLAFSDS SKWNIEHPGTIYAWEGACIWPCTYRVLDGA  
 LETFILFHNPEYNQNMSKFEQTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGNKINNNC  
 TLSIHPVHVNDSGQLGLRMVSKTEKWMERIHLNVSERPPPPRIQLPEKLOE  
 SQEVTTLTCLLNFSYGYQIQQLQWLLEGAPMRQAAVTLTSLSTKSVFTRSEL  
 KFSPQWSSHGKIVTCELHDVDGKVLSEDTVQLNVKHTPKLTIEVTPNETIV  
 RKGDSVTMTCKVNSNPEYTTVSWLKDDIPLKEQNTLMLTLHEVTKSQTGT  
 YCCRVSNVGPATSEKVFLQVQYAPEPSRVQISQSPAVEGSEVNFLEISPA  
 NPLPTNYTWYHNGKEVQGRTEKQFQIQKILPWHAGTYSVAENILGIGERG  
 PGTELDVQYPPKKVTMVIENPTPIREGDTVTLSCNYSSNPIVNHYEWRPR  
 GAWEEPSLGVKIQNIGWNTAVACAACNNWCASPVTLNVLYAPRGVRV  
 RKIKPLSEIHSGNLVSLQDFSSSHPKEVOFFWEKNGSLLGKESQLNFDI  
 SPEDAGSYSCWVNSIGQTASKAWTLEVLVYAPRRLRVSMQGNQVMGKTA  
 ILTCESDANPPVYSYAWFDWNNQSLPYSGRMLRLEPVKVQHSQAYWCCGTN  
 RVGKHSPLITLTVYYSPEITIGRRVAVGLGSCILALILAMCGFKVQRRWKR  
 TQSQQGLQENSSGQSFVRNKVRRTPPLSEGPHSLGCYNPMMEDGISYATL  
 RFPETNTPRTGDAETSELQRLPPDCDDVTYSVLQKRQVGDYENVI PDFPE  
 DEGIHYSELIQFGGERPQAQENVVIVKH (SEQ ID NO:31)

**FIG. 1D**

Raske ahela varieeruva domeeni järjestuste  
joondamine CH22-vastase antikeha 10F4 variantidega

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	36	37	38	39	40		

Kabat - CDR H1  
Chothia - CDR H1  
kontakt - CDR H1

humIII	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	
kimäärne 10F4	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Q</span>	V	Q	L	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Q</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Q</span>	S	G	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">P</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">E</span>	L	V	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">P</span>	G	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">V</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">I</span>	S	C	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	A	S	G	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Y</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">E</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">W</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">M</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">W</span>	V	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Q</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R</span>
h10F4.v1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Y</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">E</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">W</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">M</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">W</span>	V	R	Q	A	
h10F4.v2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Y</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">E</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">W</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">M</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">W</span>	V	R	Q	A	

Kabat - CDR H2  
Chothia - CDR H2  
kontakt - CDR H2

humIII	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	
kimäärne 10F4	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Y</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">G</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Q</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">E</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">W</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">I</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">G</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">I</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Y</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">P</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">G</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">D</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">G</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">D</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">T</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">N</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Y</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">G</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">T</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">L</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">T</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">D</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">K</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">T</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A</span>			
h10F4.v1	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	Y	P	G	D	G	D	T	N	Y	S	G	K	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A
h10F4.v2	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	Y	P	G	D	G	D	T	N	Y	S	G	K	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A

Kabat - CDR H3  
Chothia - CDR H3  
kontakt - CDR H3

humIII	Y	L	Q	N	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO:24						
kimäärne 10F4	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Y</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">M</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Q</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">L</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">L</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">T</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">V</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">D</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">V</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Y</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">F</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">C</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">A</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">R</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">G</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">D</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Y</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">W</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">G</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Q</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">G</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">T</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">L</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">V</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">T</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">V</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">S</span>	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SEQ ID NO:34</span>								
h10F4.v1	Y	L	Q	N	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	S	S	W	D	W	Y	F	D	V	V	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:16
h10F4.v2	Y	L	Q	N	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	S	S	W	D	W	Y	F	D	V	V	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	SEQ ID NO:16

Kerge ahela varieeruva domeeni järjestuste  
joondamine CH22-vastase antikeha 10F4 variantidega

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37															
																																	Kabat - CDR L1						Chothia - CDR L1						Contact - CDR L1											
humKI	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	P	L	E	W	Y	Q														
kimäärne 10F4	D	I	L	H	T	Q	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	P	L	E	W	Y	Q																
h10F4.v1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	P	L	E	W	Y	Q																
h10F4.v2	D	I	Q	N	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	P	L	E	W	Y	Q																
38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80														
																																	Kabat - CDR L2						Chothia - CDR L2						kontakt - CDR L2											
humKI	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	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P															
kimäärne 10F4	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	S	R	V	E	A														
h10F4.v1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P															
h10F4.v2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P															
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107																														
																																	Kabat - CDR L3						Chothia - CDR L3						kontakt - CDR L3											
humKI	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	SEQ ID NO:25																												
kimäärne 10F4	E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	Q	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO:35																												
h10F4.v1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	F	Q	G	S	Q	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO:17																												
h10F4.v2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	F	Q	G	S	Q	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO:18																												

FIG. 2B

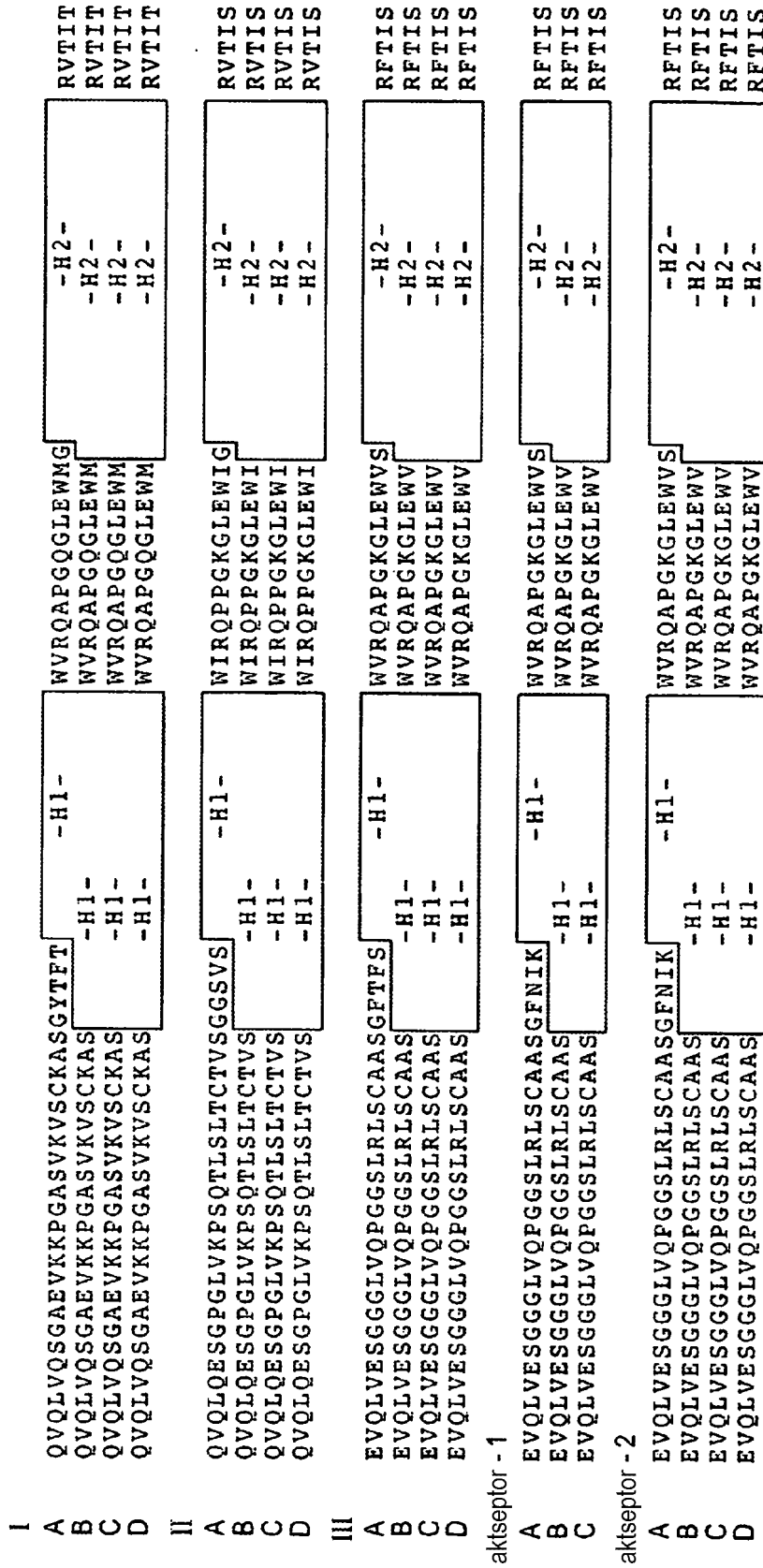


FIG. 3A

I	A	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 26, 47, 48, 7	
	B	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 50, 51, 48, 7	
	C	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCA	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 50, 51, 52, 7	
	D	ADTSTSTAYMELSSLRSED	TAVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 50, 51, 53, 7	
II	A	VDTSKNQFSLKLSVTA	AADVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 54, 55, 56, 7	
	B	VDTSKNQFSLKLSVTA	AADVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 57, 58, 56, 7	
	C	VDTSKNQFSLKLSVTA	AADVYYCA	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 57, 58, 59, 7	
	D	VDTSKNQFSLKLSVTA	AADVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 57, 58, 60, 7	
III	A	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 61, 62, 63, 7	
	B	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 64, 65, 63, 7	
	C	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 64, 65, 66, 7	
	D	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 64, 65, 67, 7	
	aktseptor - 1							
	A	ADTTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 68, 62, 69, 7	
	B	ADTTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCSR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 64, 65, 69, 7	
	C	ADTTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCS	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 64, 65, 70, 7	
	aktseptor - 2							
	A	ADTTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 68, 62, 71, 7	
	B	ADTTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 64, 65, 71, 7	
	C	ADTTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCA	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 64, 65, 72, 7	
	D	ADTTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYC	-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOS.: 64, 65, 73, 7	

FIG. 3B

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQP

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLI -L2- GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQP

kv2 DIVMTQSPSLPVTGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEA

kv3 EIVLTQSPGTLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEP

kv4 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPELLIY -L2- GVPDRFSGSGGTDFTLTISSLQA

**FIG. 4A**

kv1 EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 74, 75, 76, 77

kv1 EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 74, 78, 76, 77

kv2 EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 49, 79, 80, 77

kv3 EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 81, 82, 83, 77

kv4 EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 84, 85, 86, 77

**FIG. 4B**

8/31

	230	240	250	260	270	
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV					
humIgG2	PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV					
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV					
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV					
		****			* * *	
	280	290	300	310	320	
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP					
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP					
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP					
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP					
			* *	*	*	*
	330	340	350	360	370	
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV					
				D L		
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV					
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV					
humIgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV					
	**	*		*		
	380	390	400	410	420	
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNMFSCSVMH					
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNMFSCSVMH					
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNIFSCSVMH					
humIgG4	EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNMFSCSVMH					
	*	*	*	*	* *	
	430	440				
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK		SEQ ID NO.: 38			
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK		SEQ ID NO.: 39			
humIgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK		SEQ ID NO.: 40			
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSLGK		SEQ ID NO.: 41			
	**	*				

### Kappa kerge ahela konstantse piirkonna konsensusjärjestus

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK  
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKV  
YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC SEQ ID NO: 37

## FIG. 5A



## CD22-vastase antikeha h10F4v2 kerge ahel

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGNTFLEWYQQKPGKAPKLLI  
 YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG  
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEOLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
QSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTK  
SFNRGEC (SEQ ID NO:87)

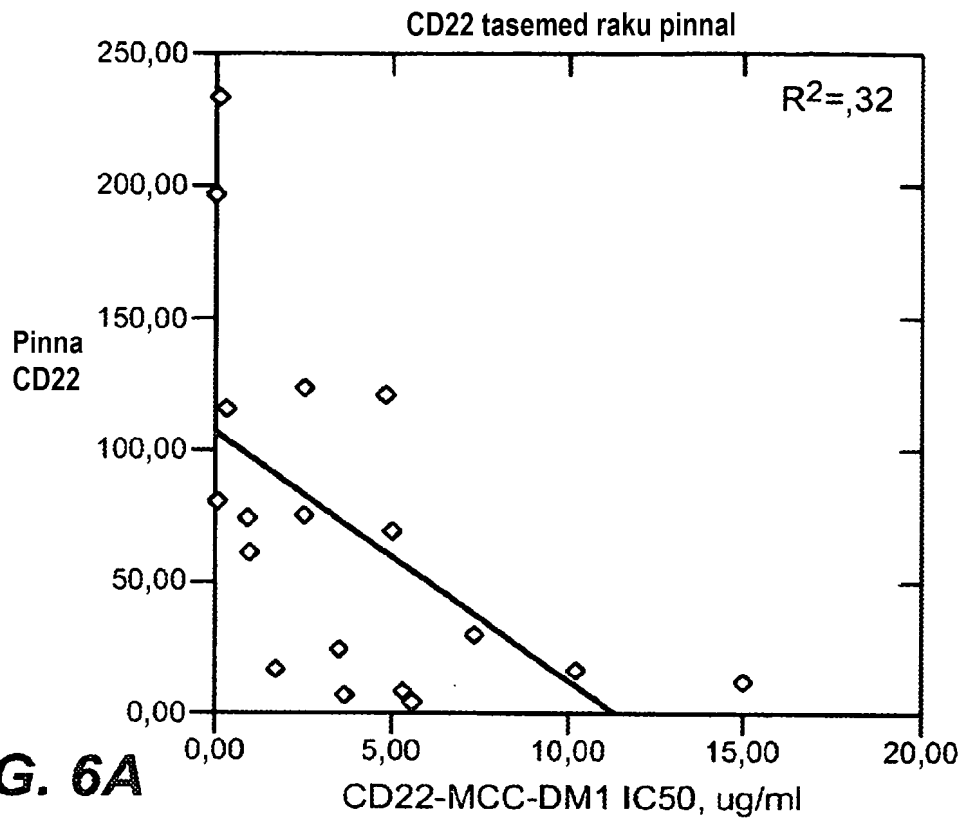
## CD22-vastase antikeha h10F4v2 raske ahel

