



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 322 556 B1**

(51) Int. Cl.  
*C07K 16/28 (2006.01)*  
*A61K 39/395 (2006.01)*  
*C07K 16/18 (2006.01)*

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

(10) Registreeringu number: <b>E011530</b>	(73) Patendiomanik:
(11) Patendikirjelduse tõlke number: <b>EE-EP 2 322 556 B1</b>	<b>Genentech, Inc.</b> <b>1 DNA Way,</b> <b>South San Francisco, CA 94080-4990, US</b>
(30) Prioriteediandmed: <b>03.09.2004</b> <b>US 607377 P</b>	(72) Leiutise autorid:
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: <b>02.09.2005</b>	<b>Dennis, Mark, S.</b> <b>120 Plymouth,</b> <b>San Carlos, CA 94070, US</b>
(96) Euroopa patendi- taotluse number: <b>10177407.3</b>	<b>Fong, Sherman</b> <b>19 Basinside Way,</b> <b>Alameda, CA 94502, US</b>
(97) Euroopa patendi väljaand- misest teatamise kuupäev: <b>21.10.2015</b>	(74) Patendivolinik:
(97) Euroopa patendi number: <b>EP 2 322 556</b>	<b>Piret Niidas</b> <b>LASVET Patendibüroo OÜ</b> <b>Suurtüki 4a, 10133 Tallinn, EE</b>
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: <b>13.01.2016</b>	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: <b>15.03.2016</b>	

(54) **Humaniseeritud beeta-7-subühiku vastased antagonistid ja nende kasutamine**

**KIRJELDUS**

## TEHNIKA ALA

[0001] Käesolev taotlus käsitleb üldiselt molekulaarbioloogia ja kasvufaktorite regulatsiooni valdkondi. Täpsemalt käsitleb leiutis beeta7-subühikut sisaldavate integriinide bioloogilise aktiivsuse modulaatoreid ja nimetatud modulaatorite kasutamist.

## LEIUTISE EELDUS

[0002] Integriinid on  $\alpha/\beta$  heterodimeersed rakupinnaretseptorid, mis osalevad paljudes raku-protssides alates rakuadhesioonist kuni geeniregulatsioonini (Hynes, R. O., Cell, 1992, 69:11-25 ja Hemler, M. E., Annu. Rev. Immunol., 1990, 8:365-368). Mitmed integriinid on segatud haigusprotssidesse ning on tekitanud laialdast huvi ravimiotsingute võimalike sihtmärkidena (Sharar, S. R. et al., Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16:359-378). Immuunsüsteemis osalevad integriinid põletikuprotsside käigus toimivas leukotsüütide transpordis, adhesioonis ja infiltratsioonis (Nakajima, H. et al., J. Exp. Med., 1994, 179:1145-1154). Integriinide diferentsiaalne ekspressioon reguleerib rakkude adhesioonimadusi ning erinevad integriinid osalevad erinevates põletikuvastustes, Butcher, E. C. et al., Science, 1996, 272:60-66. Beeta7-integriinid (s.t alfa4beeta7 ( $\alpha4\beta7$ ) ja alfaEbeeta7 ( $\alpha E\beta7$ )) ekspresseeruvad eelkõige monotsüütidel, lümfotsüütidel, eosinofiilidel, basofiilidel ja makrofaagidel, aga mitte neutrofiilidel, Elices, M. J. et al., Cell, 1990, 60:577-584.  $\alpha4\beta7$ -integriini primaarsed ligandid on endoteeli pinnavalatud limaskestast adressiini rakuadhesioonimolekul (*mucosal addressin cell adhesion molecule*, MAdCAM) ja vaskulaarne rakuadhesioonimolekul (VCAM-1) (Makarem, R. et al., J. Biol. Chem., 1994, 269:4005-4011).  $\alpha4\beta7$  seondumine kõrgetel endoteeli pisiveenidel (*high endothelial venules*, HEVs) olevates põletikusaitides ekspresseeruvale MAdCAM-ile ja/või VCAM-ile annab tulemuseks leukotsüütide püsiva adhesiooni endoteelile, millele järgneb ekstravasatsioon põletikusse ((Chuluyan, H. E. et al., Springer Semin. Immunopathol., 1995, 16:391-404).  $\alpha4\beta7$ -integriini primaarne ligand on epiteelisiseste lümfotsüütide (*intra-epithelial lymphocyte*, IEL) pinnavalak E-kadheriin, mis soodustab  $\alpha4\beta7$ -kandvate rakkude kleepumist epiteeli lümfotsüütidele. On näidatud, et  $\alpha4\beta7$ , MAdCAM-i või VCAM-i vastu suunatud monokloonsed antikehad on efektiivsed modulaatorid selliste krooniliste põletikuliste haiguste loomamudelites, nagu

astma (Laberge, S. et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, 151:822-829), reumatoidartriit (RA, Barbadillo, C. et al., *Springer Semin. Immunopathol.*, 1995, 16:375-379), koliit (Viney et al, *J. Immunol.*, 1996, 157: 2488-2497) ja põletikuline soolehaigus (IBD, Podalski, D. K., *N. Eng. J. Med.*, 1991, 325:928-937, Powrie, F. et al., *Ther. Immunol.*, 1995, 2:115-123). On näidatud, et beeta7-subühiku vastu suunatud monokloonsed antikehad seonduvad integriini subühikuga (Tidswell, M. et al., (1997) *J. Immunol.*, 159:1497-1505), kuid neil, nagu ka mitte-inimese või mittehumaniseeritud antikehadel, puudub kliiniline kasulikkus. Humaniseeritud monokloonsed antikehad või antigeeni siduvad fragmendid, mis inhibeerivad  $\beta$ 7-ahelat sisaldava integriini ekspresseerivate leukotsüütide adhesiooni, on esitatud patenditaotluses WO 96/24673.

Püsib vajadus kõrgelt spetsiifiliste ühendite järele, näiteks humaniseeritud antikehade või nende siduvate fragmentide järele, mis inhibeerivad alfa4beeta7-integriini ja selle ligandi(de) MAdCAM ja/või VCAM vahelist interaktsiooni, samuti alfaEbeeta7-integriini ja selle ligandi E-kadheriini vahelist interaktsiooni. Need ühendid on kasulikud krooniliste põletikuliste haiguste, nagu astma, Crohni tõbi, haavandiline koliit, diabeet, samuti elundi transplantatsiooni tüsistuste ja allotransplantaatidega seotud häirete raviks.

## LEIUTISE OLEMUSE AVAMINE

[0003] Leiutis on defineeritud patendinõudluses ja on suunatud leiutisekohaseid antikehi kodeerivatele nukleiinhapetele, vektoritele, peremeesrakkudele ja nende valmistamise meetoditele. Leiutis põhineb osaliselt selliste beeta7-sisaldavate integriinide bioloogiliste radade erinevate antagonistide identifitseerimisel, mis üldiselt on bioloogilised/rakulised protsessid ja kujutavad tähtsat ja kasulikku terapeutilist sihtmärki. Selliste bioloogiliste radade hulka kuuluvad, kuid nendega piirdumata, põletikud, eelkõige kroonilised põletikulised häired, nagu astma, allergia, IBD, diabeet, transplantatsioonihäired ja transplantaadi peremehevastased häired. Leiutis esitab kompositsioonid ja meetodid, mis põhinevad sekkumisel beeta7-integriini vahendatud rakkude adhesiooni ja/või rakuvarude täiendamisse, kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata, sekkumine MAdCAM ja VCAM-1 seondu misse alfa4beeta7-integriini rakuvälise osa ja E-kadheriini interaktsiooni alfaEbeeta7-integriiniga. Siin kirjeldatud leiutisekohased antagonistid on tähtsad terapeutilised ja diagnostilised aineid kasutamiseks suunatuna beeta7-integriini kaudu toimuva ebanormaalse või ebasoovitava sig-

naaliülekanedega seotud patoloogiliste seisundite vastu. Seega esitab avaldatav meetodid, kompositsioonid, komplektid ja tootmisartiklid, mis on seotud beeta7-integriini vahendatud radade moduleerimisega, kaasa arvatud MAdCAM-alfa4beeta7 seondumise moduleerimine ja leukotsüütide varude täiendamine gastrointestinaalses epiteelis, sidumine ja allergia, astma, IBD (nagu Crohni tõbi ja haavandiline koliit), diabeet, transplantatsiooniga kaasnev põletik, transplantaadi peremehevastane haigus ja/või allotransplantaatidega seotud häired ning muud beeta7-integriini vahendatud bioloogilised/füsioloogilised toimed.

[0004] Ühes eripäras käsitleb leiutis beeta7-vastased terapeutilised aineid, mis on sobivad terapeutiliseks kasutamiseks ja mis on võimelised erineval määral katkestama beeta7-integriini poolt aineatavat rada. Näiteks esitatakse avaldatavas humaniseeritud beeta7-vastase antikeha, kus antikehal kui Fab-fragmendil on inimese beeta7 suhtes samasugune sidumisafiinsus kui hiire Fab-fragmendil, mis sisaldab joonistel 1A ja 1B või joonistel 9A ja 9B kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruva domeeni järjestusi või koosneb nendest või koosneb nendest olulisel määral. Samuti kirjeldatakse siin, kuid see pole patendinõudluse osa, humaniseeritud beeta7-vastast antikeha, kus antikehal kui Fab-fragmendil on inimese beeta7 suhtes sidumisafiinsus, mis on madalam, näiteks vähemalt 3, vähemalt 5, vähemalt 7 või vähemalt 10 korda madalam kui hiire või roti Fab-fragmendi afiinsus, mis sisaldab joonistel 1A ja 1B kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruva domeeni järjestusi või joonistel 9A ja 9B kujutatud varieeruva domeeni järjestusi või koosneb nendest või koosneb nendest olulisel määral. Alternatiivselt on humaniseeritud beeta7-vastasel antikehal või selle beeta7 siduval fragmendil inimese beeta7 suhtes monovalentne afiinsus, mis on praktiliselt samasugune või suurem kui sellise antikeha monovalentne afiinsus inimese beeta7 suhtes, mis sisaldab joonisel 1A (SEQ ID NO: 10) ja/või joonisel 1B (SEQ ID NO: 11) või siis joonisel 9A (SEQ ID NO: 12) ja/või joonisel 9B (SEQ ID NO: 13) kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvaid järjestusi. Antikeha või selle seonduv fragment, millel on inimese beeta7 suhtes suurem afiinsus, omab afiinsust, mis on vähemalt 2 korda, vähemalt 5 korda, vähemalt 10 korda, vähemalt 50 korda, vähemalt 100 korda, vähemalt 500 korda, vähemalt 1000 korda, vähemalt 5000 korda või vähemalt 10000 korda suurem kui selle antikeha afiinsus, mis sisaldab joonisel 1A (SEQ ID NO: 10) ja/või joonisel 1B (SEQ ID NO: 11) või joonisel 9A (SEQ ID NO: 12) ja/või joonisel 9B (SEQ ID NO: 13) kujutatud kerge ahela ja raske ahela järjestusi.

[0005] Järgmises teostuses käsitleb leiutis beeta7-vastase humaniseeritud antikeha, kus antikehal kui Fab-fragmendil on sidumisafiinsus inimese beeta7 suhtes, mis on suurem, näiteks vähemalt 3, vähemalt 5, vähemalt 7, vähemalt 9, vähemalt 10, vähemalt 15, vähemalt 20 või vähemalt 100 korda suurem kui närilise (nagu roti või hiire) Fab-fragmendi oma, mis sisaldab vastavalt joonisel 1A ja joonisel 1B kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruva domeeni järjestusi või koosneb nendest või koosneb nendest olulisel määral. Ühes teostuses on nimetatud närilise Fab-fragmendil sellise Fab-fragmendi sidumisafiinsus, mis sisaldab selle roti-antikeha varieeruva domeeni järjestusi, mida tähistatakse kui FIB504.64 ja mis on toodetud hübriidoomi rakuliinis, mida säilitatakse Ameerika Rakutüüpide Kolleksioonis (American Type Culture Collection) juurdepääsunumbriga ATCC HB-293. Järgmises teostuses on leiutisekohasel humaniseeritud Fab-fragmendil sellise Fab-fragmendi sidumisafiinsus, mis sisaldab sellise antikeha varieeruva domeeni järjestusi, mida toodab ükskõik missugune leiutisekohastest humaniseeritud beeta7-vastastest antikehadest. Nagu tehnika tasemest on hästi teada, saab ligandi sidumisafiinsust oma retseptori suhtes määrata, kasutades ükskõik missugust paljudest erinevatest testidest, ja väljendada erinevate kvantitatiivsete väärtuste terminites. Seega väljendatakse ühes teostuses sidumisafiinsust  $K_d$ -väärtustena ning see peegeldab tõelist sidumisafiinsust (näiteks koos minimaalseks viidud aviidsuseefektidega). Üldiselt ja eelistatult mõõdetakse sidumisafiinsust *in vitro* kas rakuvabas või rakkudega seostud seadistuses. Nagu siin detailsemalt on kirjeldatud, saab sidumisafiinsuse kordsetena väljendatud erinevust kvantitatiivselt määrata Fab-vormis humaniseeritud antikeha sidumisafiinsuse ja referents/võrdlus-Fab-antikeha (näiteks hüpervarieeruva doonorpiirkonna järjestusi sisaldava hiire antikeha) sidumisafiinsuste väärtuste suhte terminites, kus sidumisafiinsuse väärtused määratakse samasugustes testitingimustes. Nii määratakse ühes teostuses sidumisafiinsuse kordsetena väljendatud erinevus Fab-vormis humaniseeritud antikeha ja nimetatud referents/võrdlus-Fab-antikeha  $K_d$  väärtuste suhtena. Sidumisafiinsuse mõõtmisteks võib kasutada ükskõik missugust paljudest tehnika tasemest tuntud testidest, kaasa arvatud siin kirjeldatud testid, kaasa arvatud näiteks Biacore<sup>®</sup> (Biacore International Ab, Uppsala, Rootsi) ja ELISA.

[0006] Siin kirjeldatud, kuid mitte patendinõudluse osaks on antikeha, mis on beeta7-vastane antikeha või selle beeta7 siduv fragment, mis sisaldab

(a) vähemalt ühte, kahte, kolme, nelja või viit hüpervarieeruva piirkonna (*hypervariable region*, HVR) järjestust, mis valitakse rühmast, millesse kuuluvad:

- (i) HVR-L1, mis sisaldab järjestust A1-A11, kus A1-A11 on RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1)
- (ii) HVR-L2, mis sisaldab järjestust B1-B8, kus B1-B8 on KYASQSIG (SEQ ID NO: 2)
- (iii) HVR-L3, mis sisaldab järjestust C1-C9, kus C1-C9 on QQGNSLPNT (SEQ ID NO: 3)
- (iv) HVR-H1, mis sisaldab järjestust D1-D10, kus D1-D10 on GFFTTNNYWG (SEQ ID NO: 4)
- (v) HVR-H2, mis sisaldab järjestust E1-E17, kus E1-E17 on GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5), ja
- (vi) HVR-H3, mis sisaldab järjestust F2-F11, kus F2-F11 on MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6).

[0007] Samuti kirjeldatakse siin polüpeptiidi või antikeha, mis sisaldab vähemalt ühte HVR varianti, kus HVR variandi järjestus sisaldab vähemalt ühe jäägi modifikatsiooni vähemalt ühes järjestustega SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 või 9 kujutatud järjestuses. Samuti kirjeldatakse siin beeta7-vastast antikeha või selle beeta7 siduvat fragmenti, mis sisaldab ühte, kahte, kolme, nelja, viit või kuut hüpervarieeruvat piirkonda (HVR), mis valitakse rühmast, millesse kuuluvad HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus:

- (i) HVR-L1 sisaldab aminohapete järjestust RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1), RASESVDLLH (SEQ ID NO: 7), RASESVDLLH (SEQ ID NO: 8) või RASESVDLLH (SEQ ID NO: 9),
- (ii) HVR-L2 sisaldab aminohapete järjestust KYASQSIG (SEQ ID NO: 2), RYASQSIG (SEQ ID NO: 67) või XYASQSIG (SEQ ID NO: 68, kus X tähendab ükskõik missugust aminohapet),
- (iii) HVR-L3 sisaldab QQGNSLPNT (SEQ ID NO: 3),
- (iv) HVR-H1 sisaldab aminohapete järjestust GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4),
- (v) HVR-H2 sisaldab aminohapete järjestust GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5), ja
- (vi) HVR-H3 sisaldab aminohapete järjestust MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6) või RTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 66) suhteliste asendite F2-F11 jaoks või sisaldab aminohapete järjestust F1-F11, kus F1-F11 on AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 63), ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 64) või AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 65).

[0008] Samuti kirjeldatakse siin beeta7-vastast antikeha või selle beeta7 siduvat fragmenti, mis sisaldab ühte, kahte, kolme, nelja, viit või kuut hüpervarieeruvat piirkonda (HVR), mis valitakse rühmast, millesse kuuluvad HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus:

- (i) HVR-L1 sisaldab aminohapete järjestust A1-A11, kus A1-A11 on RASESVDTYLH (SEQ ID NO: 1), RASESVDSLH (SEQ ID NO: 7), RASESVDTLLH (SEQ ID NO: 8) või RASESVDDLH (SEQ ID NO: 9) või järjestuste SEQ ID NO: 1, 7, 8 või 9 variant, kus aminohape A2 valitakse rühmast, millesse kuuluvad A, G, S, T ja V ja/või aminohape A3 valitakse rühmast, millesse kuuluvad S, G, I, K, N, P, Q, R ja T, ja/või A4 valitakse rühmast, millesse kuuluvad E, V, Q, A, D, G, H, I, K, L, N ja R, ja/või aminohape A5 valitakse rühmast, millesse kuuluvad S, Y, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T ja V, ja/või aminohape A6 valitakse rühmast, millesse kuuluvad V, R, I, A, G, K, L, M ja Q, ja/või aminohape A7 valitakse rühmast, millesse kuuluvad D, V, S, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S ja T, ja/või aminohape A8 valitakse rühmast, millesse kuuluvad D, G, N, E, T, P ja S, ja/või aminohape A9 valitakse rühmast, millesse kuuluvad L, Y, I ja M, ja/või aminohape A10 valitakse rühmast, millesse kuuluvad L, A, I, M ja V, ja/või aminohape A11 valitakse rühmast, millesse kuuluvad H, Y, F ja S,
- (ii) HVR-L2 sisaldab aminohapete järjestust B1-B8, kus B1-B8 on KYASQSIG (SEQ ID NO: 2), RYASQSIG (SEQ ID NO: 67) või XYASQSIG (SEQ ID NO: 68, kus X tähendab ükskõik missugust aminohapet), või järjestuse SEQ ID NO: 2, 67 või 68 variant, kus aminohape B1 valitakse rühmast, millesse kuuluvad K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y ja X (kus X tähendab ükskõik missugust aminohapet), ja/või aminohape B4 valitakse rühmast, millesse kuuluvad S ja D, ja/või aminohape B5 valitakse rühmast, millesse kuuluvad Q ja S, ja/või aminohape B6 valitakse rühmast, millesse kuuluvad S, D, L ja R, ja/või aminohape B7 valitakse rühmast, millesse kuuluvad I, V, E ja K,
- (iii) HVR-L3 sisaldab aminohapete järjestust C1-C9, kus C1-C9 on QQGNLSPNT (SEQ ID NO: 3) või järjestuse SEQ ID NO: 3 variant, kus aminohape C8 valitakse rühmast, millesse kuuluvad N, V, W, Y, R, S, T, A, F, H, I, L, M ja Y,
- (iv) HVR-H1 sisaldab aminohapete järjestust D1-D10, kus D1-D10 on GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4),
- (v) HVR-H2 sisaldab aminohapete järjestust E1-E17, kus E1-E17 on GYISYSGST-SYNPSLKS (SEQ ID NO: 5), või järjestuse SEQ ID NO: 5 variant, kus aminohape E2

valitakse rühmast, millesse kuuluvad Y, F, V ja D, ja/või aminohape E6 valitakse rühmast, millesse kuuluvad S ja G, ja/või aminohape E10 valitakse rühmast, millesse kuuluvad S ja Y, ja/või aminohape E12 valitakse rühmast, millesse kuuluvad N, T, A ja D, ja/või aminohape 13 valitakse rühmast, millesse kuuluvad P, H, D ja A, ja/või aminohape E15 valitakse rühmast, millesse kuuluvad L ja V, ja/või aminohape E17 valitakse rühmast, millesse kuuluvad S ja G, ja

(vi) HVR-H3 sisaldab aminohapete järjestust F2-F11, kus F2 -F11 on MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6), või RTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 66), või sisaldab aminohapete järjestust F1-F11, kus F1-F11 on AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 63), ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 64) või AQTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 65) või järjestuse SEQ ID NO: 6, 63, 64, 65 või 66 variant, kus aminohape F2 on R, M, A, E, G, Q, S, ja/või aminohape F11 valitakse rühmast, millesse kuuluvad F ja Y.

[0009] Leiutisekohastes mistahes antikehades on vajadusel raske ahela raamistiku asendis 71 (Kabat'i nummerdamissüsteemi järgi) olev aminohape valitav rühmast, millesse kuuluvad R, A ja T, ja/või raske ahela raamistiku asendis 73 (Kabat'i nummerdamissüsteemi järgi) olev aminohape valitakse rühmast, millesse kuuluvad N ja T, ning raske ahela raamistiku asendis 78 (Kabat'i nummerdamissüsteemi järgi) olev aminohape valitakse rühmast, millesse kuuluvad F, A ja L.

[0010] Teatud siin kirjeldatud antikehades sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1 järjestust SEQ ID NO: 1. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L2 järjestust SEQ ID NO: 2. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L3 järjestust SEQ ID NO: 3. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H1 järjestust SEQ ID NO: 4. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H2 järjestust SEQ ID NO: 5. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H3 järjestust SEQ ID NO: 6 või 66 suhteliste asendite F2-F11 jaoks või järjestust SEQ ID NO: 63, 64 või 65 suhteliste asendite F1-F11 jaoks. Ühes teostuses sisaldab HVR-L1 järjestust RASESVDSLH (SEQ ID NO: 7). Ühes teostuses sisaldab HVR-L1 järjestust RASESVDTLLH (SEQ ID NO: 8). Ühes teostuses sisaldab HVR-L1 järjestust RASESVDDLH (SEQ ID NO: 9). Neid järjestusi (siin kirjeldatud kombinatsioonides) sisaldavad antikehad on humaniseeritud või inimese antikehad.

[0011] Ühes eripäras esitab leiutis antikeha, mis sisaldab ühte, kahte, kolme, nelja, viit või kuut HVR-i, kus iga HVR sisaldab järjestust või koosneb sellest või koosneb olulisel määral sellest, mis valitakse rühmast, millesse kuuluvad SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ja 9, kus



järjestused SEQ ID NO: 7, 8 või 9 vastavad HVR-L1-le, SEQ ID NO: 2 vastab HVR-L2-le, SEQ ID NO: 3 vastab HVR-L3-le, SEQ ID NO: 4 vastab HVR-H1-le, SEQ ID NO: 5 vastab HVR-H2-le ja SEQ ID NO: 6 vastab HVR-H3-le. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures need sisaldavad vastavas järjekorras järjestusi SEQ ID NO: 7, 2, 3, 4, 5 ja 6. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures need sisaldavad vastavas järjekorras järjestusi SEQ ID NO: 8, 2, 3, 4, 5 ja 6. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures need sisaldavad vastavas järjekorras järjestusi SEQ ID NO: 9, 2, 3, 4, 5 ja 6. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures need sisaldavad vastavas järjekorras järjestusi SEQ ID NO: 9, 2, 3, 4, 5 ja 66 või SEQ ID NO: 9, 2, 3, 4, 5 ja 63 või SEQ ID NO: 9, 2, 3, 4, 5 ja 64. [0012] Siin kirjeldatakse antikehi, milles esineb HVR ja/või raamistiku modifikatsioon, kaasa arvatud sellised antikehad, kus HVR-L1-s esinev A8 variant on S, D või T ja A9 on L.

[0013] Teatud leiutisekohastes antikehades on vähemalt osa raamistikujärjestusest inimese raamistiku konsensusjärjestus.

[0014] Siin kirjeldatakse antikeha, mis ei ole leiutise patendiõudluse osa, kus HVR-L1 variant sisaldab 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10) asendust ükskõik missuguses järgnevate asendite kombinatsioonis: A2 (G, S, T või V), A3 (G, I, K, N, P, Q, R või T), A4 (A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R või V), A5 (A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V või Y), A6 (A, G, I, K, L, M, Q või R), A7 (A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T või V), A8 (S, D, E, G, P või N) ja A9 (L, I või M), A10 (A, I, M või V) ja A11 (F, S, või Y), või

HVR-L2 variant sisaldab 1-4 (1, 2, 3 või 4) asendust ükskõik missuguses järgnevate asendite kombinatsioonis: B1 (N), B5 (S), B6 (R või L) ja B7 (T, E, K, või V), või

HVR-L3 variant sisaldab vähemalt ühte asendust asendis C8 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T või V), või

seejuures sisaldab HVR-H2 variant 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 või 7) asendust ükskõik missuguses järgnevate asendite kombinatsioonis: E2 (V, D või F), E6 (G), E10 (Y), E12 (A, D või T), E13 (D, A või H), E15 (V), E17 (G), või

HVR-H3 variant sisaldab 1 või 2 asendust ükskõik missuguses järgnevate asendite kombinatsioonis F2 (A, E, G, Q, R või S) ja F11 (Y) või

leiutis esitab antikeha, mis sisaldab HVR-L1, mille järjestus on SEQ ID NO: 7,

HVR-L1, mille järjestus on SEQ ID NO: 8, või

HVR-L1, mille järjestus on SEQ ID NO: 9.

[0015] Teatud leiutisekohased antikehad sisaldavad raske ahela inimese alarühma III raske ahela raamistiku konsensusjärjestust, mis sisaldab asendusi asendites 71, 73 ja/või 78.

[0016] Asendus võib olla R71A, N73T ja/või N78A.

[0017] Teatud leiutisekohased antikehad sisaldavad HVR-L3, mille järjestus on SEQ ID NO: 3.

[0018] Mõnedes leiutisekohastes antikehades on A8 HVR-L1-s S.

[0019] Teistes on A8 HVR-L1-s D.

[0020] Mõnedes leiutisekohastes antikehades on A9 HVR-L1-s L.

[0021] Siin kirjeldatakse antikehi, kus järjestuste E1-E17 ja F1-F11 vaheline raamistikujärjestus on HFR3-1-HFR-3-31 ja kus HFR3-6 on A või R, HFR3-8 on N või T ja HFR3-13 on L või A või F.

[0022] Teatud leiutisekohastel antikehadel on antikeha monovalentne afiinsus inimese beeta7 vastu, mis on praktiliselt sama kui sellise roti-antikeha monovalentne afiinsus, mis sisaldab joonisel 9 kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvat järjestust.

[0023] Teatud leiutisekohastel antikehadel on antikeha monovalentne afiinsus inimese beeta7 vastu, mis on vähemalt 3 korda suurem kui sellise roti-antikeha monovalentne afiinsus, mis sisaldab joonisel 9 kujutatud kerge ahela ja raske ahela varieeruvat järjestust.

[0024] Roti-antikeha võib toota hübridoomi rakuliini abil, mis on deponeeritud Ameerika Rakutüüpide Kolleksioonis ATCC juurdepääsunumbriga HB-293.

[0025] Sidumisafiinsust võib väljendada K<sub>d</sub>-väärtusena.

[0026] Sidumisafiinsust võib mõõta Biacore<sup>TM</sup> või radioimmunotesti abil.

[0027] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada inimese  $\kappa$ -alarühma 1 kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust.

[0028] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada raske ahela inimese alarühma III raske ahela raamistiku konsensusjärjestust.

[0029] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada raamistikujärjestust, mis sisaldab asendust asendis 71, 73 ja/või 78.

[0030] Asendus võib olla R71A, N73T ja/või N78A või siis on asendis 71 asendatud aminohape kas R või A ja/või aminohappe asendus asendis 78 on N või T ja/või aminohappe asendus asendis 78 on L või A või F.

[0031] Asendus võib olla L78F või A78F või A78L või L78A.

Avaldatavas esitatakse ka inimese beeta7-integriini subühiku ja integriini teise subühiku ja/või ligandi vahelise interaktsiooni inhibeerimise meetod nimetatud antikeha viimisel kokkupuutesse integriini teise subühiku ja/või ligandiga.

[0032] Integriini teine subühik võib olla alfa4-integriini subühik ja ligand võib olla MAdCAM, VCAM või fibronektiin.

[0033] Alfa4-integriin võib olla inimese oma.

[0034] Ligand võib olla inimese oma.

[0035] Integriini teine subühik võib olla alfaE-integriini subühik ja ligand võib olla E-kadheriin.

[0036] AlfaE-integriini subühik võib olla inimese oma.

[0037] Ligand võib olla inimese oma.

[0038] Teatud siin esitatud antikehad, mis on mõeldud inhibeerimisel kasutamiseks, vähendavad või leevendavad sümptomeid või häireid, mis valitakse põletiku, astma, põletikulise soolehaiguse, Crohni tõve, haavandilise koliidi, diabeedi, organi transplantatsioonist põhjustatud põletiku, transplantaadi peremehevastase haiguse ja allotransplantaadi häiretega seotud põletiku hulgast.

[0039] HVR-L1 on järjestusega SEQ ID NO: 7, 8 või 9. Siin kirjeldatakse ka HVR-L1 varianti järjestusega SEQ ID NO: 1, 7, 8 või 9, mis sisaldab 1-10 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 või 10) asendust suhtelistes asendites A1-A11 ükskõik missuguste järgnevate asendite kombinatsioonides: A2 (A, G, S, T või V), A3 (S, G, I, K, N, P, Q, R või T), A4 (E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R või V), A5 (S, A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V või Y), A6 (V, A, G, I, K, L, M, Q või R), A7 (D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T või V), A8 (T, S, D, E, G, P või N) ja A9 (Y, L, I või M), A10 (L, A, I, M või V) ja A11 (H, F, S või Y).

[0040] HVR-L2 võib olla järjestusega SEQ ID NO: 2, 67 või 68 või HVR-L2 variant järjestusega SEQ ID NO: 2, 67 või 68, kus HVR-L2 variant sisaldab 1-4 (1, 2, 3, 4 või 5) asendust suhtelistes asendites B1-B8 ükskõik missuguste järgnevate asendite kombinatsioonides: B1 (K, R, N, V, A, F, Q, H, P, I, L, Y või X (kus X tähendab ükskõik missugust aminohapet), B4 (S), B5 (Q või S), B6 (S, R või L) ja B7 (I, T, E, K või V).

[0041] HVR-L3 on järjestusega SEQ ID NO: 3 või HVR-L3 variant järjestusega SEQ ID NO: 3 võib sisaldada vähemalt ühte asendust suhtelistes asendites C1-C8, nagu asendis C8 (W, Y, R, S, A, F, H, I, L, M, N, T või V). HVR-H1 võib olla järjestusega SEQ ID NO: 4.

Ühes teostuses on HVR-H2 järjestus SEQ ID NO: 5. Samuti kirjeldatakse siin HVR-H2 varianti järjestusega SEQ ID NO: 5, kus HVR-H2 variant sisaldab 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 või 7) asendust suhtelistes asendites E1-E17 ükskõik missuguste järgnevate asendite kombinatsioonides: E2 (Y, V, D või F), E6 (S või G), E10 (S või Y), E12 (N, A, D või T), E13 (P, D, A või H), E15 (L või V), E17 (S või G). Ühes teostuses on HVR-H3 järjestusega SEQ ID NO: 6, 63, 64 või 66. HVR-H3 variant järjestusega SEQ ID NO: 6, 63, 64, 65 või 66 võib sisaldada suhtelistes asendites F1-F11 järjestust SEQ ID NO: 63, 64 või 65 või suhtelistes asendites F2-F11 järjestust SEQ ID NO: 6 või 66, 1 või 2 asendust ükskõik missuguste järgnevate asendite kombinatsioonides: F2 (M, A, E, G, Q, R või S) ja F11 (F või Y). Igale asendile järgnev(ad) sulgudes täht (tähed) näitab (näitavad) illustreerivat aminohappe asendust konsensusaminohappe või teise aminohappega, ning nagu eriala asjatundjale on ilmne, võib teiste aminohapete sobivust siin kirjeldatud kontekstis asendavate aminohapetena kasutamiseks tavapäraselt hinnata tehnika tasemest tuntud ja/või siin kirjeldatud meetodite kasutamisel.

Siin kirjeldatakse ka HVR-L1, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 1. Variandis HVR-L1 olev A8 võib olla D või S. A9 variandis HVR-L1 võib olla L. Mõnel juhul on A8 variandis HVR-L1 D ja A9 variandis HVR-L1 on L. Teistel juhtudel on A8 variandis HVR-L1 S ja A9 variandis HVR-L1 on L. Antikeha võib sisaldada neid variante HVR-L1-s ning HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3 sisaldavad vastavaid järjestusi SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 ja 6 või koosnevad nendest või koosnevad nendest olulisel määral.

[0042] HVR-H3 võib sisaldada või koosneda või koosneda olulisel määral järjestustest SEQ ID NO: 6 või 66 (suhteliste asendite F2-F11 jaoks) või järjestustest SEQ ID NO: 63 või 64 või 65 (suhteliste asendite F1-F11 jaoks). Mõnedes siin kirjeldatud antikehades on A8 variandis HVR-L1 I ja A9 variandis HVR-L1 on L, kusjuures see variant sisaldab lisaks ka HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 ja 6.

[0043] Teistes antikehades on A8, A9 ja A10 variandis HVR-L1 vastavalt D, L ja V, kusjuures see variant sisaldab lisaks ka HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 ja 6.

[0044] Teistes antikehades on A8 ja A9 variandis HVR-L1 vastavalt N ja L, kusjuures see variant sisaldab lisaks ka HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga

HVR sisaldab või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 ja 6.

[0045] Teistes antikehades on A8 ja A9 variandis HVR-L1 vastavalt P ja L ning variandis HVR-L2 on B6 ja B7 vastavalt R ja T, kusjuures see variant sisaldab lisaks ka HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 3, 4, 5 ja 6.

[0046] Teistes A2, A4, A8, A9 ja A10 variantides HVR-L1 võivad olla vastavalt S, D, S, L ja V, kusjuures see variant sisaldab lisaks ka HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 ja 6.

[0047] Teistes teostustes on A5 ja A9 variandis HVR-L1 vastavalt D ja T, kusjuures see variant sisaldab lisaks ka HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 ja 6.

[0048] Teistes teostustes on A5 ja A9 variandis HVR-L1 vastavalt N ja L, kusjuures see variant sisaldab lisaks ka HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 ja 6.

[0049] Teistes teostustes on A9 variandis HVR-L1 L, kusjuures see variant sisaldab lisaks HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 ja 6.

[0050] Leiutisekohased teatud antikehad sisaldavad HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 9, 2, 3, 4, 5 ja 64. Teises teostuses sisaldab iga HVR või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 9, 67, 3, 4, 5 ja 64. Järgmises teostuses sisaldab iga HVR või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 9, 68, 3, 4, 5 ja 64. Järgmises teostuses sisaldab iga HVR või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 9, 2 või 67 või 68, 3, 4, 5 ja 66.

[0051] Siin kirjeldatakse ka HVR-L1 antikehade variante, mis sisaldavad lisaks HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 ja 6. Kui antikehavariant sisaldab HVR-L1 A8(P) ja A9(L) ning HVR-

L2 B6( R) ja B7(T), sisaldab nimetatud HVR-L1, HVR-L2 variant lisaks HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab või koosneb või koosneb olulisel määral vastavalt järjestustest SEQ ID NO: 3, 4, 5 ja 6.

[0052] Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese alarühma III raske ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 on T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostuses sisaldavad need antikehad täiendavalt inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust.

[0053] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L3, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 3. Siin kirjeldatakse HVR-L3 varianti, kus C8 on L. Lisaks võib see antikehavariant sisaldada ka HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab vastavalt järjestust SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 ja 6. Samuti kirjeldatakse siin HVR-L3 varianti, kus C8 on W. Lisaks võib see antikehavariant sisaldada ka HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab vastavalt järjestust SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 ja 6. HVR-L1 sisaldab järjestusi SEQ ID NO: 7, 8 ja 9. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad lisaks ka inimese alarühma III raske ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 on T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostuses sisaldavad need antikehad lisaks inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust.

[0054] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H3, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 6. Samuti kirjeldatakse siin HVR-H3 varianti, kus F1 on Q.

[0055] Antikehavariant võib lisaks sisaldada ka HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 ja HVR-H2, kusjuures iga HVR sisaldab vastavalt järjestust SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 ja 5. Samuti kirjeldatakse siin HVR-H3 varianti, kus F1 on R. See antikehavariant võib lisaks sisaldada ka HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 ja HVR-H2, kusjuures iga HVR sisaldab vastavalt järjestust SEQ ID NO: 1, 2, 4 ja 5. HVR-L1 sisaldab järjestust SEQ ID NO: 7, 8 või 9. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad lisaks inimese alarühma III raske ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 on T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostuses sisaldavad need antikehad lisaks inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust.

[0056] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L2, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 2.

[0057] Samuti kirjeldatakse siin HVR-L2 varianti, kus B1 on N, B5 on S, B6 on L, B7 on V ja/või B7 on E või K.

[0058] Antikehavariant võib lisaks sisaldada ka HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab vastavalt järjestust SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5 ja 6. HVR-L1 sisaldab järjestust SEQ ID NO: 7, 8 või 9. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad lisaks inimese alarühma III raske ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 on T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostuses sisaldavad need antikehad lisaks inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust.

[0059] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-L3, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 3, HVR-L3 varianti, kus C8 on W, Y, R või S, HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab vastavalt järjestust SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 ja 6. HVR-L1 sisaldab järjestust SEQ ID NO: 7, 8 või 9. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad lisaks inimese alarühma III raske ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 on T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostuses sisaldavad need antikehad lisaks inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust.

[0060] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H2, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 5.

[0061] Siin kirjeldatakse HVR-H2 varianti, kus E2 on F või kus E2 on V või D. Samuti kirjeldatakse siin HVR-H2 varianti, kus E6 on G, E10 on Y, E12 on A, D või T, E13 on D, A või N, E15 on V ja/või E17 on G.

[0062] Antikehavariant võib lisaks sisaldada ka HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab vastavalt järjestust SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 ja 6. HVR-L1 sisaldab järjestust SEQ ID NO: 7, 8 või 9. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad lisaks inimese alarühma III raske ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 on T ja/või asendis 78 on

A. Ühes nende antikehade teostuses sisaldavad need antikehad lisaks inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust.

[0063] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha HVR-H3, mis sisaldab järjestust SEQ ID NO: 6. Siin kirjeldatakse HVR-H3 varianti, kus F11 on Y. Antikehavariant võib lisaks sisaldada HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 ja HVR-H3, kusjuures iga HVR sisaldab vastavalt järjestust SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 ja 6. HVR-L1 sisaldab järjestust SEQ ID NO: 7, 8 või 9. Mõnedes teostustes sisaldavad need antikehad lisaks inimese alarühma III raske ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 on T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostuses sisaldavad need antikehad lisaks inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust.

[0064] Mõnedes nende antikehade teostustes sisaldavad need antikehad lisaks inimese alarühma III raske ahela raamistiku konsensusjärjestust. Nende antikehade ühes teostuses sisaldab raamistiku konsensusjärjestus asendust asendis 71, 73 ja/või 78. Mõnedes nende antikehade teostustes on asendis 71 A, asendis 73 on T ja/või asendis 78 on A. Ühes nende antikehade teostuses sisaldavad need antikehad lisaks inimese κI kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust.

[0065] Peremees-subjektis kasutamiseks mõeldud terapeutiline aine kutsub nimetatud subjekti eelistatult esile nõrga immuunvastuse või ei kutsu seda üldse esile. Ühes teostuses esitab leiutis sellise aine. Näiteks esitab leiutis ühes teostuses humaniseeritud antikeha, mis kutsub peremees-subjektis esile ja/või kutsub oodatavalt esile inimese närilisevastase antikehavastuse (näiteks hiirevastase või rotivastase vastuse) või inimese inimesevastase vastuse oluliselt madalamal tasemel võrreldes antikehaga, mis sisaldab järjestusi SEQ ID NO: 10 ja/või 11 (joonised 1A ja 1B) või järjestusi SEQ ID NO: 12 ja/või 13 (joonised 9A ja 9B, mis kujutavad roti hiirevastase Fib504 aminohapete järjestusi). Teises näites esitab leiutis humaniseeritud antikeha, mis ei kutsu esile ja/või ei kutsu oodatavalt esile inimese närilisevastast (näiteks inimese hiirevastast (*human anti-mouse*, HAMA) antikehavastust või inimese inimesevastast (*human anti-human*, HAHA) antikehavastust.

[0066] Leiutisekohane humaniseeritud antikeha võib sisaldada oma raske ja/või kerge ahela varieeruvast domeenis ühte või mitut inimese ja/või inimese konsensusliku mittevarieeruva piirkonna (näiteks raamistikupiirkonna) järjestust. Mõnedes teostustes esineb inimese ja/või inimese konsensusliku mittevarieeruva piirkonna järjestustes üks või mitu lisamodifikat-



siooni. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohase antikeha raske ahela varieeruv domeen inimese raamistiku konsensusjärjestust, mis ühes teostuses on alarühma III raamistiku konsensusjärjestus. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikehavariant alarühma III raamistiku konsensusjärjestust, mis on vähemalt ühes aminohappe asendis modifitseeritud. Näiteks võib variandi alarühma III raamistiku konsensusjärjestus sisaldada ühte või mitut asendust asendites 71, 73, 78 ja/või 94. Ühes teostuses on nimetatud asendused R71A, N73T, L78A ja/või R94M ükskõik missuguses nende kombinatsioonis.

[0067] Nagu tehnika tasemest on teada ja nagu siin edaspidi on detailsemalt kirjeldatud, võib aminohappe asend/piir, mis täpselt kirjeldab antikeha hüpervarieeruvat piirkonda, varieeruda sõltuvalt kontekstist ja tehnika tasemest teadaolevatest erinevatest definitsioonidest (nagu allpool on kirjeldatud). Mõnesid asendeid varieeravas domeenis võib vaadelda hübriidsete hüpervarieeruvate asenditena selle poolest, et neid asendeid saab ühtede kriteeriumikomplektide järgi pidada hüpervarieeruva piirkonna sees olevateks ja teistsuguste kriteeriumikomplektide järgi hüpervarieeruvast piirkonnast väljaspool olevateks. Ühe või mitu sellist asendit võib leida ka laiendatud hüpervarieeruvates piirkondades (nagu edaspidi allpool on defineeritud). Leiutis esitab antikehad, mis sisaldavad modifikatsioone nendes hübriidsetes hüpervarieeruvates asendites. Ühes teostuses hõlmavad need hübriidsed hüpervarieeruvad asendid ühte või mitut raske ahela varieeruva domeeni asenditest 26-30, 33-35B, 47-49, 49, 57-65, 93, 94 ja 102. Ühes teostuses hõlmavad need hübriidsed hüpervarieeruvad asendid ühte või mitut kerge ahela varieeruva domeeni asenditest 24-29, 35-36, 46-49, 49, 56 ja 97. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohase antikeha inimese alarühma raamistiku konsensusjärjestus varianti, mis on modifitseeritud ühes või mitmes hübriidses hüpervarieeravas asendis. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha raske ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab inimese alarühma III raamistiku konsensusjärjestuse varianti, mis on modifitseeritud ühes või mitmes asenditest 28-35, 49, 50, 52a, 53, 54, 58-61, 63, 65, 94 ja 102. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendusi T28F, F29I, S30T, S31N, Y32N, A33Y, M34W ja S35G. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust S49G. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust V50F või V50D või V50Y. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust G53Y. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust G53Y. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust G54S. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust Y58S. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust A60N või A60D või A60T. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust D61P või D61A või D61H. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust V63L. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust G65S. Ühes

teostuses sisaldab antikeha asendust R94M. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust R94A või R94E või G94Q või R94S. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust G95T. Ühes teostuses sisaldab antikeha ühte või mitut asendust asendites 28-35, 49, 50, 52a, 53, 54, 58-61, 63, 65, 94 ja 102 ning lisaks veel ühte või mitut asendust asendites R71A või N73T või L78A või L78F. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust Y102F. Jooniselt 1B on näha, et need asendused paiknevad raske ahela HVR-H1, HVR-H2 ja/või HVR-H3 piirkonnas.

[0068] Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab inimese alarühma I raamistiku konsensusjärjestuse varianti, mis on modifitseeritud ühes või mitmes asenditest 27, 29-31, 33, 34, 49, 50, 53-55, 91 ja 96. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust Q27E. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust I29V. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust S30D. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust N31T või N31S või N31D. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust Y32L. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust A34H. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust Y49K. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust A50Y. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust S53Q. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust L54S. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust E55I või E55V. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust Y91G. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust W96N või W96L. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust A25S. Ühes teostuses sisaldab antikeha A25 asendust aminohappega G, S, T või V. Ühes teostuses sisaldab antikeha modifikatsiooni, mis valitakse ühe või mitme järgmises rühmas sisalduvate asenduste hulgast. Näiteks ühes teostuses sisaldab antikeha S26 asendust aminohappega G, I, K, N, P, Q või T. Ühes teostuses sisaldab antikeha Q27 asendust aminohappega E, A, D, G, H, I, K, L, N, Q, R või V. Ühes teostuses sisaldab antikeha S28 asendust aminohappega A, D, G, H, I, K, N, P, R, T, V või Y. Ühes teostuses sisaldab antikeha I29 asendust aminohappega V, A, G, K, L, M, Q või R. Ühes teostuses sisaldab antikeha S30 asendust aminohappega D, A, E, G, H, I, K, L, N, P, S, T või V. Ühes teostuses sisaldab antikeha N31 asendust aminohappega D, T, E või G. Ühes teostuses sisaldab antikeha Y32 asendust aminohappega L, I või M. Ühes teostuses sisaldab antikeha L33 asendust aminohappega A, I, M või V. Ühes teostuses sisaldab antikeha A34 asendust aminohappega H, F, Y või S. Ühes teostuses sisaldab antikeha Y49 asendust aminohappega K või N. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust A50Y. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust S53Q. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust L54S. Ühes teostuses sisaldab antikeha E55 asendust E55 aminohappega V, I või K. Ühes teostuses sisaldab antikeha asendust Y91G. I Ühes teostuses sisaldab antikeha W96 asendust amino-

happega N, L, W, Y, R, S, A, F, H, I, M, N, R, S, T, V või Y. Jooniselt 1A võib näha, et need asendid paiknevad kerge ahela HVR-L1, HVR-L2 ja/või HVR-L3 piirkondades.

[0069] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada ükskõik missugust sobivat inimese kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust eeldusel, et antikehal on soovitud bioloogilised omadused (näiteks soovitav sidumisafiinsus). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha vähemalt ühte osa (või kogu) inimese κ kerge ahela raamistikujärjestust. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha vähemalt ühte osa (või kogu) inimese κ alarühma I raamistiku konsensusjärjestust.

[0070] Ühes teostuses sisaldab leiutis raske ja/või kerge ahela varieeruvat domeeni, mis sisaldab järjestusega SEQ ID NO: 34-41 ja joonistel 1, 7 ja 8 kujutatud raamistikujärjestusi eeldusel, et kerge ahela asend 49 ja raske ahela asend 94 kuuluvad laiendatud HVR-de koosseisu, ja eeldusel, et nimetatud asendis 49 on K ja nimetatud asendis 94 on eelistatult, aga mitte tingimata, M ja võib olla ka R.

