



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 2 029 173 B1**

(51) Int. Cl.

*A61K 39/395 (2006.01)**C07K 16/00 (2006.01)**A61P 35/00 (2006.01)**C07K 16/28 (2006.01)**A61K 39/00 (2006.01)**A61K 45/06 (2006.01)*(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI
PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number: E012957	(73) Patendiomanik: MacroGenics, Inc. 9640 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, US
(11) Patendikirjelduse tõlke number: EE-EP 2 029 173 B1	(72) Leiutise autorid: JOHNSON, Leslie, S. 14411 Poplar Hill Road, Darnestown, MD 20874, US
(30) Prioriteediandmed: 26.06.2006 US 816688 P	 HUANG, Ling 8210 Moorland Lane, Bethesda, MD 20817, US
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: 26.06.2007	 GERENA, Robyn 5008 Kelly Jane Ct, Sandston, VA 23510, US
(96) Euroopa patendi-taotluse number: 07812341.1	(74) Patendivolinik: Lembit Mitt AAA Patendibüroo OÜ Tartu mnt 16, 10117 Tallinn, EE
(97) Euroopa patendi väljaandmisest teatamise kuupäev: 20.07.2016	
(97) Euroopa patendi number: EP 2 029 173	
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: 08.12.2016	
Patendikirjelduse tõlke avalikustamise kuupäev: 15.02.2017	
(54) FcγRIIB-spetsiifilised antikehad ja nende kasutamise meetodid	

1. TEHNIKAVALDKOND

[0001] Leiutis puudutab patendinõudluses määratletu kohaselt antikehi või nende fragmente, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d, eelkõige inimese Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikehad või nende fragmendid seovad Fc γ RIIA-d, eelkõige inimese Fc γ RIIA-d. Leiutiskirjeldus hõlmab ka Fc γ RIIB vastase antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi kasutamist ühe ainega tehtava ravina vähi, eelistatult B-rakulise pahaloomulise kasvaja, eelkõige B-rakulise kroonilise lümfotsütaarse leukeemia või mitte-Hodgkini lümfoomi, autoimmuunhäire, põletikulise häire, IgE-vahendatud allergilise häire või nende ühe või mitme sümptomi ravimiseks, ennetamiseks, kontrolli all hoidmiseks või paremaks muutmiseks. Selline kasutamine võib hõlmata ka kombinatsiooni teiste vähi ravimeetoditega. Leiutisega pakutakse farmatseutilisi kompositsioone, mis sisaldavad Fc γ RIIB vastast antikeha või selle antigeeni siduvat fragmenti kogustes, mis on tõhusad vähi, näiteks B-rakulise pahaloomulise kasvaja, autoimmuunhäire, põletikulise häire, IgE vahendatud allergilise häire või nende ühe või mitme sümptomi ennetamiseks, ravimiseks, kontrolli all hoidmiseks või paremaks muutmiseks. Leiutise eelistatud teostused on välja toodud patendinõudluse sõltuvates punktides. Samuti on kirjeldatud terapeutiliste antikehade terapeutilise mõju parandamise meetodeid, mis hõlmavad leiutisekohaste antikehade manustamist, et parandada terapeutiliste antikehade efektorfunktsiooni. Lisaks on kirjeldatud ka vaktsiini kompositsiooni tõhususe parandamise meetodeid, mis hõlmavad leiutisekohaste antikehade manustamist koos vaktsiini kompositsiooniga.

2. LEIUTISE TAUST

2.1. Fc RETSEPTORID JA NENDE ROLLID IMMUUNSÜSTEEMIS

[0002] Antikeha-antigeeni komplekside interaktsioon immuunsüsteemi rakkudega toob kaasa palju erinevaid reaktsioone, mis ulatuvad efektorfunktsioonidest, näiteks antikehast sõltuvast rakkude vahendatud tsütotoksilisusest, nuumrakkude degranulatsioonist ja fagotsütoosist immunomoduloorsete signaalideni, mis reguleerivad näiteks lümfotsüütide proliferatsiooni ja antikehade sekretsiooni. Kõiki neid interaktsioone

käivitab antikehade või immuunkomplekside Fc domeeni seondumine hematopoeetilistel rakkudel asuvate spetsialiseerunud rakupinna retseptoritega. Antikehade ja immuunkomplekside käivitatud rakureaktsioonide mitmekesisus tuleneb Fc retseptorite struktuurilisest heterogeensusest. Fc retseptoritel on struktuuri poolest sarnased ligandit siduvad domeenid, mis eeldatavalt vahendavad rakusisest signaaliseerimist.

[0003] Fc retseptorid, mis on valkude immunoglobuliini geeni ülemperikond, on pinna glükovaalitud, mis suudavad siduda immunoglobuliini molekulide Fc osa. Iga selle perekonna liige tunneb ära ühe või mitme isotüübi immunoglobuliine Fc retseptori α -ahela äratundmisdomeeni kaudu. Fc retseptoreid määratleb nende spetsiifilisus immunoglobuliini alamtüüpide suhtes. Fc retseptoreid teatakse IgG puhul nimetusega Fc γ R, IgE puhul nimetusega Fc ϵ R ja IgA puhul nimetusega Fc α R. Erinevad antigeene esitlevad rakud kannavad erinevat isotüüpi antikehade Fc retseptoreid ning antikeha isotüüp määrab kindlaks, millised antigeene esitlevad rakud osalevad antud reaktsioonis (ülevaade publikatsioonides Ravetch J.V. *et al.*, 1991, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457–492; Gerber J.S. *et al.*, 2001 *Microbes and Infection*, 3: 131–139; Billadeau D.D. *et al.*, 2002, *The Journal of Clinical Investigation*, 2(109): 161–1681; Ravetch J.V. *et al.*, 2000, *Science*, 290: 84–89; Ravetch J.V. *et al.*, 2001 *Annu. Rev. Immunol.* 19: 275–290; Ravetch J.V., 1994, *Cell*, 78(4): 553–560). Erinevad Fc retseptorid, neid ekspresseerivad rakud ja nende isotüübi spetsiifilisus on kokkuvõtlikult välja toodud tabelis 1 (kohandatud publikatsioonist „Immunobiology: The Immune System in Health and Disease”, 4. väljaanne 1999, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York). Muu tehnika tase hõlmab publikatsiooni WO 2005115452, mis käsitleb antikehi või nende fragmente, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d, eelkõige inimese Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega kui nimetatud antikehad või nende fragmendid seovad Fc γ RIIA-d, eelkõige inimese Fc γ RIIA-d. Selles on avaldatud ka Fc γ RIIB antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi kasutamine ühe ainega tehtava ravina vähi, eelistatult B-rakulise pahaloomulise kasvaja, eelkõige B-rakulise kroonilise lümfotsütaarse leukeemia või mitte-Hodgkini lümfoomi, autoimmuunhäire, põletikulise häire, IgE vahendatud allergilise häire või nende ühe või mitme sümptomi ravimiseks, ennetamiseks, kontrolli all hoidmiseks või paremaks muutmiseks. Samuti on kirjeldatud terapeutiliste antikehade terapeutilise mõju parandamise meetodeid, mis hõlmavad selles kirjeldatud antikehade manustamist, et

parandada terapeutiliste antikehade efektorfunktsiooni, ning vaktsiini kompositsiooni tõhususe parandamise meetodeid, mis hõlmavad leiutisekohaste antikehade manustamist.

[0004] Patendidokument WO 2007021841 puudutab molekule, eelkõige polüpeptiide, veel konkreetsemalt immunoglobuliine (näiteks antikehi), mis sisaldavad Fc piirkonna varianti, kus nimetatud Fc piirkonna variant sisaldab vähemalt ühte aminohappe modifikatsiooni võrreldes metsiktüüpi Fc piirkonnaga, mis seob Fc γ RIIIA-d ja/või Fc γ RIIA-d suurema afiinsusega kui võrreldav molekul, mis sisaldab metsiktüüpi Fc piirkonda. Neid molekule on kirjeldatud eriti kasulikena haiguse, häire või infektsiooniga seotud ühe või mitme sümptomi ennetamisel, ravimisel või paremaks muutmisel; haiguse või häire ravimiseks või ennetamiseks, mille puhul on soovitud Fc γ R-i vahendatud efektorraku funktsiooni (näiteks ADCC, st antikehast sõltuv rakuline tsütotoksilisus, ingl *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) tõhususe parandamine, näiteks vähi, nakkushaiguse ravimiseks või ennetamiseks; ning terapeutiliste antikehade terapeutilise tõhususe parandamisel, mille mõju vahendab ADCC.

Fc γ retseptorid

[0005] Iga selle perekonna liige on integraalne membraani glükovalk, millel on immunoglobuliiniga seotud domeenide C2 komplektiga seotud rakuvälised domeenid, tervet membraani kattev domeen ja erineva pikkusega intratsütoplasmaatiline domeen. Tuntakse kolme Fc γ R-i, mis on tähistatud kui Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) ja Fc γ RIII (CD16). Neid kolme retseptorit kodeerivad erinevad geenid, samas osutab kolme perekonnaliikme vaheline ulatuslik homoloogia sellele, et need on välja arenenud samast eellasest, arvatavasti geeniduplikatsiooni tulemusel. Leiutis keskendub konkreetselt Fc γ RII-le (CD32).

Fc γ RII (CD32)

[0006] Fc γ RII valgud on 40 KDa integraalsed membraani glükovalgud, mis seonduvad üksnes kompleksse IgG-ga, kuna neil on madal afiinsus monomeerse Ig suhtes (10^6 M⁻¹).

See retseptor on enim ekspresseeritud Fc γ R, esinedes kõigis hematopoeetilistes rakkudes, sealhulgas monotsüütides, makrofaagides, B-rakkudes, NK-rakkudes, neutrofiilides, nuumrakkudes ja trombotsüütides. Fc γ RII-l on ainult kaks immunoglobuliini taolist piirkonda immunoglobuliini siduvas ahelas ja seega palju madalam afiinsus IgG suhtes kui Fc γ RI-l. Teatakse kolme inimese Fc γ RII geeni (Fc γ RII-A, Fc γ RII-B, Fc γ RII-C), millest kõik seovad IgG-d agregaatides või immuunkompleksides.

[0007] Fc γ RII-A (CD32A) ja Fc γ RII-B (CD32B) tsütoplasmaatiliste domeenide selged erinevused tekitavad kaks funktsionaalselt heterogeenset reaktsiooni retseptori ligeerimisele. Põhierinevus seisneb selles, et A isovorm algatab rakusisesel signaliseerimisel, mis põhjustab raku aktivatsiooni, näiteks fagotsütoosi ja oksüdatiivse purskeni, samas kui B isovorm algatab inhibeerivaid signaale, mis näiteks inhibeerivad B-raku aktivatsiooni.

15 *Signaliseerimine läbi Fc γ R-ide*

[0008] Nii aktiveerivad kui ka inhibeerivad signaalid transdutseeritakse pärast ligeerimist läbi Fc γ R-ide. Need kardinaalselt erinevad funktsioonid tulenevad struktuurilistest erinevustest retseptori isovormide vahel. Erinevaid reaktsioone selgitavad kaks selgelt eristuvat domeeni retseptori tsütoplasmaatilistes signaaldomeenides, mida nimetatakse immunoretseptori türosiinil põhinevateks aktivatsioonimotiivideks (ITAM, ingl *immunoreceptor tyrosine based activation motif*) või immunoretseptori türosiinil põhinevateks inhibeerivateks motiivideks (ITIM, *immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif*). Erinevate tsütoplasmaatiliste ensüümide kaasamine nendesse struktuuridesse dikteerib Fc γ R-vahendatud rakureaktsioonide tulemust. ITAM-e sisaldavate Fc γ R-i komplekside hulka kuuluvad Fc γ RI, Fc γ RIIA ja Fc γ RIIAA, kusjuures ITIM-e sisaldavate komplekside hulka kuulub üksnes Fc γ RIIB.

[0009] Inimese neutrofiilid ekspresseerivad Fc γ RIIA geeni. Fc γ RIIA klasteri teke läbi immuunkomplekside või spetsiifilise antikeha ristsidumise aitab koondada ITAM-e koos retseptoriga seotud kinaasidega, mis soodustavad ITAM-ide fosforülatsiooni. ITAM-i fosforülatsioon toimib põkkekohana Syki jaoks, mille aktivatsioon toob kaasa allavoolu

substraatide aktivatsiooni (nt PI₃K). Rakkude aktivatsioon põhjustab põletikku soodustavate vahendajate vabastamist.

[0010] FcγRIIB geeni ekspresseeritakse B-lümfotsüütides; selle rakuväline domeen on 96% ulatuses identne FcγRIIA-ga ja seob IgG komplekse eristamatul viisil. ITIM-i olemasolu FcγRIIB tsütoplasmaatilises domeenis määratleb selle FcγR-i inhibeeriva alamklassi. Hiljaaegu tuvastati selle inhibeerimise molekulaarne alus. Kui pidada reeglipäraseks, et see kaasneb FcγR aktiveerimisega, siis muutub ITIM FcγRIIB-s fosforüülituks ning see meelitab ligi inositolpolüfosfaadi 5'-fosfataasi SH2 domeeni (SHIP), mis hüdrolyüsib fosfoinositooli virgatsaineid, mis vabanevad ITAM-i sisaldava FcγR-i vahendatud türosiinkinaasi aktivatsiooni tagajärjel, ennetades seeläbi rakusise Ca⁺⁺ sissevoolu. Seega summutab FcγRIIB ristsidumine aktiveerimise reaktsiooni FcγR ligeerimisele ja inhibeerib rakkude reageerimisvõimet. Seeläbi nurjatakse B-rakkude aktivatsioon, B-rakkude proliferatsioon ja antikeha sekretsioon.

15

TABEL 1. Immunoglobuliini isotüüpide Fc-piirkondade retseptorid

Retseptor	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)
Seondumine	IgG1 10 ⁸ M ⁻¹	IgG1 2 × 10 ⁶ M ⁻¹	IgG1 2 × 10 ⁶ M ⁻¹	IgG1 2 × 10 ⁶ M ⁻¹	IgG1 5 × 10 ⁵ M ⁻¹	IgG1 10 ¹⁰ M ⁻¹	IgG1, IgA2 10 ⁷ M ⁻¹
Rakutüüp	Makrofaagid, neutrofiilid, eosinofiilid, dendriitrakud	Makrofaagid, neutrofiilid, eosinofiilid, dendriitrakud, trombotsüüdid,	Makrofaagid, neutrofiilid, eosinofiilid	B-rakud, nuumrakud	Looduslikud tapjarakud, eosinofiilid, makrofaagid, neutrofiilid,	Nuumrakud, eosinofiilid, basofiilid	Makrofaagid, neutrofiilid, eosinofiilid

Retseptor	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)
		Langerhania rakud			nuumrakud		
Ligeerimise mõju	Tagasihaare, stimuleerimine, oksüdatiivse purske aktivatsioon, tapmise indutseerimine	Tagasihaare, graanulite vabastamine	Tagasihaare, stimulasiooni pärssimine	Tagasihaare puudub, stimulasiooni pärssimine	Tapmise indutseerimine	Graanulite eritamine	Tagasihaare, tapmise indutseerimine

2.2. ASJAKOHASED HAIGUSED

2.2.1. VÄHK

- 5 [0011] Kasvaja ehk tuumor on neoplastiline mass, mis tekib ebanormaalse kontrollimatu rakkude kasvu tagajärjel, mis võib olla healoomuline või pahaloomuline. Healoomulised kasvavad jäävad üldiselt lokaalseteks. Pahaloomulisi kasvujaid nimetatakse ühiselt vähkideks. „Pahaloomuline” tähendab üldiselt seda, et kasvaja võib tungida naabruses paiknevatesse organismistruktuuridesse ja neid hävitada ning levida kaugematesse kohtadesse, et põhjustada surma (ülevaadet vt Robbins ja Angell, 1976, „Basic Pathology”, 2. väljaanne, W.B. Saunders Co., Philadelphia, lk 68–122). Vähk võib tekkida organismi paljudes piirkondades ja käituda erinevalt olenevalt selle päritolust. Vähirakud hävitavad selle organismi osa, kust nad pärit on, ja seejärel levivad teise (teistesse) organismi osa(de)sse, kus nad alustavad uut kasvu ja põhjustavad rohkem
- 15 hävingut.

[0012] Igal aastal tekib vähk rohkem kui 1,2 miljonil ameeriklasel. Vähk on USA-s sageduselt teine surmapõhjus ning kui praegune suundumus jätkub, siis on vähk 2010. aastaks eeldatavasti peamine surmapõhjus. USA-s on kopsu- ja eesnäärmevähk peamised vähktõbedest surma põhjustajad meeste hulgas. USA-s on kopsu- ja rinnavähk peamised vähktõbedest surma põhjustajad naiste hulgas. USA-s diagnoositakse igal teisel mehel mingil ajahetkel tema eluea jooksul vähk. USA-s diagnoositakse igal kolmandal naisel mingil ajahetkel tema eluea jooksul vähk. Vähiravi pole veel leitud. Praegused ravivõimalused, näiteks operatsioon, keemiaravi ja kiiritusravi ei ole sageli tõhusad või neil esineb tõsiseid kõrvalmõjusid.

10

2.2.1.1. B-RAKULISED PAHALOOMULISED KASVAJAD

[0013] B-rakulised pahaloomulised kasvaja, sealhulgas B-rakulised lümfoomid ja leukeemiad on neoplastilised haigused, mille esinemissagedus on USA-s märkimisväärne. USA-s on igal aastal ligikaudu 55 000 uut lümfoomijuhtu (1998. aasta andmed) ning hinnanguline surmajuhtude arv on 25 000 juhtu aastas. See moodustab 4% kõikidest vähijuhtudest ja 4% kõikidest vähiga seotud surmajuhtudest USA elanikkonnas. Lümfoidsete kasvajate Euroopa-Ameerika klassifikatsiooni parandatud väljaandes (1994 REAL klassifikatsioon, parandatud väljaanne 1999. aastal) rühmitati lümfoomid nende päritolu alusel B-rakuliini lümfoomideks, T-rakuliini lümfoomideks või Hodgkini lümfoomideks. B-rakuliini lümfoom on USA-s kõige sagedamini diagnoositud mitte-Hodgkini lümfoomi (NHL, ingl *non-Hodgkin's lymphoma*) tüüp (Williams, „Hematology” 6. väljaanne (Beutler *et al.*, toim.), McGraw Hill 2001).

Krooniline lümfootsütaarne leukeemia (CLL, ingl *chronic lymphocytic leukemia*) on neoplastiline haigus, mida iseloomustab väikeste, küpse välimusega lümfootsüütide ladestumine veres, luuüdis ja lümfikudedes. USA-s on CLL-i esinemissagedus 2,7 juhtu 100 000 inimese kohta. Haigestumise risk suureneb vanusega astmeliselt, eelkõige meeste puhul. See moodustab 0,8% kõikidest vähijuhtudest ning on kõige sagedasem täiskasvanutel esinev leukeemia, moodustades 30% kõikidest leukeemiajuhtudest. Peaaegu kõikidel juhtudel (>98%) kuuluvad haigestunud rakud B-lümfootsüütide rakuliini. Mitteleukeemiline variant, väikeserakuline lümfootsütaarne lümfoom moodustab 5–10% kõikidest lümfoomi juhtudest, sellel on histoloogilised, morfoloogilised ja

immunoloogilised tunnused, mida ei ole võimalik eristada B-CLL-i all kannatavate patsientide lümfisõlmedega seotud lümfoomide tunnustest (Williams, 2001).

5 [0014] Kroonilise lümfotsütaarse leukeemia loomulik kulg hõlmab mitut faasi. Varajases faasis on krooniline lümfotsütaarne leukeemia aeglase arenguga haigus, mida iseloomustab väikeste, küpsete, funktsionaalselt võimetute pahaloomuliste B-rakkude ladestumine, millel on pikenenud eluiga. Lõpuks väheneb pahaloomuliste B-rakkude kahekordistumise aeg ning patsiendid muutuvad üha enam sümptomaatilisteks. Kuigi kemoterapeutikumidega ravimine võib pakkuda sümptomaatilist leevendust, pikendab see 10 patsientide üldist ellujäämist üksnes minimaalselt. Kroonilise lümfotsütaarse leukeemia hiliseid faase iseloomustab märkimisväärne aneemia ja/või trombotsütopeenia. Selleks hetkeks on keskmine ellujäämise aeg vähem kui kaks aastat (Foon *et al.*, 1990, *Annals Int. Medicine* 113: 525). Rakulise proliferatsiooni väga madala määra tõttu on krooniline lümfotsütaarne leukeemia kemoterapeutikumiravi suhtes resistentne.

15

[0015] Hiljaaegu on geeniekspressiooni uuringutes tuvastatud mitmeid geene, mis võivad olla lümfoproliferatiivsete häirete korral suurenenud. Üks molekul, mille puhul arvatakse, et seda ületoodetakse B-rakulise kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (B-CLL) all kannatavatel patsientidel ja suurel osal mitte-Hodgkini lümfoomi all kannatavatel 20 patsientidel, on CD32B (Alizadeh *et al.*, 2000, *Nature* 403: 503–511; Rosenwald *et al.*, 2001, *J. Exp. Med.* 184: 1639–1647). Kuid CD32B roll B-CLL korral ei ole selge, kuna ühes aruandes demonstreeritakse, et CD32B-d ekspresseeriti vähestes B-CLL rakkudes ja madala tihedusega (Damle *et al.*, 2002, *Blood* 99: 4087–4093). CD32B on B-rakuliini pinna antigeen, mille ületootmine B-rakulise kasvaja korral teeb sellest sobiva märklaua 25 terapeutiliste antikehade jaoks. Lisaks kuulub CD32B inhibeerivate retseptorite kategooriasse, mille ligeerimine annab negatiivse signaali. Seega võivad CD32B vastu suunatud antikehad toimida selliselt, et need kõrvaldavad kasvajakarakud mehhanismide abil, mille hulka kuuluvad komplemendist sõltuv tsütotoksilisus (CDC, ingl *complement dependent cytotoxicity*), antikehast sõltuv rakuline tsütotoksilisus (ADCC), kuid ka 30 apoptootilise signaali käivitamine. CD32B kõrge homoloogia selle vaste CD32A-ga, mis aktiveerib Fc γ retseptorit, on seega siiaamaani takistanud selliste antikehade genereerimist, mis tunnevad selektiivselt ära selle molekuli ühte vormi, kuid mitte selle teist vormi.

2.2.1.2. Vähiravi

- [0016] Praegusel ajal võib vähiravi hõlmata operatsiooni, keemiaravi, hormoonravi ja/või kiiritusravi, et hävitada patsiendil neoplastilised rakud (vt näiteks Stockdale, 1998, „Principles of Cancer Patient Management” publikatsioonis *Scientific American: Medicine*, vol. 3, Rubenstein ja Federman (toim.), 12. peatükk, IV jagu). Viimasel ajal võib vähiravi hõlmata ka bioloogilist ravi või immunoteraapiat. Kõikidel nendel lähenemisviisidel on patsiendi seisukohast märkimisväärsed puudusi. Näiteks võib kirurgiline operatsioon olla vastunäidustatud patsiendi tervisliku seisundi tõttu või seetõttu, et see võib olla patsiendile vastuvõetamatu. Lisaks ei pruugi operatsioon neoplastilist kude täielikult eemaldada. Kiiritusravi on tõhus üksnes siis, kui neoplastiline kude näitab kiirituse suhtes suuremat tundlikkust kui normaalne kude ning kiiritusravi võib sageli kutsuda esile ka tõsiseid kõrvalmõjusid. Hormoonravi antakse harva üksiku aina ning kuigi hormoonravi võib olla tõhus, kasutatakse seda sageli vähi korduva ilmnemise ennetamiseks või selle edasi lükkamiseks pärast seda, kui suurem osa vähirakkudest on teiste ravimeetodite abil eemaldatud. Bioloogiliste ravimeetodite ja immunoteraapia meetodite arv on piiratud ning need võivad põhjustada kõrvalmõjusid, näiteks lööbeid või turseid, gripilaadseid sümptomeid, sealhulgas palavikku, külmavärinaid ja väsimust, seedetrakti probleeme või allergilisi reaktsioone.
- [0017] Mis puutub keemiaravisse, siis vähi ravimiseks on olemas palju erinevaid kemoterapeutikume. Enamiku vähivastaste kemoterapeutikumide toime seisneb DNA sünteesi otseses või kaudses inhibeerimises, inhibeerides deoksüribonukleotiidtrifosfaadi prekursorite biosünteesi, et ennetada DNA replikatsiooni ja sellega kaasnevat rakkude jagunemist (vt näiteks Gilman *et al.*, „Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics”, 8. väljaanne (Pergamom Press, New York, 1990)). Need ained, mille hulka kuuluvad alküülivad ained, näiteks nitrosourea, antimetaboliidid, näiteks metotreksaat ja hüdroksüurea, ning teised ained, näiteks etoposiidid, kamptotetsiinid, bleomütsiin, doksorubitsiin, daunorubitsiin jne, kuigi need ei ole tingimata rakutsükli-spetsiifilised, tapavad rakke S-faasi ajal tänu nende mõjule DNA replikatsioonile. Teised ained, konkreetselt kolhitsiin ja vinkaalkaloidid, näiteks vinblastiin ja vinkristiin, takistavad mikrotoubulite moodustumist, mille tulemuseks on mitootiline peatamine.

Keemiaravi protokollid hõlmavad üldiselt kemoterapeutikumide kombinatsiooni manustamist, et suurendada ravi tõhusust.

[0018] Hoolimata erinevate kemoterapeutikumide kättesaadavusest on keemiaravil palju puudusi (vt näiteks Stockdale, 1998, „Principles Of Cancer Patient Management” publikatsioonis *Scientific American Medicine*, vol. 3, Rubenstein ja Federman (toim.), 12. peatükk, 10. jagu). Peaaegu kõik kemoterapeutikumid on toksilised ning keemiaravi põhjustab märkimisväärseid ja sageli ohtlikke kõrvalmõjusid, sealhulgas tõsist iiveldust, luuüdi depressiooni, immunosupressiooni jne. Lisaks on paljud kasvaja isegi kemoterapeutikumide kombinatsioonide manustamise korral kemoterapeutikumide suhtes resistentsed või neil võib areneda selline resistentsus. Tegelikult on need rakud, mis on resistentsed raviprotokollis kasutatavate konkreetsete kemoterapeutikumide suhtes, tihti tõestatult resistentsed ka teiste ravimite suhtes, isegi kui need ained toimivad konkreetsetes ravis kasutatud ravimite toimemehhanismidest erinevate mehhanismidega; seda nähtust nimetatakse pleiotroopseks ravimi või hulgiravimi resistentsuseks. Seega on paljud vähivormid ravimiresistentsuse tõttu standardsetele keemiaravi raviprotokollidele tõestatult raskesti alluvad.

[0019] B-rakulisi pahaloomulisi kasvaja ravitakse üldiselt ühe ainega tehtava keemiaravi, kombineeritud keemiaravi ja/või kiiritusraviga. Need ravimeetodid võivad vähendada haiguslikkust ja/või parandada ellujäämise määra, ehkki nendega kaasnevad märkimisväärsed kõrvalmõjud. B-rakuliste pahaloomuliste kasvaja allumine erinevatele ravivormidele on erinev. Näiteks võib kiiritusravi juhtudel, kus on võimalik mitte-Hodgkini lümfoomi piisav kliiniline faaside määramine, pakkuda rahuldavat ravi. Kuid teatud patsiendid ei allu ravile ning aja jooksul järgneb haiguse korduv ilmnemine koos resistentsusega ravile, eelkõige haiguse kõige agressiivsemate variantide puhul. Selle haiguse tagajärjel surevad ligikaudu pooled patsiendid (Devesa *et al.*, 1987, *J. Nat'l Cancer Inst.* 79: 701).

[0020] Ravile raskesti alluva B-rakulise kasvaja ravimiseks uuritavate ravimeetodite hulka kuuluvad autoloogse ja allogeense luuüdi või tüvirakkude siirdamine ja geeniteraapiad. Hiljaaegu kaasati B-rakulise kasvaja ravisse immunoteraapia, milles kasutatakse monoklonaalseid antikehi B-rakkude spetsiifiliste antigeenide

sihtmärgistamiseks. Radionukliididele suunatud antikehade, toksiinide või teiste raviainete kasutamine pakub võimalust selliseid aineid selektiivselt kasvaja asukohtadesse toimetada, piirates seeläbi normaalsetele kudedele põhjustatavat toksilisust.

5 [0021] Alternatiivsete vähiravi meetodite järele on märkimisväärne vajadus, eelkõige vähi ravimiseks, mis on osutunud standardsetele vähiravi meetoditele, näiteks operatsioonile, kiiritusravile, keemiaravile või hormoonravile raskesti alluvaks. Üks paljulubav alternatiiv on immunoteraapia, milles vähirakud on spetsiifiliselt sihtmärgistatud vähi antigeeni-spetsiifiliste antikehade poolt. Peamised jõupingutused on suunatud

10 immuunreaktsiooni spetsiifilisuse rakendamisele, näiteks hübriidoomi tehnoloogia on võimaldanud välja töötada kasvaja suhtes selektiivseid monoklonaalseid antikehi (vt Green M.C. *et al.*, 2000 *Cancer Treat Rev.*, 26: 269–286; Weiner LM, 1999 *Semin Oncol.* 26 (suppl. 14): 43–51), ning mõne viimase aasta jooksul on USA Toidu- ja Raviamet heaks kiitnud esimesed vähiraviks sobivad monoklonaalsed antikehad: rituksiin (CD20

15 antikeha) mitte-Hodgkini lümfoomi korral, Campath (CD52 vastane antikeha) B-rakulise kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (B-CLL) korral ja hertseptiin [(c-erb-2/HER-2) vastane antikeha] metastaatilise rinnavähi korral (Suzanne A. Eccles, 2001, *Breast Cancer Res.*, 3: 86–90). NHL ja B-CLL on B-rakulise kasvaja kas kõige sagedamini esinevat vormi. Need antikehad on demonstreerinud kliinilist tõhusust, kuid nende kasutamisega

20 kaasnevad kõrvalmõjud. Sellist ravi takistav tegur on antikeha efektorfunktsiooni tugevus, näiteks antikehast sõltuva rakulise tsütotoksilisuse („ADCC”) vahendamisel. Lisaks ei vasta rituksaani ja Campathiga vähemalt pooled patsiendid ravile ja mürdosa ravile vastanutest võivad olla edasisele ravile raskesti alluvad.

25 [0022] Olemas on vajadus alternatiivsete ravimeetodite järele vähi, eelkõige B-rakuliste pahaloomuliste kasvajate ravimiseks, eelkõige patsientide korral, kes on standardsetele vähiravi meetoditele ja uutele immunoteraapiatele, näiteks rituksaanile raskesti alluvad.

2.2.2. PÕLETIKULISED HAIGUSED JA AUTOIMMUUNHAIGUSED

30 [0023] Põletik on protsess, mille abil organismi valged vererakud ja kemikaalid kaitsevad meie organismi võõrainete, näiteks bakterite ja viiruste põhjustatud infektsiooni eest.

Tavaliselt iseloomustab seda valu, paistetus, soojus ja punetus mõjutatud piirkonnas. Kemikaalid, mis on tuntud kui tsütokiinid ja prostaglandiinid, kontrollivad seda protsessi ning need vabanevad järjestatud ja isepiiravas kaskaadis verre või mõjutatud kudedesse. See kemikaalide vabanemine suurendab verevoolu kahjustuse või infektsiooni piirkonda ning selle tulemusel võib tekkida punetus või soojus. Osad kemikaalid põhjustavad vedeliku leket kudedesse, mille tulemuseks on paistetus. See kaitsev protsess võib stimuleerida närve ja põhjustada valu. Need muutused töötavad organismi kasuks, kui need toimuvad piiratud ajavahemiku jooksul asjakohases piirkonnas.

- 10 **[0024]** Autoimmuun- ja/või põletikuliste häirete korral käivitab immuunsüsteem põletikulise reaktsiooni, kui puuduvad võõrained, millega võidelda, ning organismi normaalne kaitsev immuunsüsteem põhjustab kahjustusi iseenda kudedele, rünnates ekslikult iseennast. Olemas on palju erinevaid autoimmuunhäireid, mis mõjutavad organismi erinevatel viisidel. Näiteks hulgiskleroosi all kannatavatel patsientidel on mõjutatud aju, Crohni tõve all kannatavatel indiviididel soolestik ning reumatoidartriidi all kannatavatel indiviididel erinevate liigeste liigesevõie, luu ja kõhr. Autoimmuunhäirete süvenedes võib tagajärg olla ühte või mitut tüüpi kehakudede hävimine, elundi ebanormaalne kasv või muutused elundi funktsioonis. Autoimmuunhäire võib mõjutada ainult ühte elundit või koetüüpi või see võib mõjutada mitut elundit ja kude.
- 20 Autoimmuunhäirete poolt tavaliselt mõjutatud elundite ja kudede hulka kuuluvad punased vererakud, veresooned, sidekoed, endokriinsed näärmed (näiteks kilpnääre või kõhunääre), lihased, liigesed ja nahk. Autoimmuunhäirete näidete hulka kuuluvad mittepiiravalt Hashimoto türeoidiit, pernitsioosne aneemia, Addisoni tõbi, 1. tüüpi diabeet, reumatoidartriit, süsteemne erütematoosluupus, dermatomüosiit, Sjögreni sündroom, dermatomüosiit, erütematoosluupus, hulgiskleroos, autoimmuunne sisekõrva haigus, generaliseerunud müasteenia, Reiteri sündroom, Gravesi tõbi, autoimmuunne hepatiit, perekondlik adenomatoosne polüpoos ja haavandiline koliit.

- 30 **[0025]** Reumatoidartriit (RA) ja juveniilne reumatoidartriit on põletikulise artriidi tüübid. Artriit on üldine mõiste, mis kirjeldab liigestes esinevat põletikku. Osad, kuid mitte kõik artriidi tüübid on valesti suunatud põletiku tagajärg. Lisaks reumatoidartriidile kuuluvad teiste põletikuga seotud artriidi tüüpide hulka järgmised: psoriaatiline artriit, Reiteri sündroom, anküloseeriv spondüliit, artriit ja podagra. Reumatoidartriit on kroonilist tüüpi

artriit, mida esineb keha mõlema poole liigestes (näiteks mõlema käe, randme või põlve liigestes). See sümmeetria aitab eristada reumatoidartriiti teistest artriidi tüüpidest. Lisaks liigeste mõjutamisele võib reumatoidartriit aeg-ajalt mõjutada ka nahka, silmi, kopsusid, südant, verd või närve.

5

[0026] Reumatoidartriit mõjutab ligikaudu 1% maailma elanikkonnast ja see on potentsiaalselt sandistav. USA-s on ligikaudu 2,9 miljonit reumatoidartriidi juhtu. Naised on sellest mõjutatud kaks kuni kolm korda rohkem kui mehed. Reumatoidartriit tekib tavaliselt vanuses 25 kuni 50 eluaastat. Juveniilne reumatoidartriit mõjutab 71 000 noort ameeriklast (vanuses 18 ja nooremad), mõjutades tüdrukuid kuus korda sagedamini kui poisse.

[0027] Reumatoidartriit on autoimmuunhäire, kus keha immuunsüsteem tuvastab sobimatult võõrastena sünoovia membraane, mis eritavad liigestes määrdevedelikku. Selle tagajärjel tekib põletik ning liigestes ja nende ümber olevad kõhred ja koed saavad kahjustusi või hävinevad. Rasketel juhtudel ulatub see põletik teistesse liigeste kudedesse ja neid ümbritsevasse kõhre, kus see võib erodeerida või hävitada luukoe ja kõhre ning põhjustada liigeste deformatsiooni. Organism asendab kahjustunud koe armkoega, põhjustades liigeste vahel tavaliselt tühimikke, et need aheneksid, ja luude ühinemist.

20 Reumatoidartriit põhjustab jäikust, paistetust, väsimust, aneemiat, kaalukaotust, palavikku ja sageli halvavat valu. Reumatoidartriidi osade tavaliste sümptomite hulka kuuluvad liigeste jäikus ärkamisel, mis kestab tund aega või kauem; paistetused konkreetsetes sõrme- või randmeliigestes; liigeseid ümbritseva pehmekoe paistetused; ja paistetused mõlemal pool liigest. Paistetust võib esineda koos valuga või ilma selleta ning see võib järk-järgult

25 halveneda või püsida enne süvenemist aastaid samal tasemel.