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP  
 GDGDTNYSKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGSSWDWY  
 FDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT  
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGN  
VFSCSVMEALHNHYTOKSLSLSPGK (SEQ ID NO:88)

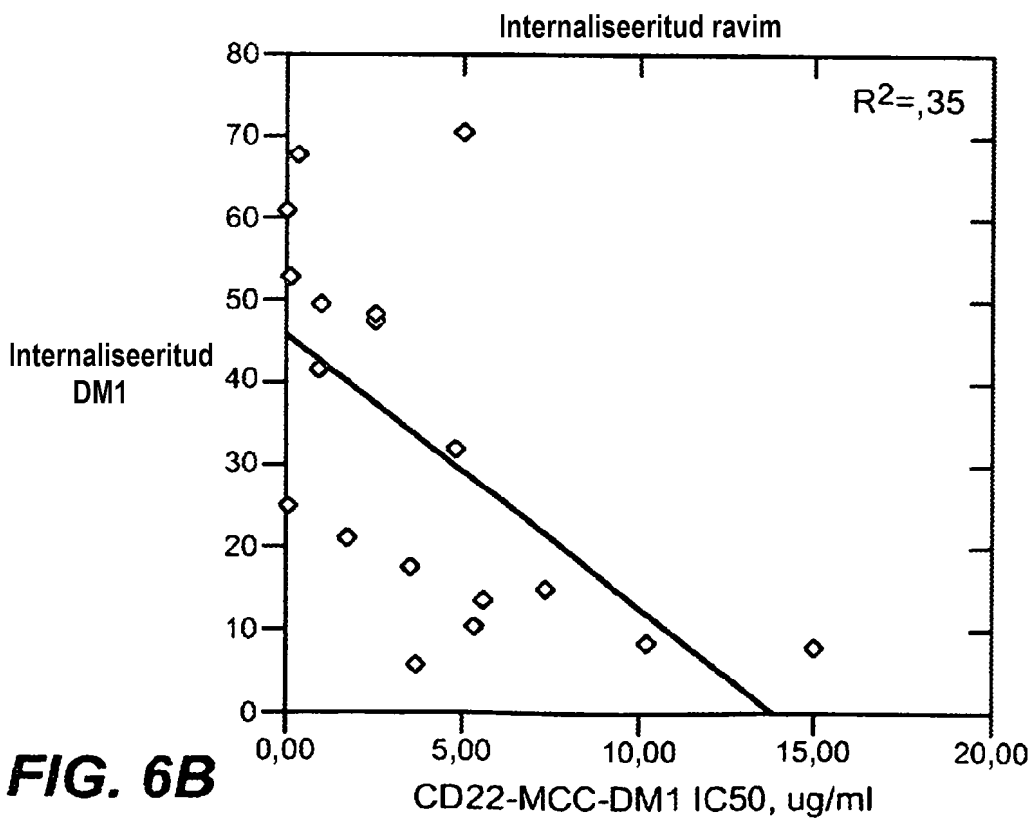