[0071] Leiutisekohaseid antagonistide võib kasutada ühe või mitme beeta7-ga seonduva efekti moduleerimiseks, kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata, seondumiseks integriini alfaE-subühikuga, seondumiseks integriini alfaE-subühikuga, alfa4beeta7-integriini seondumiseks MAdCAM, VCAM-1 või fibronektiiniga ning alfaEbeeta7-integriini seondumiseks E-kadheriiniga. Neid efekte saab moduleerida ükskõik missuguse bioloogiliselt relevantse mehhanismi abil, kaasa arvatud ligandi ja beeta7-subühiku või alfa4beeta7 seondumise katkestamise või alfaEbeeta dimeerse integriini sideme katkestamise ja/või integriini alfa- ja beeta-subühikute seondumise katkestamisega, nii et dimeerse integriini moodustumine on inhibeeritud, Seega esitab leiutis ühes teostuses beeta7 antagonist-antikeha, mis inhibeerib alfa4 seondumist beeta7-ga. Ühes teostuses katkestab leiutisekohane beeta7-vastane antagonist-antikeha alfa4beeta7 seondumise MAdCAM-ga. Ühes teostuses katkestab leiutisekohane beeta7-vastane antagonist-antikeha alfa4beeta7 seondumise VCAM-1-ga. Ühes teostuses katkestab leiutisekohane beeta7-vastane antagonist-antikeha alfa4beeta7 seondumise fibronektiiniga. Ühes teostuses katkestab leiutisekohane beeta7-vastane antagonist-antikeha beeta7 seondumise alfaE-ga. Ühes teostuses katkestab leiutisekohane beeta7-vastane antagonist-antikeha alfaEbeeta7 integriini seondumise E-kadheriiniga. See sekkumine võib olla otsene või kaudne. Näiteks võib beeta7 antagonist-antikeha seonduda beeta7-ga alfa4beeta7 või alfaEbeeta7 dimeriseerumispiirkonnas oleva järjestuse sees ja inhibeerida sellega integriini subühikute interaktsiooni ja integriini dimeeri moodustumist. Järgmises näites võib beeta7 antagonist-

antikeha seonduda beeta7 subühikus oleva ligandi siduva domeeni järjestusega ja inhibeerida sellega nimetatud seotud piirkonna interaktsiooni oma sidumispartneriga (nagu finbronektiin, VCAM või MAdCAM alfa4beeta7 integriini puhul või E-kadheriin alfaEbeeta7 integriini puhul). Järgmises näites võib beeta7-vastane antagonist-antikeha seonduda järjestusega, mis ei paikne integriini subühikute dimeriseerumispiirkonnas ega ligandi siduvas domeenis, aga kus nimetatud beeta7 antagonist-antikeha seondumise tulemuseks on beeta7 domeeni sidumispartneritega (nagu integriini alfa4- või alfaE-subühik ja/või ligand, nagu fibronektiin, VCAM, MAdCAM või E-kadheriin) interakteerumise võime katkestamine. Ühes teostuses seondub leiutisekohane antagonist-antikeha beeta7-ga (näiteks rakuvälises domeenis) nii, et beeta7 dimeriseerumine alfa4- või alfaE-subühikuga on rikutud. Ühes teostuses seondub leiutisekohane antagonist-antikeha beeta7-ga nii, et beeta7- ja/või alfa4beeta7- ja/või alfaEbeeta7-integriini võime seonduda oma ligandi või ligandidega on rikutud. Näiteks esitab leiutis ühes teostuses antagonist-antikeha, mis seondumisel beeta7 molekuliga inhibeerib nimetatud molekuli dimeriseerumise. Ühes teostuses seondub leiutisekohane beeta7 antagonist-antikeha spetsiifiliselt beeta7 ligandi siduvas domeenis oleva järjestusega. Ühes teostuses seondub leiutisekohane beeta7 antagonist-antikeha spetsiifiliselt beeta7 ligandi siduvas domeenis järjestusega nii, et ligandi (s.t fibronektiini, VCAM ja/või MAdCAM) seondumine alfa4beeta7-integriiniga on katkestatud. Ühes teostuses seondub leiutisekohane beeta7 antagonist-antikeha spetsiifiliselt beeta7 ligandi siduvas domeenis järjestusega nii, et ligandi (s.t E-kadheriini) seondumine alfaEbeeta7-integriiniga on katkestatud.

[0072] Ühes teostuses katkestab leiutisekohane antagonist-antikeha beeta7 dimeriseerumise, mis seisneb heterodimeriseerumises (s.t beeta7 dimeriseerumine integriini alfa4- või alfaE-subühiku molekuliga).

[0073] Ühes teostuses seondub leiutisekohane antagonist-antikeha integriini beeta7-subühiku epitoobiga, mis on kaardistatud aminohapetele 176-237. Teises teostuses seondub leiutisekohane antagonist-antikeha samale beeta7-integriini epitoobile, mis on praktiliselt sama kui Fib504.64 (ATCC HB-293) epitop. Epitoobiga seondumise määramine toimub standardtehnikate abil, kaasa arvatud, kuid sellega piirdumata, konkurentse sidumise analüüs.

[0074] Ühes teostuses esitab leiutis antikeha, mis sisaldab kombinatsiooni ühest, kahest, kolmest, neljast, viiest või kõigist joonisel 13 esitatud tabelis kujutatud HRV-järjestustest.

[0075] Eelistatult ei kutsu peremees-subjektis kasutamiseks mõeldud terapeutiline aine nimetatud subjektis esile immuunvastust. Ühes teostuses esitab leiutis sellise aine. Näiteks esitab

leiutis ühes teostuses humaniseeritud antikeha, mis kutsub esile ja/või loodetavasti kutsub peremees-subjektis esile inimese hiirevastase või inimese inimesevastase antikehavastuse oluliselt madalamal tasemel võrreldes antikehaga, mis sisaldab järjestusi SEQ ID NO: 10, 11, 12 ja/või SEQ ID NO: 13 (roti hiirevastane Fib504 (ATCC HB-293), joonised 1 ja 9). Teises näites esitab leiutis humaniseeritud antikeha, mis ei kutsu esile ja/või loodetavasti ei kutsu esile inimese hiirevastast, inimese rotivastast või inimese inimesevastast antikehavastust.

[0076] Leiutisekohane humaniseeritud antikeha võib oma raske ja/või kerge ahela varieeruv domeenis sisaldada ühte või mitut inimese ja/või inimese konsensuslikku mittehüpervarieeruva piirkonna (näiteks raamistiku-) järjestust. Mõnedes teostustes esineb inimese ja/või inimese konsensusliku mittehüpervarieeruva piirkonna (näiteks raamistiku-) järjestustes üks või mitu lisamodifikatsiooni. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohase antikeha raske ahela varieeruv domeen inimese raamistiku konsensusjärjestust, mis ühes teostuses on alarühma III raamistiku konsensusjärjestus. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha alarühma III raamistiku konsensusjärjestuse varianti, mis on vähemalt ühes aminohappe asendis modifitseeritud. Näiteks võib ühes teostuses alarühma III raamistiku konsensusjärjestuse variant sisaldada asendust ühes või mitmes asenditest 71, 73, 78 ja/või 94, ehkki asend 94 on osa käesoleva leiutise laiendatud raske ahela hüpervarieeruvast piirkonnast H3. Ühes teostuses on nimetatud asend R71A, N73T, N78A ja/või R94M nende ükskõik missuguses kombinatsioonis.

[0077] Leiutisekohane antikeha võib sisaldada ükskõik missugust sobivat inimese kerge ahela raamistikujärjestust või inimese kerge ahela raamistiku konsensusjärjestust eeldusel, et antikehal on soovitud bioloogilised tunnused (näiteks soovitav sidumisafiinsus). Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha vähemalt ühte osa (või kogu) inimese  $\kappa$  kerge ahela raamistikujärjestusest. Ühes teostuses sisaldab leiutisekohane antikeha vähemalt ühte osa (või kogu) inimese  $\kappa$  alarühma I raamistiku konsensusjärjestusest.

[0078] Leiutisekohaseid antagonistide võib kasutada ühe või mitme beeta7-ga seotud efekti moduleerimiseks. Näiteks võib beeta7 antagonist-antikeha seonduda beeta7-ga alfa4beeta7 või alfaEbeeta7 dimeriseerumispirkonnas oleva järjestusega ning inhibeerida sellega integriini subühikute interaktsiooni ja integriini dimeeri moodustumist. Järgmises näites võib beeta7 antagonist-antikeha seonduda järjestusega beeta7-subühiku ligandi siduvas domeenis ja inhibeerida sellega nimetatud seotud piirkonna interaktsiooni oma sidumispartneriga (nagu fibronektiin, VCAM või MAdCAM alfa4beeta7-integriini puhul või E-kadheriin

alfaEbeeta7-integriini puhul). Järgmises näites võib beeta7-vastane antagonist-antikeha seonduda järjestusega, mis ei paikne integriini subühikute dimeriseerumispiirkonnas ega ligandi siduvas domeenis, aga kus nimetatud beeta7 antagonist-antikeha seondumise tulemuseks on beeta7 domeeni sidumispartneritega (nagu integriini alfa4- või alfaE-subühik ja/või ligand, nagu fibronectiin, VCAM, MAdCAM või E-kadheriin) interakteerumise võime katkestamine. Ühes teostuses seondub leiutisekohane antagonist-antikeha beeta7-ga (näiteks rakuvälises domeenis) nii, et beeta7 dimeriseerumine alfa4- või alfaE-subühikuga on rikutud. Ühes teostuses seondub leiutisekohane antagonist-antikeha beeta7-ga nii, et beeta7 ja/või alfa4beeta7- ja/või alfaEbeeta7-integriini võime seonduda oma ligandi või ligandidega on rikutud. Näiteks esitab leiutis ühes teostuses antagonist-antikeha, mis seondumisel beeta7 molekuliga inhibeerib nimetatud molekuli dimeriseerumise. Ühes teostuses seondub leiutisekohane beeta7 antagonist-antikeha spetsiifiliselt beeta7 ligandi siduva domeeni järjestusega. Ühes teostuses seondub leiutisekohane beeta7 antagonist-antikeha spetsiifiliselt beeta7 ligandi siduva domeeni järjestusega nii, et ligandi (s.t fibronectiini, VCAM ja/või MAdCAM) seondumine alfa4beeta7-integriiniga on katkestatud. Ühes teostuses seondub leiutisekohane beeta7 antagonist-antikeha spetsiifiliselt beeta7 ligandi siduva domeeni järjestusega nii, et ligandi (s.t E-kadheriini) seondumine alfaEbeeta7-integriiniga on katkestatud.

[0079] Ühes teostuses katkestab leiutisekohane antagonist-antikeha beeta7 dimeriseerumise, mis seisneb heterodimeriseerumises (s.t beeta7 dimeriseerumise integriini alfa4- või alfaE-subühiku molekuliga).

[0080] Mõnel juhul võib olla soodus omada beeta7 antagonist-antikeha, mis ei sekku ligandi (nagu fibronectiini, VCAM, MAdCAM või alfaE) seondumisse beeta7 subühiku kui integriini osaga või alfa4beeta7-integriini või alfaEbeeta7-integriini kui dimeeriga. Seega esitab leiutis ühes teostuses antikeha, mis ei seonu beeta7-l oleva fibronectiini, VCAM, MAdCAM või E-kadheriini sidumissaidiga, vaid inhibeerib selle asemel beeta7-subühiku ja alfa-subühiku (nagu integriini alfa4- või alfaE-subühiku) vahelist interaktsiooni, nii et bioloogiliselt aktiivse integriini moodustumine on takistatud. Ühes näites võib leiutisekohast antagonist-antikeha kasutada koos ühe või mitme teise antagonistiga, kusjuures antagonistid on suunatud beeta7-integriini telje erinevatele protsessidele ja/või funktsioonidele. Nii seondub ühes teostuses beeta7 antagonist-antikeha beeta7-epitoobiga, mis erineb teise beeta7- või alfa/beeta-integriini antagonistiga (nagu alfa4beeta7 antikeha, kaasa arvatud monokloonne antikeha või antikeha, nagu humaniseeritud antikeha või monokloonne antikeha, mis pärineb sellisest anti-

kehast ja/või millel on samasugused või niisama tõhusad sidumisomadused või spetsiifilisus kui hiire antikehast pärineval antikehal) seondunud epitoobist.

[0081] Ühes teostuses esitab leiutis beeta7 antagonist-antikeha, mis katkestab nii beeta7-alfa4 või -alfaE multimeriseerumise vastavaks integriiniks kui ka selle seondumise ligandiga. Näiteks võib leiutisekohasel antagonist-antikehal, mis inhibeerib beeta7 dimeriseerumist integriini alfa4- või alfaE-subühikuga, olla täiendav võime konkureerida ligandiga beeta7 või integriini dimeeriga seondumise pärast (näiteks võib ta sekkuda fibronektiini, VCAM ja/või MAdCAM seondumisse beeta7 ja/või alfa4beeta7-ga või sekkuda E-kadheriini seondumisse beeta7 või alfaEbeeta7-ga).

[0082] Ühes leiutisekohase beeta7 antagonist-antikeha teostuses inhibeerib antagonisti seondumine ligandi seondumisest aktiveeritavat rakuadhesiooni. Teises leiutisekohase beeta7 antagonist-antikeha teostuses inhibeerib antagonisti seondumine beeta7-ga raku värbamist nende rakkude ja/või koe juurde, milles ekspresseerub beeta7 sisaldav integriin.

[0083] Ühes teostuses seondub leiutisekohane beeta7 antagonist-antikeha spetsiifiliselt vähemalt osaga beeta7 või selle variandi rakuvälise domeeni aminohapetest 176-250 (valikuliselt aminohapetest 176-237) (vt Tidswell et al. (1997) J. Immunol., 159:1497-1505) ja vähendab ligandide MAdCAM, VCAM-1, fibronektiini ja/või E-kadheriini seondumist või blokeerib selle täielikult. Ühes teostuses katkestab, vähendab ja/või tõkestab selline ligandi seondumise blokeerimine ligandi ekspresseeriva raku adhesiooni rakule, mis ekspresseerib beeta7 sisaldavat ligandi. Ühes teostuses seondub leiutisekohane antagonist-antikeha spetsiifiliselt beeta7 aminohapete järjestusele, mis sisaldab jääke 176-237. Ühes teostuses seondub leiutisekohane antagonist-antikeha spetsiifiliselt konformatsioonilisele epitoobile, mis on moodustunud osast või vähemalt ühest tervest järjestusest, mis valitakse rühmast, millesse kuuluvad beeta7 jäägid 176-237. Ühes teostuses seondub leiutisekohane antagonist-antikeha spetsiifiliselt aminohapete järjestusele, mis on järjestuse poolest vähemalt 50%, vähemalt 60%, vähemalt 70%, vähemalt 80%, vähemalt 90%, vähemalt 95%, vähemalt 98% või vähemalt 99% identne või sarnane inimese beeta7 jääkide 176-237 või jääkide 176-250 aminohapete järjestusega. Ühes teostuses seondub leiutisekohane beeta7-vastane antagonist-antikeha sama epitoobiga kui beeta7-vastane antikeha Fib504, mida toodab hübridoom ATCC HB-293.

[0084] Siin on kirjeldatud kompositsiooni, mis sisaldab ühte või mitut leiutisekohast antagonist-antikeha ja kandjat. Kandja on vajadusel farmatseutiliselt vastuvõetav.

[0085] Ühe eripärana esitatakse leiutises nukleiinhapped, mis kodeerivad leiutisekohast beeta7 antagonist-antikeha.

[0086] Ühe eripärana esitatakse leiutises vektorid, mis sisaldavad leiutisekohast nukleiinhapet.

[0087] Ühe eripärana esitatakse leiutises peremeesrakud, mis sisaldavad leiutisekohast nukleiinhapet või vektori. Vektor võib olla ükskõik missugust tüüpi, näiteks rekombinantne vektor nagu ekspressioonivektor. Võib kasutada ükskõik missugust paljudest erinevatest peremeesrakkudest. Ühes teostuses on peremeesrakk prokarüootne rakk, näiteks *E. coli* rakk. Ühes teostuses on peremeesrakk eukarüootne rakk, näiteks imetajarakk, nagu hiina hamstri munasarja (*Chinese Hamster Ovary*, CHO) rakk.

[0088] Ühe eripärana esitatakse leiutises leiutisekohase antagonisti valmistamismeetodid. Näiteks esitab leiutis beeta7 antagonist-antikeha (mis siin defineerituna hõlmab nii täispikka antikeha kui selle fragmente) valmistamismeetodi, kus nimetatud meetod hõlmab nimetatud antikeha (või selle fragmenti) kodeeriva rekombinantse vektori ekspresseerimist sobivas peremeesrakus ja nimetatud antikeha kättesaamist.

[0089] Siin kirjeldatakse ka tooteartiklit, mis sisaldab mahutit, ja mahutis sisalduvat kompositsiooni, kus kompositsioon sisaldab ühte või mitut leiutisekohast beeta7 antagonist-antikeha. Ühes teostuses sisaldab kompositsioon leiutisekohast nukleiinhapet. Ühes teostuses sisaldab antagonist-antikeha kompositsioon täiendavalt kandjat, mis mõnes teostuses on farmatseutiliselt vastuvõetav. Ühes teostuses hõlmab leiutisekohane tootmisartikkel lisaks kompositsiooni (näiteks antagonist-antikeha) subjektile manustamise juhendit.

[0090] Siin kirjeldatakse komplekti, mis sisaldab esimest mahutit, mis sisaldab ühte või mitut leiutisekohast beeta7 antagonist-antikeha, ja teist mahutit, mis sisaldab puhvrit. Ühes teostuses on puhver farmatseutiliselt vastuvõetav. Ühes teostuses sisaldab antagonist-antikeha sisaldav kompositsioon täiendavalt kandjat, mis mõnes teostuses on farmatseutiliselt vastuvõetav. Ühes teostuses sisaldab komplekt lisaks kompositsiooni (näiteks antagonist-antikeha) subjektile manustamise juhendit. Beeta7-integriinid ja nende ligandid ekspresseeruvad haigusseisundite korral erinevalt. [Põletikulise soolehaigusega (UC ja CD-ga) patsientidel kasvab MAdCAM-1 ekspressioon sooleepiteeli limaskestas põletikusaitides, samuti on UC ja CD-ga patsientide käärsoole sidekoekihis (*lamina propria*) CD3+ ja a4b7+ rakkude arv suurenenud võrreldes IBS kontrollidega (vt Souza H. et al., Gut, 45:856 (1999)). On täheldatud, et MAdCAM-1 ekspressioon on seotud maksahaiguste väratiteede põletikuga ja



see võib olla tähtis alfa4beeta7 lümfotsüütide maksavarude täiendamisel põletiku käigus (Hillan, K. et al., *Liver*, 19(6):509-18 (1999)). Maksa veresoontel paiknev MAdCAM toetab IBD ja primaarse skleroseeriva kolangiidiga patsientide a4b7+ lümfotsüütide adhesiooni. Seda adhesiooni inhibeerivad MAdCAM-1-vastased, alfa4beeta7-vastased või alfa4-vastased antikehad (Grant A. J. et al., *Hepatology*, 33(5):1065-72 (2001)). MAdCAM-1, VCAM-1 ja E-kaderiin ekspresseeruvad aju endoteelirakkudel ja/või põletikulise kesknärvisüsteemi mikroveresoontel. Beeta7-integriinid annavad oma panuse kesknärvisüsteemi (KNS) demüeliniseerumishaigusse (Kanwar et al., *J. Neuroimmunology*, 103:146 (2000)). Alfa4beeta7 ekspressioon on LPL ja CD-ga patsientidel oluliselt kõrgem kui kontrollidel ja UC-ga patsientidel (Oshitani, N. et al., *International Journal of Molecule Medicine*, 12:715-719 (2003)). CD-ga patsientide IEL-d võivad olla krooniliselt stimuleeritud ja perifeeriast ära tõmmatud ((Meresse, B. et al., *Human Immunology*, 62:694-700 (2001)). Inimese makshaiguse puhul akumulereeruvad alfaEbeeta7 T-rakud (CD4+ ja CD8+) eelistatult inimese maksa, kus hepatotsüütidel ja sapijuha epiteelil ekspresseerub E-kadheriin (Shimizu, Y. et al., *Journal of Hepatology*, 39:918-924 (2003)). Kroonilise pankreatiidi puhul infiltreeruvad pankrassa CD8+CD103+ T-rakud analoogselt sooleepiteelis olevate lümfotsüütidega (Matthias, P. et al., *Am. J. Gastroenterol.* 93:2141-2147 (1998)). AlfaEbeeta7 ülesreguleeritust spetsiifiliselt epiteelis on leitud süsteemse erütematoosluupusega patsientidel ((Pang et al., *Arthritis & Rheumatism*, 41:1456-1463 (1993)). Sjörgeni sündroomi puhul kleepuvad CD8+ alfaEbeeta7+ T-rakud atsinaarsetele epiteelirakkudele ja hävitavad need apoptoosi esilekutsumise teel (Kroneld et al., *Scand. J. Rheumatol.*, 27:215-218, 1998). Alfa4beeta7- ja alfaEbeeta7-integriinid mängivad nahapõletiku ajal rolli T-rakkude epidermotropismis ja annavad oma panuse naha transplantaadi hülgamisreaktsiooni (Sun et al., *Transplantation*, 74:1202, 2002). Teraki ja Shiohara on näidanud aEb7-integriini eelistatud ekspressiooni psoriaatilise epidermise CD8+ T-rakkudes (Teraki, Shiohara, *Br. J. Dermatology*, 147:1118, 2002). Astma, KOK-ga ja normaalsete subjektide rögas olevad T-lümfotsüüdid on aktiveeritud IEL-d (CD69+ CD103+) poolt ((Leckie et al., *Thorax*, 58:23, 2003). Neerutransplantaadi hülgamisreaktsiooni käigus akumulereeruvad CD103+ (aEb7+) CTL-d kliiniliselt transplantaadi eliteeli (Hadley et al., *Transplantation* 72:1548, 2001)]. Nii esitab leiutis ühes eripäras leiutisekohase beeta7 antagonist-antikeha kasutamise beeta7-integriini ja ligandi vahelise interaktsiooni inhibeerimiseks, et vähendada või leevendada haigust, näiteks ühte või mitut eespool kirjeldatud haigusseisunditest. Ühes teostuses kasutatakse leiutisekohast

antikeha ravimi valmistamiseks, haiguse, nagu põletikuline haigus, kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata, põletikuline soolehaigus (nagu Crohni tõbi ja haavandiline koliit), põletikuline maksahaigus, kesknärvisüsteemi (KNS) põletik, krooniline pankreatiit, süsteemne erütematoosluupus, Sjörgeni sündroom, psoriaas ja nahapõletik, astma, krooniline obstruktiivne kopsuhaigus (KOK), interstitsiaalne kopsuhaigus, allergia, autoimmuunhaigus, transplantatsiooni hülgamine, neerutrantsplantaadi hülgamine, transplantaadi peremehevastane haigus, diabeet ja vähk, terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks.

[0091] Siin kirjeldatakse ka nukleiinhappe kasutamist ravimi valmistamiseks haiguse, nagu immuunhäired (nagu autoimmuunhaigused ja põletikulised haigused), kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata, põletikuline soolehaigus (nagu Crohni tõbi või haavandiline koliit) ja allergilised reaktsioonid (nagu hingamissüsteemi-, naha-, liigestehäired, allergiline astma ja teiste elundite haigused, mida kahjustavad beeta7 sisaldava integriini vahendatud allergilised reaktsioonid), terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks.

[0092] Samuti kirjeldatakse siin ekspressioonivektori kasutamist ravimi valmistamiseks haiguste, nagu immuunhäired (nagu autoimmuunhaigused ja põletikulised haigused), kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata, põletikuline soolehaigus (nagu Crohni tõbi või haavandiline koliit) ja allergilised reaktsioonid (nagu hingamissüsteemi-, naha-, liigestehäired, allergiline astma ja teiste elundite haigused, mida kahjustavad beeta7 sisaldava integriini vahendatud allergilised reaktsioonid), terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks.

[0093] Samuti kirjeldatakse siin peremeesrakkude kasutamist ravimi valmistamiseks haiguste, nagu immuunhäired (nagu autoimmuunhaigused ja põletikulised haigused), kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata, põletikuline soolehaigus (nagu Crohni tõbi või haavandiline koliit) ja allergilised reaktsioonid (nagu hingamissüsteemi-, naha-, liigestehäired, allergiline astma ja teiste elundite haigused, mida kahjustavad beeta7 sisaldava integriini vahendatud allergilised reaktsioonid), terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks.

[0094] Siin kirjeldatakse ka toomisartikli kasutamist ravimi valmistamiseks haiguste, nagu immuunhäired (nagu autoimmuunhaigused ja põletikulised haigused), kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata, põletikuline soolehaigus (nagu Crohni tõbi või haavandiline koliit) ja allergilised reaktsioonid (nagu hingamissüsteemi-, naha-, liigestehäired, allergiline astma ja teiste elundite haigused, mida kahjustavad beeta7 sisaldava integriini vahendatud allergilised reaktsioonid), terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks.

[0095] Siin kirjeldatakse ka leiutisekohase komplekti kasutamist ravimi valmistamiseks haiguste, nagu immuunhäired (nagu autoimmuunhaigused ja põletikulised haigused), kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata, põletikuline soolehaigus (nagu Crohni tõbi või haavandiline koliit) ja allergilised reaktsioonid (nagu hingamissüsteemi-, naha-, liigestehäired, allergiline astma ja teiste elundite haigused, mida kahjustavad beeta7 sisaldava integriini vahendatud allergilised reaktsioonid), terapeutiliseks ja/või profülaktiliseks raviks.

[0096] Siin kirjeldatakse ka meetodeid ja kompositsioone kasutamiseks selliste haigusseisundite moduleerimisel, mis on seotud beeta7-integriini vahendatud rakkudevahelise interaktsiooniprotsessi düsregulatsiooniga. Beeta7-integriinid osalevad paljudes bioloogilistes ja füsioloogilistes funktsioonides, kaasa arvatud näiteks põletikulised häired ja allergilised reaktsioonid.

#### JOONISTE LÜHIKIRJELDUS

[0097]

Joonistel 1A ja 1B on kujutatud järgmised kerge ja raskete ahelate järjestused: inimese kerge ahela kapa I alarühma konsensusjärjestus (joonis 1A, SEQ ID NO: 23), inimese raske ahela alarühma III konsensusjärjestus (joonis 1B, SEQ ID NO: 24), hiire beeta7-vastase roti antikeha (Fib504) varieeruv kerge ahel (joonis 1A, SEQ ID NO: 10), hiire beeta7-vastase roti antikeha (Fib504) varieeruv raske ahel (joonis 1B, SEQ ID NO: 11) ja humaniseeritud anti-kehavariandid: humaniseeritud hu504K siiriku varieeruv kerge ahel (joonis 1A, SEQ ID NO: 25), humaniseeritud hu504K siiriku varieeruv raske ahel (joonis 1B, SEQ ID NO: 26), variant 504.5 (humaniseeritud hu504K siiriku aminohappevariandid on näidatud joonisel 1A (kerge ahel) ja joonisel 1B (raske ahel) variantidele hu504.5, hu504.16 ja hu504.32. Täiendavad aminohappe asendused hu504K siiriku HVR-H1-s ja HVR-H2-s, mille tulemuseks olid beeta7 siduvad antikehad, on näidatud joonisel 1C.

Joonistel 2A ja 2B on kujutatud inimese alarühma III kerge ahela täispikk konsensusjärjestus (joonis 2A, SEQ ID NO: 27) ja raske ahela täispikk konsensusjärjestus (joonis 2B, SEQ ID NO: 28). HRVd on alla joonitud.

Joonistel 3A ja 3B on kujutatud roti Fib504 hüpervarieeruvaid piirkondi (nagu siin on kirjeldatud) sisaldava humaniseeritud 504 siiriku täispikk järjestus, mis on siiratud inimese kapa

kerge ahela I konsensusjärjestusse (joonis 3A, SEQ ID NO: 29), ja inimese raske ahela alarühma III konsensusjärjestusse (joonis 3B, SEQ ID NO: 30). HRVd on alla joonitud.

Joonistel 4A ja 4B on kujutatud humaniseeritud 504 siiriku täispikk järjestus, milles hu504 siiriku kerge ahela asendis 49 esineb asendus Y49K. Hu504 siiriku kerge ahel on kujutatud järjestusega SEQ ID NO: 31 ja hu504 siiriku raske ahel on kujutatud järjestusega SEQ ID NO: 30. HRVd on alla joonitud.

Joonistel 5A ja 5B on kujutatud hu504K-RF siiriku täispikk järjestus, milles hu504 siiriku raske ahela asendites 71 ja 78 esinevad hu504 siiriku järjestusega võrreldes asendused A71R ja A78F. Hu504 siiriku kerge ahel on kujutatud järjestusega SEQ ID NO: 31 ja hu504 siiriku raske ahel on kujutatud järjestusega SEQ ID NO: 32. HRVd on alla joonitud.

Joonistel 6A ja 6B on kujutatud hu504.32 variandi täispikk järjestus, mis sisaldab hu504K-RF siiriku rasket ahelat (SEQ ID NO: 32) ning hu504K siiriku kerges ahelas olevaid asendusi T31D ja Y32L (SEQ ID NO: 33). HRVd on alla joonitud.

Joonistel 7A-7B ja joonistel 8A-8B on kujutatud käesoleva leiutise praktikas kasutamiseks mõeldud näitlikud inimese aktseptor-raamistiku konsensusjärjestused, mille järjestuste tunnused on järgmised:

varieeruva kerge (VL) ahela konsensusraamistikud (joonised 7A, B)

inimese VL kapa alarühma I konsensusraamistik (SEQ ID NO: 14)

inimese VL kapa alarühma I konsensusraamistik miinus laiendatud HVR-L2 (SEQ ID NO: 15)

inimese VL kapa alarühma II konsensusraamistik (SEQ ID NO: 16)

inimese VL kapa alarühma III konsensusraamistik (SEQ ID NO: 17)

inimese VL kapa alarühma IV konsensusraamistik (SEQ ID NO: 18)

Viirutatud piirkonnad vastavad kerge ahela HRV-dele (näidatud kui L1, L2 ja L3).

varieeruva raske (VH) ahela konsensusraamistikud (joonised 8A, B)

inimese VH alarühma I konsensusjärjestus miinus Kabat'i CDR-d (SEQ ID NO: 19)

inimese VH alarühma I konsensusjärjestus miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 20 kuni 22)

inimese VH alarühma II konsensusjärjestus miinus Kabat'i CDR-d (SEQ ID NO: 48)

inimese VH alarühma II konsensusjärjestus miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 49 kuni 51)

inimese VH alarühma III konsensusjärjestus miinus Kabat'i CDR-d (SEQ ID NO: 52)

inimese VH alarühma III konsensusjärjestus miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 53 kuni 55)

inimese VH aktseptor-raamistik miinus Kabat'i CDR-d (SEQ ID NO: 56)

inimese VH aktseptor-raamistik miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 57-58)

inimese VH aktseptor-raamistik 2 miinus Kabat'i CDR-d (SEQ ID NO: 59)

inimese VH aktseptor-raamistik 2 miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 60 kuni 62)

Joonistel 9A ja 9B on kujutatud hübriidoomi ATCC HB-293 abil toodetud hiire integriini beeta7-vastase roti Fib504 antikeha varieeruvate ahelate aminohapete järjestused. HVRd on alla joonitud. Varieeruv kerge ahel on kujutatud joonisel 9A (SEQ ID NO: 12) ja varieeruv raske ahel on kujutatud joonisel 9B (SEQ ID NO: 13).

Joonisel 10A on kujutatud erinevate konsensusjärjestuste (inimese alarühmad I–III) raske ahela aminohappe asendid. Herceptin<sup>®</sup> HER-2 vastase antikeha, roti Fib504 ning hu504-RL ja hu504-RF raamistike väljatöötamiseks kasutatud konsensusjärjestus on kirjeldatud siin toodud näidetes. Joonisel 10B on tulpdiaagramm, mis näitab alfa4beeta7 suhtelist seondumist hu504-siirikantikehaga ja hu504K-siirikantikehaga funktsioonina näites 1 kirjeldatud „RL“ või „RF“ raamistikumodifikatsioonidest.

Joonised 11A kuni 11C. Joonisel 11A olevas tabelis on esitatud HVR muutused, mis tulenevad afiinsusküpsemisest, ms on läbi viidud hu504.16 variandis piiratud rea aminohappe asenduste abil. Tulemused on võetud siin näites 2 kirjeldatud hu504.16 variandi individuaalselt modifitseeritud HVR-de raamatukogudest. Kastides lühenditega esitatud aminohapped on aminohapped, mis esinevad beeta7 siduvates antikehades (faagil selekteeritud antikehades) kõige sagedamini. Joonistel 11B ja 11C on joonisele 11A vastavad tulpdiagrammid, mis näitavad hu504.16 variandis (kerge ahel joonisel 11B, raske ahel joonisel 11C) olevate aminohappe asenduste arvu ja tüüpi, mis on detekteeritavad näite 2 mutageneesi- ja seleksioonimeetodite abil.

Joonisel 12 olevas tabelis on esitatud sellise afiinsusküpsemise tulemused, mis on läbi viidud hu504.32 variandi HVR-des laia valiku võimalike aminohappe asenduste abil. Viirutatud kastides on näidatud aminohapped, mida kõige sagedamini detekteeriti nendes antikehades, mis näite 2 mutageneesi- ja seleksioonimeetodite abil detekteeriti beeta7 siduvate antikehadena.

Joonisel 13 on kujutatud hiirevastase roti Fib504 (ATCC-293) HVR järjestused ja inimese konsensusjärjestused (vasakpoolsed tulbad). Paremal pool on näidatud aminohappe asenduste näited, mida täheldati iga HVR asendile (aga mis ei ole mõeldud piiravatena) näidetes kirjeldatud testide abil (aminohapete pehme randomiseerimise abil täheldatud aminohappe asendused, lai aminohappe asenduste skaneerimine ja piiratud aminohappe asenduste skaneerimine) (humaniseerimiseks kasuliku HVR-de modifitseerimismeetodi, mis on rakendatav käesoleva leiutise variantidele, võib leida US patenditaotluses seerianumbriga 60/545840, mis esitati 19. veebruaril 2004).

Joonisel 14 on toodud Fib504 ja selle antikehavariandi MAdCAM-ga seondumise näitlik graafiline esitus funktsioonina antikeha kontsentratsioonist, nagu näites 3 on kirjeldatud. Antikehadele määrati IC<sub>50</sub>- ja IC<sub>90</sub>-väärtused.

Joonisel 15 on kujutatud beeta7-vastase antikeha 504.32R kerge ja raske ahela HVR aminohapete järjestused antikeha kuue HVR jaoks vastavalt Kabat'i nummerdamissüsteemile ja suhtelisele nummerdamissüsteemile (A-F). Samuti on kujutatud aminohapped raske ahela FR3 piirkonna asendites 71, 73 ja 78. On loetletud ka paljude teistes HVR-de asendites või raske ahela FR3 piirkonna asendites olevad kasulikud aminohappeasendused.

Joonisel 16 on näidatud tulbad, mis iseloomustavad 504.32M ja 504.32R antikehade suhtelist võimet blokeerida radioaktiivselt märgistatud T-rakkude suundumist põletikulist soolehaigust põhdevate hiirte käärsoolde.

## LEIUTISE LÄBIVIIMISE VIISID

### Üldised meetodid

[0098] Käesoleva leiutise teostamisel kasutatakse, kui ei ole teisiti näidatud, tavapäraseid molekulaarbioloogia meetodeid (kaasa arvatud rekombinantsed meetodid), mikrobioloogia, rakubioloogia, biokeemia ja immunoloogia meetodeid, mis on tehnika asemest teada. Selliseid meetodeid on täielikult selgitatud kirjanduses, näiteks teostes "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", teine väljaanne (Sambrook et al., 1989), "Oligonucleotide Synthesis" (toim. M. J. Gait, 1984), "Animal Cell Culture" (toim. R. I. Freshney, 1987), "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.), "Current Protocols in Molecular Biology" (toim. F. M. Ausubel et al., 1987, ja selle perioodilised ajakohastamised), "PCR: The Polymerase Chain

Reaction", (toim. Mullis et al., 1994), "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988), "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

### Definitsioonid

[0099] „Beeta7-subühiku“ ehk „ $\beta$ 7-subühiku“ all mõeldakse inimese integriini  $\beta$ 7-subühikut (Erle et al., (1991) J. Biol. Chem., 266:11009-11016). Beeta7-subühik seondub integriini alfa4-subühikuga, näiteks inimese  $\alpha$ 4-subühikuga (Kilger, Holzmann, (1995) J. Mol. Biol., 73:347-354). Alfa4beta7-integriin ekspresseerub enamikul küpsetest lümfotsüütidest, samuti väikesel tümotsüütide, luuüdirakkude ja nuumrakkude populatsioonil (Kilshaw, Murant (1991) Eur. J. Immunol., 21:2591-2597, Gurish et al., (1992) 149:1964-1972, ning Shaw, S. K., Brenner, M. B., (1995) Semin. Immunol., 7:335). Beeta7-subühik seondub ka alfaE-subühikuga, näiteks inimese integriini alfaE-subühikuga (Cepek, K. L. et al., (1993) J. Immunol., 150:3459). alfaEbeeta7-integriin ekspresseerub soolesisese epiteeli lümfotsüütidel (*intra-intestinal epithelial lymphocytes*, iIEL) (Cepek, K. L., (1993) *supra*). Beeta7-subühik, mis seondub leiutisekohase humaniseeritud beeta7-vastase antikehaga, võib olla looduslikult esinev ning võib olla lahustuv või lokaliseerunud raku pinnale.

[0100] „AlfaE-subühiku“ ehk „integriini alfaE-subühiku“ ehk „ $\alpha$ E-subühiku“ ehk „integriini  $\alpha$ E-subühiku“ ehk „CD103“ all mõeldakse integriini subühikut, mis on leitud seonduvat epiteelisisestel lümfotsüütidel beeta7-integriiniga, kus see alfaEbeeta7-integriin aineab iEL-de seandumist E-kadheriini ekspresseeriva sooleepiteeliga (Cepek, K. L. et al., (1993) J. Immunol., 150:3459, Shaw, S. K., Brenner, M. B., (1995) Semin. Immunol., 7:335).

[0101] Termineid „MAdCAM“ ehk „MAdCAM-1“ kasutatakse käesoleva leiutise kontekstis vastastikku vahetatavatena ja need tähendavad valku mukoosse adressiini rakuadhesioonimolekul 1, mis on üheaheelaline polüpeptiid, mis sisaldab lühikest tsütoplasmas olevat saba, membraani läbivat piirkonda ja rakuvälist järjestust, mis koosneb kolmest immunoglobuliini-sarnasest domeenist. Hiire, inimese ja makaagi MAdCAM-1 on kloonitud (Briskin et al., (1993) Nature, 363:461-464, Shyjan et al., (1996) J. Immunol., 156:2851-2857).

[0102] „VCAM-1“ ehk „vaskulaarne rakuadhesioonimolekul-1“ ehk „CD106“ tähendab alfa4beeta7 ja alfa4beta1 ligandi, mis ekspresseerub aktiveeritud endoteelil ja on tähtis endoteeli leukotsüütide interaktsioonides, nagu põletiku käigus toimuv leukotsüütide seandumises ja transmigreerumises.

[0103] „E-kadheriin“ tähendab kadheriinide perekonna liiget, kus E-kadheriin ekspresseerub epiteelirakkudel. E-kadheriin on alfaEbeeta7-integriini ligand ja aineab iEL-ekspresseeruva alfaEbeeta7 seondumist sooleepiteelile, ehkki tema funktsioon lümfotsüütide sihtmärgile suunamises ei ole selge. E-kadheriini ekspressiooni reguleerib üles TGF-beeta1.

[0104] „Fibronektiin“ tähendab fibronektiini ja see osaleb kudede parandamises, embrüogeneesis, vere hüübimises ja rakkude migreerumises/adhesioonis. Ta on linkeriks ECM-i (*extracellular matrix*, rakuvälise matriksi) ja plasmas leiduva dimeeri (plasma fibronektiini) vahel. Plasmavorm sünteesitakse hepatotsüütides, samas kui ECM vorm tehakse fibroblastides, kondrotsüütides, endoteelirakkudes, makrofaagides, samuti teatud epiteelirakkudes. Selles kontekstis interakteerub ta alfa4beeta7-integriiniga, aineades lümfotsüütide sihtmärgile suunamise või adhesiooni eripärasid. Fibronektiini ECM vorm toimib üldise rakuadhesioonimolekulina, ankurdades rakke kollageeni- või proteoglykaanisubstraatidele. Fibronektiin toimib ka rakkude ja ECM vahelise interaktsiooni organiseerijana, seondudes rakuvälise matriksi erinevatele komponentidele ja rakkude pinnal olevatele membraani-seotud fibronektiini retseptoritele. Lõpuks on fibronektiin tähtis ka embrüogeneesi käigus toimuvates rakumigratsioonisündmustes.

[0105] „Gastrointestinaalsed põletikulised häired“ on rühm kroonilisi häireid, mis põhjustavad limaskesta põletikku ja/või haavandumist. Nende häirete hulka kuuluvad näiteks põletikuline soolehaigus (näiteks Crohni tõbi, haavandiline koliit, välja kujunemata koliit ja infektsioosne koliit), limaskestapõletik (näiteks suulimaskesta põletik, gastrointestinaalse limaskesta põletik, ninalimaskesta põletik ja proktiit), nekrotiseerv enterokoliit ja söögitorupõletik.

[0106] Termineid „põletikuline soolehaigus“ ehk „IBD“ kasutatakse siin vastastikku vahetatavana ja need on mõeldud tähendama soolehaigusi, mis põhjustavad põletikku ja/või haavandumist ja mille hulka kuuluvad piiranguteta Crohni tõbi ja haavandiline koliit.

[0107] „Crohni tõbi (*Crohn's disease*, CD) või „haavandiline koliit (*ulcerative colitis*, UC)“ on tundmatu etioloogiaga kroonilised soolehaigused. Erinevalt haavandilisest koliidist võib Crohni tõbi kahjustada ükskõik missugust soole osa. Crohni tõve kõige silmatorkavam tunnus on sooleseina granulaarne, punakasvilla paistetustlik paksenemine. Põletiku arenemisega kaotavad need granuloomid sageli oma piirjooned ja integreeruvad ümbritsevasse koesse. Domineerivad kliinilised tunnused on kõhulahtisus ja soolesulgus. Nagu haavandilise koliidi puhul võib ka Crohni tõve kulg olla pidev või taastuv, kerge või raskekujuline, kuid erinevalt



haavandilisest koliidist ei ole Crohni tõbi ravitav haigusest haaratud soolesegmendi kirurgilise eemaldamise abil. Enamik Crohni tõvega patsiente vajavad mingil hetkel operatsiooni, kuid sellele järgnev haiguse taastumine on üldine ning pidev meditsiiniline ravi on tavaline.

[0108] Crohni tõbi võib hõlmata ükskõik missugust seedetrakti osa suust pärakuni, ehkki tüüpiliselt ilmneb see niudesoole-käärsoole, peensoole või pära-pärasoole piirkonnas. Haiguse histopatoloogia avaldub katkelistes granulomatoomides, peidetud abstsessides, lõhedes ja aftilistes haavandites. Põletiku infiltraat on segu, mis koosneb lümfotsüütidest (nii T- kui ka B-rakkudest), plasmarakkudest, makrofaagidest ja neutrofiilidest. Tegemist on IgM- ja IgG-sekreteerivate plasmarakkude, makrofaagide ja neutrofiilide arvu ebaproportsionaalse kasvuga.

[0109] Nõrga aktiivsusega Crohni tõve ravimiseks on kasulikud põletikuvastased ravimid sulfasalasiin ja 5-aminosalitsüülhape (5-ASA) ning neid määratakse tavaliselt haiguse leevenemise püsimiseks. Metronidasool ja tsiprofloksatsiin on niisama tõhusad kui sulfasalasiin ja need on osutunud eriti kasulikeks perianaalse haiguse ravimisel. Raskemakujulistel juhtudel on aktiivse halvenemise ravimiseks efektiivsed ravimid kortikosteroidid ja need võivad haiguse leevenemist isegi säilitada. Ka asatiopriin ja 6-merkaptopuriin on osutunud edukaks patsientidel, kes vajavad kortikosteroidide kroonilist manustamist. Samuti on võimalik, et need ravimid võivad mängida rolli pikaajalises profülaktikas. Kahjuks võib aga mõnedel patsientidel nende ravimite toime algus väga pikalt viivituda (kuni kuus kuud).

[0110] Ka kõhulahtisusevastased ravimid võivad mõnede patsientide sümptomeid leevendada. Toitumisteraapia või looduslik dieet võib parendada patsientide toitumuslikku olukorda ja kutsuda esile haiguse ägedate sümptomite parenemise, kuid see ei kutsu esile haiguse pidevat kliinilist nõrgenemist. Peensoole sekundaarsete bakterite ülekasvamise ravimiseks ja püogeensete tüsistuste ravimiseks kasutatakse antibiootikume.

[0111] „Haavandiline koliit (*ulcerative colitis*, UC)“ vaevab jämesoolt. Haiguse kulg võib olla pidev või taastuv, kerge või raskekujuline. Kõige varasem kahjustus on põletikuline infiltratsioon abstsesside moodustumisega Lieberkühni krüptide alusel. Nende paisunud ja katkenud krüptide koalestseerumine kipub eraldama nende peal olevat limaskestast verevarustusest, mis viib haavandumisele. Haigussümptomite hulka kuuluvad krambid, valu alakõhus, rektaalne veritsus ja sagedased ohjeldamatud eritised, mis koosnevad peamiselt verest, müdast ja limast koos väheste väljaheiteosakestega. Ägeda, raskekujulise või kroonilise mitte-leevenduva haavandilise koliidi puhul võib osutada vajalikuks täielik kolektoomia.

[0112] UC kliinilised tunnused on väga varieeruvad ning selle algus võib olla salalik või äkiline ning see võib hõlmata kõhulahtisust, valulikku pakitsust ja taastuvat rektaalset veritust. Kiirelt areneva kogu käärsoole haaratuse või toksilise megakooloni puhul võib esineda eluohtlik olukord. Sooleväliste avaldumiste hulka kuuluvad artriit, *pyoderma gangraenosum*, uveiit ja sõlmjas erüteem.

[0113] UC ravi hõlmab sulfalasiini ja sellega sarnaseid salitsülaate sisaldavaid ravimeid kergetel juhtudel ja kortikosteroidravimeid raskekujulistel juhtudel. Mõnikord on efektiivne kas salitsülaatide või kortikosteroidide paikne manustamine, eriti juhul, kui haigus piirdub soole distaalosaga, ning see on seotud vähenenud kõrvaltoimetega võrreldes süsteemse manustamisega. Mõnikord on näidustatud toetavad meetmed, nagu raua või kõhulahtisusevastaste aineite manustamine. Mõnikord määratakse raskesti ravitavatel, kortikosteroididest sõltuvatel juhtudel kasutamiseks asatiopriini, 6-merkaptopuriini ja metotreksaati.

[0114] Aminohappejäägi/asendi „modifikatsioon“ tähendab siin kasutatuna aminohapete järjestuse primaarjärjestuse muutust võrreldes lähteaminohapete järjestusega, kus see muutus on järjestuse sellise muundamise tulemus, milles osaleb nimetatud aminohappejääk/asend. Näiteks kuuluvad tüüpiliste modifikatsioonide hulka jäägi asendus (või asendus nimetatud asendis) teise aminohappega (näiteks konservatiivne asendus või mittekonservatiivne asendus), ühe või mitme (üldiselt vähem kui 5 või vähem kui 3) inserteerimine nimetatud jäägi/asendi kõrvale ning nimetatud jäägi/asendi deletsioon. „Aminohappe asendus“ või selle variant tähendab eelnevalt kindlaksmääratud (lähte)aminohapete järjestuses oleva aminohappejäägi asendust teistsuguse aminohappejäägiga. Üldiselt ja eelistatult annab modifikatsioon tulemuseks polüpeptiidi variandi vähemalt ühe füüsikalise-biokeemilise toime muutuse võrreldes polüpeptiidiga, mis sisaldab lähte- (või „metsiktüüpi“) aminohapete järjestust. Näiteks võib antikeha puhul muudetav füüsikalise-biokeemiline toime sihtmolekulile olla seondumise afiinsus, sellega seondumise võime ja/või sidumiseefekt.

[0115] Terminit „aminohape“ kasutatakse käesoleva leiutise ulatuses selle kõige laiemas mõttes ja see on mõeldud hõlmama looduslikult esinevaid L- $\alpha$ -aminohappeid või aminohappejääke. Siin kasutatakse looduslikult esinevate aminohapete jaoks tavaliselt kasutatavaid ühe- ja kolmetähelisi lühendeid (Lehninger, A. L., Biochemistry, 2. väljaanne, lk. 71-92, Worth Publishers, New York, 1975). Termin hõlmab ka nii D-aminohappeid kui keemiliselt muundatud aminohappeid, nagu aminohappe analooge, looduslikult esinevaid aminohappeid, mida tavaliselt valkudesse ei liideta nagu norleutsiin ja keemiliselt sünteesitud ühendeid,

mille omaduste kohta on tehnika tasemest teada, et need on aminohappele iseloomulikud. Näiteks hõlmab aminohappe definitsioon fenüülalaniini või proliini analooge või mimeetikuid, mis võimaldavad samasuguseid peptiidühendite konformatsioonilisi piiranguid kui looduslikud Phe või Pro. Selliseid analooge ja mimeetikuid nimetatakse siin aminohappe „funktsionaalseteks ekvivalentideks“. Teisi aminohapete näiteid on loetlenud Roberts ja Vellaccio teoses *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, toim. Gross ja Meiehofer, kd. 5, lk. 341 (Academic Press, Inc., New York, 1983). Kui looduslikult esineva aminohappe tähistamiseks on kasutatud ühte tähte, siis on need tähistused sellised, nagu need relevantsses kirjanduses tavaliselt esinevad (vt näiteks: Alberts, B. et al., *Molecular Biology of the Cell*, 3. väljaanne, Garland Publishing, Inc. 1994, lk. 57).

[0116] „Eraldatud“ antikeha on selline, mis on identifitseeritud ning eraldatud ja/või kätte saadud tema loodusliku keskkonna komponendist. Tema loodusliku keskkonna kontamineerivad komponendid on materjalid, mis häirivad antikeha diagnostilist või terapeutilist kasutamist, ning nende hulka võivad kuuluda ensüümid, hormoonid ning muud valgulised ja mittevalgulised lahustunud ained. Eelistatud teostustes puhastatakse antikeha (1) puhtuseni rohkem kui 95% (antikeha massi järgi), määratuna Lowry meetodil, ja kõige eelistatumalt puhtuseni üle 95% (massi järgi), (2) puhtusastmeni, mis on piisav vähemalt 15 jäägi pikkuse N-terminaalse või sisemise aminohapete järjestuse saamiseks pöörleva topsiga sekvenaatori kasutamisel, või (3) homogeensuseni SDS-PAGE meetodil kas redutseerivates või mitteredutseerivates tingimustes, kasutades värvi Coomassie blue või eelistatult hõbedaga värvimist. Eraldatud antikehade hulka kuuluvad ka rekombinantsetes rakkudes *in situ* olevad antikehad, kuna vähemalt üks antikeha loodusliku keskkonna komponent on puudu. Tavaliselt aga valmistatakse eraldatud antikeha vähemalt ühe puhastamisetapi abil.