[0028] Reumatoidartriidi diagnoosimine põhineb mitmete tegurite kombinatsioonil, mille hulka kuuluvad: valulike liigeste konkreetne asukoht ja sümmeetria, hommikune liigestejäikus, nahaaluste muhkude ja mügarate (reumatoidsed mügarad) olemasolu, röntgentestide tulemused, mis viitavad reumatoidartriidi olemasolule ja/või reumatoidfaktori positiivsed tulemused vereproovis. Paljudel, kuid mitte kõigil reumatoidartriidi all kannatavatel inimestel leidub veres reumatoidfaktori antikehi. Reumatoidfaktorit võib esineda inimestel, kelle ei ole reumatoidartriiti. Reumatoidfaktori

tootmist veres võivad põhjustada ka teised haigused. Seetõttu põhineb reumatoidartriidi diagnoosimine mitmete tegurite kombinatsioonil, mitte üksnes reumatoidfaktori olemasolul veres.

- 5 [0029] Haiguse tüüpiline kulg on püsiv, kuid kõikuvate liigeseid puudutavate sümptomitega ning ligikaudu 10 aasta pärast esineb 90% haiguse all kannatajatest luu ja kõhre struktuurilist kahjustust. Väikesel osal selle haiguse all kannatajatest on lühiajaline haigus, mis kaob täielikult, ning teisel väikesel osal on väga raskekujuline haigus, millega kaasnevad paljude liigeste deformatsioon ja aeg-ajalt teised haiguseilmingud. Põletikuline protsess põhjustab liigestes oleva luukoe ja kõhre erosiooni või hävimist. Reumatoidartriidi korral esineb püsiva antigeeni esitlemise, T-rakkude stimuleerimise, tsütokiinide eritamise, sünoovia rakkude aktivatsiooni ja liigese hävitamise autoimmuunse tsükkel. See haigus avaldab olulist mõju nii indiviidile kui ka ühiskonnale, põhjustades märkimisväärset valu, kahjustunud funktsioone ja töövõimetust ning miljonite dollarite kulutamist ravikuludele ja kaotatud palkadele. (Vt näiteks NIH-i veebilehte ja NIAID veebilehte.)

- [0030] Praegu kättesaadav artriidiravi keskendub liigeste põletiku vähendamisele põletikuvastaste ja immunosupressiivsete ravimitega. Mis tahes artriidiravi esimene liin on tavaliselt põletikuvastased ravimid, näiteks aspiriin, ibuprofeen ja Cox-2 inhibiitorid, näiteks tselekoksiib ja rofekoksiib. „Teise liini ravimite” hulka kuuluvad kuld, metotreksaat ja steroidid. Kuigi need on laialdaselt tunnustatud ravimeetodid artriidi ravimiseks, taandub haigus üksnes nende raviliinide toimel väga vähestel patsientidel. Hiljutised edusammud reumatoidartriidi patogeneesi mõistmisel on viinud metotreksaadi kasutamiseni tsütokiinide või rekombinantsete lahustuvate retseptorite antikehadega kombineeritult. Näiteks on artriidi ravimisel kasutatud kasvaja nekroosifaktori (TNF)- α rekombinantseid lahustuvaid retseptoreid metotreksaadiga kombineeritult. Kuid üksnes 50% metotreksaadi ja TNF- α vastaste ainete, näiteks TNF- α rekombinantsete lahustuvate retseptorite kombinatsiooniga ravitud patsientidest näitab kliiniliselt olulist paranemist. Paljud patsiendid jäävad ravist hoolimata sellele raskesti alluvateks. Reumatoidartriidi all kannatavate patsientide puhul esineb endiselt keerulisi raviprobleeme. Paljude praeguste ravimeetodite korral esineb palju kõrvalmõjusid või need ei suuda haiguse süvenemist täielikult ennetada. Siiaamaani ei ole ükski ravimeetod ideaalne ning sellel haigusel puudub

ravi. Reumatoidartriidi ja teiste autoimmuunhäirete tõhusamaks ravimiseks on vaja uudseid ravimeid.

2.2.3. ALLERGIA

- 5 [0031] Immuunsüsteemi vahendatud allergilised (ülitundlikkuse) reaktsioonid on liigitatud nelja tüüpi (I–IV) vastavalt aluseks olevatele mehhanismidele, mis põhjustavad allergiliste sümptomite avaldumist. I tüüpi allergilisi reaktsioone iseloomustab IgE vahendatud vasoaktiivsete ainete, näiteks histamiini vabanemine nuumrakkudest ja basofiilidest. Nende ainete vabanemise ja sellele järgneva allergiliste sümptomite
- 10 ilmnemise käivitab allergeeniga seotud IgE ristsidumine selle retseptoriga nuumrakkude ja basofiilide pinnal. Indiviidide puhul, kes kannatavad I tüüpi allergiliste reaktsioonide all, põhjustab allergeeniga teist korda kokku puutumine selle allergeeni suhtes spetsiifiliste IgE antikehade kõrgete tasemete tootmist B- ja T-mälurakkude IgE tootmiseks vajaliku kolme raku interaktsiooni kaasamise tagajärjel. Toodetud IgE
- 15 antikehade kõrged tasemed põhjustavad nuumrakkudel ja basofiilidel olevate IgE retseptorite ristsidumise suurendamist allergeeniga seotud IgE poolt, mis omakorda põhjustavad nende rakkude aktivatsiooni ja farmakoloogiliste vahendajate vabastamist, mis vastutavad I tüüpi allergiliste haiguste kliiniliste ilmingute eest.
- 20 [0032] On tuvastatud kaks retseptorit, millel on erinevad afiinsused IgE suhtes, ja neid iseloomustatud. Kõrge afiinsusega retseptorit (FcεRI) ekspresseeritakse nuumrakkude ja basofiilide pinnal. Madala afiinsusega retseptorit (FcεRII/CD23) ekspresseeritakse paljudel rakutüüpidel, sealhulgas B-rakkudel, T-rakkudel, makrofaagidel, eosinofiilidel ja Langerhani rakkudel. Kõrge afiinsusega IgE retseptor koosneb kolmest alamüksusest
- 25 (alfa-, beeta- ja gamma-ahelast). Mitmed uuringud demonstreerivad, et IgE sidumisel osaleb üksnes alfa-ahel, samas kui beeta- ja gamma-ahelat (mis on transmembraansed või tsütoplasmaatilised valgud) on vaja signaaliülekanne sündmuste jaoks. IgE struktuuride tuvastamine, mida on vaja IgE seondumiseks FcεRI-ga nuumrakkudel ja basofiilidel, on IgE vahendatud allergiate ravimiseks või ennetamiseks mõeldud strateegiate
- 30 kavandamisel kõige olulisem. Näiteks võib IgE retseptori sidumissaidi selgitamine

põhjustada peptiidide või väikeste molekulide tuvastamist, mis blokeerivad IgE seondumist retseptorit kandvate rakkudega *in vivo*.

5 [0033] Praegu ravitakse IgE vahendatud allergilisi reaktsioone ravimite, näiteks antihistamiinide ja kortikosteroididega, mis üritavad leevendada allergiliste reaktsioonidega seotud sümptomeid nuumrakkudest ja basofiilidest vabanenud vasoaktiivsete ainete mõjude takistamise teel. Antihistamiinide ja kortikosteroidide kõrgetel annustel on kahjulikud kõrvalmõjud (näiteks kesknärvisüsteemi häirimine, kõhukinnisus jne). Seega on I tüüpi allergiliste reaktsioonide ravimiseks vaja teisi
10 meetodeid.

[0034] Üks lähenemisviis I tüüpi allergiliste häirete ravimisele on olnud monoklonaalsete antikehade tootmine, mis reageerivad lahustuva (vaba) IgE-ga seerumis, blokeerivad IgE seondumist selle nuumrakkudel ja basofiilidel oleva retseptoriga ning ei seonu
15 retseptoriga seotud IgE-ga (st need on mitteanafülaktogeensed). Kaks sellist monoklonaalset antikeha on IgE vahendatud allergiliste reaktsioonide ravimiseks kliiniliste uuringute lõppfaasis (vt näiteks Chang, T.W., 2000, *Nature Biotechnology* 18: 157–162).

20 [0035] Üks kõige paljulubavamaid ravimeetodeid IgE vahendatud allergiliste reaktsioonide ravimiseks on aktiivne immuniseerimine endogeensel IgE-l olevate asjakohaste mitteanafülaktogeensete epitoopide vastu. Stanworth *et al.* (USA patent nr 5 601 821) on kirjeldanud strateegiat, mis hõlmab heteroloogilise kandurvalguga seotud inimese IgE C ϵ H4 domeenist tuletatud peptiidi kasutamine allergia vaktsiinina.
25 Kuid see peptiid ei ole näidanud antikehade tootmise esile kutsumist, mis reageerivad loodusliku lahustuva IgE-ga. Lisaks pakkus Hellman (USA patent nr 5 653 980) välja IgE vastased vaktsiini kompositsioonid, mis põhinevad täispikkuses C ϵ H2-C ϵ H3 domeenidel (ligikaudu 220 aminohappe pikkused), mis on ühendatud võõra kandevalguga. Kuid antikehad, mida kutsuvad esile Hellmani välja pakutud IgE vaktsiini kompositsioonid,
30 põhjustavad kõige tõenäolisemalt anafülaksiat, kuna IgE molekuli C ϵ H2 ja C ϵ H3 domeenide teatavate osade vastu suunatud antikehad on näidanud nuumrakkude ja basofiilide pinnal oleva IgE retseptori ristsidumist ja põhjustanud anafülaksia vahendajate tootmist (vt näiteks Stadler *et al.*, 1993, *Int. Arch. Allergy and Immunology* 102: 121–

126). Seega on endiselt olemas vajadus IgE vahendatud allergiliste reaktsioonide ravimeetodite järele, mis ei kutsu esile anafülaktilisi antikehi.

[0036] Märkimisväärne mure seoses anafülaksia esile kutsumisega on andnud tulemuseks teise I tüüpi allergiliste reaktsioonide ravimise lähenemisviisi väljatöötamise, mis hõlmab mimotoope, mis võivad loomadele manustamise korral kutsuda esile IgE vastaste polükloonaalsete antikehade tootmist (vt näiteks Rudolf *et al.*, 1998, *Journal of Immunology* 160: 3315–3321). Kricek *et al.* (rahvusvaheline publikatsioon nr WO 97/31948) sõelusid faagidisplei peptiidi kogusid monoklonaalse antikehaga BSWI7, et tuvastada peptiidi mimotoope, mis võivad matkida IgE retseptori sidumise konformatsiooni. Neid mimotoope võib arvatavasti kasutada polükloonaalsete antikehade esile kutsumiseks, mis reageerivad vaba loodusliku IgE-ga, kuid mitte retseptoriga seotud IgE-ga, ning blokeerivad IgE seondumist selle retseptoriga. Kriek *et al.* avaldasid mimotoobid, mis ei ole homoloogsed IgE molekuli ühegi osaga ning seega erinevad leiutises avaldatud peptiididest.

[0037] Tehnika tasemes läbi viidud uuringust ilmnes, et endiselt on olemas vajadus häirete, näiteks vähi, autoimmuunhaiguse, põletikulise häire või allergia ravimise või ennetamise olemasolevate meetodite terapeutilise tõhususe parandamise järele. Eelkõige on olemas vajadus vähiravis kasutatavate terapeutiliste antikehade efektorfunktsiooni, eelkõige tsütotoksilise mõju parandamise järele. Praeguses tehnika tasemes esineb ka puudujääke allergiliste häirete ravimises või ennetamises (näiteks antikeha teraapia või vaktsiini teraapia abil).

25 **3. LEIUTISE OLEMUS**

[0038] Fc γ RIIA ja Fc γ RIIB rakuvälised domeenid on 95% ulatuses identsed ja seega on neil palju ühiseid epitoope. Kuid Fc γ RIIA ja Fc γ RIIB näitavad väga erinevaid aktiivsusi. Fundamentaalne erinevus seisneb selles, et Fc γ RIIA algatab rakusisese signaliseerimise, mis põhjustab raku aktivatsiooni, näiteks fagotsütoosi ja oksüdatiivse purskeni, samas kui Fc γ RIIB algatab inhibeerivaid signaale. Võttes arvesse nende erinevat aktiivsust ja rolli immuunreaktsioonide moduleerimisel, on vaja selliseid antikehi, mis tunnevad ära

looduslikku Fc γ RIIB-d, kuid mitte looduslikku Fc γ RIIA-d. Leiutis põhineb osaliselt selliste Fc γ RIIB-spetsiifiliste antikehade avastusel.

[0039] Määratletud patendinõudluse kohaselt esitatakse leiutisega isoleeritud antikeha või selle antigeeni siduv fragment, kus nimetatud isoleeritud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment seob spetsiifiliselt loodusliku inimese Fc γ RIIB rakuvälist domeeni suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment seob loodusliku inimese Fc γ RIIA-d, ning kus:

i) nimetatud antikeha on 8B5.3.4 antikeha, mida toodab hübriidoomi rakuliin, millel on ATCC registreerimisnumber PTA-7610; või

ii) nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni, mille aminohappejärjestus on SEQ ID NO: 4, ja kerge ahela varieeruvat domeeni, millel on aminohappejärjestus SEQ ID NO: 3; või

iii) nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment sisaldab hübriidoomi klooni 8B5.3.4 (ATCC registreerimisnumber PTA-7610) poolt toodetud antikeha kuut CDR-i, nimetatud kuuel CDR-il on aminohappejärjestused SEQ ID NO: 5–10, kus nimetatud antikeha või antigeeni siduv fragment seondub Fc γ RIIB sama epitoobiga, mida tunneb ära hübriidoomi klooni 8B5.3.4, millel on ATCC registreerimisnumber PTCA-7610, poolt toodetud antikeha ning konkureerib nimetatud antikehaga 8B5.3.4 loodusliku inimese Fc γ RIIB-ga seondumise osas, ning kus nimetatud antikehal või nimetatud antigeeni siduval fragmendil on dissotsiatsioonikonstant K_d (K_{off}/K_{on}), mis on väiksem kui 5×10^{-9} M pinnaplasmonresonantsiga kindlaks määratu kohaselt. Patendinõudluses määratletu kohaselt pakutakse leiutises ka farmatseutilist kompositsiooni, mis sisaldab (i) terapeutiliselt efektiivses koguses isoleeritud antikeha või selle antigeeni siduvat fragmenti vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1–12; ja (ii) farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat. Leiutiskirjeldus puudutab isoleeritud antikeha või selle fragmenti, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d, eelkõige inimese Fc γ RIIB-d, konkreetsemalt looduslikku inimese Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d, eelkõige inimese Fc γ RIIA-d, konkreetsemalt looduslikku inimese Fc γ RIIA-d. Patendinõudluses määratletu kohaselt seovad leiutisekohased antikehad loodusliku inimese Fc γ RIIB rakuvälist

domeeni. Teatavates leiutisekohastes teostustes, mis kuuluvad määratletud patendiõudluse ulatusse, seob antikeha või selle fragment Fc γ RIIB-d vähemalt kaks korda suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d. Teistes leiutisekohastes teostustes, mis kuuluvad määratletud patendiõudluse ulatusse, seob antikeha või selle fragment Fc γ RIIB-d vähemalt 4 korda, vähemalt 6 korda, vähemalt 8 korda, vähemalt 10 korda, vähemalt 100 korda, vähemalt 1000 korda, vähemalt 10⁴, vähemalt 10⁵, vähemalt 10⁶, vähemalt 10⁷, vähemalt 10⁸ korda suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d. Ühes eelistatud teostuses, mis kuulub määratletud patendiõudluse ulatusse, seob nimetatud antikeha või selle fragment Fc γ RIIB-d 100 korda, 1000 korda, 10⁴ korda, 10⁵ korda, 10⁶ korda, 10⁷ korda või 10⁸ korda suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d. Eelistatult on nimetatud sidumisafiinsused määratud kindlaks monomeerse IgG ja mitte agregeerunud IgG-ga ning sidumine toimub varieeruva domeeni kaudu (näiteks antikehade Fab fragmentide kaudu, millel on sidumisomadused, mis sarnanevad täispikkuses immunoglobuliini molekuli omadega).

[0040] Leiutis käsitleb patendiõudluses määratletu kohaselt isoleeritud antikeha või selle fragmenti, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d vastavalt mis tahes tehnika tasemes tuntud spetsiifilisuste hindamiseks kasutatava standardse meetodi abil kindlaks määratule. Leiutis käsitleb vastavalt patendiõudluses määratletule isoleeritud antikeha või selle fragmenti, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d vastavalt näiteks immunoblot-, BIAcore või radioimmuunanalüüsi abil kindlaks määratule. Leiutiskirjeldus käsitleb isoleeritud antikeha või selle fragmenti, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d vastavalt ELISA analüüsi abil kindlaks määratule Fc γ RIIB sidumise suhtes lineaarses vahemikus. Ühel juhul käsitleb leiutiskirjeldus isoleeritud antikeha või selle fragmenti, mis seob spetsiifiliselt imetaja süsteemis toodetud Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d vastavalt ELISA analüüsi abil kindlaks määratule.

5 [0041] Ühel konkreetsel juhul käsitleb leiutus isoleeritud antikeha või selle fragmenti, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d, ning nimetatud antikeha konstantsel domeenil on lisaks parem afiinsus vähemalt ühe või mitme Fc aktivatsioonireseptori suhtes. Veel ühel teisel konkreetsel juhul on nimetatud Fc aktivatsioonireseptor Fc γ RIII.

10 [0042] Ühel juhul blokeerib nimetatud antikeha või selle fragment Fc γ RIIB IgG sidumissaiti ning blokeerib agregeerunud märgistatud IgG-de seondumist Fc γ RIIB-ga, näiteks ELISA blokeerimise analüüsis. Ühel konkreetsel juhul blokeerib nimetatud antikeha või selle fragment agregeerunud märgistatud IgG-de sidumist ELISA blokeerimise analüüsis vähemalt 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% või 99,9%. Veel ühel teisel konkreetsel juhul blokeerib nimetatud antikeha või selle fragment täielikult nimetatud agregeerunud märgistatud IgG sidumise nimetatud ELISA analüüsis.

15 [0043] Ühel teisel juhul blokeerib nimetatud antikeha või selle fragment Fc γ RIIB IgG sidumissaiti ning blokeerib agregeerunud märgistatud IgG seondumist Fc γ RIIB-ga vastavalt kahekordse värvimisega FACS analüüsi abil kindlaks määratule.

20 [0044] Leiutiskirjeldus hõlmab antikehade kasutamist, mis moduleerivad (st agoniseerivad või antagoniseerivad) Fc γ RIIB aktiivsust. Ühel juhul agoniseerivad leiutisekohased antikehad Fc γ RIIB vähemalt ühte aktiivsust, st kutsuvad esile signaliseerimist. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, võivad leiutisekohased agonistlikud antikehad matkida Fc γ RIIB koondumist, mis põhjustab Fc γ R ligeerimise suhtes aktiveerimisreaktsiooni summutamist ja rakkude reageerimisvõime inhibeerimist.

25 [0045] Ühel teisel juhul antagoniseerivad leiutisekohased antikehad Fc γ RIIB vähemalt ühte aktiivsust, st blokeerivad signaliseerimist. Näiteks blokeerivad leiutisekohased antikehad agregeerunud IgG-ide seondumist Fc γ RIIB-ga.

30

[0046] Leiutiskirjelduses pakutakse antikehi, mis inhibeerivad Fc ϵ RI poolt esile kutsutud nuumrakkude aktivatsiooni. Leiutiskirjelduses pakutakse lisaks Fc γ RIIB vastaseid antikehi, mis inhibeerivad Fc γ RIIA vahendatud makrofaagide aktivatsiooni

monotsüütsetes rakkudes. Leiutiskirjelduses pakutakse ka Fc γ RIIB vastaseid antikehi, mis inhibeerivad B-rakkude retseptori vahendatud signaliseerimist.

[0047] Ühel konkreetsel juhul blokeerivad Fc γ RIIB vastased antikehad Fc γ RIIB ligandi sidumissaiti. Ühel edasisel spetsiifilisel juhul võib blokeerimise aktiivsus blokeerida immuunkompleksi käivitatud aktivatsiooni negatiivset regulatsiooni ja sellest tulenevalt parandada immuunreaktsiooni. Ühel edasisel juhul on immuunreaktsiooni paranemine antikehast sõltuva rakulise reaktsiooni suurenemine. Ühel teisel juhul blokeerivad leiutisekohased Fc γ RIIB vastased antikehad Fc γ RIIB retseptorite ristsidumist B-rakkude ja/või Fc retseptoritega, põhjustades B-rakkude, nuumrakkude, dendriitrakkude või makrofaagide aktivatsiooni.

[0048] Samuti on avaldatud leiutisekohaste antikehade või nende fragmentide tootmise meetodid, eelkõige uudsete monoklonaalsete antikehade („MAB”) tootmiseks, millel on Fc γ RIIB suhtes kõrgem spetsiifilisus kui Fc γ RIIA suhtes. Leiutisekohaseid antikehi või nende fragmente võib toota mis tahes tehnika tasemes tuntud antikehade tootmiseks kasutatava meetodi abil, eelkõige kasvatatud hübriidoomi rakkudest eritamise, keemilise sünteesi või tehnika tasemes tuntud rekombinantsete ekspressioonitehnikate abil. Üks aspekt käsitleb Fc γ RIIB-spetsiifilise antikeha rekombinantse tootmise meetodit, kus nimetatud meetod hõlmab järgnevat: (i) tingimustes, mis sobivad nimetatud antikeha ekspressiooniks söötmes, kasvatatakse peremeesrakku, mis sisaldab esimest nukleiinhappe molekuli, mis on toimivalt seotud heteroloogilise promootoriga, ja teist nukleiinhappe molekuli, mis on toimivalt seotud sama või erineva heteroloogilise promootoriga, nimetatud esimene nukleiinhape ja teine nukleiinhape kodeerivad vastavalt antikeha või selle fragmendi rasket ahelat ja kergelt ahelat, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d; ning (ii) nimetatud antikeha taastatakse nimetatud söötimest. Teine aspekt on Fc γ RIIB monoklonaalsete antikehade tootmise meetod, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d, eelkõige inimese Fc γ RIIB-d, suurema afiinsusega, kui nimetatud monoklonaalsed antikehad seovad Fc γ RIIA-d, eelkõige inimese Fc γ RIIA-d, kus nimetatud meetod hõlmab järgnevat: (a) üks või mitu Fc γ RIIA transgeenset hiirt immuniseeritakse puhastatud Fc γ RIIB või selle immunogeense fragmendiga; (b) nimetatud ühe või mitme hiire põrnarakkudest toodetakse hübriidoomi rakuliinid; (c) nimetatud hübriidoomi rakuliine

sõelutakse ühe või mitme hübriidoomi rakuliini osas, mis toodavad antikehi, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui need antikehad seovad Fc γ RIIA-d. Samuti on kirjeldatud Fc γ RIIB monoklonaalsete antikehade tootmise meetodit, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d, eelkõige inimese Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui

5 nimetatud monoklonaalsed antikehad seovad Fc γ RIIA-d, eelkõige inimese Fc γ RIIA-d, kus nimetatud meetod hõlmab järgnevat: (a) üks või mitu Fc γ RIIA transgeenset hiirt immuniseeritakse puhastatud Fc γ RIIB või selle immunogeense fragmendiga; (b) nimetatud hiirtele tehakse võimendav immuniseerimine ajavahemikuks, mis on piisav, et kutsuda esile immuunreaktsiooni; (c) nimetatud ühe või mitme hiire põrnarakkudest

10 toodetakse hübriidoomi rakuliinid; (d) nimetatud hübriidoomi rakuliine sõelutakse ühe või mitme hübriidoomi rakuliini osas, mis toodavad antikehi, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui need antikehad seovad Fc γ RIIA-d. Eelistatult tehakse nimetatud hiirtele võimendavat immuniseerimist vähemalt neli korda neljakuulise ajavahemiku jooksul. Hiiri võib immuniseerida puhastatud Fc γ RIIB-ga, mis on segatud

15 tehnika tasemes tuntud adjuvantidega, et parandada nimetatud hiirte immuunreaktsiooni. Immunogeenne fragment võib olla Fc γ RIIB lahustuv rakuväline domeen. Hübriidoomi rakuliinide sõelumiseks võib kasutada tehnika tasemes tuntud standardseid tehnikaid (näiteks ELISA).

20 **[0049]** Teatud leiutisekohastes teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, on Fc γ RIIB vastased antikehad monoklonaalsed antikehad, sünteetilised antikehad, rekombinantselt toodetud antikehad, multispetsiifilised antikehad, inimese antikehad, kimäärsed antikehad, kameliseeritud antikehad, üheaheelalised Fv-d (scFv), üheaheelalised antikehad, Fab fragmendid, F(ab') fragmendid, disulfiidseotud Fv-d (sdFv),

25 intrakehad või mis tahes eespool nimetatute epitoopi siduvad fragmendid.

[0050] Eelistatult on leiutisekohased antikehad monoklonaalsed antikehad ja enam eelistatult humaniseeritud või inimese antikehad. Patendinõudluses määratletu kohaselt seonduvad leiutisekohased antikehad loodusliku inimese Fc γ RIIB rakuvälise domeeniga.

30 Teatavatel juhtudel tunnevad siin avaldatud antikehad spetsiifiliselt või selektiivselt ära Fc γ RIIB, eelkõige loodusliku inimese Fc γ RIIB ühte või mitut epitoopi. Faagidisplei tehnoloogiat on kirjeldatud selleks, et suurendada leiutisekohaste antikehade afiinsust Fc γ RIIB suhtes. Mis tahes tehnika tasemes tuntud sõelumismeetodit võib kasutada selleks,

et tuvastada mutantseid antikehi, millel on suurenenud aviidsus Fc γ RIIB suhtes (näiteks ELISA). Leiutisekohaste antikehade sõelumiseks võib kasutada tehnikat tasemes hästi tuntud antikehade sõelumise analüüsi (näiteks BIACORE analüüsi), et tuvastada antikehi, mille K_{off} kiirus on väiksem kui $3 \times 10^{-3} s^{-1}$.

5

[0051] Ühes eelistatud teostuses pakutakse leiutises monoklonaalset antikeha, mis on toodetud hübriidoomi klooni 8B5.3.4 poolt, millel on ATCC registreerimisnumber PTA-7610, või selle kimäärseid, humaniseeritud või muul viisil töödeldud versioone. Ühel teisel juhul pakutakse leiutiskirjelduses monoklonaalset antikeha, mis on toodetud kloonide 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 ja 1F2 poolt, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959, või selle kimäärseid, humaniseeritud või muul viisil töödeldud versioone. Ühes teises teostuses pakutakse leiutises vastavalt patendinõudluses määratletule isoleeritud antikeha või selle fragmenti, mis konkureerib sidumise osas monoklonaalse antikehaga, mis on toodetud klooni 8B5.3.4 poolt ja seob looduslikku inimese Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob looduslikku inimese Fc γ RIIA-d, ning seondub Fc γ RIIB sama epitoobiga nagu kloonist 8B5.3.4 toodetud monoklonaalne antikeha ja seob Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d. Lisaks pakutakse leiutiskirjelduses hübriidoomi rakuliini 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959. Ühel konkreetsel juhul pakutakse leiutiskirjelduses 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2 antikeha või selle kimäärse, humaniseeritud või muul viisil töödeldud versioonide kasutamist B-rakulise pahaloomulise kasvaja või selle ühe või mitme sümptomi ennetamiseks, ravimiseks, kontrolli all hoidmiseks või paremaks muutmiseks. Ühes konkreetses teostuses, mis kuulub määratletud patendinõudluse ulatusse, hõlmab töödeldud versioon ühte või mitut mutatsiooni Fc piirkonnas. Nimetatud üks või mitu mutatsiooni Fc piirkonnas võivad anda tulemuseks antikeha, millel on muudetud antikeha vahendatud efektorfunktsioon, muudetud seondumine teiste Fc retseptoritega (näiteks Fc aktivatsioonireseptoritega), muudetud ADCC aktiivsus või muudetud C1q sidumisaktiivsus või muudetud komplemendist sõltuva tsütotoksilisuse aktiivsus või nende mis tahes kombinatsioon. Ühes eelistatud teostuses sisaldab humaniseeritud 8B5.3.4 antikeha raske ahela

30

varieeruvad domeeni aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 4, ja kerge ahela varieeruvad domeeni aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 3. Ühes teises eelistatud teostuses on humaniseeritud 8B5.3.4 antikeha raske ahela Fc domeeni töödeldud selliselt, et see sisaldab vähemalt ühte aminohappe asendust positsioonis 240, 243, 247, 255, 270, 292, 300, 316, 370, 392, 396, 416, 419 või 421 teise aminohappega selles positsioonis. Ühes enam eelistatud teostuses on humaniseeritud 8B5.3.4 antikeha raske ahela Fc domeenil leutsiin positsioonis 247, lüsiin positsioonis 421 ja glutamiinhape positsioonis 270; treoniin positsioonis 392, leutsiin positsioonis 396 ja glutamiinhape positsioonis 270; või glutamiinhape positsioonis 270, asparagiinhape positsioonis 316 ja glütsiin positsioonis 416. Teatavates leiutisekohastes teostustes ei ole nimetatud antikeha hübriidoomi kloonid 8B5.3.4 poolt toodetud monoklonaalne antikeha või selle kimäärsed, humaniseeritud või muul viisil töödeldud versioonid.

[0052] Teatud leiutisekohastes teostustes, mis kuuluvad määratletud patendiõudluse ulatusse, pakutakse humaniseeritud 8B5.3.4 antikehi, nimetatud humaniseeritud 8B5.3.4 antikehad sisaldavad raske ahela varieeruvat domeeni aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 4, ja kerge ahela varieeruvat domeeni aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 3, kus humaniseeritud 8B5.3.4 antikeha raske ahela Fc domeenil on leutsiin positsioonis 247, lüsiin positsioonis 421 ja glutamiinhape positsioonis 270; või glutamiinhape positsioonis 270, asparagiinhape positsioonis 316 ja glütsiin positsioonis 416.

[0053] Leiutiskirjeldus hõlmab ka polünukleotiide, mis kodeerivad leiutisekohaseid antikehi. Ühel juhul pakutakse leiutiskirjelduses isoleeritud nukleiinhappejärjestust, mis kodeerib antikeha või selle fragmendi rasket ahelat või kerget ahelat, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d. Leiutiskirjeldus käsitleb ka nimetatud nukleiinhapet sisaldavat vektorit. Leiutiskirjelduses pakutakse lisaks vektorit, mis sisaldab esimest nukleiinhappe molekuli, mis kodeerib rasket ahelat, ja teist nukleiinhappe molekuli, mis kodeerib kerget ahelat, nimetatud raske ahel ja kerge ahel kuuluvad antikeha või selle fragmendi juurde, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d. Ühel konkreetsel juhul on nimetatud vektor ekspressioonivektor. Leiutiskirjelduses pakutakse lisaks peremeesrakke, mis sisaldavad leiutisekohaseid antikehi kodeerivaid polünukleotiide või neid sisaldavaid vektoreid. Eelistatult hõlmab

leutiskirjeldus polünukleotiide, mis kodeerivad antikehade raskeid ja kergeid ahelaid, mida toodab hoiustatud hübridoomi kloon 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959, või nende osi, näiteks CDR-
5 e, varieeruvaid domeene jne ja nende humaniseeritud versioone.

[0054] Aktiveerivad ja inhibeerivad Fc retseptorid, näiteks FcγRIIA ja FcγRIIB on kriitilise tähtsusega nende retseptorite tasakaalustatud funktsioneerimise ja sobivate rakkude immuunreaktsioonide jaoks. Leiutiskirjeldus hõlmab leiutisekohaste antikehade
10 kasutamist mis tahes haiguse ravimiseks, mis on seotud sellise tasakaalu ja reguleeritud kontrolli kaotusega Fc retseptori signaalirajas. Seega leiavad leiutisekohased FcγRIIB antikehad kasutust immuunreaktsiooni reguleerimisel, näiteks immuunreaktsiooni inhibeerimisel seoses autoimmuun- või põletikulise haigusega, või allergilise reaktsiooni inhibeerimisel. Leiutisekohaseid FcγRIIB antikehi võib kasutada ka teatavate
15 efektorfunktsioonide muutmiseks, et näiteks parandada terapeutilist antikeha vahendatud tsütotoksilisust.

[0055] Leiutisekohased antikehad on kasulikud vähi ennetamiseks või ravimiseks, näiteks ühes teostuses ühe ainega tehtava ravina. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada
20 melanoomi ravimiseks ja/või ennetamiseks. Antikehad on kasulikud ka vähi ennetamiseks või ravimiseks, eelkõige vähi antigeeni spetsiifiliste tsütotoksilise toimega terapeutiliste antikehade tsütotoksilise toime võimendamisel, et parandada kasvajarakkude tapmist, ja/või terapeutiliste antikehade ADCC, CDC või fagotsütoosi parandamisel. Kirjeldatud on vähi ravimise meetodit patsiendil, kellel on vähk, mida iseloomustab vähi antigeen;
25 nimetatud meetod hõlmab nimetatud patsiendile terapeutiliselt efektiivses koguses esimese antikeha või selle fragmendi manustamist, mis seob spetsiifiliselt FcγRIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob FcγRIIA-d, ja teise antikeha manustamist, mis seob spetsiifiliselt nimetatud vähi antigeeni ja on tsütotoksiline. Samuti pakutakse vähi ravimise meetodit patsiendil, kellel on vähk, mida
30 iseloomustab vähi antigeen; nimetatud meetod hõlmab nimetatud patsiendile terapeutiliselt efektiivses koguses antikeha või selle fragmendi manustamist, mis seob spetsiifiliselt FcγRIIB-d, eelkõige looduslikku inimese FcγRIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob FcγRIIA-d, eelistatult looduslikku inimese

Fc γ RIIA-d, ja mille konstantsel domeenil on lisaks suurem afiinsus ühe või mitme Fc aktivatsioonireseptori, näiteks Fc γ RIIA suhtes, kui nimetatud antikeha on monomeerne, ning antikeha manustamist, mis seob spetsiifiliselt nimetatud vähi antigeeni ja on tsütotoksiline. Nimetatud Fc aktivatsioonireseptor võib olla Fc γ RIIA. Leiutisekohast antikeha võib manustada sellises annuses, et antikeha ei seonu tuvastatavalt neutrofiilidega.

[0056] Leiutisekohased antikehad on samuti kasulikud B-rakuliste pahaloomuliste kasvajate, eelkõige mitte-Hodgkini lümfoomi või kroonilise lümfotsütaarse leukeemia ennetamiseks või ravimiseks. Sellest tulenevalt on kirjeldatud B-rakulise pahaloomulise kasvaja ravimise, kontrolli all hoidmise, ennetamise või paremaks muutmise meetodeid, mis hõlmavad antikehade manustamist, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d ja eelistatult ei seo spetsiifiliselt Fc γ RIIA-d, ning selliste antikehade derivaatide, analoogide ja antigeeni siduvate fragmentide manustamist üksi või ühe või mitme teise raviainega kombineeritult. Konkreetsetel juhtudel on ravialuse vähk raskesti alluv ühele või mitmele standardsele või eksperimentaalsele ravimeetodile, eelkõige rituksaaniga tehtavale ravile. Kirjeldatud meetodeid võib kasutada B-rakuliste haiguste, näiteks B-rakulise kroonilise lümfotsütaarse leukeemia (B-CLL), mitte-Hodgkini lümfoomi, difuusse suurerakulise B-rakulise lümfoomi, difuusse suurerakulise B-rakulise lümfoomi piirkondadega follikulaarse lümfoomi, väikeserakulise lümfotsütaarse lümfoomi, mantelrakulise lümfoomi ja difuusse väikeserakulise lõhustatud rakkudega lümfoomi ravimiseks, kontrolli all hoidmiseks, ennetamiseks või paremaks muutmiseks.

[0057] Fc γ RIIB-spetsiifilise antikeha kasutamine võib olla konjugeeritud raviaine või ravimiga. Raviainete näidete hulka, mida võib Fc γ RIIB antikeha või selle antigeeni siduva fragmendiga konjugeerida, kuuluvad mittepiiravalt tsütokiinid, toksiidid, radioaktiivsed elemendid ja antimetaboliidid.