**FIG. 5B**

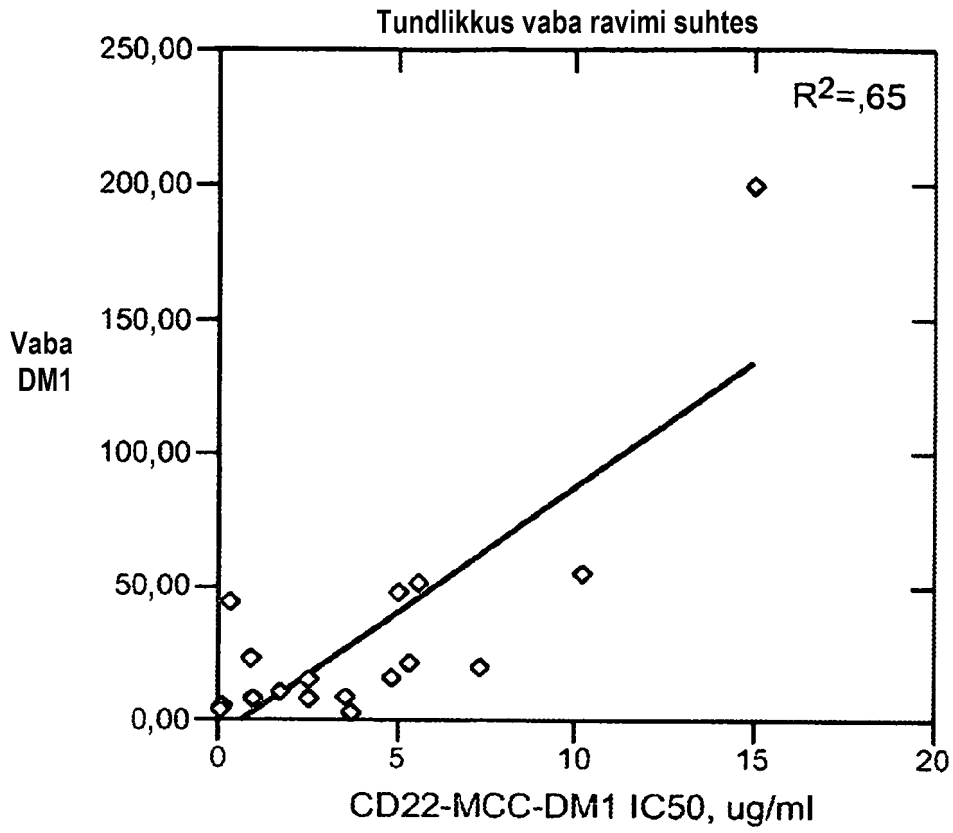
10/31



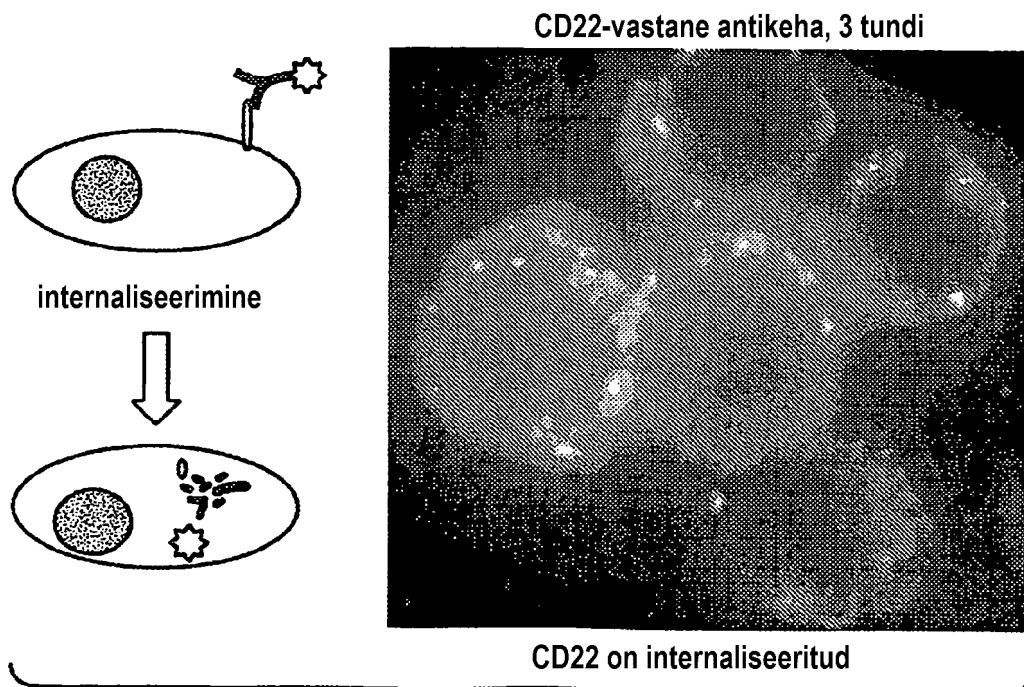
**FIG. 6A**



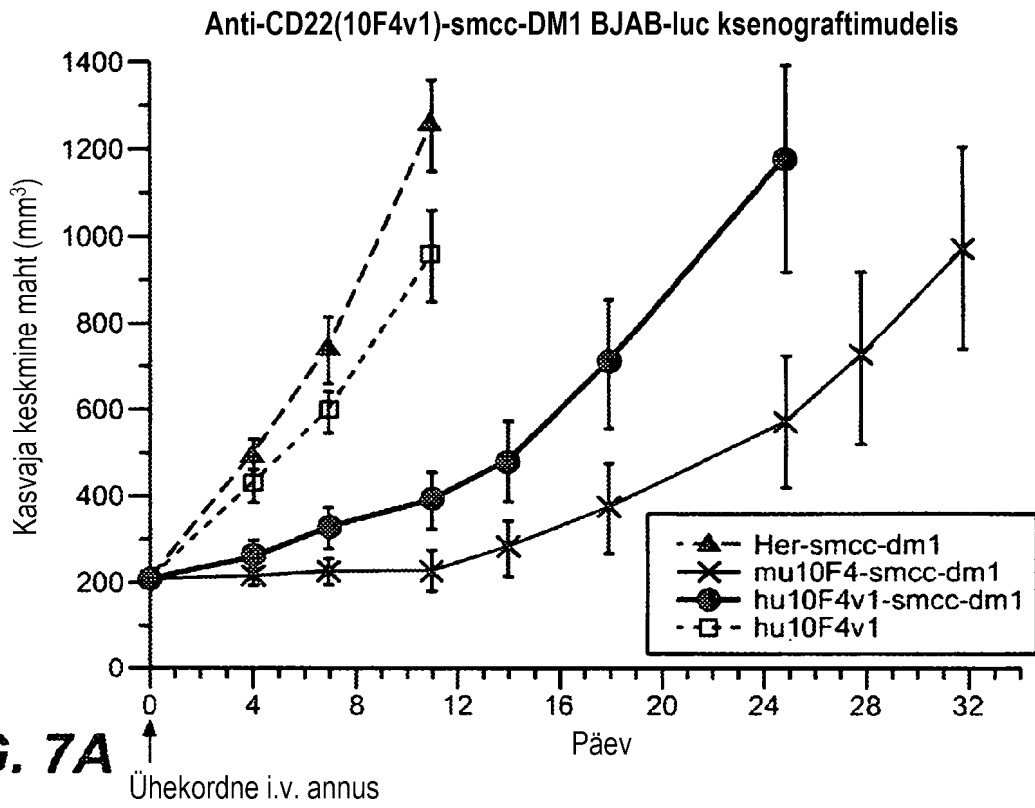
**FIG. 6B**



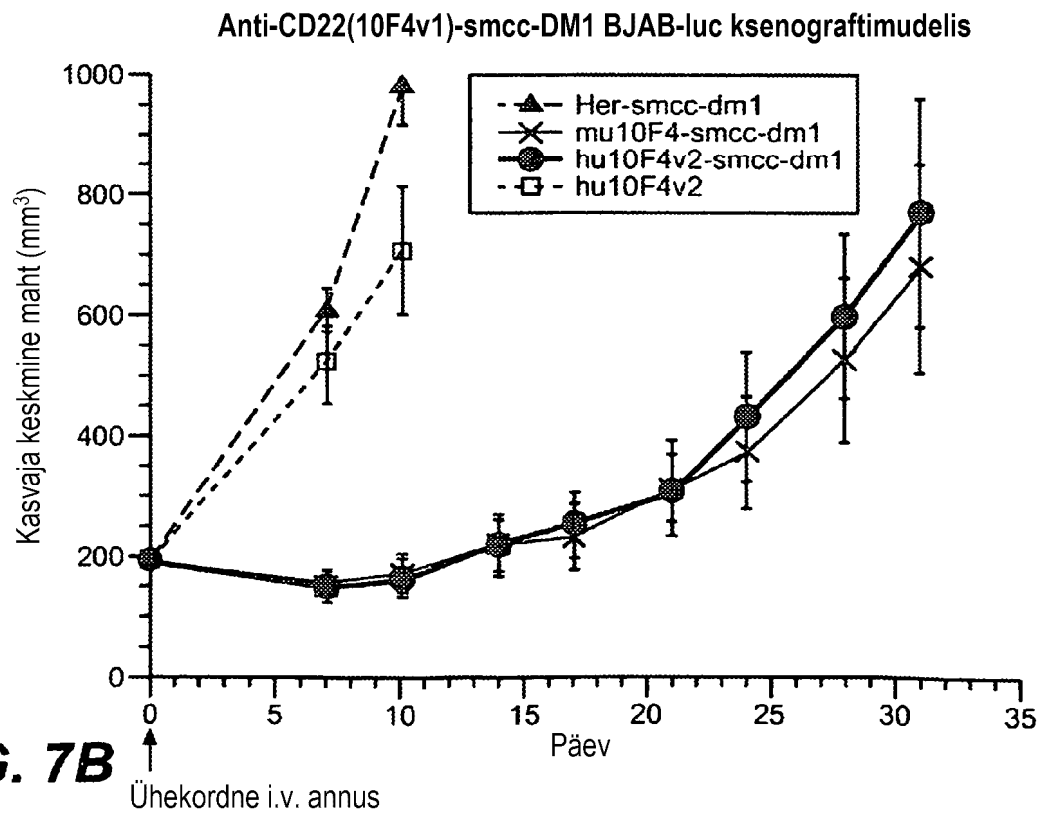
**FIG. 6C**



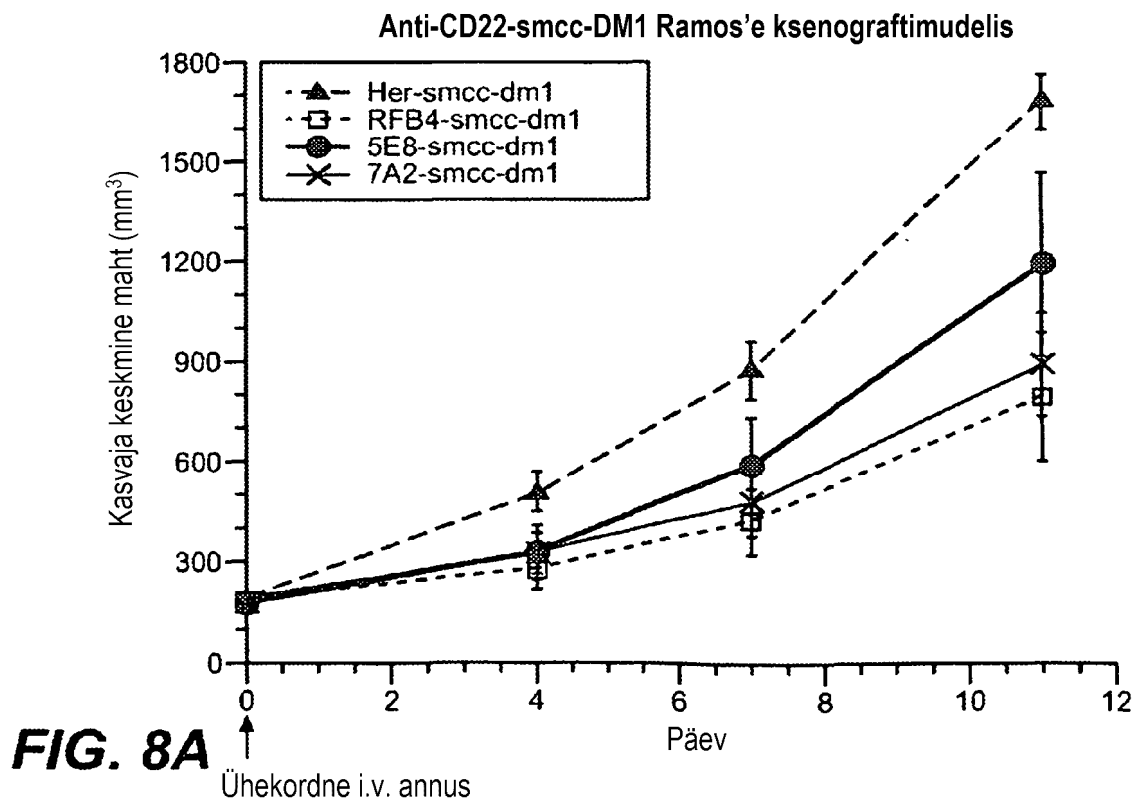
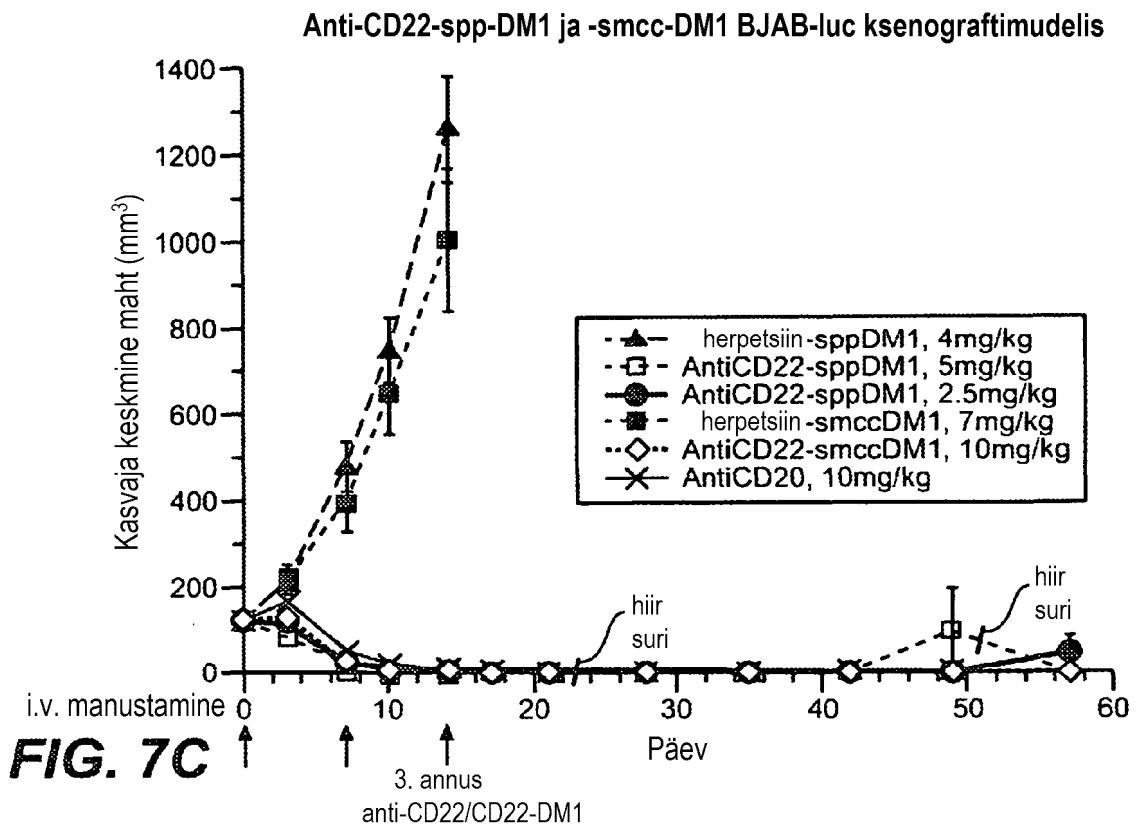
**FIG. 6D**