[0117] Termin „varieeruva domeeni jääkide nummerdamine Kabat'i järgi“ või „aminohappe asendite nummerdamine Kabat'i järgi“ tähendab nummerdamissüsteemi, mida kasutatakse raske ahela varieeruvatele domeenidele või kerge ahela varieeruvatele domeenidele antikehade kompilatsioonil Kabat'i jt. teoses: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991). Selle nummerdamissüsteemi kasutamisel võib tegelik lineaarne aminohapete järjestus sisaldada vähem või täiendavaid aminohappeid, mis vastavad varieeruva domeeni FR või CDR lühemisele või sellesse tehtud insertioonidele. Näiteks võib raske ahela varieeruv domeen sisaldada H2 jäägi 52 järel ühte inserteeritud aminohapet (Kabat'i järgi jääk 52a) ja inser-

teeritud jääke raske ahela FR jäägi 82 järel (Kabat'i järgi näiteks jääke 82a, 82b ja 82c jne). Kabat'i jääkide nummerdamise võib antud antikehale määrata homoloogsete antikehajärjestuste piirkondade joondamise abil „standardse“ Kabat'i järgi nummerdatud järjestusega.

[0118] Fraas „praktiliselt sarnane“ või „praktiliselt sama“ märgib siin kasutatuna piisavalt kõrget sarnasuse taset kahe numbrilise väärtuse vahel (millest üks on üldiselt seotud leiutisekohase antikehaga ja teine on seotud referents-/võrdlusantikehaga), nii et eriala asjatundja saab pidada kahe väärtuse erinevust nimetatud väärtuste (näiteks Kd väärtuste) abil mõõdetud bioloogiliste tunnuste kontekstis väikeseks või bioloogilist ja/või statistilist tähendust mittemomavaks. Kahe nimetatud väärtuse erinevus funktsioonina referents-/võrdlusantikeha väärtusest on eelistatult väiksem kui umbes 50%, eelistatult väiksem kui umbes 40%, eelistatult väiksem kui umbes 30%, eelistatult väiksem kui umbes 20%, eelistatult väiksem kui umbes 10%.

[0119] „Sidumisafiinsus“ tähendab üldiselt molekuli (näiteks antikeha) ühe sidumissaidi ja selle sidumispartneri (näiteks antigeeni) vaheliste mittekovalentsete interaktsioonide tugevuse kogusummat. Kui ei ole teisiti näidatud, tähendab „sidumisafiinsus“ siin kasutatuna tõelist sidumisafiinsust, mis peegeldab seonduva paari liikmete (näiteks antikeha ja antigeeni) vahelisi 1 : 1 interaktsioone. Molekuli X seondumise afiinsust partneriga Y võib üldiselt esitada dissotsiatsioonikonstandi (Kd) abil. Afiinsust võib mõõta tehnika tasemest tuntud tavaliste meetodite abil, kaasa arvatud siin kirjeldatud meetodid. Üldiselt seovad madala afiinsusega antikehad aeglaselt ja kalduvad kergesti dissotsieeruma, samas kui kõrge afiinsusega antikehad seovad antigeeni kiiremini ja jäävad kauem seotuks. Sidumisafiinsuse mõõtmiseks on tehnika tasemest teada palju erinevaid meetodeid, mida kõiki saab kasutada käesoleva leiutise eesmärkidel. Järgnevalt kirjeldatakse spetsiifilisi illustreerivaid teostusi.

[0120] Ühes teostuses mõõdetakse leiutisele vastavat „Kd“ või „Kd-väärtust“ radioaktiivselt märgistatud antigeeni sidumistesti abil (RIA), mis viiakse läbi huvialuse antikeha Fab versiooni ja selle antigeeniga, nagu on kirjeldatud järgnevas testis, kus mõõdetakse Fab-ide antigeeniga seondumise afiinsust lahuses, tasakaalustades Fab minimaalses kontsentratsioonis oleva (<sup>125</sup>I)-märgistatud antigeeniga tiitritava märgistamata antigeeni seeriade juuresolekul ja püüdes seejärel seonduvad antigeeni Fab-vastase antikehaga kaetud plaadile (Chen et al., (1999) J. Mol. Biol., 293:865-881). Testi tingimuste määramiseks kaetakse mikroitiiterplaadid (Dynex) üle öö 5 µg/ml kontsentratsioonis Fab-vastase püüdur-antikehaga (Cappel Labs) 50 mM naatriumkarbonaadis (pH 9,6) ja blokeeritakse seejärel 2% (massiosa mahuosas)

veise seerumi albumiini lahusega PBS-s kahe kuni viie tunni jooksul toatemperatuuril (umbes 23 °C). Mitteabsorbeerival plaadil (Nunc # 269620) segatakse 100 pM või 26 pM [<sup>125</sup>I]-antigeen seerialahjendustes huvialuse Fab-ga (näiteks kooskõlas VEGF-vastase antikeha Fab-12 hindamisega artiklis: Presta et al., (1997) *Cancer Res.*, 57:4593-4599). Seejärel inkubeeritakse huvialust Fab-i üle öö, aga inkubatsioon võib kesta ka kauem (näiteks 65 tundi), et kindlustada tasakaalu saabumine. Siis kantakse segud püüdurplaadile inkubeerimiseks toatemperatuuril (näiteks tund aega). Seejärel eemaldatakse lahus ja plaate pestakse kaheksa korda 0,1% Tween-20 lahusega PBS-s. Kui plaadid on kuivanud, lisatakse süvendi kohta 150 µl stsintillaatorit (MicroScint-20, Packard) ja plaate loendatakse kümme minutit Topcount gammaloenduris (Packard). Kõik Fab kontsentratsioonid, mis andsid 20% maksimaalsest sidumisest või alla selle, valitakse kasutamiseks konkureeriva sidumise testides. Teises teostuses mõõdetakse K<sub>d</sub> või K<sub>d</sub>-väärtust pinnaplasmonresonantsi testide abil, kasutades BIAcore™-2000 või BIAcore™-3000 (BIAcore Inc., Piscataway, NJ) 25 °C juures ja immobiliseeritud antigeeni ~ 10 vastusühikuga (RU) CM5 kiipe. Lühidalt öeldes aktiveeritakse karboksümetüülitud dekstraan-biosensorkiibid (CM5, BIAcore Inc.) N-etüül-N'-(3-dimetüülaminopropüül)karbodiimiidhüdrokloriidi (EDC) ja N-hüdroksütsüünimiidiga (NHS) vastavalt tarnija juhendile. Antigeen lahjendatakse 10 mM naatriumatsetaadiga, pH 4,8, kontsentratsioonini 5 µg/ml (~0,2 µM) enne süstimist kiirusel 5 µl/min, et saavutada umbes 10 sidestatud valgu vastusühikut (RU). Pärast antigeeni süstimist süstitakse reageerimata rühmade blokeerimiseks 1 M etanoolamiini. Kineetilisteks mõõtmisteks süstitakse Fab kahekordsed seerialahjendused (0,78 nM kuni 500 nM) PBS-s koos 0,05% Tween-20-ga (PBST) 25 °C juures voolukiirusel umbes 25 µl/min. Assotsiatsioonikiirused (k<sub>on</sub>) ja dissotsiatsioonikiirused (k<sub>off</sub>) arvutatakse, kasutades lihtsat Langmuiri üks-ühele seondumise mudelit (BIAcore hindamistarkvara versioon 3.2) assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonisensorprogrammide samaaegse sobitamise abil. Tasakaalulise dissotsiatsiooni konstant (K<sub>d</sub>) arvutatakse k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub> suhtena, vt näiteks Chen, Y. et al., (1999) *J. Mol. Biol.*, 293:865-881. Kui eeltoodud pinnaplasmonresonantsi testis assotsiatsioonikiirus ületab 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>S<sup>-1</sup>, saab assotsiatsioonikiiruse määrata fluorestsentsi kustutamise meetodil, kus mõõdetakse 20 nM antigeenivastase antikeha (Fab-vormis) PBS-s, pH 7,2, lahuse fluorestsentskiirguse kasvamist või kahanemist (ergastus = 265 nm, kiirgus = 340 nm, 16 nm ribapääs) 25 °C juures kasvavates kontsentratsioonides antigeeni juuresolekul, kusjuures kontsentratsioone mõõdetakse spektromeetris,

näiteks *stop-flow* seadmega varustatud spektrofotomeetris (Aviv Instruments) või seeria 8000 SLM-Aminco spektrofotomeetris (ThermoSpectronics) küvetis segamisega.

[0121] Käesolevale leiutisele vastavat „assotsiatsioonikiirust“ ehk „ $k_{on}$ “ saab määrata sama eespool kirjeldatud pinnaplasmonresonantstehnika abil, kasutades BIAcore™-2000 või BIAcore™-3000 (BIAcore Inc., Piscataway, NJ) 25 °C juures koos immobiliseeritud antigeeni ~ 10 vastusühikuga (RU) CM5 kiipidega. Lühidalt öeldes aktiveeritakse karboksümetüülitud dekstraan-biosensorkiibid (CM5, BIAcore Inc.) N-etüül-N’-(3-dimetüülaminopropüül)karbodiimiidhüdrokloriidi (EDC) ja N-hüdoksüsuktsiinimiidiga (NHS) vastavalt tarnija juhendile. Antigeen lahjendatakse 10 mM naatriumatsetaadiga, pH 4,8, kontsentratsioonini 5 µg/ml (~ 0,2 µM) enne süstimist kiirusel 5 µl/min, et saavutada umbes 10 sidestatud valgust vastusühikut (RU). Pärast antigeeni süstimist süstitakse reageerimata rühmade blokeerimiseks 1 M etanoolamiini. Kineetilisteks mõõtmisteks süstitakse Fab kahekordsed seerialahjendused (0,78 nM kuni 500 nM) PBS-s koos 0,05% Tween-20-ga (PBST) 25 °C juures voolukiirusel umbes 25 µl/min. Assotsiatsioonikiirused ( $k_{on}$ ) ja dissotsiatsioonikiirused ( $k_{off}$ ) arvutatakse, kasutades lihtsat Langmuiri üks-ühele seondumise mudelit (BIAcore hindamistarkvara versioon 3.2) assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonisensorgrammide samaaegse sobitamise abil. Tasakaalulise dissotsiatsiooni konstant ( $K_d$ ) arvutatakse  $k_{off}/k_{on}$  suhtena, vt näiteks Chen, Y. et al., (1999) J. Mol. Biol., 293:865-881. Kui aga eeltoodud pinnaplasmonresonantsi testis assotsiatsioonikiirus ületab  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ , määratakse assotsiatsioonikiirus eelistatult fluorestsentsi kustutamise meetodil, kus mõõdetakse 20 nM antigeenivastase antikeha (Fab-vormis) PBS-s, pH 7,2, lahuse fluorestsentskiirguse kasvamist või kahanemist (ergastus = 265 nm, kiirgus = 340 nm, 16 nm ribapääs) 25 °C juures kasvavates kontsentratsioonides antigeeni juuresolekul, kusjuures kontsentratsioone mõõdetakse spektromeetris, näiteks *stop-flow* seadmega varustatud spektrofotomeetris (Aviv Instruments) või seeria 8000 SLM-Aminco spektrofotomeetris (ThermoSpectronics) küvetis segamisega. Sellele leiutisele vastav „ $K_d$ “ või „ $K_d$ -väärtus“ mõõdetakse leiutise ühes teostuses radioaktiivselt märgistatud antigeeni sidumise testis (RIA), mis viiakse antikeha Fab versiooni ja antigeeni molekuliga läbi nii, nagu on kirjeldatud järgnevas testis, kus mõõdetakse Fab ja antigeeni seondumise afiinsust lahuses, tasakaalustades Fab-i minimaalse kontsentratsiooni ( $^{125}\text{I}$ )-märgistatud antigeeniga tiitritava märgistamata antigeeni seeriaste juuresolekul ja püüdes seejärel seondunud antigeeni Fab-vastase antikehaga kaetud plaadile (Chen et al., (1999) J. Mol. Biol., 293:865-881). Testi tingimuste määramiseks kaetakse mikrotiiterplaadid (Dynex) üle öö 5 µg/ml kont-

sentratsioonis Fab-vastase püüdur-antikehaga (Cappel Labs) 50 mM naatriumkarbonaadis (pH 9,6) ja blokeeritakse seejärel 2% (massiosa mahuosas) veise seerumi albumiini lahusega PBS-s kahe kuni viie tunni jooksul toatemperatuuril (umbes 23 °C). Mitteabsorbeerival plaadil (Nunc # 269620) segatakse 100 pM või 26 pM [<sup>125</sup>I]-antigeen seerialahjendustes huvialuse Fab-ga (näiteks kooskõlas VEGF-vastase antikeha Fab-12 hindamisega artiklis: Presta et al., (1997) *Cancer Res.*, 57:4593-4599). Seejärel inkubeeritakse huvialust Fab-i üle öö, aga inkubatsioon võib kesta ka kauem (näiteks 65 tundi), et kindlustada tasakaalu saabumine. Siis kantakse segud üle püüdurplaadile tunniajaliseks inkubeerimiseks toatemperatuuril. Seejärel eemaldatakse lahus ja plaate pestakse kaheksa korda 0,1% Tween-20 lahusega PBS-s. Kui plaadid on kuivanud, lisatakse süvendi kohta 150 µl stsintillaatorit (MicroScint-20, Packard) ja plaate loendatakse kümme minutit Topcount gammaloenduris (Packard).

[0122] Ühes teostuses määratakse „assotsiatsioonikiirus“ ehk „ $k_{on}$ “ sama eespool kirjeldatud pinnaplasmonresonantstehnika abil, kasutades BIAcore™-2000 või BIAcore™-3000 (BIAcore Inc., Piscataway, NJ) 25 °C juures koos immobiliseeritud antigeeni ~ 10 vastusühikuga (RU)CM5 kiipidega. Lühidalt öeldes aktiveeritakse karboksümetüülitud dekstraanbiosensorkiibid (CM5, BIAcore Inc.) N-etüül-N'-(3-dimetüülaminopropüül)karbodiimiidhüdrokloriidi (EDC) ja N-hüdroksütsütsiinimiidiga (NHS) vastavalt tarnija juhendile. Antigeen lahjendatakse 10 mM naatriumatsetaadiga, pH 4,8, kontsentratsioonini 5 µg/ml (~ 0,2 µM) enne süstimist kiirusel 5 µl/min, et saavutada umbes 10 sidestatud valgu vastusühikut (RU). Pärast antigeeni süstimist süstitakse reageerimata rühmade blokeerimiseks 1 M etanoolamiini. Kineetilisteks mõõtmisteks süstitakse Fab kahekordsed seerialahjendused (0,78 nM kuni 500 nM) PBS-s koos 0,05% Tween-20-ga (PBST) 25 °C juures voolukiirusel umbes 25 µl/min. Assotsiatsioonikiirused ( $k_{on}$ ) ja dissotsiatsioonikiirused ( $k_{off}$ ) arvutatakse, kasutades lihtsat Langmuiri üks-ühele seondumise mudelit (BIAcore hindamistarkvara versioon 3.2) assotsiatsiooni- ja dissotsiatsioonisensorgrammide samaaegse sobitamise abil. Tasakaalulise dissotsiatsiooni konstant ( $K_d$ ) arvutatakse  $k_{off}/k_{on}$  suhtena, vt näiteks Chen, Y. et al., (1999) *J. Mol. Biol.*, 293:865-881. Kui aga eeltoodud pinnaplasmonresonantsi testis assotsiatsioonikiirus ületab  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ , määratakse assotsiatsioonikiirus eelistatult fluorestsentsi kustutamise meetodil, kus mõõdetakse 20 nM antigeenivastase antikeha (Fab-vormis) PBS-s, pH 7,2, lahuse fluorestsentskiirguse kasvamist või kahanemist (ergastus = 265 nm, kiirgus = 340 nm, 16 nm ribapääs) 25 °C juures kasvavates kontsentratsioonides antigeeni juuresolekul, kusjuures kontsentratsioone mõõdetakse spektromeetris, näiteks *stop-flow* sead-

mega varustatud spektrofotomeetris (Aviv Instruments) või seeria 8000 SLM-Aminco spektrofotomeetris (ThermoSpectronics) küvetis segamisega.

[0123] Fraas „oluliselt vähenenud“ või „oluliselt erinev“ märgib siin kasutatuna piisavalt kõrget erinevuse taset kahe numbrilise väärtuse vahel (millest üks on üldiselt seotud leiutisekohase antikehaga ja teine on seotud referents-/võrdlusantikehaga), nii et eriala asjatundja saab pidada kahe väärtuse erinevust nimetatud väärtuste (näiteks Kd väärtuste, HAMA vastuse) abil mõõdetud bioloogiliste tunnuste kontekstis statistiliselt oluliseks. Kahe nimetatud väärtuse erinevus funktsioonina referents-/võrdlusantikeha väärtusest on eelistatult suurem kui umbes 10%, eelistatult suurem kui umbes 20%, eelistatult suurem kui umbes 30%, eelistatult suurem kui umbes 40%, eelistatult suurem kui umbes 50%.

[0124] „Aminohapete järjestuste protsendiline (%) identsus“ peptiid- või polüpeptiidjärjestuse suhtes defineeritakse kandidaatjärjestuses olevate aminohappejääkide protsendina, mis on identsed aminohappejääkidega spetsiifilises peptiid- või polüpeptiidjärjestuses pärast järjestuste joondamist ja vajadusel tühikute sisseviimist, et saavutada maksimaalne järjestuste protsendiline identsus, arvestamata ühtki konservatiivset asendust järjestuste identsuse osana. Aminohapete järjestuste protsendilise identsuse määramiseks tehtava joonduse võib saavutada eriala spetsialistile teadaolevatel erinevatel viisidel, näiteks kasutades avalikult saadavat arvutitarkvara, nagu BLAST, BLAST-2, ALIGN või Megalign (DNASTAR) tarkvara. Eriala asjatundja saab määrata joonduse mõõtmiseks sobivad parameetrid, kaasa arvatud algoritmid, mis on vajalikud võrreldavate täispikkade järjestuste maksimaalse joonduse saavutamiseks. Siinsetel eesmärkidel saadakse aga aminohapete järjestuse identsuse protsendilise väärtused, kasutades järjestuste võrdlemise arvutiprogrammi ALIGN-2, kusjuures ALIGN-2 programmi täielik allikakood on esitatud alltoodud tabelis A. ALIGN-2 järjestuste võrdlemise programmi autor on Genetech Inc. ning alltoodud tabelis A näidatud allikakood esitati koos kasutaja dokumentatsiooniga USA Autoriõiguse Ametile (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, kus see registreeriti USA autoriõiguse registreerimisnumbriga TXU510087. ALIGN-2 programm on avalikult saadav firmast Genentech, Inc., South San Francisco, California, või võib selle kompileerida alltoodud joonisel 8 esitatud allikakoodist. ALIGN-2 programm tuleb kompileerida kasutamiseks operatsioonisüsteemis UNIX, eelistatult digitaalses operatsioonisüsteemis UNIX V4.0D. Kõik järjestuste võrdlemise parameetrid seatakse ALIGN-2 programmi abil ja need ei varieeru.



[0125] Olukordades, kus ALIGN-2 programmi kasutatakse aminohapete järjestuste võrdlemiseks, arvutatakse antud aminohapete järjestuse A protsendiline identsus antud aminohapete järjestuse B suhtes (mis võib alternatiivselt olla väljendatud antud aminohapete järjetusena A, mis sisaldab teatud aminohapete järjestuse protsendilist identsust antud aminohapete järjestusega B) järgmiselt:

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

kus X on nende aminohappejääkide koguarv, mis annavad ideaalse kokkulangevuse järjestuste joondamise programmi ALIGN-2 abil selle programmi A ja B joonduses, ja kus Y on järjestuses B olevate aminohappejääkide koguarv. On mõistetav, et kui aminohapete järjestuse A pikkus ei ole võrdne aminohapete järjestuse B pikkusega, siis ei ole A ja B aminohapete järjestuste protsendiline identsus võrdne B ja A aminohapete järjestuste protsendilise identsusega.

[0126] Kui spetsiifiliselt ei väideta teisiti, saadakse kõik siin kasutatavad aminohapete järjestuste protsendilise identsuse väärtused nii, nagu on kirjeldatud sellele lõigule vahetult eelnevas lõigus, kasutades ALIGN-2 arvutiprogrammi.

**Table A**

```

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

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

```

```

/* H */ {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */ {0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */ {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */ {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */ {0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ {1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */ {0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */ {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */ {1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */ {1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */ {0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ {0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */ {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */ {0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */ {0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};

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

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

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

```

```

#define PINS1      4      /* penalty per residue */

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

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

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

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

```

```

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

```

```

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

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

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

main(ac, av)
    int    ac;
    char   *av[];

```

**main**

```

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

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

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

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

```

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/

```

```

nw()

```

```

nw

```

```

{

```

```

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

```

```
dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
```

```

ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

```

```
smax = -10000;
```

```
if (endgaps) {
```

```

    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }

```

```
col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
```

```
}
```

```
else
```

```

    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

```

```
/* fill in match matrix
```

```
*/
```

```
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
```

```

    /* initialize first entry in col

```

```

    */

```

```

if (endgaps) {
    if (xx == 1)
        col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
    else
        col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
    ndelx = xx;
}
else {
    col1[0] = 0;
    delx = -ins0;
    ndelx = 0;
}

...nw

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

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

```

```

        ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
}

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

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

```

...nw

```

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

```



```

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

```

```

        if (col1[yy] > smax) {
            smax = col1[yy];
            dmax = id;
        }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);    }

/*
*
* print() -- only routine visible outside this module
*
* static:
* getmat() -- trace back best path, count matches: print()
* pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
* dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
* nums() -- put out a number line: dumpblock()
* putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
* stars() -- put a line of stars: dumpblock()
* stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
*/

#include "nw.h"

#define SPC    3
#define P_LINE    256    /* maximum output line */

```

```

#define P_SPC 3      /* space between name or num and seq */

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

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

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

```

print

```

    pr_align();
}

```

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
    double   pct;
    register      n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;

```

```

        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbrm[*p0-'A']&xbrm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}

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

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
...getmat

```

```

fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static nm;          /* matches in core -- for checking */
static lmax;       /* lengths of stripped file names */
static ij[2];      /* jmp index for a path */
static nc[2];      /* number at start of current line */
static ni[2];      /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2]; /* ptr to current element */
static char *po[2]; /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
* print alignment of described in struct path pp[]
*/

```

```

static
pr_align()
{
    int      nn; /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }

    for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {
        for (i = more = 0; i < 2; i++) {
            /*
             * do we have more of this sequence?
             */
            if (!*ps[i])
                continue;

            more++;

            if (pp[i].spc) { /* leading space */
                *po[i]++ = ' ';
                ppl[i].spc--;
            }
            else if (siz[i]) { /* in a gap */
                *po[i]++ = '-';
                siz[i]--;
            }
        }
    }
}

```

pr\_align

...pr\_align

```

else {          /* we're putting a seq element
                */
    *po[i] = *ps[i];
    if (islower(*ps[i]))
        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
    po[i]++;
    ps[i]++;

    /*
     * are we at next gap for this seq?
     */
    if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
        /*
         * we need to merge all gaps
         * at this location
         */
        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
            siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
    }
    ni[i]++;
}
}
if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock();
    for (i = 0; i < 2; i++)
        po[i] = out[i];
    nn = 0;
}
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
dumpblock

```



```

{
    register    i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';

...dumpblock

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

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int    ix;    /* index in out[] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';

```

```

for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
    if (*py == ' ' || *py == '\n')
        *pn = ' ';
    else {
        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
            j = (i < 0)? -i : i;
            for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                *px = j%10 + '0';
            if (i < 0)
                *px = '-';
        }
        else
            *pn = ' ';
        i++;
    }
}
*pn = '\0';
nc[ix] = i;
for (pn = nline; *pn; pn++)
    (void) putc(*pn, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                putline
    int    ix;                               {

                                            ...putline

    int    i;
    register char *px;

    for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != '\n'; px++, i++)
        (void) putc(*px, fx);
}

```

```

for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

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

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

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

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

```

```

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

```

```

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

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_alloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup();                            /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                cleanup
{
    int i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)                          getseq
{
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
}

```

```

char        line[1024], *pseq;
register char *px, *py;
int         natgc, tlen;
FILE        *fp;

if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
    fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
    exit(1);
}
tlen = natgc = 0;
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++)
        if (isupper(*px) || islower(*px))
            tlen++;
}
if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
    fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
    exit(1);
}
pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))

```

```

        *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU",*(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (flen/3);
return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(msg, nx, sz)                                g_alloc
    char *msg; /* program, calling routine */
    int nx, sz; /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
* get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
*/
readjmps()                                        readjmps
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

```

```

if (fj) {
    (void) fclose(fj);
    if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
        cleanup(1);
    }
}
for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
    while (1) {
        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
            ;

                                                    ...readjmps
        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }
        else
            break;
    }
    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1
            */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        }
    }
}

```



```

        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jmps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}
}

```

```

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

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

```

[0127] Termin „vektor“ on siin kasutatuna mõeldud tähendama nukleiinhappemolekuli, mis on võimeline transportima teist nukleiinhapet, millega ta on ühendatud. Üks vektoritüüp on „plasmiid“, mis tähendab tsirkulaarset kaheahelalist DNA-silmust, millesse võib ligeerida täiendavaid DNA-segmente. Teine vektoritüüp on faagivektor. Järgmine vektoritüüp on viirusvektor, kus täiendavad DNA-segendid võivad olla ligeeritud viiruse genoomi. Teatud vektorid on võimelised replitseerima selles peremeesrakus, millesse nad on viidud (näiteks bakteriaalset replikatsiooni alguspunkti sisaldavad bakteriaalsed vektorid ja episomaalsed imetajavektorid). Teised vektorid (näiteks mitte-episomaalsed imetajavektorid) võivad peremeesrakku viimisel integreeruda peremeesraku genoomi ja seetõttu replitseeruda koos peremeesgenoomiga. Lisaks on teatud vektorid suutelised suunama nende geenide ekspressiooni, millega nad on juhitavalt seotud. Selliseid vektoreid nimetatakse siin „rekombinantseteks ekspressioonivektoriteks“ (või lihtsalt „rekombinantseteks vektoriteks“). Üldiselt on rekombinantseks DNA tehnikaks kasulikud ekspressioonivektorid sageli plasmidi vormis. Käes-

olevas kirjelduss võib termineid „plasmiid“ ja „vektor“ kasutada vastastikku vahetatavatena, kuna plasmiid on kõige tavalisemalt kasutatav vektorivorm.

[0128] Terminid „polünukleotiid“ ja „nukleiinhape“, mida siin kasutatakse vastastikku vahetatavatena, tähendavad ükskõik missuguse pikkusega nukleotiididest koosnevaid polümeere, kaasa arvatud DNA ja RNA. Nukleotiidid võivad olla desoksüribonukleotiidid, ribonukleotiidid, modifitseeritud nukleotiidid või nukleotiidalused ja/või nende analoogid või ükskõik missugune substraat, mida saab polümeeri liita DNA või RNA polümeraasi abil või sünteesireaktsiooni abil. Polünukleotiid võib sisaldada modifitseeritud nukleotide, nagu metüülitud nukleotiidid ja nende analoogid. Modifikatsioonide esinemisel võib nukleotiidi struktuurile anda modifikatsiooni kas enne või pärast polümeeri kokkupanekut. Nukleotiidjärjestus võib olla katkestatud mittenukleotiidsete komponentidega. Polünukleotiidi võib pärast sünteesi täiendavalt modifitseerida, näiteks märgisega konjugeerimise abil. Teiste modifikatsioonide hulka kuuluvad näiteks „mütsid“ („caps“), ühe või mitme looduslikult esineva nukleotiidi asendamine selle analoogiga, nukleotiididevahelised modifikatsioonid, nagu näiteks laenguta sidemetega polünukleotiidid (näiteks metüülfosfonaadid, fosfotriestrid, fosfoamidaadid, karbamaadid jne) ja laenguga sidemetega polünukleotiidid (näiteks fosforotioaadid, fosforoditioaadid jne), ripats-osamolekule, nagu näiteks valke (näiteks nukleaase, toksiiine, antikehi, signaalpeptiide, polü-L-lüsiini jne) sisaldavad polünukleotiidid, interkalaatoreid (näiteks akriidiini, psoraleeni jne.) sisaldavad polünukleotiidid, kelaatijaid (näiteks metalle, radioaktiivseid metalle, boori, oksüdeerivaid metalle jne) sisaldavad polünukleotiidid, alküüljaid sisaldavad polünukleotiidid, modifitseeritud sidemeid sisaldavad polünukleotiidid (näiteks alfa-anomeersed nukleiinhapped jne.), samuti polünukleotiidi(de) modifitseerimata vormid. Lisaks võib kõiki tavaliselt suhkrutes esinevaid hüdroksüülrühmi asendada näiteks fosfonaatrühmade, fosfaatrühmadega, kaitsta standardsete kaitserühmadega või aktiveerida täiendavatele nukleotiididele lisasidemete tegemiseks või konjugeerida pooltahketele või tahketele kandjatele. 5'- ja 3'-terminaalseid OH-rühmi võib fosforüülida või asendada amiinide või 1 kuni 20 süsinikuaatomiga „mütsi“ andvate rühmadega orgaaniliste osamolekulidega. Ka teisi hüdroksüülrühmi võib derivaatida standardseteks kaitserühmadeks. Polünukleotiidid võivad sisaldada ka riboos- või desoksüriboosuhkrutega analoogseid vorme, mis on tehnika tasemest tuntud, näiteks 2'-O-metüül-, 2'-O-allüül-, 2'-fluoro- või 2'-asidoriboosi, karbotsüklilisi suhkruanalooge, alfa-anomeerseid suhkruid, epimeerseid suhkruid, nagu arabiinose, ksüloose või lüksoose, püranoos-suhkruid, furanoos-suhkruid, sedoheptuloose, atsüklilisi analooge ja

nukleotiidalust mittesisaldavaid (*abasic*) nukleosiidanalooge nagu metüülribosiid. Ühe või mitu fosfodiestersidet võib asendada alternatiivsete ühendavate rühmadega. Nende alternatiivsete ühendavate rühmade hulka kuuluvad, kuid nendega piirdumata, teostused, kus fosfaatrühm on asendatud P(O)S ("tioaat-"), P(S)S ("ditioaat-"), "(O)NR<sub>2</sub>" ("amidaat-"), P(O)R, P(O)OR', CO või CH<sub>2</sub> ("formatsetaal-") rühmaga, kus iga R või R' on sõltumatult H või asendatud või asendamata alküülrühm (1-20 C), mis valikuliselt sisaldab eetersidet (-O-), arüül-, alkenüül-, tsükloalküül-, tsükloalkenüül- või aralküülrühma. Mitte kõik sidemed polünukleotiidis ei tarvitse olla identsed. Eelnev kirjeldus rakendub kõigile siin nimetatud polünukleotiididele, kaasa arvatud RNA ja DNA.

[0129] „Oligonukleotiid“ tähendab siin kasutatuna lühikesi, üldiselt üheaheelalisi, üldiselt sünteetilisi polünukleotiide, mis on üldiselt, kuid mitte tingimata, pikkuselt lühemad kui umbes 200 nukleotiidi. Terminid „oligonukleotiid“ ja „polünukleotiid“ ei ole teineteist välistavad. Ülaltoodud polünukleotiidide kirjeldus on samavõrra ja täielikult rakendatav ka oligonukleotiididele.

[0130] Termineid „antikeha“ ja „immunoglobuliin“ kasutatakse vastastikku vahetatavatena kõige laiemas mõttes ja need hõlmavad monokloonseid antikehi (näiteks täispikki või intaktseid monokloonseid antikehi), polükloonseid antikehi, multivalentseid antikehi, multispetsiifilisi antikehi (näiteks bispetsiifilisi antikehi, kuni nad on soovitud bioloogilise aktiivsusega) ja nende hulka võivad kuuluda ka teatud antikehafragmendid (nagu siin detailsemalt on kirjeldatud). Antikeha võib olla inimese oma, humaniseeritud ja/või afiinselt küpsenud.

[0131] „Antikehafragmendid“ sisaldavad ainult osa intaktsest antikehast, kusjuures eelistatult säilitab see osa vähemalt ühe, eelistatult enamiku või kõik funktsioonid, mis on intaktse antikehas selle osaga seotud. Ühes teostuses sisaldab antikehafragment intaktse antikeha sidumissaiti ja säilitab seega antigeeniga seondumise võime. Teises teostuses säilitab antikehafragment, näiteks selline, mis sisaldab Fc-piirkonda, vähemalt ühe bioloogilistest funktsioonidest, mis tavaliselt on seotud intaktse antikehas oleva Fc-piirkonnaga, näiteks FcRn sidumise, antikeha poolväärtusaja moduleerimise, ADCC funktsiooni ja komplemendi sidumise. Ühes teostuses on antikehafragment monovalentne antikeha, mille *in vivo* poolväärtusaeg on praktiliselt samasugune kui intaktse antikehal. Näiteks võib selline antikehafragment sisaldada antigeeni siduvat õlga, mis on ühendatud Fc-järjestusega, mis on suuteline andma fragmendile *in vivo* stabiilsuse.

[0132] Termin „monokloonne antikeha“ tähendab siin kasutatuna antikeha, mis on saadud praktiliselt homogeensete antikehade populatsioonist, s.t populatsioonis sisalduvad individuaalsed antikehad on identsed, kuid nende hulgas võib vähesel hulgal esineda võimalikke looduslikult toimuvaid mutatsioone. Monokloonsed antikehad on väga spetsiifilised, olles suunatud ainsa antigeeni vastu. Lisaks on iga monokloonne antikeha suunatud antigeeni ainsa determinandi (epitoobi) vastu vastupidiselt polükloonsete antikehade preparaatidele, mis tüüpiliselt sisaldavad erinevate determinantide vastu suunatud erinevaid antikehi.

[0133] Monokloonsed antikehad hõlmavad siin spetsiifiliselt „kimäärseid“ antikehi, milles osa raskest ja/või kergest ahelast on identne või homoloogne vastava järjestusega nendes antikehades, mis pärinevad konkreetsest liigist või kuuluvad konkreetseesse antikehade klassi või alaklassi, samas kui ülejäänud ahel(ad) on identne (identsed) või homoloogne (homoloogsed) vastavate järjestusega antikehades, mis pärinevad erinevatest liikidest või kuuluvad teise antikehade klassi või alaklassi, samuti nende antikehade fragmente seni, kuni neil on soovitud bioloogilised omadused (US patent 4816567, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

[0134] Mitte-inimese (näiteks närilise) antikehade „humaniseeritud“ vormid on kimäärseid antikehad, mis sisaldavad minimaalset järjestust, mis pärineb mitte-inimese immunoglobuliinist. Suuremas osas on humaniseeritud antikehad inimese immunoglobuliinid (retsipient-antikehad), milles retsiptiendi hüpervarieeruvast osast pärinevad jäägid on asendatud inimesest erineva liigi, nagu hiir, rott, küülik, või inimesest erineva primaadi antikeha (doonor-antikeha), millel on soovitud spetsiifilisus, afiinsus ja tugevus, hüpervarieeruvast piirkonnast pärinevate jääkidega. Mõnel juhul on inimese immunoglobuliini raamistikupiirkonna (*framework region*, FR) jäägid asendatud vastavate mitte-inimese järjestustega. Lisaks võivad humaniseeritud antikehad sisaldada jääke, mida ei esine retsiptient-antikehas ega doonor-antikehas. Need modifikatsioonid tehakse antikeha toimimise täiendavaks parendamiseks. Üldiselt sisaldab humaniseeritud antikeha praktiliselt täielikult vähemalt ühte, tüüpiliselt kahte varieeruvat piirkonda, milles kõik või praktiliselt kõik hüpervarieeruvad silmused vastavad mitte-inimese immunoglobuliinile ja kõik või praktiliselt kõik FR-d on inimese immunoglobuliinjärjestuse FR-d. Humaniseeritud antikeha sisaldab valikuliselt ka vähemalt osa immunoglobuliini konstantsest piirkonnas (Fc), tüüpiliselt inimese immunoglobuliinist. Lisadetaile vaadake teosest 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 ja nendes 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).

[0135] „Antigeen“ on ettemääratud antigeen, millega antikeha võib selektiivselt seonduda. Sihtmärkantigeen võib olla polüpeptiid, süsivesik, nukleiinhape, lipiid, hapteen või mõni muu looduslikult esinev või sünteetiline ühend. Eelistatult on sihtmärkantigeen polüpeptiid. „Inimese aktseptor-raamistik“ on siinsetel eesmärkidel raamistik, mis sisaldab inimese immunoglobuliini raamistikust või inimese konsensusraamistikust pärinevat VL- või VH-raamistiku aminohapete järjestust. Inimese aktseptor-raamistik, mis „pärib“ inimese immunoglobuliini raamistikust või inimese konsensusraamistikust, võib sisaldada sellega samasugust aminohapete järjestust või sisaldada eelnevalt olemasolevaid aminohapete järjestuse muutusi. Kui eelnevalt on olemas aminohappe muutused, on neid eelistatult mitte rohkem kui 5, eelistatult 4 või vähem või siis eelistatult 3 või vähem. Kui eelnevalt olemasolevad aminohappe muutused esinevad VH-s, on neid muutusi eelistatult ainult kolmes, kahes või ühes asenditest 71H, 73H ja 78H, näiteks nendes asendites võivad olla aminohapped 71A, 73T ja/või 78A. Ühes teostuses on inimese VL-aktseptor-raamistiku konsensusjärjestus identne inimese immunoglobuliini VL-raamistikujärjestuse või inimese raamistiku konsensusjärjestusega.

[0136] „Inimese konsensusraamistik“ on raamistik, mis vastab inimese valitud immunoglobuliini VL- või VH-raamistikujärjestustes kõige tavalisemalt esinevatele aminohappejääkidele. Üldiselt valitakse inimese immunoglobuliini VL- või VH-järjestused varieeruva domeeni järjestuste alarühmast. Üldiselt on järjestuste alarühm Kabat'i jt alarühm. Ühes teostuses on VL-alarühm Kabat'i jt kapa I alarühm. Ühes teostuses on VH-alarühm Kabat'i jt alarühm III.

[0137] „VL-alarühma I konsensusraamistik“ sisaldab Kabat'i jt varieeruva kerge kapa alarühma I aminohapete järjestustest saadud konsensusjärjestust. Ühes teostuses sisaldab VL-alarühma I raamistiku konsensusjärjestus vähemalt osa või kõiki järgnevatest järjestustest:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO: 34)-L1-WYQQKPGKAPKLLI (SEQ ID NO: 35)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 36)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 37).

[0138] „VH-alarühma III konsensusraamistik“ sisaldab Kabat'i jt varieeruva raske alarühma III aminohapete järjestustest saadud konsensusjärjestust. Ühes teostuses sisaldab VH-alarühma III raamistiku konsensusjärjestus vähemalt osa või kõiki järgnevatest järjestustest:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 38)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 39)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 40)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

[0139] „Inimese modifitseerimata raamistik“ on inimese raamistik, millel on sama aminohapete järjestus kui inimese aktseptor-raamistikul, s.t selles puudub (puuduvad) inimese aktseptor-raamistiku järjestusse tehtud mitte-inimese järjestusele vastav(ad) aminohappe asendus(ed).

[0140] „Muudetud hüpervarieeruv piirkond“ on siinsetel eesmärkidel hüpervarieeruv piirkond, mis sisaldab ühte või mitut (näiteks ühte kuni 16) aminohappe asendust.

[0141] „Modifitseeritud hüpervarieeruv piirkond“ on siinsetel eesmärkidel hüpervarieeruv piirkond, mis sisaldab samasugust aminohapete järjestust kui mitte-inimese antikeha, millest ta pärineb, s.t milles üks või mitu aminohappe asendust puuduvad.

[0142] Terminid „hüpervarieeruv piirkond“, „HVR“ või „HV“ tähendavad siin kasutatuna antikeha varieeruva domeeni piirkondi, mis on järjestuse ja/või struktuuri poolest defineeritud lingude suhtes hüpervarieeruvad. Üldiselt sisaldavad antikehad kuut hüpervarieeruvat piirkonda: kolme VH-s (H1, H2 ja H3) ja kolme VL-s (L1, L2 ja L3). Kasutusel on palju hüpervarieeruva piirkonna täpseid kirjeldusi ja need on siin hõlmatud. Kabat'i komplementaarsust määravad piirkonnad (*Complementarity Determining Regions, CDR*) põhinevad järjestuse varieeruvusel ja on kõige tavalisemalt kasutatavad (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5. väljaanne. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia viitab selle asemel struktuursete lingude paiknemisele (Chothia, Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). AbM hüpervarieeruvad piirkonnad esindavad kompromissi Kabat'i CDR-de ja Chothia struktuursete lingude vahel ja neid kasutatakse firma Oxford Molecular Ltd. antikehade modelleerimise tarkvara AbM puhul. Hüpervarieeruvad „kontaktpiirkonnad“ põhinevad saadavate komplekside kristallstruktuuridel. Kõigi nende hüpervarieeruvate piirkondade jäägid on märgitud allpool.

Tabel 1

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

[0143] Hüpervarieeruvad piirkonnad võivad sisaldada järgnevaid „laiendatud piirkondi“: 24-36 või 24-34 (L1), 46-56 või 49-56 või 50-56 või 52-56 (L2) ja 89-97 (L3) VL-s ning 26-35 (H1), 50-65 või 49-65 (H2) ja 93-102, 94-102 või 95-102 (H3) VH-s. Kõigi nende definitsioonide puhul on varieeruva domeeni jäägid nummerdatud Kabat'i jt, *supra*, järgi.

[0144] „Raamistiku“ ehk „FR“ jäägid on need varieeruva domeeni jäägid, mis ei ole siin defineeritud hüpervarieeruva piirkonna jäägid.

[0145] „Inimese antikeha“ on see, mille aminohapete järjestus vastab sellele antikehale, mida toodetakse inimese organismis ja/või mis on valmistatud ükskõik missugusel siin avaldatud inimese antikehade valmistamise meetodil. See inimese antikeha definitsioon välistab spetsiifiliselt humaniseeritud antikeha, mis sisaldab mitte-inimese antigeeni siduvaid jääke.

[0146] „Afiinselt küpsenud“ antikeha on antikeha, mille ühes või mitmes CDR-s on üks või mitu muutust, mis annavad tulemuseks antikeha afiinsuse parenemise antigeeni suhtes võrreldes algse antikehaga, milles seda muutust (neid muutusi) ei ole. Eelistatud afiinselt küpsenud antikehadel on sihtmärkantigeeni suhtes nanomolaarne või isegi pikomolaarne afiinsus. Afiinselt küpsenud antikehi toodetakse tehnika tasemest tuntud protseduuride abil. Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), kirjeldavad afiinset küpsemist VH- ja VL-domeenide nihutamise abil. CDR ja/või raamistikujääkide juhuslikku mutageneesi on kirjeldanud Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813 (1994), Schier et al., *Gene*, 169:147-



155 (1995), Yelton et al., J. Immunol., 155:1994-2004 (1995), Jackson et al., J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995), ja Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992).

[0147] „Blokeeriv“ antikeha või „antagonist-“antikeha on selline, mis inhibeerib või vähendab selle antigeeni bioloogilist aktiivsust, millega ta seondub. Eelistatud blokeerivad antikehad või antagonist-antikehad inhibeerivad antigeeni bioloogilise aktiivsuse praktiliselt või täielikult.

[0148] „Agonist-antikeha“ on siin kasutatuna antikeha, mis aimab järele vähemalt ühte huvi-aluse polüpeptiidi funktsionaalsetest aktiivsustest.

[0149] „Häire“ on ükskõik missugune seisund, mille puhul on kasu leiutisekohase aine/molekuliga ravimisest või leiutisekohasel meetodil ravimisest. See hõlmab kroonilisi ja ägedaid seisundeid või haigusi, kaasa arvatud sellised patoloogilised seisundid, mis loovad imetajal eelsoodumuse kõnealuseks häireks. Siin ravitavate häirete mittepiiravate näidete hulka kuuluvad pahaloomulised ja healoomulised kasvajakasvud, mitteleukeemilised ja lümfoidsed pahaloomulised kasvajakasvud, neuronite, gliia, astrotsüütide, hüpotalamuse ja teised näärmelised häired, makrofaagide, epiteeli, strooma ja blastotsöoli häired ning põletikulised, immunoloogilised ja muud angiogeneesiga seotud häired.

[0150] Termin „immuunseoseline haigus“ tähendab haigust, mille puhul imetaja immuunsüsteemi komponent põhjustab, aineab imetaja haigestumust või panustab sellesse mingil muul moel. See hõlmab ka haigusi, mille puhul immuunvastuse stimuleerimine või sellesse sekkumine avaldab parendavat toimet haiguse progresseerumisele. See termin hõlmab immuunvahendatud põletikulisi haigusi, mitteimmuunvahendatud põletikulisi haigusi, nakkushaigusi, immuunpuudulikkushaigusi, neoplaasiaid jne.

[0151] Immuunseoseliste ja põletikuliste haiguste näidete hulka, millest mõned on vahendatud T-rakkude poolt ja mida võib ravida leiutise kohaselt, kuuluvad süsteemne erütematoosluupus, reumatoidartriit, juveniilne krooniline artriit, spondüloartropaatiad, süsteemne skleroos (sklerodermia), idiopaatilised põletikulised müopatiad (dermatomüosiit, polümüosiit), Sjörgeni sündroom, süsteemne vaskuliit, sarkoidoos, autoimmuunne hemolüütiline aneemia (immuun-pantsütopeenia, paroksüsmaalne öine hemoglobiinuuria), autoimmuunne trombotsütopeenia (idiopaatiline trombotsütopeeniline purpur, immuunvahendatud trombotsütopeenia), türeoidiit (Graves'i tõbi, Hashimoto türeoidiit, juveniilne lümfotsüütiline türeoidiit, atroofiline türeoidiit), suhkurtõbi, immuunvahendatud neeruhaigus (glomerulonefriit, tubulointerstitsiaalne nefriit), kesk- ja perifeerse närvisüsteemi demüelinisatsioonihai-

gused, nagu hulgakoldekõvastumus, idiopaatiline demüeliniseeriv polüneuropaatia ehk Guillaini-Barré sündroom ja krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, hepatobiliaarsed haigused, nagu infektsiooniline hepatiit (hepatiit A, B, C, D, E ja teised mittehepatotroopsed viirused), autoimmuunne krooniline aktiivne hepatiit, primaarne maksatsirroos, granulomatoosne hepatiit ja skleroseeriv kolangiit, põletikuline soolehaigus (haavandiline koliit, Crohni tõbi), gluteenitundlik enteropaatia ja Whipples'i tõbi, autoimmuunsed või immuunvahendatud nahahaigused, kaasa arvatud villilised nahahaigused, multiformne erüteem ja kontaktdermatiit, psoriaas, allergilised haigused, nagu astma, allergiline nohu, atoopiline dermatiit, ülitundlikkus toidu suhtes ja nõgestõbi, immunoloogilised kopsuhaigused, nagu eosinofiilsed kopsupõletikud, idiopaatiline kopsufibroos ja hüpersensitiivsuspneumoniit, transplantatsiooniga seotud haigused, kaasa arvatud transplantaadi hülgamisreaktsioon ja transplantaadi peremehevastane haigus, nakkushaigused, kaasa arvatud viirushaigused, nagu AIDS (HIV-nakkus), hepatiit A, B, C, D ja E, herpes jne, bakteriaalsed infektsioonid, seeninfektsioonid, algloomainfektsioonid ja parasiidi-infektsioonid.

[0152] „Autoimmuunhäire“ või „autoimmuunhaigus“, mida siin kasutatakse vastastikku vahetatavatena, on siin mittepahaloomuline haigus või häire, mis tuleneb indiviidi oma kudedest ja on suunatud nende vastu. Siin kirjeldatavate autoimmuunhaiguste hulgast on spetsiaalselt välja jäetud pahaloomulised haigused või vähihaigused või -seisundid, eelkõige B-rakkude lümfoom, äge lümfoblastleukeemia (*acute lymphoblastic leukemia*, ALL), krooniline lümfotsüütleukeemia (*chronic lymphocytic leukemia*, CLL), karvrakk-leukeemia ja krooniline müeloblastleukeemia. Autoimmuunhaiguste või -häirete hulka kuuluvad, kuid nendega piirdumata, põletikureaktsioonid, nagu põletikulised nahahaigused, kaasa arvatud psoriaas ja dermatiit (näiteks atoopiline dermatiit), süsteemne sklerodermia ja sklerooos, põletikulise soolehaigusega (nagu Crohni tõbi ja haavandiline koliit) seotud reaktsioonid, respiratoorse distressi sündroom (kaasa arvatud täiskasvanute respiratoorse distressi sündroom, ARDS), dermatiit, meningiit, entsefaliit, uveit, koliit, glomerulonefriit, allergilised seisundid, nagu ekseem ja astma, ja muud seisundid, mis hõlmavad T-rakkude infiltratsiooni ja kroonilisi põletikureaktsioone, ateroskleroos, leukotsüütide adhesioonipuudulikkus, reumatoidartriit, süsteemne erütematoosluupus (SLE), suhkurtõbi (näiteks 1. tüüpi suhkurtõbi ehk insuliinisõltuv suhkurtõbi), hulgakoldekõvastumus, Reynaud' sündroom, amutoimmuunne türeoidiit, allergiline entsefalomüeliit, Sjörgeni sündroom, juveniilse algusega diabeet, ning ägeda ja hilineva ülitundlikkusega seotud immuunvastused, mida vahendavad tsütokiinid ja T-lümfot-

süüdid ja mis sageli esinevad tuberkuloosi, sarkoidoosi, polümüosiidi, granulomatoosi ja vaskuliidi puhul, pernitsioosne aneemia (Addisoni tõbi), leukotsüütide diapedeesiga seotud haigused, kesknärvisüsteemi (KNS) põletikuline häire, hulgiorgani kahjustuse sündroom, hemolüütiline aneemia (kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata, krüoglobineemia ehk Coombs'i-positiivne aneemia), raske müasteenia, antigeeni-antikehakehkompleksist vahendatud haigused, glomerulaarse basaalmembraani vastaste antikehadega seotud haigus, fosfolipiidide vastane sündroom, allergiline neuriit, Graves'i tõbi, Lamberti-Eatoni müasteeniline sündroom, villiline pemfigoid, pemfigus, autoimmuunsed polüendokrinopaatiad, Reiteri tõbi, inimese jäikusesündroom, Bechet' tõbi, hiidrakuline arteriit, immuunkomplekside ladestumisest tingitud nefriit, IgA nefropaatia, IgM polüneuropaatiad, immuunne trombotsütopeeniline purpur (ITP) või autoimmuunne trombotsütopeenia jne.