[0058] Fc γ RIIB-spetsiifilise antikeha kasutamist võib kombineerida B-rakuliste pahaloomuliste kasvajate korral kasutatavate standardsete või eksperimentaalsete ravirežiimidega (näiteks keemiaravi, radioimmunoteraapia või kiiritusraviga). Selline kombineeritud ravi võib parandada standardse või eksperimentaalse ravi tõhusust. Raviainete näidete hulka, mis on eriti kasulikud Fc γ RIIB-spetsiifilise antikeha või selle

antigeeni siduva fragmendiga kombineeritult B-rakuliste pahaloomuliste kasvajate ennetamiseks, ravimiseks, kontrolli all hoidmiseks või paremaks muutmiseks, kuuluvad mittepiiravalt rituksaan, interferoon-alfa ja vähivastased ained. Kemoterapeutikumide hulka, mida võib kasutada Fc γ RIIB-spetsiifilise antikeha või selle antigeeni siduva fragmendiga kombineeritult, kuuluvad mittepiiravalt alküülivad ained, antimetaboliidid, looduslikud tooted ja hormoonid. Kombineeritud ravi võimaldab Fc γ RIIB vastase antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi madalamate annuste ja/või Fc γ RIIB vastase antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi väiksema sagedusega manustamist B-rakulise pahaloomulise kasvaja all kannatavale ravialusele, et saavutada terapeutiline või profülaktiline mõju.

[0059] Fc γ RIIB vastase antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi kasutamine pikendab ravialuse ellujäämist, kellel on diagnoositud B-rakuline pahaloomuline kasvaja.

[0060] Samuti on avaldatud antikeha vahendatud tsütotoksilise mõju parandamise meetod tsütotoksilise antikehaga ravitava ravialusel; nimetatud meetod hõlmab nimetatud patsiendile leiutisekohase antikeha või selle fragmendi manustamist koguses, mis on piisav nimetatud tsütotoksilise antikeha tsütotoksilise mõju parandamiseks. Samuti on avaldatud antikeha vahendatud tsütotoksilise mõju parandamise meetod tsütotoksilise antikehaga ravitava ravialusel; nimetatud meetod hõlmab nimetatud patsiendile leiutisekohase antikeha või selle fragmendi, millel on lisaks parem afiinsus Fc aktivatsioonireseptori suhtes, kui see on monomeerne, manustamist koguses, mis on piisav nimetatud tsütotoksilise antikeha tsütotoksilise mõju parandamiseks. Lisaks on avaldatud meetod, mis hõlmab lisaks ühe või mitme täiendava vähiravimi manustamist.

25

[0061] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada kombineeritult mis tahes terapeutilise antikehaga, mis vahendab selle terapeutilist mõju rakkude tapmise kaudu, et võimendada antikeha terapeutilist toimet. Leiutisekohased antikehad võivad võimendada antikeha terapeutilist toimet antikeha vahendatud efektorfunktsiooni parandamise kaudu. Leiutisekohased antikehad võivad võimendada tsütotoksilise antikeha terapeutilist toimet sihtmärgistatud kasvajarakkude fagotsütoosi ja opsoniseerimise parandamise kaudu. Leiutisekohased antikehad võivad võimendada tsütotoksilise antikeha terapeutilist toimet sihtmärgistatud kasvajarakkude hävitamisel ADCC parandamise kaudu. Teatavatel

asjaoludel võib leiutisekohaseid antikehi kasutada Fc liitvalkudega kombineeritult, et parandada ADCC-d.

5 [0062] Samuti on kirjeldatud leiutisekohaste antikehade kasutamist kombineeritult terapeutilise antikehaga, mis ei vahenda selle terapeutilist mõju rakkude tapmise kaudu, et võimendada antikeha terapeutilist toimet. Avaldatud on leiutisekohaste antikehade kasutamine kombineeritult agonistliku aktiivsusega apoptoosi indutseeriva terapeutilise antikeha, näiteks Fas-i vastase antikehaga. Apoptoosi indutseerivad terapeutilised antikehad võivad olla spetsiifilised mis tahes tehnika tasemes tuntud surmareseptori 10 suhtes apoptootilise raja moduleerimiseks, näiteks TNFR retseptori perekonna liige või TRAIL perekonna liige.

[0063] Leiutisekohased antikehad võivad blokeerida makrofaagide vahendatud kasvajarakkude edasiminekut ja metastaase. Leiutisekohased antikehad on eriti kasulikud 15 tahkete kasvajate ravimisel, mille korral esineb makrofaagide sissetungi. Leiutisekohased antagonistlikud antikehad on eriti kasulikud kasvajarakkude metastaaside kontrolli all hoidmiseks, näiteks vähendamiseks või kõrvaldamiseks, vähendades või kõrvaldades selleks makrofaagide populatsiooni, mis paikneb kasvaja asukohas. Antikehad võivad tõhusalt vähendada või kõrvaldada ka immuunseid efektorrakke, mis ei ole makrofaagid, 20 mis ekspresseerivad Fc γ RIIB-d, näiteks dendriittrakke. Immuunsete efektorrakkude tõhus vähendamine või kõrvaldamine leiutisekohaseid antikehi kasutades võib ulatuda efektorrakkude populatsiooni vähenemiseni 50%, 60%, 70%, 80%, eelistatult 90% ja enim eelistatult 99% võrra. Leiutisekohast antikeha võib manustada sellises annuses, et antikeha ei seonu tuvastatavalt neutrofiilidega.

25

[0064] Leiutisekohased agonistlikud antikehad võivad olla eriti kasulikud mittehematopoeetilist päritolu kasvajate, sealhulgas melanoomirakkude kasvajate ravimiseks.

30 [0065] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada terapeutiliste antikehadega kombineeritult, mis seonduvad immunospetsiifiliselt kasvaja antigeenidega, mida ei ekspresseerita kasvajarakkudel endil, vaid pigem ümbritsevates reaktiivsetes ja kasvajat toetavates, mittepahaloomulistest rakkudes, mis hõlmavad kasvaja stroomat. Eelistatult

kasutatakse leiutisekohast antikeha kombineeritult sellise antikehaga, mis seob immunospetsiifiliselt kasvaja antigeeni fibroblastil, näiteks fibroblasti aktivatsiooni valk (FAP).

5 **[0066]** Kirjeldatud on seda vajaval patsiendil autoimmuunhäire ravimise meetodit; nimetatud meetod hõlmab nimetatud patsiendile terapeutiliselt efektiivses koguses ühe või mitme leiutisekohase antikeha manustamist. Samuti on kirjeldatud seda vajaval patsiendil autoimmuunhäire ravimise meetodit; nimetatud meetod hõlmab lisaks nimetatud patsiendile terapeutiliselt efektiivses koguses ühe või mitme põletikuvastase aine ja/või
10 ühe või mitme immunomoduleeriva aine manustamist.

[0067] Samuti pakutakse seda vajaval patsiendil põletikulise häire ravimise meetodit; nimetatud meetod hõlmab nimetatud patsiendile terapeutiliselt efektiivses koguses ühe või mitme leiutisekohase antikeha manustamist. Samuti on kirjeldatud on seda vajaval
15 patsiendil põletikulise häire ravimise meetodit; nimetatud meetod hõlmab lisaks nimetatud patsiendile terapeutiliselt efektiivses koguses ühe või mitme põletikuvastase aine ja/või ühe või mitme immunomoduleeriva aine manustamist.

[0068] Samuti pakutakse ravialusel vaktsiini kompositsiooni suhtes immuunreaktsiooni
20 parandamise meetodit; nimetatud meetod hõlmab nimetatud ravialusele antikeha või selle antigeeni siduva fragmendi manustamist, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d, ning vaktsiini kompositsiooni manustamist, nii et nimetatud antikeha või selle fragmenti manustatakse koguses, mis on efektiivne nimetatud ravialusel nimetatud vaktsiini kompositsiooni suhtes
25 immuunreaktsiooni parandamiseks. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada vaktsiini kompositsiooni antigeeni(de) vastase humoraalse ja/või rakkude vahendatud reaktsiooni parandamiseks. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud vaktsiinidega kombineeritult. Kirjeldatud on leiutisekohaste antikehade kasutamist konkreetse häire ennetamises või ravis, kus suurendatud immuunreaktsioon konkreetse
30 antigeeni või konkreetsete antigeenide vastu on efektiivne haiguse või häire ravimiseks või ennetamiseks.

[0069] Samuti on kirjeldatud seda vajaval patsiendil IgE vahendatud allergilise häire ravimise või ennetamise meetodit, mis hõlmab nimetatud patsiendile terapeutiliselt efektiivses koguses leiutisekohaste agonistlike antikehade manustamist. Samuti pakutakse seda vajaval patsiendil IgE vahendatud allergilise häire ravimise või ennetamise meetodit, mis hõlmab nimetatud patsiendile leiutisekohaste antikehade manustamist teiste terapeutiliste antikehade või vaktsiini kompositsioonidega kombineeritult, mida kasutatakse IgE vahendatud allergiliste häirete ravimiseks või ennetamiseks.

[0070] Avaldatud on immuunravi parandamise meetod nakkusetekitaja korral, kus leiutisekohaseid antikehi manustatakse patsiendile, kes on juba nakatunud patogeeni, näiteks HIV, HCV või HSV-ga, et parandada nakatunud rakkude opsoniseerimist ja fagotsütoosi.

[0071] Kirjeldatud on kahjustunud apoptoosi vahendatud signaliseerimisega haiguste, näiteks vähi, autoimmuunhaiguste ravimise meetodit. See võib hõlmata puuduliku Fas-i vahendatud apoptoosiga haiguse ravimise meetodit; nimetatud meetod hõlmab leiutisekohase antikeha manustamist Fas-i vastase antikehaga kombineeritult.

[0072] Lisaks on kirjeldatud leiutisekohaste antikehade kasutamist spetsiifiliselt Fc γ RIIB (st Fc γ RIIB ja mitte Fc γ RIIA) olemasolu tuvastamiseks bioloogilises proovis.

[0073] Samuti on avaldatud ravialusel autoimmuunhaiguse diagnoosimise meetod, mis hõlmab järgmist: (i) nimetatud ravialuselt võetud bioloogiline proov viiakse kokku efektiivses koguses leiutisekohase antikehaga; ja (ii) tuvastatakse nimetatud antikeha või selle fragmendi sidumine, kus nimetatud tuvastatava markeri tuvastamine üle tausta või standardse taseme näitab, et nimetatud ravialusel on autoimmuunhaigus.

[0074] Leiutises pakutakse lisaks patendinõudluses määratletu kohaselt farmatseutilist kompositsiooni, mis sisaldab (i) terapeutiliselt efektiivses koguses antikeha või selle fragmenti, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d; ja (ii) farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat. Teatavates leiutisekohastes teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, pakutakse farmatseutilist kompositsiooni, mis sisaldab (i) terapeutiliselt

efektiivses koguses antikeha või selle fragmenti, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d; (ii) tsütotoksilist antikeha, mis seob spetsiifiliselt vähi antigeeni; ja (iii) farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat.

5

[0075] Teatavatel juhtudel on kirjeldatud farmatseutilisi kompositsioone, mis on mõeldud kasutamiseks leiutisekohaste meetodite kohaselt; nimetatud farmatseutilised kompositsioonid sisaldavad Fc γ RIIB vastast antikeha või selle antigeeni siduvat fragmenti koguses, mis on efektiivne B-rakulise pahaloomulise kasvaja või selle ühe või mitme sümptomi ennetamiseks, ravimiseks, kontrolli all hoidmiseks või paremaks muutmiseks, ja farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat. Samuti pakutakse farmatseutilisi kompositsioone, mis on mõeldud kasutamiseks leiutisekohaste meetodite kohaselt; nimetatud farmatseutilised kompositsioonid sisaldavad Fc γ RIIB vastast antikeha või selle antigeeni siduvat fragmenti, profülaktilist või raviainet, mis ei ole Fc γ RIIB antagonist, ja farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat.

10
15

3.1. Definitsioonid

[0076] Väljend „seondub spetsiifiliselt Fc γ RIIB-ga” ja analoogsed väljendid viitavad antikehadele või nende fragmentidele (või mis tahes muudele Fc γ RIIB-d siduvatele molekulidele), mis seonduvad spetsiifiliselt Fc γ RIIB või selle fragmendiga ja ei seondu spetsiifiliselt teiste Fc retseptorite, eelkõige Fc γ RIIA-ga. Lisaks on valdkonna asjatundjale arusaadav, et antikeha, mis seondub spetsiifiliselt Fc γ RIIB-ga, võib siduda antikeha varieeruva domeeni või konstantse domeeni kaudu. Kui antikeha, mis seondub spetsiifiliselt Fc γ RIIB-ga, seondub selle varieeruva domeeni kaudu, siis on valdkonna asjatundjale arusaadav, et see ei ole agregeerunud, st see on monomeerne. Antikeha, mis seondub spetsiifiliselt Fc γ RIIB-ga, võib seonduda teiste peptiidide või polüpeptiididega madalama afiinsusega vastavalt näiteks immuunanalüüside, BIAcore või teiste tehnika tasemes tuntud analüüsimeetodite abil kindlaks määratule. Eelistatult ei ristreegeri antikehad või fragmendid, mis seonduvad spetsiifiliselt Fc γ RIIB või selle fragmendiga, teiste antigeenidega. Antikehi või fragmente, mis seonduvad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-ga, saab tuvastada näiteks immuunanalüüside, BIAcore või muude valdkonna asjatundjatele

20
25
30

tuntud tehnikate abil. Antikeha või selle fragment seondub spetsiifiliselt Fc γ RIIB-ga, kui see seondub Fc γ RIIB-ga kõrgema afiinsusega kui mis tahes ristreaktiivse antigeeniga vastavalt eksperimentaalseid tehnikaid, näiteks immunoblotanalüüse, radioimmuunanalüüse (RIA) ja ensüüm-immuunsorptsiooni analüüse (ELISA-d) kasutades kindlaks määratule. Vt näiteks publikatsioonist Paul (toim.), 1989, „Fundamental Immunology”, teine väljaanne, Raven Press, New York, lk 332–336 kirjeldust antikehade spetsiifilisuse kohta.

10 [0077] Väljend „looduslik Fc γ RIIB” osutab siin Fc γ RIIB-le, mida endogeenselt ekspresseeritakse ja mis esineb rakupinnal. Osades teostustes hõlmab „looduslik Fc γ RIIB” valku, mida ekspresseeritakse rekombinantselt imetajarakus. Eelistatult ei ekspresseerita looduslikku Fc γ RIIB-d bakterirakus, st *E. coli* rakus. Enim eelistatult ei ole looduslik Fc γ RIIB denatureeritud, st see on selle bioaktiivses konformatsioonis.

15 [0078] Väljend „looduslik Fc γ RIIA” osutab Fc γ RIIA-le, mida endogeenselt ekspresseeritakse ja mis esineb rakupinnal. Osades teostustes hõlmab „looduslik Fc γ RIIA” valku, mida ekspresseeritakse rekombinantselt imetajarakus. Eelistatult ei ekspresseerita looduslikku Fc γ RIIA-d bakterirakus, st *E. coli* rakus. Enim eelistatult ei ole looduslik Fc γ RIIA denatureeritud, st see on selle bioaktiivses konformatsioonis.

20

[0079] Väljend „endogeenne” osutab rakulise valgule kontekstis valgule, mida esineb looduslikult ja/või mida ekspresseeritakse raku poolt rekombinantse manipuleerimise puudumisel; sellest tulenevalt ei hõlma terminid „endogeenselt ekspresseeritud valk” või „endogeenne valk” rakulisi valke, mida ekspresseeritakse rekombinantse tehnoloogia abil.

25

[0080] Väljend „analoog” osutab valguliste ainete (näiteks valkude, polüpeptiidide ja antikehade) kontekstis valgulisele ainele, millel on sarnane või identne funktsioon nagu teisel valgulisel ainel, kuid see ei sisalda tingimata teise valgulise aine sarnast või identset aminohappejärjestust, või sellel on teise valgulise aine sarnane või identne struktuur.

30 Valguline aine, millel on sarnane aminohappejärjestus, osutab teisele valgulisele ainele, mis vastab vähemalt ühele alljärgnevale tingimusele: (a) valguline aine, millel on aminohappejärjestus, mis on vähemalt 30%, vähemalt 35%, vähemalt 40%, vähemalt 45%, vähemalt 50%, vähemalt 55%, vähemalt 60%, vähemalt 65%, vähemalt 70%,

vähemalt 75%, vähemalt 80%, vähemalt 85%, vähemalt 90%, vähemalt 95% või vähemalt 99% identne teise valgulise aine aminohappejärjestusega; (b) valguline aine, mida kodeerib nukleotiidne järjestus, mis hübridiseerub rangetes tingimustes nukleotiidseks järjestuseks, mis kodeerib teist valgulist järjestust, mis sisaldab vähemalt 5 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 10 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 15 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 20 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 25 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 40 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 50 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 60 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 70 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 80 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 90 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 100 järjestikust aminohappejääki, vähemalt 125 järjestikust aminohappejääki või vähemalt 150 järjestikust aminohappejääki; ja (c) valguline aine, mida kodeerib nukleotiidne järjestus, mis on vähemalt 30%, vähemalt 35%, vähemalt 40%, vähemalt 45%, vähemalt 50%, vähemalt 55%, vähemalt 60%, vähemalt 65%, vähemalt 70%, vähemalt 75%, vähemalt 80%, vähemalt 85%, vähemalt 90%, vähemalt 95% või vähemalt 99% identne teist valgulist ainet kodeeriva nukleotiidse järjestusega. Valguline aine, millel on teise valgulise ainega sarnane struktuur, osutab valgulisele ainele, millel on teise valgulise ainega sarnane sekundaarne, tertsiarne või kvaternaarne struktuur. Polüpeptiidi struktuuri saab kindlaks määrata valdkonna asjatundjatele tuntud meetodite, sealhulgas mittepiiravalt peptiidide järjestamise, röntgenkristallograafia, tuumamagnetresonantsi, tsirkulaarse dikroismi ja kristallograafilise elektronmikroskoopia abil.

[0081] Selleks, et määrata kindlaks kahe aminohappejärjestuse või kahe nukleiinhappejärjestuse identsuse protsent, joondatakse need järjestused optimaalse võrdlemise eesmärgidel (näiteks võib esimesse aminohappejärjestusse või nukleiinhappejärjestusse sisestada teise aminohappe- või nukleiinhappejärjestusega optimaalseks joondamiseks tühiku). Seejärel võrreldakse aminohappejääke või nukleotiide vastavates aminohappe positsioonides või nukleotiidi positsioonides. Kui positsioon esimeses järjestuses on hõivatud samasuguse aminohappejäägi või nukleotiidiga nagu vastav positsioon teises järjestuses, siis on need kaks molekuli selles positsioonis identsed. Kahe järjestuse vaheline identsuse protsent on nende järjestuste poolt jagatud identsete positsioonide arvu funktsioon (st identsuse protsent = identsete

kattuvate positsioonide arv / positsioonide koguarv \times 100%). Ühel juhul on kaks järjestust ühepikkused.

[0082] Kahe järjestuse identsuse protsendi kindlaks määramiseks võib kasutada ka matemaatilist algoritmi. Kahe järjestuse võrdlemiseks kasutatud matemaatilise algoritmi eelistatud, mittepiirav näide on algoritm, mida on kirjeldatud publikatsioonis Karlin ja Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2264–2268, mida on modifitseeritud vastavalt sellele, mida on kirjeldatud publikatsioonis Karlin ja Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5873–5877. Selline algoritm sisestatakse NBLAST ja XBLAST programmidesse, mida on kirjeldatud publikatsioonis Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403. Nukleotiidipäringuid BLAST võib teha nukleotiidiprogrammi NBLAST parameetritega, mis on näiteks $score = 100$ ($score$ – skoor), $wordlength = 12$ ($wordlength$ – sõna pikkus), et saada nukleotiidsed järjestused, mis on homoloogsed käesoleva leiutise kohaste nukleiinhappe molekulidega. Valgu päringuid BLAST võib teha programmi XBLAST parameetritega, mis on näiteks $score = 50$, $wordlength = 3$, et saada aminohappejärjestused, mis on homoloogsed käesoleva leiutise kohaste valgumolekulidega. Selleks, et saada võrdlemise eesmärkidel tühikutega joondamised, võib kasutada Gapped BLAST programmi, mida on kirjeldatud publikatsioonis Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402. Alternatiivselt võib kasutada programmi PSI-BLAST, et viia läbi korduv päring, mis tuvastab kauged suhted molekulide vahel (ld.). Programmide BLAST, Gapped BLAST ja PSI-Blast kasutamise korral võib kasutada vastavate programmide (näiteks XBLAST ja NBLAST) vaikimisi parameetreid (vt näiteks NCBI veebilehte). Järjestuste võrdlemiseks kasutatava matemaatilise algoritmi üks teine mittepiirav näide on algoritm, mida on kirjeldatud publikatsioonis Myers ja Miller, 1988, *CABIOS* 4: 11–17. Selline algoritm on kaasatud programmi ALIGN (versioon 2.0), mis on GCG järjestuste joondamise tarkvarapaketi osa. Kui aminohapete võrdlemiseks kasutatakse programmi ALIGN, siis võib kasutada PAM120 kaaluga jääkide tabelit, tühiku pikkuse trahvi 12 ja tühiku trahvi 4.

[0083] Kahe järjestuse vahelise identsuse protsendi kindlaks määramiseks võib kasutada tehnikaid, mis sarnanevad eespool kirjeldatutega, koos tühikute võimaldamisega või ilma selleta. Identsuse protsendi arvutamisel võetakse tavaliselt arvesse ainult täpseid kattuvusi.

[0084] Väljend „analoog” mittevulgulise aine kontekstis teisele orgaanilisele või anorgaanilisele molekulile, millel on sarnane või identne funktsioon nagu esimesel orgaanilisel või anorgaanilisel molekulil ja mis sarnaneb struktuuri poolest esimese orgaanilise või anorgaanilise molekuliga.

5

[0085] Siin osutavad terminid „antagonist” ja „antagonistid” mis tahes valgule, polüpeptiidile, peptiidile, antikehale, antikeha fragmendile, suurele molekulile või väikesele molekulile (väiksem kui 10 kDa), mis blokeerib, inhibeerib, vähendab või neutraliseerib teise molekuli, näiteks Fc γ RIIB funktsiooni, aktiivsust ja/või ekspressiooni.

10 Erinevatel juhtudel vähendab antagonist teise molekuli funktsiooni, aktiivsust ja/või ekspressiooni vähemalt 10%, vähemalt 15%, vähemalt 20%, vähemalt 25%, vähemalt 30%, vähemalt 35%, vähemalt 40%, vähemalt 45%, vähemalt 50%, vähemalt 55%, vähemalt 60%, vähemalt 65%, vähemalt 70%, vähemalt 75%, vähemalt 80%, vähemalt 85%, vähemalt 90%, vähemalt 95% või vähemalt 99% võrreldes kontrolli, näiteks
15 fosfaatpuhverdatud soolalahusega (PBS).

[0086] Terminid „antikeha” või „antikehad” osutavad siin monoklonaalsetele antikehadele, multispetsiifilistele antikehadele, inimese antikehadele, humaniseeritud antikehadele, sünteetilistele antikehadele, kimäärsetele antikehadele, kameliseeritud
20 antikehadele, üheaahelalistele Fv-dele (scFv), üheaahelalistele antikehadele, Fab fragmentidele, F(ab') fragmentidele, disulfiidseotud Fv-dele (sdFv), intrakehadele ja idiotüübi vastastele (Id vastastele) antikehadele (sealhulgas näiteks Id vastased ja Id vastaste antikehade vastased antikehad leütisekohaste antikehade suhtes) ja mis tahes
25 eespool nimetatute epitoopi siduvatele fragmentidele. Eelkõige hõlmavad antikehad immunoglobuliini molekule ja immunoglobuliini molekulide immunoloogiliselt aktiivseid fragmente, st molekule, mis sisaldavad antigeeni sidumissaiti. Immunoglobuliini molekulid võivad olla mis tahes tüübist (näiteks IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ja IgY), klassist (näiteks IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ ja IgA₂) või alamklassist.

30 **[0087]** Terminid „B-rakulised pahaloomulised kasvajakud” ja „B-rakuline pahaloomuline kasvaja” osutavad siin mis tahes B-rakulisele lümfoproliferatiivsele häirele. B-rakuliste pahaloomuliste kasvajakute hulka kuuluvad B-rakulist päritolu kasvajakud. B-rakuliste pahaloomuliste kasvajakute hulka kuuluvad mittepiiravalt lümfoomid, kroonilised

lümfootsütaarsed leukeemiad, ägedad lümfoblastsed leukeemiad, hulgmüeloom, Hodgkini ja mitte-Hodgkini tõbi, difuusne suurearakuline B-rakuline lümfoom, difuusse suurearakulise B-rakulise lümfoomi piirkondadega follikulaarne lümfoom, väikeserakuline lümfootsütaarne lümfoom, mantelrakuline lümfoom ja difuusne väikeserakuline lõhustatud rakkudega lümfoom.

[0088] Kui ei ole teisiti määratletud, siis on antikehadele (mis on siin üldjoontes määratletud) osutamisel viide antikeha domeenidele ja/või aminohappe positsioonidele antikehades või nende fragmentides kooskõlas aminohapete mõiste ja nende igasse domeeni määramisega publikatsioonis Kabat *et al.*, „SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST”, 5. väljaanne, Public Health Service (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 ja 1991). Immunoglobuliinide küpsete raskete ja kergete ahelate varieeruvatest piirkondadest pärit aminohapped on tähistatud aminohappe positsiooniga ahelas. Kabat kirjeldas arvukaid aminohappejärjestusi antikehade kohta, tuvastas aminohapete konsensusjärjestuse iga alamrühma jaoks ja määras igale aminohappele jäägi numbri. Kabati nummerdamissüsteem on laiendatav antikehadele, mida tema kogumik ei hõlma, joondades kõnealuse antikeha ühe Kabati kogumikus sisalduva konsensusjärjestusega viitega konserveerunud aminohapetele. See jääkide numbrite määramiseks kasutatav meetod on muutunud antud valdkonnas standardiks ning see võimaldab hõlpsasti tuvastada aminohappeid samaväärsetes positsioonides erinevates antikehades, sealhulgas kimäärsetes või humaniseeritud variantides. Näiteks aminohape inimese antikeha kerge ahela positsioonis 50 hõivab samaväärse positsiooni aminohappega hiire antikeha kerge ahela positsioonis 50. Seega vastavalt siin humaniseeritud antikehade kontekstis kasutatule osutab selline viide nagu „Fc piirkonna positsioonis 297” aminohappe positsioonile immunoglobuliini ahelas, immunoglobuliini ahela piirkonnas või immunoglobuliini ahelast tuletatud polüpeptiidi piirkonnas, mis vastab vastava inimese immunoglobuliini positsioonile 297.

[0089] Väljend „vähk” osutab siin kasvajale või tuumorile, mis tekib rakkude ebanormaalse kontrollimatu kasvu tagajärjel. Vähk hõlmab siin selgesõnaliselt leukeemiaid ja lümfoome. Termin „vähk” osutab haigusele, mis hõlmab rakke, millel on potentsiaal moodustada metastaase kaugetesse kohtadesse ja näidata fenotüüpseid tunnuseid, mis erinevad rakkude omadest, mis ei ole vähirakud, näiteks moodustavad need

kolooniaid kolmemõõtmelisele alusmaterjalile, näiteks pehmele agarile, või need moodustavad tubulaarseid võrke või võrgutaolisi maatrikseid kolmemõõtmelisse alusmembraani või rakuvälise maatriksi preparaati. Rakud, mis ei ole vähirakud, ei moodusta kolooniaid pehmes agaris ning ei moodusta eraldiseisvaid kerakujulisi

5 struktuure kolmemõõtmelisse alusmembraani või rakuvälise maatriksi preparaatidesse. Vähirakud omandavad iseloomulikud funktsionaalsed võimed nende arengu käigus, kuigi erinevate mehhanismide kaudu. Selliste võimete hulka kuuluvad apoptoosi vältimine, omavarustatus kasvusignaalide korral, tundetus kasvuvastaste signaalide suhtes, kudedesse tungimine / metastaaside moodustamine, piiramatu eksplikatiivne potentsiaal

10 ja püsiv angiogenees. Termin „vähirakk” on mõeldud hõlmama nii vähieelseid rakke kui ka pahaloomulisi vähirakke. Osades teostustes tähendab vähk healoomulist kasvajat, mis on jäänud lokaalseks. Teistes teostustes tähendab vähk pahaloomulist kasvajat, mis on tunginud naabruses asuvasse organismi struktuuridesse ja levinud kaugemal asuvasse kudedesse ning neid hävitanud. Veel teistes teostustes on vähk seotud konkreetse vähi

15 antigeeniga.

[0090] Väljend „derivaat” osutab siin polüpeptiidide või valkude, sealhulgas antikehade kontekstis polüpeptiidile või valgule, mis sisaldab aminohappejärjestust, mida on muudetud aminohappejäägi asenduste, deletsioonide või lisanduste sisestamise teel.

20 Väljend „derivaat” osutab ka polüpeptiidile või valgule, mida on modifitseeritud, st mis tahes tüüpi molekuli kovalentse sidumise teel polüpeptiidi või valguga. Näiteks võib antikeha olla modifitseeritud mittepiiravalt näiteks glükosüülimise, atsetüülimise, pegüülimise, fosforüülimise, amideerimise, tuntud kaitse- / blokeerivate rühmadega deriveerimise, proteolüütilise lõhustamise, rakulise ligandi või muu valguga sidumise teel

25 jne. Polüpeptiidi või valgu derivaat võib olla toodetud keemiliste modifikatsioonide abil, kasutades valdkonna asjatundjatele tuntud tehnikaid, sealhulgas mittepiiravalt spetsiifilist keemilist lõhustamist, atsetüülimist, formüülimist, tunikamütsiini metaboolset sünteesi jne. Lisaks on polüpeptiidi või valgu derivaadil sarnane või identne funktsioon nagu polüpeptiidil või valgul, millest see tuletati.

30

[0091] „Derivaat” osutab siin seoses Fc γ RIIB-ga kasutatuna polüpeptiidile, mis sisaldab Fc γ RIIB polüpeptiidi aminohappejärjestust, Fc γ RIIB polüpeptiidi fragmendile, antikehale, mis seondub immunospetsiifiliselt Fc γ RIIB polüpeptiidiga, või antikeha

fragmendile, mis seondub immunospetsiifiliselt Fc γ RIIB polüpeptiidiga, mida on muudetud aminohappejäägi asenduste, deletsioonide või lisanduste (st mutatsioonide) sisestamise teel. Teatud juhtudel sisaldab antikeha derivaat või selle fragment aminohappejäägi asendusi, deletsioone või lisandusi ühes või mitmes CDR-is. Antikeha derivaadil võib olla antikehaga, mis ei ole derivaat, võrreldes sisuliselt samasugune sidumisvõime, parem sidumisvõime või halvem sidumisvõime. Konkreetsetel juhtudel on üks, kaks, kolm, neli või viis CDR-i aminohappejäägi asendatud, deleteeritud või lisatud (st muteeritud). Termin „derivaat” osutab siin seoses Fc γ RIIB-ga kasutatuna ka Fc γ RIIB polüpeptiidile, Fc γ RIIB polüpeptiidi fragmendile, antikehale, mis seondub immunospetsiifiliselt Fc γ RIIB polüpeptiidiga, või antikeha fragmendile, mis seondub immunospetsiifiliselt Fc γ RIIB polüpeptiidiga, mida on modifitseeritud, st mis tahes tüüpi molekuli polüpeptiidiga kovalentse sidumise teel. Näiteks võib Fc γ RIIB polüpeptiid, Fc γ RIIB polüpeptiidi fragment, antikeha või antikeha fragment olla modifitseeritud mittepiiravalt näiteks glükosüülimise, atsetüülimise, pegüülimise, fosforüülimise, amideerimise, tuntud kaitse- / blokeerivate rühmadega deriveerimise, proteolüütilise lõhustamise, rakulise ligandi või muu valguga sidumise teel jne. Fc γ RIIB polüpeptiidi, Fc γ RIIB polüpeptiidi, antikeha või antikeha fragmendi derivaat võib olla modifitseeritud keemiliste modifikatsioonidega, kasutades selleks valdkonna asjatundjatele tuntud tehnikaid, sealhulgas mittepiiravalt spetsiifilist keemilist lõhustamist, atsetüülimist, formuleerimist, tunikamütsiini metaboolset sünteesi jne. Lisaks võib Fc γ RIIB polüpeptiidi, Fc γ RIIB polüpeptiidi fragmendi, antikeha või antikeha fragmendi derivaat sisaldada ühte või mitut mitteklassikalist aminohapet. Ühes teostuses on antikeha derivaadil lähteantikehaga sarnane või identne funktsioon. Ühes teises teostuses on antikeha või antikeha fragmendi derivaadil muutmata antikehaga võrreldes muudetud aktiivsus. Näiteks võib antikeha või selle fragmendi derivaat seonduda selle epitoobiga tihedamalt või olla proteolüüsi suhtes vastupidavam.

[0092] Termineid „häire” ja „haigus” kasutatakse siin samatähenduslikena, et osutada ravialuse haigusseisundile. Konkreetselt kasutatakse terminit „autoimmuunhaigus” samatähenduslikuna terminiga „autoimmuunhäire”, et osutada ravialuse haigusseisundile, mida iseloomustab rakkude, kudede ja/või elundi kahjustus, mida põhjustab ravialuse immunoloogiline reaktsioon iseenda rakkude, kudede ja/või elundite vastu. Terminit „põletikuline haigus” kasutatakse samatähenduslikult terminiga „põletikuline häire”, et

osutada ravialuse haigusseisundile, mida iseloomustab põletik, eelistatult krooniline põletik. Autoimmuunhäired võivad olla seotud põletikuga, kuid ei pruugi. Lisaks võib põletikku põhjustada autoimmuunhäire, kuid ei pruugi. Seega võib teatavaid häireid iseloomustada nii autoimmuun- kui ka põletikuliste häiretena.

5

[0093] Väljend „epitooop” osutab antigeeni molekulil olevale piirkonnale, millega antikeha spetsiifiliselt seondub.

[0094] Väljend „fragment” osutab peptiidile või polüpeptiidile, mis sisaldab mõne muu polüpeptiidi aminohappejärjestuse vähemalt 5 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 10 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 15 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 20 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 25 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 40 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 50 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 60 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 70 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 80 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 90 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 100 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 125 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 150 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 175 järjestikuse aminohappejäägi, vähemalt 200 järjestikuse aminohappejäägi või vähemalt 250 järjestikuse aminohappejäägi pikkust aminohappejärjestust. Ühes konkreetses teostuses säilitab polüpeptiidi fragment vähemalt ühe polüpeptiidi funktsiooni. Eelistatult on antikeha fragmendid epitooopi siduvad fragmendid.

[0095] Väljend „humaniseeritud antikeha” osutab immunoglobuliinile, mis sisaldab inimese raampiirkonda ja ühte või mitut CDR-i mitteinimese (tavaliselt hiire või roti) immunoglobuliinist. Mitteinimese immunoglobuliini, mis annab CDR-id, nimetatakse „doonoriks” ja inimese immunoglobuliini, mis annab raampiirkonna, nimetatakse „aktseptoriks”. Konstantseid piirkondi ei pea olema, kuid kui need on olemas, siis peavad need olema sisuliselt identsed inimese immunoglobuliini konstantsete piirkondadega, st vähemalt ligikaudu 85–90%, eelistatult ligikaudu 95% või suuremal määral identsed. Seega on humaniseeritud immunoglobuliini kõik osad, välja arvatud mõeldavalt CDR-id, sisuliselt identsed looduslike inimese immunoglobuliini järjestuste vastavate osadega. „Humaniseeritud antikeha” on antikeha, mis sisaldab humaniseeritud kerge ahela ja humaniseeritud raske ahela immunoglobuliini. Näiteks ei hõlma humaniseeritud antikeha

tüüpilist kimäärset antikeha, kuna näiteks kimäärse antikeha terve varieeruv piirkond on mitteinimese päritolu. Öeldakse, et doonori antikeha on „humaniseeritud” „humaniseerimise” protsessi abil, kuna eeldatavasti seondub tulemuseks saadud humaniseeritud antikeha sama antigeeniga nagu doonori antikeha, mis annab CDR-id.