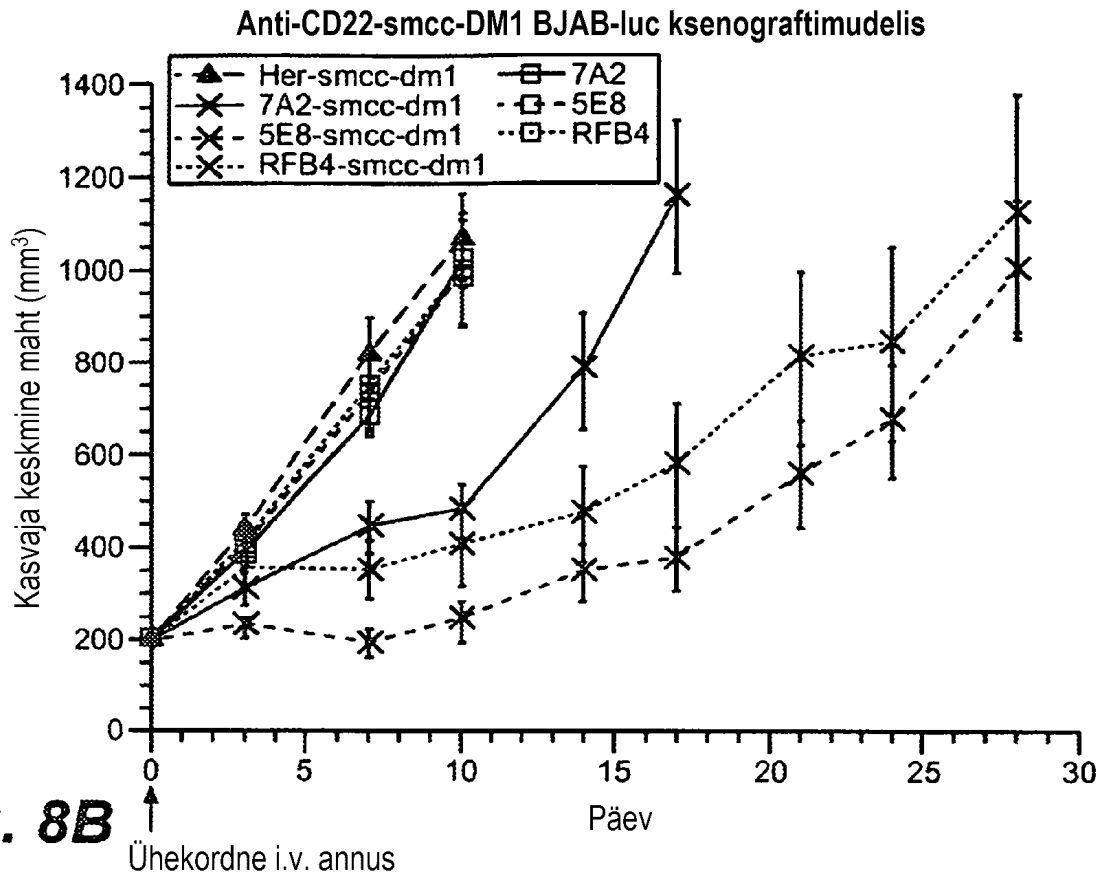


**FIG. 7A**

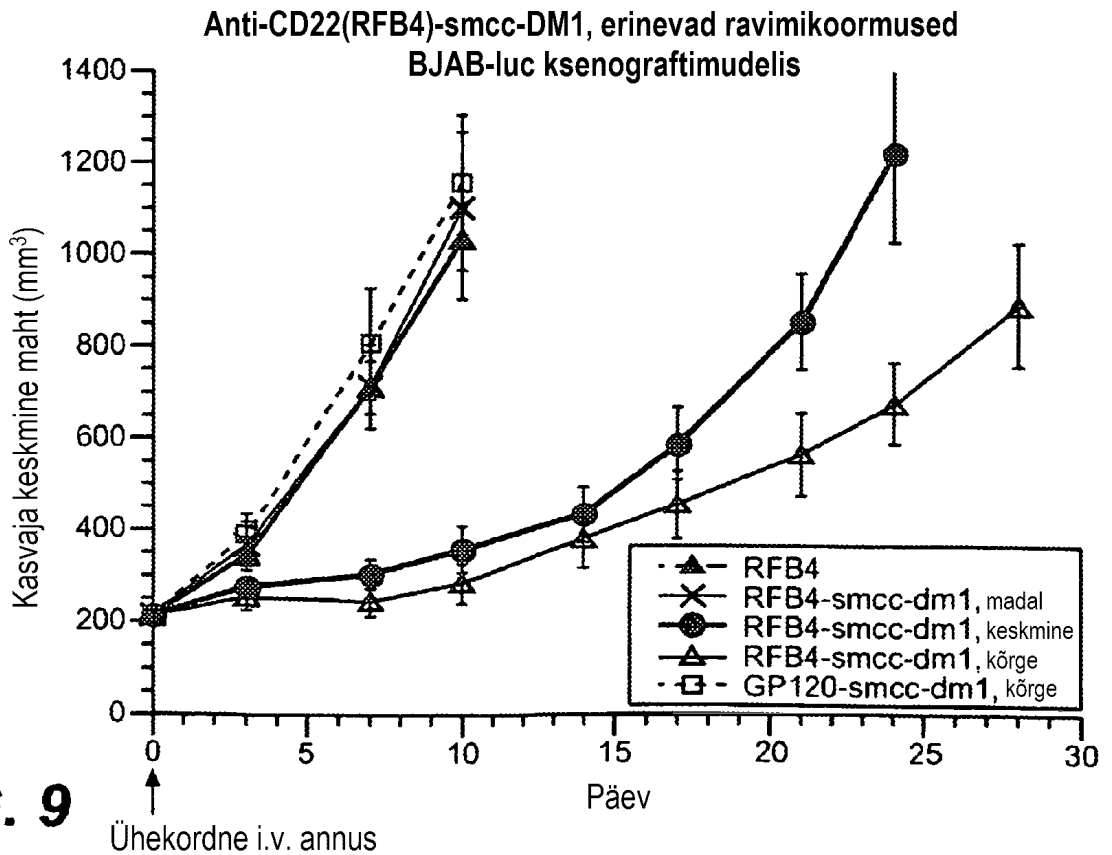


**FIG. 7B**

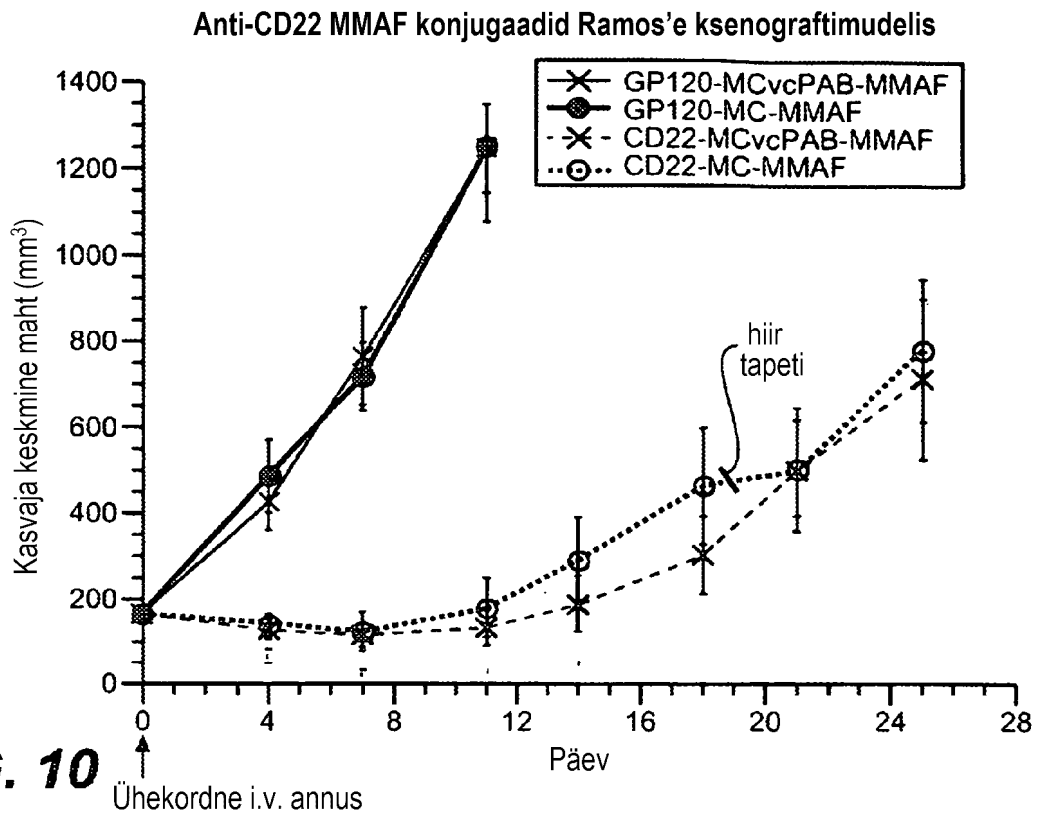




**FIG. 8B**

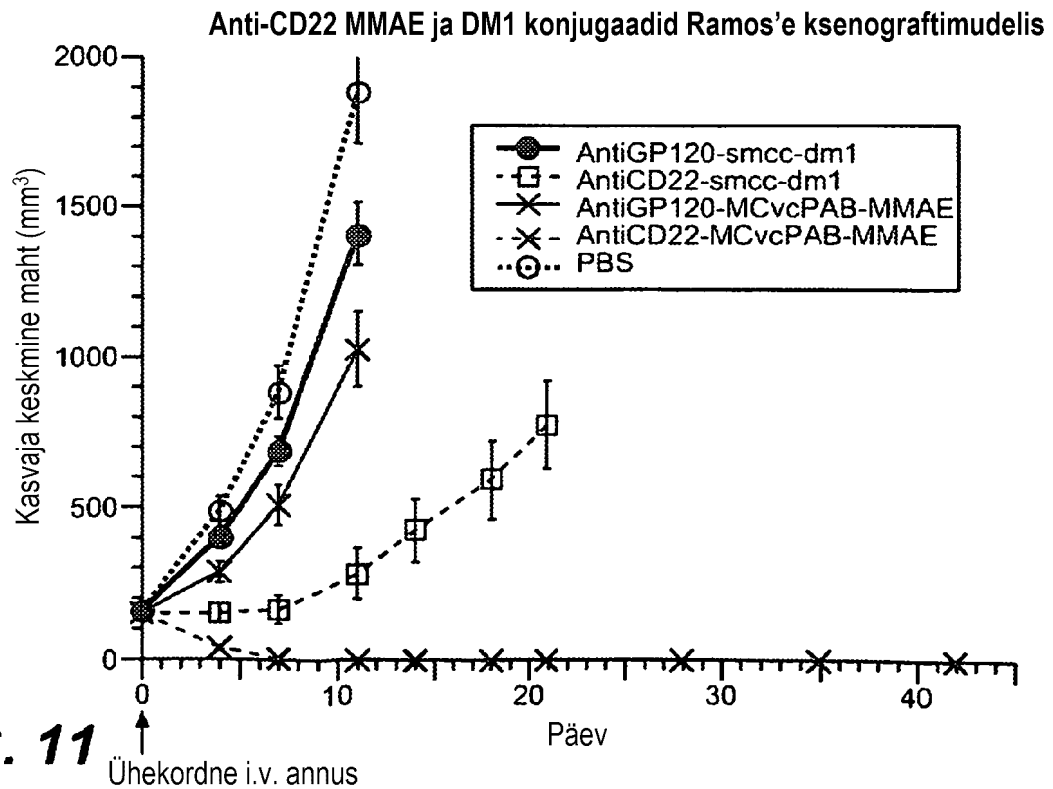


**FIG. 9**



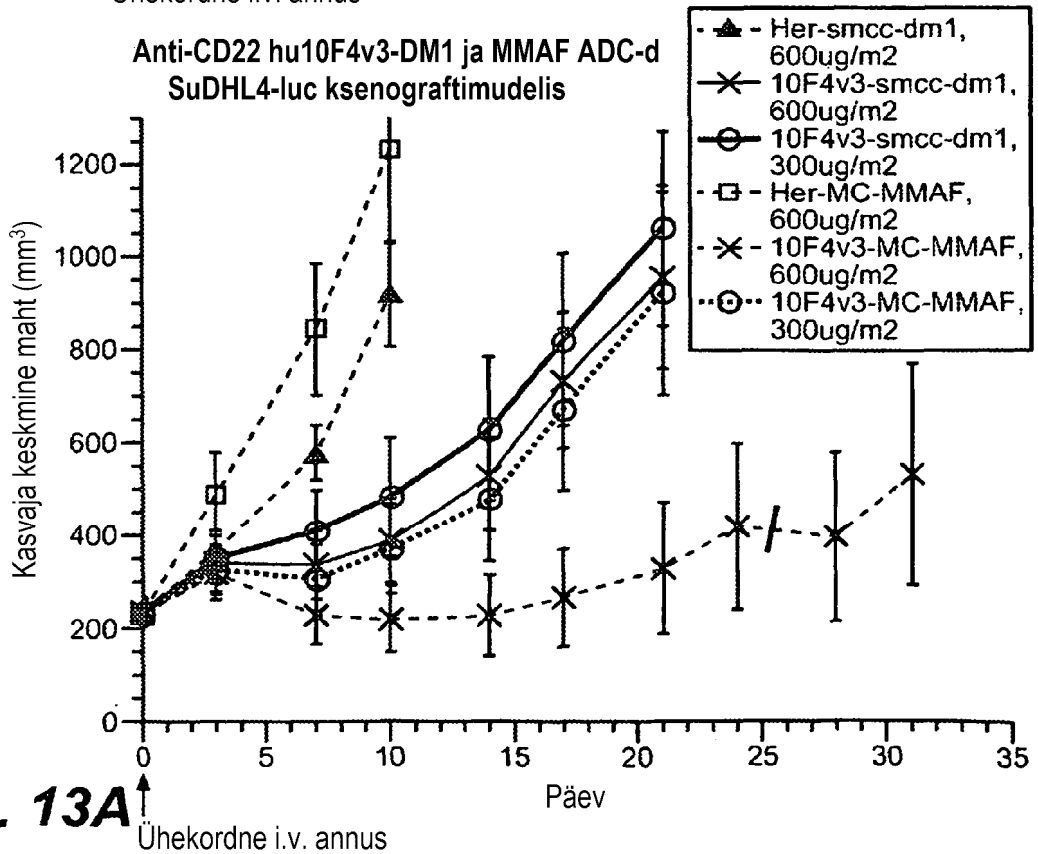
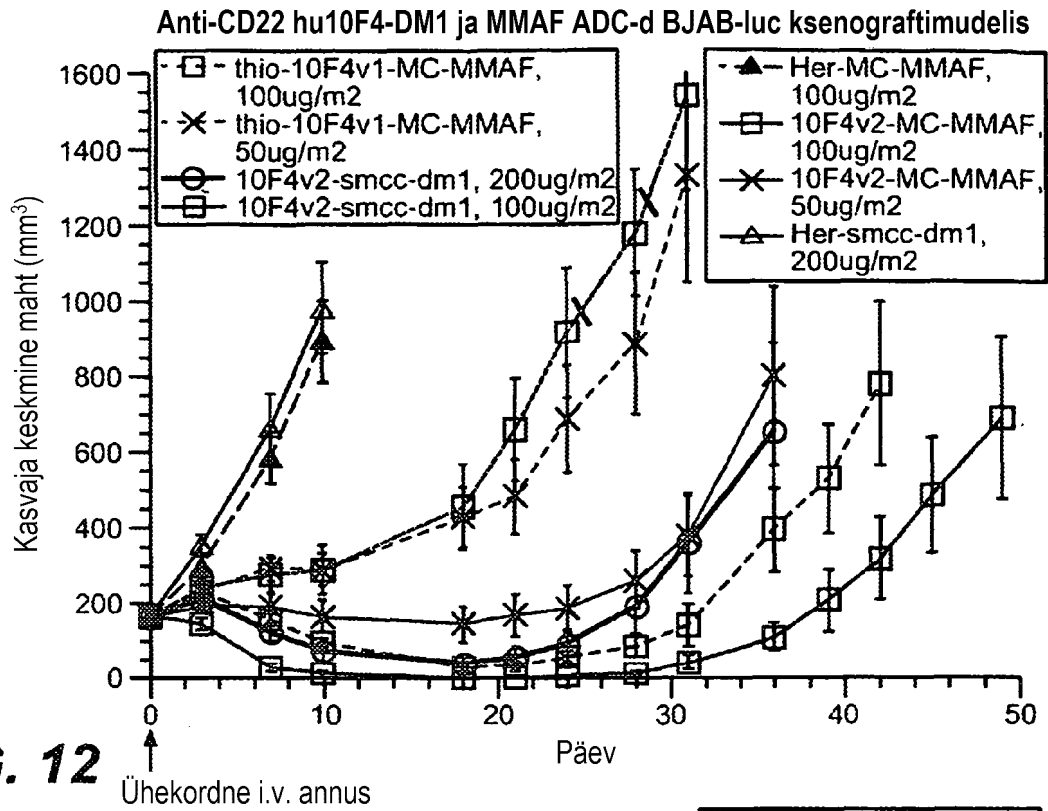
**FIG. 10**