[0153] Termin „gastrointestinaalsed põletikuline häired“ on rühm kroonilisi haigusi, mis põhjustavad limaskestapõletikku ja/või haavandumist. Nii hõlmab see termin põletikulist soolehaigust (näiteks Crohni tõbe, haavandilist koliiti, väljakujunemata koliiti ja infektsioosset koliiti), limaskestapõletikke (näiteks suulimaskesta põletikku, gastrointestinaalset limaskestapõletikku, ninalimaskesta põletikku ja pärasoolepõletikku), nekrotiseerivat enterokoliiti ja söögitorupõletikku.

[0154] Terminid „raku proliferatsioonihäire“ ja „proliferatsioonihäire“ tähendab häireid, mis on mingil määral seotud ebanormaalse rakuproliferatsiooniga. Ühes teostuses on raku proliferatsioonihäire vähk.

[0155] „Kasvaja“ tähendab kõiki kasvajalisi rakukasvu ja proliferatsioonijuhtumeid, kas pahaloomulisi või healoomulisi, ja kõiki vähieelseid rakke ja vähirakke ja –kudesid. Terminid „vähk“, „vähi-“, „raku proliferatsioonihäire“, „proliferatsioonihäire“ ja „kasvaja“ ei ole siinses tähenduses üksteist välistavad.

[0156] Terminid „vähk“ ja „vähi-“ tähendavad või kirjeldavad imetaja füsioloogilist seisundit, mida tüüpiliselt iseloomustab reguleerimata rakukasv/proliferatsioon. Vähi näidete hulka kuuluvad, kuid ei ole nendega piiratud, kartsinoom, lümfoom, blastoom, sarkoom ja leukeemia. Nende vähiliikide täpsemate näidete hulka kuuluvad soomusrakk-vähk, väikserakuline kopsuvähk, mitteväikserakuline kopsuvähk, kopsu adenokartsinoom, kopsu soomusrakk-vähk, kõhukelmevähk, hepatotsellulaarne vähk, gastrointestinaalne vähk, pankreasevähk, glioblastoom, emakakaelavähk, munasarjavähk, maksavähk, põievähk, hepatoom, rinnavähk, käärsoolevähk, kolorektaalvähk, emaka limaskestast või emakavähk, süljenäärme-

kartsinoom, neeruvähk, maksavähk, eesnäärmevähk, häbemevähk, kilpnäärmevähk, maksa-kartsinoom ning erinevat tüüpi pea- ja kaelavähk.

[0157] Angiogeneesi düsregulatsioon võib viia paljudele häiretele, mida saab ravida leiutisekohaste kompositsioonide ja meetoditega. Nende häirete hulka kuuluvad nii mittekasvajalised kui kasvajalised seisundid. Kasvajate hulka kuuluvad, kuid nendega piirdumata, eespool nimetatud kasvajakud. Mittekasvajaliste seisundite hulka kuuluvad, kuid nendega piirdumata, soovimatu või hälbiv hüpertroofia, artriit, reumatoidartriit (RA), psoriaas, psoriaatilised naastud, sarkoidoos, ateroskleroos, aterosklerootilised naastud, diabeetilised ja muud proliferatiivsed retinopaatiad, kaasa arvatud enneaegsete retinopaatia, retrolentaalne fibroplasia, neovaskulaarne glaukoom, eakate maakula degeneratsioon, diabeetiline maakulaturse, sarvkesta neovaskularisatsioon, sarvkesta transplantaadi neovaskularisatsioon, sarvkesta transplantaadi hülgamisreaktsioon, võrkkesta/soonkesta neovaskularisatsioon, silmanurga neovaskularisatsioon (punetus), silma neovaskularisatsioonihaiigus, vaskulaarne restenoos, arteriovenoossed väär moodustised, (AVM), meningioom, hemangioom, angiofibroom, kilpnäärme hüpeplaasiad (kaasa arvatud Graves'i tõbi), sarvkesta ja teiste kudede transplantatsioon, krooniline põletik, kopsupõletik, äge kopsukahjustus / ARDS, sepsis, kopsu primaarne hüpertensioon, pahaloomulised kopsuverejooksud, ajuturse (näiteks akuutse rabanduse / kinnise peavigastuse / traumaga seotud ajuturse), liigesepõletik, pannuse moodustumine RA puhul, luustuv müosiit, hüpertroofiline luumoodustumine, osteoartriit (OA), refraktoorsed astsiidid, polütsüstiline munasarjahaigus, endometriosis, vedelike soontevälise kogunemisega seotud haigused (pankreatiit, kompartmendisündroom, põletused, soolehaigus), emakafibroosid, enneaegsed tuhud, krooniline põletik, nagu IBD (Crohni tõbi ja haavandiline koliit), neerutransplantaadi hülgamisreaktsioon, põletikuline soolehaigus, nefrootiline sündroom, ebasoovitatav või hälbiv (mittevähi) koemassi suurenemine, hemofiilsed liigesed, hüpertroofilised armid, juuksekasvu pidurdumine, Osleri-Weberi sündroom, püogeenne granuloom, retrolentaalsed fibroplaasiad, sklerodermia, trahhoom, vaskulaaradhesioonid, liigesepõletik, dermatiidid, pre-eklampsia, astsiidid, perikardi efusioon (näiteks perikardiidiga seotud) ja pleura efusioon.

[0158] „Ravi“ tähendab siin kasutatuna kliinilist sekkumist katsena mõjutada ravitava indiviidi või raku loomulikku kulgu ning selle võib läbi viia profülaktiliselt või kliinilise patoloogia ravikuuri käigus. Soovitavate ravitoimete hulka kuuluvad haiguse esinemise või taastumise tõkestamine, sümptomite leevendamine, haiguse ükskõik missuguse otsese või kaudse patoloogilise tagajärje vähendamine, metastaaside tõkestamine, haiguse progresseerumise

kiiruse alandamine, haigusseisundi parendamine või leevendamine ning parendatud prognoosi saamine. Mõnedes teostustes kasutatakse leiutisekohaseid antikehi haiguse või häire edasilükkamiseks.

[0159] „Efektiivne kogus“ tähendab ettenähtud annustamise puhul ja ettenähtud aja jooksul soovitud terapeutilise või profülaktilise tulemuse saavutamiseks vajalikku kogust.

[0160] Leiutisekohase aine/molekuli, agonisti või antagonistiga „terapeutiliselt efektiivne kogus“ või varieeruda sõltuvalt sellistest teguritest nagu haigusseisund, indiviidi vanus, sugu ja kehakaal ning aine/molekuli, agonisti või antagonistiga võime indiviidil soovitud vastust esile kutsuda. Samuti on terapeutiliselt efektiivne kogus selline, milles aine/molekuli, agonisti või antagonistiga terapeutiliselt kasulikud toimed kaaluvad üles selle ükskõik missuguse toksilise või kahjuliku toime. „Profülaktiliselt efektiivne kogus“ tähendab ettenähtud annustamise puhul ja ettenähtud aja jooksul soovitud profülaktilise tulemuse saavutamiseks vajalikku kogust. Tavaliselt, kuid mitte tingimata, on profülaktiliselt efektiivne kogus väiksem kui terapeutiliselt efektiivne kogus, kuna profülaktilist annust kasutatakse subjektile enne haigust või selles varases etapis.

[0161] Termin „tsütotoksiline aine“ tähendab siin kasutatuna ainet, mis inhibeerib või tõkestab rakkude funktsioneerimise ja/või põhjustab rakkude hävimise. Termin on mõeldud hõlmama radioaktiivseid isotoope (näiteks  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$  ja Lu radioaktiivsed isotoobid), kemoterapeutilised ained, nagu metotreksaat, adriamütsiin, *vinca*-alkaloidid (vinkristiin, vinblastiin, etoposiid), doksorubitsiin, melfalaan, mitomütsiin C, kloorambutsiil, daunorubitsiin või muud interkaleeruvad ained, ensüümid ja nende fragmendid, nagu nukleolüütilised ensüümid, antibiootikumid ja toksiidid, nagu madalamolekulaarsed toksiidid või bakteriaalse, seene-, taimse või loomse päritoluga ensümaatilised aktiivsed toksiidid, kaasa arvatud nende fragmendid ja/või variandid, ning mitmesugused allpool avaldatud kasvajakasvatajad ja vähivastased ained. Allpool on kirjeldatud ka teisi tsütotoksilisi aineid. Kasvajaline aine põhjustab kasvajakasvatajate hävimist.

[0162] „Kemoterapeutiline aine“ on keemiline ühend, mis on kasulik vähi ravimiseks. Kemoterapeutiliste ainete hulka kuuluvad alküülivad ained, nagu tiotepa ja CYTOXAN® tsüklofosfamiid, alküülsulfonaadid, nagu busulfaan, improsulfaan ja piposulfaan, asiridiinid, nagu bensodopa, karboksivon, meturedopa ja uredopa, etüleeniimiinid ja metüülamiinid, kaasa arvatud altretamiin, trietüleeniimiin, trietüleenfosforamiid, trietüleenfosforamiid ja trimetüülamiin, atsetogeniinid (eelkõige bullatatsiin ja bullatatsinoon), delta-9-tetra-

hüdrokannabinool (dronabinool, MARINOL<sup>®</sup>), beeta-lapahoon, lapahool, kolhitsiinid, betu-  
liinhape, kamtotetsiin (kaasa arvatud selle sünteetiline analoog topotekaan (HYCAMTIN<sup>®</sup>),  
CPT-11 (irinotekaan, CAMPTOSAR<sup>®</sup>), atsetüülkamptotetsiin, skopolektiin ja 9-aminokamp-  
totetsiin), brüostatiin, kallistatiin, CC-1065 (kaasa arvatud selle sünteetilised analoogid ado-  
selesiin, karselesiin ja biselesiin), podofüllotoksiin, podofülliiinhape, teniposiid, krüptofüt-  
siinid (eelkõige krüptofütsiin 1 ja krüptofütsiin 8), dolastatiin, duokarmütsiin (kaasa arvatud  
selle sünteetilised analoogid KW-2189 ja CB1-TM1), eleuterobiin, pankratiin, sarkodik-  
tüin, spongistatiin, lämmastikipriidid, nagu kloorambutsiil, kloornafasiin, kolofosfamiid,  
östramütsiin, ifosfamiid, mekloretamiin, mekloretamiinoksiidhüdrokloriid, melfalaan, nov-  
embitsiin, fenesteriin, prednimütsiin, trofosfamiid, uratsüülipriit, nitrosouuread, nagu kar-  
mustiin, klorozototsiin, fotemütsiin, lomütsiin, nimütsiin ja ranimnüstiin, antibiootikumid,  
nagu enediüünantibiootikumid (näiteks kaliheamütsiin, eriti kaliheamütsiin gammaII ja kali-  
heamütsiin omegaII (vt nt Agnew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))), dünemütsiin,  
kaasa arvatud dünemütsiin A, esperamütsiin, samuti neokartsinostatiini kromfoor ja sellega  
seotud kromoproteiinid enediüünantibiootikumide kromfoorid), aklatsinomütsiinid, aktino-  
mütsiin, autramütsiin, asaseriin, bleomütsiinid, kaktinomütsiin, karabitsiin, karminomütsiin,  
kartsinofilliin, kromomütsiinid, daktinomütsiin, daunorubitsiin, detorubitsiin, 6-diaso-5-okso-  
L-norleutsiin, ADRIAMYCIN<sup>®</sup>, doksorubitsiin (kaasa arvatud morfolinodoksoubitsiin, tsüa-  
nomorfolinodoksoubitsiin, 2-pürrolinodoksoubitsiin ja desoksüdoksoubitsiin), epirubitsiin,  
esorubitsiin, idarubitsiin, martsellomütsiin, mitomütsiinid, nagu mitomütsiin C, mükofenool-  
hape, nogalamütsiin, olivomütsiinid, peplomütsiin, potfiromütsiin, puromütsiin, kvelamüt-  
siin, rodorubitsiin, streptonigriin, streptozotsiin, tubertsidiin, ubenimeks, zinostatiin, zorubit-  
siin, antimetaboliidid, nagu metotreksaat ja 5-fluorouratsüül (5-FU), foolhappe analoogid,  
nagu denopteriin, metotreksaat, pteropteriin, trimetreksaat, puriini analoogid, nagu fludara-  
biin, 6-merkaptopuriin, tiamipriin, tioguaaniin, pürimidiini analoogid, nagu antsitabiin, asatsü-  
tidiin, 6-asauridiin, karmofur, tsütarabiin, didesoksüuridiin, doksifluridiin, enotsitabiin, floks-  
uridiin, androgeenid, nagu kalusteroon, dromostanoloopropionaat, epitiostanool, mepitios-  
taan, testolaktoon, andrenaliinivastased aineid, nagu aminoglutetimiid, mitotaan, trilostaan,  
foolhappe varude täiendajad, nagu froliinhape, atseglatoon, aldofosfamiidglükosiid, amino-  
levuliinhape, eniluratsüül, amsakriin, bestrabutsiil, bisantreen, edatraksaat, defofamiin, deme-  
koltsiin, diasikvoon, elfomitiin, elliptiiniumatsetaat, epotiloon, etoglütsiid, galliumnitraat,  
hüdroksüuurea, lentinaan, lonidainiin, maitansinoidid, nagu maitansiin ja ansamitotsiinid,

mitoguasoon, mitoksantroon, mopidanmool, nitraeriin, pentostatiin, fenamet, pirarubitsiin, losoksantroon, 2-etüülhüdrasiid, prokarbasiin, PSK<sup>®</sup> polüsahhariidkompleks (JHS Natural Products, Eugene, OR), rasoksaan, risoksiin, sisofiraan, spirogermaanium, tenuasoonhape, triasikvoon, 2,2',2"-triklorotrietüülamin, trihotetseenid (eriti T-2 toksiin, verrakuriin A, roriidiin A ja anguidiin), uretaan, vindesiin (ELDISINE<sup>®</sup>, FILDESIN<sup>®</sup>), dakarbasiin, mannomustiin, mitobronitool, mitolaktool, pipobromaan, gatsütosiin, arabinosiid ("Ara-C"), tiotepa, taksoiidid, näiteks TAXOL<sup>®</sup>, paklitakseel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE<sup>™</sup> paklitakseeli kremoforivaba vorm, albumiiniga seotud nanopartiklite preparaat (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), ja TAXOTERE<sup>®</sup> doksetakseel (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Prantsusmaa), kloorambutsiil, gemtsitabiin (GEMZAR<sup>®</sup>), 6-tioguaaniin, merkaptopuriin, metotreksaat, plaatina-analoogid, nagu tsisplatiin ja karboplatiin, vinblastiin (VELBAN<sup>®</sup>), plaatina, etoposiid (VP-16), ifosfamiid, mitoksantroon, vinkristiin (ONCOVIN<sup>®</sup>), oksaliplatiin, leukovoviin, vinorelbiin (NAVELBINE<sup>®</sup>), novantroon, edatreksaat, daunomütsiin, aminopteriin, ibandronaat, topoiso-meraasi inhibiitor RFS 2000, difluorometüülornitiin (DMFO), retinoidid, nagu retinoidhape, kapetsitabiin (XELODA<sup>®</sup>), ükskõik missuguse eespool nimetatud aine farmatseutiliselt vastuvõetavad soolad, happed või derivaadid, samuti kahe või enama eespool nimetatud aine kombinatsioonid, nagu CHOP, mis on tsüklofosfamiidi, doksorubitsiini, vinkristiini ja prednisolooni kombineeritud ravimi lühend, ja FOLFOX, mis on oksaliplatiini (ELOXATIN<sup>™</sup>) ravirežiim, mis on kombineeritud 5-FU ja leukovoviiniga.

[0163] See definitsioon hõlmab ka hormoonivastaseid aineid, mis reguleerivad, vähendavad, blokeerivad või inhibeerivad nende hormoonide toimet, mis võivad soodustada vähi kasvu, ja mida sageli kasutatakse süsteemse ehk kogu organismi haarava ravi vormis. Need võivad olla ka hormoonid ise. Näidete hulka kuuluvad antiöstrogeenid ja selektiivsed östrogeenireseptorite moduleerijad (SERM-d), kaasa arvatud näiteks tamoksifeen (kaasa arvatud NOLVADEX<sup>®</sup> tamoksifeen), EVISTA<sup>®</sup> raloxifeen, droloksifeen, 4-hüdroksütamoksifeen, trioksifeen, keoksifeen, LY117018, onapristoon ja FARESTON<sup>®</sup> toremifeen, progesteroonivastased ained, östrogeenireseptori allareguleerijad (ERD-d), ained, mis suruvad alla või seiskavad munasarjade tegevuse, näiteks luteiniseerivat hormooni vabastava hormooni (LHRH) agonistid, nagu LUPRON<sup>®</sup> ja ELIGARD<sup>®</sup> leuproliidatsetaat, gosereliinatsetaat, busereliinatsetaat ja triptereliin, teised androgeenivastased ained, nagu flutamiid, nilutamiid ja bikalutamiid, ning aromataasi inhibiitorid, mis inhibeerivad ensüümi aromataas, mis regu-

leerib östrogeeni tootmist neerupealistes, nagu näiteks 4(5)-imidasoolid, aminoglutetimiid, MEGASE<sup>®</sup> megestroolatsetaat, AROMASIN<sup>®</sup> eksemestaan, formestaan, fadrosool, RIVISOR<sup>®</sup> vorosool, FEMARA<sup>®</sup> letrosool ja ARIMIDEX<sup>®</sup> anastrosool. Lisaks hõlmab see kemoterapeutiliste ainete definitsioon bisfosfonaate, nagu klordonaat (näiteks BONEFOS<sup>®</sup> või OSTAC<sup>®</sup>), DIDROCAL<sup>®</sup> etidronaat, NE-58095, ZOMETA<sup>®</sup> soledroonhape/soledronaat, FOSAMAX<sup>®</sup> alendronaat, AREDIA<sup>®</sup> pamidronaat, SKELID<sup>®</sup> tiludronaat või ACTONEL<sup>®</sup> risedronaat, samuti troksatsitabiini (tsütosiin-nukleosiidi 1,3-dioksolaan-analoog), *antisense* oligonukleotiide, eelkõige neid, mis inhibeerivad nende signaali ülekanderadade geene, mis osalevad hälbivas rakuproliferatsioonis, nagu näiteks PKC-alfa, Raf, H-Ras ja epidermaalse kasvufaktori retseptor (EGF-R), vaktsiine, nagu THERATOPE<sup>®</sup> vaktsiin ja geeniteraapia vaktsiinid, näiteks ALLOVECTIN<sup>®</sup> vaktsiin, LEUVECTIN<sup>®</sup> vaktsiin ja VAXID<sup>®</sup> vaktsiin, LURTOTECAN<sup>®</sup> topoisomeraas I inhibiitorit, ABARELIX<sup>®</sup> rnrH, lapatinib-ditosülaati (ErbB-2 ja EGFR duaalse türosiinkinaasi madalamolekulaarne inhibiitor, tuntud ka kui GW572016), ja kõigi eelnimetatute farmatseutiliselt vastuvõetavaid sooli, happeid või derivaate.

[0164] „Kasvu inhibeeriv aine“ tähendab siin kasutatuna ühendit või kompositsiooni, mis inhibeerib nende rakkude kasvu, mis on kas *in vitro* või *in vivo* sõltuvad beeta7 aktiivatsioonist. Seega võib kasvu inhibeeriv aine olla selline, mis oluliselt vähendab S-faasis olevate beeta7-st sõltuvate rakkude protsenti. Kasvu inhibeerivate ainete näidete hulka kuuluvad ained, mis blokeerivad rakutsükli progresseerumist (mujal kui S-faasis), näiteks ained, mis indutseerivad G1 seiskamist ja M-faasi seiskamist. Klassikaliste M-faasi blokeerijate hulka kuuluvad *vinca*-ühendid (vinkristiin ja vinblastiin), taksaanid ja topoisomeraasi II inhibiitorid, nagu doksorubitsiin, epirubitsiin, daunorubitsiin, etoposiid ja bleomütsiin. Need ained, mis seiskavad G1, seiskavad ka S-faasi, näiteks DNA alküülivad ained, nagu tamoksifeen, prednisoon, dakarbasiin, mekloreтамиин, tsisplatiin, metotreksaat, 5-fluorouratsüül ja ara-C. Täiendavat informatsiooni saab leida teosest: The Molecular Basis of Cancer, toim. Mendelsohn ja Israel, ptk. 1 pealkirjaga "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), eriti lk. 13. Taksaanid (paklitakseel ja dotsetakseel) on vähivastased ravimid, mis on pärit jugapuust. Dotsetakseel (TAXOTERE<sup>®</sup>, Rhone-Poulenc Rorer), mis on pärit Euroopa jugapuust, on paklitakseeli poolsünteetiline analoog (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb). Paklitakseel ja dotsetakseel soodustavad tubuliini dimeeride kokkupakkumist mikrotuubuliteks ja stabiliseerivad mikrotuu-



buleid, takistades nende depolümeerisumist, mille tulemuseks on rakkude mitoosi pärssimine.

[0165] „Doksorubitsiin“ on antratsükliin-antibiootikum. Doksorubitsiini täielik keemiline nimetus on (8*S-cis*)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoksü- $\alpha$ -L-lükso-heksapüranosüül)oksü]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihüdroksü-8-(hüdroksüatsetüül)-1-metoksü-5,12-naftatseendioon.

[0166] Ühendite hulka, mis on kasulikud kombinatsioonraviks leiutisekohase beeta7-vastase antagonist-antikehaga, kuuluvad antikehad (piiranguteta kaasa arvatud teised beeta7-vastased antagonist-antikehad (Fib 21, 22, 27, 30 (Tidswell, M. (1997), *supra*) või nende humaniseeritud derivaadid), alfa4-vastased antikehad (näiteks ANTIGEN<sup>®</sup>), TNF-vastased (REMICADE<sup>®</sup>) või mittevalgulised ühendid, piiranguteta kaasa arvatud 5-ASA ühendid ASACOL<sup>®</sup>, PENTASA<sup>™</sup>, ROWASA<sup>™</sup>, COLAZAL<sup>™</sup>, ja teised ühendid, nagu purinetool ja steroidid nagu prednisoon. Ühes teostuses hõlmab leiutis patsiendi nagu inimpatsient ravimeetodit kas ainult leiutisekohase beeta7-vastase antagonist-antikehaga või kombinatsioonis teise ühendiga, mis on samuti kasulik põletiku ravimiseks. Ühes teostuses valitakse teine ühend rühmast, millesse kuuluvad Fib 21, 22, 27, 30 või nende humaniseeritud derivaadid, alfa4-vastane antikeha ANTIGEN<sup>®</sup>, TNF-vastane ühend REMICADE<sup>®</sup>, 5-ASA ühendid ASACOL<sup>®</sup>, PENTASA<sup>™</sup>, ROWASA<sup>™</sup>, COLAZAL<sup>™</sup>, purinetool ja steroid prednisoon. Leiutise ühes teostuses vähendab leiutisekohase beeta7-vastase antagonist-antikeha manustamine teise ühendi kogust. Ühes teostuses on nimetatud teise ühendi annuse vähenemine vähemalt 30%, vähemalt 40%, vähemalt 50%, vähemalt 60%, vähemalt 70%, vähemalt 80%, vähemalt 90%, vähemalt 95%. Leiutise ühes teostuses leevendab leiutisekohase antikeha ja teise ühendi vähendatud annuse kombinatsioon patsiendi sümptomeid praktiliselt samal määral või isegi enam kui ainult teise ühendi manustamine.

#### Vähenenud või puuduvat HAMA vastust andvate antikehavariantide loomine

[0167] HAMA (inimese hiirevastase vastuse (rakendatav ka inimese rotivastasele ja inimese inimesevastasele vastusele)) vähendamine või kõrvaldamine on sobivate terapeutiliste ainete kliinilise väljatöötamise märkimisväärne eripära, vt näiteks: Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst., (1988), 80:937, Jaffers et al., Transplantation, (1986), 41:572, Shawler et al., J. Immunol., (1985), 135:1530, Sears et al., J. Biol. Response Mod., (1984), 3:138, Miller et al., Blood, (1983), 62:988, Hakimi et al., J. Immunol., (1991), 147:1352, Reichmann et al.,

Nature, (1988), 332:323, Junghans et al., Cancer Res., (1990), 50:1495. Nagu siin on kirjeldatud, esitab leiutis antikehad, mis on humaniseeritud, nii et HAMA vastus on vähenenud või kõrvaldatud. Nende antikehade variante võib täiendavalt saada, kasutades tehnika tasemest tuntud tavameetodeid, millest mõningaid on allpool kirjeldatud.

[0168] Näiteks võib siin kirjeldatud aminohapete järjestus olla raamistiku ja/või hüpervarieeruva(te) järjestus(t)e mitmekesistamise lähtejärjestuseks. Väljavalitud raamistikujärjestust, millega hüpervarieeruv järjestus ühendatakse, nimetatakse siin inimese aktseptor-raamistikuks. Samas kui inimese aktseptor-raamistikud võivad olla pärit või tuletatud inimese immunoglobuliinist (selle VL ja/või VH piirkonnast), on inimese aktseptor-raamistikud eelistatult pärit või tuletatud inimese raamistiku konsensusjärjestusest, kuna on näidatud, et sellised raamistikud on inimpatsientidele minimaalselt või üldse mitte immunogeensed.

[0169] Kui aktseptor pärineb inimese immunoglobuliinist, võib inimese raamistikujärjestuse valida valikuliselt tema homoloogia järgi doonor-raamistikujärjestusega, joondades doonor-raamistikujärjestuse inimese raamistikujärjestuste kollektsioonis olevate inimese erinevate raamistikujärjestustega ning valides aktseptoriks kõige homoloogsema raamistikujärjestuse.

[0170] Ühes teostuses pärinevad siin toodud inimese konsensus-raamistikujärjestused VH-alarühma III ja/või VL kapa alarühma I konsensus-raamistikujärjestustest või on nendest tuletatud.

[0171] Nii võib inimese VH aktseptor-raamistik sisaldada ühte, kahte, kolme või kõiki järgnevatest raamistikujärjestustest:

FR1, mis sisaldab EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 38),

FR2, mis sisaldab WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 39),

FR3, mis sisaldab RFTISX1DX2SKNTX3YLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 42), kus X1 on A või R, X2 on T või N ja X3 on A, L või F,

FR4, mis sisaldab WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

VH konsensusraamistike hulka kuuluvad:

inimese VH-alarühma I konsensusraamistik miinus Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 19),

inimese VH-alarühma I konsensusraamistik miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 20-22),

inimese VH-alarühma II konsensusraamistik miinus Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 48),

inimese VH-alarühma II konsensusraamistik miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 49-51),

inimese VH-alarühma III konsensusraamistik miinus Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 52),  
 inimese VH-alarühma III konsensusraamistik miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 53-55),  
 inimese VH aktseptor-raamistik miinus Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 56),  
 inimese VH aktseptor-raamistik miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 57-58),  
 inimese VH aktseptor-raamistik 2 miinus Kabat'i CDRd (SEQ ID NO: 59), või  
 inimese VH aktseptor-raamistik 2 miinus laiendatud hüpervarieeruvad piirkonnad (SEQ ID NO: 60-62).

[0172] Ühes teostuses sisaldab inimese VH aktseptor-raamistik ühte, kahte, kolme või kõiki järgnevatest raamistikujärjestustest:

FR1, mis sisaldab EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 38),  
 FR2, mis sisaldab WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 39),  
 FR3, mis sisaldab RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 43),  
 RFTISRDTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 44),  
 RFTISRDTSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 45),  
 RFTTSADTSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 46),  
 FR4, mis sisaldab WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

[0173] Inimese VL aktseptor-raamistik võib sisaldada ühte, kahte, kolme või kõiki järgnevatest raamistikujärjestustest:

FR1, mis sisaldab DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 34),  
 FR2, mis sisaldab WYQQKPGKAPKLLI (SEQ ID NO: 35),  
 FR3, mis sisaldab GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 36),  
 FR4, mis sisaldab FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 37).

VL konsensus-raamistike näidete hulka kuuluvad:

inimese VL kapa alarühma I konsensusraamistik (SEQ ID NO: 14),  
 inimese VL kapa alarühma I konsensusraamistik (laiendatud HVR-L2) (SEQ ID NO: 15),  
 inimese VL kapa alarühma II konsensusraamistik (SEQ ID NO: 16),  
 inimese VL kapa alarühma III konsensusraamistik (SEQ ID NO: 17) või  
 inimese VL kapa alarühma IV konsensusraamistik (SEQ ID NO: 18).

[0174] Samas kui aktseptor võib järjestuse poolest olla identne inimese väljavalitud raamistikujärjestusega, ükskõik kas see on pärit inimese immunoglobuliinist või inimese konsensus-

raamistikust, peetakse käesolevas leiutises silmas, et aktseptorjärjestus võib sisaldada eelnevalt olemasolevaid aminohappe asendusi võrreldes inimese immunoglobuliini järjestuse või inimese raamistiku konsensusjärjestusega. Need eelnevalt olemasolevad asendused on eelistatult minimaalsed, tavaliselt esineb ainult neli, kolm, kaks või üks aminohappe erinevus(t) võrreldes inimese immunoglobuliini järjestusega või raamistiku konsensusjärjestusega.

[0175] Mitte-inimese antikeha hüpervarieeruva piirkonna jäägid liidetakse inimese VL ja/või VH aktseptor-raamistikesse. Näiteks võib sinna liita jääke, mis vastavad Kabat'i CDR jääkidele, Chothia hüpervarieeruva lingu jääkidele, Abm jääkidele ja/või kokkupuutes olevatele jääkidele. Valikuliselt liidetakse sinna järgnevad laiendatud hüpervarieeruva piirkonna jäägid: 24-34 (L1), 49-56 (L2) and 89-97 (L3), 26-35 (H1), 50-65 or 49-65 (H2) and 93-102, 94-102 või 95-102 (H3).

[0176] Kui siin arutatakse hüpervarieeruva piirkonna „liitmist“, tuleb arvestada, et selle võib saavutada erinevatel viisidel, näiteks võib soovitud aminohapete järjestust kodeeriva nukleiinhappe luua hiire varieeruva domeeni järjestust kodeeriva nukleiinhappe muteerimise abil nii, et selle raamistikujäägid muudetakse inimese aktseptor-raamistiku jääkideks, või inimese varieeruva domeeni järjestust kodeeriva nukleiinhappe muteerimise abil nii, et hüpervarieeruva domeeni jäägid muudetakse mitte-inimese jääkideks, või siis soovitud järjestust kodeeriva nukleiinhappe sünteesimise teel jne.

[0177] Siin toodud näidetes loodi siiratud hüpervarieeruva piirkonnaga variandid inimese aktseptorjärjestusi kodeeriva nukleiinhappe Kunkeli mutageneesi abil, kasutades iga hüpervarieeruva piirkonna jaoks eraldi oligonukleotiidi, Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154:367-382 (1987). Tavapärase meetodite abil saab raamistikku ja/või hüpervarieeruvasse piirkonda viia sisse sobivaid muutusi, et parandada ja taastada õigeid hüpervarieeruva piirkonna ja anti-geeni vahelisi interaktsioone.

[0178] Paljude erinevate potentsiaalsete antikehavariantide loomise ja skriinimise mugava ja kiire meetodina võib kasutada järjestuste randomiseerimise abil saadud raamatukogu faagil (fagemiidil) kuvamist (siin mõnes kontekstis nimetatakse ka faagikuvamiseks). Eriala asjatundjale on aga kättesaadavad ka teised muudetud antikehade tegemise ja skriinimise meetodid.

[0179] Faagil (fagemiidil) kuvamise tehnoloogia on osutunud võimsaks tööriistaks uute valkude loomisel ja selekteerimisel, mis seonduvad ligandi, näiteks antigeeniga. Faagil (fagemiidil) kuvamise meetodite kasutamine võimaldab valguvariantide suurte raamatukogude loo-

mist, mida saab kiiresti sorteerida nende järjestuste suhtes, mis seonduvad sihtmolekulidele kõrge afiinsusega. Polüpeptiidvariante kodeerivad nukleiinhapped liidetakse üldiselt viiruse kattevalku kodeeriva nukleiinhappejärjestusega, näiteks valgugeeniga III või valgugeeniga VIII. Välja on töötatud monovalentsed fagemiidil kuvamise süsteemid, kus valku või polüpeptiidi kodeeriv nukleiinhappejärjestus on liidetud valgugeeni III kodeeriva osa nukleiinhappejärjestusega (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990), Lowman ja Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). Monovalentsel fagemiidil kuvamise süsteemis ekspresseerub liitgeen madalal tasemel ja metsiktüüpi geeni III valgud ekspresseeruvad samuti, nii et partiklite infektsioonilisus on säilinud. Peptiidiraamatukogude loomise ja nende raamatukogude skriinimise meetodid on avaldatud paljudes patentides (näiteks US patendis 5723236, US patendis 5432018, US patendis 5580717, US patendis. 5427908 ja US patendis 5498530).

[0180] Antikehade või antigeeni siduvate polüpeptiidide raamatukogusid on valmistatud mitmel viisil, kaasa arvatud ühe geeni muutmine juhuslike DNA-järjestuste inserteerimisel või omavahel suguluses geenide perekonna kloonimisel. Antikehade või antigeeni siduvate fragmentide kuvamise meetodeid faagil (fagemiidil) kuvamise abil on kirjeldatud US patentides 5750373, 5733743, 5837242, 5969108, 6172197, 5580717 ja 5658727. Seejärel skriinitakse raamatukogu soovitud tunnustega antikehade või antigeeni siduvate valkude suhtes.

[0181] Valitud aminohappe matriitsnukleiinhappesse asendamise meetodid on tehnika tasemest teada ja mõned neist on siin kirjeldatud. Näiteks võib hüpervarieeruva piirkonna jääke asendada Kunkeli meetodil, vt näiteks Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154:367-382 (1987).

[0182] Oligonukleotiidi järjestus sisaldab muudetavate hüpervarieeruva piirkonna jääkidele ühte või mitut disainitud koodonikomplekti. Koodonikomplekt on erinevate nukleotiiditriplettide järjestuste komplekt, mida kasutatakse soovitud aminohappevariantide kodeerimiseks. Koodonikomplekte saab esitada, kasutades konkreetsete nukleotiidide või nukleotiidide ekvivalentsete segude tähistamiseks sümboleid vastavalt allpool näidatud IUB koodile.

#### IUB koodid

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)

[0183] Näiteks võib koodonikomplektis DVK D olla nukleotiid A või G või T, V võib olla A või G või C, K võib olla G või T. See koodonikomplekt võib esindada 18 erinevat koodonit ning võib kodeerida aminohappeid Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly ja Cys.

[0184] Oligonukleotiidide või praimerikomplekte võib sünteesida standardmeetoditel. Tahkefaasilise sünteesi abil saab sünteesida näiteks oligonukleotiidide komplekti, mis sisaldab järjestusi, mis esindavad kõiki võimalikke koodonikomplekti esitatud nukleotiiditriplettide kombinatsioone ja mis kodeerivad soovitud aminohapete rühma. Oligonukleotiidide süntees, kus teatud asendites esineb valitud nukleotiidide „kõduvus“, on tehnika tasemest hästi teada. Selliseid nukleotiidikomplekte, mis sisaldavad teatud koodonikomplekte, saab sünteesida kaubanduslike nukleiinhappesüntesaatorite abil (mis on saadaval näiteks firmast Applied Biosystems, Foster City, CA) või neid võib saada kaubanduslikult (näiteks firmast Life Technologies, Rockville, MD). Seetõttu sisaldab konkreetset koodonikomplekti sisaldav oligonukleotiididekomplekt palju erinevate järjestustega oligonukleotiidide, kusjuures koodonikomplektist tingitud erinevused esinevad kogu järjestuse ulatuses. Leiutise kohaselt kasutatavad oligonukleotiidid on järjestustega, mis võimaldavad neil hübridiseeruda nukleiinhappe matriitsi varieeruva domeeniga, samuti võivad nad sisaldada kloonimiseks mõeldud restriktiooniensüümide saite.

[0185] Ühe meetodi puhul võib aminohappevariante kodeerivad nukleiinhappejärjestused luua oligonukleotiidide vahendatud mutageneesi abil. See meetod on tehnika tasemest hästi tuntud, nagu on kirjeldanud Zoller et al., *Nucleic Acids Res.*, 10:6487-6504(1987). Lühidalt öeldes luuakse aminohappevariante kodeerivad nukleiinhappejärjestused soovitud koodonikomplekte kodeerivate oligonukleotiidide komplekti hübridiseerimisel DNA matriitsiga, kus matriits on nukleiinhappe matriitsjärjestuse varieeruvat piirkonda sisaldava plasmidi üheaheelaline vorm. Pärast hübridiseerimist kasutatakse DNA polümeraasi matriitsi teise täieliku komplementaarse ahela sünteesimiseks, mis sisaldab seega oligonukleotiidpraimerit ja oligonukleotiididekomplektiga esitatud koodonikomplekti.

[0186] Üldiselt kasutatakse oligonukleotiidide ahela pikkusega vähemalt 25 nukleotiidi. Optimaalne oligonukleotiid sisaldab 12 kuni 15 nukleotiidi, mis on matriitsiga mõlemal pool mutatsiooni kodeerivat nukleotiidi (mutatsioone kodeerivaid nukleotiide) täiesti komplementaarsed. See kindlustab oligonukleotiidide õige hübridiseerumise üheaheelalise DNA matriitsmolekuliga. Oligonukleotiidide saab kergesti sünteesida, kasutades tehnika tasemest tuntud meetodeid, näiteks neid, mida on kirjeldanud Crea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

[0187] DNA matriits luuakse nende vektorite abil, mis on tuletatud kas bakteriofaagi M13 vektoritest (sobivad on kaubanduslikult saadavad M13mp18- ja M13mp19-vektorid) või vektoritest, mis sisaldavad üheaheelalist faagi replikatsiooni-alguspunkti, nagu on kirjeldanud Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Nii saab muteerimist vajava DNA inserteerida üheaheelalise matriitsi saamiseks ühte nendest vektoritest. Üheaheelalise matriitsi tootmist on kirjeldatud eeltoodud viite Sambrook jt. lõikudes 4.21–4.41.

[0188] Natiivse DNA-järjestuse muutmiseks hübridiseeritakse oligonukleotiid sobivates hübridisatsioonitingimustes üheaheelalise matriitsiga. Seejärel lisatakse matriitsile komplementaarse ahela sünteesimiseks DNA polümeriseerivat ensüümi, tavaliselt T7 DNA polümeraasi või DNA polümeraasi I Klenowi fragmenti, kasutades sünteesipraimerina oligonukleotiidi. Nii moodustub selline heterodupleksmolekul, kus üks DNA ahel kodeerib geen 1 muteeritud vormi ja teine ahel (algne matriits) kodeerib natiivset, muutmata järjestusega geeni 1. See heterodupleksmolekul transformeeritakse seejärel sobivasse peremeesrakku, tavaliselt prokaryootti, näiteks *E. coli* JM101, rakku. Pärast rakkude kasvatamist plaaditakse need agarosplaatile ja skriinitakse, kasutades radioaktiivset <sup>32</sup>P-märgistatud oligonukleotiid-praimerit, et identifitseerida muteeritud DNA-d sisaldavad bakterikolooniad.

[0189] Vahetult eespool kirjeldatud meetodit võib modifitseerida nii, et luuakse homodupleksmolekul, kus mõlemad plasmiidi ahelad sisaldavad mutatsiooni (mutatsioone). Modifikatsioonid on järgmised. Üheaahelaline oligonukleotiid anniilitakse üheaahelalise matriitsi külge, nagu eespool on kirjeldatud. Kolme desoksüribonukleotiidi – desoksüriboadenosiini (dATP), desoksüriboguanosiini (dGTP) ja desoksüribotümidiini (dTTP) – segu ühendatakse modifitseeritud tidesoksüribotsütosiiniga, mida nimetatakse dCTP-(aS) (seda võib saada firmast Amersham). See segu lisatakse matriitsi/oligonukleotiidi kompleksile. DNA polümeraasi lisamisel sellele segule saadakse matriitsiga identne DNA-ahel, välja arvatud muteeritud alused. Lisaks sisaldab see uus DNA-ahel dCTP asemel dCTP-(aS), mille ülesanne on kaitsta ahelat restriksiooniensüümidega lõikamise eest. Pärast seda, kui kaheaahelalise heterodupleksi matriitsahel on sälgustatud sobiva restriksiooniensüümi abil, võib matriitsahela lõigata ExoIII nukleaasi või mõne muu sobiva nukleaasi abil piirkonnast, mis sisaldab muteerimist vajavat saiti (vajavaid saite). Siis reaktsioon peatatakse, et jätta alles molekul, mis on ainult osaliselt üheaahelaline. Seejärel moodustatakse täielikult kaheaahelaline DNA homodupleks, kasutades DNA polümeraasi kõigi nelja desoksüribonukleotiid-trifosfaadi, ATP ja DNA ligaasi juuresolekul. Selle homodupleksmolekuli võib seejärel transformeerida sobivasse peremeesrakku.

[0190] Nagu eelnevalt on näidatud, on oligonukleotiidide komplekti järjestuse pikkus piisav matriitsnukleiinhappega hübridiseerumiseks ja see võib sisaldada, ehkki mitte tingimata, restriksioonisaiti. DNA matriitsi võib luua nende vektorite abil, mis on tuletatud bakteriofaagi M13-vektoritest või vektoritest, mis sisaldavad üheaahelalist faagi replikatsiooni-alguspunkti, nagu on kirjeldanud Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Seega tuleb muteerimist vajav DNA inserteerida üheaahelalise matriitsi saamiseks ühte nendest vektoritest. Üheaahelalise matriitsi tootmist on kirjeldatud eeltoodud viite Sambrook jt. lõikudes 4.21–4.41.

[0191] Teise meetodi järgi saab raamatukogu luua vastassuunaliste ja pärisuunaliste oligonukleotiidide komplektide esitamise abil, kus iga kompleks sisaldab palju erinevate järjestustega oligonukleotiidide, kus erinevad järjestused saadakse koodonikomplektide abil, mis esitatakse oligonukleotiidide järjestuste sees. Vastassuunalisi ja pärisuunalisi oligonukleotiidide komplekte koos matriits-nukleiinhappejärjestuse varieeruva domeeniga saab kasutada polümeraasi ahelreaktsioonis, et luua PCR produktide „raamatukogu“. PCR produkte võib nimetada „nukleiinhappe kassetideks“, kuna neid saab liita teiste suguluses olevate või mitteole-



vate nukleiinhappejärjestustega, näiteks viiruste kattevalkude ja dimeriseerumisdomeenidega, kasutades välja töötatud molekulaarbioloogia meetodeid.

[0192] PCR praimerite järjestused sisaldavad ühte või mitut disainitud koodonikomplekti lahustis saadavatele ja väga varieeruvatele asenditele hüpervarieerivas piirkonnas. Nagu eespool on kirjeldatud, on koodonikomplekt erinevate nukleotiitriplettjärjestuste komplekt, mida kasutatakse soovitud aminohappevariantide kodeerimiseks.

[0193] Soovitud kriteeriumidele vastavaid antikehi, mis on valitud sobivate skriinimis-/selektioonietappide abil, saab eraldada ja kloonida standardsete rekombinantsete meetodite kasutamisel.

### Vektorid, peremeesrakud ja rekombinantsete tehnikad

[0194] Leiutisekohase antikeha rekombinantseks tootmiseks eraldatakse seda kodeeriv nukleiinhape ja inserteeritakse replitseeruvasse vektorisse edasiseks kloonimiseks (DNA amplifikatsiooniks) või ekspresseerimiseks. Antikeha kodeeriva DNA saab kergesti eraldada ja sekveneerida, kasutades tavapäraseid protseduure (näiteks kasutades oligonukleotiidsone, mis on suuteliselt spetsiifiliselt seonduma antikeha raskeid ja kergeid ahelaid kodeerivate geenidega. Saadaval on palju vektoreid. Osaliselt sõltub vektori valik kasutatavast peremeesrakust. Üldiselt on eelistatud peremeesrakud kas prokarüootse või eukarüootse (eelistatult imetaja) päritoluga.

### *Antikehade loomine prokarüootsete peremeesrakkude kasutamisel*

#### *Vektori konstrueerimine*

[0195] Leiutisekohase antikeha polüpeptiidkomponente kodeerivaid polünukleotiidjärjestusi võib saada standardsete rekombinantsete meetodite kasutamisel. Soovitud polünukleotiidjärjestusi võib eraldada ja sekveneerida antikehi tootvatest rakkudest, näiteks hübriidomirakkudest. Alternatiivselt võib polünukleotiide sünteesida nukleotiidsüntesaatori või PCR meetodite kasutamisel. Saadud polüpeptiide kodeerivad järjestused inserteeritakse rekombinantse vektorisse, mis on võimeline prokarüootsetes peremeesorganismides heteroloogseid polünukleotiide replitseerima ja ekspresseerima. Käesoleva leiutise eesmärgil saab kasutada paljusid tehnika tasemest tuntud vektoreid. Sobiva vektori valik sõltub peamiselt vektorisse

inserteeritava nukleiinhappe suuruselt ja konkreetsest peremeesrakust, mida vektoriga transformeeritakse. Iga vektor sisaldab erinevaid komponente sõltuvalt oma funktsioonist (heteroloogse polünukleotiidi amplifikatsioon või ekspressioon või mõlemad) ja sobivusest konkreetse peremeesrakuga, milles ta paikneb. Vektori komponentide hulka kuuluvad üldiselt, kuid nendega piirdumata, replikatsiooni alguspunkt, selekteeritav markergeen, promootor, ribosoomi sidumissait (*ribosome binding site*, PBS), signaaljärjestus, heteroloogne nukleiinhappeinsert ja transkriptsiooni terminatsioonijärjestus.

[0196] Üldiselt kasutatakse peremeesrakkudega seoses neid plasmiidvektoreid, mis sisaldavad replikoni ja kontrolljärjestusi, mis pärinevad peremeesrakuga kokkusobivatest liikidest. Tavaliselt kannab vektor replikatsioonisaiti, samuti markerjärjestusi, mis võimaldavad transformeeritud rakkude seleksiooni nende fenotüübi järgi. Näiteks *E. coli* transformeeritakse tavaliselt, kasutades pBR322, mis on *E. coli*'st tuletatud plasmiid. pBR322 sisaldab gene, mis kodeerivad ampitsilliiniresistentsust (Amp) ja tetratsükliiniresistentsust (Tet), ja annab seega kerge vahendi transformeeritud rakkude identifitseerimiseks. pBR322, selle derivaadid või teised mikroobiplasmiidid või bakterifaagid võivad sisaldada või olla modifitseeritud sisaldama ka promootoreid, mida mikroobiorganism saab kasutada endogeensete valkude ekspresseerimiseks. Konkreetsete antikehade ekspresseerimiseks kasutatud pBR322 näiteid on detailselt kirjeldanud Carter jt. US patendis 5648237.

[0197] Lisaks võib faagivektoreid, mis sisaldavad peremees-mikroorganismiga kokkusobivat replikoni ja kontrolljärjestusi, kasutada neid peremeesrakke transformeerivate vektoritena. Näiteks võib sellist bakteriofaagi nagu  $\lambda$ GEM<sup>TM</sup>-11 kasutada rekombinantse vektori tegemiseks, mida saab kasutada vastuvõtlike peremeesrakkude, näiteks *E. coli* LE392, transformeerimiseks.

[0198] Leiutisekohane ekspressioonivektor võib sisaldada kahte või enamat promootor-tsistroni paari, millest kumbki kodeerib polüpeptiidkomponenti. Promootor on mittetransleeritav reguleeriv järjestus, mis paikneb tsistronile vastassuunas (5') ja moduleerib selle ekspressiooni. Prokarüootide promootorid langevad tüüpiliselt kahte klassi: indutseeritavad ja konstitutiivsed. Indutseeritav promootor on selline promootor, mis käivitab tema kontrolli all oleva tsistroni transkriptsiooni kõrgele tasemele vastusena rakukultuuri tingimuste muutustele, näiteks toitainete olemasolule või selle puudumisele või temperatuurimuutusele.