5 Humaniseeritud antikehad on suuremas osas inimese immunoglobuliinid (vastuvõtja antikeha), milles vastuvõtja hüpervarieeruva piirkonna jäägid on asendatud mitteinimese liigilt, näiteks hiirelt, rotilt, küülikult või mitteinimesest primaadilt saadud hüpervarieeruva piirkonna jääkidega (doonori antikeha), millel on soovitud spetsiifilisus, afiinsus ja suutlikkus. Osadel juhtudel on inimese immunoglobuliini raampiirkonna (FR)

10 jäägid asendatud vastavate mitteinimese jääkidega. Lisaks võivad humaniseeritud antikehad sisaldada jääke, mida ei leidu vastuvõtja antikehas või doonori antikehas. Neid modifikatsioone tehakse antikeha suutlikkuse täiendavaks viimistlemiseks. Üldiselt sisaldab humaniseeritud antikeha sisuliselt kõiki vähemalt ühest ja tüüpiliselt kahest varieeruvast domeenist, milles kõik või sisuliselt kõik hüpervarieeruvad piirkonnad

15 vastavad mitteinimese immunoglobuliini omadele ja kõik või sisuliselt kõik FR-id on inimese immunoglobuliini järjestuse omad. Valikuliselt sisaldab humaniseeritud antikeha ka vähemalt immunoglobuliini konstantse piirkonna (Fc), tüüpiliselt inimese immunoglobuliini osa, mis seondub immunospetsiifiliselt Fc γ RIIB polüpeptiidiga, mida on muudetud aminohappejäägi asenduste, deletsioonide või lisanduste (st mutatsioonide)

20 sisestamise teel. Osades teostustes on humaniseeritud antikeha derivaat. Selline humaniseeritud antikeha sisaldab aminohappejäägi asendusi, deletsioone või lisandusi ühes või mitmes mitteinimese CDR-is. Humaniseeritud antikeha derivaadil võib olla humaniseeritud antikehaga, mis ei ole derivaat, võrreldes sisuliselt samasugune sidumisvõime, parem sidumisvõime või halvem sidumisvõime. Konkreetsetel juhtudel on

25 üks, kaks, kolm, neli või viis CDR-i aminohappejääki asendatud, deleteeritud või lisatud (st muteeritud). Antikehade humaniseerimise kohta edasiste üksikasjade saamiseks vt Euroopa patendid nr EP 239 400, EP 592 106 ja EP 519 596; rahvusvahelised publikatsioonid nr WO 91/09967 ja WO 93/17105; USA patendid nr 5 225 539, 5 530 101, 5 565 332, 5 585 089, 5 766 886 ja 6 407 213; ja Padlan, 1991, *Molecular*

30 *Immunology* 28(4/5): 489–498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6): 805–814; Roguska *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 969–973; Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169: 1119–1125; Caldas *et al.*, 2000, *Protein Eng.* 13: 353–360; Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20: 267–279; Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 10 678 – 10 684;

Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9: 895–904; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s–5977s; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55: 1717–1722; Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409–410; Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959–973; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522–525; Reichmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323–329; ja Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593–596.

[0096] Väljend „hüpervarieeruv piirkond” osutab antikeha aminohappejääkidele, mis vastutavad antigeeni sidumise eest. Hüpervarieeruv piirkond sisaldab aminohappejääke „komplementaarsust määravast piirkonnast” ehk „CDR-ist” (st jäägid 24–34 (L1), 50–56 (L2) ja 89–97 (L3) kerge ahela varieeruv domeenis ja 31–35 (H1), 50–65 (H2) ja 95–102 (H3) raske ahela varieeruv domeenis; Kabat *et al.*, „Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5. väljaanne, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) ja/või neid jääke „hüpervarieeruvast lingust” (st jäägid 26–32 (L1), 50–52 (L2) ja 91–96 (L3) kerge ahela varieeruv domeenis ja 26–32 (H1), 53–55 (H2) ja 96–101 (H3) raske ahela varieeruv domeenis; Chothia ja Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901–917). CDR-i jäägid Eph099B-208.261 ja Eph099B-233.152 kohta on loetletud tabelis 1. „Raampiirkond” ehk „FR” on sellised varieeruva domeeni jäägid, mis ei ole hüpervarieeruva piirkonna jäägid vastavalt siin määratletule.

[0097] Terminid „immunomoduleeriv aine” ja selle variandid, sealhulgas mittepiiravalt immunomoduleerivad ained, osutavad siin ainele, mis moduleerib peremeesorganismi immuunsüsteemi. Teatavates teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, on immunomoduleeriv aine immunosupressant. Teatavates teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, on immunomoduleeriv aine immunostimulaator. Immunomoduleerivate ainete hulka kuuluvad mittepiiravalt väikesed molekulid, peptiidid, polüpeptiidid, liitvalgud, antikehad, anorgaanilised molekulid, mimeetikumid ja orgaanilised molekulid.

[0098] Terminid „kontrolli all hoidma” ja „kontrolli all hoidmine” osutavad siin kasulikele mõjudele, mida ravialune saab profülaktilise või raviaine manustamisest, kuid mille tulemuseks ei ole haiguse ravimine. Teatavatel juhtudel manustatakse ravialusele ühte või mitut profülaktilist või raviainet, et haigust „kontrolli all hoida”, et vältida nimetatud haiguse süvenemist või halvenemist.

[0099] Terminid „nukleinhapped” ja „nukleotiidsed järjestused” hõlmavad DNA molekule (näiteks cDNA või genoomne DNA), RNA molekule (näiteks mRNA), DNA ja RNA molekulide kombinatsioone või DNA/RNA molekulide hübriide ja DNA või RNA molekulide analooge. Selliste analoogide genereerimiseks võib kasutada näiteks

5 nukleotiidi analooge, mille hulka kuuluvad mittepäärdavalt inosiini või tritüülitud alused. Sellised analoogid võivad sisaldada ka DNA või RNA molekule, mis sisaldavad modifitseeritud tüviahelaid, mis annavad molekulidele kasulikud omadused, näiteks nukleaasi resistentsuse või parema võime läbida rakumembraane. Nukleinhapped või nukleotiidsed järjestused võivad olla üheaheelalised, kaksikahelalised, võivad sisaldada nii

10 üheaheelalist kui ka kaheaheelalist osa ning võivad hõlmata kolmeaheelalisi osi, kuid eelistatavalt on tegu kaksikahelalise DNA-ga.

[0100] Terminid „ennetama” „ennetamine” ja „ennetus” osutavad siin ravialusel häire ühe või mitme sümptomi esinemise ja/või kordumise või avaldumise ennetamisele

15 profülaktilise või raviaine manustamise tulemusel.

[0101] Terminid „profülaktiline aine” ja „profülaktilised ained” osutavad siin mis tahes aine(te)le, mida võib kasutada häire ennetamisel või häire kordumise või leviku ennetamisel. Profülaktiliselt efektiivne kogus võib osutada profülaktilise aine kogusele,

20 mis on piisav hüperproliferatiivse haiguse, eelkõige vähi kordumise või leviku ennetamiseks või selle esinemise ennetamiseks patsiendil, sealhulgas sellisel, kellel on eelsoodumus hüperproliferatiivse haiguse tekkeks, näiteks sellisel, kellel on geneetiline eelsoodumus vähi tekkeks või kes on varem kantserogeenidega kokku puutunud. Profülaktiliselt efektiivne kogus võib osutada ka profülaktilise aine kogusele, mis pakub

25 profülaktilist kasu haiguse ennetamisel. Lisaks tähendab profülaktiliselt efektiivne kogus seoses leiutiskirjelduse kohase profülaktilise ainega üksnes profülaktilise aine kogust või teiste toimeainetega kombineeritud, mis pakub profülaktilist kasu haiguse ennetamisel. Leiutisekohase Fc γ RIIB antikeha kogusega seoses kasutatuna võib nimetatud väljend hõlmata kogust, mis parandab üldist profülaktikat või parandab teise profülaktilise aine

30 profülaktilist tõhusust või sünergia teise profülaktilise aine, näiteks mittepäärdavalt terapeutilise antikehaga. Teatavatel juhtudel osutab väljend „profülaktiline aine” agonistlikule Fc γ RIIB-spetsiifilisele antikehale. Teistel juhtudel osutab „profülaktiline aine” antagonistlikule Fc γ RIIB-spetsiifilisele antikehale. Teatavatel teistel juhtudel osutab

väljend „profülaktiline aine” vähi kemoterapeutikumidele, kiiritusravile, hormoonravile, bioloogilisele ravile (näiteks immunoteraapia) ja/või leiutisekohastele Fc γ RIIB antikehadele Teistel juhtudel võib rohkem kui ühte profülaktilist ainet manustada kombineeritult.

5

[0102] Fraas „kõrvalmõjud” hõlmab siin profülaktilise või raviaine soovimatuid või kahjulikke kõrvalmõjusid. Kahjulikud mõjud on alati soovimatud, kuid soovimatud mõjud ei ole tingimata kahjulikud. Profülaktilisest või raviainest tulenev kahjulik mõju võib olla kahjustav või ebamugav või ohtlik. Keemiaravi kõrvalmõjude hulka kuuluvad mittepiiravalt seedetrakti toksilisus, näiteks mittepiiravalt, varase ja hilise tekkega kõhulahtisus ja puhitus, iiveldus, oksendamine, anoreksia, leukopeenia, aneemia, neutropeenia, astenia, kõhukrambid, palavik, valu, kaalukaotus, vedelikukaotus, alopeetsia, hingeldus, unetus, peapööritus, mukosiit, suukuivus ja neerupuudulikkus, ning kõhukinnisus, mõjud närvidel ja lihastele, ajutine või püsiv kahjustus neerudele ja põiele, gripilaadsed sümptomid, vedelikupeetus ning ajutine või püsiv viljatus. Kiiritusravi kõrvalmõjude hulka kuuluvad mittepiiravalt väsimus, suukuivus ja isukaotus. Bioloogilise ravi / immunoteraapia kõrvalmõjude hulka kuuluvad mittepiiravalt lööve või paistetud manustamiskohas, gripilaadsed sümptomid, näiteks palavik, külmavärinad ja väsimus, seedetrakti probleemid ja allergilised reaktsioonid. Hormoonravi kõrvalmõjude hulka kuuluvad mittepiiravalt iiveldus, viljakusprobleemid, depressioon, isukaotus, silmaprobleemid, peavalu ja kehakaalu kõikumine. Täiendavaid soovimatuid mõjusid, mida patsiendid kogevad, on palju ja need on tehnika tasemes tuntud, vt näiteks „Physicians' Desk Reference” (56. väljaanne, 2002).

25 [0103] Terminid „üheahelaline Fv” või „scFv” antikeha osutavad siin fragmentidele, mis sisaldavad antikeha VH- ja VL-domeene, kus need domeenid esinevad ühes polüpeptiidahelas. Üldiselt sisaldab Fv polüpeptiid lisaks polüpeptiidlinkerit VH- ja VL-domeenide vahel, mis võimaldab scFv-l moodustada soovitud struktuuri antigeeni sidumiseks. Ülevaate saamiseks scFv kohta vt Plückthun publikatsioonis „The
30 Pharmacology of Monoclonal Antibodies”, vol. 113, Rosenberg ja Moore (toim.), Springer-Verlag, New York, lk 269–315 (1994). Konkreetsetes teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, kuuluvad scFv-de hulka bispetsiifilised scFv-d ja humaniseeritud scFv-d.

[0104] Termineid „ravialune” ja „patsient” kasutatakse siin samatähenduslikena. Ravialune on siin eelistatult imetaja, näiteks mitteprimaat (näiteks veised, sead, hobused, kassid, koerad, rotid jne) ja primaat (näiteks ahv ja inimene), enim eelistatult inimene.

5 [0105] „Terapeutiliselt efektiivne kogus” osutab siin raviaine kogusele, mis on piisav, et ravidada või hoida kontrolli all haigust või häiret, mis on seotud Fc γ RIIB-ga, või haigust, mis on seotud Fc retseptori signaalirajas regulatsiooni kaotusega, või parandada teise ravivormi, näiteks terapeutilise antikeha, vaktsiiniga tehtava ravi või profülaktika terapeutilist tõhusust jne. Terapeutiliselt efektiivne kogus võib osutada raviaine kogusele, mis on piisav, et lükata edasi haiguse avaldumist või seda miinimumini viia, näiteks lükata edasi vähi levikut või seda miinimumini viia. Terapeutiliselt efektiivne kogus võib osutada ka raviaine kogusele, mis pakub terapeutilist kasu haiguse ravimisel või kontrolli all hoidmisel. Lisaks tähendab terapeutiliselt efektiivne kogus seoses leiutisekohase raviaine raviga raviaine kogust üksi või teiste ravivormidega kombineeritult, mis pakub 10 terapeutilist kasu haiguse ravimisel või kontrolli all hoidmisel, näiteks on see piisav, et parandada haiguse ravimiseks või kontrolli all hoidmiseks piisava terapeutilise antikeha terapeutilist tõhusust. Leiutisekohase Fc γ RIIB antikeha kogusega seoses kasutatuna võib nimetatud termin hõlmata kogust, mis parandab üldist ravi, vähendab või väldib soovimatuid kõrvalmõjusid või parandab teise raviaine terapeutilist tõhusust või sünergiaid teise raviaine raviga. 15 20

[0106] Terminid „ravima”, „ravimine” ja „ravi” osutavad siin Fc retseptori signaalirajas regulatsiooni kaotusega seotud haiguse või häire sümptomite kõrvaldamisele, vähendamisele või paremaks muutmisele või teise ravivormi, näiteks terapeutilise antikeha, vaktsiiniga tehtava ravi või profülaktika terapeutilise tõhususe parandamisele. 25 Osadel juhtudel osutab ravimine primaarse, piirkondliku või metastaatilise vähikoe kõrvaldamisele, eemaldamisele, muutmisele või kontrolli all hoidmisele, mis tuleneb ühe või mitme raviaine manustamisest. Teatavatel juhtudel osutavad sellised terminid vähi leviku miinimumi viimisele või edasi lükkamisele, mis tuleneb ühe või mitme raviaine manustamisest sellise haiguse all kannatavale ravialusele. Teistel juhtudel osutavad 30 sellised terminid haigust põhjustavate rakkude kõrvaldamisele.

[0107] Väljend „kombineeritult” osutab rohkem kui ühe profülaktilise ja/või raviaine kasutamisele. Termin „kombineeritult” kasutamine ei piira järjekorda, millega profülaktilisi ja/või raviaineid manustatakse häire, näiteks hüperproliferatiivsete rakkude häire, eelkõige vähi all kannatavale ravialusele. Esimest profülaktilist või raviainet võib manustada ravialusele, kes kannatas või kannatab häire all või kes on sellele vastuvõtlik, enne teise profülaktilise või raviaine manustamist (näiteks 1 minut, 5 minutit, 15 minutit, 30 minutit, 45 minutit, 1 tund, 2 tundi, 4 tundi, 6 tundi, 12 tundi, 24 tundi, 48 tundi, 72 tundi, 96 tundi, 1 nädal, 2 nädalat, 3 nädalat, 4 nädalat, 5 nädalat, 6 nädalat, 8 nädalat või 12 nädalat varem), sellega samaaegselt või pärast seda (näiteks 1 minut, 5 minutit, 15 minutit, 30 minutit, 45 minutit, 1 tund, 2 tundi, 4 tundi, 6 tundi, 12 tundi, 24 tundi, 48 tundi, 72 tundi, 96 tundi, 1 nädal, 2 nädalat, 3 nädalat, 4 nädalat, 5 nädalat, 6 nädalat, 8 nädalat või 12 nädalat hiljem). Profülaktilisi või raviaineid manustatakse ravialusele sellises järjestuses ja ajavahemiku tagant, et leiutisekohane aine saab toimida koos teise ainega, et pakkuda suuremat kasu, kui see oleks olnud võimalik siis, kui neid oleks manustatud teisiti. Mis tahes täiendavat profülaktilist või raviainet võib manustada teiste täiendavate profülaktiliste või raviainetega mis tahes järjestuses.

4. JOONISTE LÜHIKIRJELDUS

[0108]

20 **Joonis fig 1:** 8B5.3.4 antikeha immunoreaktiivsus Fc γ RIIA ja Fc γ RIIB suhtes. 8B5.3.4 hübridoomi rakuliini klooni poolt toodetud antikeha (MAb 8B5.3.4) vahetut seondumist Fc γ RIIB ja Fc γ RIIA-ga testiti (kahes korduses) ELISA analüüsis, kasutades retseptoritega Fc γ RIIA ja Fc γ RIIB kaetud plaate. Seotud antikehi tuvastati hiire HRP vastase kitse konjugeeritud antikehaga ja neeldumist 25 jälgiti lainepikkusel 650 nm.

Joonis fig 2: MAb 8B5.3.4 isotüübi iseloomustamine. Hübridoomi klooni 8B5.3.4 poolt toodetud MAb 8B5.3.4 isotüüp määrati kindlaks ELISA analüüsi abil. Antikehi analüüsiti erinevate isotüüpide suhtes ning teatati neeldumise väärtused.

Joonis fig 3: Esitatud on nukleotiidsed (SEQ ID NO: 1) ja aminohappejärjestused (SEQ ID NO: 3) klooni 8B5.3.4 poolt toodetud monoklonaalse antikeha varieeruva kerge ahela kohta.

5 **Joonis fig 4:** Esitatud on nukleotiidsed (SEQ ID NO: 2) ja aminohappejärjestused (SEQ ID NO: 4) klooni 8B5.3.4 poolt toodetud monoklonaalse antikeha varieeruva raske ahela kohta.

5. EELISTATUD TEOSTUSTE KIRJELDUS

5.1. FcγRIIB-SPETSIIFILISED ANTIKEHAD

10 **[0109]** Patendinõudluse kohaselt pakutakse leiutisega isoleeritud antikeha või selle antigeeni siduvat fragmenti, kus nimetatud isoleeritud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment seob spetsiifiliselt loodusliku inimese FcγRIIB rakuvälist domeeni suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment seob loodusliku inimese FcγRIIA-d, ning kus:

15 i) nimetatud antikeha on 8B5.3.4 antikeha, mida toodab hübriidoomi rakuliin, millel on ATCC registreerimisnumber PTA-7610; või

ii) nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 4, ja kerge ahela varieeruvat domeeni aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 3; või

20 iii) nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment sisaldab hübriidoomi klooni 8B5.3.4, millel on ATCC registreerimisnumber PTA-7610, poolt toodetud antikeha kuut CDR-i, nimetatud kuuel CDR-il on aminohappejärjestused SEQ ID NO: 5–10, kus nimetatud antikeha või antigeeni siduv fragment seondub FcγRIIB sama epitoobiga, mida tunneb ära hübriidoomi klooni 8B5.3.4, millel on ATCC
25 registreerimisnumber PTA-7610, poolt toodetud antikeha ning konkureerib nimetatud antikehaga 8B5.3.4 loodusliku inimese FcγRIIB-ga seondumise osas, ning kus nimetatud antikehal või nimetatud antigeeni siduval fragmendil on

dissotsiatsioonikonstant K_d (K_{off}/K_{on}), mis on väiksem kui 5×10^{-9} M vastavalt pinnaplasmonresonantsiga kindlaks määratule. Leiutiskirjeldus hõlmab antikehi (eelistatult monoklonaalseid antikehi) või nende fragmente, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d, eelistatult inimese Fc γ RIIB-d, enam eelistatult looduslikku inimese Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikehad või nende fragmendid seovad Fc γ RIIA-d, eelistatult inimese Fc γ RIIA-d, enam eelistatult looduslikku inimese Fc γ RIIA-d. Näitlikud antikehad on avaldatud USA patenditaotluse publikatsioonis nr 2004/0185045 ja USA patenditaotluse publikatsioonis nr 2006/0013810. Leiutiskirjeldus hõlmab Fc γ RIIB-spetsiifilise antikeha, selle analoogi, derivaadi või antigeeni siduva fragmendi (näiteks Fc γ RIIB-spetsiifilise antikeha ühe või mitme komplementaarsust määrava piirkonna („CDR-i”)) kasutamist haiguse, näiteks vähi, eelkõige B-rakulise pahaloomulise kasvaja või selle ühe või mitme sümptomi ennetamisel, ravimisel, kontrolli all hoidmisel või paremaks muutmisel. Nõudluspunktides määratletu kohaselt seovad leiutisekohased antikehad loodusliku inimese Fc γ RIIB rakuvälist domeeni. Teatavates teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, seonduvad antikehad või nende fragmendid Fc γ RIIB-ga afiinsusega, mis on rohkem kui kaks korda, neli korda, 6 korda, 10 korda, 20 korda, 50 korda, 100 korda, 1000 korda, 10^4 korda, 10^5 korda, 10^6 korda, 10^7 korda või 10^8 korda suurem afiinsusest, millega nimetatud antikehad või fragmendid seovad Fc γ RIIA-d. Veel teistel juhtudel hõlmab leiutiskirjeldus Fc γ RIIB antikehade kasutamist, mis seonduvad üksnes Fc γ RIIB-ga ja millel puudub afiinsus Fc γ RIIB suhtes, kasutades tehnika tasemes tuntud ja siin avaldatud standardseid meetodeid. Ühes eelistatud teostuses on nimetatud antikehad inimese või humaniseeritud antikehad.

25

[0110] Ühel konkreetsel juhul agoniseerivad leiutisekohased antikehad või nende fragmendid vähemalt ühte Fc γ RIIB aktiivsust. Ühel juhul on nimetatud aktiivsus B-rakkude retseptori vahendatud signaliseerimise inhibeerimine. Ühel teisel juhul inhibeerivad leiutisekohased agonistlikud antikehad B-rakkude aktivatsiooni, B-rakkude proliferatsiooni, antikehade tootmist, B-rakkude rakusisest kaltsiumi sissevoolu, rakutsükli progressiooni või ühe või mitme allavoolu signaliseeriva molekuli aktiivsust Fc γ RIIB signaaliülekanerajas. Veel ühel teisel juhul parandavad leiutisekohased

30

agonistlikud antikehad Fc γ RIIB fosforüülimist või SHIP-i värbamist. Ühel edasisel juhul inhibeerivad agonistlikud antikehad MAP kinaasi aktiivsust või Akt värbamist B-rakkude retseptori vahendatud signaalirajas. Ühel teisel juhul agoniseerivad leiutisekohased agonistlikud antikehad Fc γ RIIB vahendatud Fc ϵ RI signaliseerimise inhibeerimist. Ühel

5 konkreetset juhul inhibeerivad nimetatud antikehad Fc ϵ RI esilekutsutud nuumrakkude aktivatsiooni, kaltsiumi mobiliseerimist, degranuleerimist, tsütokiinide tootmist või serotoniini vabanemist. Ühel teisel juhul stimuleerivad leiutisekohased agonistlikud antikehad Fc γ RIIB fosforüülimist, stimuleerivad SHIP-i värbamist, stimuleerivad SHIP-i fosforüülimist ja selle sidumist Shc-ga või inhibeerivad MAP kinaasi perekonna liikmete

10 (näiteks Erk1, Erk2, JNK, p38 jne) aktivatsiooni. Veel ühel teisel juhul parandavad leiutisekohased agonistlikud antikehad p62dok-i türosiini fosforüülimist ja selle sidumist SHIP-i ja rasGAP-iga. Ühel teisel juhul inhibeerivad leiutisekohased agonistlikud antikehad Fc γ R-i vahendatud fagotsütoosi monotsüütides või makrofaagides.

15 [0111] Ühel teisel juhul antagoniseerivad leiutisekohased antikehad või nende fragmendid vähemalt ühte Fc γ RIIB aktiivsust. Ühel juhul on nimetatud aktiivsus B-rakkude retseptori vahendatud signaliseerimise aktiveerimine. Ühel konkreetset juhul parandavad leiutisekohased antagonistlikud antikehad B-rakkude aktivatsiooni, B-rakkude proliferatsiooni, antikehade tootmist, rakusisest kaltsiumi sissevoolu või ühe või mitme

20 allavoolu signaliseeriva molekuli aktiivsust Fc γ RIIB signaaliülekanerajas. Veel ühel teisel konkreetset juhul vähendavad leiutisekohased antagonistlikud antikehad Fc γ RIIB fosforüülimist või SHIP-i värbamist. Leiutiskirjelduse ühel edasisel juhul parandavad antagonistlikud antikehad MAP kinaasi aktiivsust või Akt värbamist B-rakkude retseptori vahendatud signaalirajas. Ühel teisel juhul antagoniseerivad leiutisekohased

25 antagonistlikud antikehad Fc γ RIIB vahendatud Fc ϵ RI signaliseerimise inhibeerimist. Ühel konkreetset juhul parandavad leiutisekohased antagonistlikud antikehad Fc ϵ RI esilekutsutud nuumrakkude aktivatsiooni, kaltsiumi mobiliseerimist, degranuleerimist, tsütokiinide tootmist või serotoniini vabanemist. Ühel teisel juhul inhibeerivad leiutisekohased antagonistlikud antikehad Fc γ RIIB fosforüülimist, inhibeerivad SHIP-i

30 värbamist, inhibeerivad SHIP-i fosforüülimist ja selle sidumist Shc-ga, parandavad MAP kinaasi perekonna liikmete (näiteks Erk1, Erk2, JNK, p38 jne) aktivatsiooni. Veel ühel teisel juhul inhibeerivad leiutisekohased antagonistlikud antikehad p62dok-i türosiini fosforüülimist ja selle sidumist SHIP-i ja rasGAP-iga. Ühel teisel juhul parandavad

leiutisekohased antagonistlikud antikehad Fc γ R-i vahendatud fagotsütoosi monotsüütides või makrofaagides. Ühel teisel juhul ennetavad leiutisekohased antagonistlikud antikehad fagotsütoosi, opsoniseeritud osakeste kliirensit põrnarakkude poolt.

- 5 [0112] Teistel juhtudel võib leiutiskirjelduse kohaseid antikehi või nende fragmente kasutada ühe rakkude populatsiooni, kuid mitte teiste sihtmärgistamiseks. Ühestki konkreetsest teoriast lähtumata on leiutajad avastanud, et Fc γ RIIB-d ei ekspresseerita neutrofiilidel nii kõrgel määral, nagu varem arvati. Fc γ RIIB antikeha kõrged kontsentratsioonid reageerivad neutrofiilidega. Kuid neutrofiilide reaktiivsus kaob
- 10 Fc γ RIIB vastaste antikehade kontsentratsiooni vähenemisel kiiresti. Fc γ RIIB vastase antikeha madalate kontsentratsioonide juures säilis reaktiivsus CD20+ B rakkudega. Seega saab leiutiskirjelduse kohase antikeha reaktiivsust neutrofiilidega vähendada nii, et see ei mõjutaks ebaolulisi populatsioone, näiteks neutrofiile või trombotsüüte. Sellest tulenevalt kasutatakse teatavatel juhtudel leiutiskirjelduse kohast antikeha tasemetel, mis
- 15 tunnevad täielikult ära selle märklaudpopulatsioone, kuid mitte teisi rakke.

- [0113] Leiutisekohaste antikehade hulka kuuluvad mittepiiravalt monoklonaalsed antikehad, sünteetilised antikehad, rekombinantselt toodetud antikehad, multispetsiifilised antikehad, inimese antikehad, humaniseeritud antikehad, kimäärsed antikehad,
- 20 kameliseeritud antikehad, üheaahelised Fv-d (scFv), üheaahelised antikehad, Fab fragmendid, F(ab') fragmendid, disulfiidseotud Fv-d (sdFv), intrakehad ja mis tahes eespool nimetatute epitoopi siduvad fragmendid. Konkreetset kuuluvad leiutisekohastes meetodites kasutatud antikehade hulka immunoglobuliini molekulid ja immunoglobuliini molekulide immunoloogiliselt aktiivsed osad, st molekulid, mis sisaldavad antigeeni
- 25 sidumissaiti, mis seondub immunospetsiifiliselt Fc γ RIIB-ga suurema afiinsusega, kui nimetatud immunoglobuliini molekulid seovad Fc γ RIIA-d. Antikeha analoogide hulka võivad kuuluda ka Fc γ RIIB-spetsiifilised T-raku retseptorid, näiteks kimäärsed T-raku retseptorid (vt näiteks USA patenditaotluse publikatsioon nr 2004/0043401), üheaahelaline T-raku retseptor, mis on seotud üheaahelalise antikehaga (vt näiteks patent US 6 534 633),
- 30 ja kinnitusvalgud (vt näiteks patent US 6 818 418). Teatavates teostustes ei ole leiutisekohane antikeha analoog monoklonaalne antikeha.

- [0114] Siin kirjeldatud meetodites kasutatud antikehad võivad olla mis tahes loomset päritolu, sealhulgas lindudelt ja imetajatelt (näiteks inimene, mitteinimesest primaat, hiir, eesel, lammas, küülik, kits, merisiga, kaamel, hobune või kana). Eelistatult on nimetatud antikehad inimese või humaniseeritud monoklonaalsed antikehad. „Inimese” antikehad hõlmavad siin antikehi, millel on inimese immunoglobuliini aminohappejärjestus, ja nende hulka kuuluvad inimese immunoglobuliini kogudest või sünteetiliste inimese immunoglobuliini kodeerivate järjestuste kogudest või inimese geenidest pärit antikehi ekspresseerivatelt hiirtelt isoleeritud antikehad.
- 10 [0115] Siin kirjeldatud meetodites kasutatud antikehad võivad olla monospetsiifilised, bispetsiifilised, trispetsiifilised või suurema multispetsiifilisusega. Multispetsiifilised antikehad võivad immunospetsiifiliselt seonduda Fc γ RIIB erinevate epitoopidega või seonduda immunospetsiifiliselt Fc γ RIIB epitoobi ja heteroloogilise epitoobi, näiteks heteroloogilise polüpeptiidi või tahke kandjaga. Vt näiteks rahvusvahelised publikatsioonid nr WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360 ja WO 92/05793; Tutt, *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147: 60–69; USA patendid nr 4 474 893, 4 714 681, 4 925 648, 5 573 920 ja 5 601 819; ja Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148: 1547–1553; Todorovska *et al.*, 2001 *Journal of Immunological Methods*, 248: 47–66.
- 15
- 20 [0116] Konkreetsetes teostustes on leiutisekohased antikehad multispetsiifilised, omades spetsiifilisusi Fc γ RIIB ja vähi antigeeni või mis tahes muu rakupinna markeri suhtes, mis on spetsiifiline raku (näiteks immuunraku, näiteks T-raku või B-raku) suhtes, mida kavandatakse tappa, näiteks konkreetse haiguse või häire ravimisel või ennetamisel, või teiste Fc retseptorite, näiteks Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB jne suhtes.
- 25
- [0117] Ühes konkreetses teostuses on antikeha tuletatud hiire monoklonaalsest antikehast, mis on toodetud hübriidoomi klooni poolt, millel on ATCC registreerimisnumber PTA-7610. Hübriidoomid, mis toodavad antikehi 8B5.3.4, deponeeriti Ameerika tüüpkultuuride kollektsioonis (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110–2209) 23. mail 2006
- 30 mikroorganismide patendiekspertiisiks deponeerimise rahvusvahelise tunnustamise Budapesti lepingu kohaselt ja neile määrati registreerimisnumber PTA-7610 (hübriidoomi jaoks, mis toodab 8B5.3.4 antikeha). Ühes konkreetses teostuses hõlmab leiutis antikeha, millel on raske ahela varieeruv piirkond aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 4, ja kerge

ahela varieeruv piirkond aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 3. Ühes eelistatud teostuses on leiutisekohased antikehad inimese või humaniseeritud antikehad, eelistatult hübriidoomi kloonid 8B5.3.4 poolt toodetud antikeha humaniseeritud versioon.

- 5 [0118] Leiutiskirjeldus hõlmab ka teiste antikehade, eelistatult monoklonaalsete antikehade või nende fragmentide kasutamist, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d, eelistatult inimese Fc γ RIIB-d, enam eelistatult looduslikku inimese Fc γ RIIB-d, ning mis on tuletatud kloonidest, mille hulka kuuluvad mittepiiravalt 2B6 ja 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 ja 1F2, millel on vastavalt ATCC registreerimisnumbrid PTA-4591, PTA-4592, 10 PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959. 2B6 ja 3H7 kloone tootvad hübriidoomid deponeeriti vastavalt Budapesti lepingule Ameerika tüüpkultuuride kollektsioonis (10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110–2209) 13. augustil 2002, ja need on siin viitega hõlmatud. 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 ja 1F2 kloone tootvad hübriidoomid deponeeriti vastavalt Budapesti lepingule Ameerika tüüpkultuuride kollektsioonis (10801 15 University Blvd., Manassas, VA. 20110–2209) 7. mail 2004. Eelistatud teostustes on eespool kirjeldatud antikehad kimäärsed või humaniseeritud.

- [0119] Kirjeldatud meetodites kasutatud konkreetne antikeha on selline antikeha või selle antigeeni siduv fragment (näiteks sisaldab ühte või mitut komplementaarsust määravat 20 piirkonda (CDR-i), eelistatult kõiki kuut CDR-i), mida toodab kloon 8B5.3.4 ATCC registreerimisnumbriga PTA-7610 (näiteks raske ahela CDR3). Kirjeldatud meetodites kasutatud edasine konkreetne antikeha on selline antikeha või selle antigeeni siduv fragment (näiteks sisaldab ühte või mitut komplementaarsust määravat piirkonda (CDR- 25 i), eelistatult kõiki kuut CDR-i), mida toodab kloon 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 ja 1F2, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959 (näiteks raske ahela CDR3). Antikehad või nende antigeeni siduvad fragmentid, mis sisaldavad vähem kui 6 CDR-i ja millel on kõrge afiinsus ja spetsiifilisus konkreetse antigeeni suhtes ning selliste antikehade tootmise ja tuvastamise meetodid on tehnika tasemes üldtuntud (vt näiteks Ward *et al.*, 30 1989, *Nature* 341: 544–546; Dumoulin *et al.*, 2002, *Protein Sci.* 11: 500–515; Davies *et al.*, 1995, *Bio/Technol.* 13: 475–479; Van den Beucken *et al.*, 2001, *J. Mol. Biol.* 310: 591–601; ja Pereira *et al.*, 1998, *Biochem.* 37: 1430–1437). Antikehi, mis on spetsiifilised konkreetse antigeeni suhtes ning mille genereerimiseks kombineeriti üks või kaks CDR-i

antikehast, mis teadaolevalt seondub spetsiifiliselt antigeeni teiste CDR-idega, on kirjeldatud ja need on tehnika tasemes üldtuntud (vt näiteks Marks *et al.*, 1992, *Bio/Technol.* 10: 779–783; Klimka *et al.*, 2000, *Brit. J. Cancer* 83(2): 252–260; ja Rader *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8910–8915). Seega on leiutiskirjelduses võimalikud antikehad, millel on üks, kaks, kolm, neli või viis klooni 8B5.3.4 CDR-i, mis seovad Fc γ RIIB-d spetsiifiliselt ja mille tuvastamiseks võib kasutada siin avaldatud sõelumismeetodeid.

[0120] Ühes teostuses on leiutisekohane antikeha fragment polüpeptiid, mis sisaldab ühte või mitut antikeha CDR-i, mis on toodetud klooni 8B5.3.4 poolt, millel on ATCC registreerimisnumber PTA-7610 (näiteks raske ahela CDR3), mis seob spetsiifiliselt loodusliku inimese Fc γ RIIB rakuvälist domeeni suurema afiinsusega, kui nimetatud polüpeptiid seob looduslikku inimese Fc γ RIIA-d. Polüpeptiid võib sisaldada aminohappejärjestust SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 või nende mis tahes kombinatsiooni (vt näiteks Davies *et al.*, 1995, *Bio/Technol.* 13: 475–479; Pereira *et al.*, 1998, *Biochemistry* 37: 1430–1437; Tsumoto *et al.*, 2002, *FEBS Letters* 525: 77–82; van den Beucken *et al.*, 2001, *J. Mol. Biol.* 310: 591–601; Ward *et al.*; 1989, *Nature* 341: 544–546; ja Dumoulin *et al.*, 2002, *Protein Sci.* 11: 500–515).

20

[0121] Siin kirjeldatud meetodites kasutatud antikeha võib seonduda sama epitoobiga nagu hiire monoklonaalne antikeha, mis on toodetud klooni 8B5.3.4 poolt, millel on vastavalt ATCC registreerimisnumber PTA-7610, ja/või see konkureerib hiire monoklonaalse antikehaga, mis on toodetud klooni 8B5.3.4 poolt, millel on vastavalt ATCC registreerimisnumber PTA-7610, vastavalt näiteks ELISA analüüsis või muus sobivas konkureerivas immuunanalüüsis kindlaks määratule, ning see seob ka Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d. Siin kirjeldatud meetodites kasutatud antikeha võib seonduda sama epitoobiga nagu hiire monoklonaalne antikeha, mis on toodetud hübriidoomi kloonide 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 ja 1F2 poolt, millel on vastavalt ATCC registreerimisnumbrid PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959, ja/või see konkureerib hiire monoklonaalse antikehaga, mis on toodetud klooni 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 ja 1F2 poolt, millel on vastavalt ATCC registreerimisnumbrid PTA-4591, PTA-4592,

30

PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959, vastavalt näiteks ELISA analüüsis või muus sobivas konkureerivas immuunanalüüsis kindlaks määratule, ning see seob ka Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d.