Ühekordne i.v. annus

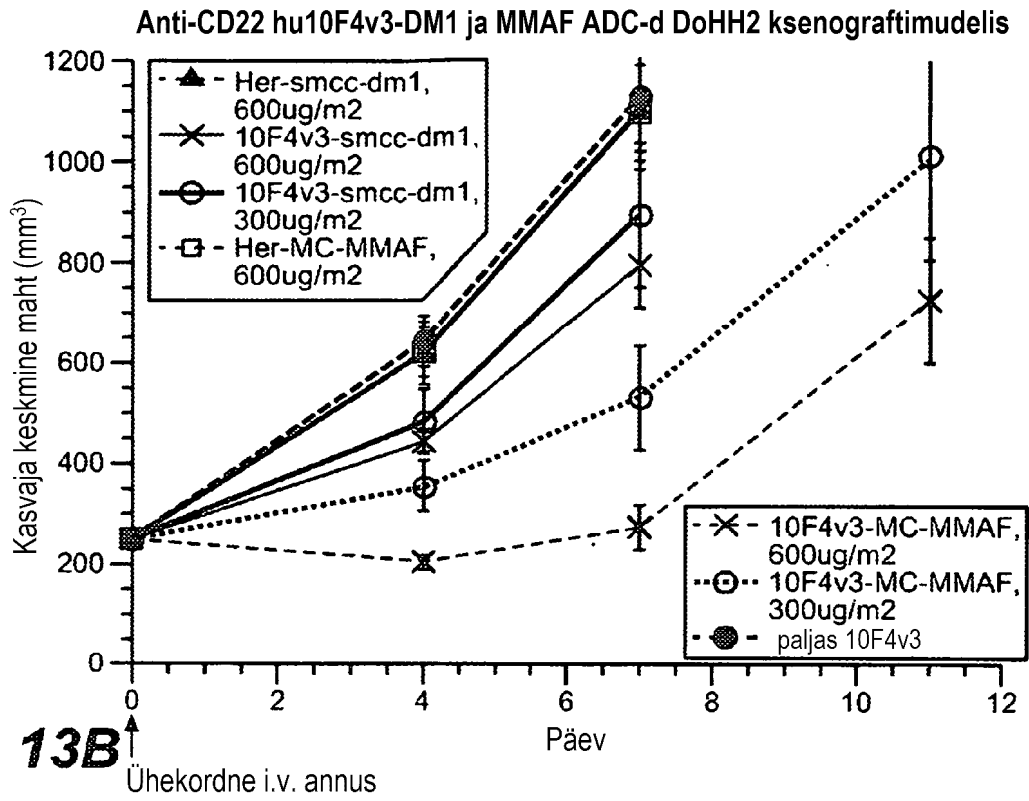


**FIG. 11**

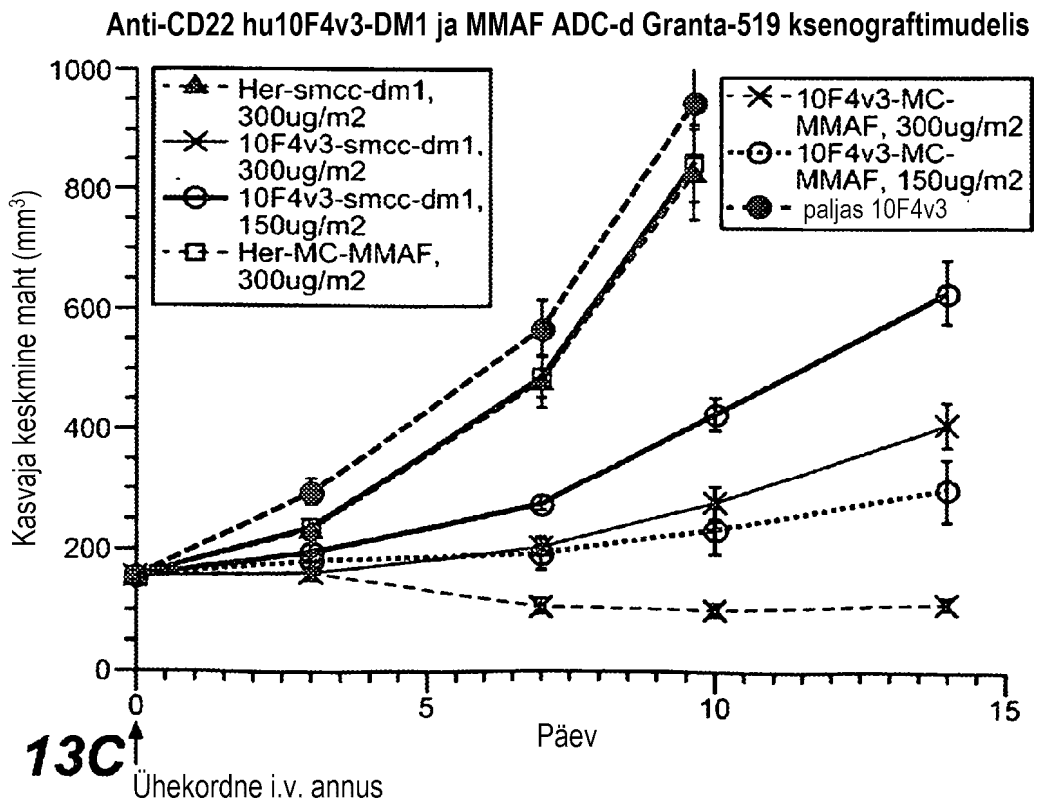
Ühekordne i.v. annus





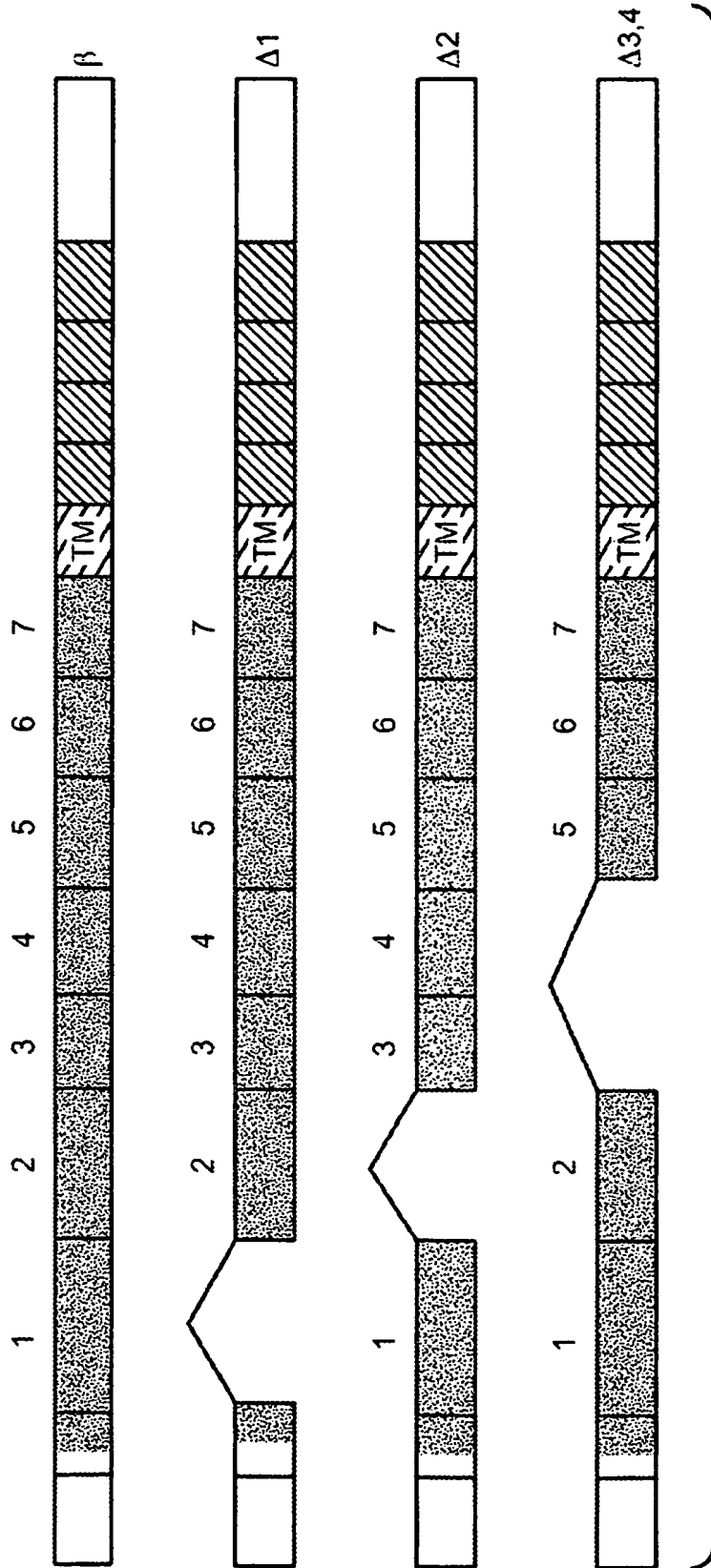


**FIG. 13B**



**FIG. 13C**

CD22 domeenide deletsioonid epitoobi kaardistamiseks



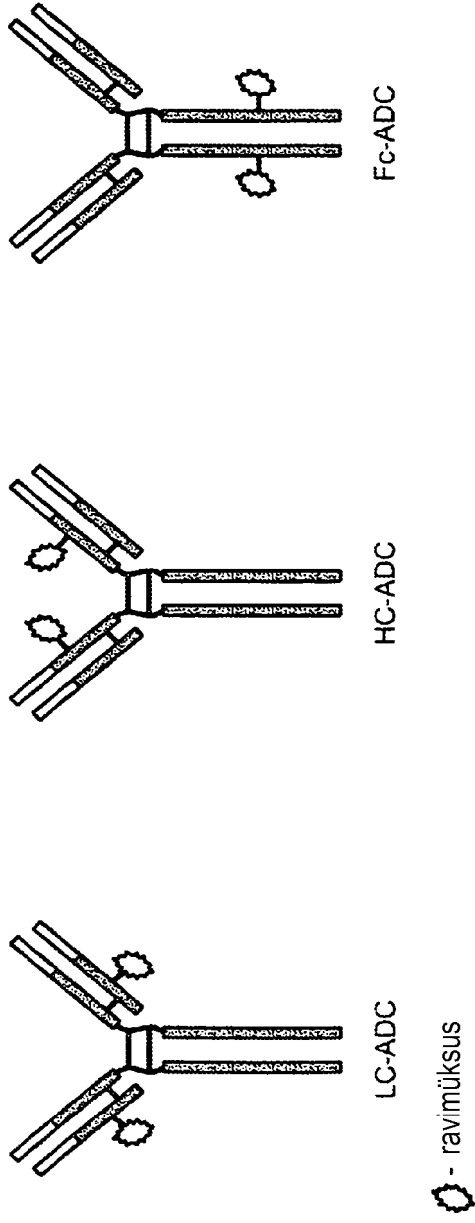


FIG. 15

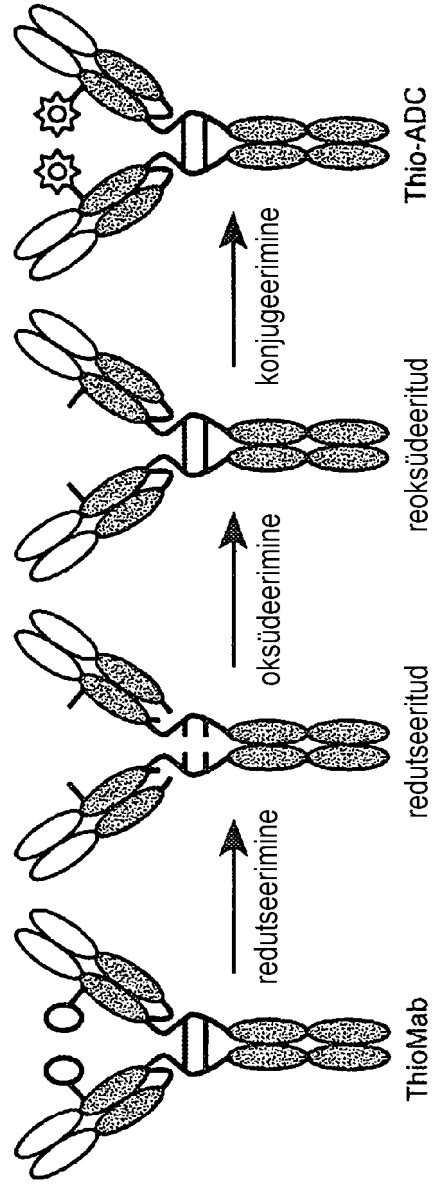


FIG. 16

20/31

## Anti-CD22 V205C h10F4v3 tsüsteini-modifitseeritud kerge ahel

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSIVHSVGNTFLEWYQQKPGKAPKLLI  
 YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG  
 TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  
OSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPCTK  
SFNRGEC (SEQ ID NO:91)

**FIG. 17A**

## Anti-CD22 A118C h10F4v3 tsüsteini-modifitseeritud raske ahel

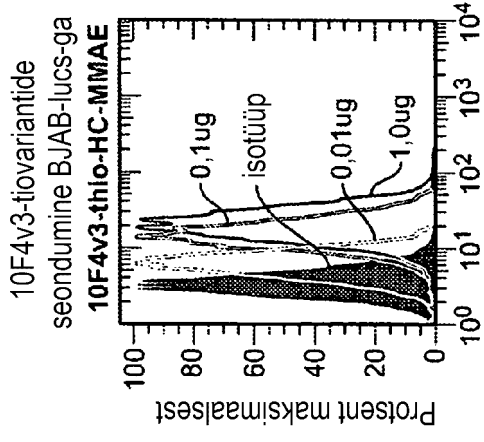
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP  
 GDGDTNYSKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY  
 FDVWGQGTLLVTVSSCSTKGPVSFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT  
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK (SEQ ID NO:92)

**FIG. 17B**

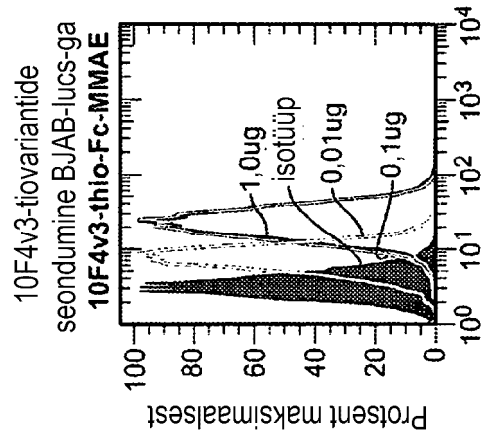
## Anti-CD22 S400C h10F4v3 tsüsteini-modifitseeritud Fc-piirkond

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP  
 GDGDTNYSKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY  
 FDVWGQGTLLVTVSSASTKGPVSFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT  
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDGCDGSFFLYSKLTVDKSRWQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLSPGK (SEQ ID NO:93)