[0199] Suur arv erinevate potentsiaalsete peremeesrakkude poolt äratuntavaid promootoreid on hästi teada. Valitud promootori võib juhitavalt siduda kerget või rasket ahelat kodeeriva

tsistroni DNA-ga, eemaldades promootori tema allikaks olevast DNA-st rektsiksioonien-süümiga lõikamise abil ja inserteerides promootorjärjestuse leiutisekohasesse vektorisse. Sihtmärkgeenide otseseks amplifitseerimiseks ja/või ekspresseerimiseks võib kasutada nii natiivset promootorjärjestust kui paljusid heteroloogseid promootoreid. Mõnedes teostustes kasutatakse heteroloogseid promootoreid, kuna need võimaldavad üldiselt ekspresseeritava sihtmärkgeeni paremat transkriptsiooni ja suuremaid saagiseid võrreldes sihtmärk-polüpeptiidi natiivse promootoriga.

[0200] Prokarüootsetes peremeesrakkudes kasutamiseks sobivate promootorite hulka kuuluvad PhoA promootor,  $\beta$ -galaktamaasi ja laktoosi promootorsüsteemid, trüptofaani (*trp*) promootorsüsteem ja hübriidsed promootorid, nagu *tac* või *trc* promootor. Sobivad on aga ka teised promootorid, mis on bakterites funktsionaalsed (näiteks teised tuntud bakteriaalsed või faagipromootorid). Nende nukleiinhappejärjestused on avaldatud, mis võimaldab eriala asjatundjal neid juhitavalt siduda tsistroniga, mis kodeerib sihtmärgiks olevat kerget ja rasket ahelat (Siebenlist et al., (1980) Cell, 20:269), kasutades linkereid või adaptoreid ükskõik mis-suguse restriksioonisaidi loomiseks.

[0201] Leiutise ühes eripäras sisaldab iga rekombinantsetes vektoris olev tsistron sekretsiooni signaaljärjestuse komponenti, mis suunab ekspresseeritud polüpeptiidide ümberpaiknemist läbi membraani. Üldiselt võib signaaljärjestus olla vektori komponent või see võib olla osa sihtmärkpolüpeptiidi DNA-st, mis on vektorisse inserteeritud. Selle leiutise jaoks valitud signaaljärjestus peab olema peremeesraku poolt äratuntav ja töödeldav (s.t signaalpeptidaasi poolt lõigatav). Prokarüootsete rakkude puhul, mis ei tunne ära ja ei töötle heteroloogsetele polüpeptiididele omaseid signaaljärjestusi, asendatakse signaaljärjestus prokarüoodi signaaljärjestusega, mis valitakse näiteks rühmast, millesse kuuluvad leeliselise fosfataasi, penitsillinaasi, Ipp või kuumakindla enterotoksiini II (STII) juhtjärjestused, LamB, PhoE, PelB, OmpA ja MBP. Ühes leiutise teostuses on ekspressioonisüsteemi mõlemas tsistronis kasutatavad signaaljärjestused STII signaaljärjestused või nende variandid.

[0202] Teises eripäras võib leiutisekohaste immunoglobuliinide tootmine toimuda peremeesraku tsütoplasmas ning seetõttu ei vaja see sekretsiooni signaaljärjestuste olemasolu igas tsistronis. Sel juhul ekspresseeritakse, volditakse ja pakitakse immunoglobuliini kerged ja rasked ahelad funktsionaalse immunoglobuliini moodustamiseks tsütoplasmas. Teatud peremeestüved (näiteks *E. coli trxB* tüved) pakuvad tsütoplasma tingimusi, mis on soodsad

disulfiidsildade moodustumiseks, võimaldades seega ekspresseeritavate valgu subühikute õiget voltumist ja pakkumist, Proba, Pluckthun, Gene, 159:203 (1995).

[0203] Käesolev leiutis esitab ekspressioonisüsteemi, milles ekspresseeritavate polüpeptiidkomponentide kvantitatiivset suhet võib moduleerida leiutise kohaselt sekreteeritud ja õigesti kokkupakitud antikehade maksimaalse saagise saamiseks. Selline moduleerimine viiakse vähemalt osaliselt läbi polüpeptiidkomponentide samaaegse translatsioonitugevuse moduleerimisega.

[0204] Ühe meetodi translatsiooni tugevuse moduleerimiseks on avaldanud Simmons jt. US patendis 5840523. Selles kasutatakse translatsiooni initsiatsioonipiirkonna (*translational initiation region*, TIR) variante tsistronis. Antud TIR-ks saab luua translatsioonitugevuse vahemikus aminohapete järjestuste või nukleiinhappejärjestuste variantide seeria, pakkudes sellega mugava vahendi, mille abil saab selle teguri reguleerida spetsiifilise ahela soovitud ekspressioonitasemele. TRI-i variante võib luua tavapäraste mutageenesimeetodite abil, mis annavad tulemuseks koodoni muutused, mis võivad muuta aminohapete järjestust, ehkki eelistatud on nukleotiidjärjestuse vaikivad muutused. TIR-i muutuste hulka võivad kuuluda näiteks Shine-Dalgarno järjestuste arvu või paigutuse muutused koos muutustega signaaljärjestuses. Üks mutantsete signaaljärjestuste loomismeetod on kodeeriva järjestuse algusse „koodonipanga“ loomine, mis ei muuda signaaljärjestuse aminohapete järjestust (s.t muutused on vaikivad). Selle võib läbi viia nukleotiidi muutmiselega iga koodoni kolmandas asendis, lisaks on mõnel aminohappel, näiteks leutsiinil, seriinil ja arginiinil, mitu nukleotiidi koodoni esimeses ja teises asendis, millega saab suurendada panga kompleksust. Seda muteerimis-meetodit on detailselt kirjeldatud artiklis: Yansura et al., (1992) *Methods: A Companion to Methods in Enzymol.*, 4:151-158.

[0205] Eelistatult luuakse TIR-i tugevuste ulatuses olev vektorite komplekt iga selles sisalduvale vektorile. See piiratud komplekt annab iga ahela ekspressioonitasemete võrdluse, samuti soovitud antikehaproduktide saagise erinevates TIR-i tugevuse kombinatsioonides. TIR-i tugevuse saab määrata reportergeeni ekspressioonitaseme kvantitatiivse mõõtmisega, nagu on detailselt kirjeldanud Simmons jt. US patendis 5840523. Translatsioonitugevuse võrdluse alusel valitakse individuaalsed TIR-id leiutisekohastes ekspressioonivektorites kombineerimiseks.

[0206] Leiutisekohaste antikehade ekspresseerimiseks sobivate prokarüootsete peremeesrakude hulka kuuluvad arhebakterid ja eubakterid, näiteks gram-negatiivsed ja gram-positiivsed

organismid. Kasulike bakterite näidete hulka kuuluvad *Escherichia* liigid (näiteks *E. coli*), batsillid (näiteks *B. subtilis*), enterobakterid, *Pseudomonase* liigid (näiteks *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobium*, *Vitreoscilla* või *Paracoccus*. Ühes teostuses kasutatakse gram-negatiivseid rakke. Ühes teostuses kasutatakse leiutisekohaste peremeesrakkudena *E. coli* rakke. *E. coli* tüvede näidete hulka kuuluvad W3110 tüvi (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, kd. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), lk. 1190-1219, ATCC deponeerimisnumber 27325) ja selle derivaadid, kaasa arvatud 33D3 tüvi genotüübiga W3110 A/7tMA ( $\Delta tonA$ ) *ptr3 lac Iq lacL8  $\Delta ompT$   $\Delta (nmpc-fepE)$  degP41 kan<sup>R</sup>* (US patent 5639635). Sobivad on ka selle teised tüved ja derivaadid, nagu *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli*, 1776 (ATCC 31537) ja *E. coli* RV308 (ATCC 31608). Need näited on pigem illustreerivad kui piiravad. Kõigi eespool märgitud ja defineeritud genotüübiga bakteriderivaatide konstrueerimise meetodid on tehnika tasemest tuntud ja neid on kirjeldatud näiteks artiklis: Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). Üldiselt on sobiva bakteri valimisel vaja arvesse võtta replikoni replitseeruvust bakteris. Näiteks *E. coli*, *Serratia* või *Salmonella* liike võib kasutada sobivate peremeesrakkudena juhul, kui replikoni tarnimiseks kasutatakse selliseid hästi tuntud plasmide nagu pBR322, pBR325, pACYC177 või pKN410. Tavaliselt peaks peremeesrakk sekreteerima minimaalsel määral proteolüütilisi ensüüme, samuti võib olla soovitatav rakukultuuri koostisse liita täiendavaid proteaaside inhibiitoreid.

### *Antikehade tootmine*

[0207] Peremeesrakud transformeeritakse ülalkirjeldatud ekspressioonivektoritega ja kasvatatakse tavapärasel rakuõotmes, mida on sobivalt modifitseeritud promootorite indutseerimiseks, transformantide selekteerimiseks või soovitud järjestusi kodeerivate geenide amplifitseerimiseks.

[0208] Transformeerimine tähendab DNA sisseviimist prokarüootsesse peremeesraku, et DNA oleks replitseeruv kas kromosoomivälise elemendi või kromosoomi koostisosana. Sõltuvalt kasutatavatest peremeesrakkudest viiakse transformatsioon läbi nendele rakkudele sobivate standardmeetodite kasutamisel. Bakterirakkude puhul, mis sisaldavad olulisi raku-seinabarjääre, rakendatakse üldiselt kaltsiumitöötlust, kus kasutatakse kaltsiumkloriidi. Teise

transformatsioonimeetodi puhul kasutatakse polüetüleenglükooli/DMSO-d. Järgmise meetodina kasutatakse elektroporatsiooni.

[0209] Leiutisekohaste polüpeptiidide tootmiseks kasutatavaid prokarüoodirakke kasvatatakse tehnika tasemest tuntud sobivas söötmes, mis sobib valitud peremeesrakkude kasvatamiseks. Sobivate söötmete näidete hulka kuulub Luria puljong (*Luria broth*, LB) koos vajalike toidulisanditega. Mõnedes teostustes sisaldab sööde ka selektsioonivainet, mis on valitud ekspressioonivektori konstruktsiooni alusel, et võimaldada ekspressioonivektorit sisaldavate prokarüoodirakkude selektiivset kasvamist. Näiteks ampitsilliiniresistentsuse geeni ekspresseerivate rakkude kasvatamise söötmesse lisatakse ampitsilliini.

[0210] Lisaks süsiniku, lämmastiku ja anorgaanilise fosfaadi allikatele võib sobivates kontsentratsioonides lisada kõiki vajalikke lisandeid kas üksi või segus teise lisandi või söötme, näiteks kompleksse lämmastikuallikaga. Kasvusööde võib valikuliselt sisaldada ühte või mitut redutseerivat ainet, mis valitakse rühmast, millesse kuuluvad glutatioon, tsüsteiin, tsüstamiin, tioglükollaat, ditioerütritool ja ditiotreitool.

[0211] Prokarüootseid peremeesrakke kasvatatakse sobival temperatuuridel. Näiteks *E. coli* kasvatamiseks on eelistatud temperatuur vahemikus umbes 20 °C kuni 39 °C, eelistatumalt umbes 25 °C kuni 37 °C, veelgi eelistatumalt umbes 30 °C. Söötme pH võib olla ükskõik missugune pH vahemikus umbes 5 kuni 9 ja see sõltub peamiselt peremeesorganismist. *E. coli* puhul on pH eelistatult umbes 6,8 kuni 7,4, eelistatumalt umbes 7,0.

[0212] Kui leiutisekohases ekspressioonivektoris kasutatakse indutseeritavat promotorit, siis indutseeritakse valguga ekspressioon promotori aktivatsiooniks sobivates tingimustes. Polüpeptiidide transkriptsiooni kontrolli all hoidmiseks kasutatakse PhoA promotoreid. Seega kasvatatakse transformeeritud peremeesrakke indutseerimiseks fosfaadipiiranguga söötmes. Eelistatult on fosfaadipiiranguga sööde C.R.A.P. sööde (vt näiteks: Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Vastavalt kasutatavale vektorikonstruktile võib kasutada ka paljusid teisi tehnika tasemest tuntud induktoreid.

[0213] Ühes teostuses sekreteeritakse ekspresseeritud polüpeptiidid peremeesrakkude periplasmasse ja saadakse sellest kätte. Valgu kättesaamine hõlmab tavaliselt mikroorganismi purustamist, üldiselt selliste vahendite abil nagu osmootne šokk, sonikeerimine või lüüs. Kui rakud on purustatud, võib rakujäänused või kõik rakud eemaldada tsentrifuugimise või filtrimisega. Valke võib täiendavalt puhastada, näiteks afiinsuskromatograafia abil. Alternatiivselt võib valgud transportida raku söötmesse ja eraldada sealt. Rakud võib eemaldada rakukul-

tuurist ning kultuuri supernatandi filtrida ja kontsentreerida toodetud valkude täiendavaks puhastamiseks. Ekspresseeritud polüpeptiide võib täiendavalt eraldada ja identifitseerida, kasutades üldtuntud meetodeid, nagu polüakrüülamiidgeelelektroforees (PAGE) ja *Western bloti* test.

[0214] Leiutise ühes eripäras viiakse antikehade suures koguses tootmine läbi fermentatsiooniprotsessiga. Rekombinantsete valkude tootmiseks on teada erinevaid suuremastaabilisi järeltoitega fermentatsiooniprotsesse. Suuremastaabiliste fermentatsioonide tootlikkus on vähemalt 1000 liitrit, eelistatult umbes 1000 kuni 100000 liitrit. Nendes fermenterites kasutatakse hapniku ja toitainete, eelkõige glükoosi (eelistatud süsiniku/energiaallikas) ühtlaseks jaotamiseks tiiviksegisteid. Väikesemahuline fermentatsioon tähendab üldiselt fermenteerimist fermenteris, mille maht ei ole suurem kui umbes 100 liitrit ning see võib ulatuda umbes 1 liitrist kuni 100 liitrini.

[0215] Fermentatsiooniprotsessis käivitatakse valguekspressiooni induktsioon tavaliselt pärast seda, kui rakud on kasvatatud sobivates tingimustes soovitud tihenduseeni, näiteks optilise tihenduseeni ( $OD_{550}$ ) umbes 180-220, selles etapis on rakud varases statsionaarses faasis. Vastavalt kasutatavale vektorikonstruktile võib kasutada erinevaid, tehnika tasemest tuntud ja eespool kirjeldatud induktoreid. Rakke võib kasvatada enne indutseerimist lühemate perioodide jooksul. Tavaliselt indutseeritakse rakke umbes 12-50 tundi, ehkki võib kasutada ka pikemaid või lühemaid indutseerimisaegu.

[0216] Leiutisekohaste polüpeptiidide tootmise saagise ja kvaliteedi parendamiseks võib modifitseerida erinevaid fermentatsioonitingimusi. Näiteks võib sekreteeritavate antikehapolüpeptiidide õige kokkupakkumise ja voltumise parendamiseks kasutada peremeesrakkude kotransfekterimiseks lisavektoreid, mis üleekspresseerivad tšaperonvalke, näiteks Dsb valke (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD ja/või DsbG) või FkpA (tšaperoni aktiivsusega peptidüülprolüül-*cis,trans*-isomeraas). On näidatud, et tšaperonvalgud hõlbustavad bakteriaalsetes peremeesrakkudes toodetavate heteroloogsete valkude õiget voltumist ja lahustuvust, Chen et al., (1999) *J. Biol. Chem.*, 274:19601-19605, Georgiou et al., US patent 6083715, Georgiou et al., US patent 6027888, Bothmann, Pluckthun, (2000) *J. Biol. Chem.*, 275:17100-17105, Ramm, Pluckthun, (2000) *J. Biol. Chem.*, 275:17106-17113, Arie et al., (2001) *Mol. Microbiol.*, 39:199-210.

[0217] Et viia ekspresseeritavate heteroloogsete valkude (eriti proteolüüsitundlike valkude) proteolüüs minimaalseks, võib käesoleva leiutise puhul kasutada teatud peremeestüvesid,

milles puuduvad proteolüütilised ensüümid. Näiteks võib peremeesraku tüve modifitseerida, viies geneetilise(d) mutatsiooni (mutatsioonid) geenidesse, mis kodeerivad tuntud bakteriproteaase, nagu proteaas III, OmpT, DegP, Tsp, proteaas I, proteaas Mi, proteaas V, proteaas VI, ja nende kombinatsioone. Mõned *E. coli* proteaasi-puudulikud tüved on saadaval ja kirjeldatud näiteks järgmistes allikates: Joly et al., (1998), *supra*, Georgiou et al., US patent 5264365, Georgiou et al., US patent 5508192, Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

[0218] Ühes teostuses kasutatakse leiutisekohases ekspresioonisüsteemis peremeesrakku dena *E. coli* tüvesid, milles puuduvad proteolüütilised ensüümid ja mida on transformeeritud plasmiididega, mis üleekspresseerivad ühte või mitut tšaperonivalku.

#### *Antikeha puhastamine*

[0219] Ühes teostuses puhastatakse siin toodetud antikehavalku täiendavalt, et saada preparaadid, mis on praktiliselt homogeensed edasisteks testideks ja kasutamiseks. Võib kasutada tehnika tasemest tuntud standardseid valgupuhastamise meetodeid. Järgnevad protseduurid on sobivate puhastamisprotseduuride näited: fraktsioneerimine immunoafiinsetes või ioonivahetuskolonnides, etanooliga sadestamine, HPLC pööratud faasil, kromatograafia silikageelil või kationivahetusvaigul nagu DEAE, kromatofokusseerimine, SDS-PAGE, ammoooniumsulfaadiga sadestamine ja geelfiltratsioon näiteks Sephadex G-75 abil.

[0220] Ühes eripäras kasutatakse leiutisekohaste täispikkade antikehaproduktide immunoafiinseks puhastamiseks tahkele kandjale immobiliseeritud A-valku. A-valk on *Staphylococcus aureus* rakuseina valk molekulmassiga 41 kD, mis seob antikehade Fc-piirkonda kõrge afiinsusega, Lindmark et al., (1983) *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13. Tahke faas, millele A-valk immobiliseeritakse, on eelistatult kolonn, mis sisaldab klaasi- või silikageelipinda, eelistatumalt kontrollitava poori suurusega klaaskoloni või ränihappekoloni. Mõnedes rakendustes on kolonn kaetud reaktiivi, näiteks glütserooliga, katsena vähendada kontaminantide ebaspetsiifilist adhesiooni.

[0221] Nagu esimeses puhastusetapis, kantakse rakukultuurist saadud preparaat tahkele faasile immobiliseeritud A-valgule, et võimaldada huvialuse antikeha spetsiifilist seondumist A-valguga. Seejärel pestakse tahket faasi sellele mittespetsiifiliselt seondunud kontaminantide eemaldamiseks. Huvialune antikeha saadakse tahkelt faasilt lõpuks kätte elueerimisega.



Antikehade saamine eukariootsete peremeesrakkude kasutamisel

[0222] Vektorikomponentide hulka kuuluvad üldiselt, kuid nendega piirdumata, üks või mitu järgmistest järjestustest: signaaljärjestus, replikatsiooni alguspunkt, üks või mitu markergeeni, enhanser-element, promootor ja transkriptsiooni terminatsioonijärjestus.

*(i) Signaaljärjestuse komponent*

[0223] Eukariootses peremeesrakus kasutamiseks mõeldud vektor võib sisaldada ka signaaljärjestust või mõne muu polüpeptiidi järjestust, millel on huvialuse küpse valgu või polüpeptiidi N-terminuses spetsiifiline lõikamissait. Valitud heteroloogne signaaljärjestus on eelistatult selline, mis peremeesrakus ära tuntakse ja töödeldakse (s.t lõigatakse signaalpeptidaasi poolt). Imetajarakkudes ekspresseerimiseks on saadaval imetaja signaaljärjestused, samuti viraalsed sekretsiooni juhtjärjestused, näiteks lihtherpese (*herpes simplex*) gD signaaljärjestus.

[0224] Sellise eellaspiirkonna DNA ligeeritakse lugemisraamis antikeha kodeeriva DNA-ga.

*(ii) Replikatsiooni alguspunkt*

[0225] Üldiselt ei ole replikatsiooni alguspunkti komponent imetajate ekspressioonivektoritele vajalik. Näiteks SV40 alguspunkti võib tüüpiliselt kasutada ainult sellepärast, et ta sisaldab varajast promootorit.

*(iii) Seleksioonigeeni komponent*

[0226] Ekspressiooni- ja kloonimisvektorid võivad sisaldada seleksioonigeeni, mida nimetatakse ka seleksioonimarkeriks. Tüüpilised seleksioonigeenid kodeerivad valke, mis (a) annavad resistentsuse antibiootikumide või muude toksiinide vastu, näiteks ampitsilliini, neomütsiini, metotreksaadi või tetratsükliini vastu, (b) komplementeerrivad auksotroofseid puudulikkusi juhul, kui see on relevantne, või (c) tarnivad kriitilisi toitaineid, mida kompleks-  
söötmes ei sisaldu.

[0227] Ühes selektsiooniskeemi näites kasutatakse ravimit peremeesrakkude kasvu peatamiseks. Need rakud, mis on heteroloogse geeniga edukalt transformeeritud, toodavad ravimiresistentsust tagavat valku ja jäävad seega selektsioonirežiimis ellu. Sellise dominantse selektsiooni näidetes kasutatakse ravimitena neomütsiini, mükofenoolhapet ja hügomütsiini.

[0228] Teises imetajarakkudele sobivate selektsioonimarkerite näites kasutatakse markereid, mis võimaldavad identifitseerida neid rakke, mis on kompetentsed võtma sisse nukleiinhapet, näiteks DHFR, tümidiinkinaas, metallotioneiin-I ja -II, eelistatult primaatide metallotioneiini geenid, adensiini desaminaas, ornitiindekarboksülaas jne.

[0229] Näiteks identifitseeritakse DHFR-i selektsioonigeeniga transformeeritud rakud kõigepealt kõigi transformantide kasvatamisel rakusöötmes, mis sisaldab metotreksaati (Mtx) – DHFR-ga konkureerivat antagonistit. Sobivad peremeesrakud, kus kasutatakse metsiktüüpi DHFR-i, on hiina hamstri munasarja (*Chinese hamster ovary*, CHO) rakuliin, milles puudub DHFR aktiivsus (näiteks ATCC CRL-9096).

[0230] Alternatiivselt võib peremeesrakke (eelkõige metsiktüüpi peremeesrakke, mis sisaldavad endogeenset DHFR), mis on transformeeritud või kotransformeeritud DNA-järjestustega, mis kodeerivad antikeha, metsiktüüpi DHFR valku ja teist selektsioonimarkerit, nagu aminoglükosiid-3'-fosfotransferaas (APH), selekteerida rakkude kasvamise järgi söötmes, mis sisaldab selektsioonimarkerile sobivat selektsiooniainet, näiteks aminoglükosiidset antibiootikumi, näiteks kanamütsiini, neomütsiini või G418, vt US patenti 4965199.

*(iv) Promootori komponent*

[0231] Ekspressiooni- ja kloonimisvektorid sisaldavad tavaliselt promootorit, mille peremeesorganism tunneb ära ja mis on juhitavalt seotud antikeha-polüpeptiidi nukleiinhappega. Eukarüootide promootorjärjestused on teada. Peaaegu kõik eukarüootsed geenid sisaldavad AT-rikast piirkonda, mis paikneb transkriptsiooni initsiatsioonisaadist umbes 25-30 aluse võrra vastassuunas. Teine järjestus, mis esineb transkriptsiooni algusest 70 kuni 80 aluse võrra vastassuunas, on CNCAAT-piirkond, kus N võib olla ükskõik missugune nukleotiid. Enamiku eukarüootsete geenide 3'-otsas on AATAAA-järjestus, mis võib olla signaal polüA saba lisamiseks kodeeriva järjestuse 3'-otsa. Kõiki neid järjestusi saab sobivalt inserteerida eukarüootsetesse ekspressioonivektoritesse.

[0232] Vektoritelt toimuvat antikeha-polüpeptiidi transkriptsiooni imetaja peremeesrakkudes kontrollitakse näiteks promootorite abil, mis on saadud viiruste genoomidest, nagu polüoomiviirus, lindude rõugeviirus, adenoviirus (näiteks adenoviirus 2), veise papilloomiviirus, lindude sarkoomiviirus, tsütomegaloviirus, retroviirus, hepatiit B viirus ja ahviviirus 40 (SV40), heteroloogsete imetajapromootorite, näiteks aktiini promootori või immunoglobuliini promootori, kuumašoki promootorite abil eeldusel, et need promootorid sobivad kokku peremeesraku süsteemidega.

[0233] SV40 varajast ja hilist promootorit on mugav saada SV40 restriksioonifragmendina, mis sisaldab ka SV40 viiruse replikatsiooni alguspunkti. Inimese tsütomegaloviiruse kohest varajast promootorit on mugav saada HindIII restriksioonifragmendina. Imetajarakkudele mõeldud DNA ekspresioonisüsteem, kus vektorina kasutatakse veise papilloomiviirust, on avaldatud US patendis 4419446. Selle süsteemi modifikatsiooni kirjeldatakse US patendis 4601978. Lihtherpese viiruse tümidiinkinaasi promootori kontrolli all oleva inimese  $\beta$ -interferooni cDNA ekspressiooni kohta hiirerakkudes vt ka Reyes et al., Nature, 297:598-601 (1982). Alternatiivselt võib promootorina kasutada Rousi sarkoomiviiruse pikka lõppkordust.

*(v) Enhanserelemendi komponent*

[0234] Selle leiutisekohase antikeha-polüpeptiidi kodeeriva DNA transkriptsiooni kõrgemates eukarüootides suurendatakse sageli vektorisse enhanserjärjestuste inserteerimisel. Praegu on teada palju imetajageenide enhanserjärjestusi (globiin, elastaas, albumiin,  $\alpha$ -fetoproteiin ja insuliin). Tüüpiliselt aga kasutatakse eukarüootse raku viiruse enhanserit. Näidete hulka kuuluvad SV40 replikatsiooni alguspunkti hilisel poolel paiknev enhanser (aluspaarid 100-270), tsütomegaloviiruse varajase promootori enhanser, polüoomiviiruse replikatsiooni alguspunkti replikatsiooni hilisel poolel paiknev enhanser ja adenoviiruse enhanserid. Eukarüootsete promootorite aktiveerimiseks sobivate ehnaaser-elementide kohta vt ka Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982). Enhanseri võib splaissida vektorisse antikeha-polüpeptiidi kodeeriva järjestuse suhtes 5'- või 3'-asendis, aga eelistatult paikneb see promootori suhtes 5'-asendis.

*(vi) Transkriptsiooni terminatsiooni komponent*

[0235] Eukarüootsetes peremeesrakkudes kasutatavad ekspressioonivektorid sisaldavad tüüpiliselt ka järjestusi, mis on vajalikud transkriptsiooni terminatsiooniks ja mRNA stabiliseerimiseks. Sellised järjestused on tavaliselt saadavad eukarüootsete või viiruse DNA-de või cDNA-de 5'- ja mõnikord ka 3'-mittetransleeritavatest piirkondadest. Need piirkonnad sisaldavad nukleotiidisegmente, mis transkribeeritakse polüadenüülitud fragmentidena antikeha kodeeriva mRNA mittetransleeritavas osas. Üks kasulik transkriptsiooni terminatsiooni komponent on veise kasvuhormooni polüadenüleerimispiirkond, vt WO 94/11026 ja selles avaldatud ekspressioonivektorid.

*(vii) Peremeesrakkude selektsioon ja transformeerimine*

[0236] Siinsetes vektorites oleva DNA kloonimiseks või ekspresseerimiseks sobivate peremeesrakkude hulka kuuluvad siin kirjeldatud kõrgemate eukarüootide rakud, kaasa arvatud selgroogsete peremeesrakud. Selgroogsete organismide rakkude paljundamine kultuuris (koe-kultuuris) on muutunud tavapäraseks protseduuriks. Kasulike imetaja-peremeesrakuliinide näited on ahvi neeru rakuliin CV1, mis on transformeeritud SV40-ga (COS-7, ATCC CRL 1651), inimese embrüonaalse neeru rakuliin (293 või 293-rakud, mis on kloonitud kasvatamiseks suspensioonkultuuris, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)), beebihamstri neerurakud (BHK, ATCC CCL 10), hiina hamstri munasarjarakud/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)), hiire sertolirakud (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)), ahvi neerurakud (CV1 ATCC CCL 70), aafrika rohepärdiku neerurakud (VERO-76, ATCC CRL-1587), inimese emakakaelakartsinoomi rakud (HELA, ATCC CCL 2), koera neerurakud (MDCK, ATCC CCL 34), buffalo roti maksarakud (BRL 3A, ATCC CRL 1442), inimese kopsurakud (W138, 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).

[0237] Peremeesrakke transformeeritakse antikehade tootmiseks mõeldud eespool kirjeldatud ekspressiooni- või kloonimisvektoritega ja kasvatatakse tavapärasel toitesöötmes, mida on

sobivalt modifitseeritud promootoritelt indutseerimiseks, transformantide selekteerimiseks või soovitud järjestusi sisaldavate geenide amplifitseerimiseks.

*(viii) Peremeesrakkude kasvatamine*

[0238] Leiutisekohase antikeha tootmiseks kasutatavaid peremeesrakke võib kasvatada erinevates söötmetes. Peremeesrakkude kasvatamiseks sobivad kaubanduses saadavad söötmed, nagu Ham'i F10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) ja Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde ((*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM), Sigma). Lisaks võib peremeesrakkude kasvusöötmena kasutada ükskõik missugust muud söödet, mida on kirjeldatud allikates: Ham et al., Meth. Enz., 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), US patendid 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 või 5122469, WO 90/03430, WO 87/00195, või US patent Re. 30985. Kõigile nendele söötmetele võib vajadusel lisada hormoone ja/või teisi kasvufaktoreid (nagu insuliin, transferriin või epidermaalne kasvufaktor), sooli (nagu naatriumkloriid, kaltsium, magneesium ja fosfaat), puhvreid (nagu HEPES), nukleotiide (nagu adenosiin ja tümidiin), antibiootikume (nagu Gentamycin<sup>TM</sup>-ravim), mikroelemente (mis defineeritakse tavaliselt mikromolaarses vahemikus lõppkontsentratsioonides esinevate anorgaaniliste ühenditena) ja glükoosi või sellega samaväärset glükoosiallikat. Võib lisada ka sobivates kontsentratsioonides ükskõik missuguseid muid eriala asjatundjale teadaolevaid lisaaineid. Söötme tingimused, nagu temperatuur, pH jne, on samad, mida ekspresseerimiseks valitud peremeesrakkudele on eelnevalt kasutatud, ja need eriala spetsialistile teada.

*(ix) Antikeha puhastamine*

[0239] Kui kasutatakse rekombinantseid tehnikaid, võib antikehi toota rakkude sees või sekreteerida need otse söötmesse. Kui antikeha toodetakse rakkude sees, siis eemaldatakse esimeses etapis osakeste – kas peremeesrakkude või lüüsitud fragmentide - jäänused näiteks tsentrifuugimise või ultrafiltrimisega. Kui antikeha sekreteeritakse söötmesse, kontsentreeritakse üldiselt kõigepealt nende ekspressioonisüsteemide supernatandid, kasutades kaubanduses saadavaid valkude kontsentreerimise filtreid, näiteks firmade Amicon või Millipore Pellicon ultrafiltrimisseadmeid. Kõigis eeltoodud etappides võib proteolüüsi inhibeerimiseks

kasutada proteaaside inhibiitoreid nagu PMFS ja kõrvaliste kontaminantide kasvu tõkestamiseks võib lisada antibiootikume.

[0240] Rakkudest valmistatud antikehapreparaate saab puhastada näiteks kromatograafia abil hüdroksüapatiidil, geelelektroforeesi, dialüüsi ja afiinsuskromatograafiaga, kusjuures eelistatud puhastamismeetod on afiinsuskromatograafia. A-valgu sobivus afiinsusligandina kasutamiseks sõltub liigist ja antikehas esineva ükskõik missuguse immunoglobuliini Fc-domeeni isotüübist. A-alku võib kasutada nende antikehade puhastamiseks, mis põhinevad inimese  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  või  $\gamma 4$  rasketel ahelatel (Lindmark et al., J. Immunol. Meth., 62:1-13 (1983)). G-alku soovitatakse kõigi hiire isotüüpide ja inimese  $\gamma 3$  jaoks (Guss et al., EMBO J., 5:15671575 (1986)). Maatriks, millele afiinsusligand kinnitatakse, on kõige sagedamini agaros, aga saadaval on ka teised maatriksid. Mehaaniliselt stabiilsed maatriksid, nagu kontrollitava poori suurusega klaas või polü(stüreendivinüül)benseen, võimaldavad suuremaid voolukiirusi ja lühemat töötlemisaega, kui seda saab saavutada agarosiga. Kui antikeha sisaldab C<sub>H</sub>3-domeeni, on puhastamiseks kasulik Bakerbond ABX™ vaik (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ). Sõltuvalt kättesaadavast antikehast on saadaval ka teised valkude puhastamise meetodid, nagu fraktsioneerimine ionivahetuskolonnis, etanooliga sadestamine, HPLC pööratud faasil, kromatograafia silikageelil, kromatograafia hepariinkolonnis, Sepharose™ kromatograafia aniooni- või kationivahetusvaigul (nagu polüasparagiinhappekolonnis), kromatofokuseerimine, SDS-PAGE ja sadestamine ammooniumsulfaadiga.

[0241] Ükskõik missugus(t)e esialgse(te) puhastusetaapi (-etappide) järel võib huvialust antikeha ja kontaminante sisaldava seguga läbi viia hüdrofoobseid interaktsioone kasutava kromatograafia madala pH juures, kasutades eluatsioonipuhvrit, mille pH on umbes 2,5-4,5, eelistatult madalal soolakontsentratsioonil (näiteks umbes 0–0,25 M soola juuresolekul).

### Aktiivsustestid

[0242] Leiutisekohaseid antikehi võib iseloomustada nende füüsikalise-keemiliste omaduste ja bioloogiliste funktsioonide suhtes tehnika asemest tuntud erinevate testide abil.

[0243] Puhastatud immunoglobuliin võib täiendavalt iseloomustada rea testide abil, mille hulka kuuluvad, kuid nendega piirdumata, N-terminaalne sekveneerimine, aminohappe analüüs, mittedenatureeriv geelfiltratsioon kõrgsurve-vedelikukromatograafia (*high pressure*

*liquid chromatography*, HPLC) meetodil, massispektromeetria, ioonivahetuskromatograafia ja lõikamine papaiiniga.

[0244] Leiutise konkreetsetes teostustes analüüsitakse siin toodetud immunoglobuliine nende bioloogilise aktiivsuse suhtes. Mõnedes teostustes testitakse leiutisekohaseid immunoglobuliine nende antikehi siduva aktiivsuse suhtes. Tehnika tasemest tuntud antigeeni sidumise testide hulka, mida siin võib kasutada, kuuluvad sellised meetodid nagu *western blot*, radioimmunotestid, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ensüümiseoseline immunosorptsioonitest), „võileib (*sandwich*)“-immunotestid, immunosadestamistestid, fluorestsimmunotestid ja A-valgu immunotestid. Illustreeriv antigeeni sidumise test on esitatud allpool näidete osas.

[0245] Ühes teostuses peab käesolev leiutis silmas muudetud antikeha, millel on mõned, aga mitte kõik efektorfunktsioonid, mis muudab ta soovitud kandidaadiks paljudele rakendustele, milles on tähtis antikeha *in vivo* poolväärtusaeg, aga teatud efektorfunktsioonid (nagu komplement ja ADCC) on mittevajalikud või kahjulikud. Teatud teostustes mõõdetakse toodetud immunoglobuliini Fc-aktiivsusi tagamaks, et säilinud on ainult soovitud omadused. CDC ja/või ADCC aktiivsuste vähendamise/kõrvaldamise kinnitamiseks võib läbi viia *in vitro* ja/või *in vivo* tsütotoksilisuse testid. Näiteks võib läbi viia Fc-retseptori (FcR) sidumistestid tagamaks, et antikehal puudub Fc $\gamma$ R sidumisvõime (seega tõenäoliselt puudub ka ADCC aktiivsus), aga on säilinud FcRn sidumisaktiivsus. Primaarsed ADCC vahendavad rakud – NK rakud – ekspresseerivad ainult Fc $\gamma$ RIII, samas kui monotsüüdid ekspresseerivad Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII ja Fc $\gamma$ RIII. FcR ekspressioon hematopoeetilistel rakkudel on kokku võetud artikli Ravetch, Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991), leheküljel 464 tabelis 3. Huvialuse molekuli ADCC aktiivsuse hindamise *in vitro* testi näide on kirjeldatud US patendis 5500362 või 5821337. Sellisteks testideks kasulike efektorrakkude hulka kuuluvad perifeerse vere mononukleaarsed rakud (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) ja looduslikud tapjarakud (*Natural Killer*, NK). Alternatiivselt või lisaks võib huvialust molekuli hinnata *in vivo* näiteks loomamudelil, nagu selles, mis on avaldatud artiklis Clynes et al., *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998). Samuti võib läbi viia C1q sidumistestide kinnitamaks, et antikeha ei ole võimeline siduma C1q ja seetõttu puudub tal CDC aktiivsus. Komplementi aktiveerimise hindamiseks võib läbi viia CDC testi, näiteks nii, nagu on kirjeldatud artiklis Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996). Samuti võib läbi viia FcRn sidumise ja

*in vivo* kõrvaldamise/poolväärtusaja määramisi, kasutades tehnika tasemest tuntud meetodeid, näiteks neid, mida on kirjeldatud siin näidete osas.

### Humaniseeritud antikehad

[0246] Käesolev leiutis hõlmab humaniseeritud antikehi. Tehnika tasemest on tuntud erinevad meetodid mitte-inimese antikehade humaniseerimiseks. Näiteks võib humaniseeritud antikeha sisaldada ühte või mitut aminohappejääki, mis on temasse sisse viidud inimesest erinevast allikast. Neid mitte-inimese aminohappejääke nimetatakse sageli „import“-jääkideks, mis tüüpiliselt on võetud varieeruvast „import“-domeenist. Humaniseerimise võib olemuslikult läbi viia, järgides Winteri ja kaastöötajate meetodit (Jones et al., (1986) Nature, 321:522-525, Riechmann et al., (1988) Nature, 332:323-327, Verhoeyen et al., (1988) Science, 239:1534-1536), asendades hüpervarieeruva piirkonna järjestused inimese antikeha vastavates järjestustes. Seega on sellised „humaniseeritud“ antikehad kimäärsed antikehad (US patent 4816567), kus oluliselt väiksem osa kui inimese intaktne varieeruv domeen on asendatud inimesest erineva liigi vastava järjestusega. Praktikast on humaniseeritud antikehad tüüpiliselt inimese antikehad, milles mõned hüpervarieeruva piirkonna jäägid ja võib-olla mõned FR-jäägid on asendatud näriliste antikehade analoogsetest saitidest pärit jääkidega.

[0247] Humaniseeritud antikehade valmistamisel kasutatavate inimese varieeruvate domeenide – nii kergete kui raskete domeenide – valik on antigeensuse vähendamiseks väga oluline. Niinimetatud „parema sobituvuse (*best fit*)“ meetodi järgi skriinitakse närilise antikeha varieeruva domeeni järjestust inimese tuntud varieeruvate domeenide järjestuste täieliku raamatukogu vastu. Seejärel tunnistatakse inimese järjestus, mis on närilise omale kõige lähedasem, humaniseeritud antikeha puhul kasutatavaks inimese raamistikuks (Sims et al., (1993) J. Immunol., 151:2296, Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol., 196:901). Teise meetodi puhul kasutatakse konkreetset raamistikku, mis on tuletatud inimese antikehade kõigi kergete või raskete ahelate konkreetse alarühma konsensusjärjestusest. Üht ja sama raamistikku võib kasutada mitmele erinevale humaniseeritud antikehale (Carter et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285, Presta et al., (1993) J. Immunol., 151:2623).

[0248] Lisaks on tähtis, et humaniseeritavad antikehad säilitaksid kõrge afiinsuse antigeeni suhtes ja muud soodsad bioloogilised omadused. Selle eesmärgi saavutamiseks valmistatakse humaniseeritud antikehad ühe meetodi järgi lähtejärjestuste ja erinevate kontseptuaalsete



humaniseeritud produktide analüüsiprotsessi abil, kasutades lähtejärjestuste ja humaniseeritud järjestuste kolmemõõtmelisi mudeleid. Immunoglobuliinide kolmemõõtmelised mudelid on üldiselt saadaval ja eriala asjatundjale tuttavad. Saadaval on arvutiprogrammid, mis illustreerivad ja kuvavad valitud immunoglobuliinide kandidaatjärjestuste võimalikke kolme-dimensionaalseid konformatsioonilisi struktuure. Nende kujutiste uurimine võimaldab analüüsida jääkide võimalikku rolli immunoglobuliini kandidaatjärjestuses, s.t analüüsida jääke, mis mõjutavad kandidaat-immunoglobuliini võimet seonduda oma antigeeniga. Sel viisil saab valida ja kombineerida retsiipiendi FR-jäägid ja importida järjestusi nii, et saavutatakse soovitud antikeha-omadused, näiteks suurenenud afiinsus sihtantigeeni(de) suhtes. Üldiselt osalevad hüpervarieeruva piirkonna jäägid otseselt ja kõige olulisemalt antigeeniga seondumise mõjutamises.

#### Antikehavariandid

[0249] Ühes eripäras esitab leiutis antikehafragmendi, mis sisaldab modifikatsioone Fc-piirkonda moodustavate Fc-polüpeptiidide liideses, kus modifikatsioonid hõlbustavad ja/või soodustavad heterodimeriseerumist. Need modifikatsioonid hõlmavad kümme sisseviimist esimesse Fc-polüpeptiidi ja süvendi sisseviimist teise Fc-polüpeptiidi, kusjuures kümme on süvendisse paigutatav nii, et see soodustab kompleksi moodustumist esimese ja teise Fc-polüpeptiidi vahel. Selliste modifikatsioonidega antikehade loomismeetodid on tehnika tasemest teada ja on kirjeldatud näiteks US patendis 5731168.

[0250] Mõnedes teostustes peetakse silmas siin kirjeldatud antikehade aminohapete järjestuse modifikatsiooni (modifikatsioone). Näiteks võib olla soovitav parendada antikeha seondumisasiinsust ja/või muid bioloogilisi omadusi. Antikeha aminohapete järjestuse variandid valmistatakse sobivate nukleotiidimuutuste sisseviimisel antikeha nukleiinhappesse või siis peptiidsünteesi abil. Selliste modifikatsioonide hulka kuuluvad näiteks antikeha aminohapete järjestuse jääkide deletsioonid ja/või insertsioonid ja/või asendused. Kõik deletsioonide, insertsioonide ja asenduste kombinatsioonid tehakse lõppkonstrukti saamiseks eeldusel, et lõppkonstruktil on soovitud omadused. Aminohappe muutusi võib antikeha aminohapete järjestusse viia selle järjestuse valmistamise ajal.

[0251] Kasulikku meetodit antikehas olevate konkreetsete jääkide või piirkondade identifitseerimiseks mutageneesiks eelistatud kohtadena nimetatakse „alaniini skaneerivaks mutage-

neesiks“, nagu on kirjeldanud Cunningham ja Wells (1989), *Science*, 244:1081-1085. Siin identifitseeritakse sihtmärgiks olevate jääkide rühm (näiteks laetud jäägid, nagu Arg, Asp, His, Lys ja Glu) ja asendatakse need neutraalse või negatiivselt laetud aminohappega (kõige eelistatumaltalaniini või polüalaniiniga), et kahjustada aminohappe interaktsiooni antigeeniga. Neid aminohappe kohti, mis on asenduse suhtes tundlikud, parendatakse asendussaitidesse täiendavate või teiste variantide sisseviimisega. Seega, kui aminohapete järjestuse variandi sisseviimise koht on eelnevalt määratud, ei tarvitse mutatsiooni loomus *per se* olla eelnevalt määratud. Näiteks viiakse antud saiti tehtava mutatsiooni käitumise analüüsimiseks sihtmärk-koodonis või sihtmärk-piirkonnas läbi skaneeriv või juhuslik mutageenes ja ekspresseeruvaid immunoglobuliine skriinitakse soovitud aktiivsuse suhtes.

[0252] Aminohapete järjestuse insertioonide hulka kuuluvad sellised liitmised amino- ja/või karboksüterminusele, mis ulatuvad ühest jäägist sadat või enamat jääki sisaldavate polüpeptiidideni, samuti ühe või mitme aminohappejäägi järjestusesisesed insertioonid. Terminaalsete insertioonide näidete hulka kuuluvad N-terminaalset metioniinjääki sisaldav antikeha või tsütotoksilise polüpeptiidiga liidetud antikeha. Teiste antikehamolekuli insertioonivariantide hulka kuuluvad antikeha N- või C-terminuse liitmine ensüümi (näiteks ADEPT) või polüpeptiidiga, mis suurendab antikeha poolväärtusaega seerumis.

[0253] Teist tüüpi variant on aminohappe asenduse variant. Need variandid sisaldavad antikehamolekulis vähemalt ühte aminohappejääki, mis on asendatud sellest erineva jäägiga. Asendusmutageneesiks suurimat huvi pakkuvate saitide hulka kuuluvad hüpervarieeruvad piirkonnad, aga silmas peetakse ka FR muutusi. Konservatiivsed asendused on näidatud tabelis 2 pealkirja „eelistatud asendused“ all. Kui sellised asendused annavad tulemuseks bioloogilise aktiivsuse muutuse, võib sisse viia olulisemaid muutusi, mida tabelis 2 on nimetatud „näidisasendusteks“, või mida on allpool täiendavalt kirjeldatud viitega aminohappe klassidele, ning skriinidaprodukte.

Tabel 2

Originaaljääk	Näidisasendused	Eelistatud asendused
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln

Originaaljääk	Näidisasendused	Eelistatud asendused
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, Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleutsiin, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gin, 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

[0254] Antikeha bioloogiliste omaduste olulised modifikatsioonid viiakse läbi selliste asenduste valimisel, mis erinevad oluliselt oma toime poolest (a) asenduse alas oleva polüpeptiidkarkassi struktuuri, näiteks lehe või helikaalse konformatsiooni, säilimisele, (b) molekuli sihtmärksaidi laengu või hüdrofoobsuse säilimisele, või (c) külghelate koguhulga säilimisele. Aminohappeid võib grupeerida nende külghelate omaduste sarnasuse järgi (teoses: A. L. Lehninger, Biochemistry, teine väljaanne, lk. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)) kui:

- (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).

[0255] Alternatiivselt võib looduslikult esinevaid jääke jagada rühmadesse nende külghelate ühiste omaduste järgi kui:

- (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,
- (6) aromaatsed: Trp, Tyr, Phe.

[0256] Mittekonservatiivsed asendused toovad kaasa nendest klassidest ühe liikme vahetumise teise klassi liikmega. Selliseid asendatud jääke võib sisse viia ka konservatiivse asenduse saitidesse või, eelistatumalt, ülejäänud (mittekonserveerunud) saitidesse.

[0257] Üks tüüp asendusvariante hõlmab lähteantikeha (näiteks humaniseeritud või inimese antikeha) hüpervarieerivas piirkonnas ühe või mitme jäägi asendamist. Üldiselt on selle tulemusena edasiseks väljatöötamiseks valitud variant (variandid) parendatud bioloogiliste omadustega võrreldes lähteantikehadega, millest ta (nad) loodi. Mugav tee nende asendusvariantide loomiseks hõlmab afiinsusküpsemist faagil kuvamise kasutamise abil. Lühidalt öeldes muteeritakse mitu hüpervarieeruva piirkonna saiti (näiteks 6-7 saiti), et luua igas saidis kõik võimalikud aminohappe asendused. Selliselt loodud antikehad kuvatakse filamentsetel faagiosakestel, liidetuna M13 geeni II produktiga, mis on pakitud kõigi osakeste sisse. Seejärel skriinitakse faagil kuvatud variante nende bioloogilise aktiivsuse suhtes (näiteks sidumisasiinsuse suhtes), nagu siin on avaldatud. Hüpervarieeruva piirkonna modifitseerimiseks sobivate kandidaatsaitide identifitseerimiseks võib läbi viiaalaniini skaneeriva mutageneesi, et identifitseerida need hüpervarieeruva piirkonna jäägid, mis oluliselt panustavad antigeeni sidumisse. Alternatiivselt või lisaks võib olla kasulik analüüsida antigeeni-antikeha kristallstruktuuri, et identifitseerida antikeha ja antigeeni kokkupuutepunktid. Sellised kokkupuutuvad jäägid ja nende naaberjäägid on kandidaadid siin välja töötatud meetoditel asendamiseks. Kui need variandid on loodud, skriinitakse variantide paneeli nii, nagu siin on kirjeldatud, ja ühes või mitmes asjakohases testis suurepärase omadustega antikehad võib valida edasiseks väljatöötamiseks.

[0258] Antikeha aminohapete järjestuste variante kodeerivad nukleiinhappemolekulid valmistatakse erinevatel tehnika tasemel tuntud meetoditel. Nende meetodite hulka kuuluvad, kuid nendega piirdumata, eraldamine looduslikust allikast (looduslikult esinevate aminohapete järjestuste variantide puhul) või valmistamine varem valmistatud antikehavariandi või mitte-variantversiooni oligonukleotiidi-vahendatud (või sait-suunatud) mutageneesi abil, PCR mutageneesi ja kassetmutageneesi abil.