5

[0122] Leiutiskirjeldus hõlmab ka antikehi või nende fragmente, mis sisaldavad varieeruva raske ahela ja/või varieeruva kerge ahela aminohappejärjestust, mis on vähemalt 45%, vähemalt 50%, vähemalt 55%, vähemalt 60%, vähemalt 65%, vähemalt 70%, vähemalt 75%, vähemalt 80%, vähemalt 85%, vähemalt 90%, vähemalt 95% või vähemalt 99% ulatuses identne hiire monoklonaalse antikeha varieeruva raske ahela ja/või varieeruva kerge ahela aminohappejärjestusega, mis on toodetud klooni 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2 poolt, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959. Leiutiskirjeldus hõlmab lisaks antikehi või nende fragmente, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d, nimetatud antikehad või antikeha fragmendid sisaldavad ühe või mitme CDR-i aminohappejärjestust, mis on vähemalt 45%, vähemalt 50%, vähemalt 55%, vähemalt 60%, vähemalt 65%, vähemalt 70%, vähemalt 75%, vähemalt 80%, vähemalt 85%, vähemalt 90%, vähemalt 95% või vähemalt 99% ulatuses identne hiire monoklonaalse antikeha ühe või mitme CDR-i aminohappejärjestusega, mis on toodetud klooni 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2 poolt, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959. Kahe aminohappejärjestuse identsuse protsendi kindlaks määramiseks võib kasutada mis tahes valdkonna asjatundjale tuntud meetodit, sealhulgas BLAST valgu-uuringuid.

[0123] Leiutiskirjeldus hõlmab ka antikehade või antikeha fragmentide kasutamist, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikehad või nende fragmendid seovad Fc γ RIIA-d, kus nimetatud antikehasid või antikeha fragmente kodeerib nukleotiidne järjestus, mis hübriidiseerub rangetes tingimustes hiire monoklonaalse antikeha nukleotiidseks järjestuseks, mis on toodetud klooni 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2 poolt, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-

30

5960 ja PTA-5959. Ühel eelistatud juhul pakutakse leiutises antikehi või nende fragmente, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikehad või nende fragmendid seovad Fc γ RIIA-d, nimetatud antikehad või antikeha fragmendid sisaldavad varieeruvat kerget ahelat ja/või varieeruvat rasket ahelat, mida kodeerib nukleotiidne järjestus, mis hübridiseerub rangetes tingimustes hiire monoklonaalse antikeha varieeruva kerge ahela ja/või varieeruva raske ahela nukleotiidseks järjestuseks, mis on toodetud klooni 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2 poolt, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959. Ühel teisel eelistatud juhul pakutakse leiutises antikehi või nende fragmente, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikehad või nende fragmendid seovad Fc γ RIIA-d, nimetatud antikehad või antikeha fragmendid sisaldavad ühte või mitut CDR-i, mida kodeerib nukleotiidne järjestus, mis hübridiseerub rangetes tingimustes hiire monoklonaalse antikeha ühe või mitme CDR-i nukleotiidseks järjestuseks, mis on toodetud klooni 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2 poolt, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959. Rangete hübridisatsioonitingimuste hulka kuuluvad mittepiiravalt hübridisatsioon filtriga seotud DNA-ga 6 korda naatriumkloriidis / naatriumtsitraadis (SSC) temperatuuril ligikaudu 45 °C, millele järgneb üks või mitu pesu 0,2 \times SSC-s / 0,1% SDS-is temperatuuril ligikaudu 50–65°C; äärmiselt ranged tingimused, näiteks hübridisatsioon filtriga seotud DNA-ga 6 \times SSC-s temperatuuril ligikaudu 45 °C, millele järgneb üks või mitu pesu 0,1 \times SSC-s / 0,2% SDS-is temperatuuril ligikaudu 60 °C; või mis tahes muud valdkonna asjatundjatele tuntud ranged hübridisatsioonitingimused (vt näiteks Ausubel, F.M. *et al.* (toim.) 1989, „Current Protocols in Molecular Biology”, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. ja John Wiley and Sons, Inc., NY, lk 6.3.1 kuni 6.3.6 ja 2.10.3).

[0124] Antikeha konstantsed domeenid võivad olla valitud seoses pakutud antikeha funktsiooniga, eelkõige seoses efektorfunktsiooniga, mis võib olla vajalik. Osades teostustes on antikehade konstantsed domeenid inimese IgA, IgE, IgG või IgM domeenid.

[0125] Siin kirjeldatud meetodites kasutatud antikehade hulka võivad kuuluda derivaadid, mis on modifitseeritud, st mis tahes tüüpi molekuli antikehaga kovalentse sidumise teel.

Näiteks hõlmavad antikeha derivaadid mittepiiravalt antikehi, mida on modifitseeritud näiteks glükosüülimise, atsetüülimise, pegüülimise, fosforüülimise, amideerimise, tuntud kaitse/blokeerimisrühmadega derivatiseerimise, proteolüütilise lõhustamise, raku ligandi või muu valguga sidumise teel jne. Tuntud meetoditel, mis hõlmavad mittepiiravalt spetsiifilist keemilist lõhustamist, atsetüülimist, formüülimist, tunikamütsiini metabolismet sünteesi jne, on võimalik läbi viia terve rida keemilisi modifikatsioone. Derivaat võib ühtlasi sisaldada üht või mitut mitteklassikalist aminohapet.

[0126] Lisaks võib leiutisekohaseid antikehi omakorda kasutada idiotüübi vastaste antikehade genereerimiseks, kasutades selleks valdkonna asjatundjatele hästi tuntud tehnikaid. (Vt näiteks Greenspan ja Bona, 1989, *FASEB J.* 7: 437–444; ja Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147: 2429–2438). Leiutiskirjelduse pakutakse meetodeid, milles kasutatakse polinukleotiide, mis sisaldavad leiutisekohast antikeha või selle fragmenti kodeerivat nukleotiidset järjestust.

15

[0127] Siin kirjeldatud meetodid hõlmavad ka antikehade või nende fragmentide kasutamist, mille poolestusajad (näiteks seerumi poolestusajad) imetaja, eelistatult inimese organismis on pikemad kui 15 päeva, pikemad kui 20 päeva, pikemad kui 25 päeva, pikemad kui 30 päeva, pikemad kui 35 päeva, pikemad kui 40 päeva, pikemad kui 45 päeva, pikemad kui 2 kuud, pikemad kui 3 kuud, pikemad kui 4 kuud või pikemad kui 5 kuud. Leiutisekohaste antikehade või nende fragmentide pikemad poolestusajad imetaja, eelistatult inimese organismis annavad tulemuseks nimetatud antikehade või antikeha fragmentide kõrgemad seerumi tiitrid imetaja organismis ning selle tulemusel väheneb nimetatud antikehade või antikeha fragmentide manustamise sagedus ja/või väheneb nimetatud manustatavate antikehade või antikeha fragmentide kontsentratsioon. Antikehi või nende fragmente, millel on pikemad *in vivo* poolestusajad, saab genereerida valdkonna asjatundjatele tuntud tehnikate abil. Näiteks võib antikehade või nende fragmentide genereerimiseks, millel on pikemad *in vivo* poolestusajad, modifitseerida (näiteks asendada, deleteerida või lisada) aminohappejääke, mille puhul on tuvastatud, et need osalevad Fc domeeni ja FcRn retseptori vahelises interaktsioonis. Leiutisekohaseid antikehi võib töödelda meetodite abil, mida on kirjeldanud Ward *et al.*, et pikendada nende bioloogilisi poolestusaegu (vt USA patent nr 6 277 375 B1). Näiteks võib leiutisekohaseid

30

antikehi töödelda Fc-liigenddomeenis, et saada pikemad *in vivo* või seerumi poolestusajad.

5 [0128] Antikehade või nende fragmentide genereerimiseks, millel on pikemad *in vivo* poolestusajad, võib siduda nimetatud antikehade või antikeha fragmentide külge polümeeri molekule, näiteks kõrge molekulmassiga polüetüleenglükooli (PEG). PEG võib siduda nimetatud antikehade või antikeha fragmentide külge multifunktsionaalse linkeriga või ilma selleta PEG-i nimetatud antikehade või antikeha fragmentide N- või C-otsaga saitspetsiifilise konjugeerimise kaudu või lüsiinijääkidel olevate epsilon-aminorühmade 10 kaudu. Selleks kasutatakse hargnemata või hargnenud ahelaga polümeeri deriveerimist, mille tulemuseks on minimaalne bioaktiivsuse kadu. Konjugeerimise määra jälgitakse hoolikalt SDS-PAGE-i ja massispektromeetria abil, et tagada PEG-i molekulide sobiv konjugeerimine antikehadega. Reageerimata PEG-i võib eraldada antikeha-PEG-i konjugaatidest näiteks suuruseraldus- või ionvahetuskromatograafia abil.

15

[0129] Leiutisekohaseid antikehi võib modifitseerida ka meetodite ja sidumisainetega, mida on kirjeldanud Davis *et al.* (vt patent US 4 179 337), et pakkuda kompositsioone, mida saab süstida imetaja vereringesse sisuliselt immunogeense reaktsioonita.

20 [0130] Leiutiskirjeldus hõlmab ka antikehade või antikeha fragmentide kasutamist, mis sisaldavad mis tahes leiutisekohaste antikehade aminohappejärjestust koos mutatsioonidega (näiteks ühe või mitme aminohappe asendusega) raamistikus või CDR-piirkondades. Eelistatult säilitavad või parandavad nendes antikehades sisalduvad mutatsioonid antikehade aviidsust ja/või afiinsust FcγRIIIB suhtes, millega need 25 immunospetsiifiliselt seonduvad. Selleks, et analüüsida antikeha afiinsust konkreetse antigeeni suhtes, võib kasutada valdkonna asjatundjatele tuntud standardseid tehnikaid (näiteks immuunanalüüse).

30 [0131] Samuti on kirjeldatud leiutisekohase antikeha efektorfunktsiooni modifitseerimise meetodeid, kus nimetatud meetod hõlmab antikeha süsivesikute sisalduse modifitseerimist, kasutades selleks siin avaldatud või tehnika tasemes tuntud meetodeid.

[0132] Antikeha või selle fragmenti kodeeriva nukleotiidsse järjestusse mutatsioonide sisestamiseks võib kasutada valdkonna asjatundjatele tuntud standardseid tehnikaid, sealhulgas näiteks saitsuuna-mutageneesi ja PCR-i vahendatud mutageneesi, mis annab tulemuseks aminohappe asendused. Eelistatult sisaldavad derivaadid vähem kui 5 aminohappe asendust, vähem kui 10 aminohappe asendust, vähem kui 5 aminohappe asendust, vähem kui 4 aminohappe asendust, vähem kui 3 aminohappe asendust või vähem kui 2 aminohappe asendust võrreldes algse antikeha või selle fragmendiga. Ühes eelistatud teostuses on derivaatidel konservatiivsed aminohappe asendused, mis on tehtud ühte või mitmesse prognoositud asendatavasse aminohappejääki.

10

[0133] Osades kasutusvaldkondades, sealhulgas antikehade *in vivo* kasutamisel inimese organismis ja *in vitro* tuvastusanalüüsid, võib olla eelistatav kasutada inimese, kimäärseid või humaniseeritud antikehi. Inimestest ravialuste ravimiseks on eriti soovitatavad täielikult inimese antikehad. Inimese antikehi võib valmistada mitmete tehnika tasemes tuntud meetodite, sealhulgas eespool kirjeldatud faagidisplei meetodite abil, milles kasutatakse inimese immunoglobuliini järjestustest tuletatud antikehade kogusid. Vt ka USA patendid nr 4 444 887 ja 4 716 111; ja rahvusvahelised publikatsioonid nr WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 ja WO 91/10741.

20

5.1.1. Humaniseeritud antikehad

[0134] Eelistatud teostustes on antikehad humaniseeritud antikehad. Humaniseeritud antikeha on antikeha, selle variant või fragment, mis on suuteline seonduma eelnevalt kindlaks määratud antigeeniga ja mis sisaldab raampirkonda, millel on sisuliselt inimese immunoglobuliini aminohappejärjestus, ja CDR-i, millel on sisuliselt mitteinimese immunoglobuliini aminohappejärjestus. Fc γ RIIB-spetsiifiline humaniseeritud antikeha võib sisaldada sisuliselt kõiki vähemalt ühest ja tüüpiliselt kahest varieeruvast domeenist, milles kõik või sisuliselt kõik CDR-piirkonnad vastavad mitteinimese immunoglobuliini (st doonori antikeha) omadele ja kõik või sisuliselt kõik raampiirkonnad on inimese immunoglobuliini konsensusjärjestuse omad. Eelistatult sisaldab leiutisekohane humaniseeritud antikeha ka vähemalt osa immunoglobuliini konstantsest piirkonnast (Fc),

30

tüüpiliselt inimese immunoglobuliini omast. Leiutisekohaste humaniseeritud antikehade konstantsed domeenid võivad olla valitud seoses pakutud antikeha funktsiooniga, eelkõige seoses efektorfunktsiooniga, mis võib olla vajalik. Osades teostustes on leiutisekohaste humaniseeritud antikehade konstantsed domeenid inimese IgA, IgE, IgG või IgM domeenid. Ühes spetsiifilises teostuses, mis kuulub määratletud patendinõudluse ulatusse, kasutatakse inimese IgG konstantseid domeene, eelkõige IgG1 ja IgG3 isotüübi omasid, kui leiutisekohased humaniseeritud antikehad on mõeldud terapeutiliste kasutusvaldkondade jaoks ja antikeha efektorfunktsioonid on vajalikud. Alternatiivsetes teostustes kasutatakse IgG2 ja IgG4 isotüüpi, kui leiutisekohane humaniseeritud antikeha on mõeldud terapeutiliste eesmärkide jaoks ja antikeha efektorfunktsioonid ei ole vajalikud. Fc γ RIIB-spetsiifilised humaniseeritud antikehad on avaldatud USA eeltaotlustes nr 60/569 882 ja 60/582 043, mis on sisse antud vastavalt 10. mail 2004 21. juunil 2004, ning USA patenditaotluses nr 11/126 978, mis on sisse antud 10. mail 2005.

15

[0135] Osades teostustes sisaldab antikeha nii kerget ahelat kui ka vähemalt raske ahela varieeruvat domeeni. Teistes teostustes võib antikeha sisaldada lisaks ühte või mitut raske ahela CH1-, liigend-, CH2-, CH3- ja CH4-piirkonda. Humaniseeritud antikeha võib olla valitud mis tahes immunoglobuliinide klassist, mille hulka kuuluvad IgM, IgG, IgD, IgA ja IgE, ja mis tahes isotüübist, mille hulka kuuluvad IgG₁, IgG₂, IgG₃ ja IgG₄. Osades teostustes on konstantne domeen kompleменти fikseeriv konstantne domeen, kui on soovitatav, et humaniseeritud antikeha näitaks tsütotoksilist toimet, ning nimetatud klass on tüüpiliselt IgG₁. Teistes teostustes, kus selline tsütotoksiline toime ei ole soovitatav, võib konstantne domeen olla IgG₂ klassist. Humaniseeritud antikeha võib sisaldada järjestusi rohkem kui ühest klassist või isotüübist ning soovitud efektorfunktsioonide optimeerimiseks konkreetsete konstantsete domeenide valimine kuulub asjatundja pädevusse.

25

[0136] Humaniseeritud antikeha raamistik ja CDR-piirkonnad ei pruugi täpselt vastata lähtejärjestustele, näiteks võivad doonori CDR- või konsensusraamistik olla mutageniseeritud vähemalt ühe jäägi asendamise, sisestamise või deletsiooni teel, nii et CDR-i või raamistiku jääk selles saidis ei pruugi vastata konsensusjärjestusele või doonori antikehale. Eelistatult ei ole sellised mutatsioonid ulatuslikud. Tavaliselt vastab vähemalt

30

75%, sagedamini 90% ja enim eelistatult rohkem kui 95% humaniseeritud antikeha jääkidest lähte-raampiirkonna (FR) ja CDR-i järjestuste omadele. Humaniseeritud antikehade valmistamiseks võib kasutada mitmeid tehnika tasemes tuntud tehnikaid, sealhulgas mittepiiravalt CDR-i pookimist (Euroopa patent nr EP 239 400; 5 rahvusvaheline publikatsioon nr WO 91/09967; ja USA patendid nr 5 225 539, 5 530 101 ja 5 585 089), väliskihi muutmist (*veneering*) või katmist (*resurfacing*) (Euroopa patendid nr EP 592 106 ja EP 519 596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489–498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6): 805–814; ja Roguska *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 969–973), ahela kokkulohistamist (USA patent nr 5 565 332), ja 10 tehnikaid, mis on avaldatud näiteks publikatsioonides USA patendid nr 6 407 213, 5 766 886, 5 585 089, rahvusvaheline publikatsioon nr WO 9317105, Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.* 169: 1119–1125, Caldas *et al.*, 2000, *Protein Eng.* 13: 353–360, Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20: 267–279, Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 10 678 – 10 684, Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9: 895–904, Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55 (23 15 Supp): 5973s–5977s, Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.* 55: 1717–1722, Sandhu, 1994, *Gene* 150: 409–410, Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235: 959–973, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522–525, Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323, ja Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593–596. Sageli asendatakse raampiirkonnas raamjäägid antigeeni sidumise muutmiseks, eelistatult parandamiseks, CDR-i doonori antikeha vastava jäägiga. Sellised 20 raamistiku asendused on tuvastatavad tehnika tasemes üldtuntud meetodite abil, näiteks CDR-i ja raamjääkide interaktsioonide modelleerimisega, et tuvastada antigeeni sidumise seisukohast olulised jäägid, ning järjestuste võrdlemisega, et tuvastada konkreetsetes positsioonides ebatavalised raamjäägid. (Vt näiteks Queen *et al.*, USA patent nr 5 585 089; USA publikatsioonid nr 2004/0049014 ja 2003/0229208; USA patendid 25 nr 6 350 861; 6 180 370; 5 693 762; 5 693 761; 5 585 089; ja 5 530 101 ja Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323).

[0137] Leiutiskirjelduses pakutakse Fc γ RIIB suhtes spetsiifiliste humaniseeritud antikeha molekulide kasutamist, milles inimese antikeha (vastuvõtja antikeha) raske ja/või kerge 30 ahela varieeruvate piirkondade ühe või mitme CDR-i üks või mitu piirkonda on asendatud doonori monoklonaalse antikeha ühe või mitme CDR-i analoogse osaga, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega kui Fc γ RIIA-d, näiteks monoklonaalne antikeha, mis on toodetud klooni 8B5.3.4 poolt, millel on vastavalt ATCC

registreerimisnumber PTA-7610. Teistel juhtudel seonduvad humaniseeritud antikehad sama epitoobiga nagu 8B5.3.4 antikeha. Enim eelistatud juhul seondub humaniseeritud antikeha spetsiifiliselt sama epitoobiga nagu hiirest doonori antikeha. Valdkonna asjatundjale on arusaadav, et leiutis hõlmab antikehade CDR-pookimist üldiselt. Seega

5 võivad doonor- ja aktseptorantikehad olla tuletatud samasse liiki kuuluvatest loomadest ja isegi samast antikehade klassist või alamklassist. Sagedamini on doonor- ja aktseptorantikehad tuletatud siiski erinevatesse liikidesse kuuluvatest loomadest. Tüüpiliselt on doonori antikeha mitteinimese antikeha, näiteks närilise monoklonaalne antikeha, ja aktseptorantikeha on inimese antikeha.

10

[0138] Osadel juhtudel on vähemalt üks doonori antikehast pärit CDR poogitud inimese antikehale. Teistel juhtudel on iga raske ja/või kerge ahela varieeruva piirkonna vähemalt kaks ja eelistatult kõik kolm CDR-i poogitud inimese antikehale. CDR-id võivad hõlmata Kabati CDR-e, struktuurse lingu CDR-e või nende kombinatsiooni. Osadel juhtudel

15 hõlmab leiutiskirjeldus Fc γ RIIB humaniseeritud antikeha, mis sisaldab vähemalt ühte CDR-poogitud rasket ahelat ja vähemalt ühte CDR-poogitud kerget ahelat.

20

[0139] Ühes eelistatud teostuses on Fc γ RIIB-spetsiifilise humaniseeritud antikeha CDR-piirkonnad tuletatud Fc γ RIIB-spetsiifilisest hiire antikehast. Osades teostustes sisaldavad

20 siin kirjeldatud humaniseeritud antikehad muutusi, sealhulgas mittepiiravalt aminohappe deletsioone, insertioone, modifikatsioone aktseptorantikehas, st inimese raske ja/või kerge ahela varieeruva domeeni raampiirkondades, mis on vajalikud doonori monoklonaalse antikeha sidumisspetsiifilisuse säilitamiseks. Osades teostustes ei koosne

25 siin kirjeldatud humaniseeritud antikehade raampiirkonnad tingimata täpsest looduslikult esineva inimese antikeha varieeruva piirkonna raampiirkonna aminohappejärjestusest, vaid sisaldab erinevaid muutusi, sealhulgas mittepiiravalt aminohappe deletsioone, insertioone, modifikatsioone, mis muudavad humaniseeritud antikeha omadust, näiteks parandavad humaniseeritud antikeha piirkonna sidumisomadusi, mis on spetsiifiline sama

30 märklaua suhtes nagu Fc γ RIIB-spetsiifiline hiire antikeha. Enim eelistatud teostustes on raampiirkonda tehtud minimaalne arv muutusi, et vältida mitteinimese raamjääkide suuremahulisi sisestamisi ja tagada humaniseeritud antikehade minimaalne immunogeensus inimese organismis. Doonori monoklonaalne antikeha on eelistatult

monoklonaalne antikeha, mis on toodetud klooni 8B5.3.4 poolt (millel on ATCC registreerimisnumber PTA-7610) ja mis seob Fc γ RIIB-d.

[0140] Ühel spetsiifilisel juhul hõlmab leiutiskirjeldus CDR-poogitud antikeha kasutamist, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha seob Fc γ RIIA-d, kus CDR-poogitud antikeha sisaldab raske ahela varieeruva piirkonna domeeni, mis sisaldab vastuvõtja antikeha raamjääke ja doonori monoklonaalsest antikehast pärit jääke, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha seob Fc γ RIIA-d, näiteks monoklonaalne antikeha, mis on toodetud klooni 8B5.3.4 poolt. Ühel teisel spetsiifilisel juhul hõlmab leiutiskirjeldus CDR-poogitud antikeha kasutamist, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha seob Fc γ RIIA-d, kus CDR-poogitud antikeha sisaldab kerge ahela varieeruva piirkonna domeeni, mis sisaldab vastuvõtja antikeha raamjääke ja doonori monoklonaalsest antikehast pärit jääke, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha seob Fc γ RIIA-d, näiteks monoklonaalne antikeha, mis on toodetud kloonide 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2 poolt.

[0141] Eelistatult seovad humaniseeritud antikehad loodusliku inimese Fc γ RIIB rakuvälise domeeni. Leiutiskirjelduse kohastel Fc γ RIIB vastastel antikehadel võib olla raske ahela varieeruv piirkond, mis sisaldab CDR1 (SEQ ID NO: 8) ja/või CDR2 (SEQ ID NO: 9) ja/või CDR3 aminohappejärjestust (SEQ ID NO: 10) ja/või kerge ahela varieeruv piirkond, mis sisaldab CDR1 (SEQ ID NO: 5) ja/või CDR2 (SEQ ID NO: 6) ja/või CDR3 aminohappejärjestust (SEQ ID NO: 7).

25

[0142] Ühel spetsiifilisel juhul hõlmab leiutiskirjeldus humaniseeritud antikeha kasutamist, mis sisaldab 8B5.3.4 antikeha CDR-e, B-rakulise pahaloomulise kasvaja või selle ühe või mitme sümptomi ennetamisel, ravimisel, kontrolli all hoidmisel või paremaks muutmisel. Konkreetsemalt öeldes kasutatakse antikeha, millel on raske ahela varieeruv domeen aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 4, ja kerge ahela varieeruv domeen aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 3, B-rakulise pahaloomulise kasvaja või selle ühe või mitme sümptomi ennetamisel, ravimisel, kontrolli all hoidmisel või paremaks

30

muutmisel. Veel ühel teisel eelistatud juhul ei seo humaniseeritud antikehad lisaks Fc aktivatsioonireseptoreid, näiteks Fc γ IIIa, Fc γ IIb jne.

- [0143]** Ühel spetsiifilisel juhul pakutakse humaniseeritud 8B5.3.4 antikeha, kus VH piirkond koosneb FR segmentidest, mis on pärit inimese idutee VH segmentist VH1–18 (Matsuda *et al.*, 1998, *J. Exp. Med.* 188: 2151062) ja JH6 (Ravetch *et al.*, 1981, *Cell* 27(3 Pt. 2): 583–591), ja 8B5.3.4 antikeha ühest või mitmest VH CDR-piirkonnast, millel on aminohappejärjestus SED ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 või SEQ ID NO: 10. Ühel teisel spetsiifilisel juhul sisaldab humaniseeritud 8B5.3.4 antikeha lisaks VL-piirkonda, mis koosneb FR segmentidest, mis on pärit inimese idutee VL-segmentist VK-A26 (Lautner-Rieske *et al.*, 1992, *Eur. J. Immunol.* 22: 1023–1029) ja JK4 (Hieter *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 1516–1522), ja 8B5.3.4 antikeha ühest või mitmest VL-i CDR-piirkonnast, millel on aminohappejärjestus SED ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 või SEQ ID NO: 7.
- [0144]** Konkreetsemalt öeldes pakutakse humaniseeritud antikeha, mis seondub immunospetsiifiliselt loodusliku inimese Fc γ RIIB rakuvälise domeeniga, nimetatud antikeha sisaldab 8B5.3.4 antikeha CDR järjestusi (või alternatiivselt koosneb nendest) mis tahes alljärgnevatel kombinatsioonides: VH CDR1 ja VL CDR1; VH CDR1 ja VL CDR2; VH CDR1 ja VL CDR3; VH CDR2 ja VL CDR1; VH CDR2 ja VL CDR2; VH CDR2 ja VL CDR3; VH CDR3 ja VH CDR1; VH CDR3 ja VL CDR2; VH CDR3 ja VL CDR3; VH1 CDR1, VH CDR2 ja VL CDR1; VH CDR1, VH CDR2 ja VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2 ja VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3 ja VL CDR1, VH CDR2, VH CDR3 ja VL CDR2; VH CDR2, VH CDR2 ja VL CDR3; VH CDR1, VL CDR1 ja VL CDR2; VH CDR1, VL CDR1 ja VL CDR3; VH CDR2, VL CDR1 ja VL CDR2; VH CDR2, VL CDR1 ja VL CDR3; VH CDR3, VL CDR1 ja VL CDR2; VH CDR3, VL CDR1 ja VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 ja VL CDR1; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 ja VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 ja VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1 ja VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1 ja VL CDR3; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1 ja VL CDR2; VH CDR1, VH CDR3, VL CDR1 ja VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 ja VL CDR2; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 ja VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR2 ja VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 ja VL CDR2; VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1 ja VL CDR3; VH CDR1, VH CDR2, VL CDR1, VL CDR2 ja VL CDR3; VH CDR1, VH

CDR3, VL CDR1, VL CDR2, ja VL CDR3; VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 ja VL CDR3; või mis tahes siin avaldatud VH CDR-ide ja VL CDR-ide kombinatsioone.

5.1.2. Inimese antikehad

5 [0145] Inimese antikehade tootmiseks võib kasutada ka transgeenseid hiiri, mis ei ole suutelised ekspresseerima funktsionaalseid endogeenseid immunoglobuliine, kuid mis suudavad ekspresseerida inimese immunoglobuliini gene. Näiteks võib hiire embrüo tüvirakkudesse juhuslikkuse alusel või homoloogse rekombinantsiooni teel viia inimese raske ja kerge ahela immunoglobuliini geenikompleksid. Alternatiivselt võib hiire
10 embrüonaalsetesse tüvirakkudesse sisestada lisaks inimese raske ja kerge ahela geenidele ka inimese varieeruva piirkonna, konstantse piirkonna ja mitmekesisuse piirkonna. Hiire raske ja kerge ahela immunoglobuliini geenid võib muuta mittefunktsionaalseteks eraldi või inimese immunoglobuliini lookuste sisestamisega samaaegselt homoloogse rekombineerimise teel. Konkreetsemalt takistab endogeensete antikehade tootmist J_H
15 piirkonna homosügootne deletsioon. Modifitseeritud embrüonaalsed tüvirakud laiendatakse ja sisestatakse mikrosüstimise teel blastotsüstidesse kimäärsete hiirte tootmiseks. Seejärel paljundatakse kimäärseid hiiri selleks, et saada inimese antikehi ekspresseerivaid homosügootseid järglasi. Transgeensed hiired immuniseeritakse tavapäraseid metodoloogiaid kasutades valitud antigeeni, näiteks kogu leiutisekohase
20 polüpeptiidi või selle osaga. Antigeeni vastu suunatud monoklonaalseid antikehi võib saada immuniseeritud transgeensetelt hiirtelt tavapärasest hübriidoomi tehnoloogiat kasutades. Transgeensetes hiirtes sisalduvad inimese immunoglobuliini transgeenid paigutatakse ümber B-raku diferentseerumise ajal ning seejärel läbivad need klassivahetuse ja somaatilise mutatsiooni. Seega on sellist tehnikat kasutades võimalik
25 toota terapeutiliselt kasulikke IgG, IgA, IgM ja IgE antikehi. Selle inimese antikehade tootmiseks kasutatava tehnoloogia ülevaadet vt publikatsioonist Lonberg ja Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65–93). Üksikasjalikku kirjeldust selle inimese antikehade ja inimese monoklonaalsete antikehade tootmiseks kasutatava tehnoloogia kohta ja selliste antikehade tootmise protokolle vt näiteks rahvusvahelistest publikatsioonidest nr WO
30 98/24893, WO 96/34096, ja WO 96/33735; ja USA patentidest nr 5 413 923, 5 625 126, 5 633 425, 5 569 825, 5 661 016, 5 545 806, 5 814 318, ja 5 939 598. Lisaks võib kaasata

selliseid ettevõtteid, nagu näiteks Abgenix, Inc. (Freemont, CA) ja Medarex (Princeton, NJ), et pakkuda valitud antigeeni vastu suunatud inimese antikehi, kasutades selleks tehnoloogiat, mis sarnaneb eespool kirjeldatuga.

5 **5.1.3. Kimäärsed antikehad**

[0146] Kimäärne antikeha on molekul, milles antikeha erinevad osad on tuletatud erinevatest immunoglobuliini molekulidest, näiteks antikeha, millel on mitteinimese antikehast saadud varieeruv piirkond ja inimese immunoglobuliini konstantne piirkond. Leiutiskirjelduses pakutakse kimäärsed antikehi, mis on tuletatud hübriidoomi kloonidest

10 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2 toodetud antikehadest, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959. Kimäärsete antikehade tootmise meetodid on tehnika tasemes teada. Vt näiteks Morrison, 1985, *Science* 229: 1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4: 214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods* 125: 191–202;

15 ja USA patendid nr 6 311 415, 5 807 715, 4 816 567, ja 4 816 397. Kimäärsete antikehade tootmiseks, mis sisaldavad ühte või mitut CDR-i mitteinimese liikidelt ja raampiirkondi inimese immunoglobuliini molekulist, võib kasutada mitmeid tehnika tasemes tuntud tehnikaid, sealhulgas näiteks CDR-pookimist (EP 239 400; rahvusvaheline publikatsioon nr WO 91/09967; ja USA patendid nr 5 225 539, 5 530 101, ja 5 585 089), väliskihi

20 muutmist või katmist (EP 592 106; EP 519 596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489–498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7: 805; ja Roguska *et al.*, 1994, *PNAS* 91: 969) ja ahela kokkulohistamist (patent US 5 565 332).

[0147] Sageli asendatakse raampiirkonnas raamjäägid antigeeni sidumise muutmiseks, eelistatult parandamiseks, CDR-i doonori antikeha vastava jäägiga. Sellised raamistiku

25 asendused on tuvastatavad tehnika tasemes üldtuntud meetodite abil, näiteks CDR-i ja raamjääkide interaktsioonide modelleerimisega, et tuvastada antigeeni sidumise seisukohast olulised jäägid, ning järjestuste võrdlemisega, et tuvastada konkreetsetes positsioonides ebatavalised raamjäägid. (Vt näiteks patent US 5 585 089; ja Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323).

30

5.1.4. Fc piirkonna modifikatsioonid

- [0148]** Leiutis hõlmab Fc konstantsete domeenidega antikehi, mis sisaldavad ühte või mitut aminohappe modifikatsiooni, mis muudavad antikeha efektorfunktsioone, näiteks selliseid, mis on avaldatud USA patenditaotluse publikatsioonides nr U.S. 2005/0037000 ja U.S. 2005/0064514; USA patentides nr 5 624 821 ja 5 648 260 ja Euroopa patendis nr EP 0 307 434. Need antikehad võivad näidata paremat ADCC aktiivsust (st 2 korda, 10 korda, 100 korda, 500 korda jne paremat) võrreldes võrreldavate antikehadega, mis ei sisalda aminohappe modifikatsiooni.
- 10 **[0149]** Leiutis hõlmab antikehi, mis sisaldavad modifikatsioone, eelistatult Fc piirkonnas, mis modifitseerib antikeha sidumisafiinsust ühe või mitme Fc γ R-i suhtes. Ühe või mitme Fc γ R-i suhtes modifitseeritud sidumisega antikehade modifitseerimise meetodid on tehnika tasemes tuntud, vt näiteks PCT publikatsioone nr WO 04/029207, WO 04/029092, WO 04/028564, WO 99/58572, WO 99/51642, WO 98/23289, WO 89/07142, WO
- 15 88/07089, ja USA patente nr 5 843 597 ja 5 642 821. Osades teostustes hõlmab leiutis antikehi, millel on muudetud aafiinsus Fc γ R-i, näiteks Fc γ RIIIA aktiveerimiseks. Eelistatult on sellistel modifikatsioonidel ka muudetud Fc vahendatud efektorfunktsioon. Modifikatsioonid, mis mõjutavad Fc vahendatud efektorfunktsiooni, on tehnika tasemes tuntud (vt USA patent nr 6 194 551). Aminohapete hulka, mida võib modifitseerida
- 20 vastavalt leiutiskirjelduse kohasele meetodile, kuuluvad mittepiiravalt proliin 329, proliin 331 ja lüsiin 322. Proliin 329, proliin 331 ja lüsiin 322 asendatakse eelistatultalaniiniga, kuid mõeldav on ka mis tahes muu aminohappega asendamine. Vt rahvusvaheline publikatsioon nr WO 00/42072 ja patent US 6 194 551.
- 25 **[0150]** Ühes konkreetses teostuses hõlmab Fc piirkonna modifikatsioon ühte või mitut mutatsiooni Fc piirkonnas. Nimetatud üks või mitu mutatsiooni Fc piirkonnas võivad anda tulemuseks antikeha, millel on muudetud antikeha vahendatud efektorfunktsioon, muudetud seondumine teiste Fc retseptoritega (näiteks Fc aktivatsiooniretseptoritega), muudetud ADCC aktiivsus või muudetud C1q sidumisaktiivsus või muudetud
- 30 komplemendist sõltuva tsütotoksilisuse aktiivsus või nende mis tahes kombinatsioon.

[0151] Osades teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, hõlmab leiutis molekule, mis sisaldavad Fc piirkonna varianti, millel on aminohappe modifikatsioon ühes või mitmes alljärgnevas positsioonis: 119, 125, 132, 133, 141, 142, 147, 149, 162, 166, 185, 192, 202, 205, 210, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 227, 229, 231, 232, 233, 235, 240, 241, 242, 243, 244, 246, 247, 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 258, 261, 262, 263, 268, 269, 270, 272, 274, 275, 276, 279, 280, 281, 282, 284, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 295, 298, 301, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 323, 326, 327, 328, 330, 333, 334, 335, 337, 339, 340, 343, 344, 345, 347, 348, 352, 353, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 369, 370, 371, 372, 375, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 404, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 427, 428, 431, 433, 435, 436, 438, 440, 441, 442, 443, 446 või 447. Eelistatult annab Fc piirkonna töötlemine tulemuseks kasvajarakkude rakkude vahendatud tapmise ja/või komplemendi vahendatud tapmise suurenemise.