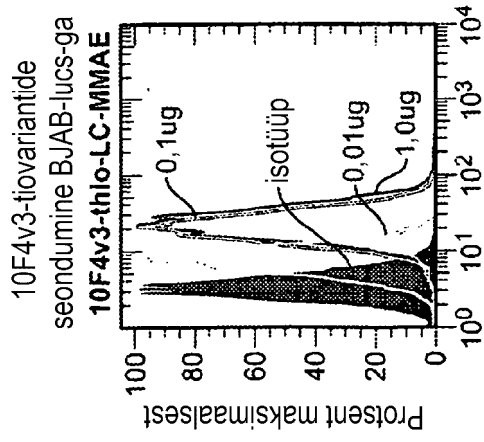
**FIG. 17C**



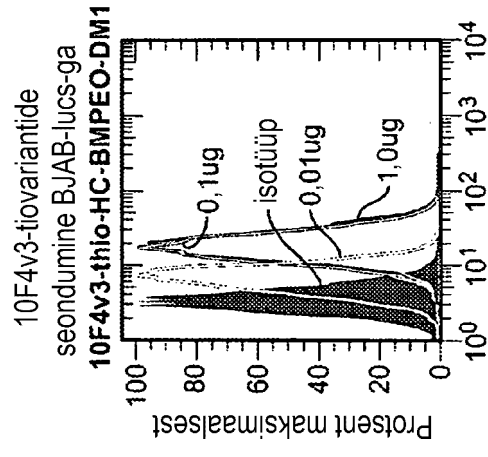
**FIG. 18C**



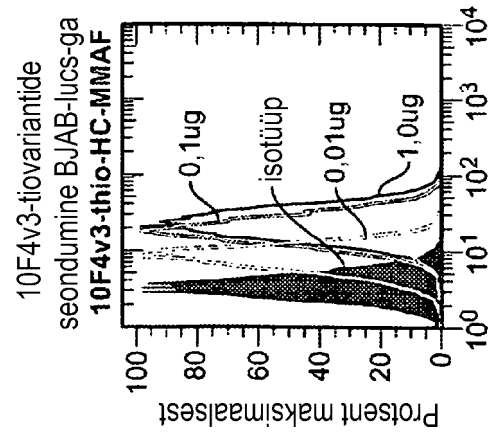
**FIG. 18B**



**FIG. 18A**

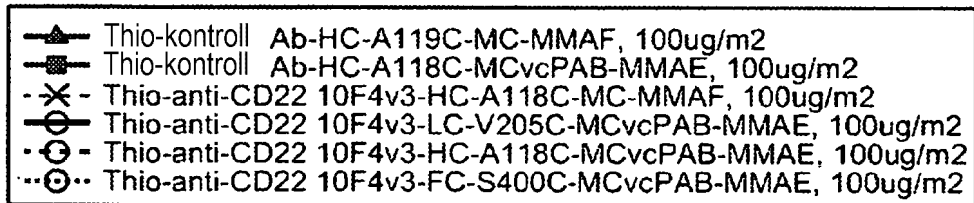
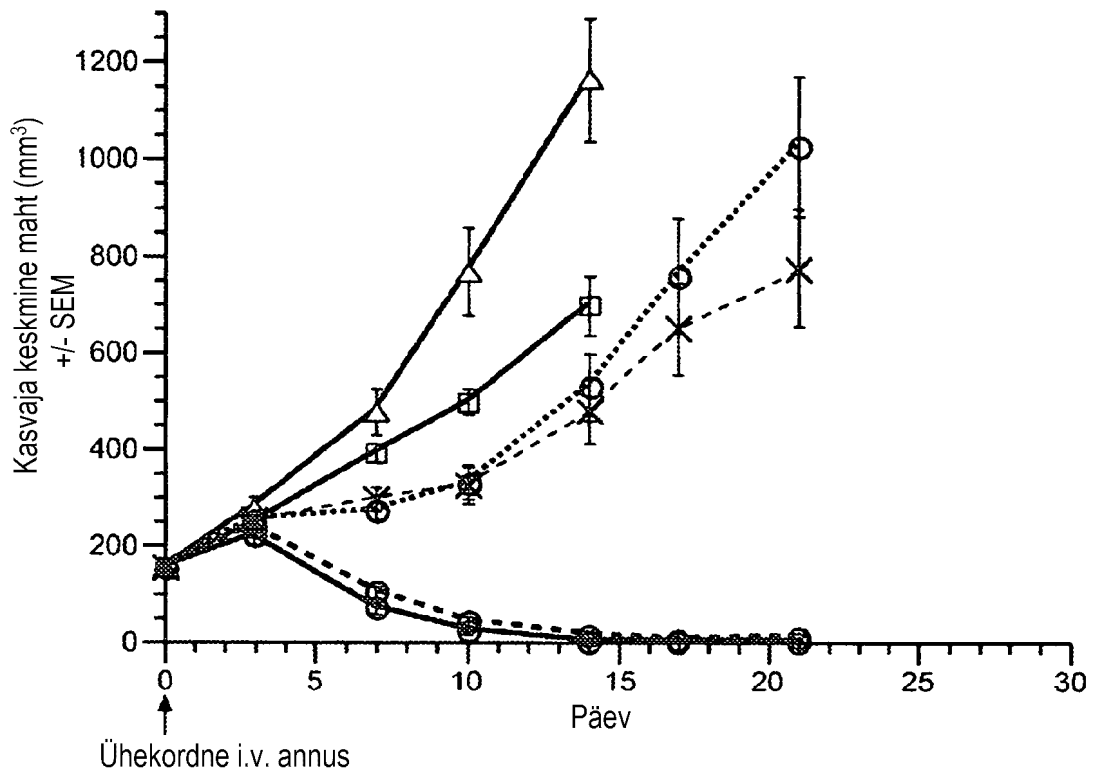


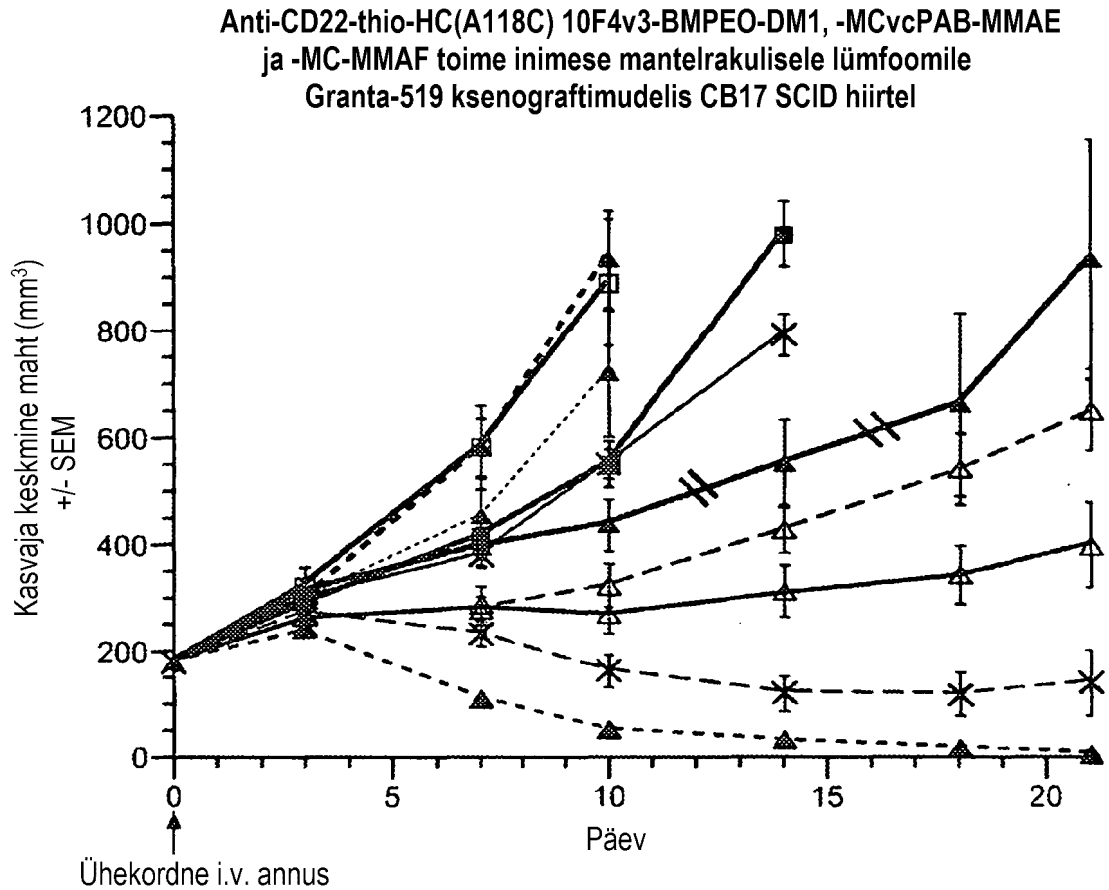
**FIG. 18E**



**FIG. 18D**

## Manustatud anti-CD22 TDC-de toime Granta-519 ksenograffile SCID hiirtel

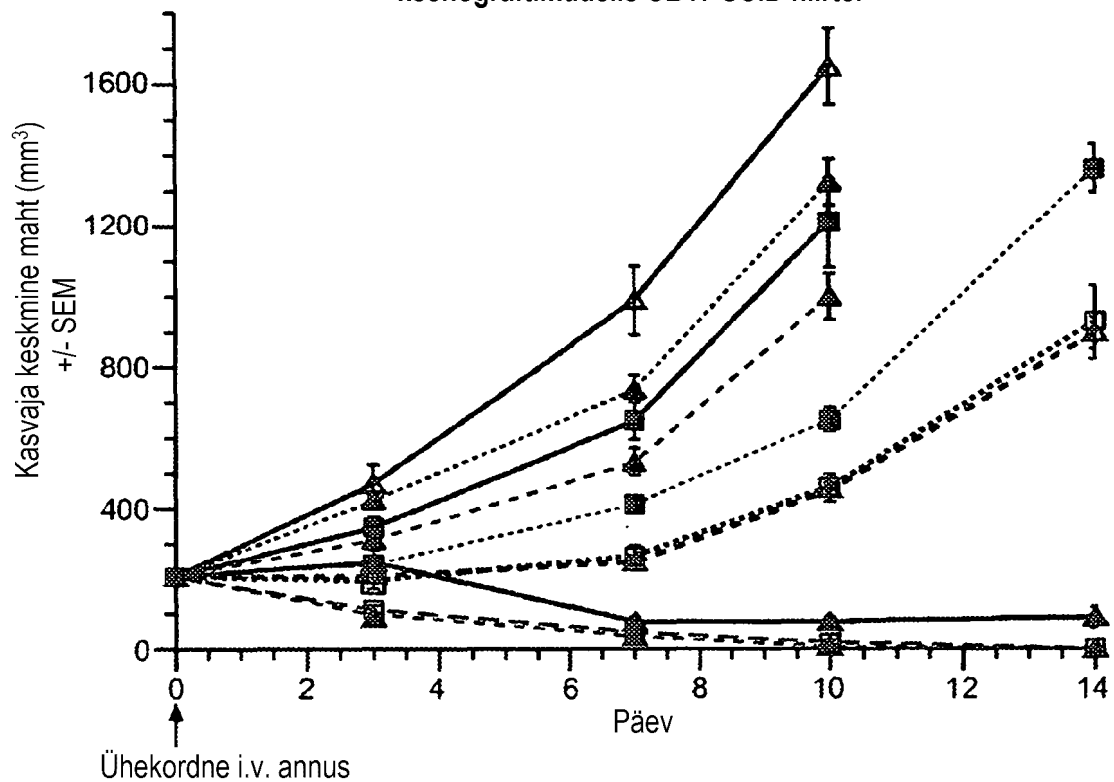
**FIG. 19**



- ▲ - Anti-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 150 ug/m2
- □ - Thio-HC(A118C) kontroll Ab-bmpeo-dm1, 300 ug/m2
- ▲ - Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 150 ug/m2
- ■ - Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 300 ug/m2
- ▲ - Thio-HC(A118C) kontroll Ab-MCvcPAB-MMAE, 150 ug/m2
- ▲ - Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 150 ug/m2
- X - Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 75 ug/m2
- ▲ - Thio-HC(A118C) kontroll Ab-MC-MMAF, 150 ug/m2
- ▲ - Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 150 ug/m2
- X - Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 75ug/m2

**FIG. 20A**

Anti-CD22-thio-HC(A121C) 10F4v3-BMPEO-DM1, -MCvcPAB-MMAE  
ja -MC-MMAF toime follikulaarsele lümfoomile DoHH2  
ksenograftimudelil CB17 SCID hiirtel



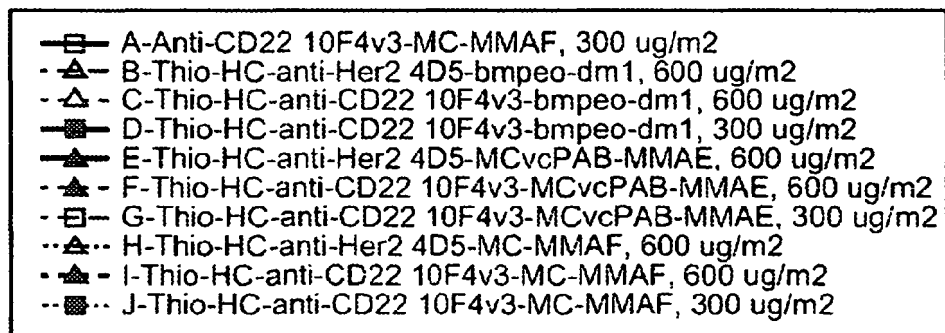
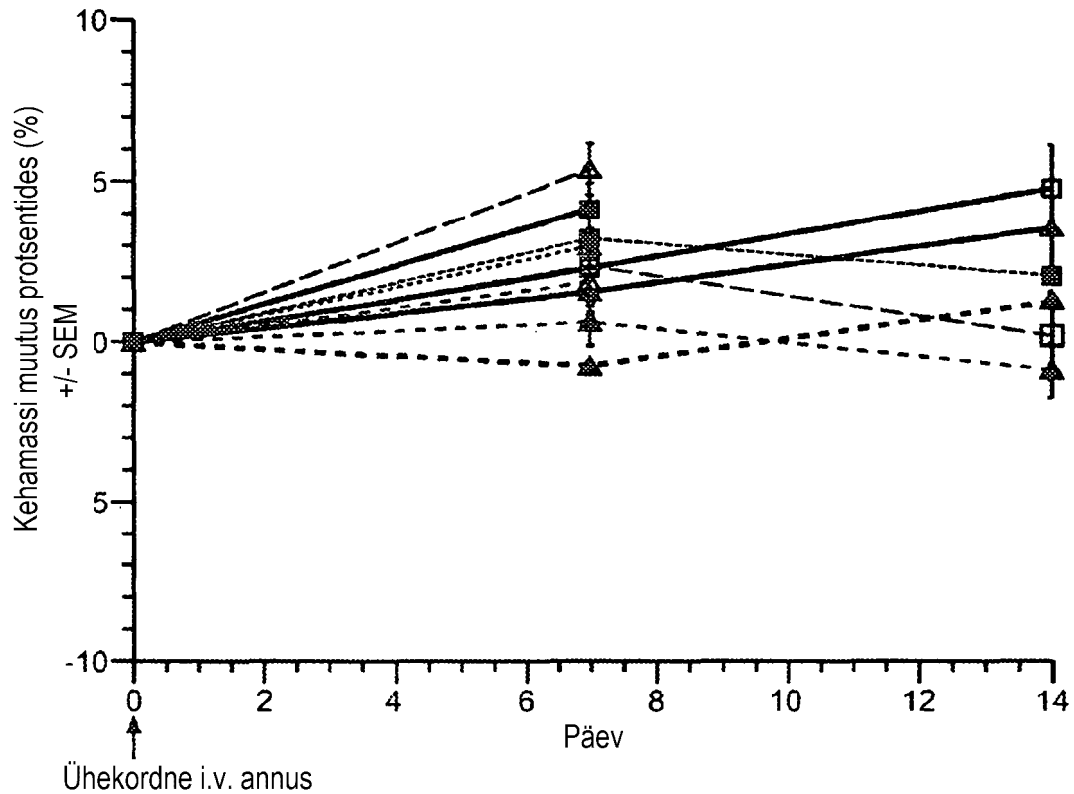
- A-Anti-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 300 ug/m2
- △— B-Thio-HC-anti-Her2 4D5-bmpeo-dm1, 600 ug/m2
- ▲- C-Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 600 ug/m2
- D-Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 300 ug/m2
- ▲— E-Thio-HC-anti-Her2 4D5-MCvcPAB-MMAE, 600 ug/m2
- ▲- F-Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 600 ug/m2
- G-Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 300 ug/m2
- ▲•• H-Thio-HC-anti-Her2 4D5-MC-MMAF, 600 ug/m2
- △•• I-Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 600 ug/m2
- J-Thio-HC-anti-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 300 ug/m2