[0259] Võib olla soovitatav viia leiutisekohase immunoglobuliini-polüpeptiidide Fc-piirkonda üks või mitu aminohappe modifikatsiooni, luues sellega Fc-piirkonna variandi. Fc-piirkonna variant võib sisaldada inimese Fc-piirkonna järjestust (näiteks inimese IgG1, IgG2, IgG3 või IgG4 Fc-piirkonna järjestust), mis sisaldab aminohappe modifikatsiooni (näiteks asendust) ühes või mitmes aminohappe asendis, kaasa arvatud hinge-piirkonna tsüsteiini.

[0260] Vastavalt sellele kirjeldusele ja tehnika tasemest teadaolevale arvestatakse, et mõned teostustes võib leiutisekohastes meetodites kasutatav antikeha sisaldada ühte või mitut muutust võrreldes metsiktüüpi paarik-antikehaga, näiteks Fc-piirkonnas. Need antikehad säilitavad sellest hoolimata praktiliselt samad tunnused, mis on vajalikud terapeutiliseks kasulikkuseks, kui nende metsiktüüpi paarikud. Näiteks arvatakse, et Fc-piirkonda võib teha teatud muutusi, mis annavad tulemuseks muutunud (s.t kas parenenud või vähenenud) C1q sidumise ja/või komplemendi-sõltuva tsütotoksilisuse (*Complement Depending Cytotoxicity*, CDC), näiteks nagu on kirjeldatud patenditaotluses WO 99/51642, vt ka Duncan, Winter, Nature, 322:738-40 (1988), US patent 5648260, US patent 5624821 ja WO 94/29351, mis puudutavad teisi Fc-piirkonna variante.

### Immunokonjugaadid

[0261] Leiutis puudutab ka immunokonjugaate või antikeha-ravimi konjugaate (*antibody-drug conjugates*, ADC), mis sisaldavad antikeha, mis on konjugeeritud tsütotoksilise ainega, nagu kemoterapeutiline aine, ravim, kasvu inhibeeriv aine, toksiin (näiteks bakteriaalse, seene-, taimse või loomse päritoluga ensümaatiliseltselt aktiivne toksiin või selle fragment), või radioaktiivse isotoobiga (s.t radiokonjugaaiga).

[0262] Antikeha-ravimi konjugaatide kasutamine tsütotoksiliste või tsütostaatiliste ainete, s.t vähiravi puhul kasvajakakkude hävitamiseks või inhibeerimiseks mõeldud ravimite paikseks kohaletoimetamiseks ((Syrigos, Epenetos, (1999) Anticancer Research, 19:605-614, Niculescu-Duvaz, Springer, (1997) Adv. Drg Del. Rev., 26:151-172, US patent 4975278) võimaldab teoreetiliselt ravimi osamolekuli suunatud kohaletoimetamist kasvajatesse ja nende rakusisest akumulierumist sinna, kuna nende konjugeerimata ravimainete süsteemne manustamine võib anda tulemuseks normaalsete rakkude suhtes vastuvõetamatu toksilisuse taseme, samuti kasvajakakkudesse, mille kõrvaldamist soovitakse ((Baldwin et al., (1986) Lancet, (15. märts 1986):603-605, Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents

In Cancer Therapy: A Review," teoses Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (toim.), lk. 475-506). Selle abil otsitakse maksimaalset tõhusust ja minimaalset toksilisust. Nende strateegiate puhul on leitud, et kasulikud on nii polükloonsed antikehad kui monokloonsed antikehad (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Nende meetodite puhul kasutatavate ravimite hulka kuuluvad daunomütsiin, doksorubitsiin, metotreksaat ja vindesiin (Rowland et al., (1986) *supra*). Antikeha-toksiini konjugaatides kasutatavate toksiinide hulka kuuluvad bakteriaalsed toksiinid nagu difteeriatoksiin, taimsed toksiinid nagu ritsiin, madalamolekulaarsed toksiinid 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), maitansinoidid (EP 1391213, Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8618-8623) ja kaliheamütsiin (Lode et al., (1998) Cancer Res., 58:2928, Hinman et al., (1993) Cancer Res., 53:3336-3342). Toksiinid võivad avaldada tsütotoksilist ja tsütostaatilist toimet selliste mehhanismide kaudu nagu tubuliini sidumine, DNA sidumine või topoisomeraasi inhibeerimine. Mõned tsütotoksilised ravimid kipuvad olema inaktiivsed või vähem aktiivsed juhul, kui nad on konjugeeritud suurte antikehade või valguretseptorite ligandidega.

[0263] ZEVALIN® (ibritumomab tiuksetaan, Biogen/Idex) on antikeha-radioisotoobi konjugaat, mis koosneb hiire IgG1 kappi monokloonses antikehas, mis on suunatud normaalsete ja pahaloomuliste B-lümfotsüütide pinnal leiduva CD20 antigeeni vastu, ja <sup>111</sup>In või <sup>90</sup>Y radioisotoobist, mis on omavahel seotud tiourea-kelaatiga abil (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). Ehkki ZEVALIN-il on toime B-rakkudele mitte-Hodgkini lümfoomi (*non-Hodgkin's Lymphoma*, NHL) puhul, annab selle manustamine enamiku patsientide puhul tulemuseks rasked ja pikaajalised tsütopeeniad. MYLOTARG™ (gemtuzumab osogamütsiin, Wyeth Pharmaceuticals) – antikeha ja ravimi konjugaat, mis koosneb kaliheamütsiiniga liidetud inimese CD33-antikehas – kiideti 2000. a. heaks ägeda müeloidleukeemia ravimiseks süstimise teel (Drugs of the Future, (2000) 25(7):686, US patendid 4970198, 5079233, 5585089, 5606040, 5693762, 5739116, 5767285, 5773001). Kantusumab mertansiin (Immunogen, Inc.) – antikeha ja ravimi konjugaat, mis koosneb huC242 antikehas, mis on disulfiidlinkeri SPP abil liidetud maintasinoïdravimi osamolekuliga DM1 – on jõudnud faasi II kliinilistesse

katsetesse nende vähiliikide ravimiseks, mis ekspresseerivad CanAg, näiteks käärsöolevähk, pankreasevähk, maovähk jt. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.) – antikeha ja ravimi konjugaat, mis koosneb eesnäärme-spetsiifilise membraaniantigeeni (PSMA) vastasest monokloonsest antikehast, mis on seotud maitansinoidravimi osamolekuliga DM1 – on väljatöötamisel eesnäärmekasvajate võimalikuks raviks. Auristatiinpeptiidid, auristatiin E (AE), monometüülauristatiin E (MMAE) ja dolastatiini sünteetilised analoogid, konjugeeriti kimäärsete monokloonsete antikehadega cBR96 (spetsiifiline kartsinoomidel Lewis Y antigeeni suhtes) ja cAC10 (spetsiifiline hematoloogilistel pahaloomulistel kasvajatel CD30 antigeeni suhtes) (Doronina et al., (2003) *Nature Biotechnology*, 21(7):778-784, ja Francisco et al., (2003) *Blood*, 102, 1458-1465), ning need on terapeutilisel väljatöötamisel. Teiste ühendite hulka, mis on mõeldud kasutamiseks ravimikonjugaatides tsütotoksiliste ainetena, kuuluvad piiranguteta auristatiin E (AE), MMAF (auristatiin E variant (MMAE), kus ravimi C-terminuses on fenüülalaniin), ja AEVB (auristatiin E vale-rüübensüülhüdrasoon – AE C-terminuses olev happe suhtes labiilne linker). Ravimi antikehale kinnitamiseks sobivate konjugaadilinkerite hulka kuuluvad piiranguteta MC (maleimidokaproüülrühm), Val Cit (valiin-tsitruilliin, mille proteaasiga lõigatavas linkeris on dipeptiidisait), tsitruilliin (2-amino-5-ureidopentaanhape), PAB (p-aminobensüülkarbamooülrühm, linkeri "ennastohverdav" osa), Me (N-metüül-valiin-tsitruilliin, kus linker-peptiidisid on modifitseeritud, et takistada selle lõikamist katepsiin B abil), MC(PEG)6-OH (maleimidokaproüül-polüetüleenglükool, mis on kinnitatud antikeha tsüsteiinidele), SPP (N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüülditio)pentanoaat) ja SMCC (N-suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat). Need ja teised kasulikud ravimikonjugaadid ja nende valmistamine on avaldatud näiteks artiklis: Doronina, S. O. et al., *Nature Biotechnology*, 21:778-794 (2003). Eriti eelistatud linkermolekulide hulka kuuluvad näiteks N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditio)propionaat (SPDP) (vt näiteks: Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173, 723-737 (1978)), N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüülditio)butanoaat (SPDB) (vt näiteks US patenti 4563304), N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüülditio)pentanoaat (SPP) (vt CAS registrinumbrit 341498-08-6), N-suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaat (SMCC) (vt näiteks Yoshitake et al., *Eur. J. Biochem.*, 101, 395-399 (1979)) ja N-suktsiinimidüül-4-metüül-4-[2-(5-nitropüridüül)ditio]pentanoaat (SMNP) (vt näiteks US patenti 4563304).

[0264] Selliste immunokonjugaatide loomiseks kasulikke kemoterapeutilisi aineid on kirjeldatud eespool. Ensümaatilistelt aktiivsete toksiinide ja nende fragmentide hulka, mida saab kasutada, kuuluvad difteeriatoksiini A-ahel, difteeriatoksiini mittesiduvad aktiivsed fragmentid, eksotoksiini A-ahel (*Pseudomonas aeruginosa*'st), ritsiini A-ahel, abriini A-ahel, modetsiini A-ahel, alfa-sartsiin, *Aleurites fordii* valgud, diantiinvalgud, *Phytolaca americana* valgud (PAPI, PAPII ja PAP-S), *Momordica charantia* inhibiitor, kurtsiin, krotiin, *Saponaria officinalis*'e inhibiitor, geloniin, mitogelliin, restriktotsiin, fenomütsiin, enomütsiin ja trikotetseenid. Radiokonjugeeritud antikehade tootmiseks on saadaval erinevaid radionukliide. Näidete hulka kuuluvad  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  ja  $^{186}\text{Re}$ . Antikeha ja tsütotoksilise aine konjugaadid valmistatakse, kasutades erinevaid bifunktsionaalseid valkude sidestamise aineid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditiool)propionaat (SPDP), iminotiolaan (IT), imindoesitrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladiipimidaathüdrokloriid), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehyüdid (nagu glutaaraldehyüd), bisasidoühendid (nagu bis(p-asidobensoüül)heksaandiamiin), bisdiasooniumderivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluen-2,6-diisotsüanaat) ja bisaktiivsed fluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Näiteks saab ritsiini immunotoksiini valmistada nii, nagu on kirjeldanud Vitetta jt, *Science*, 238: 1098 (1987). Süsinik-14-mürgistatud 1-isotiotsüanatobensüül-3-metüüldietüleentriaminopentaäädikhape (MX-DTPA) on radionukliidi antikehaga konjugeerimiseks mõeldud kelaativa aine näide, vt WO 94/11026.

[0265] Siin peetakse silmas ka antikeha konjugaate ühe või mitme madalamolekulaarse toksiiniga, nagu kaliheamütsiin, maitansinoidid, trikotetseen ja CC1065, ja nende toksiinide derivaatidega, millel on toksiiniaktiivsus.

#### *Maitansiin ja maitansinoidid*

[0266] Leiutisekohane antikeha (kas täispikk antikeha või selle fragmentid) võib olla konjugeeritud ühe või mitme maitansinoidimolekuliga.

[0267] Maitansinoidid on mitoosi inhibiitorid, mis toimivad tubuliini polümerisatsiooni inhibeerimise kaudu. Maitansiin eraldati esmakordselt Ida-Aafrika põõsastaimest *Maytenus serrata* (US patent 3896111). Seejärel avastati, et teatud mikroobid toodavad samuti maitansinoide, nagu maitansinool ja C-3 maitansinool (US patent 4151042). Sünteetiline maitansinool ning selle derivaadid ja analoogid on avaldatud näiteks US patentides 4137230,



4248870, 4256746, 4260608, 4265814, 4294757, 4307016, 4308268, 4308269, 4309428, 4313946, 4315929, 4317321, 4322348, 4331598, 4361650, 4364866, 4424219, 4450254, 4362663 ja 4371533.

*Maitansinoidi ja antikeha konjugaadid*

[0268] Katses parendada nende terapeutilisi näitajaid, on maitansiin ja maitansinoidid konjugeeritud antikehadega, mis spetsiifiliselt seonduvad kasvajarakkude antigeenidele. Maitansinoidide sisaldavad immunokonjugaadid ja nende terapeutiline kasutamine on avaldatud näiteks US patentides 5208020 ja 5416064 ning Euroopa patendis EP 0425235 B1. Liu jt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8618-8623 (1996) kirjeldasid immunokonjugaate, mis sisaldavad maitansinoidi tähistusega DM1, mis on seotud inimese kolorektaalvähi vastu suunatud monokloonse antikehaga C242. Leiti, et konjugaat on kultuuris kasvatavatele käärsöolevähi rakkudele tugevalt tsütotoksiline ja on *in vivo* kasvajakasvu testis kasvajakavastase aktiivsusega. Chari jt, Cancer Research, 52:127-131 (1992), kirjeldavad immunokonjugaate, milles maitansinoid oli disulfiidlinkeri kaudu konjugeeritud hiire antikehaga A7, mis seondub inimese käärsöolevähi rakuliinidel oleva antigeeni või teise hiire monokloonse antikehaga TA.1, mis seob HER-2/*neu* onkogeeni. TA.1-maitansinoidi konjugaati testiti *in vitro* inimese rinnavähi rakuliinil SK-BR-3, mis ekspresseerib  $3 \times 10^5$  HER-2 pinnaantigeeni molekuli raku kohta. Ravimikonjugaat saavutas tsütotoksilisuse taseme, mis oli sarnane vaba maitansinoidravimi omaga ja mida oleks saanud suurendada, suurendades maitansinoidimolekulide arvu antikehamolekuli kohta. A7-maitansinoidikonjugaadil oli hiirtes madala süsteemse toksilisusega.

*Antikeha-maitansinoidi konjugaadid (immunokonjugaadid)*

[0269] Antikeha-maitansinoidi konjugaadid valmistatakse antikeha keemilisel sidumisel maitansinoidimolekuliga, vähendamata seejuures oluliselt nii antikeha kui maitansinoidimolekuli bioloogilist aktiivsust. Keskmiselt 3-4 konjugeeritud maitansinoidimolekuliga ühe antikehamolekuli kohta on näidatud tõhusat tsütotoksilisuse võimendamist sihtrakkude suhtes, mõjutamata seejuures negatiivselt antikeha funktsioneerimist või selle lahustuvust, ehkki isegi üks molekul toksiini antikeha kohta suurendaks eeldatavasti tsütotoksilisust võrreldes ainult antikehaga. Maitansinoidid on tehnika tasemest hästi tuntud ja neid saab sünteesida tuntud mee-

totitel või eraldada looduslikest allikatest. Sobivad maintasinoidid on avaldatud näiteks US patendis 5208020 ja teistes siin viidatud patentides ja mitte-patendipublikatsioonides. Eelistatud maintasinoidid on maitansinool ja maitansinooli analoogid, kus maintansinoolimolekuli on modifitseeritud aromaatses tuumas või mõnes muus maitansinoolimolekuli asendis, näiteks on erinevad maitansinoolestrid.

[0270] Antikeha-maintasinoidkonjugaatide valmistamiseks on tehnika tasemest teada palju ühendamisrühmi, kaasa arvatud näiteks need, mis on avaldatud US patendis 5208020, Euroopa patendis EP 0425235 B1 ning artiklis Chari et al., *Cancer Research*, 52:127-131 (1992). Ühendavate rühmade hulka kuuluvad disulfiidrühmad, tioeeterrühmad, happelabiilsed rühmad, fotolabiilsed rühmad, peptidaasilabiilsed rühmad või esteraasilabiilsed rühmad, nagu on kirjeldatud eespool määratletud patentides, kusjuures eelistatud on disulfiid- ja tioeeterrühmad.

[0271] Antikeha ja maitansinoidi konjugaate võib valmistada, kasutades erinevaid bifunktsionaalseid valkude sidestamise aineid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditio)propionaat (SPDP), suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaad, iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladipimidaathüdrokloriid), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehydid (nagu glutaaraldehydid), bisasidoühendid (nagu bis(p-asidobensoüül)heksaandiamiin), bisdiasooniumderivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluen-2,6-diisotsüanaad) ja bisaktiivsed fluoriühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Disulfiidsidemete saamiseks eriti eelistatud sidestamise ainete hulka kuuluvad N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditio)propionaat (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173:723-737 [1978]) ja N-suktsiinimidüül-4-(2-püridüülditio)pentanoaat (SPP).

[0272] Linkeri võib mantasinoidimolekulile kinnitada erinevates asendites, sõltuvalt sideme tüübist. Näiteks võib estersideme moodustada reaktsioonil hüdroksüülrühmaga, kasutades tavapäraseid sidestamise meetodeid. Reaktsioon võib toimuda C-3 asendis, kus paikneb hüdroksüülrühm, C-14 asendis, mis on modifitseeritud hüdroksümetüülrühmaga, C-15 asendis, mida on modifitseeritud hüdroksüülrühmaga, ja C-20 asendis, kus paikneb hüdroksüülrühm. Eelistatud teostuses moodustatakse side maitansinooli või maitansinooli analoogi C-3 asendis.

*Kaliheamütsiin*

[0273] Teine huvialune immunokonjugaat sisaldab antikeha, mis on konjugeeritud ühe või mitme kaliheamütsiini molekuliga. Antibiootikumide kaliheamütsiiniperekond on võimeline tekitama kaheaheelalise DNA katkemisi juba sub-pikomolaarsetes kontsentratsioonides. Kaliheamütsiiniperekonna konjugaatide valmistamist vaadake US patentidest 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (kõik American Cyanamid Company patendid). Kaliheamütsiini struktuursete analoogide hulka, mida võib kasutada, kuuluvad, kuid nendega piirdumata:  $\gamma_1^I$ ,  $\alpha_2^I$ ,  $\alpha_3^I$ , N-atsetüül- $\gamma_1^I$ , PSAG ja  $\theta^I$ , (Hinman et al., Cancer Research, 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research, 58:2925-2928 (1998) ning eespool märgitud firma American Cyanamid patendid). Järgmine kasvavastane ravim, millega antikeha võib konjugeerida, on QFA, mis on antifolaat. Nii kaliheamütsiini kui QFA toimimissaidid on raku sees ja nad ei läbi kergesti rakumembraani. Seetõttu võimendab nende ainete rakkudesse võtmine antikehade vahendatud internaliseerumise abil tugevasti nende tsütotoksilisi toimeid.

*Teised tsütotoksilised aineid*

[0274] Teiste kasvavastaste ainete hulka, mida saab konjugeerida leiutisekohaste antikehadega, kuuluvad BCNU, streptoziitsiin, vinkristiin ja 5-fluorouratsüül, ainete perekond, mida ühiselt tuntakse kui LL-E33288 kompleksi, mis on kirjeldatud US patentides 5053394 ja 5770710, samuti esperamütsiinid (US patent 5877296).

[0275] Ensümaatiliselt aktiivsete toksiinide ja nende fragmentide hulka, mida võib kasutada, kuuluvad difteeriatoksiini A-ahel, eksotoksiini A-ahel (*Pseudomonas aeruginosa*'st), ritsiini A-ahel, abriini A-ahel, modetsiini A-ahel, alfa-sartsiin, *Aleurites fordii* valgud, dantiinvalgud, *Phytolaca americana* valgud (PAPI, PAPII ja PAP-S), *Momordica charantia* inhibiitor, kurtsiin, krotiin, *Saponaria officinalis*'e inhibiitor, geloniin, mitogelliin, restriktotsiin, fenomütsiin, enomütsiin ja trikotetseenid, vt näiteks patenditaotlust WO 93/21232, mis avaldati 28. oktoobril 1993.

[0276] Lisaks peab käesolev leiutis silmas immunokonjugaate, mis moodustatakse antikeha ja nukleolüütilise aktiivsusega ühendi (näiteks ribonukleaasi või DNA endonukleaasi nagu desoksüribonukleas (DNAasi)) vahel.

[0277] Kasvaja selektiivseks hävitamiseks võib antikeha sisaldada kõrge radioaktiivsusega aatomit. Radiokonjugeeritud antikehade tootmiseks on saadaval erinevaid radioaktiivseid isotoope. Näidete hulka kuuluvad At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> ja Lu radioaktiivsed isotoobid. Kui konjugaati kasutatakse detekteerimiseks, võib see sisaldada stsintigraafilisteks uuringuteks mõeldud radioaktiivset aatomit, näiteks Tc<sup>99m</sup> või I<sup>123</sup>, või spinmärgist kuvamiseks tuumamagnetresonantsi meetodil (*nuclear magnetic resonance*, NMR) (mida tuntakse ka kui magnetresonants-kuvamist (*magnetic resonance imaging*, MRI)), nagu jood-123, jood-131, indium-111, fluor-19, süsinik-13, lämmastik-15, hapnik-17, gadoliinium, mangaan või raud.

[0278] Radioaktiivseid ja muid märgiseid saab konjugaadi koostisse liita tuntud viisidel. Näiteks võib peptiidi sünteesida biosünteesi meetodil või keemilise aminohappesünteesi meetodil, kasutades sobivaid aminohapete eellasmolekule, mis sisaldavad näiteks vesiniku asemel 19-fluori. Sellised märgised, nagu Tc<sup>99m</sup> või I<sup>123</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup> ja In<sup>111</sup>, võib kinnitada peptiidi tsüsteiinijääkide kaudu. Ütrium-90 võib kinnitada lüsiinijäägi kaudu. Jood-123 liitmiseks võib IODOGEN meetodit (Fraker et al., (1978) *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 80: 49-57). Teisi meetodeid kirjeldatakse detailselt teoses: "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989).

[0279] Antikeha ja tsütotoksilise aine konjugaate võib valmistada, kasutades erinevaid bifunktsionaalseid valkude sidestamise aineid, nagu N-suktsiinimidüül-3-(2-püridüülditio)propionaat (SPDP), suktsiinimidüül-4-(N-maleimidometüül)tsükloheksaan-1-karboksülaad, iminotiolaan (IT), imidoestrite bifunktsionaalsed derivaadid (nagu dimetüüladipimidaathüdrokloriid), aktiivsed estrid (nagu disuktsiinimidüülsuberaat), aldehüüdid (nagu glutaaraldehüüd), bisasidoühendid (nagu bis(p-asidobensoüül)heksaandiamiin), bisdiasoonium derivaadid (nagu bis(p-diasooniumbensoüül)etüleendiamiin), diisotsüanaadid (nagu toluen-2,6-diisotsüanaad) ja bisaktiivsed fluorühendid (nagu 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenseen). Näiteks ritziini immunotoksiini saab valmistada nii, nagu on kirjeldatud artiklis: Vitetta et al., *Science*, 238:1098 (1987). Süsinik-14-märgistatud 1-isotiotsüanatobensüül-3-metüüldietüleentriaminopentaäädikhape (MX-DTPA) on radionukliidi ja antikeha konjugeerimiseks sobiva kelaatiiva aine näide, vt WO 94/11026. Linker võib olla „lõigatav linker“, mis hõlbustab tsütotoksilise ravimi vabanemist rakust. Näiteks võib kasutada happelabiilset linkerit, peptidaasi-tundlikku linkerit, fotolabiilset linkerit, dimetüüllinkerit või disulfiidi sisaldavat linkerit (Chari et al., *Cancer Research*, 52:127-131 (1992), US patent 5208020).

[0280] Leiutisekohaste ühendite all peetakse silmas eelkõige, kuid nendega piirdumata, ADC preparaate, mis on valmistatud ristsidestavate reaktiivide abil: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC ja sulfo-SMPB ning SVSB (suktsiinimidüül-(4-vinüülsulfoon)bensoaat), mis on kaubanduses saadaval (näiteks firmast Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., USA), vaadake Applications Handbook and Catalog, lk. 467-498, 2003-2004.

#### *Antikeha-ravimi konjugaatide valmistamine*

[0281] Antikeha-ravimi konjugaatides (*antibody drug conjugates*, ADC) on antikeha (Ab) konjugeeritud ühe või mitme ravimi (*drug*, D) osamolekuli, näiteks umbes 1 kuni 20 ravimi-osamolekuliga, linkeri (L) kaudu. ADC valemiga 1 võib valmistada mitmel viisil, kasutades eriala asjatundjale tuntud orgaanilise keemia reaktsioone, tingimusi ja reaktiive, kaasa arvatud (1) antikeha nukleofiilse rühma reaktsioon kahevalentse linker-reaktiiviga Ab-L moodustamiseks kovalentse sideme kaudu, millele järgneb reaktsioon ravimi-osamolekuliga D, ja (2) ravimi-osamolekuli nukleofiilse rühma reaktsioon kahevalentse linker-reaktiiviga D-L-i moodustamiseks kovalentse sideme kaudu, millele järgneb reaktsioon antikeha nukleofiilse rühmaga.



[0282] Antikehade nukleofiilsete rühmade hulka kuuluvad, kuid nendega piirdumata, (i) N-terminaalsed aminorühmad, (ii) külgahelate aminorühmad, näiteks lüsiin, (iii) külgahelate tioolrühmad, näiteks tsüsteiin, ja (iv) suhkrute hüdroksüül- või aminorühmad juhul, kui antikeha on glükosüülitud. Amino-, tiool- ja hüdroksüülrühmad on nukleofiilsed ja suutelised reageerima kovalentsete sidemete moodustamiseks elektrofiilsete rühmade või linker-osamolekulidega, kaasa arvatud (i) aktiivsed estrid, nagu NHS-estrid, HOBt-estrid, halogenoformiaadid ja happahalogeniidid, (ii) alküül- ja bensüülhalogeniidid, nagu halogenoatsetamiidid, (iii) aldehüüdid, ketoonid, karboksüül- ja maleimidorühmad. Teatud antikehad sisaldavad redutseeritavaid ahelatevahelisi disulfiide, s.t tsüsteiinsildasid. Antikehasid võib muuta linker-reaktiividega konjugeerimiseks reaktsioonivõimeliseks töötlemisel redutseeriva ainega

nagu DDT (ditiotreitool). Seega moodustub igast tsüsteinsillast teoreetiliselt kaks reaktsioonivõimelist tiol-nukleofiili. Täiendavaid nukleofiilseid rühmi saab antikehadesse viia lüsiinide reaktsioonil 2-iminotiolaaniga (Traut'i reaktiiviga), mis annab tulemuseks aminorühma konverteerimise tiolrühmaks.

[0283] Antikeha-ravimi konjugaate võib toota ka antikeha modifitseerimise abil elektrofiilsete osamolekulide sisseviimiseks, mis võivad reageerida linker-reaktiivi või ravimi nukleofiilsete asendajatega. Suhkru vormis glükosüülitud antikehi võib oksüdeerida näiteks oksüdeerivate perjodaat-reaktiividega, et moodustada aldehüüd- või ketorühmi, mis võivad reageerida linker-reaktiivi või ravimi osamolekuli aminorühmaga. Selle tulemusena saadud Schiffi aluse iminorühmad võivad moodustada stabiilse sideme või neid võib redutseerida näiteks borohüdriidreaktiividega, et moodustada stabiilsed aminosidemed. Ühes teostuses võib glükosüülitud antikeha süsivesikuosa reaktsioon kas galaktoosoksidaasi või naatriummetaperjodaadiga anda tulemuseks valgus oleva karbonüülrühma (aldehüüd- või ketorühma), mis võib reageerida sobivate ravimirühmadega (Hermanson, Bioconjugate Techniques). Teises teostuses võivad N-terminaalset seriini- või treoniinijääki sisaldavad valgud reageerida naatriummetaperjodaadiga, mille tulemusena saadakse esimese aminohappe asemel aldehüüd (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem., 3:138-146, US patent 5362852). Selline aldehüüd võib reageerida ravimi-osamolekuli või linker-nukleofiiliga.

[0284] Samamoodi kuuluvad ravimi-osamolekulis olevate nukleofiilide hulka, kuid nendega piirdumata, amino-, tiol-, hüdroksüül-, hüdrasiid-, oksiiim-, hüdrasiin-, tiosemikarbasoon-, hüdrasiinkarboksülaat- ja arüülhüdrasiidrühmad, mis on võimelised reageerima kovalentsete sidemete moodustamiseks elektrofiilsete rühmade või linker-osamolekulide ja linker-reaktiividega, kaasa arvatud (i) aktiivsed estrid, nagu NHS-estrid, HOBt-estrid, halogenoformiaadid ja happehalogeniidid, (ii) alküül- ja bensüülhalogeniidid, nagu halogenoatsetamiidid, (iii) aldehüüdid, ketoonid, karboksüül- ja maleimidorühmad.

[0285] Alternatiivselt võib valmistada liitvalke, mis sisaldavad antikeha ja tsütotoksilist ainet, näiteks rekombinantsete meetodite või peptiidsünteesiga. DNA pikkuses võivad sisalduda vastavad piirkonnad, mis kodeerivad konjugaadi kahte osa, mis on kas kõrvuti või lahutatud piirkonna abil, mis kodeerib linker-peptiidi, mis ei riku konjugaadi soovitud omadusi.

[0286] Antikeha võib konjugeerida „retseptoriga“ (nagu streptavidiin) eelsuunamiseks kasvajale, kui antikeha-retseptori konjugaati manustatakse patsiendile, millele järgneb seondumata konjugaadi ringlusest eemaldamine kõrvaldava aine kasutamisega ja seejärel „ligandi“ (näi-

teks avidiini) manustamine, mis on konjugeeritud tsütotoksilise ainega (näiteks radionukliidiga).

### Antikehaderivaadid

[0287] Leiutisekohaseid antikehi võib täiendavalt modifitseerida tehnika tasemest tuntud ja kergesti kättesaadavaid täiendavaid mittevalgulisi osamolekule sisaldavateks. Eelistatult on antikeha derivaatimiseks sobivad osamolekulid vees lahustuvad polümeerid. Vees lahustuvate polümeeride mittepiiravate näidete hulka kuuluvad polüetüleenglükool (PEG), etüleenglükooli/propüleenglükooli kopolümeerid, karboksümetüülselluloos, dekstraan, polüvinüülalkohol, pürrolidoon, polü-1,2-dioksolaan, polü-1,3,6-trioksaan, etüleenimaleanhüdriidi kopolümeer, polüaminohapped (kas homopolümeerid või juhuslikud kopolümeerid) ja dekstraan või polü(n-vinüülpürrolidoon)polüetüleenglükool, propüleenglükooli homopolümeerid, polüpropüleenoksiidi/etüleenoksiidi kopolümeerid, polüoksüetüülitud polüoolid (näiteks glütserool, polüvinüülalkohol) ja nende segud. Polüetüleenglükooli propioonaldehüüd võib olla tootmiseks eelistatud oma stabiilsuse tõttu vees. Polümeer võib olla ükskõik missuguse molekulmassiga ja see võib olla hargnenud või mittehargnenud. Antikehaga ühendatud polümeeride arv võib varieeruda ja juhul, kui antikeha on kinnitatud enama kui ühe polümeeriga, võivad need olla kas samad või erinevad molekulid. Üldiselt võib derivaatimiseks kasutatavate polümeeride arvu ja/või tüübi määrata kaalutluste alusel, mille hulka kuuluvad, kuid nendega piirdumata, parendatava antikeha konkreetsed omadused või funktsioonid, kas antikehaderivaati kasutatakse ravimiseks kindlaksmääratud tingimustes jne.

### Farmatseutilised preparaadid

[0288] Leiutisekohast antikeha sisaldavad säilitatavad terapeutilised preparaadid valmistatakse soovitud puhtuseastmega antikeha segamisel valikuliste füsioloogiliselt vastuvõetavate kandjate, abiainete või stabilisaatoritega (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. väljaanne, toim. Osol, A. (1980)) vesilahuste, lüofiliseeritud või teisiti kuivatatud preparaate vormis. Vastuvõetavad kandjad, abiaained või stabiliseerijad on kasutatud annustes ja kontsentratsioonides vastuvõtjale mittetoksilised ja hõlmavad puhvreid, nagu fosfaat-, tsitrat-, histidiinpuhver ja teistest orgaanilistest hapetest moodustatud puhvrid, antioksüdante, kaasa

arvatud askorbiinhape ja metioniin, säilitusaineid (nagu oktaetsüüldimetüülbensüülammooniumkloriid, heksametoniumkloriid, bensalkooniumkloriid, benseetooniumkloriid, fenool, butüül- või bensüülalkohol, alküülparabeenid, nagu metüül- või propüülparabeen, katehool, resortsinool, tsükloheksanool, 3-pentanool ja m-kresool), madalamolekulaarseid (lühemad kui 10 jääki) polüpeptiide, valke, nagu seerumi albumiin, želatiin või immunoglobuliinid, hüdrofiilseid polümeere nagu polüvinüülpirrolidoon, aminohappeid, nagu glütsiin, glutamiin, asparagiin, histidiin, arginiin või lüsiin, monosahhariide, disahhariide ja muid süsivesikuid, kaasa arvatud glükoos, mannoos või dekstriinid, kelaativaid aineid nagu EDTA, suhkruid, nagu sahharoos, mannitool, trehaloos või sorbitool, soola moodustavaid vastasioone nagu naatriumiioonid, metallikomplekse (näiteks Zn-valgu komplekse) ja/või mitteioonseid pindaktiivseid aineid, nagu TWEEN™, PLURONICS™ või polüetüleenglükool (PEG).

[0289] Siin toodud preparaat võib konkreetse ravitava näidustuse puhul sisaldada ka rohkem kui ühte toimivat ühendit, eelistatult sellist, millel on komplementaarne toime nii et need toimivad ühendid ei mõju teineteisele kahjulikult. Sellised molekulid esinevad sobivas kombinatsioonis kogustes, mis on kavatsetaval eesmärgil efektiivsed.

[0290] Aktiivsed koostisosad võib sulgeda ka mikrokapslisse, mis valmistatakse näiteks koatserevatsiooni meetodil või vedelike polümerisatsioonil, näiteks vastavalt hüdroksümetüülselluloosist või želatiinist mikrokapslisse ja polü(metüülmetakrülaadist) mikrokapslisse, kolloidsetesse ravimi kohaletoimetamise süsteemidesse (näiteks liposoomidesse, albumiini mikrokerakesse, mikroemulsioonidesse, nanopartiklitesse ja nanokapslitesse) või makroemulsioonidesse. Sellised meetodid on avaldatud teoses: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. väljaanne, toim. Osol, A. (1980).

[0291] *In vivo* kasutamiseks mõeldud preparaadid peavad olema steriilsed. Steriliseerimise saab kergesti läbi viia filtrimisel läbi steriilsete filtrismembraanide.

[0292] Võib valmistada ka toimeainet püsivalt vabastavaid preparaate. Toimeainet püsivalt vabastavate preparaatide näidete hulka kuuluvad tahketest hüdrofoobsetest polümeeridest valmistatud poolläbilaskvad maatriksid, mis sisaldavad leiutisekohast immunoglobuliini, kusjuures need maatriksid on kindla kujuga vahendid, näiteks kiled või mikrokapslid. Toimeainet püsivalt vabastavate maatriksite näidete hulka kuuluvad polüestrid, hüdrogeelid (näiteks polü(2-hüdroksüetüülmetakrülaad) või polü(vinüülalkohol), polülaktiidid (US patent 3773919), L-glutamiinhappe ja etüül-L-glutamaadi kopolümeerid, mittelagunev etüleenvinüülatsetat, lagunevad piimhappe-glükoolhappe kopolümeerid, nagu LUPRON DEPOT™



(süstitavad mikrokerakesed, mis koosnevad piimhappe-glükoolhappe kopolümeerist ja leuproliidatsetaadist) ja polü-D-(-)-3-hüdroksüvõihape. Kui polümeerid, nagu etüleenvinüülatsetaat ja piimhappe-glükoolhape, võimaldavad molekulide vabanemist rohkem kui 100 päeva jooksul, siis teatud hüdrogeelid vabastavad valgud lühema aja jooksul. Kui kapseldatud immunoglobuliinid jäävad organismi liiga pikaks ajaks, võivad nad denatureeruda või agregeeruda 37 °C juures niiskusele eksponeerituse tulemusena, mille tulemuseks on bioloogilise aktiivsuse kadumine ja võimalikud immunogeensuse muutused. Sõltuvalt selles osalevast mehhanismist võib stabiliseerimiseks välja töötada otstarbekohased strateegiad. Näiteks kui leitakse, et agregatsioonimehhanism on molekulidevahelise S-S-sideme moodustumine tio-disulfiidi vastastikuse vahetumise kaudu, võib stabiliseerumise saavutada sulfüdrüüljääkide modifitseerimise, happelistest lahustest lüofiliseerimise, niiskusesisalduse kontrollimisega, kasutades sobivaid lisaaineid, ja spetsiifiliste polümeermaatriksi-kompositsioonide väljatöötamise abil.

### Kasutamine

[0293] Leiutisekohast antikeha võib kasutada näiteks *in vitro*, *ex vivo* ja *in vivo* terapeutilistes meetodites. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada antagonistidena antigeeni spetsiifilise aktiivsuse osaliseks või täielikuks blokeerimiseks *in vitro*, *ex vivo* ja/või *in vivo*. Lisaks suudavad vähemalt mõned leiutisekohased antikehad neutraliseerida teiste organismide antigeenide aktiivsust. Seega võib leiutisekohaseid antikehi kasutada antigeeni spetsiifilise aktiivsuse inhibeerimiseks näiteks antigeeni sisaldavas rakukultuuris, inimesubjektidel või teistel imetajasubjektidel, kelle organism sisaldab antigeeni, millega antikeha annab ristreaktsioone (näiteks šimpans, paavian, marmorsett, roeahv ja reesusmakaak, siga või hiir). Ühes teostuses võib leiutisekohast antikeha kasutada antigeeni aktiivsuse inhibeerimiseks antikeha antigeeniga kokkupuutesse viimisel, nii et antigeeni aktiivsus on inhibeeritud. Eelistatult on antigeen inimese valgumolekul.

[0294] Ühes teostuses võib leiutisekohast antikeha kasutada antigeeni inhibeerimise meetodis subjektidel, kes kannatab sellise häire all, mille puhul antigeeni aktiivsus on kahjulik, kus meetod hõlmab subjektile leiutisekohase antikeha manustamist, nii et subjekti antigeeni aktiivsus inhibeeritakse. Eelistatult on antigeen inimese valgumolekul ja subjekt on inimesubjekt. Alternatiivselt võib subjekt olla imetaja, kelle organism ekspresseerib antigeeni,

millega leiutisekohane antikeha seondub. Lisaks võib subjekt olla imetaja, kelle organismi antigeen on sisse viidud (näiteks antigeeni manustamisel või antigeeni transgeeni ekspresseerimisel). Leiutisekohast antikeha võib inimsubjektile manustada terapeutilistel eesmärkidel. Lisaks võib leiutisekohast antikeha manustada inimesest erinevale imetajale (näiteks primaardile, seale või hiirele), kelle organism ekspresseerib antigeeni, millega immunoglobuliin annab ristreaktsioone, kas veterinaarsetel eesmärkidel või inimese haiguse loomamudelina. Mis puutub viimasesse eesmärki, siis sellised loomamudelid võivad olla kasulikud leiutisekohase antikeha terapeutilise tõhususe hindamiseks (näiteks annuste ja manustamise ajalise režiimi testimiseks). Leiutisekohaste blokeerivate antikehade hulka, mis on terapeutiliselt kasulikud, kuuluvad näiteks, aga nendega piirdumata, HER2-vastased, VEGF-vastased, IgE-vastased, CD11-vastased, interferoonivastased ja koefaktorivastased antikehad. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada ühe või mitme antigeenimolekuli ebanormaalse ekspressiooni ja/või aktiivsusega seotud haiguste, häirete või seisundite, kaasa arvatud, kuid nendega piirdumata pahaloomulised ja healoomulised kasvajakasvajad, mitte-leukeemiad ja pahaloomulised lümfoidkasvajad, neuronite, gliia, astrotsüütide, hüpotalamuse ja teiste näärmete, makrofaagide, epiteeli, strooma ja blastotsöoli häired ja põletikulised angiogeneetilised ja immunoloogilised häired, ravimiseks, pärssimiseks, progresseerumise edasilükkamiseks, taastumise tõkestamiseks/edasilükkamiseks, leevendamiseks või tõkestamiseks.

[0295] Ühes eripäras on leiutisekohane blokeeriv antikeha spetsiifiline ligand-antigeeni suhtes ja inhibeerib antigeeni aktiivsust, blokeerides ligandi ja retseptori vahelist interaktsiooni, milles ligand-antigeen osaleb, või sekkudes sellesse, inhibeerides sellega vastava signaaliraja ja teised molekulaarsed või rakulised sündmused. Leiutis rõhutab ka retseptorispetsiifilisi antikehi, mis tingimata ei takista ligandi seondumist, aga mis sekkuvad retseptori aktivatsiooni, inhibeerides sellega kõik vastused, mille ligandi seondumine normaalolukorras käivitab. Leiutis hõlmab ka antikehi, mis kas seonduvad eelistatult või eranditult ligandi-retseptori kompleksidele. Leiutisekohane antikeha võib toimida ka konkreetse antigeeni retseptori agonistina, tugevdades, võimendades või aktiveerides sellega ligandi poolt vahendatava retseptori aktivatsiooni kõik toimed või osa nendest.

[0296] Teatud teostustes manustatakse patsiendile immunokonjugaati, mis sisaldab tsütotoksilise ainega konjugeeritud antikeha. Mõnedes teostustes seotakse immunokonjugaat ja/või antigeen, millega ta on seondunud, rakule või internaliseeritakse rakku, mille tulemuseks on immunokonjugaadi suurenenud terapeutiline tõhusus sihtrakkude suhtes, millega ta seondub.

Ühes teostuses on tsütotoksiline aine suunatud sihtrakus olevale nukleiinhappele või mõjutab seda. Selliste tsütotoksiliste ainete näidete hulka kuuluvad kõik siin märgitud kemoterapeutilised ained (nagu maitansinoid või kaliheamütsiin), radioaktiivsed isotoobid või ribonukleaas või DNA endonukleaas.

[0297] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada teraapias kas üksi või kombinatsioonis teisega. Näiteks võib leiutisekohast antikeha manustada koos teise antikeha, kemoterapeutilis(t)e aine(te) (kaasa arvatud kemoterapeutiliste ainete segu), teis(t)e tsütotoksilis(t)e aine(te), angiogeneesivasta(t)e aine(te), tsütokiinide ja/või kasvu inhibeeriva(te) aine(te)ga. Kui leiutisekohane antikeha inhibeerib kasvaja kasvu, võib olla eriti soovitatav kombineerida ta ühe või mitme terapeutilise ainega, mis samuti inhibeerib (inhibeerivad) kasvaja kasvu. Näiteks võib raviskeemis ühendada leiutisekohase antikeha VEGF-vastase antikeha (näiteks avastiiniga) ja/või ErbB-vastase antikehadega (näiteks Herceptin<sup>®</sup> või HER2-vastase antikehaga), näiteks siin kirjeldatud haiguste ravimisel, kaasa arvatud kolorektaalvähk, metastaatiline rinnavähk ja neeruvähk. Alternatiivselt või lisaks võib patsient saada kombineeritud kiiritusravi (näiteks välist kiiritust või ravi radioaktiivselt märgistatud ainega nagu antikeha). Selliste eespool märgitud kombinatsioonravide hulka kuuluvad ühendatud manustamine (kus kaks või enam ainet sisalduvad samas preparaadis või eraldi preparaatides) ja eraldi manustamine, kus leiutisekohane antikeha võib anda enne ja/või pärast lisaravimi või -ravimite manustamist.

[0298] Leiutisekohane antikeha (ja lisaraviaine) manustatakse ükskõik missugusel sobival viisil, kaasa arvatud parenteraalne, subkutaanne, intraperitoneaalne, intrapulmonaalne ja intranasaalne tee, ning soovi korral lokaalse ravina kahjustusesisese manustamisena. Parenteraalsete infusioonide hulka kuuluvad intramuskulaarne, intravenoosne, intraarteriaalne, intraperitoneaalne või subkutaanne manustamine. Lisaks võib antikeha mugavalt manustada impulss-infusiooni teel, eelkõige antikeha alanevate annuste abil. Annustamine võib toimuda ükskõik missugusel sobival teel, näiteks süstimisega, nagu intravenoossete või subkutaansete süstide abil, sõltuvalt osaliselt sellest, kas manustamine on lühiajaline või korduv.

[0299] Leiutisekohase antikehakoostitsooni võib valmistada, annustada ja manustada viisil, mis on kooskõlas hea meditsiinitavaga. Selles kontekstis silmaspeetavate tegurite hulka kuuluvad konkreetne ravitav häire, konkreetne ravitav imetaja, individuaalse patsiendi kliiniline seisund, häire põhjus, aine sisestamiskoht, manustamismeetod, manustamisrežiim ja teised raviarstile teadaolevad tegurid. Antikeha ei pea valmistama, aga võib valikuliselt

valmistada koos ühe või mitme ainega, mida parajasti kasutatakse küsimuse all oleva häire tõkestamiseks või raviks. Nende teiste aineite efektiivsed kogused sõltuvad preparaadis sisalduva leiutisekohase antikeha kogusest, häire või haiguse liigist ja teistest eespool arutatud teguritest. Neid kasutatakse üldiselt samades annustes ja selliste manustamisteede abil, nagu siin on eelnevalt kasutatud või umbes 1 kuni 99% ulatuses siin kasutatud annustest.

[0300] Haiguse tõkestamise või ravi puhul sõltub leiutisekohase antikeha sobiv annus (kui seda kasutatakse üksi või kombinatsioonis teiste ainetega, nagu kemoterapeutilised ained) ravitava haiguse liigist, antikeha tüübist, haiguse raskusest ja kulust, sellest, kas antikeha manustatakse preventiivsel või terapeutilisel eesmärgil, eelnevast ravist, patsiendi haigusloost ja antikehavastusest ning raviarsti otsusest. Antikeha on patsiendile mugav manustada kas üks kord või ravimiseeriatena. Sõltuvalt haiguse tüübist ja raskusest on algne kandidaatannus patsiendile manustamiseks umbes 1 µg/kg kuni 15 mg/kg (näiteks 0,1 mg/kg kuni 10 mg/kg), kas näiteks ühe või mitme eraldi manustamisena või pideva infusiooni teel. Üks tüüpiline päevane annus võib olla vahemikus 1 µg/kg kuni 100 mg/kg või enam, sõltuvalt eespool nimetatud teguritest. Mitu päeva või enam kestva manustamise puhul jätkatakse ravi, sõltuvalt seisundist, kuni haigussümptomite soovitud mahasurumiseni. Üks antikeha näidisannus on vahemikus umbes 0,05 mg/kg kuni 10 mg/kg. Seega võib patsiendile manustada üks või mitu umbes 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg või 10 mg/kg annust (või nende kombinatsiooni). Selliseid annuseid võib manustada vaheaegadega, näiteks igal nädalal või iga kolme nädala järel (näiteks nii, et patsient saab umbes kaks kuni kakskümmend annust, näiteks kuus antikeha annust). Alguses võib manustada suurema annuse, millele järgneb üks või mitu väiksem(at) annus(t). Näidisannustamisrežiim hõlmab esmase, umbes 4 mg/kg suure annuse manustamist, millele järgneb igal nädalal antikeha säilitav umbes 2 mg/kg annus. Kasulikud võivad olla aga ka teised annustamisrežiimid. Selle ravi edukust saab kergesti järgida tava-päraste meetodite ja testide abil.

### Tooteartiklid

[0301] Kirjeldatakse tooteartiklit, mis sisaldab eespool kirjeldatud häirete ravimiseks, tõkestamiseks ja/või diagnoosimiseks kasulikke materjale. Tooteartikkel hõlmab mahutit ja mahutiga seotud märgist või pakendi infolehte. Sobivate mahutite hulka kuuluvad näiteks pudelid, viaalid, süstlad jne. Mahuteid või vormida erinevatest materjalidest, nagu klaas või plast.

Mahuti sisaldab kompositsiooni, mis kas ise või kombinatsioonis teise kompositsiooniga on efektiivne seisundi ravimiseks, tõkestamiseks ja/või diagnoosimiseks, ning sellel võib olla steriilne juurdepääsuava (näiteks võib mahuti olla intravenoosse lahuse kott või viaal, millel on hüpodermilise süstlanõelaga läbitorgatav kork). Vähemalt üks kompositsiooni toimeaine on leiutisekohane antikeha. Silt või pakendi infoleht näitab, et kompositsiooni kasutatakse valitud seisundi, näiteks vähi, ravimiseks. Lisaks võib tootartikkel sisaldada (a) esimest mahutit koos selles sisalduva kompositsiooniga, kus kompositsioon sisaldab leiutisekohast antikeha, ja (b) teist mahutit koos selles sisalduva kompositsiooniga, kus kompositsioon sisaldab täiendavat tsütotoksilist ainet. Selles leiutise teostuses võib tootartikkel täiendavalt sisaldada pakendi infolehte, mis näitab, et esimest ja teist antikehakompositsiooni saab kasutada konkreetse seisundi, näiteks vähi ravimiseks. Alternatiivselt või lisaks võib tootartikkel täiendavalt sisaldada teist (või kolmandat) mahutit, mis sisaldab farmatseutiliselt vastuvõetavat puhvrit, näiteks bakteriostaatilist süstevett (*bacteriostatic water for injection*, BWFI), fosfaatpuhverdatud soolalahust, Ringeri lahust ja dekstroosilahust. Tootartikkel võib täiendavalt sisaldada muid materjale, mis on soovitavad kaubanduslikust ja kasutaja vaatepunktist, kaasa arvatud teised puhvrid, lahjendid, filtrid, nõelad ja süstlad.