[0152] Leiutis hõlmab molekule, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, mis sisaldavad Fc piirkondade varianti, mis koosneb mis tahes allpool tabelis 2 loetletud mutatsioonidest või sisaldab neid.

20

TABEL 2. NÄITLIKUD MUTATSIOONID

ÜHE SAIDI MUTANDID	KAHE SAIDI MUTANDID
K392R	Q347H, A339V
N315I	S415I, L251F
S132I	K290E, L142P
P396L	G285E, P247H
P396H	K409R, S166N
A162V	E334A, K334A
R292L	R292L, K334E
T359N	K288N, A330S

ÜHE SAIDI MUTANDID	KAHE SAIDI MUTANDID
T366S	R255L, E318K
V379L	F243L, E318K
K288N	V279L, P395S
A330S	K246T, Y319F
F243L	F243I, V379L
E318K	K288M, K334E
V379M	K334E, E308D
S219Y	E233D, K334E
V282M	K246T, P396H
D401V	H268D, E318D
K222N	K246I, K334N
K334I	K320E, K326E
K334E	S375C, P396L
I377F	K288N, K326N
P247L	P247L, N421K
F372Y	S298N, W381R
K326E	R255Q, K326E
H224L	V284A, F372L
F275Y	T394M, V397M
L398V	P247L, E389G
K334N	K290T, G371D
S400P	P247L, L398Q
S407I	P247L, I377F
F372Y	K326E, G385E

ÜHE SAIDI MUTANDID	KAHE SAIDI MUTANDID
T366N	S298N, S407R
K414N	E258D, N384K
M352L	F241L, E258G
T225S	K370N, S440N
I377N	K317N, F423-DELETED
K248M	P227S, K290E
R292G	K334E, E380D
S298N	P291S, P353Q
D270E	V240I, V281M
E233G	P232S, S304G
	P247L, L406F
	D399E, M428L
	L251F, F372L
	D399E, G402D
	D399E, M428L
	K392T, P396L
	H268N, P396L
	K3261, P396L
	H268D, P396L
	K210M, P396L
	L358P, P396L
	K334N, P396L
	V379M, P396L
	P227S, P396L

ÜHE SAIDI MUTANDID	KAHE SAIDI MUTANDID
	P217S, P396L
	Q419H, P396L
	K370E, P396L
	L242F, P396L
	R255L, P396L
	V240A, P396L
	T250A, P396L
	P247S, P396L
	L410H, P396L
	Q419L, P396L
	V427A, P396L
	E258D, P396L
	N384K, P396L
	V323I, P396L
	P244H, P396L
	V305L, P396L
	S400F, P396L
	V303I, P396L
	A330V, Q419H
	V263Q, E272D
	K326E, A330T

[0153] Veel teistes teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, hõlmab leiutis molekule, mis sisaldavad Fc piirkondade varianti, millel on rohkem kui

kaks aminohappe modifikatsiooni. Selliste variantide mittepiirav näide on loetletud allpool esitatud tabelis (tabel 3). Leiutis hõlmab tabelis 3 loetletud mutatsioone, mis hõlmavad lisaks ühte või mitut aminohappe modifikatsiooni, näiteks neid, mis on siin avaldatud.

5

TABEL 3. NÄITLIKUD KOMBINATSIOONI VARIANDID

D399E, R292L, V185M
R301C, M252L, S192T
P291S, K288E, H268L, A141V
S383N, N384K, T256N, V262L, K218E, R214I, K205E, F149Y, K133M
S408I, V215I, V125L
G385E, P247H
V348M, K334N, F275I, Y202M, K147T.
H310Y, T289A, Y407V, E258D
R292L, P396L, T359N
F275I, K334N, V348M
F243L, R255L, E318K
K334E, T359N, T366S
T256S, V305I, K334E, N390S
T335N, K370E, A378V, T394M, S424L.
K334E, T359N, T366S, Q386R
K288N, A330S, P396L
P244H, L358M, V379M, N384K, V397M.
P217S, A378V, S408R
P247L, I253N, K334N
D312E, K327N, I378S

D280E, S354F, A431D, L441I
K218R, G281D, G385R
P247L, A330T, S440G
T355N, P387S, H435Q
P247L, A431V, S442F
P343S, P353L, S375I, S383N
E216D, E345K, S375I
K288N, A330S, P396L
K222N, T335N, K370E, A378V, T394M
G316D, A378V, D399E
N315I, V379M, T394M
K326Q, K334E, T359N, T366S
A378V, N390I, V422I
V282E, V369I, L406F
V397M, T411A, S415N
T223I, T256S, L406F
L235P, V382M, S304G, V305J, V323I
P247L, W313R, E388G
D221Y, M252I, A330G, A339T, T359N, V422I, H433L
F243I, V379L, G420V
A231V, Q386H, V412M
T215P, K274N, A287G, K334N, L365V, P396L
P244A, K326I, C367R, S375I, K447T
R301H, K340E, D399E
C229Y, A287T, V379M, P396L, L443V

E269K, K290N, Q311R, H433Y
E216D, K334R, S375I
T335N, P387S, H435Q
K246I, Q362H, K370E
K334E, E380D, G446V
V303I, V369F, M428L
K246E, V284M, V308A
E293V, Q295E, A327T
Y319F, P352L, P396L
D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D
K290T, N390I, P396L
K288R, T307A, K344E, P396L
V273I, K326E, L328I, P396L
K326I, S408N, P396L
K261N, K210M, P396L
F243L, V305I, A378D, F404S, P396L.
K290E, V369A, T393A, P396L
K210N, K222I, K320M, P396L
P217S, V305I, I309L, N390H, P396L.
K246N, Q419R, P396L
P217A, T359A, P396L
V215I, K290V, P396L
F275L, Q362H, N384K, P396L
A330V, H433Q, V427M
V263Q, E272D, Q419H

N276Y, T393N, W417R
V282L, A330V, H433Y, T436R
V284M, S298N, K334E, R355W
A330V, G427M, K438R
S219T, T225K, D270E, K360R
K222E, V263Q, S298N
E233G, P247S, L306P
S219T, T225K, D270E
S254T, A330V, N361D, P243L
V284M, S298N, K334E, R355W, R416T
D270E, G316D, R416G
K392T, P396L, D270E
R255L, P396L, D270E
V240A, P396L, D270E
Q419H, P396L, D270E
K370E, P396L, D270E
P247L, N421K, D270E
R292P, V305I
R292P, V305I, F243L
V284M, R292L, K370N
F243L, R292L, Y300L

[0154] Enim eelistatud teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, on leitud kohalasel Fc γ RIIB vastasel antikehal modifitseeritud Fc piirkond, millel on muudetud afiinsus aktivatsiooni- ja/või inhibitsioonireseptorite suhtes, kus nimetatud Fc domeenil on üks või mitu aminohappe modifikatsiooni, kus nimetatud üks või mitu

aminohappe modifikatsioon on asendus positsioonis 288 asparagiiniga, positsioonis 330 seriiniga ja positsioonis 396 leutsiiniga (MgFc10) (vt tabelid 2 ja 3); või asendus positsioonis 334 glutamiinhappega, positsioonis 359 asparagiiniga ja positsioonis 366 seriiniga (MgFc13); või asendus positsioonis 316 asparagiinhappega, positsioonis 378
5 valiiniga ja positsioonis 399 glutamiinhappega (MgFc27); või asendus positsioonis 392 treoniiniga ja positsioonis 396 leutsiiniga (MgFc38); või asendus positsioonis 221 glutamiinhappega, positsioonis 270 glutamiinhappega, positsioonis 308alaniiniga, positsioonis 311 histidiiniga, positsioonis 396 leutsiiniga ja positsioonis 402 asparagiinhappega (MgFc42); või asendus positsioonis 240alaniiniga ja positsioonis 396
10 leutsiiniga (MgFc52); või asendus positsioonis 410 histidiiniga ja positsioonis 396 leutsiiniga (MgFc53); või asendus positsioonis 243 leutsiiniga, positsioonis 305 isoleutsiiniga, positsioonis 378 asparagiinhappega, positsioonis 404 seriiniga ja positsioonis 396 leutsiiniga (MgFc54); või asendus positsioonis 255 leutsiiniga ja positsioonis 396 leutsiiniga (MgFc55); või asendus positsioonis 370 glutamiinhappega ja
15 positsioonis 396 leutsiiniga (MgFc59); või asendus positsioonis 243 leutsiiniga, positsioonis 292 proliiniga, positsioonis 300 leutsiiniga, positsioonis 305 isoleutsiiniga ja positsioonis 396 leutsiiniga (MgFc88); või asendus positsioonis 243 leutsiiniga, positsioonis 292 proliiniga, positsioonis 300 leutsiiniga ja positsioonis 396 leutsiiniga (MgFc88A); või asendus positsioonis 243 leutsiiniga, positsioonis 292 proliiniga ja
20 positsioonis 300 leutsiiniga (MgFc155). (Vt ka tabelid 2, 3A ja 3B USA patenditaotluse publikatsioonis nr 2005/0064514 A1, Stavenhagen *et al.*, mis on sisse antud 28. juulil 2004).

[0155] Ühes eelistatud teostuses on Fc γ RIIB vastasel antikehal, näiteks 8B5.3.4 antikehal
25 modifitseeritud Fc piirkond, leutsiiniga positsioonis 243, proliiniga positsioonis 292, leutsiiniga positsioonis 300, isoleutsiiniga positsioonis 305 ja leutsiiniga positsioonis 396.

[0156] Konkreetsetes teostustes, mis kuuluvad määratletud patendiõudluse ulatusse, on
30 Fc piirkonna variandil leutsiin positsioonis 247, lüsiin positsioonis 421 ja glutamiinhape positsioonis 270 (MgFc31/60); treoniin positsioonis 392, leutsiin positsioonis 396 ja glutamiinhape positsioonis 270 (MgFc38/60); treoniin positsioonis 392, leutsiin positsioonis 396, glutamiinhape positsioonis 270 ja leutsiin positsioonis 243 (MgFc38/60/F243L); histidiin positsioonis 419, leutsiin positsioonis 396 ja glutamiinhape

positsioonis 270 (MGFc51/60); histidiin positsioonis 419, leutsiin positsioonis 396, glutamiinhape positsioonis 270 ja leutsiin positsioonis 243 (MGFc51/60/F243L); lüsiin positsioonis 255, leutsiin positsioonis 396 ja glutamiinhape positsioonis 270 (MGFc55/60); lüsiin positsioonis 255, leutsiin positsioonis 396, glutamiinhape positsioonis 270 ja leutsiin positsioonis 300 (MGFc55/60/Y300L); lüsiin positsioonis 255, leutsiin positsioonis 396, glutamiinhape positsioonis 270 ja leutsiin positsioonis 243 (MgFc55/60/F243L); glutamiinhape positsioonis 370, leutsiin positsioonis 396 ja glutamiinhape positsioonis 270 (MGFc59/60); glutamiinhape positsioonis 270, asparagiinhape positsioonis 316 ja glütsiin positsioonis 416 (MgFc71); leutsiin positsioonis 243, proliin positsioonis 292, isoleutsiin positsioonis 305 ja leutsiin positsioonis 396 (MGFc74/P396L); glutamiin positsioonis 297 või mis tahes individuaalsete asenduste kombinatsioon.

5.1.5. Süsivesiku modifikatsioonid

[0157] Leiutises pakutakse ka muudetud oligosahhariidi sisaldusega antikehi. Siin osutavad oligosahhariidid süsivesikutele, mis sisaldavad kahte või enam lihtsuhkrut ning neid kahte terminit võib siin kasutada samatähenduslikena. Leiutisekohaseid süsivesikufragmente kirjeldatakse viitega tehnika tasemes tavapäraselt kasutatavale nomenklatuurile. Süsivesikute keemia kohta ülevaate saamiseks vt näiteks Hubbard *et al.*, 1981 *Ann. Rev. Biochem.*, 50: 555–583. Sellesse nomenklatuuri kuuluvad näiteks Man, mis tähistab mannoosi; GlcNAc, mis tähistab 2-*N*-atsetüülglükoosamiini; Gal, mis tähistab galaktoosi; Fuc, mis tähistab fukoosi ja Glc, mis tähistab glükoosi. Siaalhappeid kirjeldatakse lühendatud kirjaviisiga, kus NeuNAc on 5-*N*-atsetüülneuramiinhape ja NeuNGc on 5-glükkoolneuramiinhape.

25

[0158] Üldiselt sisaldavad antikehad süsivesikufragmente konserveerunud positsioonides raske ahela konstantses piirkonnas ja kuni 30% inimese IgG-dest on glükosüülitud Fab piirkond. IgG-1 on üksik N-seotud biantennaarse süsivesiku struktuur positsioonis Asn 297, mis paikneb CH2 domeenis (Jefferis *et al.*, 1998, *Immunol. Rev.* 163: 59–76; Wright *et al.*, 1997, *Trends Biotech* 15: 26–32). Inimese IgG-1 on tüüpiliselt alljärgneva struktuuriga süsivesik: GlcNAc(Fucose)-GlcNAc-Man-(ManGlcNAc)₂. Kuid IgG-de

30

- lõikes esineb variatsioone süsivesiku sisalduse osas, mis põhjustab muutunud funktsiooni, vt näiteks Jassal *et al.*, 2001 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 243–249; Groenink *et al.*, 1996 *J. Immunol.* 26: 1404–1407; Boyd *et al.*, 1995 *Mol. Immunol.* 32: 1311–1318; Kumpel *et al.*, 1994, *Human Antibody Hybridomas*, 5: 143–151). Leiutis hõlmab antikehi, mis sisaldavad variatsiooni süsivesiku fragmendis, mis on liidetud positsiooniga Asn 297. Ühes teostuses, mis kuulub määratletud patendinõudluse ulatusse, on süsivesiku fragmendil galaktoos ja/või galaktoos-siaalhape ühes või mõlemas terminaalses GlcNAc ja/või kolmandas GlcNAc haaras (poolitav GlcNAc).
- 10 **[0159]** Osades teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, on leiutisekohased antikehad sisuliselt ühest või mitmest suhkrurühmast vabad, näiteks ühest või mitmest siaalhappe jäägist, ühest või mitmest galaktoosi jäägist, ühest või mitmest fukoosi jäägist vabad. Antikeha, mis on sisuliselt vaba ühest või mitmest valitud suhkrurühmast, võib olla valmistatud valdkonna asjatundjale tuntud tavalisi meetodeid kasutades, muu hulgas võib leiutisekohast antikeha rekombinantselt toota peremeesrakus, mis on defektne valitud suhkrurühma(de) antikeha süsivesiku fragmendile lisamises, nii et ligikaudu 90–100% kompositsioonis sisalduvast antikehast puuduvad valitud suhkrurühm(ad), mis on liidetud süsivesiku fragmendiga. Selliste antikehade valmistamiseks kasutatavate alternatiivsete meetodite hulka kuuluvad näiteks rakkude kasvatamine tingimustes, mis ennetavad või vähendavad ühe või mitme valitud suhkrurühma lisamist, või ühe või mitme valitud suhkrurühma translatsioonijärgne eemaldamine.
- 25 **[0160]** Ühel spetsiifilisel juhul hõlmab leiutiskirjeldus sisuliselt homogeense antikeha preparaadi tootmise meetodit, kus ligikaudu 80–100% kompositsioonis sisalduvast antikehast puudub fukoos selle süsivesiku fragmendil, näiteks süsivesiku ühendus positsioonis Asn 297. Antikeha võib olla valmistatud näiteks (a) töödeldud peremeesraku kasutamise teel, millel on puudulik fukoosi metabolism, nii et sellel on vähenenud võime fukosüülida selles ekspresseeritud valke; (b) rakkude kasvatamise teel tingimustes, mis ennetavad või vähendavad fukosüülimist; (c) fukoosi translatsioonijärgse eemaldamise teel, näiteks fukosidaasi ensüümiga; või (d) antikeha puhastamise teel, et selekteerida produkt, mis ei ole fukosüülitud. Enim eelistatult ekspresseeritakse soovitud antikeha kodeerivat nukleiinhapet peremeesrakus, millel on vähenenud võime fukosüülida selles
- 30

ekspresseritud antikeha. Eelistatult on nimetatud peremeesrakk dihüdrofolaatreduktaasi puudulikkusega hiina hamstri munarakk (CHO), näiteks Lec 13 CHO rakk (lektiini resistentne CHO mutantne rakuliin; Ribka ja Stanley, 1986, *Somatic Cell & Molec. Gen.* 12(1): 51–62; Ripka *et al.*, 1986 *Arch. Biochem. Biophys.* 249(2): 533–545), CHO-K1, 5 DUX-B11, CHO-DP12 või CHO-DG44, mida on modifitseeritud selliselt, et antikeha ei ole sisuliselt fukosüülitud. Seega võib rakk näidata muudetud ekspressiooni ja/või aktiivsust fukosüültransferaasi ensüümi või muu ensüümi või substraadi suhtes, mis osaleb fukoosi lisamisel N-seotud oligosahhariidile, nii et nimetatud ensüümil on vähenenud aktiivsus ja/või vähenenud ekspressioonitase rakus. Muudetud 10 fukoosisisaldusega antikehade tootmise meetodeid vt näiteks publikatsioonidest WO 03/035835 ja Shields *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277(30): 26 733 – 26 740).

[0161] Osades teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, moduleerivad muudetud süsivesiku modifikatsioonid ühte või mitut järgnevate hulgast: 15 antikeha solubiliseerimine, antikeha subtsellulaarse transpordi ja sekretsiooni lihtsustamine, antikeha moodustamise, konformatsioonilise terviklikkuse ja antikeha vahendatud efektorfunktsiooni soodustamine. Ühes konkreetses teostuses parandavad muudetud süsivesiku modifikatsioonid antikeha vahendatud efektorfunktsiooni võrreldes antikehaga, millel puudub süsivesiku modifikatsioon. Süsivesiku modifikatsioonid, mis 20 võivad põhjustada muudetud antikeha vahendatud efektorfunktsiooni, on tehnika tasemes hästi tuntud (vt näiteks Shields R.L. *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 277(30): 26 733 – 26 740; Davies J. *et al.*, 2001, *Biotechnology & Bioengineering*, 74(4): 288–294). Ühes teises konkreetses teostuses parandavad muudetud süsivesiku modifikatsioonid leiutisekohaste antikehade seondumist Fc γ RIIB retseptoriga. Süsivesiku modifikatsioonide muutmine 25 leiutisekohaste meetodite kohaselt hõlmab näiteks antikeha süsivesiku sisalduse suurendamist või antikeha süsivesiku sisalduse vähendamist. Süsivesiku sisalduse muutmise meetodid on valdkonna asjatundjatele tuntud, vt näiteks Wallick *et al.*, 1988, *Journal of Exp. Med.* 168(3): 1099–1109; Tao *et al.*, 1989 *Journal of Immunology*, 143(8): 2595–2601; Routledge *et al.*, 1995 *Transplantation*, 60(8): 847–853; Elliott *et al.* 2003; 30 *Nature Biotechnology*, 21: 414–421; Shields *et al.* 2002 *Journal of Biological Chemistry*, 277(30): 26 733 – 26 740).

[0162] Osades teostustes, mis kuuluvad määratletud patendiõudluse ulatusse, hõlmab leiutis antikehi, mis sisaldavad ühte või mitut glükosüülimissaiti, nii et üks või mitu süsivesiku fragmenti liidetakse kovalentselt antikeha külge. Teistes teostustes, mis kuuluvad määratletud patendiõudluse ulatusse, hõlmab leiutis antikehi, mis sisaldavad ühte või mitut glükosüülimissaiti ja ühte või mitut modifikatsiooni Fc piirkonnas, näiteks selliseid, mis on eespool avaldatud, ja selliseid, mis on valdkonna asjatundjale tuntud. Eelistatud teostustes, mis kuuluvad määratletud patendiõudluse ulatusse, parandavad üks või mitu modifikatsiooni Fc piirkonnas antikeha afiinsust Fc γ R-i, näiteks Fc γ R11A aktiveerimiseks võrreldes antikehaga, mis sisaldab metsiktüüpi Fc piirkondi.

10 Leiutisekohastel antikehadel, millel on üks või mitu glükosüülimissaiti ja/või üks või mitu modifikatsiooni Fc piirkonnas, on parem antikeha vahendatud efektorfunktsioon, näiteks parem ADCC aktiivsus. Osades teostustes, mis kuuluvad määratletud patendiõudluse ulatusse, hõlmab leiutis lisaks antikehi, mis sisaldavad ühte või mitut aminohappe modifikatsiooni, mis teadaolevalt avaldavad otseselt või kaudselt vastastiktoimet antikeha süsivesiku fragmendiga, sealhulgas mittepiiravalt aminohapete modifikatsiooni positsioonides 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 ja 301. Aminohapped, mis avaldavad otseselt või kaudselt vastastiktoimet antikeha süsivesiku fragmendiga, on tehnika tasemes tuntud, vt näiteks Jefferis *et al.*, 1995 *Immunology Letters*, 44: 111–117).

20

[0163] Leiutis hõlmab antikehi, mida on modifitseeritud ühe või mitme glükosüülimissaidi sisestamise teel ühte või mitmesse antikeha saiti, mis eelistatult ei muuda antikeha funktsionaalsust, näiteks Fc γ R11B-ga seondumise aktiivsust. Glükosüülimissaitide võib sisestada leiutisekohaste antikehade varieeruvasse ja/või konstantsesse piirkonda. Siin hõlmavad „glükosüülimissaidid” mis tahes spetsiifilist aminohappejärjestust antikehas, mille külge kinnitub oligosahhariid (st süsivesikud, mis sisaldavad omavahel seotud kahte või enam lihtsuhkrut) spetsiifiliselt ja kovalentselt. Oligosahhariidi kõrvalahelad seotakse tüüpiliselt antikeha karkassi külge N- või O-sidemete kaudu. N-seotud glükosüülimine osutab oligosahhariidi fragmendi liitmisele asparagiinijäägi kõrvalahelaga. O-seotud glükosüülimine osutab oligosahhariidi fragmendi liitmisele hüdroksüaminohappe, näiteks seriini või treoniiniga.

30 Leiutisekohased antikehad võivad sisaldada ühte või mitut glükosüülimissaiti, sealhulgas N-seotud või O-seotud glükosüülimissaitide. Leiutisekohaselt võib kasutada mis tahes

glükosüülimissaiti, mida tehnika tasemes teadaoleva kohaselt kasutatakse N-seotud või O-seotud glükosüülimise jaoks. Näitlik N-seotud glükosüülimissait, mis on kasulik vastavalt käesoleva leiutise kohastele meetoditele, on aminohappejärjestus: Asn-X-Thr/Ser, kus X võib olla mis tahes aminohape ja Thr/Ser tähistab treoniini või seriini.

5 Sellise saidi või selliste saitide leiutisekohasesse antikehasse sisestamiseks kasutatakse käesoleva leiutise valdkonnas hästi tuntud meetodeid. Vt näiteks „*In vitro* Mutagenesis”, Recombinant DNA: A Short Course, J. D. Watson, *et al.*, W.H. Freeman and Company, New York, 1983, 8. peatükk, lk 106–116. Näitlik meetod glükosüülimissaidi sisestamiseks leiutisekohasesse antikehasse võib hõlmata: antikeha aminohappejärjestuse

10 modifitseerimist või muteerimist, nii et selle tulemusel saadakse soovitud Asn-X-Thr/Ser järjestus.

[0164] Leiutisekohase antikeha süsivesiku sisalduse modifitseerimise meetodid, mis hõlmavad glükosüülimissaidi lisamist või deleteerimist, on avaldatud antikehade

15 süsivesiku sisalduse modifitseerimise meetoditena, mis on tehnika tasemes hästi tuntud, vt näiteks patent US 6 218 149; EP 0 359 096 B1; USA publikatsioon nr US 2002/0028486; WO 03/035835; USA publikatsioon nr 2003/0115614; patent US 6 218 149; patent US 6 472 511. Samuti on hõlmatud leiutisekohase antikeha süsivesiku sisalduse modifitseerimise meetodid, mis hõlmavad antikeha ühe või mitme

20 endogeense süsivesiku fragmendi deleteerimist.

[0165] Samuti pakutakse modifitseeritud Fc γ RIIB antikehade kasutamist, kus CDR2 piirkonna N-glükosüülimise konsensussaiti Asn₅₀-Val-Ser on modifitseeritud, nii et selle tulemusel on glükosüülimissait positsioonis 50 kõrvaldatud. Kuigi siinkohal ei soovita

25 lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, võib glükosüülimissaidi eemaldamine piirata potentsiaalset variatsiooni antikeha tootmisel ning potentsiaalset immunogeensust farmatseutilises rakenduses. Ühes spetsiifilises teostuses hõlmab leiutis Fc γ RIIB humaniseeritud antikeha kasutamist, kus aminohape positsioonis 50 on modifitseeritud, näiteks deleteeritud või asendatud. Ühel teisel spetsiifilisel juhul hõlmab leiutiskirjeldus

30 lisaks antikeha kasutamist, millel on aminohappe modifikatsioon, näiteks deletsioon või asendus positsioonis 51. Ühel spetsiifilisel juhul hõlmab leiutiskirjeldus Fc γ RIIB humaniseeritud antikeha kasutamist, kus aminohape positsioonis 50 on asendatud türosiiniga. Ühel teisel spetsiifilisemal juhul hõlmab leiutiskirjeldus Fc γ RIIB antikeha

kasutamist, kus aminohape positsioonis 50 on asendatud türosiiniga ja aminohape positsioonis 51 on asendatudalaniiniga.

5.1.6. Fc γ RIIB AGONISTID JA ANTAGONISTID

5 [0166] Lisaks Fc γ RIIB-spetsiifilise antikeha kasutamisele võib kirjeldatud meetodites ja leiutisekohastes kompositsioonides kasutada selle analoogi, derivaati või antigeeni siduvat fragmenti; teisi Fc γ RIIB agoniste ja antagonistide võib kasutada vastavalt kirjeldatud meetoditele. Fc γ RIIB agonistide ja antagonistide hulka kuuluvad mittepiiravalt valgulised molekulid (näiteks valgud, polüpeptiidid (näiteks lahustuvad

10 Fc γ RIIB polüpeptiidid), peptiidid, liitvalgud (näiteks lahustuvad Fc γ RIIB polüpeptiidid, mis on konjugeeritud terapeutilise fragmendiga), nukleiinhappe molekulid (näiteks Fc γ RIIB antisenss-nukleiinhappe molekulid, kolmikheeliksid, dsRNA, mis vahendab RNAi-d, või nukleiinhappe molekulid, mis kodeerivad valgulisi molekule), orgaanilised molekulid, anorgaanilised molekulid, väikesed orgaanilised molekulid, ravimid ja

15 väikesed anorgaanilised molekulid, mis blokeerivad, inhibeerivad, vähendavad või neutraliseerivad Fc γ RIIB aktiivsust ja/või ekspressiooni, mida ekspresseeritakse immuunrakul, eelistatult B-rakul. Osadel juhtudel ei ole Fc γ RIIB agonist või antagonist, mida kasutatakse leiutisekohaste meetodite kohaselt, väike orgaaniline molekul, ravim või antisenss-molekul. Fc γ RIIB agonistide või antagonistide tuvastamiseks võib kasutada

20 tehnika tasemes hästi tuntud või siin kirjeldatud tehnikaid.

[0167] Leiutisekohaste profülaktiliste ja terapeutiliste ühendite hulka kuuluvad mittepiiravalt valgulised molekulid, sealhulgas mittepiiravalt peptiidid, polüpeptiidid, valgud, sealhulgas translatsioonijärgselt modifitseeritud valgud, antikehad jne; väikesed

25 molekulid (väiksemad kui 1000 daltonit), anorgaanilised või orgaanilised ühendid; nukleiinhappe molekulid, sealhulgas mittepiiravalt kaksikahelaline või üheaahelaline DNA, kaksikahelaline või üheaahelaline RNA ning kolmikheeliksi nukleiinhappe molekulid. Profülaktilisi ja terapeutilisi ühendeid võib tuletada mis tahes tuntud organismilt (sealhulgas mittepiiravalt loomad, taimed, bakterid, seened ja algloomad või

30 viirused) või sünteetiliste molekulide kogust.

[0168] Teatavatel juhtudel vähendavad Fc γ RIIB antagonistid Fc γ RIIB polüpeptiidi funktsiooni, aktiivsust ja/või ekspressiooni B-rakulise pahaloomulise kasvaja all kannataval ravialusel. Teistel juhtudel seonduvad Fc γ RIIB antagonistid vahetult Fc γ RIIB polüpeptiidiga ning moduleerivad otseselt või kaudselt B-lümfotsüütide aktiivsust ja/või funktsiooni. Konkreetsetel juhtudel inhibeerivad või vähendavad Fc γ RIIB antagonistid B-rakkude proliferatsiooni B-rakulise pahaloomulise kasvaja all kannataval ravialusel vastavalt siin kirjeldatud või valdkonna asjatundjatele hästi tuntud standardsete *in vivo* ja/või *in vitro* analüüsides kindlaks määratule. Ühel konkreetsel juhul vähendavad Fc γ RIIB antagonistid lümfotsüütide ammendumist, eelkõige perifeerse vere B-rakkudes, B-rakulise pahaloomulise kasvaja all kannataval ravialusel vastavalt siin kirjeldatud või valdkonna asjatundjatele hästi tuntud standardsete *in vivo* ja/või *in vitro* analüüsides kindlaks määratule. Ühel teisel juhul moduleerivad Fc γ RIIB antagonistid otseselt või kaudselt B-lümfotsüütide aktiivsust ja/või funktsiooni antikehast sõltuva rakkude vahendatud tsütotoksilisuse (ADCC) kasutamise teel.

15

[0169] Ühel eelistatud juhul on valgud, polüpeptiidid või peptiidid (sealhulgas antikehad ja liitvalgud), mida kasutatakse Fc γ RIIB antagonistidena, tuletatud valkude, polüpeptiidide või peptiidide vastuvõtjaga samalt liigilt, et vähendada nende valkude, polüpeptiidide või peptiidide suhtes tekkiva reaktsiooni tõenäosust. Ühel teisel eelistatud juhul, kui ravialune on inimene, on valgud, polüpeptiidid või peptiidid, mida kasutatakse Fc γ RIIB antagonistidena, inimese omad või humaniseeritud.

20

[0170] Nukleiinhappe molekule, mis kodeerivad valke, polüpeptiide või peptiide, mis toimivad Fc γ RIIB antagonistidena, võib manustada B-rakulise pahaloomulise kasvaja all kannatavale ravialusele leutisekohaste meetodite kohaselt. Lisaks võib nukleiinhappe molekule, mis kodeerivad valkude, polüpeptiidide või peptiidide derivaate, analooge, fragmente või variante, mis toimivad Fc γ RIIB antagonistidena, manustada B-rakulise pahaloomulise kasvaja all kannatavale ravialusele leutisekohaste meetodite kohaselt. Eelistatult säilitavad sellised derivaadid, analoogid, variandid ja fragmendid täispikkuses metsiktüüpi valgu, polüpeptiidi või peptiidi Fc γ RIIB antagonisti aktiivsuse.

30

5.2. ANTIKEHA KONJUGAADID

[0171] Leiutis hõlmab antikehi, mis on rekombinantselt liidetud või keemiliselt konjugeeritud (sealhulgas nii kovalentsed kui ka mittekovalentsed konjugatsioonid) heteroloogiliste polüpeptiididega (st mitteseotud polüpeptiidi; või selle osaga, eelistatult vähemalt 10, vähemalt 20, vähemalt 30, vähemalt 40, vähemalt 50, vähemalt 60, vähemalt 70, vähemalt 80, vähemalt 90 või vähemalt 100 polüpeptiidi aminohappega), et genereerida liitvalgud. Liitmine ei pruugi olla vahetu, vaid võib toimuda linkerjärjestuste kaudu. Antikehi võib kasutada näiteks heteroloogiliste polüpeptiidide suunamiseks *in vitro* või *in vivo* konkreetsete rakutüüpide vastu, liites või konjugeerides antikehad konkreetsete rakupinna retseptorite suhtes spetsiifiliste antikehadega. Heteroloogiliste polüpeptiididega liidetud või konjugeeritud antikehi võib kasutada ka *in vitro* immuunanalüüsides ja puhastamisprotsessides tehnika tasemes tuntud meetodeid kasutades. Vt näiteks PCT publikatsioon nr WO 93/21232; EP 439 095; Naramura *et al.*, 1994, *Immunol. Lett.*, 39: 91–99; USA patent nr 5 474 981; Gillies *et al.*, 1992, *Proc Natl Acad Sci*, 89: 1428–1432; ja Fell *et al.*, 1991, *J. Immunol.*, 146: 2446–2452.

[0172] Lisaks võib antikeha olla konjugeeritud raviaine või ravimi fragmendiga, mis modifitseerib antud bioloogilist reaktsiooni. Raviainete või ravimi fragmente ei tohiks käsitleda selliselt, et need on piiratud klassikaliste keemiliste raviainetega. Näiteks võib nimetatud ravimi fragment olla valk või polüpeptiid, millel on soovitud bioaktiivsus. Selliste valkude hulka võivad kuuluda näiteks toksiin, näiteks abriin, ritsiin A, *Pseudomonas*'e endotoksiin (st PE-40) või difteeria toksiin, ritsiin, geloniin ja kermesmarja viirusevastane valk, valk, näiteks kasvaja nekroosifaktor, interferoonid, sealhulgas mittepäävatav α -interferoon (IFN- α), β -interferoon (IFN- β), närvikasvufaktor (NGF), trombotsüütidest saadud kasvufaktor (PDGF), koe plasminogeeni aktivaator (TPA), apoptootiline aine (näiteks TNF- α , TNF- β , AIM I vastavalt PCT publikatsioon nr WO 97/33899 avaldatule), AIM II (vt näiteks PCT publikatsioon nr WO 97/34911), Fas ligand (Takahashi *et al.*, 1994 *J. Immunol.*, 6: 1567–1574) ja VEGI (PCT publikatsioon nr WO 99/23105), trombootiline aine või angiogeneesi vastane aine (näiteks angiostatiin või endostatiin), või bioloogilise reaktsiooni modifitseerija, näiteks lümfokiin (näiteks interleukiin-1 („IL-1”), interleukiin-2 („IL-2”), interleukiin-6 („IL-6”), granulotsüüdi makrofaagi kolooniat stimuleeriv faktor („GM-CSF”) ja granulotsüüdi

kolooniat stimuleeriv faktor („G-CSF”), makrofaagi kolooniat stimuleeriv faktor („M-CSF”) või kasvufaktor (näiteks kasvuhormoon („GH”); proteaas või ribonukleas).

[0173] Antikehi võib liita markerjärjestuste, näiteks peptiidiga, et lihtsustada puhastamist.

5 Eelistatud teostustes on markeri aminohappejärjestus muu hulgas heksahistidiini peptiid, näiteks pQE vektoris sisalduv märgis (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), millest paljud on kaubanduslikult kättesaadavad. Näiteks publikatsioonis Gents *et al.*, 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 821–824, kirjeldatu kohaselt võimaldab heksahistidiin liitvalgu mugavat puhastamist. Muude puhastamiseks kasulike

10 peptiidmärgiste hulka kuuluvad mittepiiravalt hemaglutiniini „HA” märgis, mis vastab gripiviiruse hemaglutiniini valgust tuletatud epitoobile (Wilson *et al.*, 1984 *Cell*, 37: 767), ja „flag”-märgis (Knappik *et al.*, 1994 *Biotechniques*, 17(4): 754–761).

[0174] Samuti on kirjeldatud kompositsioonide kasutamist, mis sisaldavad antikeha

15 fragmentidega liidetud või konjugeeritud heteroloogilisi polüpeptiide. Näiteks võivad heteroloogilised polüpeptiidid olla liidetud või konjugeeritud Fab fragmendi, Fd fragmendi, Fv fragmendi, F(ab)₂ fragmendi või selle osaga. Polüpeptiidide antikeha osadega liitmise või konjugeerimise meetodid on tehnika tasemes tuntud. Vt näiteks USA patendid nr 5 336 603, 5 622 929, 5 359 046, 5 349 053, 5 447 851 ja 5 112 946; EP

20 307 434; EP 367 166; rahvusvahelised publikatsioonid nr WO 96/04388 ja WO 91/06570; Ashkenazi *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10 535 – 10 539; Zheng *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154: 5590–5600; ja Vil *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11 337 – 11 341.