**FIG. 20B**

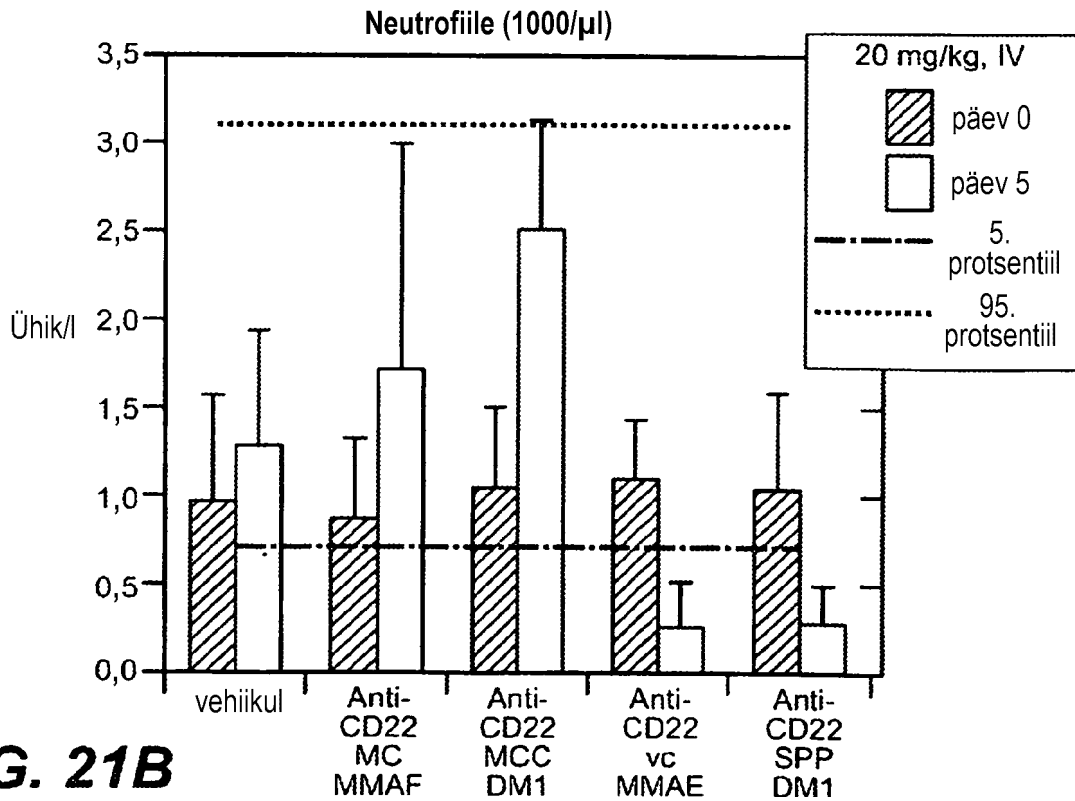
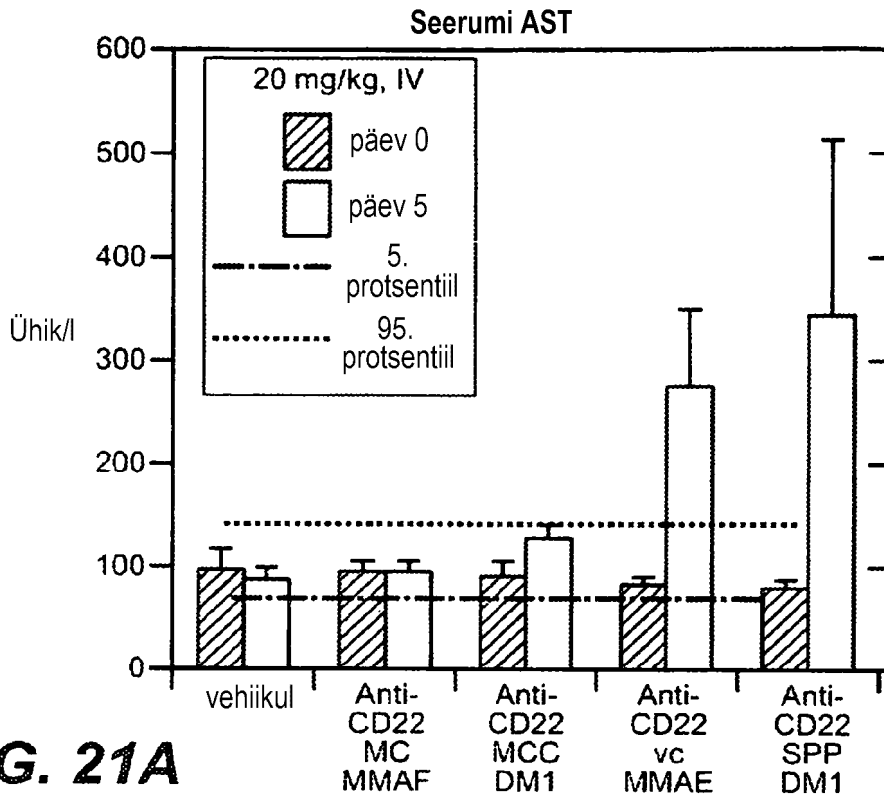


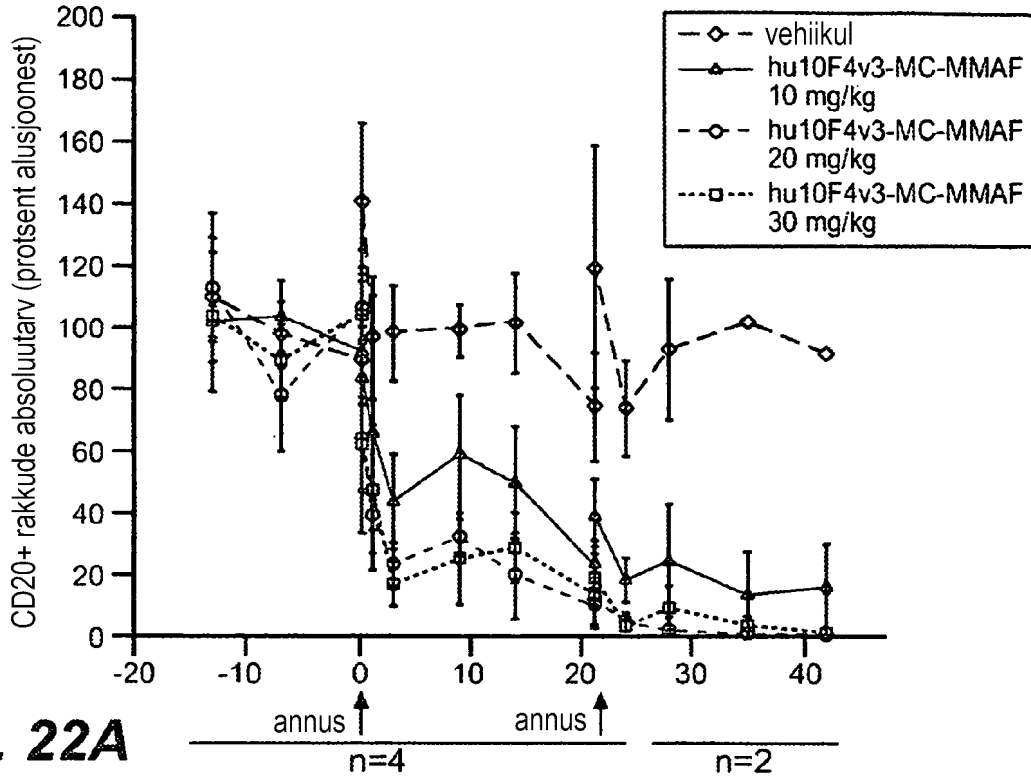
25/31

Anti-CD22-thio-HC(A121C) 10F4v3-BMPEO-DM1, -MCvcPAB-MMAE  
ja -MC-MMAF toime follikulaarsele lümfoomile DoHH2  
ksenograaftimudelil CB17 SCID hiirtel