[0302] Järgnevad leiutisekohaste meetodite ja kompositsioonide näited. On mõistetav, et eespool esitatud üldise kirjelduse alusel võib läbi viia ka erinevaid teisi teostusi.

## NÄITED

[0303] Siin toodud näited kirjeldavad humaniseeritud beeta7-vastaste antikehade loomist roti hiirevastasest antikehast, mis seondub alfa4beeta7-integrini beeta7-subühikuga.

### Näide 1. Beeta7 antagonist-antikeha humaniseerimine

#### Materjalid ja meetodid

[0304] Järgid on nummerdatud Kabat'i järgi (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Kasutatakse ühetähelisi aminohapete lühendeid. DNA degenereerimine esitatakse IUB koodi kasutamise abil (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T).

[0305] *Otsesed hüpervarieeruva piirkonna siirikud inimese aktseptor-konsensusraamistikule.* Selles töös kasutatud fageemiid pVO350-2b on monovalentne Fab-g3 kuvamisvektor, mis sisaldab 2 avatud lugemisraami, mis on phoA promootori kontrolli all, nagu tegelikult on kirjeldatud artiklis: Lee et al., J. Mol. Biol., (2004), 340(5):1073-93. Esimene lugemisraam koosneb vaikivast signaaljärjestusest, mis on liidetud kerge aktseptorahela VL- ja CH1-domeenidega, ja teine koosneb vaikivast signaaljärjestusest, mis on liidetud raske aktseptorahela VH- ja CH1-domeenidega, ning neile järgneb faagi minoorse kattevalgu P3 kärbitud vorm (Lowman, H. et al., (1990) Biochemistry, 30:10832).

[0306] Roti Fib504 (antikeha FIB504.64, mida toodab hübriidloom ATCC HB-293, American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, USA) VL- ja VH-domeenid joondati inimese kapal konsensusdomeeni (huKI) ja inimese alarühma III (huIII) VH konsensusdomeeniga. Hüpervarieeruva piirkonna (*hypervariable region*, HVR) siirikute tegemiseks kasutati järgmisi raamistikke. HuKI kasutati kerge ahela varieeruva domeeni raamistikuks (vt jooniseid 1A ja 7). Raske ahela varieeruva domeeni raamistikuks võib VH aktseptor-raamistikuna kasutada inimese alarühma III (huIII) modifitseeritud VH-konsensusdomeeni, mis erineb huIII järjestusest 3 asendis: R71A, N73T ja L78A (vt Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)) (vt joonist 1B). Leiutisekohaste antikehade loomisel valmistati 504K-RF siirik samuti inimese alarühma III modifitseeritud VH-konsensusdomeenist, tehes sinna aminohappe asendused A71R ja A78F.

[0307] Roti Fib504 hüpervarieeruvad piirkonnad konstrueeriti inimese alarühma III VH aktseptor-raamistiku konsensusjärjestusse, et saada otsene HVR-siirik (Fib504 siirik) (vt joonist 1B). VL-domeenis siirati inimese konsensus-aktseptorisse huKI järgmised Fib504 piirkonnad: asendid 24-34 (L1), 50-56 (L2) ja 89-97 (L3) (joonis 1A). VH-domeenis siirati asendid 26-35 (H1), 49-65 (H2) ja 94-102 (H3) (joonis 1B). Lisaks konstrueeriti ka teine HVR siirik – Fib504 siirik, mis samuti sisaldas HVR-s VL asendit 49, mis põhines L2 laiendatud definitsioonil (vt MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262: 732-745 (1996)). MacCallum jt on analüüsinud antikeha ja antigeeni kompleksi kristallstruktuure ja leidnud, et kerge ahela asend 49 ja raske ahela asendid 49 ja 94 moodustavad osa antigeeniga kokku puutepiirkonnast, seega liideti need asendid siin avaldatud beeta7-vastaste humaniseeritud antikehade HVR-L2, HVR-H2 ja HVR-H3 definitsioonidesse.

[0308] Otseste siirikutega variandid loodi Kunkeli mutageneesi abil (Kunkel et al. (1987), *supra*), kasutades igale hüpervarieeruvale piirkonnale eraldi oligonukleotiidi. Kloonide õigsust hinnati DNA sekveneerimise abil.

*Hüpervarieeruvate piirkondade pehme randomiseerimine*

[0309] „Pehme randomiseerimise“ protsess (vt US patenditaotlust seerianumbriga 60/545840) tähendab valitud valgujärjestuse, nagu antikeha hüpervarieeruv piirkond, kallutatud mutageneesiprotseduuri. Meetod säilitab kallutatuse hiire, roti või mõne teise hüpervarieeruva piirkonna lähtejärjestuse poole, viies samal ajal igasse väljavalitud asendisse umbes 10-50 protsenti mutatsioone. See meetod suurendab kasutatavat skriinitavat raamatukogu ja väldib antikeha poolt äratuntava epitoobi muutumist. Selle pehme randomiseerimismeetodi järgi viiakse igasse hüpervarieeruvasse piirkonda järjestuste mitmekesisus, kasutades strateegiat, mis säilitab kallutatuse hiire hüpervarieeruva piirkonna järjestuse poole. See saavutatakse rikitud oligonukleotiidide sünteesistrateegia kasutamise, mida esmakordselt kirjeldasid Gallop jt, *J. Med. Chem.*, 37:1233-1251 (1994). Saadaval on aga ka teisi meetodeid mitte-inimese hüpervarieeruva piirkonna jääkide poole kallutatuse säilitamiseks, näiteks veakindel PCR, DNA nihutamine jne.

[0310] Siin kasutatud meetodi järgi rikutakse muteeritava hüpervarieeruva piirkonna antud asendis olev koodon, mis kodeerib metsiktüüpi aminohapet, nukleotiidide seguga (näiteks nukleotiidide 70 : 10 : 10 : 10 seguga), mis annab igas valitud hüpervarieeruva piirkonna asendis umbes 50% muteerumismäära. Selle saavutamiseks sünteesitakse koodon, mis kodeerib metsiktüüpi hüpervarieeruva piirkonna seda aminohapet, mida tahetakse muteerida, kolme ülejäänud nukleotiidi vähesel määral sisaldava seguga, nagu 70 : 10 : 10 : 10 nukleotiidiseguga. Seega sünteesitakse näiteks proliini (CCG) pehmeks randomiseerimiseks esimene asend seguga, mis sisaldab 70% C ja 10% nii G, T kui A, teine asend seguga, mis sisaldab 70% C ja 10% nii A, G kui T, ning kolmas asend seguga, mis sisaldab 70% G ja 10% nii A, C kui T. On selge, et kallutatust saab reguleerida nii üles- kui allapoole, sõltuvalt antud asendis sünteesitavast koodonist, konkreetset aminohapet sünteesivate koodonite arvust ja määrast, milleni oligonukleotiidide sünteesi on rikitud sünteesisegus oleva nukleotiidi-koostisega.

[0311] Pehmelt randomiseeritud oligonukleotiidide mustri saab kujundada hiire, roti või mõne muu hüpervarieeruva piirkonna lähtejärjestuse järgi ja see hõlmab neid samu piirkondi, mis defineeritakse otseste hüpervarieeruva piirkonna siirikute abil. Valikuliselt võivad kaks aminohapet VH-domeeni H2 ja H3 alguses olla oma mitmekesisuselt piiratud: asendis 49 võib kasutada koodonit RGC, mis kodeerib A, G, S või T, ja asendis 94 koodonit AKG, mis kodeerib M või R.

[0312] *Faagiraamatukogude loomine.* Igale hüpervarieeruvale piirkonnale disainitud randomiseeritud oligonukleotiidide kogumid fosforüüliti eraldi kuues 20 µl reaktsioonisegus, mis sisaldasid 660 ng oligonukleotiidi, 50 mM Tris-puhvrit, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 20 mM DTT ja 5 ühikut (U) polünukleotiidkinaasi, 1 tund 37 °C juures. Seejärel ühendati kuus fosforüülitud oligonukleotiidide kogumit 20 µg Kunkeli matriitsiga 50 mM Tris-puhvris, pH 7,5, mis sisaldas 10 mM MgCl<sub>2</sub>, lõppmahus 500 µl, mis andis tulemuseks oligonukleotiidide ja matriitsi suhte 3. Segu anniiluti 90 °C juures 4 minutit, 50 °C juures 5 minutit ja jahutati siis jääl. Anniilumata oligonukleotiidi liig eemaldati QIAQUICK™ PCR puhastamiskomplekti abil (Qiagen kit 28106, Qiagen, Valencia, CA), kasutades modifitseeritud juhendit, et takistada anniilunud DNA liigset denatureerumist. 500 µl anniilunud segule lisati 150 µl firma Qiagen puhvrit PB ja segu jaotati kahe silikageelikolonne vahel. Pärast mõlema kolonne pesemist 750 µl firma Qiagen puhvriga PE ja kolonnide lühidat tsentrifuugimist nende kuivatamiseks elueeriti mõlemat kolonne 110 µl 10 mM Tris-puhvriga, pH 8, mis sisaldas 1 mM EDTA. Anniilitud ja puhastatud matriits (220 µl) täideti seejärel 3 tunni jooksul toatemperatuuril 1 µl 100mM ATP, 10 µl 25mM dNTP-de (25 mM nii dATP, dCTP, dGTP kui dTTP), 15 µl 100 mM DTT, 25 µl 10-kordse TM puhvri (0,5 M Tris-puhver, pH 7,5, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>), 2400 U T4-ligaasi ja 30 U T7-polümeraasi lisamisel.

[0313] Täidetud produkti analüüsiti Tris-atsetaat-EDTA / agaroosgeelidel (Sidhu et al., *Methods in Enzymology*, 328:333-363 (2000)). Tavaliselt on näha kolme vööti: alumine vööt on õigesti täidetud ja ligeerunud produkt, keskmine vööt on täidetud, aga ligeerumata produkt ja ülemine vööt on teisaldatud ahel. Ülemine vööt tekib T7-polümeraasile omase kõrvalaktiivsuse abil ja seda on raske vältida (Lechner et al., *J. Biol. Chem.*, 258:11174-11184 (1983)), see vööt transformeerub aga 30 korda vähem efektiivselt kui alumine vööt ja tavaliselt on tema panus raamatukogusse väike. Keskmine vööt on tingitud 5'-fosfaadi puudumisest lõpp-ligeerimisreaktsioonis, see vööt transformeerub efektiivselt ja annab peamiselt metsiktüüpi järjestuse.



[0314] Täidetud produkt puhastati ja elektroporeeriti SS320 rakkudesse M13/KO7 abistaja-faagi juuresolekul, nagu on kirjeldanud Sidhu jt, *Methods in Enzymology*, 328:333-363 (2000). Raamatukogu suurus oli vahemikus  $1-2 \times 10^9$  sõltumatut klooni. Esmasest raamatukogust sekveneeriti juhuslikud kloonid raamatukogu kvaliteedi hindamiseks.

[0315] *Faagide selekteerimine*. Täispikk inimese alfa4beeta7-integriin ekspresseeriti 293-rakkudes ((Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)), puhastati Fib504 afiinsuskromatograafia abil ja kasutati faagiselektiooni sihtmärgina. Immobiliseerimiseks MaxiSorp™ mikroitiiterplaatidele (Nalge Nunc, Rochester, NY), kaeti süvendid üle öö 4 °C juures 100 µl inimese alfa4beeta7-integriiniga kontsentratsioonis 5 µg/ml lahuses, mis sisaldas 150 mM NaCl, 50 mM Tris-puhvrit, pH 7,5, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> ja 2 mM MnCl<sub>2</sub> (TBSM). Süvendeid blokeeriti tund aega, kasutades TBSM, mis sisaldas 1% BSA. Esimeseks selektsiooniringiks kasutati 8 sihtmärgiga kaetud süvendit, järgnevateks selektsiooniringideks kasutati ühte sihtmärgiga kaetud süvendit. Faagid koguti rakukultuuri supernatandist ja suspendeeriti TBSM-s, mis sisaldas 1% BSA ja 0,05% Tween™ 20 (TBSMBT). Pärast 2 tundi kestnud rakkudele seondumist eemaldati seondumata faag põhjalikul pesemisel TBS-ga, mis sisaldas 0,05% Tween 20 (TBST). Seondunud faag elueeriti süvendite inkubeerimisel 30 minuti jooksul 100 mM HCl lahusega. Faag amplifitseeriti, kasutades Top10 rakke ja M13/KO7 abistajafaagi, ning kasvatati üle öö 37 °C juures 2YT söötmes, mis sisaldas 50 µg/ml karbanatsilliini. Rikastamise hindamiseks võrreldi sihtmärgiga kaetud süvendist elueeritud faagi tiitreid sihtmärgiga katmata süvendist tagasi saadud faagi tiitritega. Pärast nelja selektsiooniringi läbiviimist valiti juhuslikud kloonid järjestuse analüüsiks.

[0316] *Fab tootmine ja afiinsuse määramine*. Fab-valgu ekspresseerimiseks afiinsuse mõõtmiseks viidi faagikuvamise vektorisse raske ahela ja g3 vahele stopp-koodon. Kloonid transfomeeriti *E. coli* 34B8 rakkudesse ja rakke kasvatati AP5 söötmes 30 °C juures (Presta, L. et al., *Cancer Res.*, 57:4593-4599 (1997)). Rakud koguti tsentrifuugimisega, suspendeeriti 10 mM Tris-puhvris, pH 8, mis sisaldas 1 mM EDTA, ja lõhuti mikroeevkihistajas. Fab puhastati G-valgu afiinsuskromatograafia abil.

[0317] Afiinsuse määramine viidi läbi pinnasplasmonresonantsi meetodil, kasutades BIAcore™-3000 instrumenti (Biacore, Piscataway, NJ). Humaniseeritud Fib504 Fab variantid immobiliseeriti 10mM atsetaatpuhvris, pH 4,5 (vahemikus 250 kuni 1500 vastusühikut (*response units*, RU)) CM5 sensorikiibil ja süstiti siis inimese alpha4beta7-integriini 2-kordset lahjendused (1,5 kuni 770 nM) TBSM-s, mis sisaldas 2% n-oktüülglükosiidi. Iga proovi

analüüsiti 5-minutise assotsiatsiooniaja ja 5- kuni 60-minutise dissotsiatsiooniaja jooksul. Pärast iga süsti kiip regenereeriti, kasutades kolme 1-minutist 8 M urea süsti. Sidumisvastus korrigeeriti RU lahutamise abil vooluraku foonist. Kineetiliseks analüüsiks kasutati  $k_{on}$  ja  $k_{off}$  samaaegse sobitamise 1 : 1 Langmuiri mudelit.

### Tulemused ja arutelu

[0318] *Roti Fib504 humaniseerimine*. Humaniseerimiseks kasutatud inimese aktseptor-raamistik põhineb Herceptin<sup>®</sup> jaoks kasutatud raamistikul ja koosneb inimese kapa I (huKI) VL-konsensusdomeenist ja inimese alarühma III (humIII) VH-konsensusdomeeni variandist. See VH-domeeni variant sisaldab inimese konsensusjärjestusega võrreldes 3 muutust: R71A, N73T ja L78A. Roti Fib504 VL- ja VH-domeenid joondati mõlemad inimese kapa I ja alarühma III domeenidega, mõlemad hüpervarieeruvad piirkonnad (HVR) identifitseeriti ja siirati inimese aktseptor-raamistikku HVR siiriku saamiseks (504 siirik), mida oli võimalik faagil Fab-ina kuvada (joonised 1AS ja 1B).

[0319] Saadavate antikeha ja antigeeni komplekside kristallstruktuuride analüüsi alusel pakusid MacCallum jt (MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996)) HVR definitsioonid, mis põhinevad nendel varieeruva domeeni jääkidel, mis sageli on kokkupuutes antigeeniga. Seega liideti raske ahela asendid 49G ja 94M Fib504 HVR siirikusse (joonis 1B). Lisaks loodi ka teine HVR siirik – Fib504K siirik, mis sisaldas kerge ahelas asendit 49K, kuna ka see asend kuulub HVR-L2 kokkupuute-definitsiooni ja võib toimida antigeeniga kokkupuutujana (joonis 1A). Kui kas Fib504 või Fib504K siirikud kuvati faagil ja testiti immobiliseeritud alfa4beeta7-ga seondumise suhtes, siis seondumist ei täheldatud.

[0320] Nii Fib504 kui Fib504K siirikuid kasutades loodi raamatukogud, kus kõik HVR piirkonnad olid samaaegselt pehmelt randomiseeritud. Kõiki HVR siirikute raamatukogusid sortiti (*were panned*) immobiliseeritud alfa4beeta 7 vastu 4 selektsiooniringis. Rikastamist ei täheldatud ja DNA sekveneerimiseks korjatud kloonid näitasid ainult juhuslikke 6 HVR piirkonda suunatud järjestuse muutusi.

[0321] Aktseptor-raamistikena uuriti veel kahte VH-raamistikujärjestust „RL“ ja „RF“, mis sisaldasid muutusi asendites 71 ja 78. Asend 71 muudeti inimese alarühma III konsensusena arginiiniks ja asend 79 muudeti inimese alarühma III konsensusena leutsiiniks (aktseptor-raamistik „RL“) või inimese alarühma II konsensusena ja roti Fib504 VH raamistikuna

fenüülalaniiniks (aktseptor-raamistik „RF“) (joonis 10A). Kui kas „RL“-s olev Fib504 või Fib504K siirik (Fib504-RL ja Fib504K-RL) või „RF“ (Fib504-RF ja Fib504K-RF) aktseptor-raamistik kuvati faagil ja testiti seondumise suhtes immobiliseeritud alfa4beeta7-ga, siis täheldati spetsiifilist faagile seondumist ainult Fib504K siiriku puhul, kasutades „FR“ raamistikku (joonis 10B). Fib504-RF kuvava faagi ainult tagasihoidlik seondumine võrreldes teiste siirikutega, milles puudus Y49K (kerge ahel) ja L78F (raske ahel), näitab nende asendite tähtsust kasulike aktseptor-raamistike valimisel.

[0322] Fib504K-RL ja Fib504K-RF siirikute kõigi 6 HVR jaoks loodi raamatukogud nii nagu eelnevalt, kasutades pehme randomiseerimise strateegiat, ja raamatukogud sorteeriti immobiliseeritud alfa4beeta7-l 4 selektsiooniringis, nagu eespool on kirjeldatud. Rikastamist täheldati ainult selle raamatukogu puhul, mis põhines Fib504K-RF siirikul. Fib504K-RF raamatukogu selektsiooniringist 4 valiti kloonid sekveneerimisanalüüsiks ja näidati HVR-L1 piirkonda suunatud aminohappe muutused. Enamik kloone sisaldas muutust Y32L, lisaks oli asend 31 sageli muutunud aminohappeks D, S, P või N (joonis 1C). Lisaks lähtesiirikule Fib504K-RF ekspresseeriti veel 3 klooni ja puhastati need Fab-valkudena ning analüüsiti Biacore abil, nagu eespool on kirjeldatud. Kloonid hu504-5, hu504-16 ja hu504-32 (SEQ ID NO: 1 variandid, mis sisaldasid asendusi T31S ja Y32L (variant hu504.5), Y32L (variant hu504.16) või T31D ja Y32L (variant hu504.32), vt joonist 1C), andsid Fib504K-RF siirikuga võrreldes suurepärase seondumise alpha4beta7-ga ja olid alfa4beeta7 suhtes sama või suurema afiinsusega kui kimäärne Fib504 Fab. Biacore analüüsi tulemused on antud alltoodud tabelis 3 ja need näitavad, et siin avaldatud HVR-de ja/või raamistikupiirkondade variandid andsid alfa4beeta7-vastased antagonist-antikehad, millel on lähteantikehaga võrreldes parendatud afiinsus. Tulemused tabelis 3 näitavad, et humaniseeritud variandi 504.32 afiinsus oli roti lähteantikehaga võrreldes kõige rohkem suurenenud ning ta seondus alfa4beeta7-ga 3 korda tugevamini.

Tabel 3

Fab (BIAcore™ analüüs)	Afiinsus alfa4beeta7 suhtes (nM)
Fib504	11
Variant 504.5	9

Fab (BIAcore™ analüüs)	Afiinsus alfa4beeta7 suhtes (nM)
Variant 504.16	23
Variant 504.32	3

[0323] Tulemused tabelis 3 näitavad ka seda, et HVR-L1 ümberdisainimine oli tähtis kõrge afiinsusega antigeeni sidumise taastamiseks. Erinevates kloonides oli kõige sagedasem mutatsioon eelkõige Y32L. Teised muutused asendis 31 ja paljud teised asendused kogu HVR-H1-s osutusid hästi talutatavateks ja võivad pakkuda täiendavat parendamist. Nendest tulemustest on selge, et on palju järjestuste muutusi, mis võivad parendada inimese raamistikule siiratud Fib504 afiinsust, et saada afiinsused, mis on sama tugevad või paremad kui algsel roti antikehal.

[0324] Seega, alustades 6 roti Fib504 HVR-i siirdamisest inimese aktseptor-raamistikku, laiendati HVR-L2, sisaldamaks asendit 49 (lüsiin), HVR-H2, sisaldamaks asendit 49 (glüt-siin) ja HVR-94 laiendamist, sisaldamaks asendit 94 (metioniin), samuti aminohappe muu-tusi: VHR-L1 muutusi asendis 32 (kus L või I asendavad Y) ja valikuliselt VHR-L1 asendis 31 (kus T on asendatud näiteks D või S-ga). Kasulikud raamistiku-aminohappe vahetused tehti VH-domeeni asendites 71 (A71R) ja 78 (L78F). Sellised aminohappe vahetused viivad inimese täieliku antikeha, näiteks variandi hu504.32, seondumisafiinsuse 3-kordsele parene-misele alfa4beeta7-integriini suhtes. Lisaks on määratud, et siin kirjeldatud valitud humani-seeritud antikehadel on roti lähteantikehaga Fib504 vähemalt võrreldav bioloogiline aktiivsus (vt siin näidet 3).

## Näide 2. Täiendavad humaniseeritud Fib504 HVR variandid

[0325] Humaniseeritud Fib504.32 HVR aminohapete järjestusi varieeriti veel, et luua täien-davad variandid, mis on suutelised antagoniseerima integriini beeta7-subühikut ja/või beeta7-subühikut sisaldavaid integriine.

[0326] *Aminohapete laia skaneerimise raamatukogu loomine.* Valitud HVR asendite skanee-rimiseks teiste aminohappejääkide suhtes, mis on võimelised tekitama hu504.32 variandi beeta7 siduvaid variante, loodi raamatukogu, kasutades kolme nukleotiidi: 504-L1, mis disainiti HVR-L1 osa pehmeks randomiseerimiseks kallutatusega hu504.32 HVR-L1 järjestu-se poole (s.t järjestust ASESVDDLLH (SEQ ID NO: 47, suhtelised asendid A2-A11) ran-

domiseeriti pehmelt, nagu eespool on kirjeldatud), ning HVR-L3 504-N96 ja HVR-H3 504-M94, mis viivad NNS kerge ahela HVR-L3 asendisse 96 ja raske ahela HVR-H3 asendisse 94, võimaldades seega nendes asendites kõigi 20 aminohappe esinemist. Nende kolme oligonukleotiidiga loodi aminohapete laia skaneerimise raamatukogu, nagu eespool on kirjeldatud, kasutades matriitsi, mis sisaldas kerges ahelas kolme stopp-koodonit (asendid 31 ja 32 HVR-L1-s ja asend 96 HVR-L3-s) ja 1 stopp-koodonit raskes ahelas (asend 94 HVR-H3-s).

*hu504-32 aminohapete lai skaneerimine.* Et täielikumalt ära kasutada HVR-L1-s lubatud eelistatud järjestusi ja tugevdada 504-32 stabiilsust, disainisime me faagi raamatukogu, mis a) randomiseeris pehmelt 504-32 HVR-L1 piirkonnas, milles oli humaniseerimise käigus täheldatud muutusi (s.t ASESVDDLLH (SEQ ID NO: 47, suhtelised asendid A2-A11) (joonis 1C), ja b) võimaldas HVR-L3 asendis N96 ja HVR-H3 asendis M94 kõigi aminohapete esinemist. 4 selektsiooniringi järel, mis tehti immobiliseeritud täispika inimese alfa4beeta7-integriini vastu, nagu eespool on kirjeldatud, valiti 96 juhuslikku kloni järjestuste analüüsiks. Aminohapete laia skaneerimise raamatukogu igas asendis leiduvate aminohapete sagedus näitab, et hu504-32-s esinev HVR-L1 järjestus ja metioniini esinemine raske ahela asendis 94 on kõrge afiinsusega sidumise jaoks optimaalsed (joonis 12). Kõige eelistatumad aminohapped, mis saadi selektsioonidel, alustades variantidest 504.32 (joonis 12), on näidatud kollasega. Sellele vastupidiselt – ehkki hu504-32 kerge ahela asendis 96 esineb asparagiin, näitab laia aminohapete skaneerimisel selles asendis täheldatud leutsiini sage esinemine, et mutatsioon N96L võiks humaniseeritud Fib504 variantide afiinsust alfa4beeta7 suhtes täiendavalt parendada ning kõrvaldada ka selles asendis esinevad võimalikud desamineerimisprobleemid. Joonisel 12 esitatud informatsioon viitab ka sellele, et enamikus asendites on tõenäoliselt mitmed aminohappe asendused talutavad afiinsuse olulise vähenemiseta. Näiteks HVR-H3-s M94 oksüdeerumise kõrvaldamiseks võiks sinna tõenäoliselt asendada glutamiini või arginiini.

[0327] *Aminohapete piiratud skaneerimise raamatukogud.* Kuues aminohapete piiratud skaneerimiseks mõeldud raamatukogus kasutati kuut erinevat Kunkeli matriitsi, millest igaüks sisaldas stopp-koodonit, mis paiknes ühes kuuest HVR-st. Iga raamatukogu loodi, kasutades ühte oligonukleotiidi, mis kodeeris ühte HVR-i, ja kasutades joonisel 11A loetletud koodoneid („koodonite“ tulp), et muuta aminohappejääke edasiseks testimiseks beeta7 või alfa4beeta7-ga seondumise suhtes. Sama protseduuri kasutatakse ka beeta7-vastaste antike-

hade aminohappejääkide muutmiseks ja nende testimiseks alfaEbeeta7-ga integriinidega seondumise suhtes.

[0328] *hu504-32 aminohapete piiratud skaneerimine*. Hu504-32 aminohapete piiratud skaneerimine disainiti selleks, et muuta hu504-16 veelgi sarnasemaks inimese kerge ja raske ahela konsensusjärjestustega ja selle protsessi käigus identifitseerida roti Fib504 minimaalsed järjestuselemendid, mis on seondumiseks vajalikud. Loodi kuus raamatukogu ja suunati kõikidele HVR asenditele, mis erinesid hu504-16 ja inimese kapa I kerge ahela või alarühma III raske ahela konsensusjärjestustest (joonised 1A ja 1B), raamatukogus olid nendes asendites lubatud kas roti või inimese aminohapped (joonis 11A). Mõlema aminohappe kodeerimise võimaldamiseks oligonukleotiidide sünteesi ja mutageneesi käigus viidi mõnel juhul sisse ka täiendavaid aminohappeid (vt kodeeritavaid aminohappeid joonisel 11A). Aminohapete piiratud skaneerimise raamatukogud selekteeriti immobiliseeritud täispika inimese alfa4beeta7-integriini vastu, nagu eespool on kirjeldatud, ja igast raamatukogust sekveneeriti pärast 3. selektsiooniringi 32 juhuslikku kloon. Igas asendis leitud iga aminohappe sagedus on näidatud joonistel 11B ja 1C.

[0329] Nii nagu aminohapete laia skaneermise puhul, annab ka aminohapete piiratud skaneerimine informatsiooni selle kohta, milliseid muutusi paljudes humaniseeritud Fib504 asendites talutakse. Erinevalt aminohapete laiast skaneerimisest oli aga aminohapete piiratud skaneerimisel iga randomiseeritud asendi mitmekesisus piiratud paari aminohappega. Seega ei näita täheldatava asenduse puudumine antud asendis, et konkreetset jääki ei saa muuta, samuti ei näita konkreetse aminohappe suur esinemissagedus antud asendis tingimata, et see on kõrge afiinsuse jaoks parim lahendus.

[0330] Mõnedes asendites (kerge ahela asendid 27, 29, 30, 53 ja 54 ning raske ahela asendid 50, 54, 58, 60, 61 ja 65) valitakse inimese konsensusaminohappeid küllalt sageli, mis viitab sellele, et inimese konsensusseks tagasimuteerumine ei mõjuta drastiliselt seondumist inimese alfa4beeta7-ga. Tegelikult valitakse kerge ahela (HVR-L2-s) asendis 54 inimese konsensusaminohapet sagedamini kui roti Fib504 aminohapet, mis näitab, et see muutus 504-32 anti-kehas annab kasuliku beeta7 siduva antikeha.

[0331] Lisaks valitakse raamatukogu disaini tulemusena neid aminohappeid, mis ei pärine ei inimese konsensussest ega roti Fib504-st, mõnedes asendites sagedamini ja need annavad potentsiaalsed asendused humaniseeritud Fib504 variantide afiinsuse parendamiseks. Nende hulka kuuluvad piiranguteta D30A ja I55V kerges ahelas ning Y50F raskes ahelas. Need

kahe raamatukogu tulemused näitavad, et paljud HVR asendid kannatavad asendamist teiste aminohapetega ja säilitavad siiski võrreldava bioloogilise aktiivsuse.

[0332] Täheldatud aminohappe muutuste kokkuvõtted on näidatud joonistel 13 ja 15. Joonisel 15 on kokku võetud erinevad aminohapped, mis on kasulikud kõigis leiutisekohaste antikehavariantide CDR-de asendites, kusjuures asendid on nummerdatud Kabat'i nummerdamissüsteemi või suhtelise nummerdamissüsteemi järgi. Kõik täiendavad antikehad, mida joonistel 13 ja 15 kujutatud variandid hõlmavad, on leiutise teostuseks.

### Näide 3. Rakuadhesiooni testid

[0333] Mõnede leiutisekohaste humaniseeritud Fib504 variantide võimet seonduda raku pinnal ekspresseeritud ligandidega testiti rakuadhesiooni testide abil. Seondumist alfa4beeta7-ga ja teise beeta7-integrini, alfaEbeeta7-ga, testiti humaniseeritud variantide võime järgi katkestada integrini seondumine tema loodusliku retseptoriga. Humaniseeritud Fib504 variantide seondumist ainult raku pinnal ekspresseeruva beeta7-subühikuga testiti samal viisil. Protseduurid ja tulemused on kirjeldatud allpool.

*IgG tootmine.* Humaniseeritud Fib504 IgG variandid ekspresseeriti transientselt 293-rakkudes (Graham et al., (1977) *supra*), kasutades kergele ja raskele ahelale eraldi vektoreid. Vektorid konstrueeriti kerge ja raske ahela varieeruvate domeenide subkloonimisel kerge ja raske ahela sobivatesse ekspressioonivektoritesse. 1,1 liitrit humaniseeritud Fib504 varianti sisaldavate CHO-rakkude supernatanti filtriti läbi 0,45 µm filtri ja kanti uuele 1 ml HiTrap A-valgu HP kolonnile (Amersham/Pharmacia), mis oli tasakaalustatud puhvriga A (10 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl). Proovid kanti peale üle öö voolukiirusel 0,8 ml/min ja temperatuuril 4 °C. Iga kolonni pesti seejärel ja tasakaalustati 30 ml puhvriga A. Antikeha elueeriti kromatograafiliselt toatemperatuuril FPLC meetodil (Amersham/Pharmacia), kasutades 0 kuni 100% puhvri B (100 mM glütsiin, pH 3,0) 14-minutist lineaarset gradienti voolukiirusel 1 ml/min. Saadud 1 ml fraktsioonid neutraliseeriti kohe 75 µl 1 M Tris'i, pH 8, lisamisega. Elueeritud valk määrati neeldumise järgi 280 nm juures ning piike sisaldavad fraktsioonid ühendati ja vabastati soolast, viies nad PBS lahusesse PD10 G-25 Sephadex'i ühekordsetes geelfiltratsioonikolonnides (Amersham/Pharmacia). Valgusisaldus mõõdeti optilise tiheduse (OD) järgi 280 nm juures ja piike sisaldavad fraktsioonid ühendati. Antikeha lahustati PBS-s filtriti läbi 0,22 µm filtri ja säilitati 4 °C juures. Nende puhastatud antikehade

kontsentratsiooni kvantitatiivseks mõõtmiseks kasutati aminohappe analüüsi ja kontsentratsioonide väärtused määrati kahe eraldi mõõtmise keskmisena.

#### BCECF-märgistamine

[0334] Kõigis selles näites 3 esitatud testides märgistati rakud järgmise protseduuri järgi. Kõik adhesioonitestides kasutatud rakud märgistati 10  $\mu\text{M}$  2',7'-bis(2-karboksüületüül)-5-(ja-6)-karboksüfluorestseiinatsetoksümetüülestriga (BCECF) RPMI1640 söötmes, mis sisaldas 10% FBS, RPMI8866 rakkude ja 38C13 rakkude puhul, mida oli transfekteeritud beeta7-subühikuga (38C13 beeta7-rakud) ja F-12:DMEM segus (50 : 50), mis sisaldas 10% FBS, alfaEbeeta7-ga transfekteeritud 293-rakkude puhul (alfaEbeeta7 293-rakud). Rakke märgistati 30 minutit ja pesti siis kaks korda testisöötmega. Rakkude tihedus reguleeriti väärtusele  $3 \times 10^6$  rakku/ml RPMI8866 ja 38C13 beeta7-rakkude puhul ja  $2,2 \times 10^6$  rakku/ml alfaEbeeta7 293-rakkude puhul.

#### Humaniseeritud Fib504 variandid katkestavad alfa4beeta7 seondumise MAdCAM-ga

[0335] RPMI8866/MAdCAM-1-Ig rakkude adhesioon. RPMI8866 rakud ekspresseerivad oma pinnal alfa4beeta7 (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY). Humaniseeritud Fib504 variandid (hu504 variandid) viidi kokkupuutesse RPMI8866 rakkude ja MAdCAM-ga, mis oli liidetud IgG-ga kaetud tahkele kandjale. Humaniseeritud Fib504 variandi kontsentratsioonid, mis andsid RPMI8866 rakkude MAdCAM-ga seondumise 50% inhibeerimise ( $\text{IC}_{50}$ ), mõõdeti, kattes Nunc Maxisorp™ 96 süvendiga plaadid 2  $\mu\text{g/ml}$  MAdCAM-1-Ig lahusega PBS-s, 100  $\mu\text{l}$  süvendi kohta (Genentech, Inc., kus Ig tähendab MAdCAM-1 liitmist Fc-piirkonnaga), üle öö 4 °C juures. Pärast plaatide blokeerimist 5 mg/ml BSA lahusega, 200  $\mu\text{l}$  süvendi kohta, ühe tunni jooksul toatemperatuuril, lisati igasse süvendisse 50  $\mu\text{l}$  humaniseeritud Fib504 varianti testisöötmes (RPMI 1640 sööde, Hyclone®, Logan Utah, USA, millele oli lisatud 5 mg/ml BSA) ja 150000 BCECF-ga märgistatud rakke (BCECF, Molecular Probes, Eugene, OR) 50  $\mu\text{l}$  testipuhvril ning inkubeeriti 15 minutit 37 °C juures. Rakke pesti seondumata rakkude eemaldamiseks kaks korda 150  $\mu\text{l}$  testipuhvriga. Seondunud rakud solubiliseeriti 100  $\mu\text{l}$  0,1% SDS-lahusega 50 mM Tris/HCl-puhvril, pH7,5. Lüüsitud rakkudest vabanenud fluorestsents mõõdeti SPECTRAMax GEMINT™ (Molecular Devices,



Sunnyvale, CA) instrumendil 485 nm ergastuse 530 nm emissiooni lainepikkustel. Fluorestsentsi väärtusi analüüsiti igasse testisegusse lisatud humaniseeritud Fib504 variantide kontsentratsiooni funktsioonina, kasutades neljaparameetrilist mittelineaarse vähimruutude sobitamise meetodit, et saada igale testitud humaniseeritud Fib504 variandile IC<sub>50</sub>-väärtus. Joonisel 14 on esitatud tulemuste näidisgraafik. IC<sub>50</sub>- ja IC<sub>90</sub>-väärtused hinnati neljaparameetrise sobitamise kõvera alusel. Kõigi testitud variantide IC<sub>90</sub>- ja IC<sub>50</sub>-väärtused on näidatud alltoodud tabelis 4.

Tabel 4. Antikeha seondumine inimese MAdCAM-1-ga

Testitud antikeha: Fib504 ja hu504 variandid	IC <sub>50</sub> (nM) Exp 1 / Exp 2*	IC <sub>90</sub> (nM) Exp 1 / Exp 2*
Roti Fib504	0,098/0,197	0,483/0,703
Variant hu504.5	0,067/0,248	0,361/0,880
Variant hu504.16	0,0768/0,206	0,244/0,551
Variant hu504.32	0,036/0,119	0,150/0,396
6B11 (mitteblokeeriv kontroll)	>100	>100
*Exp 1 / Exp 2 tähendab kordustestide tulemusi		

#### Humaniseeritud Fib504 variant katkestab alfa4beeta7 seondumise VCAM-ga

[0336] RPM18866/7dVCAM-1 rakkude adhesioon. RPMI8866/7dVCAM-testi formaat on samasugune kui RPMI8866/MAdCAM-1-Ig formaat, aga siin kasutati plaatide katmiseks 2 µg/ml 7VCAM-1 (ADP5, R&D Systems, Minneapolis, MN). Tulemusi analüüsiti nii, nagu eespool MAdCAM seondumise katsete puhul on kirjeldatud. Kõigi testitud variantide IC<sub>50</sub>-väärtused on näidatud alltoodud tabelis 5.

Tabel 5. Antikeha seondumine inimese VCAM-ga

Testitud antikeha: Fib504 ja hu504 variandid	IC <sub>50</sub> (nM) Exp 1 / Exp 2*	IC <sub>90</sub> (nM) Exp 1 / Exp 2*
Roti Fib504	0,107/0,193	0,396/0,580
Variant hu504.5	0,088/0,270	0,396/0,726
Variant hu504.16	0,098/0,223	0,261/0,774
Variant hu504.32	0,059/0,110	0,183/0,337
6B11 (mitteblokeeriv kontroll )	>100	>100
*Exp 1 / Exp 2 tähendab kordustestide tulemusi		

Humaniseeritud Fib504 variant katkestab alfaEbeeta 7 seondumise inimese E-kadheriiniga

[0337] AlphaEbeta7 293/huE-kadheriin rakkude adhesioon. 293-rakud (Graham et al., (1977) *supra*) transfekteeriti alfaE ja beeta7-ga (Genentech, Inc.). Testi formaat on sarnane RPMI8866/MAdCAM-1-Ig testi omaga, aga plaatide katmiseks kasutati 2 µg/ml huE-kadheriini (648-EC, R&D Systems, Minneapolis, MN). Seejärel blokeeriti plaate 5 mg/ml BSA lahusega, nagu eespool on märgitud, ning igasse süvendisse lisati 50 µl FIB504 varianti testisöötmes (F-12:DMEM (50 : 50), millele oli lisatud 5 mg/ml BSA) ja 110000 BCECF-ga märgistatud rakke 50 µl testisöötmes ning inkubeeriti 15 minutit 37 °C juures. Rakke pesti kaks korda 150 µl testisöötmega ja lüüsitud rakkudest vabanenud fluorestsents mõõdeti ja analüüsiti nii, nagu eespool on kirjeldatud. Kolme katse tulemused on näidatud tabelis 6.

Tabel 6. Antikeha seondumine inimese E-kadheriiniga

Testitud antikeha: Fib504 ja hu504 Variandid	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>90</sub> (nM)
Roti Fib504	2,047/7,89/4,19	8,80/24,5/9,95
Variant hu504.5	2,132/10,18/4,77	7,99/28,7/10,19

Testitud antikeha: Fib504 ja hu504 Variandid	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>90</sub> (nM)
Variant hu504.16	1,957/10,05/4,58	7,03/33,7/13,51
Variant hu504.32	1,814/6,99/3,47	8,8/24,5/11,73
HP2/1 (alfa4-vastane, kontroll)	>100/>100/>100	>100/>100/>100

#### Humaniseeritud Fib504 variant katkestab beeta7 seondumise MAdCAM-ga

[0338] 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig rakkude adhesiooni test. 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig testi formaat oli sarnane RPMI8866/MAdCAM-1-Ig formaadiga, aga plaatide katmiseks kasutati 2 µg/ml muMAdCAM-1-Ig (Genentech, Inc.). 38C13 alfa4+ hiire lümfoomirakud (Crowe, D. T. et al., J. Biol. Chem., 269:14411-14418 (1994)) transfekteeriti beeta7-integriini kodeeriva DNA-ga, nii et alfa4beeta7 ekspresseerus raku pinnal. Antikehavariantide võimet katkestada rakumembraaniga seotud alfa4beeta7 ja MAdCAM vaheline interaktsioon hinnati nii, nagu eespool on kirjeldatud. Testi tulemused on näidatud tabelis 7. (On näidatud kahe katse IC<sub>50</sub>- ja IC<sub>90</sub>-väärtused).

Tabel 7. Hu504 antikehavariantide toime 38C13-beta7 ekspresseerivate rakkude seondumisele hiire MAdCAM-ga

Testitud antikeha: Fib504 ja hu504 variandid	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>90</sub> (nM)
Roti Fib504	0,682/0,306	2,869/1,51
Variant hu504.5	0,8587/0,466	2,322/2,61
Variant hu504.16	0,998/0,610	3,717/4,08
Variant hu504.32	0,718/0,458	4,08/1,51

#### Humaniseeritud Fib504 variant katkestab beeta7 seondumise hiire VCAM-ga

[0339] 38C13beta7/muMAdCAM-1-Ig rakkude adhesiooni test. 38C13beta7/muVCAM-1-Ig test viidi läbi eespool toodud hiire MAdCAM-1-Ig RPMI8866 rakkude sidumistesti järgi, aga

plaatide katmiseks kasutati 2 µg/ml muVCAM-1-Ig (Genentech, Inc.). Testi tulemused on näidatud tabelis 8. (On näidatud kahe katse IC<sub>50</sub>- ja IC<sub>90</sub>-väärtused).

Tabel 7. hu504 antikehavariantide toime 38C13-beta7 ekspresseerivate rakkude seondumisele hiire VCAM-1-Ig-ga

Testitud antikeha: Fib504 ja hu504 variandid	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>90</sub> (nM)
Roti Fib504	0,845/0,447	2,903/2,30
Variant hu504.5	0,763/0,407	3,074/2,30
Variant hu504.16	0,835/0,584	2,857/1,84
Variant hu504.32	0,562/0,330	2,004/1,84

[0340] Humaniseeritud Fib504 variantide sidumiskatsed näitavad, et leiutisekohane humaniseeritud antikeha seondub oma sihtmärgi beeta7-integriini subühiku, samuti alfa4beeta7- ja alfaEbeeta7-integriinidega sama afiinsusega kui roti lähteantikeha, mõnedes teostustes ka suurema afiinsusega. Seega on leiutisekohane humaniseeritud beeta7-vasatne antikeha kasutatav beeta7-vastastes ravimenetlustes, eelkõige inimese ravimenetlustes.

#### Leiutisekohaste hu504.32 variantide suhteline aktiivsus

[0341] hu504.32 antikeha erinevaid aminohappevariante testiti inimese ja hiire rakkude adhesioonitestides nende võime suhtes inhibeerida beeta-7 sisaldava retseptori seondumist oma ligandiga siin avaldatud rakuadhesioonimeetodi kohaselt. RPMI8866/MAdCAM-1-Fc test viidi läbi nii, nagu siin eespool on kirjeldatud. AlfaEbeeta7-293/hu E-kadheriini testi modifitseeriti inimese E-kadheriini-Fc kui ligandi kasutamise abil (human E-cadherin-Fc, 648-EC, R&D Systems, Minneapolis, MN). Samuti uuriti Hhu504.32 variantide suhtelist võimet inhibeerida inimese fibronektiini (huFN40) interaktsiooni RPMI8866 rakkudel inimese alfa4beeta7 retseptoriga. Nendes uuringutes kasutatud RPMI8866/inimese fibronektiini (huFN40) testi formaat oli samasugune kui siin avaldatud RPMI8866/MAdCAM-1-Ig testil, aga plaatide katmiseks kasutati 2 µg/ml inimese fibronektiini alfa-kümüotrüpsiiniga lõigatud 40 kDa fragmenti (F1903, Chemicon International, Temecula, CA).

[0342] Uuriti hu504.32 variantide võimet inhibeerida hiire beeta7 sisasldavate retseptorite interaktsiooni hiire MAdCAM-1 või hiire VCAM-1-ga. Hiire MAdCAM-1-Fc ja hiire VCAM-1-Fc interaktsioon hiire beeta7 ekspresseerivate hiire lümfoomi alfa4+ rakkudega (38C13beeta7 rakud) inhibeeriti hu504.32 variantide abil. Hiire MAdCAM-1-Fc ja hiire VCAM-1-Fc rakuadhesiooni testid viidi läbi samamoodi, kui siin eespool on kirjeldatud inimese MAdCAM ja VCAM puhul. Kui ligandid liideti Fc-piirkondadega, blokeeriti rakkudel Fc-retseptorid 0,5 µg CD16/32-vastase antkehaga (Fc-gamma III/II retseptori vastane antikeha, katalooginr. 553142, BD Biosciences, San Jose, CA) 1 miljoni raku kohta 5 minutit toatemperatuuril. Igasse süvendisse lisati 150 000 märgistatud rakku 50 µl testipuhvris ja inkubeeriti 13 minutit 37 °C juures. Süvendid pesti ja lüüsitud rakkudest vabanenud fluorestsents mõõdeti nii, nagu siin eespool on avaldatud. Kontrollantikehaks inimese rakkude adhesiooni-testides oli hiire monokloonne inimese seerumi albumiini vastane antikeha 6B11 (katalooginr. ab10244, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA). Kontrollantikehaks hiire rakkude adhesioonitestides oli hiire beeta7-integriini vastane roti antikeha M293 (BD Biosciences, San Jose, CA), mis ei konkureeri ligandi või Fib504-ga beeta7-integriiniga seondumise pärast.

[0343] Inimese ja hiire rakuadhesiooni kolmes korduses läbiviidud testide tulemused on esitatud vastavalt tabelites 9 ja 10.

Tabel 9. Hu504.32 antikehavariantide aktiivsus inimese rakuadhesiooni testides

Antikeha variant	IC <sub>50</sub> keskm. ± SD			
	RPMI8866 / huMAdCAM-1-Fc	RPMI8866 / hu7dVCAM-1	αEβ7-293 / huE-kadheriin-Fc	RPMI8866 / huFN40
hu504.32	0,088 ± 0,035	0,101 ± 0,021	3,970 ± 1,664	0,100 ± 0,046
hu504.32M94Q	0,090 ± 0,045	0,111 ± 0,035	4,130 ± 1,212	0,124 ± 0,056
hu504.32M94R	0,075 ± 0,034	0,089 ± 0,009	3,963 ± 1,776	0,119 ± 0,056
Kontroll (6B11)	>100	>100	>100	>100

Tabel 10. Hu504.32 antikehavariantide aktiivsus hiire rakuadhesiooni testides

Antikeha variant	IC <sub>50</sub> keskm. ± SD	
	38C13beta7 / muMAdCAM-1-Fc	38C13beta7 / mu7dVCAM-1-Fc
hu504.32	0,270 ± 0,041	0,228 ± 0,065
hu504.32M94Q	0,370 ± 0,102	0,264 ± 0,083
hu504.32M94R	0,391 ± 0,112	0,228 ± 0,081
kontroll (M293)	>100	>100

[0344] Hu504.32 antikeha sisaldab raske ahela CDR3 asendis 94 metioniini. Variandid M94Q (või hu504.32Q) ja M94R (või hu504.32R) sisaldavad hu504.32 variandi asendis 94 vastavalt glutamiini või arginiini. Hu504.32M, Q ja R antikehad vähendasid oluliselt beeta7-integriini retseptori ja ligandi interaktsiooni kõigis testides ja on seega beeta7-vahendatud rakuadhesiooni tugevad inhibiitorid.

Antikeha hu504.32R aktiivsus *in vivo*.

[0345] Hu504.32 antikehavarianti testiti *in vivo* tema võime suhtes vähendada beeta7-integriini retseptori ja ligandi vahelist interaktsiooni ja vähendada lümfotsüütide värbamist põletikulisel käärsoolde põletikulise soolehaiguse *in vivo* hiiremudelil. BALB/c hiired ja CB17 SCID hiired saadi firmast Charles River Laboratories International, Inc. (Wilmington, MA, USA). CD4<sup>+</sup>CD45Rb kõrge sisaldusega T-rakud, mis olid taastatud SCID koliiti põdevatelt hiirtelt, valmistati CD4<sup>+</sup>CD45Rb kõrge sisaldusega T-rakkude eraldamisel BALB/c doonorhiirtelt, kandes veenisiseselt üle 3 x 10<sup>5</sup> rakku 100 µl PBS-s. SCID kontrollhiired ei saanud CD4<sup>+</sup>CD45Rb kõrge sisaldusega T-rakke. CD4<sup>+</sup> taastatud hiired, kes vastasid uurin-gusse kaasamise kriteeriumidele - 4. nädalal 10% kaalukaotus baasjoonega võrreldes või 15% kaalukaotus suurima kaaluga võrreldes – loeti esilekutsutud põletikulist soolehaigust kandvateks ja valiti ravimiseks.