25 [0175] Täiendavaid liitvalke on võimalik genereerida geenide kokkulohistamise, motiivide kokkulohistamise, eksonite kokkulohistamise ja/või koodonite kokkulohistamisega (üldistatult „DNA kokkulohistamisega”). DNA kokkulohistamist võib kasutada leiutisekohaste antikehade või nende fragmentide (näiteks antikehade või nende fragmentide, millel on kõrgemad afiinsused ja madalamad dissotsiatsioonikiirused)

30 aktiivsuse muutmiseks. Vt üldiselt USA patendid nr 5 605 793; 5 811 238; 5 830 721; 5 834 252; ja 5 837 458, ja Patten *et al.*, 1997, *Curr. Opinion Biotechnol.* 8: 724–733; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16: 76; Hansson, *et al.*, 1999, *J. Mol. Biol.* 287: 265; ja Lorenzo ja Blasco, 1998, *BioTechniques* 24: 308. Antikehi või nende fragmente või

kodeeritud antikehi või nende fragmente võib muuta juhusliku mutageneesiga veaalti PCR-i abil, juhusliku nukleotiidi sisestamise teel või muude meetodite abil enne rekombineerimist. Antikeha või antikeha fragmenti kodeeriva polünukleotiidi ühte või mitut osa, millised osad seonduvad spetsiifiliselt FcγRIIB-ga, võib kombineerida ühe või mitme heteroloogilise molekuli ühe või mitme komponendi, motiivi, lõigu, osa, domeeni, fragmendiga jne.

[0176] Leiutis hõlmab ka antikehi, mis on konjugeeritud diagnostilise või raviainega või mis tahes muu molekuliga, mille puhul on soovitatav seerumi poolestusaja pikendamine.

Antikehi võib kasutada diagnostiliselt, et näiteks jälgida haiguse, häire või infektsiooni arengut või süvenemist kliinilise testimise protseduuri osana, et näiteks määrata kindlaks antud ravirežiimi tõhusus. Tuvastamise hõlbustamiseks võib antikeha ühendada tuvastatava ainega. Tuvastatavate ainete näidete hulka kuuluvad erinevad ensüümid, prosteetilised rühmad, fluorestsentsmaterjalid, luminescentsmaterjalid, bioluminescentsmaterjalid, radioaktiivsed materjalid, positrone eraldavad metallid ja mitteradioaktiivsed paramagnetilised metalliioonid. Tuvastatava aine võib siduda või konjugeerida vahetult antikehaga või kaudselt vahesaaduse (näiteks antud valdkonnas tuntud linkeri) kaudu tehnika tasemes tuntud tehnikaid kasutades. Vt näiteks USA patenti nr 4 741 900 metalliioonide kohta, mida võib antikehadega konjugeerida vastavalt käesolevale leiutiskirjeldusele diagnostilise vahendina kasutamiseks. Sellise diagnoosimise ja tuvastamise saavutamiseks võib antikeha siduda tuvastatavate ainetega, mille hulka kuuluvad mittepiiravalt erinevad ensüümid, ensüümid, sealhulgas mittepiiravalt mädarõika peroksüdaas, leeliseline fosfataas, beeta-galaktosidaas või atsetüülkoliinesteraas; prosteetilise rühma kompleksid, sealhulgas mittepiiravalt streptavidiin/biotiin ja avidiin/biotiin; fluorestsentsained, sealhulgas mittepiiravalt umbelliferoon, fluorestseiin, fluorestseiinisotiotsüanaat, rodamiin, diklorotriasiinülamiinfluorestseiin, dansüülkloriid või fukoerütriin; luminescentsained, näiteks mittepiiravalt luminool; bioluminescentsained, näiteks mittepiiravalt lutsiferaas, lutsiferiin ja akveoriin; radioaktiivsed ained, näiteks mittepiiravalt vismut (^{213}Bi), süsinik (^{14}C), kroom (^{51}Cr), koobalt (^{57}Co), fluor (^{18}F), gadoliinium (^{153}Gd , ^{159}Gd), gallium (^{68}Ga , ^{67}Ga), germaanium (^{68}Ge), holmium (^{166}Ho), indium (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), jood (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantaan (^{140}La), luteetsium (^{177}Lu), mangaan (^{54}Mn), molübdeen (^{99}Mo), pallaadium (^{103}Pd), fosfor (^{32}P), praseodüüm (^{142}Pr), promeetium (^{149}Pm), reenium (^{186}Re ,

^{188}Re), roodium (^{105}Rh), ruteenium (^{97}Ru), samaarium (^{153}Sm), skandium (^{47}Sc), seleen (^{75}Se), strontsium (^{85}Sr), väävel (^{35}S), tehneetsium (^{99}Tc), tallium (^{201}Ti), tina (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritium (^3H), ksenoon (^{133}Xe), üterbium (^{169}Yb , ^{175}Yb), ütrium (^{90}Y), tsink (^{65}Zn); positrone emiteerivad metallid erinevaid positronemissioontomograafiaid kasutades ja mitteradioaktiivsed paramagnetilised metalliioonid.

[0177] Antikeha võib konjugeerida terapeutilise fragmendi, näiteks tsütotoksiini (näiteks tsütostaatilise või tsütotsiidse aine), raviaine või radioaktiivse elemendiga (näiteks alfaemitterid, gammaemitterid jne). Tsütotoksiinide või tsütotoksiliste ainete hulka kuuluvad mis tahes ained, mis on rakkudele kahjulikud. Näidete hulka kuuluvad paklitaksool, tsütokalasiin B, gramitsidiin D, etiidiimbromiid, emetiin, mitomütsiin, etoposiid, tenoposiid, vinkristiin, vinblastiin, kolkitsiin, doksorubitsiin, daunorubitsiin, dihidroksüantratsiindioon, mitoksantroon, mitramütsiin, aktinomütsiin D, 1-dehüdrotestosteron, glükokortikoidid, prokaiin, tetrakaiin, lidokaiin, propranolool ja puromütsiin ning nende analoogid või homoloogid. Raviainete hulka kuuluvad mittepiiravalt antimetaboliidid (näiteks metotreksaat, 6-merkaptopuriin, 6-tioguaaniin, tsütarabiin, 5-fluorouratsiildekarbasiin), alküülivad ained (näiteks mekloretamiin, tiotepa kloorambutsiil, melfalaan, karmustiin (BSNU) ja lomustiin (CCNU), tsüklofosfamiid, busulfaan, dibromomannitool, streptosototsiin, mitomütsiin C ja tsisdiklorodiamiinplaatina (II) ((DDP) tsisplatiin), antratsükliinid (näiteks daunorubitsiin (varem daunomütsiin) ja doksorubitsiin), antibiootikumid (näiteks daktinomütsiin (varem aktinomütsiin), bleomütsiin, mitramütsiin ja antramütsiin (AMC)) ja antimitootilised ained (näiteks vinkristiin ja vinblastiin).

[0178] Lisaks võib antikeha olla konjugeeritud terapeutiliste fragmentidega, näiteks radioaktiivsete ainete või makrotsükliiliste kelaatoritega, mis on kasulikud radiometalliioonide konjugeerimiseks (radioaktiivsete ainete näiteid vt eespool). Teatavates teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, on makrotsükliiline kelaator 1,4,7,10-tetraasatsüklododekaan- N,N,N'',N'' -tetraäädikhape (DOTA), mida saab antikehaga liita linkermolekuli kaudu. Sellised linkerid on tehnika tasemes üldtuntud ja neid on kirjeldatud publikatsioonides Denardo *et al.*, 1998, *Clin Cancer Res.* 4: 2483–2490; Peterson *et al.*, 1999, *Bioconjug. Chem.* 10: 553; ja Zimmerman *et al.*, 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26: 943–950.

[0179] Selliste terapeutiliste fragmentide antikehadega konjugeerimise tehnikad on hästi tuntud; vt näiteks Arnon *et al.*, „Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy” publikatsioonis „Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy”,
5 Reisfeld *et al.* (toim.), 1985, lk 243–256, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, „Antibodies For Drug Delivery”, publikatsioonis „Controlled Drug Delivery” (2. väljaanne), Robinson *et al.* (toim.), 1987, lk 623–653, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, „Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review” publikatsioonis „Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications”, Pinchera *et al.* (toim.), 1985,
10 lk 475–506); „Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy” publikatsioonis „Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy”, Baldwin *et al.* (toim.), 1985, lk 303–316, Academic Press; ja Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62: 119–158, 1982.

15 [0180] Antikeha või selle fragmenti, mis on koos sellega konjugeeritud terapeutilise fragmendiga või ilma selleta ning mida manustatakse üksi või tsütotoksilis(t)e faktori(te) ja/või tsütokiini(de)ga kombineeritult, võib kasutada ravimina.

[0181] Alternatiivselt võib antikeha olla konjugeeritud teise antikehaga, et moodustada
20 antikeha heterokonjugaat, mida on kirjeldanud Segal USA patendis nr 4 676 980.

[0182] Antikehasid võib liita ka tahketele kandjatele, mis on eriti kasulikud immuunanalüüside või märklaudantigeeni puhastamiseks jaoks. Selliste tahkete kandjate hulka kuuluvad mittepiiravalt klaas, tselluloos, polüakrüülamiid, nailon, polüstüreen,
25 polüvinüülkloriid ja polüpropüleen.

5.3 LEIUTISEKOHASTE MONOKLONAALSETE ANTIKEHADE VALMISTAMINE JA ISELOOMUSTAMINE

[0183] Monoklonaalsete antikehade valmistamiseks on tehnika tasemes tuntud terve rida
30 tehnikaid, sealhulgest hübriidoomi, rekombinantset ja faagidisplei meetodid ning nende kombinatsioonid. Näiteks võib monoklonaalsete antikehade valmistamiseks kasutada

- hübriidoomi tehnikaid, sealhulgas neid, mis on tehnika tasemes tuntud ja mida on õpetatud näiteks publikatsioonides Harlow *et al.*, „Antibodies: A Laboratory Manual”, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. väljaanne 1988); Hammerling, *et al.* publikatsioonis „Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas”, lk 563–681 (Elsevier, N.Y., 1981).
- 5 Väljed „monoklonaalne antikeha” ei ole siin piiratud hübriidoomi tehnoloogia kaudu valmistatud antikehadega. Väljend „monoklonaalne antikeha” osutab antikehale, mis on tuletatud ühest kloonist, sealhulgas eukarüootse või prokarüootse raku või faagi kloonist, ja mitte meetodile, mida kasutatakse selle valmistamiseks.
- 10 **[0184]** Spetsiifiliste antikehade valmistamise ja sõelumise meetodid, milles kasutatakse hübriidoomi tehnoloogiat, on rutiinsed ja tehnika tasemes hästi tuntud. Ühes mittepiiravas näites võib hiiri immuniseerida huvipakkuva antigeeni või sellist antigeeni ekspresseeriva rakuga. Immuunvastuse tuvastamise korral, näiteks antigeeni suhtes spetsiifiliste antikehade tuvastamise korral hiire seerumis, eemaldatakse hiire põrn ja splenotsüüdid
- 15 isoleeritakse. Seejärel liidetakse splenotsüüdid üldtuntud tehnikate abil mis tahes sobivate müeloomirakkudega. Hübriidoomid selekteeritakse ja kloonitakse piirlahjenduse teel. Seejärel analüüsitakse hübriidoomi kloone tehnika tasemes tuntud meetodite abil rakkude osas, mis eritavad antigeeni sidumiseks võimelisi antikehi. Astsiidivedeliku genereerimiseks, mis üldiselt sisaldab antikehade kõrgeid tasemeid, võib hiiri
- 20 inokuleerida intraperitoneaalselt positiivsete hübriidoomi kloonidega.
- [0185]** Kirjeldatud on monoklonaalsete antikehade valmistamise meetodit, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud monoklonaalsed antikehad seovad Fc γ RIIA-d, milline meetod hõlmab: ühe või mitme Fc γ RIIA transgeense hiire
- 25 immuniseerimist (vt US 5 877 396 ja US 5 824 487) inimese Fc γ RIIB puhastatud rakuvälise domeeniga, mis sisaldab aminohappeid 1–180; hübriidoomi rakuliinide tootmist nimetatud hiire põrnarakkudest, nimetatud hübriidoomi rakuliinide sõelumist ühe või mitme hübriidoomi rakuliinide osas, mis toodavad antikehi, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikehad seovad Fc γ RIIA-d. Samuti
- 30 esitatakse selliste Fc γ RIIB monoklonaalsete antikehade valmistamise meetod, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d, eelkõige inimese Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud monoklonaalsed antikehad seovad Fc γ RIIA-d, kus nimetatud meetod hõlmab lisaks: ühe või mitme Fc γ RIIA transgeense hiire immuniseerimist puhastatud Fc γ RIIB või selle

immunogeense fragmendiga, nimetatud hiirte võimendavat immuniseerimist piisaval arvul kordi, et kutsuda esile immuunreaktsiooni, hübriidoomi rakuliinide tootmist nimetatud ühe või mitme hiire põrnarakkudest, nimetatud hübriidoomi rakuliinide sõelumist ühe või mitme hübriidoomi rakuliini osas, mis toodavad antikehi, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikehad seovad Fc γ RIIA-d. Nimetatud hiiri võib immuniseerida puhastatud Fc γ RIIB-ga, mis on segatud mis tahes tehnika tasemes tuntud adjuvandiga, et parandada immuunreaktsiooni. Kirjeldatud meetodites kasutamiseks sobivate adjuvantide hulka kuuluvad mittepiiravalt valgu adjuvandid; bakteriaalsed adjuvandid, näiteks terved bakterid (BCG, *Corynebacterium parvum*, *Salmonella minnesota*) ja bakteriaalsed komponendid, sealhulgas rakuseina karkass, trehaloos-dimükolaat, monofosforüüllipiid-A, tuberkuloosibakteri metanooliga ekstraheeritav jääk (MER), täielik või mittetäielik Freundi adjuvant; viiruse adjuvandid; keemilised adjuvandid, näiteks alumiiniumhüdrosiid, jodoatsetaat ja kolesterüülhemisuktsinaator; palja DNA adjuvandid. Kirjeldatud meetodites kasutamiseks sobivate teiste adjuvantide hulka kuuluvad kooleratoksiin, parapox-valgud, MF-59 (Chiron Corporation; vt ka Bieg *et al.*, 1999, *Autoimmunity*, 31(1): 15–24), MPL® (Corixa Corporation; vt ka Lodmell D.I. *et al.*, 2000 *Vaccine*, 18: 1059–1066; Ulrich *et al.*, 2000, *Methods in Molecular Medicine*, 273–282; Johnson *et al.*, 1999, *Journal of Medicinal Chemistry*, 42: 4640–4649; Baldrige *et al.*, 1999, *Methods*, 19: 103–107), RC-529 adjuvant (Corixa Corporation; juhtühend Corixa aminoalküülglükoosamiinid-4-fosfaadi (AGP) keemilisest kogust, vt ka www.corixa.com) ja DETOX™ adjuvant (Corixa Corporation; DETOX™ adjuvandi hulka kuuluvad MPL® adjuvant (monofosforüüllipiid-A) ja mükobakteriaalne rakuseina karkass; vt ka Eton *et al.*, 1998, *Clin. Cancer Res*, 4(3): 619–627; ja Gubta R. *et al.*, 1995, *Vaccine*, 13(14): 1263–1276).

25

[0186] Konkreetseid epitoope ära tundvaid antikeha fragmente on võimalik genereerida tuntud tehnikate abil. Näiteks võib Fab ja F(ab')₂ fragmente valmistada immunoglobuliini molekulide proteolüütilise lõhustamise teel, kasutades selleks ensüüme, näiteks papaiini (et toota Fab fragmente) või pepsini (et toota F(ab')₂ fragmente). F(ab')₂ fragmendid sisaldavad tervet kerget ahelat ja varieeruvat piirkonda, st CH1 piirkonda, ja vähemalt osa raske ahela liigendpiirkonnast.

30

[0187] Näiteks võib antikehade genereerimiseks kasutada ka erinevaid tehnika tasemes tuntud faagidisplei meetodeid. Faagidisplei meetodite korral kuvatakse antikeha funktsionaalseid domeene neid kodeerivaid polünukleotiidjärjestusi kandvate faagiosakeste pinnal. Sellist faagi võib kasutada antigeeni siduvate domeenide, näiteks

5 Fab-i või Fv või disulfiidseotud stabiliseeritud Fv kuvamiseks, mida ekspresseeritakse repertuaarist või kombinatoorsest antikeha kogust (näiteks inimese või hiire kogust). Huvipakkuvat antigeeni siduvaid antigeeni sidumisdomeene ekspresseerivat faagi saab selekteerida või tuvastada antigeeni abil, näiteks kasutades märgistatud antigeeni või tahkele pinnale või terakesele püütud või seotud antigeeni. Nendes meetodites kasutatud

10 faag on tüüpiliselt filamentne faag, sealhulgas fd ja M13. Antigeeni siduvaid domeene ekspresseeritakse rekombinantselt liidetud valguna faagi geeni III või geeni VIII valgule. Faagidisplei meetodite hulka, mida võib kasutada käesoleva leiutise kohaste immunoglobuliinide või nende fragmentide valmistamiseks, kuuluvad need, mis on avaldatud publikatsioonides Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 182: 41–50, 1995;

15 Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 184: 177–186, 1995; Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 24: 952–958, 1994; Persic *et al.*, *Gene*, 187: 9–18, 1997; Burton *et al.*, *Advances in Immunology*, 57: 191–280, 1994; PCT publikatsioon nr WO9201047; PCT publikatsioonid nr WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; ja USA patendid nr 5 698 426; 5 223 409;

20 5 403 484; 5 580 717; 5 427 908; 5 750 753; 5 821 047; 5 571 698; 5 427 908; 5 516 637; 5 780 225; 5 658 727; 5 733 743 ja 5 969 108.

[0188] Eelnimetatud allikates kirjeldatu kohaselt võib pärast faagi selekteerimist faagist isoleerida antikeha kodeerivad piirkonnad ja kasutada neid terviklike antikehade,

25 sealhulgas inimese antikehade või mis tahes muu soovitud fragmentide genereerimiseks ning ekspresseerida mis tahes soovitud peremehes, sealhulgas imetajarakkudes, putukarakkudes, taimerakkudes, pärmi- ja bakterirakkudes, näiteks vastavalt allpool üksikasjalikult kirjeldatule. Näiteks võib rakendada ka Fab, Fab' ja F(ab')₂ fragmentide rekombinantseks tootmiseks kasutatavaid tehnikaid, kasutades selleks tehnika tasemes

30 tuntud meetodeid, näiteks selliseid, mis on avaldatud publikatsioonides PCT publikatsioon WO 92/22324; Mullinax *et al.*, *BioTechniques*, 12(6): 864–869, 1992; ja Sawai *et al.*, *AJRI*, 34: 26–34, 1995; ja Better *et al.*, *Science*, 240: 1041–1043, 1988. Tehnikate näidete hulka, mida võib kasutada üheaheelaliste Fv-de ja antikehade

tootmiseks, kuuluvad need, mida on kirjeldatud publikatsioonides USA patendid nr 4 946 778 ja 5 258 498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology*, 203: 46–88, 1991; Shu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 7995–7999, 1993; ja Skerra *et al.*, *Science*, 240: 1038–1040, 1988.

5

[0189] Faagidisplei tehnoloogiat võib kasutada leiutisekohaste antikehade afiinsuse suurendamiseks Fc γ RIIB-suhtes. See tehnika võib olla kasulik kõrge afiinsusega antikehade saamiseks, mida võib kasutada leiutisekohastes kombineeritud meetodites. Tehnoloogia, mida nimetatakse afiinsusküpsemiseks, kasutab mutageneesi või CDR-il jalutamist ja uuesti selekteerimist, kasutades selleks Fc γ RIIB-d või selle antigeenset fragmenti, et tuvastada antikehasid, mis seonduvad antigeeniga kõrgema afiinsusega kui esialgne või lähteantikeha (vt näiteks Glaser *et al.*, 1992, *J. Immunology* 149: 3903). Üksikute nukleotiidide asemel tervete koodonite mutageniseerimine annab tulemuseks aminohappe mutatsioonide poolrandomiseeritud repertuaari. Konstrueerida võib kogusid, mis koosnevad kloonide variantide kogumist, millest igauks erineb ühe aminohappe muutuse poolest ühes CDR-is ja mis sisaldab variante, mis tähistavad kõiki võimalikke aminohappe asendusi iga CDR-i jäägi kohta. Antigeeni suhtes suurenenud sidumisafiinsusega mutantide sõelumiseks võib immobiliseeritud mutandid viia kokku märgistatud antigeeniga. Mutantsete antikehade tuvastamiseks, millel on suurenenud aviidsus antigeeni suhtes, võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud sõelumismeetodit (näiteks ELISA) (vt Wu *et al.*, 1998, *Proc Natl. Acad Sci. USA* 95: 6037; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunology* 155: 1994). Samuti on võimalik CDR-il jalutamine, mis randomiseerib kerge ahela (vt Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Bio.* 263: 551).

25 [0190] Leiutisekohaseid antikehi võib lisaks iseloomustada epitoobi kaardistamise teel, nii et selle tulemusel saab selekteerida antikehi, millel on suurim spetsiifilisus Fc γ RIIB suhtes võrreldes Fc γ RIIA-ga. Antikehade epitoobi kaardistamise meetodid on tehnika tasemes hästi tuntud ja leiutisekohastes meetodites hõlmatud. Teatavatel juhtudel võib leiutisekohase antikeha epitoobi kaardistamisel kasutada liitvalke, mis sisaldavad 30 Fc γ RIIB ühte või mitut piirkonda. Ühel spetsiifilisel juhul sisaldab liitvalk Fc γ RIIB piirkonna aminohappejärjestust, mis on liidetud inimese IgG2 Fc osaga. Iga liitvalk võib lisaks sisaldada retseptori teatavate piirkondade aminohappe vahetusi ja/või asendusi vastava piirkonnaga homoloogi retseptorist, näiteks Fc γ RIIA, vastavalt allpool tabelis 4

näidatule. pMGX125 ja pMGX132 sisaldavad FcγRIIB retseptori IgG sidumissaiti, eespool nimetatud FcγRIIB C-otsaga ja viimati nimetatud FcγRIIA C-otsaga, ning neid võib kasutada C-otsa sidumise diferentseerimiseks. Teistel on FcγRIIA asendused IgG sidumissaidis ja FcγIIA või FcγIIB N-otsas. Need molekulid võivad aidata kindlaks määrata seda retseptori molekuli osa, kus antikeha seob.

[0191] Tabel 4. Liitvalkude loetelu, mida võib kasutada FcγRIIB vastaste monoklonaalsete antikehade epitoobi uurimiseks. Järgid 172 kuni 180 kuuluvad FcγRIIA ja B IgG sidumissaidile. Spetsiifilised aminohapped FcγRIIA järjestusest on paksus kirjas. C-otsa järjestus APSSS on järjestusega SEQ ID NO: 11 ja C-otsa järjestus VPSMGSSS on järjestusega SEQ ID NO: 12.

Plasmiid	Retseptor	N-ots	172–180	SEQ ID NO:	C-ots
pMGX125	RIIb	IIb	KKFSRSDPN	51	APS-----SS (IIb)
pMGX126	RIIa/b	IIa	Q KFSRLDPN	52	APS-----SS (IIb)
pMGX127		IIa	Q KFSRLDPT	53	APS-----SS (IIb)
pMGX128		IIb	K KFSRLDPT	54	APS-----SS (IIb)
pMGX129		na	Q KFSHLDPT	55	APS-----SS (IIb)
pMGX130		IIb	K KFSHLDPT	56	APS-----SS (IIb)
pMGX131		IIa	Q KFSRLDPN	52	VPSMGSSS(IIa)
pMGX132		IIb	K KFSRSDPN	51	VPSMGSSS(IIa)
pMGX133	RIIa-131R	IIa	Q KFSRLDPT	53	VPSMGSSS(IIa)
pMGX134	RIIa-131H	IIa	Q KFSHLDPT	55	VPSMGSSS(IIa)
pMGX135		IIb	K KFSRLDPT	54	VPSMGSSS(IIa)
pMGX136		IIb	K KFSHLDPT	56	VPSMGSSS(IIa)

15 [0192] Liitvalke võib kasutada mis tahes biokeemilises analüüsis, mida kasutatakse leiutisekohase FcγRIIB vastase antikehaga seondumise kindlaks määramiseks, näiteks

ELISA-s. Teistel juhtudel võib epitoobi spetsiifilisuse edasiseks kinnitamiseks kasutada peptiide, mille spetsiifilised jäägid on asendatud Fc γ RIIA järjestusest saadud jääkidega.

[0193] Leiutisekohaseid antikehi võib iseloomustada Fc γ RIIB-ga spetsiifilise seondumise osas, kasutades selleks mis tahes tehnika tasemes tuntud immunoloogilist või biokeemilist meetodit, mida kasutatakse iseloomustamiseks, sealhulgas antikeha ja Fc γ RIIB vahelise interaktsiooni kvantifitseerimiseks. Leiutisekohase antikeha Fc γ RIIB-ga spetsiifilise seondumise kindlaks määramiseks võib kasutada näiteks immunoloogilisi või biokeemilisi meetodeid, sealhulgas mittepiiravalt ELISA analüüsi, pinnaplasmonresonantsi analüüsi, immunosadestamise analüüsi, afiinsuskromatograafiat ja tasakaalualüüsi. Immuuanalüüside hulka, mida võib kasutada leiutisekohaste antikehade immunospetsiifilise sidumise ja ristreaktiivsuse analüüsimiseks, kuuluvad mittepiiravalt konkureerivad ja mittekonkureerivad analüüsisüsteemid, milles kasutatakse selliseid tehnikaid nagu immunoblotanalüüsid, radioimmuuanalüüsid, ELISA (ensüüm-immuunsorptsiooni analüüs), kihttehnikal põhinevad immuuanalüüsid, immunosadestamise analüüsid, pretsipitiinreaktsioonid, geeldifusioonpretsipitiinreaktsioonid, immunodifusioonianalüüsid, aglutinatsioonianalüüsid, fluorestsentsimmuuanalüüsid, valgu A immuuanalüüsi jpt. Sellised analüüsid on rutiinsed ja tehnika tasemes hästi tuntud (vt näiteks Ausubel *et al.* (toim.), 1994, „Current Protocols in Molecular Biology”, vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York).

[0194] Leiutisekohaste antikehade analüüsimiseks võib kasutada ka mis tahes tehnika tasemes tuntud pinnaplasmonresonantsil põhinevaid analüüse, mida kasutatakse antikeha ja Fc γ RIIB vahelise interaktsiooni kineetiliste parameetrite iseloomustamiseks. Leiutises võib kasutada mis tahes kaubanduslikult kättesaadavat SPR-instrumenti, sealhulgas mittepiiravalt BIAcore instrumente, mis on saadaval ettevõttelt Biacore AB (Uppsala, Rootsi); IAsys instrumente, mis on saadaval ettevõttelt Affinity Sensors (Franklin, MA.); IBIS süsteemi, mis on saadaval ettevõttelt Windsor Scientific Limited (Berks, UK), SPR-CELLIA süsteemid, mis on saadaval ettevõttelt Nippon Laser and Electronics Lab (Hokkaido, Jaapan), ja SPR Detector Spreeta, mis on saadaval ettevõttelt Texas Instruments (Dallas, TX). SPR-põhise tehnoloogia kohta ülevaate saamiseks vt Mullet *et al.*, 2000, *Methods* 22: 77–91; Dong *et al.*, 2002, *Review in Mol. Biotech.*, 82: 303–323; Fivash *et al.*, 1998, *Current Opinion in Biotechnology* 9: 97–101; Rich *et al.*, 2000,

Current Opinion in Biotechnology 11: 54–61. Lisaks on leiutisekohastes meetodites võimalik kasutada mis tahes SPR-instrumente ja SPR-il põhinevaid meetodeid, mida kasutatakse valkudevaheliste interaktsioonide mõõtmiseks, mida on kirjeldatud USA patentides nr 6 373 577; 6 289 286; 5 322 798; 5 341 215; 6 268 125.

5

[0195] Lühidalt öeldes hõlmavad SPR-il põhinevad analüüsid pinnal oleva sidumiskaari ühe liikme immobiliseerimist ja selle interaktsiooni jälgimist sidumiskaari teise liikmega lahuses reaajas. SPR põhineb pinna lähedal oleva lahusti murdumisnäitaja osas toimuvate muutuste mõõtmisel, mis esinevad kompleksi moodustumise või dissotsiatsiooni korral. Pind, millel immobiliseerimine toimub on sensorikiip, mis on SPR-tehnoloogias kesksel kohal; see koosneb klaaspinnast, mis on kaetud õhukese kullakihi ja moodustab aluse mitmete spetsiaalsete pindade jaoks, mis on kujundatud molekuli pinnaga seondumise optimeerimiseks. Mitmed sensorikiibid on kaubanduslikult kättesaadavad, eelkõige eespool loetletud ettevõtelt, millest kõiki võib kasutada leiutiskirjelduse kohastes meetodites. Sensorikiipide näidete hulka kuuluvad need, mis on saadaval ettevõtelt BIAcore AB, Inc., näiteks sensorikiip CM5, SA, NTA ja HPA. Leiutisekohase molekuli sensorikiibi pinnale immobiliseerimiseks võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud immobiliseerimise meetodeid ja keemilisi meetodeid, sealhulgas mittepiiravalt otsest kovalentset sidumist amiinrühmade kaudu, otsest kovalentset sidumist sulfhüdrüülrühmade kaudu, biotiini liitmist avidiiniga kaetud pinnaga, aldehüüdi sidumist süsivesiku rühmadega ja histidiini märgise kaudu NTA kiipidega liitmist.

[0196] Leiutisekohaste antikehade sidumisspetsiifilisuse hindamiseks võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud meetodit, mida kasutatakse sidumiskaaride interaktsioonide kindlaks määramiseks, sealhulgas mittepiiravalt ELISA-t, immunoblotanalüüsi, pinnaplasmonresonantsi (näiteks BIAcore) ja radioimmuunanalüüsi. Mis tahes tehnika tasemes tuntud meetodit, mida kasutatakse sidumisspetsiifilisuse hindamiseks, võib kasutada leiutiskirjelduse kohaste antikehade tuvastamiseks, mis näitavad K_d väärtust, mis on suurem kui 0,001 nM, kuid mitte suurem kui 5 nM, mitte suurem kui 10 nM, mitte suurem kui 15 nM, mitte suurem kui 20 nM, mitte suurem kui 25 nM, mitte suurem kui 30 nM, mitte suurem kui 35 nM, mitte suurem kui 40 nM, mitte suurem kui 45 nM või mitte suurem kui 50 nM vastavalt BIAcore analüüsiga kindlaks määratule.

[0197] Leiutiskirjelduses pakutakse ka leiutisekohaseid antikehi või nende fragmente, mille on kõrge sidumisafiinsus huvipakkuva antigeeni suhtes. Ühel konkreetsel juhul on käesoleva leiutiskirjelduse kohasel immunospetsiifilisel polüpeptiidil või selle fragmendil assotsiatsioonikiiruse konstant ehk k_{on} kiirus (antikeha (Ab) + antigeen (Ag) Ab-Ag), mis on vähemalt $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vähemalt $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vähemalt $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vähemalt $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vähemalt $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vähemalt $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ või vähemalt $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Ühel eelistatud juhul on käesoleva leiutiskirjelduse kohasel antikehal või selle fragmendil k_{on} , mis on vähemalt $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vähemalt $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vähemalt $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vähemalt $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vähemalt $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, vähemalt $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ või vähemalt $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

10

[0198] Ühel teisel juhul on käesoleva leiutiskirjelduse kohasel antikehal või selle fragmendil k_{off} kiirus (antikeha (Ab) + antigeen (Ag) Ab-Ag), mis on väiksem kui 10^{-1} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-2} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-3} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-4} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-5} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-6} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-7} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-8} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-9} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ või väiksem kui 10^{-10} s^{-1} . Ühel eelistatud juhul on käesoleva leiutiskirjelduse kohasel antikehal või selle fragmendil k_{off} , mis on väiksem kui $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-5} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-6} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-7} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-8} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, väiksem kui 10^{-9} s^{-1} , väiksem kui $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ või väiksem kui 10^{-10} s^{-1} .

20

[0199] Veel teistel juhtudel on käesoleva leiutiskirjelduse kohasel antikehal või selle fragmendil affiinsuskonstant K_a (k_{on} / k_{off}), mis on vähemalt 10^2 M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^3 M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^4 M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^5 M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^6 M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^7 M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^8 M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^9 M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^{10} M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^{11} M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^{12} M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^{13} M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^{14} M^{-1} , vähemalt $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, vähemalt 10^{15} M^{-1} või vähemalt $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$. Veel ühel teisel juhul on käesoleva leiutiskirjelduse kohasel antikehal või selle fragmendil dissotsiatsioonikonstant ehk K_d (k_{off} / k_{on}), mis on väiksem kui 10^{-2} M , väiksem kui $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, väiksem kui 10^{-3} M , väiksem kui $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, väiksem

30

kui 10^{-4} M, väiksem kui 5×10^{-4} M, väiksem kui 10^{-5} M, väiksem kui 5×10^{-5} M, väiksem kui 10^{-6} M, väiksem kui 5×10^{-6} M, väiksem kui 10^{-7} M, väiksem kui 5×10^{-7} M, väiksem kui 10^{-8} M, väiksem kui 5×10^{-8} M, väiksem kui 10^{-9} M. Teostustes, mis kuuluvad määratletud patendinõudluse ulatusse, on käesoleva leiutise kohasel antikehal või selle fragmendil dissotsiatsioonikonstant ehk K_d (k_{off}/k_{on}), mis on väiksem kui 5×10^{-9} M, väiksem kui 10^{-10} M, väiksem kui 5×10^{-10} M, väiksem kui 10^{-11} M, väiksem kui 5×10^{-11} M, väiksem kui 10^{-12} M, väiksem kui 5×10^{-12} M, väiksem kui 10^{-13} M, väiksem kui 5×10^{-13} M, väiksem kui 10^{-14} M, väiksem kui 5×10^{-14} M, väiksem kui 10^{-15} M või väiksem kui 5×10^{-15} M.

10

[0200] Samuti kirjeldatakse siin kirjeldatud meetodite abil valmistatud antikehade iseloomustamist, kasutades selleks teatavaid iseloomustamise analüüse, et tuvastada leiutisekohaste antikehade funktsiooni, eelkõige nende Fc γ RIIB signaliseerimise moduleerimise aktiivsust. Näiteks võivad leiutisekohased iseloomustamise analüüsid mõõta türosiinijääkide fosforüülimist Fc γ RIIB ITIM fragmendis või mõõta B-raku retseptori genereeritud kaltsiumi mobilisatsiooni inhibeerimist. Need iseloomustamise analüüsid võivad olla rakupõhised või rakuvabad analüüsid.

[0201] Tehnika tasemes on hästi teada, nuumrakkudes põhjustab Fc γ RIIB koagregatsioon kõrge afiinsusega IgE retseptori Fc ϵ RI-ga antigeeni esile kutsutud degranulatsiooni, kaltsiumi mobilisatsiooni ja tsütokiinide tootmise inhibeerimist (Metcalf D.D. *et al.*, 1997, *Physiol. Rev.* 77: 1033; Long E.O. 1999, *Annu Rev. Immunol.* 17: 875). Selle signaaliraja molekulaarseid üksikasju on hiljaaegu selgitatud (Ott V. L., 2002, *J. Immunol.* 162(9): 4430–4439). Kui Fc γ RIIB on Fc ϵ RI-ga koagregeeritud, siis fosforüülitakse see kiiresti selle ITIM fragmendis oleval türosiinil, ja seejärel värbab see Src homoloog-2, mis sisaldab inositol-5-fosfataasi (SHIP); mis on SH2 domeeni sisaldav inositolpolüfosfaat-5-fosfataas, mis omakorda fosforüülitakse ja see ühineb Shc ja p62^{dok}-iga (p62^{dok} on adaptormolekulide perekonna prototüüp, mis hõlmab signaalidomeene, näiteks aminoterminalset pleckstrini homoloogia domeeni (PH domeen), PTB domeeni ja karboksüterminalset piirkonda, mis sisaldab PXXP motiive ja arvukaid fosforüülimissaite (Carpino *et al.*, 1997, *Cell*, 88: 197; Yamanshi *et al.*, 1997, *Cell*, 88: 205)).