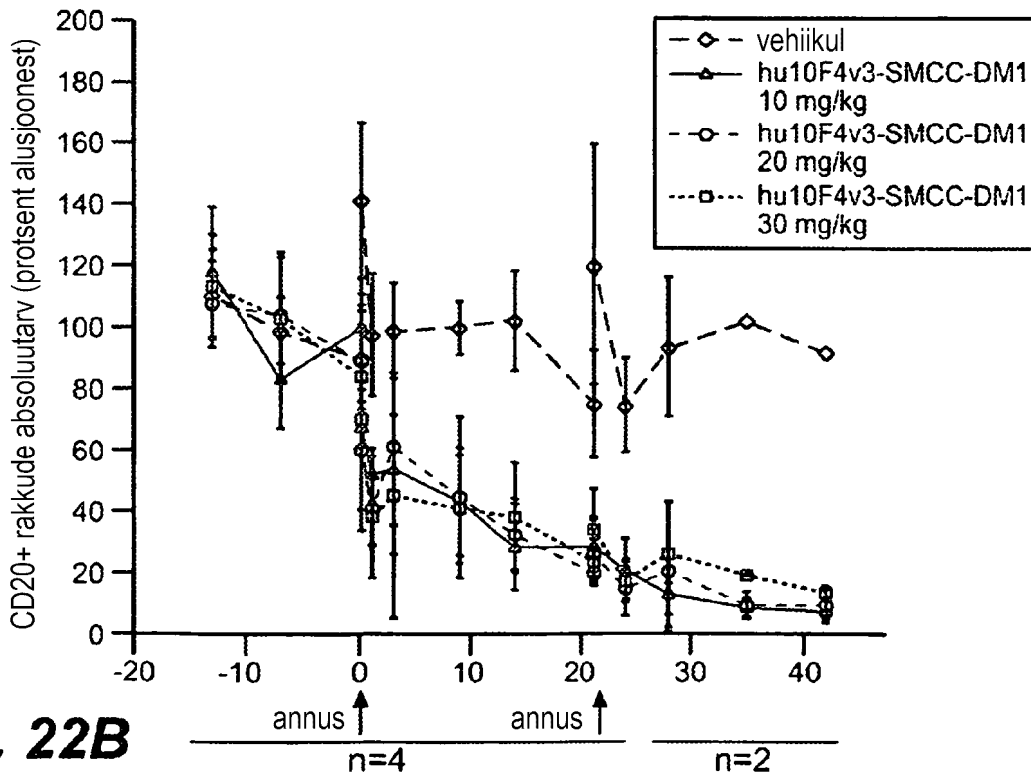


**FIG. 20C**

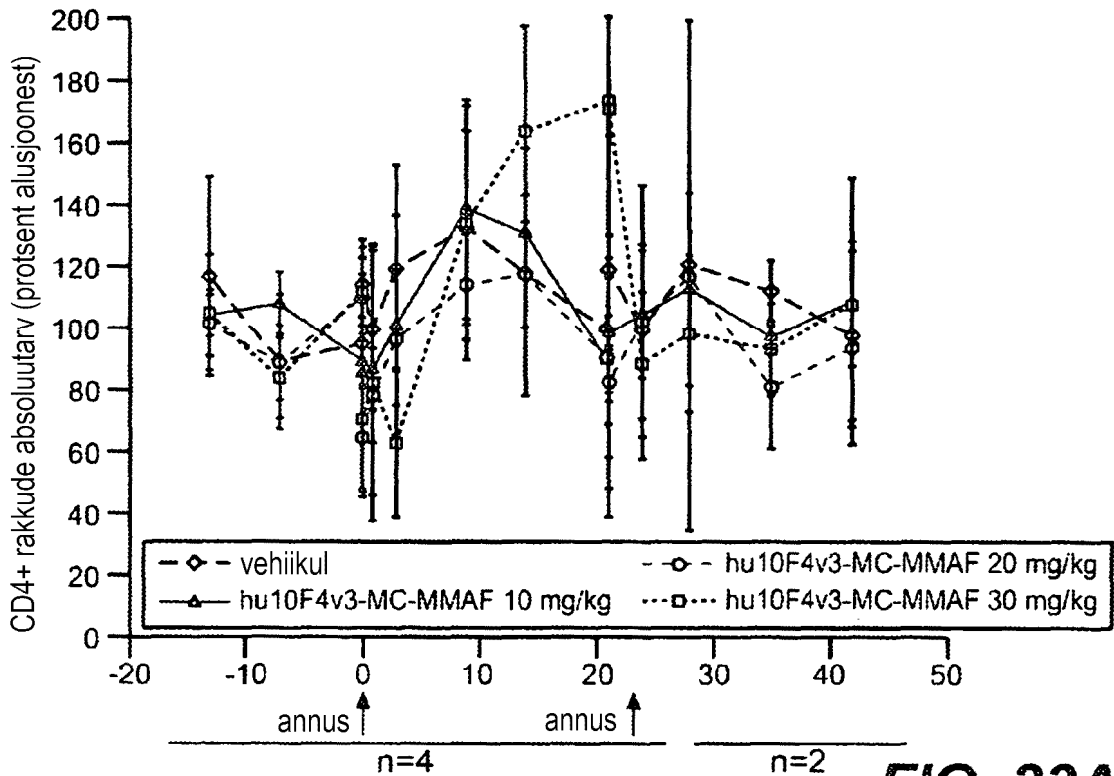




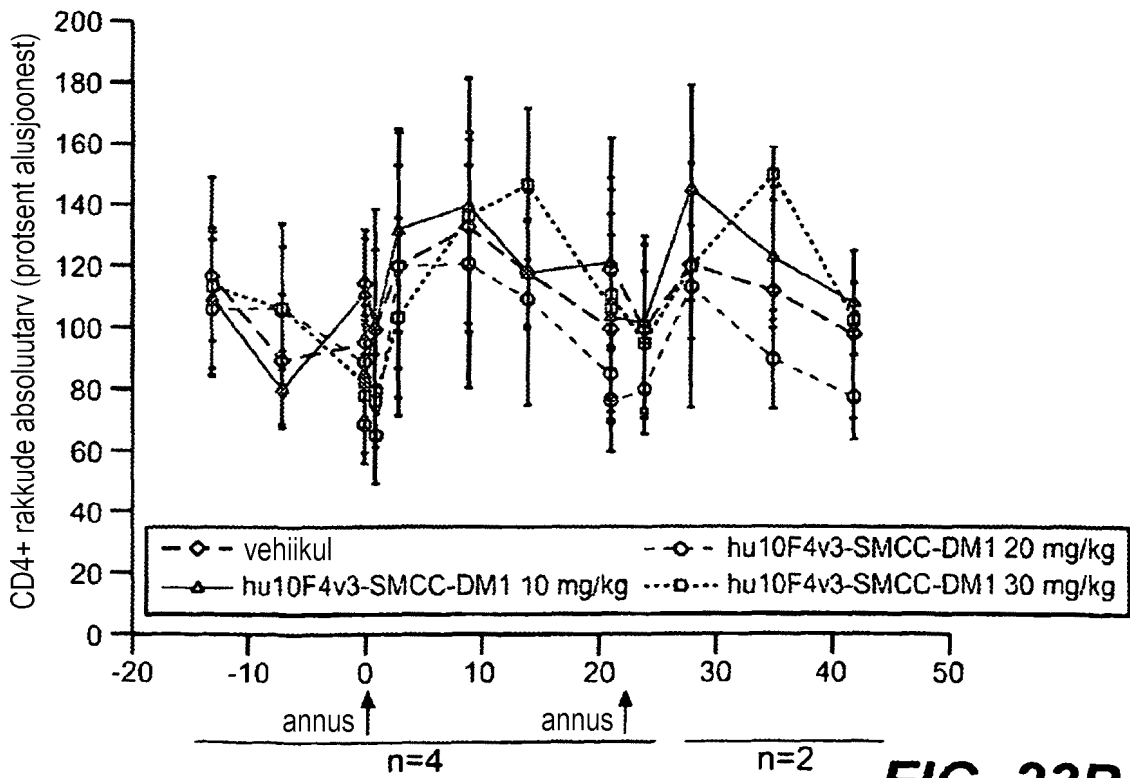
**FIG. 22A**



**FIG. 22B**

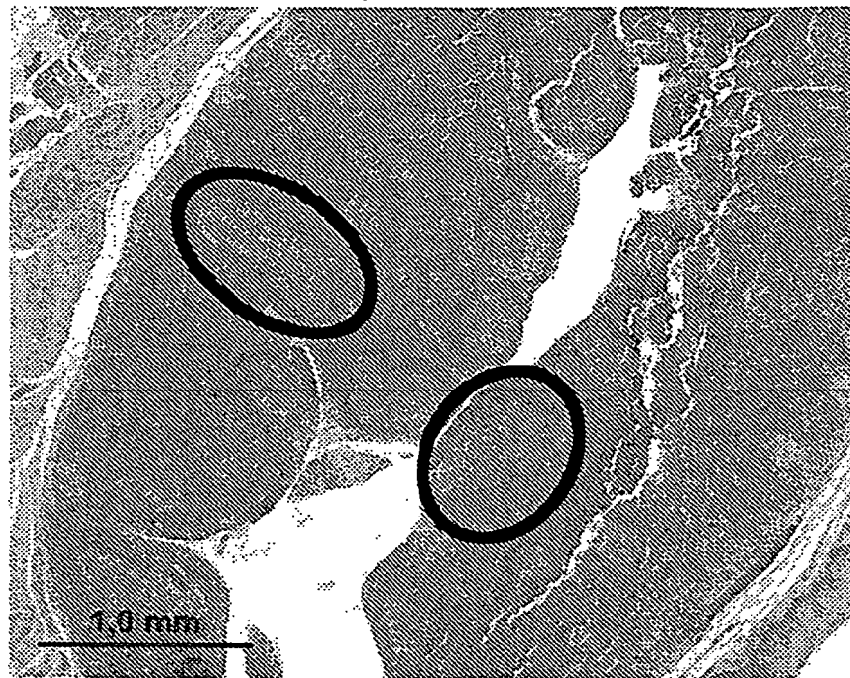


**FIG. 23A**



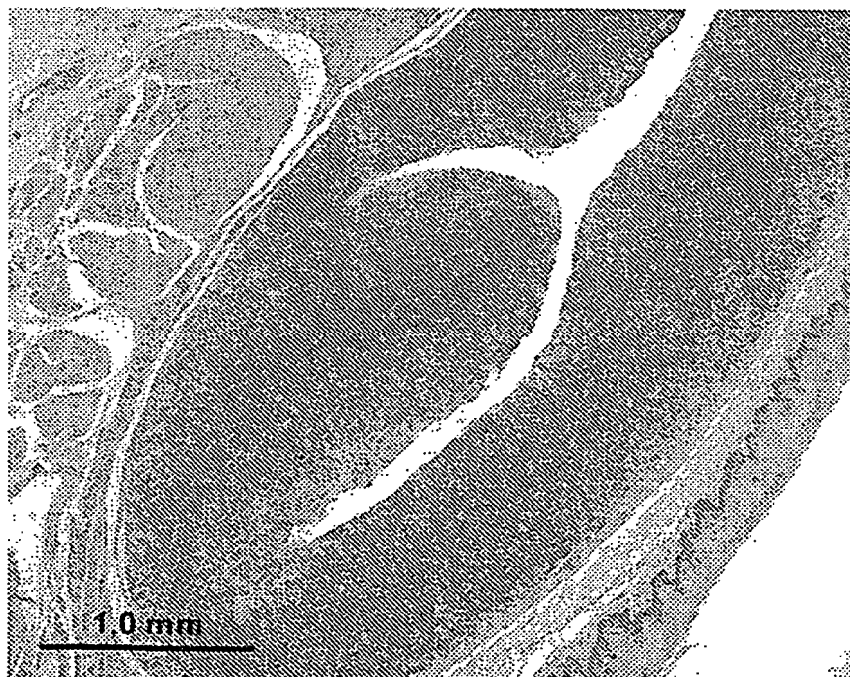
**FIG. 23B**

Mandlikoe proovi vehiikukontroll

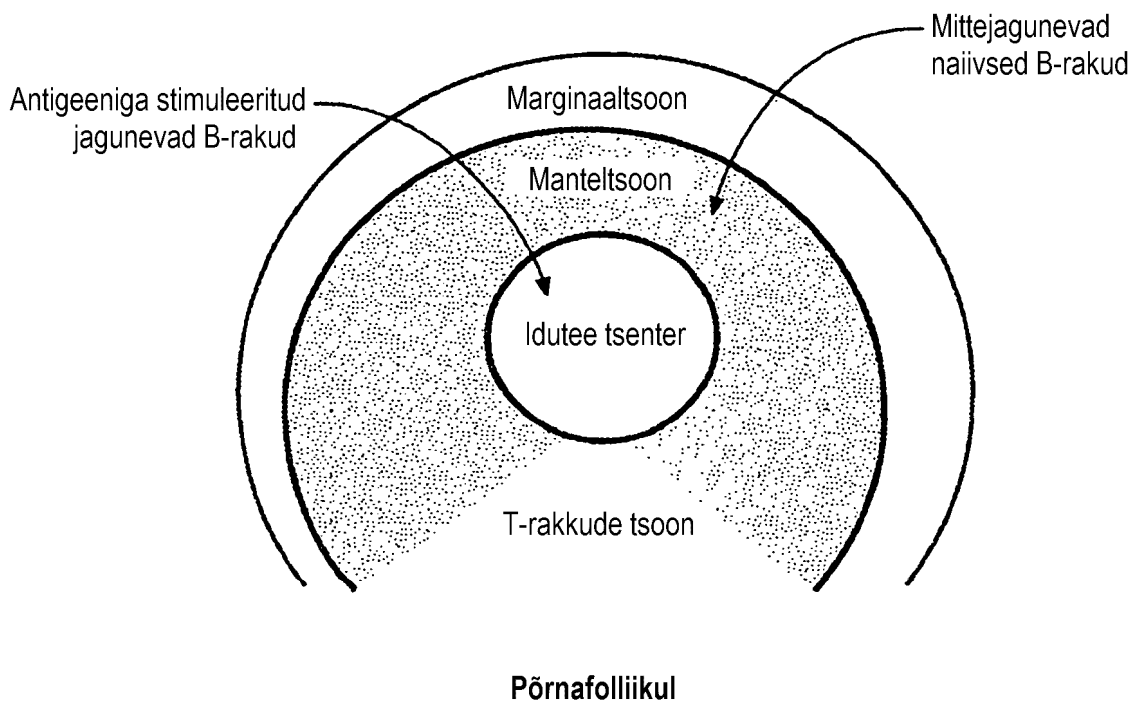


**FIG. 24A**

hu10F4v3-SMCC-DM1-ga töödeldud mandlikude



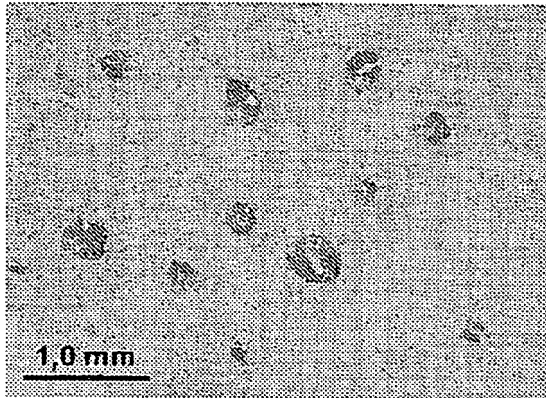
**FIG. 24B**



**FIG. 25A**

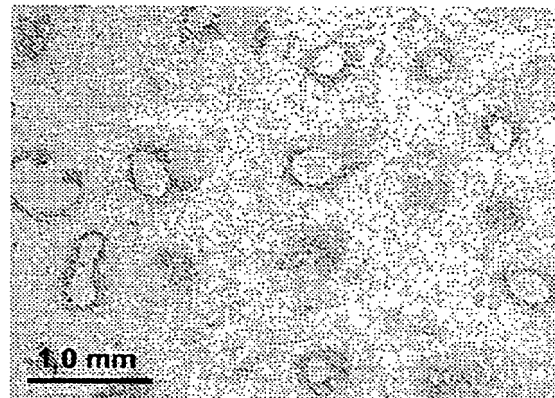
**FIG. 25B**

Ki-67 värvumine  
(jagunenud rakud)

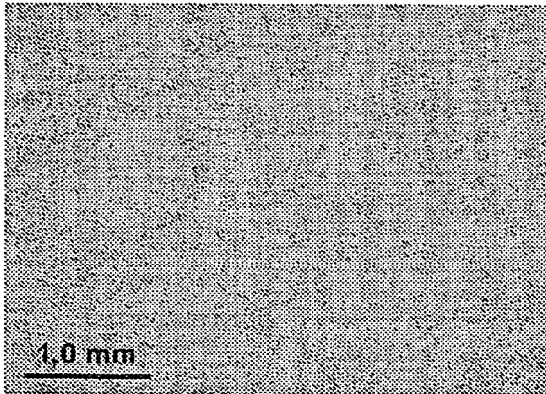


**FIG. 25D**

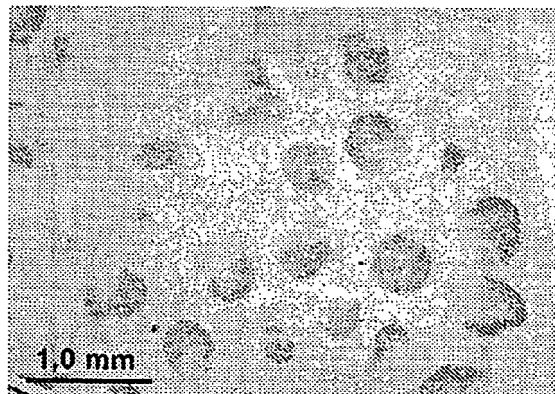
Anti-IgD värvumine  
(naaiused B-rakud)



vehiikul



vehiikul



Anti-CD22-MC-MMAF  
(10 mg/kg)

**FIG. 25C**

Anti-CD22-MC-MMAF  
(10 mg/kg)

**FIG. 25E**