[0346] Testitavate antikehadega ravimise päeval koguti BALB/c doonorhiirte mesenteerilise lümfisõlme (*mesenteric lymph node*, MLN) rakud ja märgistati Cr<sup>51</sup>-ga. Ravi hõlmas eelnevat GP120-vastase antikeha, hu504.32 beeta7-vastase antikeha, hu503.32R beeta7-vastase anti-

keha manustamist või antikeha mittemanustamist (kontroll) intravenoosselt koguses 200 µg / 100 µl PBS. Kolmkümmend minutit pärast antikeha manustamist süstiti Cr<sup>51</sup>-märgistatud MLN-rakud koguses 4 x 10<sup>6</sup> rakku / 100 µl. Tund aega pärast märgistatud rakkude süstimist hiired eutaniseeriti, põrn, käärsool ja Peyeri naastud koguti, kaaluti ja määrati kogu Cr<sup>51</sup> radioaktiivsus elundi kohta. Joonisel 16 on nende tulemuste tulpdiaagramm, mis näitab antikehade suhtelist võimet blokeerida radioaktiivselt märgistatud T-rakkude ssuundumist põletikulist soolehaigust põdeva hiire käärsoolde. T-rakkude suundumist põletikulisse käärsoolde inhibeerisid hu504.32 ja hu504.32R antikehad, võrreldes negatiivse kontrolli – GP120-vastase antikehaga. Põrnas oli kõigi antikehade jaotumine ühesugune. Seega inhibeerivad hu504.32 ja hu504.32R beeta7-vastased antikehad efektiivselt T-rakkude *in vivo* suundumist põletikulisse käärsoolde.

[0347] Antikeha glükeerimine ei kahjusta hu504.32R võimet blokeerida MAdCAM-1 seondumist alfa4beeta7 retseptoriga.

[0348] Glükeerimine (*glycation*) – valkude mitte-ensümaatilise glükosüülimine – võib kahjustada antikeha ja ligandi vahelist interaktsiooni (vt näiteks Kennedy, D. M. et al., Clin. Exp. Immunol., 98(2):245-51 (1994)). Lüsiini glükeerimine hu504.32R asendis 49. Hu504.32R variandi kerge ahela asendis 49 (HVR-L2 suhteline asend B1) täheldati lüsiini glükeerimist, aga see ei kahjustanud oluliselt antikehavariandi võimet blokeerida MAdCAM-1 seondumist alfa4-beeta7 retseptorit ekspresseerivatele RPMI8866 rakkudele. Glükeerimise ja glükeerimistasemete määramine viidi läbi, kasutades standardset elektropihustamisioniseerimisega massispektromeetria (*electrospray ionization-mass spectroscopy*, ESI-MS) ja boronaatafiinsuskromatograafiat. Glükeerimise testimiseks kasulikke boronaatafiinsus-HPLC meetodeid võib leida näiteks artiklitest Quan C. P. et al., Analytical Chemistry, 71(20):4445-4454 (1999) ja Li Y. C. et al., J. Chromatography A, 909:137-145 (2001). Rakuadhesioonitesti viidi läbi siin avaldatud RPMI8866/MAdCAM-1-Fc rakkude adhesioonitesti järgi.

[0349] Leiutise alternatiivses teostuses vähendatakse või kõrvaldatakse glükeerimine asendis 49 juhul, kui asendis 49 esineb lüsiinist erinev aminohape. Leiutisekohane polüpeptiid või antikeha sisaldab asendis 49 (HVR-L2 suhteline asend B1) ükskõik missugust aminohapetest A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W või Y, kus iga täht tähendab aminohapet vastavalt aminohapete standardsele ühetähelisele tähistusviisile. Alternatiivselt valitakse hu504.32R variandi (või teise antikeha hu504 variandi) kerge ahela asendis 49 olev aminohape

rühmast, millesse kuuluvad R, N, V, A, F, Q, H, P, I ja L. Asendis 49 olev kasulik aminohape valitakse näiteks hu504.32R Fab (variandi) faagil kuvamisel (valmistades faagiraamatukogu), asendades asendis 49 koodoni eraldi koodonitega kõigi 20 looduslikult esineva aminohappe jaoks. Asendis 49 muudetud hu504.32R variante ekspresseerivaid faage testitakse nende seondumise suhtes beeta7-integriini ja/või retseptoriga, mis sisaldab beeta7-integriini, näiteks alfa4beeta7- või alfaEbeeta7-retseptoriga. Neid variante, mis seonduvad beeta7-integriini või alfa4beeta7- või alfaEbeeta7-retseptoriga, skriinitakse täiendavalt võime suhtes inhibeerida beeta7-integriini retseptori ja ligandi seondumist ja selle *in vivo* tõhusust, nagu siin on kirjeldatud. Alternatiivselt võib looduslikult esinevaid või looduses mitteesinevaid aminohapped asendada asendis 49 standardsete mutageneesimeetodite abil ja testida siis siin kirjeldatud rakuadhesiooni ja *in vivo* testides. Alternatiivselt on kerge ahela asendis 49 aminohape lüsiinist (K) erinev ja kõiki teisi HVR või raamistiku asendeid või kerge ahela ja/või raske ahela asendeid muudetakse, et välja valida beeta7-vastane siduv polüpeptiid või antikeha, mille afiinsus, *in vitro* ja *in vivo* bioloogiline aktiivsus, farmakokineetika, ravimi kõrvaldumine ja immunogeensus on kasulik põletiku vähendamiseks beeta7-integriini bioloogilise aktiivsuse vähendamise abil. Sellise polüpeptiidi või antikehavariandi metagenees ja selektioon viiakse läbi nii, nagu siin on avaldatud, ja teiste standardmeetodite järgi. Selline beeta7-vastane siduv polüpeptiid või antikeha seondub beeta7-integriiniga afiinsusega, mis on 10000 korda, 1000 korda, alternatiivselt 100 korda, alternatiivselt 10 korda, alternatiivselt 5 korda, alternatiivselt 2 korda suurem kui ükskõik missuguse siin avaldatud humaniseeritud Fib504 variandi afiinsus.



**PATENDINÕUDLUS**

1. Eraldatud nukleiinhape, mis kodeerib humaniseeritud beeta7-vastast antikeha, mis sisaldab:

HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavalt RASESVDDLLH (SEQ ID NO: 9), KYASQSIG (SEQ ID NO: 2), QQG-NSLPNT (SEQ ID NO: 3), GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5) ja ARTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 64).

2. Eraldatud nukleiinhape, mis kodeerib humaniseeritud beeta7-vastast antikeha, mis sisaldab:

HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavalt RASESVDDLLH (SEQ ID NO: 9), KYASQSIG (SEQ ID NO: 2), QQG-NSLPNT (SEQ ID NO: 3), GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5) ja MTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 6).

3. Eraldatud nukleiinhape, mis kodeerib humaniseeritud beeta7-vastast antikeha, mis sisaldab:

HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavalt RASESVDDLLH (SEQ ID NO: 9), KYASQSIG (SEQ ID NO: 2), QQG-NSLPNT (SEQ ID NO: 3), GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5) ja AMTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 63).

4. Eraldatud nukleiinhape, mis kodeerib humaniseeritud beeta7-vastast antikeha, mis sisaldab:

HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavalt RASESVDDLLH (SEQ ID NO: 9), KYASQSIG (SEQ ID NO: 2), QQG-NSLPNT (SEQ ID NO: 3), GFFITNNYWG (SEQ ID NO: 4), GYISYSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 5) ja RTGSSGYFDF (SEQ ID NO: 66).

5. Eraldatud nukleiinhape, mis kodeerib humaniseeritud beeta7-vastast antikeha, mis sisaldab:

HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavalt RASESVDSLH (SEQ ID NO: 7), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 64.

6. Eraldatud nukleiinhape, mis kodeerib humaniseeritud beeta7-vastast antikeha, mis sisaldab:

HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavalt RASESVDSLH (SEQ ID NO: 7), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6.

7. Eraldatud nukleiinhape, mis kodeerib humaniseeritud beeta7-vastast antikeha, mis sisaldab:

HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavalt RASEVDLH (SEQ ID NO: 8), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 64.

8. Eraldatud nukleiinhape, mis kodeerib humaniseeritud beeta7-vastast antikeha, mis sisaldab:

HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 ja HVR-H3, kus igaüks neist sisaldab vastavalt RASEVDLH (SEQ ID NO: 8), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 ja SEQ ID NO: 6.

9. Vektor, mis sisaldab ükskõik missugusele nõudluspunktide 1 kuni 8 vastavat nukleiinhapet.

10. Peremeesrakk, mis sisaldab nõudluspunktile 9 vastavat vektorit.

11. Peremeesrakk vastavalt nõudluspunktile 10, kusjuures peremeesrakk on prokarüootne rakk.

12. Peremeesrakk vastavalt nõudluspunktile 11, kusjuures peremeesrakk on *E. coli*.

13. Peremeesrakk vastavalt nõudluspunktile 10, kusjuures peremeesrakk on eukarüootne rakk.

14. Peremeesrakk vastavalt nõudluspunktile 13, kusjuures peremeesrakk on imetaja rakk.

15. Peremeesrakk vastavalt nõudluspunktile 14, kusjuures peremeesrakk on hiina hamstri munasarjarakk.

16. Humaniseeritud beeta7-vastase antikeha valmistamise meetod, nimetatud meetod hõlmab nõudluspunktile 9 vastava rekombinantse vektori ekspresseerimist ükskõik missugusele nõudluspunktidest 10 kuni 15 vastavas peremeesrakus ja nimetatud antikeha kättesaamist.

Kabat'i nr. 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

huKI D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C HVR1 R A S Q S I S N Y L A W

Fib504 D V V M T Q S P A T L S V T P G E R R I S L S S V D T R A S E S V D T Y L H W

504K siirik D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S V D T R A S E S V D T Y L H W

hu504-5 S L

hu504-16 L

hu504-32 D L

Kabat'i nr. 36 37 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

huKI Y Q Q K P G K A P K L L I HVR2 Y A A S S L E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I

Fib504 Y Q Q K P N E S P R L L I I K Y A S Q S I S G I P S R F S G S G S G T D F T L S I

504K siirik Y Q Q K P G K A P K L L I K Y A S Q S I S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I

Kabat'i nr. 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 a 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

huKI S S L Q P E D F A T Y Y C HVR3 Q Q Y N S L P W T F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO.: 23)

Fib504 N G V E L E D L S I Y Y C G N S L P N T F F G A G T K E L K R (SEQ ID NO.: 10)

504K siirik S S L Q P E D F A T Y Y C G N S L P N T F F G Q G T K V E I K R (SEQ ID NO.: 25)

FIG. 1A

Kabat'i nr. 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 41 42

hum III E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G  
 Fib504 E V Q L Q E S G P G L V K G L S L S L T C S V T G F F I T N N Y W G W I R K F P G  
 504K siirik E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F F I T N N Y W G W V R Q A P G

HVR1

Kabat'i nr. 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a 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 81 82 a

hum III K G L E W V S V I S G D G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N  
 Fib504 N K M E W M G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S I S R I T R D T S K N Q F F L Q L N  
 504K siirik K G L E W V G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S I S R I T I S A T S K N T A Y L Q M N  
 hu504-5 G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S I S R I T I S A T S K N T A Y L Q M N  
 hu504-16 G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S I S R I T I S A T S K N T A Y L Q M N  
 hu504-32 G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S I S R I T I S A T S K N T A Y L Q M N

HVR2

Kabat'i nr. b c 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 a k 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113

hum III 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)  
 Fib504 S V T T E D T A T Y Y C A M T G S S G Y F D F W G P G T M V T V S S (SEQ ID NO.: 11)  
 504K siirik S L R A E D T A V Y Y C A M T G S S G Y F D F W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO.: 26)

HVR3

FIG. 1B

Fib504 humaniseeritud variandid

HVR-L1 ja L2 asendused,  
Fib504-K RF raamistik

BIAcore  
afiinsustest (nM)

L2

L1

504K-RF  
jäägid

K Y A S Q S I S

R A S E S V D T Y L H

11

Variant

68	R A S E S V D T I L H	K Y A S Q S I S
74	R A S E S V D D L V H	K Y A S Q S I S
504-32	R A S E S V D D L L H	K Y A S Q S I S
51	R A S E S V D N L L H	K Y A S Q S I S
59	R A S E S V D P L L H	K Y A S Q S I S
504-5	R A S E S V D S L L H	K Y A S Q S I S
60	R S S V D S L V H	K Y A S Q S I S
96	R A S E S V D T L L H	K Y A S Q S I S
83	R A S E S V D T L L H	K Y A S Q S I S
504-16 (8)	R A S E S V D T L L H	K Y A S Q S I S
504-RF (29)	R A S E S V D T Y L H	K Y A S Q S I S

3,5

9

23,4  
132

FIG. 1C

4/21

**Inimese konsensusjärjestus**

Kerge ahel (kapa I)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQSISNYLAWYQOKPGKAPKLLIYAASSLES  
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQOYNLSLPWTFGQGTKVEIKRTVAA  
 PSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 27)

**FIG. 2A****Inimese konsensusjärjestus**

Raske ahel (alarühm III)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGDGG  
STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSGYFDFWGQGT  
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV  
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
 HTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
 (SEQ ID NO: 28)

**FIG. 2B**

## Fib504 siirik

Kerge ahel

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASESVDTYLHWYQOKPGKAPKLLIYYASOSIS  
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQOGNLSLPNTFGQGTKVEIKRTVAA  
 PSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 29)

**FIG. 3A**

## Fib504 siirik

Raske ahel

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFITNNYWGWRQAPGKGLEWVGYISYSGS  
TSYNPSLKSRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSGYFDFWGQGT  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVH  
 TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH  
 TCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
 (SEQ ID NO: 30)

**FIG. 3B**

5/21

## Fib504 siirik

## Kerge ahel

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDTYLHWYQOKPGKAPKLLIKYASOSIS  
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCOOQNSLPNTFGOGTKVEIKRTVAA  
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

**FIG. 4A**

## Fib504 siirik

## Raske ahel

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWRQAPGKGLEWVGYISYSGS  
TSYNPSLKSRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSGYDFEWGQGL  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
 (SEQ ID NO: 30)

**FIG. 4B**

## Fib504K-RF siirik

## Kerge ahel

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDTYLHWYQOKPGKAPKLLIKYASOSIS  
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCOOQNSLPNTFGOGTKVEIKRTVAA  
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

**FIG. 5A**

## Fib504K-RF siirik

## Raske ahel

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGWRQAPGKGLEWVGYISYSGS  
TSYNPSLKSRFTISRDTSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCAMTGSSGYDFEWGQGL  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  
 (SEQ ID NO: 32)

**FIG. 5B**



6/21

## Humaniseeritud variant 504.32

## Kerge ahel

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDDLLHWYQOKPGKAPKLLIKYASQISIS  
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQNSLPNTFGQGKTKVEIKRTVAA  
 PSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS  
 KDSTYLSSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 33)

**FIG. 6A**

## Humaniseeritud variant 504.32

## Raske ahel

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFITNNYWGVRQAPGKGLEWVGYISYSGS  
TSYNPSLKSSRFTISRDTSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCCAMTGSSGYDFDWGQGTL  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKCKVEPKSCDKTH  
 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK  
 (SEQ ID NO: 32)

**FIG. 6B**

## Roti hiirevastase Fib504 varieeruvad domeenid

## Varieeruv kerge ahel

DVVMTQSPATLSVTPGERISLSCRASESVDTYLHWYQOKPNESPRLLIKYASQISIS  
 GIPSRFSGSGSGTDFTLTINGVELEDLSIYYCQOQNSLPNTFGAGTKLELKRADAA  
 PTVSIFPPSMEQLTSGGATVVCVFNIFYPRDISVKWKIDGSEQRDGLVDSVTDQDS  
 KDSTYS (SEQ ID NO: 12)

**FIG. 9A**

## Roti hiirevastase Fib504 varieeruvad domeenid

## Varieeruv raske ahel

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGFFITNNYWGWRIRKFPGNKMEWMGYISYSGS  
TSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCCAMTGSSGYDFDWGPSTM  
 VTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLV (SEQ ID NO: 13)

**FIG. 9B**

kv1 Z DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQP  
kv1 X DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLI -L2- GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQP  
kv2 DIVMTQSPSLPVTGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEA  
kv3 EIVLTQSPGTLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEP  
kv4 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGGTDFTLTISLQQA

**FIG. 7A**

kv1 Z EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 14  
kv1 X EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 15  
kv2 EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 16  
kv3 EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 17  
kv4 EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 18

**FIG. 7B**

8/21

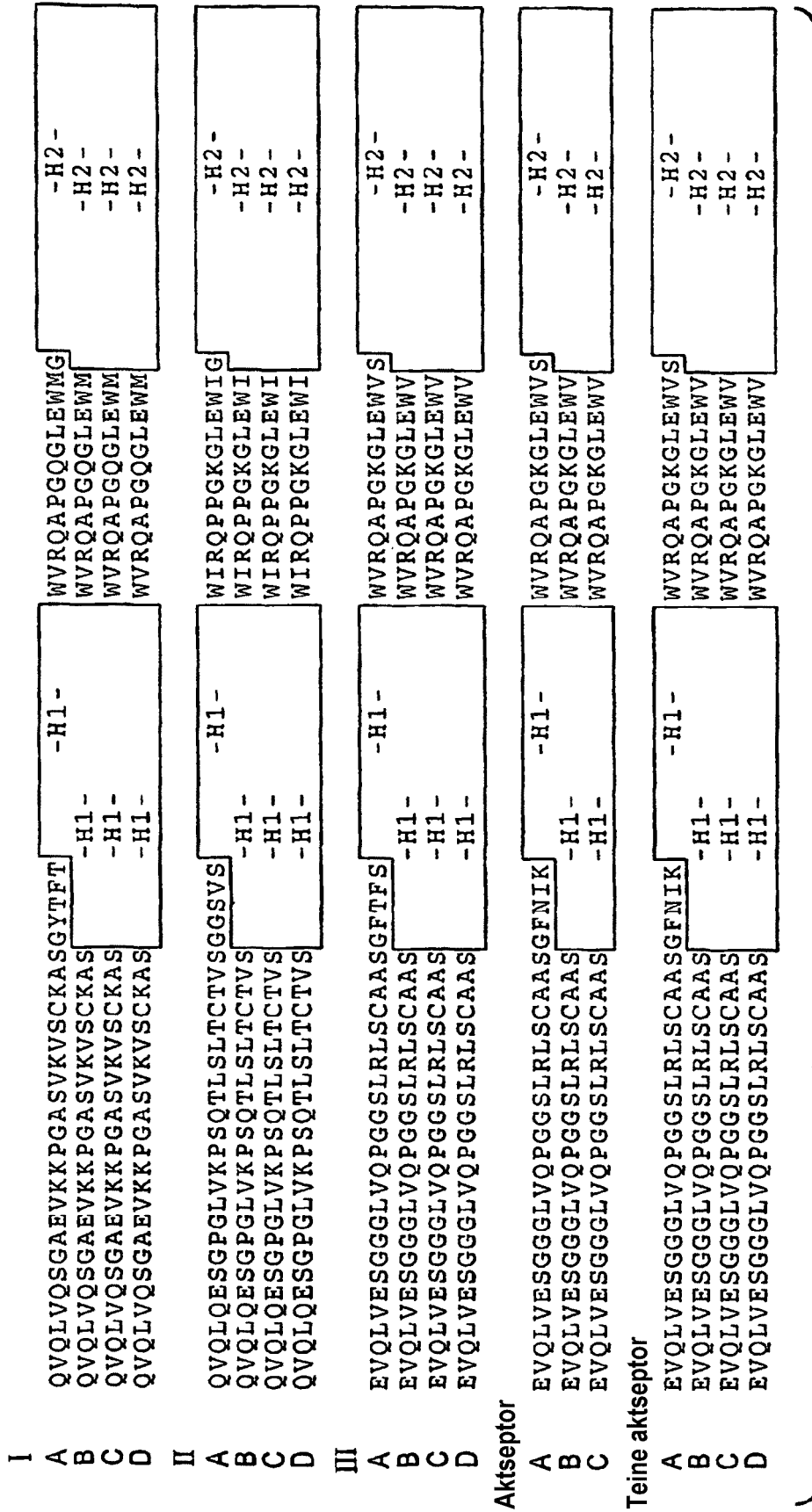


FIG. 8A

9/21

I	A	RVTITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 19
	B	RVTITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCAR	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 20
	C	RVTITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYCA	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 21
	D	RVTITADTSTAYMELSSLRSED	TAVYYC	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 22
II	A	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCAR	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 48
	B	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCAR	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 49
	C	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYCA	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 50
	D	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAAD	TAVYYC	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 51
III	A	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 52
	B	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 53
	C	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYCA	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 54
	D	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 55
	Aktseptor					
	A	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCSR	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 56
	B	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCSR	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 57
	C	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCS	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 58
	Teine aktseptor					
	A	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 59
	B	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCAR	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 60
	C	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYCA	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 61
	D	RFTISADTSKNTAYLQMN SLRAED	TAVYYC	-H3 -	WGQGLLVTVSS	SEQ ID NO.: 62

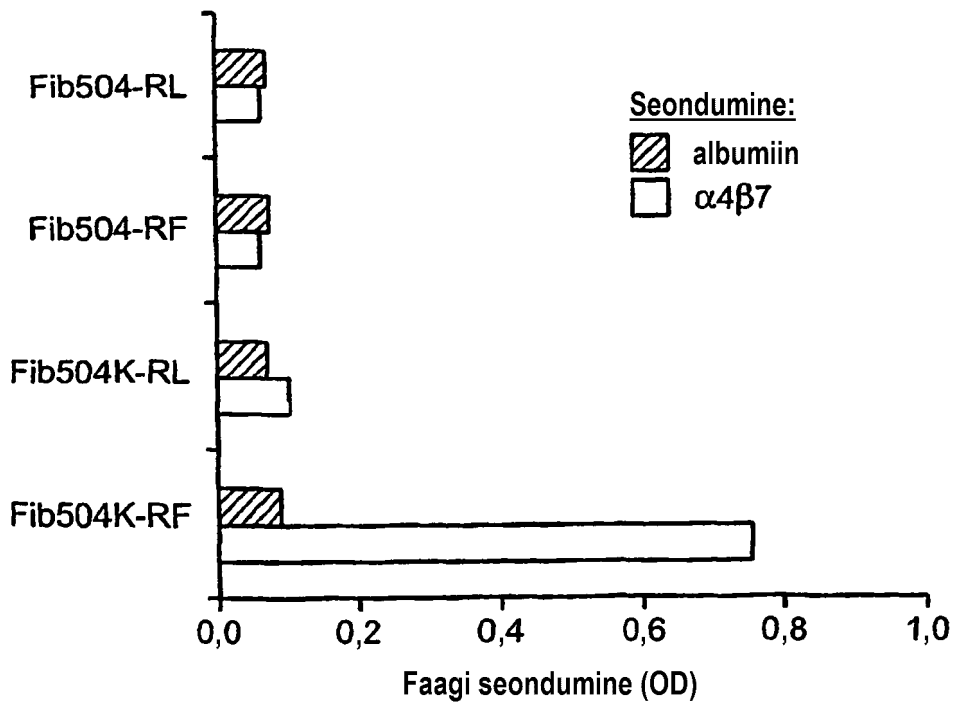
FIG. 8B

VH raamistikujärjestuste võrdlus

Raamistiku piirkond H3

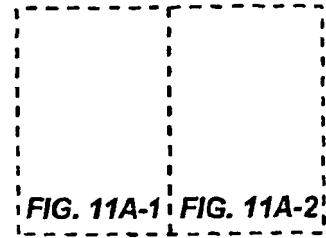
	71	72	73	74	75	76	77	78
Inimese alarühm I	A	D	T	S	T	S	T	A
Inimese alarühm II	V	D	T	S	K	N	Q	F
Inimese alarühm III	R	D	N	S	K	N	T	L
hertsepiin	A	D	T	S	K	N	T	A
<b>Fib504</b>	R	D	T	S	K	N	Q	F
<b>Fib504-RL</b>	R	D	T	S	K	N	T	L
<b>Fib404-RF</b>	R	D	T	S	K	N	T	F

**FIG. 10A**



**FIG. 10B**

**FIG. 11A**



**FIG. 11A-1**

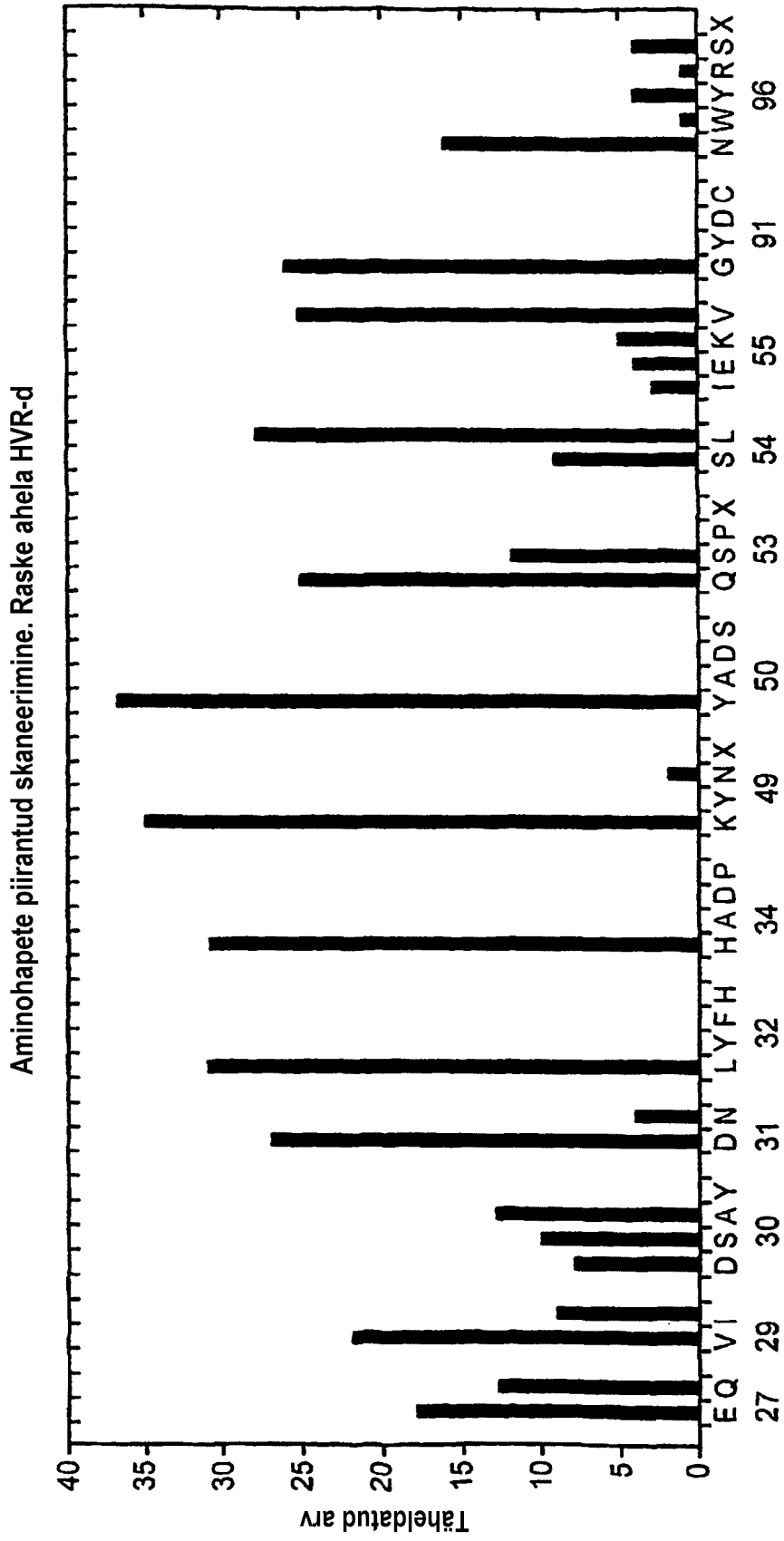
504.16		Inimese	Koodon	Aminohapped	Aminohapped					
		konsensus		kodeeritud	täheldatud					
HVR-L1		R	R							
	<u>25</u>	A	A							
		S	S							
	<u>27</u>	E	Q	SAA	EQ	E	Q			
		S	S							
	<u>29</u>	V	I	RTT	VI	V	I			
		D	S	KMT	DSAY	D	S	A		
	<u>31</u>	T	N	RAC	DN	D	N			
		L	Y	YWC	LYFH	L				
	<u>33</u>	L	L							
	H	A	SMC	HADP	H					
HVR-L2	<u>49</u>	K	Y	WAW	KYNZ	K	N			
		Y	A	KMC	YADS	Y				
	<u>51</u>	A	A							
		S	S							
	<u>53</u>	Q	S	YMG	QSPZ	Q	S			
		S	L	TYG	SL	S	L			
	<u>55</u>	I	E	RWA	IEKV	I	E	K	V	
	S	S								
HVR-L3	<u>89</u>	Q	Q							
		Q	Q							
	<u>91</u>	G	Y	KRT	GYDC	G				
		N	N							
	<u>93</u>	S	S							
		L	L							
	<u>95</u>	P	P							
	N	W	WRS	NWYRSZ	N	W	Y	R	S	
<u>97</u>	T	T								

Märkus: Z on stoppkoodon. Kõige sagedamini täheldatud aminohapped on raamiga ümbritsetud.

12/21

504.16		Inimese	Koodon	Aminohapped	Aminohapped					
		konsensus		kodeeritud	täheldatud					
HVR-H1	<u>26</u>	G	G							
		F	F							
	<u>28</u>	F	T	WYC	FITS	F				
		I	F	WTC	IF	I				
	<u>30</u>	T	S	ASC	TS	T				
		N	S	ARC	NS	N				
	<u>32</u>	N	Y	WAC	NY	N				
		Y	A	KMT	YADS	Y				
<u>34</u>	W	M	WKG	WMRL	W					
	G	S	RGC	GS	G					
HVR-H2	<u>49</u>	G	S	RGC	GS	G				
		Y	V	KWT	YVDF	Y	V	D	F	
	<u>51</u>	I	I							
		S	S							
	<u>53</u>	Y	G	KRT	YGCD	Y				
		S	G	RGC	SG	S	G			
	<u>55</u>	G	G							
		S	S							
	<u>57</u>	T	T							
		S	Y	TMT	SY	S	Y			
	<u>59</u>	Y	Y							
		N	A	RMC	NADT	N	A	D	T	
	<u>61</u>	P	D	SMT	PDAH	P	D	A	H	
		S	S							
<u>63</u>	L	V	STG	LV	L	V				
	K	K								
<u>65</u>	S	G	RGC	SG	S	G				
HVR-H3	<u>93</u>	A	A							
		M	R	AKG	MR	M				
	<u>95</u>	T	G	RSC	TGAS	T				
		G								
	<u>97</u>	S								
		S								
	<u>99</u>	G								
		Y								
	F	F								
<u>101</u>	D	D								
	F	Y	TWC	FY	F	Y				

FIG. 11A-2



**FIG. 11B**



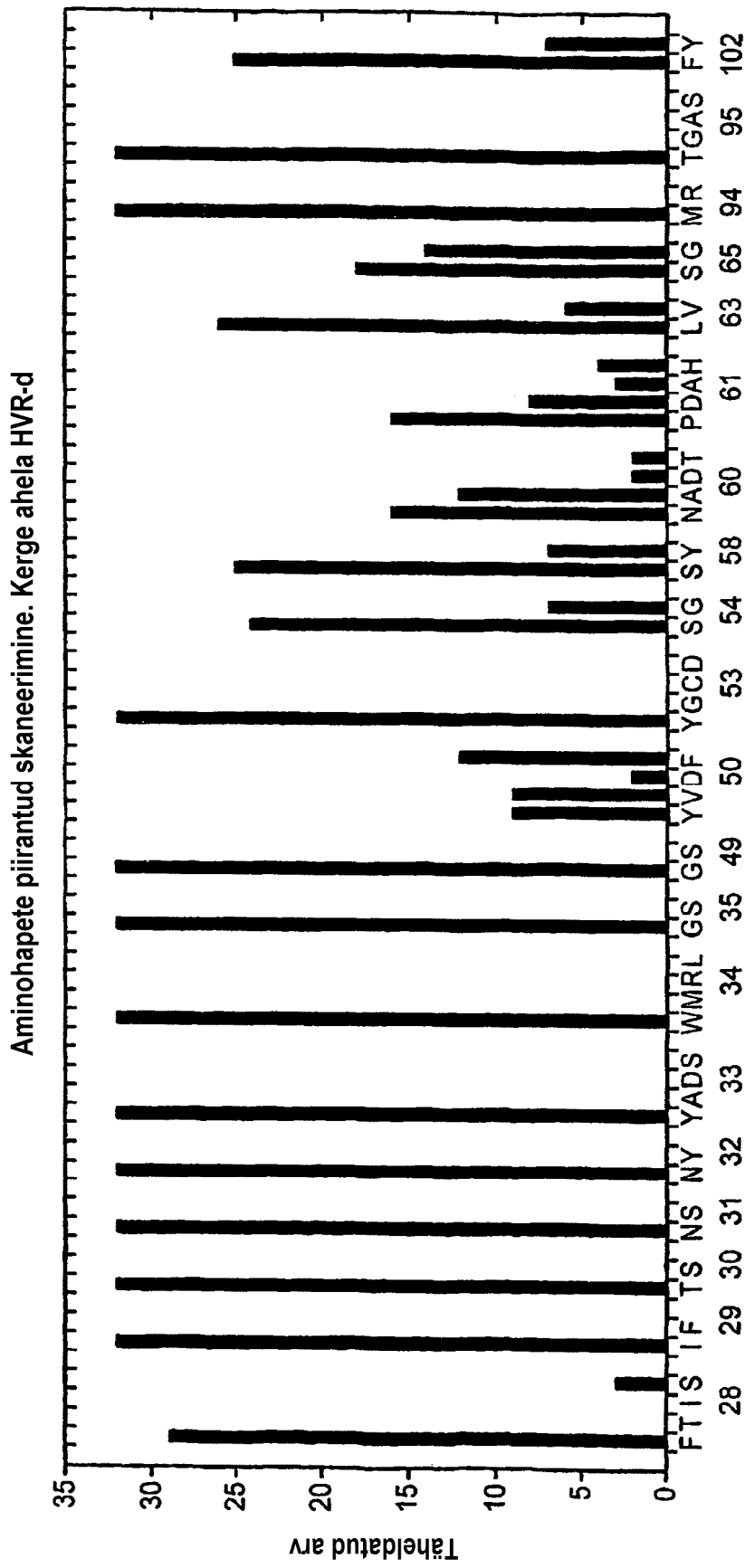


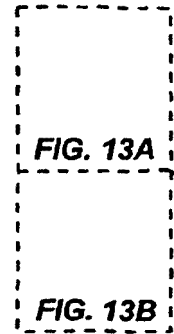
FIG. 11C

Aminohappe asend	Aminohapped												
	Täheldatud kordade arv												
A25	<b>A</b> 64	G 2	S 11	T 7	Y 9								
S26	G 4	I 2	K 3	N 8	P 1	Q 1	R 7	<b>S</b> 61	T 6				
E27	A 6	D 8	<b>E</b> 60	G 2	H 1	I 1	K 4	L 1	N 2	Q 5	R 1	V 2	
S28	A 1	D 1	G 7	H 1	I 1	K 1	N 9	P 3	R 7	<b>S</b> 56	T 4	V 1	Y 1
V29	A 11	G 6	I 3	K 1	L 9	M 6	Q 1	R 1	<b>V</b> 55				
D30	A 3	<b>D</b> 59	E 9	G 3	H 3	I 1	K 1	L 1	N 6	P 1	S 1	T 2	V 3
D31	<b>D</b> 77	E 13	G 2	N 1									
L32	I 1	<b>L</b> 88	M 4										
L33	A 1	I 5	<b>L</b> 64	M 1	V 22								
H34	F 1	<b>H</b> 87	Y 4	S 1									
<b>HVR-L1</b>													
<b>HVR-L3</b>													
N96	A 2	F 6	H 1	I 3	<b>L</b> 47	M 3	N 2	R 2	S 2	T 4	V 2	W 16	Y 3
<b>HVR-H3</b>													
M94	A 1	E 3	G 1	<b>M</b> 48	Q 10	R 24	S 8						

Märkus: Kõige sagedamini täheldatud aminohapped on raamiga ümbritsetud.

**FIG. 12**

**FIG. 13**



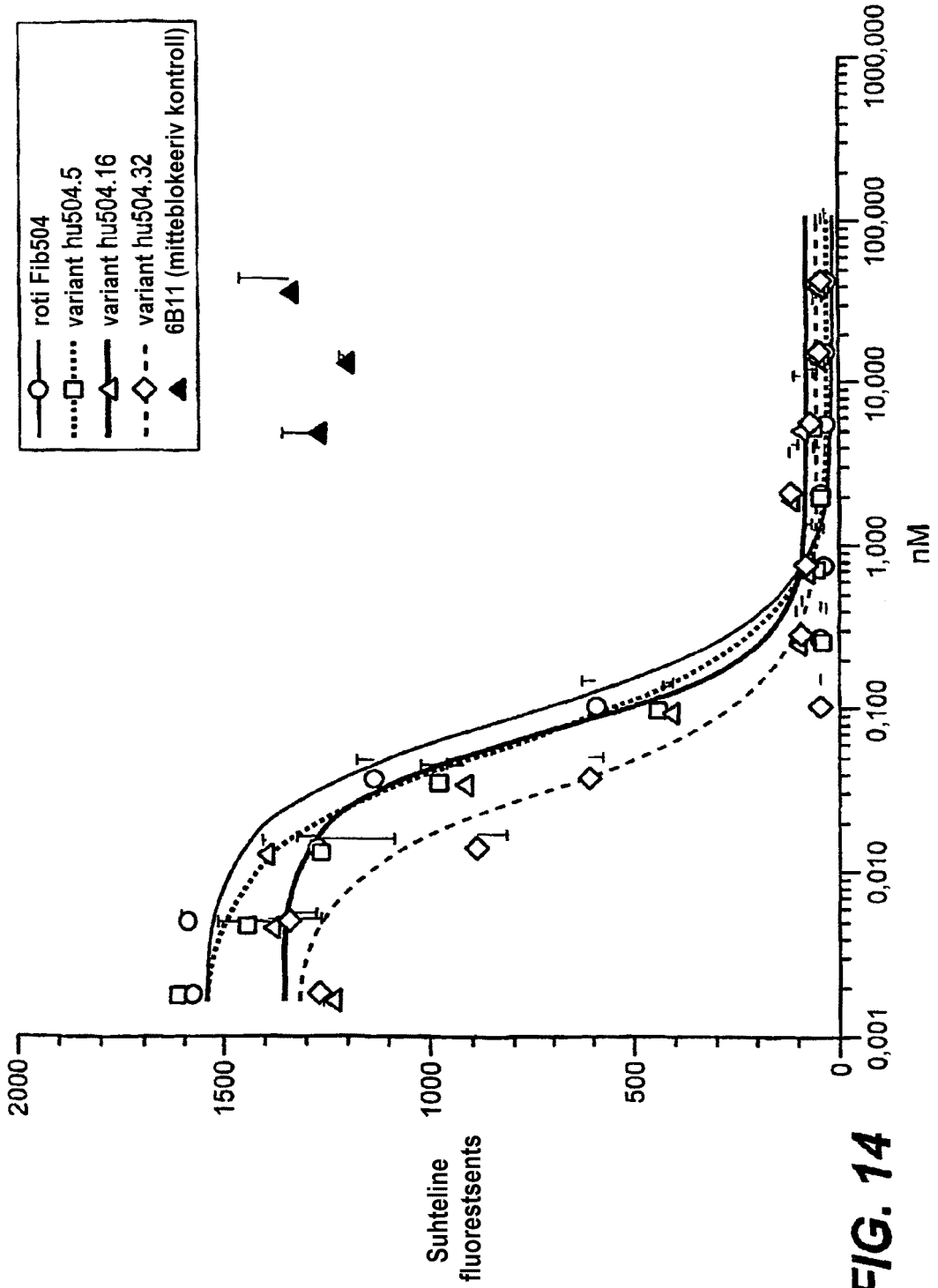
**FIG. 13A**

	Kõik täheldatud muutused roiti Fib504	Inimese konsensus	Kõik täheldatud aminohapped	Piiratud skaneerimine	Täheldatud aminohapped lai skaneerimine	Pehme randomiseerimine (muutused 504 suhtes)
CDR-L1	<u>25</u>	R	R		<b>A</b> G S T V	S
		A	A	AGSTV	G I K N P Q R <b>S</b> T	
	<u>27</u>	S	S	G I K N P Q R S T	A D <b>E</b> G H I K L N Q R V	D
		E	Q	A D E G H I K L N Q R V	A D G H I K N P R <b>S</b> T V Y	DN
	<u>29</u>	S	S	A D G H I K N P R S T V Y	A G I K L M Q R <b>V</b>	
		V	I	A G I K L M Q R V	<b>A</b> <b>D</b> E G H I K L N P S T V	
<u>31</u>	D	S	A D E G H I K L N P S T V	<b>D</b> E G N	S P N <b>D</b>	
	T	N	D E G N S P	I L M	I <b>L</b>	
<u>33</u>	Y	Y	I L M	<b>L</b>	V	
	L	L	A I L M V	<b>H</b>		
	H	A	F H Y S			
CDR-L2	<u>49</u>	K	Y	KN	<b>K</b> N	
		Y	A	Y	<b>Y</b>	
	<u>51</u>	A	A			
		S	S	Q S	<b>Q</b> S	
	<u>53</u>	Q	S	S L R	<b>S</b> <b>L</b>	
	S	L	E I K T V	I E K <b>V</b>	R	
<u>55</u>	I	E			T	
	S	S				
CDR-L3	<u>89</u>	Q	Q			
		Q	Q	G	<b>G</b>	
	<u>91</u>	G	Y			
		N	N			
	<u>93</u>	N	S			
	S	S				
<u>95</u>	L	L				
	P	P				
<u>97</u>	N	W	A F H I L M N R S T V W Y	<b>N</b> W Y R S A F H I <b>L</b> M N R S T V W Y		
	T	T				

	Kõik tähteldatud muutused roiti Fib504	Inimese konsensus	Kõik tähteldatud aminohapped	Piiratud skaneerimine	Tähteldatud aminohapped lai skaneerimine	
CDR-H1	<u>26</u> <u>28</u> <u>30</u> <u>32</u> <u>34</u>	G F H N N Y W G	F F S Y A M S	F I F N N Y W G		
	<u>49</u> <u>51</u> <u>53</u> <u>55</u> <u>57</u> <u>59</u> <u>61</u> <u>63</u> <u>65</u>	G Y I S K S G S H S Y N P S L K S	S V I S G G S T Y Y A D S V K G	G DFVY  Y GS  SY ADNT ADHP LV GS	G Y V D F  Y S G  S Y N A D T P D A H L V S G	
CDR-H2	<u>93</u> <u>95</u> <u>97</u> <u>99</u> #	A M T G S S G Y F D F	A R G  F D Y	AEGMQRS T  FY	M T  E Y	A E G M Q R S

**FIG. 13B**

Fib504 variantide aktiivsus RPMI8866-rakkudes  
 Seondumine inimese MAdCAM-1g-ga



**FIG. 15**

FIG. 15A

FIG. 15B

**FIG. 15A**

	Asend	504.32R	Aminohappe
	Kabati nr.	Suhteline nr.	Aminohape
	24	A1	R
	25	A2	A
	26	A3	S
	27	A4	E
HVR-L1	28	A5	S
	29	A6	V
	30	A7	D
	31	A8	D
	32	A9	L
	33	A10	L
	34	A11	H
			GSTV
			G I K N P Q R T
			V Q A D G H I K L N R
			Y A D G H I K N P R T V
			R I A G K L M Q
			V S A E G H I K L N P S T
			G N E T P S
			Y I M
			A I M V
			Y F S
	49	B1	K
	50	B2	Y
	51	B3	A
HVR-L2	52	B4	S
	53	B5	Q
	54	B6	S
	55	B7	I
	56	B8	S
			Y N
			D
			S
			D L R
			V E K T
	89	C1	Q
	90	C2	Q
	91	C3	G
HVR-L3	92	C4	N
	93	C5	S
	94	C6	L
	95	C7	P
	96	C8	N
	97	C9	T
			V W Y R S T A F H I L M

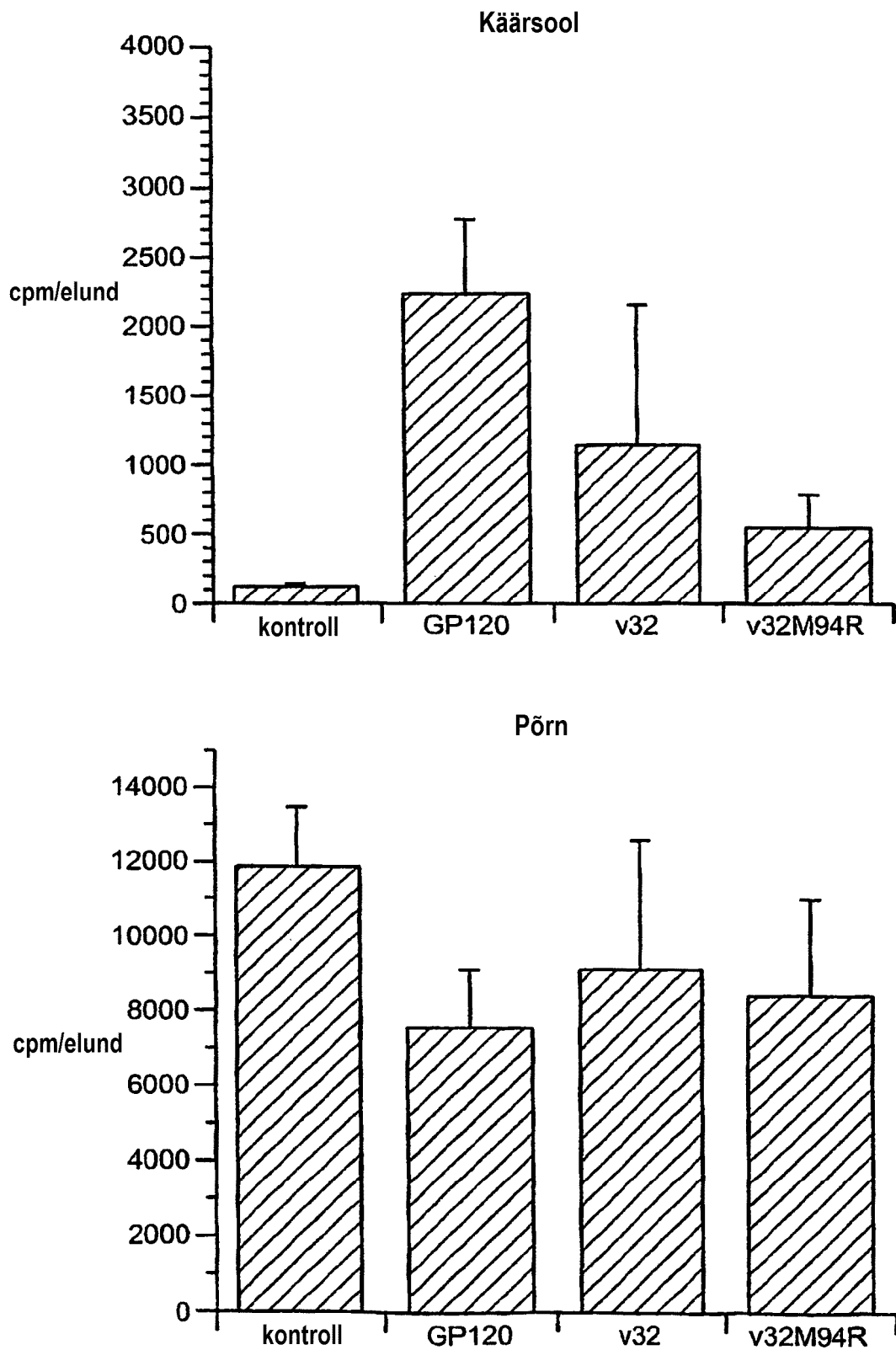
20/21

	Asend		504.32R	Aminohappe asendused
	Kabati nr.	Suhteline nr.	Aminohape	
HVR-H1	26	D1	G	
	27	D2	F	
	28	D3	F	
	29	D4	I	
	30	D5	T	
	31	D6	N	
	32	D7	N	
	33	D8	Y	
	34	D9	W	
	35	D10	G	
HVR-H2	49	E1	G	
	50	E2	Y	FVD
	51	E3	I	
	52	E4	S	
	53	E5	Y	
	54	E6	S	G
	55	E7	G	
	56	E8	S	
	57	E9	T	
	58	E10	S	Y
	59	E11	Y	
	60	E12	N	TAD
	61	E13	P	HDA
	62	E14	S	
	63	E15	L	V
	64	E16	K	
	65	E17	S	G
HVR-H3	93	F1	A	
	94	F2	R	MAEGQS
	95	F3	T	
	96	F4	G	
	97	F5	S	
	98	F6	S	
	99	F7	G	
	100	F8	Y	
	k	F9	F	
	101	F10	D	
	102	F11	F	Y
Raske	71		R	AT
ahela	73		T	N
FR3	78		F	AFL



**FIG. 15B**

21/21

**FIG. 16**