[0202] Leiutisekohaseid Fc γ RIIB vastaseid antikehi võib iseloomustada ühe või mitme IgE vahendatud reaktsiooni moduleerimisel. Eelistatult kasutatakse leiutisekohaste Fc γ RIIB vastaste antikehade iseloomustamisel IgE vahendatud reaktsioonide moduleerimisel rakuliine, mis ekspresseerivad samaaegselt kõrge afiinsusega retseptorit

5 IgE suhtes ja madala afiinsusega retseptorit Fc γ RIIB suhtes. Ühes spetsiifilises teostuses kasutatakse leiutisekohastes meetodites rakke, mis on saadud roti basofiilse leukeemia rakuliinist (RBL-H23; Barsumian E.L. *et al.*, 1981, *Eur. J. Immunol.* 11: 317), mida on transfekteeritud täispikkuses inimese Fc γ RIIB-ga. RBL-2H3 on hästi iseloomustatud roti rakuliin, mida on laialdaselt kasutatud signaliseerimismehhanismide uurimisel pärast IgE

10 vahendatud rakkude aktivatsiooni. RBL-2H3 rakkudes ekspresseerimisel ja FC ϵ RI-ga koagregeerimisel inhibeerib Fc γ RIIB FC ϵ RI esile kutsutud kaltsiumi mobilisatsiooni, degranulatsiooni ja tsütokiinide tootmist (Malbec *et al.*, 1998, *J. Immunol.* 160: 1647; Daeron *et al.*, 1995, *J. Clin. Invest.* 95: 577; Ott *et al.*, 2002 *J. of Immunol.* 168: 4430–4439).

15

[0203] Leiutisekohaseid Fc γ RIIB vastaseid antikehi võib iseloomustada Fc ϵ RI esile kutsutud nuumrakkude aktivatsiooni inhibeerimise osas. Näiteks on rakke, mis on saadud roti basofiilse leukeemia rakuliinist (RBL-H23; Barsumian E.L. *et al.*, 1981, *Eur. J. Immunol.* 11: 317), mida on transfekteeritud Fc γ RIIB-ga, sensitiseeritud IgE-ga ja

20 stimuleeritud hiire IgG vastaste küüliku F(ab')₂ fragmentidega, et agregeerida üksnes Fc ϵ RI-d, või hiire IgG vastase terve küüliku antikehaga, et agregeerida Fc γ RIIB-d ja Fc ϵ RI-d. Selles süsteemis võib allavoolu signaalimolekulide kaudset moduleerimist analüüsida leiutisekohaste antikehade lisamisel sensitiseeritud ja stimuleeritud rakkudele. Näiteks võib analüüsida Fc γ RIIB türosiini fosforüülimist ja SHIP-i värbamist ja

25 fosforüülimist, MAP kinaasi perekonna liikmete, sealhulgas mittepiiravalt Erk1, Erk2, JNK, või p38 aktivatsiooni; ning p62^{dok} türosiini fosforüülimist ja selle ühinemist SHIP-i ja RasGAP-iga.

[0204] Üks näitlik analüüs, mida kasutatakse Fc ϵ RI esile kutsutud nuumrakkude

30 aktivatsiooni leiutisekohaste antikehade poolt inhibeerimise kindlaks määramiseks, võib hõlmata järgnevat: RBL-H23 rakkude transfekteerimist inimese Fc γ RIIB-ga; RBL-H23 rakkude sensitiseerimist IgE-ga; RBL-H23 rakkude stimuleerimist hiire IgG vastase küüliku F(ab')₂-ga (et agregeerida üksnes Fc ϵ RI ja kutsuda esile Fc ϵ RI vahendatud

- signaliseerimist, mida kasutatakse kontrollina) või RBL-H23 rakkude stimuleerimist hiire IgG vastase terve küüliku antikehaga (et koagregerida Fc γ RIIB ja Fc ϵ RI, mille tulemus on Fc ϵ RI vahendatud signaliseerimise inhibeerimine). Rakke, mida on stimuleeritud hiire IgG vastaste tervete küüliku antikehadega, võib lisaks eelinkubeerida leiutisekohaste antikehadega. Rakkude, mida on eelinkubeeritud leiutisekohaste antikehadega, ja rakkude, mida ei ole eelinkubeeritud leiutisekohaste antikehadega, Fc ϵ RI-st sõltuva aktiivsuse mõõtmine ja Fc ϵ RI-st sõltuva aktiivsuse tasemete võrdlemine nendes rakkudes näitab Fc ϵ RI-st sõltuva aktiivsuse moduleerimist leiutisekohaste antikehade poolt.
- 5
- 10 **[0205]** Eespool kirjeldatud näitlikke analüüsimeetodeid võib kasutada näiteks antikehade tuvastamiseks, mis blokeerivad ligandi (IgG) seondumist Fc γ RIIB retseptoriga ja antagoniseerivad Fc γ RIIB vahendatud Fc ϵ RI signaliseerimise inhibeerimist, ennetades Fc γ RIIB ja Fc ϵ RI koagregatsiooni. See analüüsimeetod võimaldab tuvastada ka antikehi, mis parandavad Fc γ RIIB ja Fc ϵ RI koagregatsiooni ja agoniseerivad Fc γ RIIB vahendatud
- 15 Fc ϵ RI signaliseerimise inhibeerimist, soodustades Fc γ RIIB ja Fc ϵ RI koagregatsiooni.
- [0206]** Eelistatult on Fc ϵ RI-st sõltuv aktiivsus vähemalt üks või mitu alljärgnevate hulgast: allavoolu signaliseerivate molekulide moduleerimine (näiteks Fc γ RIIB fosforülatsiooni oleku moduleerimine, SHIP-i värbamise moduleerimine, MAP kinaasi aktiivsuse moduleerimine, SHIP-i fosforülatsiooni oleku moduleerimine, SHIP-i ja Shc ühinemise moduleerimine, p62^{dok} fosforülatsiooni oleku moduleerimine, p62^{dok} ja SHIP-i ühinemise moduleerimine, p62^{dok} ja RasGAP ühinemise moduleerimine, kaltsiumi mobilisatsiooni moduleerimine, degranulatsiooni moduleerimine ja tsütokiinide tootmise moduleerimine). Veel ühel teisel eelistatud juhul on Fc ϵ RI-st sõltuv aktiivsus serotoniini vabastamise ja/või rakuvälise Ca⁺⁺ sissevoolu ja/või IgE-st sõltuv nuumrakkude aktivatsioon. Valdonna asjatundjale on teada, et Fc γ RIIB ja Fc ϵ RI koagregatsioon stimuleerib Fc γ RIIB türosiini fosforülatsiooni, stimuleerib SHIP-i värbamist, stimuleerib SHIP-i türosiini fosforülatsiooni ja She-ga ühinemist ja inhibeerib MAP kinaasi perekonna liikmete, sealhulgas mittepiiravalt Erk1, Erk2, JNK, p38 aktivatsiooni.
- 20
- 25
- 30 Valdonna asjatundjale on ka teada, et Fc γ RIIB ja Fc ϵ RI koagregatsioon stimuleerib paremat p62^{dok} türosiini fosforülatsiooni ja selle ühinemist SHIP-i ja RasGAP-iga.

- [0207] Leiutisekohaseid Fc γ RIIB vastaseid antikehi võib iseloomustada nende suutlikkuse põhjal moduleerida IgE vahendatud reaktsiooni, jälgides ja/või mõõtes nuumrakkude või basofiilide degranulatsiooni, eelistatult rakupõhises analüüsis. Eelistatult on sellistes analüüsides kasutamiseks sobivaid nuumrakke või basofiile töödeldud, et need sisaldaksid inimese Fc γ RIIB-d, kasutades selleks valdkonna asjatundjale tuntud standardseid rekombinantseid meetodeid. Ühel spetsiifilisel juhul iseloomustatakse leiutisekohaseid Fc γ RIIB vastaseid antikehi nende suutlikkuse osas moduleerida IgE vahendatud reaktsiooni rakupõhises β -heksoosaminidaasi (graanulites sisalduv ensüüm) vabanemise analüüsis. B-heksoosaminidaasi vabanemine nuumrakkudest ja basofiilidest on peamine sündmus ägeda allergilise ja põletikulise haigusseisundi korral (Aketani *et al.*, 2001 *Immunol. Lett.* 75: 185–189; Aketani *et al.*, 2000, *Anal. Chem.* 72: 2653–2658). Analüüsida võib ka teiste põletikuliste vahendajate, sealhulgas mittepiiravalt serotoniini ja histamiini vabanemist, et mõõta IgE vahendatud reaktsiooni vastavalt leiutisekohastele meetoditele. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, on graanulite, näiteks β -heksoosaminidaasi sisaldavate graanulite vabanemine nuumrakkudest ja basofiilidest rakusisese kaltsiumi kontsentratsioonist sõltuv protsess, mida käivitab Fc γ RI-de ristsidumine multivalentse antigeeniga.
- [0208] Üks näitlik analüüs leiutisekohaste Fc γ RIIB vastaste antikehade iseloomustamiseks IgE vahendatud reaktsiooni vahendamisel on β -heksoosaminidaasi vabanemise analüüs, mis hõlmab järgnevat: RBL-H23 rakkude transfekdeerimine inimese Fc γ RIIB-ga; rakkude sensitiseerimine üksnes hiire IgE-ga või hiire IgE ja leiutisekohase Fc γ RIIB vastase antikehaga; rakkude stimuleerimine erinevates kontsentratsioonides hiirevastase kitse antikeha F(ab)₂-ga, eelistatult vahemikus 0,03 μ g/ml kuni 30 μ g/ml ligikaudu 1 tund; supernatandi kogumine; rakkude lüüsimine; ja supernatandis vabanenud β -heksoosaminidaasi aktiivsuse mõõtmine kolorimeetrilise analüüsi abil, näiteks *p*-nitrofenüül-*N*-atsetüül- β -D-glükoosaminidaasi kasutades. Vabanenud β -heksoosaminidaasi aktiivsust ekspresseeritakse vabanenud aktiivsuse protsendina koguaktiivsuse suhtes. Vabanenud β -heksoosaminidaasi aktiivsust mõõdetakse ja võrreldakse rakkudes, mida on töödeldud üksnes antigeeniga; üksnes IgE-ga; IgE ja leiutisekohase Fc γ RIIB vastase antikehaga. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, siis kui rakke on sensitiseeritud üksnes hiire IgE-ga ja

neile on esitatud väljakutse hiire IgG vastase kitse polükloonaalse antikeha F(ab)₂ fragmentidega, siis toimub FcγRI agregatsioon ja ristsidumine, kuna polükloonaalne antikeha tunneb ära FcεRI-ga seondunud hiire IgE kerge ahela; mis omakorda põhjustab nuumrakkude aktivatsiooni ja degranulatsiooni. Teisest küljest, kui rakke on sensitiseeritud hiire IgE ja leiutisekohase FcγRIIB vastase antikehaga ning neile on esitatud väljakutse hiire IgG vastase kitse polükloonaalse antikeha F(ab)₂ fragmentidega, siis toimub FcγRI ja FcγRIIB ristsidumine, mille tulemuseks on FcγRI esile kutsutud degranulatsiooni inhibeerimine. Mõlemal juhul kutsub hiirevastane kitse F(ab)₂ esile annusest sõltuvat β-heksoosaminidaasi vabanemist. Osadel juhtudel ei mõjuta FcγRIIB vastased antikehad, mis on seondunud FcγRIIB retseptoriga ja ristseotud FcγRI-ga, inhibeeriva raja aktivatsiooni, st degranulatsiooni tase ei muutu FcγRIIB vastase antikeha juuresolekul. Teistes teostustes vahendavad FcγRIIB vastased antikehad inhibeeriva retseptori FcγRIIB tugevamat aktivatsiooni, kui see on seotud FcγRIIB vastase antikehaga, võimaldades tõhusat ristsidumist FcγRI-ga ja homoagregeeritud FcγRIIB inhibeeriva raja aktivatsiooni.

[0209] Samuti on avaldatud leiutisekohaste FcγRIIB vastaste antikehade IgE vahendatud rakkude reaktsioonile avaldatava mõju iseloomustamine kaltsiumi mobilisatsiooni analüüsi kasutades, milles kasutatakse valdkonna asjatundjale tuntud metodoloogiaid. Näitlik kaltsiumi mobilisatsiooni analüüs võib hõlmata järgnevat: basofiilide või nuumrakkude täitmine IgE-ga; rakkude inkubeerimine kaltsiumi indikaatori, näiteks Fura 2-ga; rakkude stimuleerimine vastavalt eespool kirjeldatule; ja rakusisese kaltsiumi kontsentratsiooni jälgimine ja/või kvantifitseerimine, näiteks voolutsütomeetriat kasutades. Rakusisese kaltsiumi kontsentratsiooni jälgimiseks ja/või kvantifitseerimiseks võib kasutada mis tahes valdkonna asjatundjale tuntud meetodit, vt näiteks *Immunology Letters*, 2001, 75: 185–189; *British J. of Pharm.*, 2002, 136: 837–45; *J. of Immunology*, 168: 4430–4439 ja *J. of Cell Biol.*, 153(2): 339–349.

[0210] Eelistatult inhibeerivad leiutisekohased FcγRIIB vastased antikehad IgE vahendatud rakkude aktivatsiooni. Teistel juhtudel blokeerivad leiutisekohased FcγRIIB vastased antikehad FcγRIIB poolt reguleeritud inhibeerivaid radasid või blokeerivad FcγRIIB-l olevat ligandi sidumissaiti ning seeläbi parandavad immuunreaktsiooni.

[0211] Võime uurida inimese nuumrakke on olnud piiratud sobivate pikaajaliste inimese nuumrakkude kultuuride puudumise tõttu. Hiljaaegu võeti kasutusele kaks uutset tüviraku faktorist sõltuvat inimese nuumrakkude rakuliini, mis on tähistatud kui LAD1 ja LAD2, mis saadi nuumrakulise sarkoomi / leukeemia all kannatava patsiendi luuüdi aspiraatidest

5 (Kirshenbaum *et al.*, 2003, *Leukemia research*, 27: 677–682). Kirjeldatu kohaselt ekspresseerivad mõlemad rakuliinid FcεRI-d ja mitmeid inimese nuumraku markereid. Leiutis hõlmab LAD1 ja LAD2 rakkude kasutamist leiutisekohastes meetodites, et hinnata leiutisekohaste antikehade mõju IgE vahendatud reaktsioonidele. Ühel spetsiifilisel juhul võib rakupõhiseid β-heksoosaminidaasi vabanemise analüüse, näiteks neid, mida

10 kirjeldati eespool, kasutada LAD rakkude puhul, et määrata kindlaks mis tahes IgE vahendatud reaktsiooni modulatsioon leiutisekohaste FcγRIIB vastaste antikehade poolt. Ühes näitlikus analüüsis täidetakse inimese nuumrakud, näiteks LAD1 rakud inimese IgE nitrofenooli (NP) vastase kimäärse antikehaga ja neile esitatakse väljakutse polüvalentse antigeeniga BSA-NP ning rakkude degranulatsiooni jälgitakse supernatandis vabanenud

15 β-heksoosaminidaasi vabanemise teel (Kirshenbaum *et al.*, 2003, *Leukemia research*, 27: 677–682).

[0212] Kui inimese nuumrakud ekspresseerivad endogeenset FcγRIIB-d madalal tasemel vastavalt tehnika tasemes tuntud standardseid meetodeid, näiteks FACS värvimist

20 kasutades kindlaks määratule, siis võib leiutisekohaste FcγRIIB vastaste antikehade vahendatud inhibeeriva raja aktivatsiooni jälgimine ja/või erinevuste tuvastamine olla keeruline. Samuti on olemas alternatiivseid meetodeid, kus FcγRIIB ekspressiooni saab suurendada tsütokiine ja konkreetseid kasvutingimusi kasutades. Kirjeldatu kohaselt suurendab FcγRIIB taset inimese monotsüütide rakuliinides, näiteks THP1 ja U937

25 (Tridandapani *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277(7): 5082–5089) ja inimese primaarsetes monotsüütides (Pricop *et al.*, 2001, *J. of Immunol.*, 166: 531–537) väga suurel määral IL4. Samuti on kirjeldatud U937 rakkude diferentseerimist dibutüürül-tsüklilise AMP-ga, et suurendada FcγRIIB ekspressiooni (Cameron *et al.*, 2002 *Immunology Letters* 83, 171–179). Seega saab leiutiskirjelduse kohastes meetodites kasutamiseks endogeense FcγRIIB

30 ekspressiooni inimese nuumrakkudes suurendada tsütokiine, näiteks IL-4, I-13 kasutades, et parandada tuvastamise tundlikkust.

- [0213] Leiutisekohaseid Fc γ RIIB vastaseid antikehi võib iseloomustada B-raku retseptori (BCR-i) vahendatud signaliseerimise inhibeerimise osas. BCR-i vahendatud signaliseerimine võib hõlmata vähemalt ühte või mitut allavoolu bioloogilist reaktsiooni, näiteks B-rakkude aktivatsiooni ja proliferatsiooni, antikeha tootmist jne. Fc γ RIIB ja BCR-i koagregatsioon põhjustab rakutsükli progressiooni ja rakkude ellujäämise inhibeerimist. Lisaks põhjustab Fc γ RIIB ja BCR-i koagregatsioon BCR-i vahendatud signaliseerimise inhibeerimist.
- [0214] Konkreetsemalt öeldes hõlmab BCR-i vahendatud signaliseerimine vähemalt ühte või mitut järgnevate hulgast: allavoolu signaliseerivate molekulide (näiteks Fc γ RIIB fosforülatsiooni oleku, SHIP-i värbamise, Btk ja/või PLC γ lokalisatsiooni, MAP kinaasi aktiivsuse, Akt (apoptoosi vastase signaali) värbamise, kaltsiumi mobilisatsiooni, rakutsükli progressiooni ja rakkude proliferatsiooni) moduleerimine.
- [0215] Kuigi arvukaid Fc γ RIIB vahendatud BCR-i signaliseerimise inhibeerimise efektorfunktsioone vahendatakse SHIP-i kaudu, demonstreeriti hiljaaegu, et lipopolüsahhariidi (LPS)-aktiveeritud B-rakud SHIP-i puudulikkusega hiirtelt näitavad märkimisväärset Fc γ RIIB vahendatud kaltsiumi mobilisatsiooni, Ins(1,4,5)P₃ tootmise ja Erk ja Akt fosforülatsiooni inhibeerimist (Brauweiler A. *et al.*, 2001, *Journal of Immunology*, 167(1): 204–211). Sellest tulenevalt võib *ex vivo* B-rakke SHIP-i puudulikkusega hiirtelt kasutada leiutisekohaste antikehade iseloomustamiseks. Üks näitlik analüüs leiutisekohaste antikehade poolt Fc γ RIIB vahendatud BCR-i signaliseerimise inhibeerimise kindlaks määramiseks võib hõlmata järgnevat: põrna B-rakkude isoleerimine SHIP-i puudulikkusega hiirtelt, nimetatud rakkude aktiveerimine lipopolüsahhariidiga ja nimetatud rakkude stimuleerimine IgM-i vastase antikeha F(ab')₂-ga, et agregeerida BCR, või IgM vastase antikehaga, et koagregeerida BCR Fc γ RIIB-ga. Rakke, mida on stimuleeritud terve IgM-i vastase antikehaga, et koagregeerida BCR Fc γ RIIB-ga, võib lisaks eelinkubeerida leiutisekohaste antikehadega. Rakkude Fc γ RIIB-st sõltuvat aktiivsust võib mõõta tehnika tasemes tuntud standardsete tehnikatega. Fc γ RIIB-st sõltuva aktiivsuse taseme võrdlus rakkudes, mida on eelinkubeeritud leiutisekohaste antikehadega, ja rakkudes, mida ei ole eelinkubeeritud, ning nende tasemete võrdlus näitab Fc γ RIIB-st sõltuva aktiivsuse moduleerimist leiutisekohaste antikehade poolt.

[0216] Fc γ RIIB-st sõltuva aktiivsuse mõõtmine võib hõlmata näiteks rakusisese kaltsiumi mobilisatsiooni mõõtmist volutsütomeetria abil, Akt ja/või Erk fosforülatsiooni mõõtmist, BCR-i vahendatud PI(3,4,5)P₃ ladestumise mõõtmist või Fc γ RIIB vahendatud B-rakkude proliferatsiooni mõõtmist.

5

[0217] Analüüse võib kasutada näiteks antikehade tuvastamiseks, mis moduleerivad Fc γ RIIB vahendatud BCR-i signaliseerimise inhibeerimist, blokeerides ligandi (IgG) sidumissaidi Fc γ RIIB retseptori suhtes ja antagoniseerides Fc γ RIIB vahendatud BCR-i signaliseerimise inhibeerimist, ennetades Fc γ RIIB ja BCR-i koagregatsiooni. Analüüse
10 võib kasutada ka antikehade tuvastamiseks, mis parandavad Fc γ RIIB ja BCR-i koagregatsiooni ja agoniseerivad Fc γ RIIB vahendatud BCR-i signaliseerimise inhibeerimist.

[0218] Samuti on kirjeldatud leiutisekohaste Fc γ RIIB vastaste antikehade
15 iseloomustamist Fc γ RIIB vahendatud signaliseerimise kohta inimese monotsüütides/makrofaagides. Fc γ RIIB koagregatsioon retseptoriga, mis kannab immunoretseptori türosiinil põhinevat aktivatsioonimotiivi (ITAM), vähendab Fc γ R-i vahendatud fagotsütoosi, kasutades SHIP-i selle efektorina (Tridandapani *et al.*, 2002, *J. Biol. Chem.* 277(7): 5082–5089). Fc γ RIIA koagregatsioon Fc γ RIIB-ga annab tulemuseks
20 Fc γ RIIB ITIM motiivil oleva türosiinijäägi kiire fosforülatsiooni, põhjustades SHIP-i fosforülatsiooni, SHIP-i She-ga ühinemise ja valkude fosforülatsiooni paranemist, mille molekulmass on 120 ja 60–65 kDa. Lisaks annab Fc γ RIIA koagregatsioon Fc γ RIIB-ga tulemuseks Akt fosforülatsiooni vähendamise, mis on seriini-treoniini kinaas, mis osaleb rakulises regulatsioonis ja mille ülesanne on pärssida apoptoosi.

25

[0219] Samuti on hõlmatud leiutisekohaste Fc γ RIIB vastaste antikehade iseloomustamine seoses nende Fc γ R-i vahendatud fagotsütoosi inhibeerimisega inimese monotsüütides/makrofaagides. Näiteks võib inimese monotsüütide rakuliinist THP-1 saadud rakke stimuleerida Fc γ RII vastase hiire monoklonaalse antikeha IV.3 ja
30 hiirevastase kitse antikeha Fab fragmentidega (et agregeerida üksnes Fc γ RIIA) või terve hiire monoklonaalse antikeha IV.3 ja hiirevastase kitse antikehaga (et koagregeerida Fc γ RIIA ja Fc γ RIIB). Selles süsteemis võib allavoolu signalseerivate molekulide moduleerimist, näiteks Fc γ RIIB türosiini fosforülatsiooni, SHIP-i fosforülatsiooni, SHIP-

i She-ga ühinemist, Akt fosforülatsiooni ja valkude fosforülatsiooni, mille molekulmass on 120 ja 60–65 kDa, analüüsida leiutisekohaste antikehade stimuleeritud rakkudele lisamise teel. Lisaks võib monotsüütide rakuliini Fc γ RIIB-st sõltuvat fagotsüütilist tõhusust mõõta vahetult leiutisekohaste antikehade juuresolekul või puudumisel.

5

[0220] Üks teine näitlik analüüs leiutisekohaste antikehade poolt Fc γ R-i vahendatud fagotsütoosi inhibeerimise kindlaks määramiseks inimese monotsüütides/makrofaagides võib hõlmata järgnevat: THP-1 rakkude stimuleerimine Fc γ RII vastase hiire antikeha IV.3 ja hiirevastase kitse antikeha Fab-iga (et agregeerida üksnes Fc γ RIIA ja kutsuda esile Fc γ RIIA vahendatud signalseerimist); või Fc γ RII vastase hiire antikeha ja hiirevastase kitse antikehaga (et koagregeerida Fc γ RIIA ja Fc γ RIIB ja inhibeerida Fc γ RIIA vahendatud signalseerimist). Rakke, mida on stimuleeritud Fc γ RII vastase hiire antikeha või hiirevastase kitse antikehaga, võib lisaks eelinkubeerida leiutisekohaste antikehadega. Stimuleeritud rakkude, mida on eelinkubeeritud leiutisekohaste antikehadega, ja rakkude, mida ei ole eelinkubeeritud leiutisekohaste antikehadega, Fc γ RIIA-st sõltuva aktiivsuse mõõtmine ja Fc γ RIIA-st sõltuva aktiivsuse tasemete võrdlemine nendes rakkudes näitab Fc γ RIIA-st sõltuva aktiivsuse moduleerimist leiutisekohaste antikehade poolt.

[0221] Kirjeldatud näitlikku analüüsimeetodit võib kasutada näiteks antikehade tuvastamiseks, mis blokeerivad ligandi seondumist Fc γ RIIB retseptoriga ja antagoniseerivad Fc γ RIIB vahendatud Fc γ RIIA signalseerimise inhibeerimist, ennetades Fc γ RIIB ja Fc γ RIIA koagregatsiooni. Seda analüüsi võib kasutada ka antikehade tuvastamiseks, mis parandavad Fc γ RIIB ja Fc γ RIIA koagregatsiooni ja agoniseerivad Fc γ RIIB vahendatud Fc γ RIIA signalseerimise inhibeerimist.

25

[0222] Leiutisekohaste antikehade funktsiooni iseloomustamine, mõõtes THP-1 rakkude suutlikkust fagotsütoosida fluorestseeritud IgG-opsoniseeritud lamba punaseid vererakke (SRBC), on samuti avaldatud varem kirjeldatud meetoditega (Tridandapani *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.* 275: 20 480 – 20 487). Näiteks hõlmab üks näitlik fagotsütoosi mõõtmiseks kasutatav analüüsimeetod järgnevat: THP-1 rakkude töötlemine leiutisekohaste antikehade või kontrollantikehaga, mis ei seondu Fc γ RII-ga, nimetatud rakkude aktiivsuse tasemete võrdlemine, kus erinevus rakkude aktiivsuste osas (näiteks tühistamise aktiivsus (THP-1 rakkude arv, mis seovad IgG-ga kaetud SRBC-d), kinnitumisaktiivsus (THP-

30

rakkudega seondunud SRBC koguarv) ja fagotsütoosi määr) näitab Fc γ RIIA-st sõltuva aktiivsuse moduleerimist leiutisekohaste antikehade poolt. Seda analüüsimeetodit võib kasutada näiteks antikehade tuvastamiseks, mis blokeerivad Fc γ RIIB retseptori ligandi sidumist ja antagoniseerivad Fc γ RIIB vahendatud fagotsütoosi inhibeerimist. Seda

5 analüüsimeetodit võib kasutada ka antikehade tuvastamiseks, mis parandavad Fc γ RIIB vahendatud Fc γ RIIA signaliseerimise inhibeerimist.

[0223] Ühel eelistatud juhul moduleerivad leiutisekohased antikehad Fc γ RIIB-st sõltuvat aktiivsust inimese monotsüütides/makrofaagides vähemalt ühel või mitmel järgmisel

10 viisil: allavoolu signaliseerivate molekulide moduleerimine (näiteks Fc γ RIIB fosforülatsiooni oleku moduleerimine, SHIP-i fosforülatsiooni moduleerimine, SHIP-i ja She ühinemise moduleerimine, Akt fosforülatsiooni moduleerimine, täiendavate valkude fosforülatsiooni moduleerimine, mis on ligikaudu 120 ja 60–65 kDa suurused) ja fagotsütoosi moduleerimine.

15

[0224] Kirjeldatakse leiutisekohaste antikehade iseloomustamist, kasutades selleks valdkonna asjatundjatele tuntud analüüsimeetodeid, et tuvastada antikehade mõju terapeutiliste antikehade rakkude efektorfunktsioonile, näiteks nende suutlikkust parandada terapeutiliste antikehade kasvajaspetsiifilist ADCC aktiivsust. Terapeutiliste

20 antikehade hulka, mida võib kasutada leiutisekohaste meetodite kohaselt, kuuluvad mittepiiravalt kasvajavastased antikehad, viirusevastased antikehad, mikroobivastased antikehad (näiteks bakterid ja ainuraksed parasiidid), mille näited on siin avaldatud (jagu 5.4.6). Eelkõige hõlmab leiutis leiutisekohaste antikehade iseloomustamist seoses nende mõjuga terapeutiliste antikehade, näiteks kasvajaspetsiifiliste monoklonaalsete antikehade

25 Fc γ R-vahendatud rakkude efektorfunktsioonile. Rakkude efektorfunktsioonide näidete hulka, mida võib analüüsida käesoleva leiutise kohaselt, kuuluvad mittepiiravalt antikehast sõltuv rakkude vahendatud tsütotoksilisus, fagotsütoos, opsoniseerimine, opsonofagotsütoos, C1q sidumine ja komplemendist sõltuv rakkude vahendatud tsütotoksilisus. Kasutada võib mis tahes valdkonna asjatundjatele tuntud rakupõhist või

30 rakuvaba analüüsimeetodit, mida kasutatakse rakkude efektorfunktsiooni aktiivsuse kindlaks määramiseks (rakkude efektorfunktsioonide analüüsimeetodeid vt Perussia *et al.*, 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179–192; Baggiolini *et al.*, 1998 *Experientia*, 44(10): 841–848; Lehmann *et al.*, 2000, *J. Immunol. Methods*, 243(1–2): 229–242; Browns E. J., 1994,

Methods Cell Biol., 45: 147–164; Munn *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.*, 172: 231–237, Abdul-Majid *et al.*, 2002, *Scand. J. Immunol.* 55: 70–81; Ding *et al.*, 1998, *Immunity* 8: 403–411).

- 5 [0225] Leiutisekohaseid antikehi võib analüüsida nende terapeutiliste antikehade FcγR-i vahendatud ADCC aktiivsusele avaldatava mõju osas efektorrakkudes, näiteks looduslikes tapjarakkudes, kasutades selleks mis tahes valdkonna asjatundjatele tuntud standardseid meetodeid (vt näiteks Perussia *et al.*, 2000, *Methods Mol. Biol.* 121: 179–192). Siin kannavad väljendid „antikehast sõltuv rakkude vahendatud tsütotoksilisus” ja
- 10 „ADCC” nende tavapärasest ja harilikku tehnika tasemes tuntud tähendust ning osutavad *in vitro* rakkude vahendatud reaktsioonile, milles mittespetsiifilised tsütotoksilised rakud, mis ekspresseerivad FcγR-e (näiteks monotsüüdid, näiteks looduslikud tapjarakud (NK-rakud) ja makrofaagid), tunnevad ära märklaudrakul seotud antikeha ja seejärel põhjustavad selle märklaudraku lüüsi. Põhimõtteliselt võib ADCC vahendamiseks
- 15 käivitada mis tahes efektorraku, millel on aktiveeriv FcγR. Primaarsed rakud ADCC vahendamiseks on NK-rakud, mis ekspresseerivad üksnes FcγRIII-d, samas kui monotsüüdid võivad olenevalt nende aktivatsiooni, lokalisatsiooni või diferentseerumise olekust ekspresseerida FcγRI-d, FcγRII-d ja FcγRIII-d. Ülevaadet FcγR ekspressiooni kohta hematopoeetilistel rakkudel vt näiteks publikatsioonist Ravetch *et al.*, 1991, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457–92.
- 20

- [0226] Efektorrakud on leukotsüüdid, mis ekspresseerivad ühte või mitut FcγR-i ja täidavad efektorfunktsioone. Eelistatult ekspresseerivad need rakud vähemalt FcγRIII-d ja täidavad ADCC efektorfunktsiooni. Efektorrakkude hulka, mida võib kasutada
- 25 leiutiskirjelduse kohastes meetodites, kuuluvad mittepiiravalt perifeerse vere mononuklearsed rakud (PBMC), looduslikud tapjarakud (NK-rakud), monotsüüdid ja neutrofiilid; kus eelistatud on PBMC-d ja NK-rakud. Efektorrakke võib isoleerida nende looduslikust allikast, näiteks verest või PBMC-dest vastavalt siin kirjeldatule. Eelistatult on leiutiskirjelduse kohastes ADCC analüüsides kasutatavad efektorrakud perifeerse vere
- 30 mononuklearsed rakud (PBMC), mis on eelistatult puhastatud normaalsest inimverest valdkonna asjatundjale tuntud standardsete meetodite abil, näiteks Ficoll-Paque'i tihedusgradiendi tsentrifuugimist kasutades. Näiteks võib PBMC-sid isoleerimiseks panna täisvere Ficoll-Hypaque seadmele ja tsentrifuugida rakke kiirusel 500g toatemperatuuril

30 minutit. Leukotsüütide kihi võib efektorrakkudena kokku koguda. Teiste efektorrakkude hulka, mida võib kasutada leiutisekohastes ADCC analüüsid, kuuluvad mittepiiravalt monotsüütidest saadud makrofaagid (MDM-id). MDM-id, mida kasutatakse efektorrakkudena leiutiskirjelduse kohastes meetodites, on eelistatult saadud külmutatud lähtelahustena või neid kasutatakse värsketena (näiteks ettevõttelt Advanced Biotechnologies, MD). Enim eelistatud juhtudel kasutatakse leiutiskirjelduse kohastes meetodites efektorrakkudena uhutud inimese monotsüüte. Uhutud inimese monotsüüdid ekspresseerivad aktivatsioonireseptoreid FcγRIIIA ja FcγRIIA ja inhibitsioonireseptorit FcγRIIB. Inimese monotsüüdid on kaubanduslikult kättesaadavad ja neid võib saada külmutatud lähtelahustena, mis sulatatakse põhisöötmes, mis sisaldab 10% inimese AB seerumit, või põhisöötmes, mis sisaldab tsütokiine sisaldavat inimese seerumit. FcγR-ide ekspressiooni tasemeid rakkudes võib vahetult kindlaks määrata, näiteks FACS analüüsi kasutades. Alternatiivselt võib rakkudel lasta ka kultuuris makrofaagideks küpseda. FcγRIIB ekspressiooni taset võib suurendada makrofaagides. Antikehade hulka, mida võib kasutada FcγR-ide ekspressiooni taseme kindlaks määramiseks, kuuluvad mittepiiravalt inimese FcγRIIA vastased antikehad, näiteks IV.3-FITC; FcγRI vastased antikehad, näiteks 32.2 FITC; ja FcγRIIIA vastased antikehad, näiteks 3G8-PE.

[0227] Leiutiskirjelduse kohastes ADCC analüüsid kasutatavate märklaudrakkude hulka kuuluvad mittepiiravalt rinnavähi rakuliinid, näiteks SK-BR-3 ATCC registreerimisnumbriga HTB-30 (vt näiteks Tremp *et al.*, 1976, *Cancer Res.* 33–41); B-lümfotsüüdid; Burkitti lümfoomist saadud rakud, näiteks Raji rakud ATCC registreerimisnumbriga CCL-86 (vt näiteks Epstein *et al.*, 1965, *J. Natl. Cancer Inst.* 34: 231–240), Daudi rakud ATCC registreerimisnumbriga CCL-213 (vt näiteks Klein *et al.*, 1968, *Cancer Res.* 28: 1300–1310); munasarjakartsinoomi rakuliinid, näiteks OVCAR-3 ATCC registreerimisnumbriga HTB-161 (vt näiteks Hamilton, Young *et al.*, 1983), SK-OV-3, PA-1, CAO3, OV-90 ja IGROV-1 (saadaval NCI hoidlast, Benard *et al.*, 1985, *Cancer Research*, 45: 4970–4979). Märklaudrakud peavad olema analüüsitava antikeha antigeeni sidumissaidi poolt ära tuntavad. Leiutiskirjelduse kohastes meetodites kasutamiseks sobival märklaudrakkudel võib olla madal, keskmine või kõrge vähi antigeeni ekspressioonitase. Vähi antigeeni ekspressioonitasemete kindlaks määramiseks võib kasutada valdkonna asjatundjale tuntud tavapäraseid meetodeid, näiteks FACS analüüsi. Näiteks hõlmab leiutiskirjeldus munasarjavähi rakkude, näiteks IGROV-1

kasutamist, kus Her2/neu-d ekspresseeritakse erinevatel tasemetel, või OV-CAR-3 kasutamist (ATCC registreerimisnumber HTB-161; mida iseloomustab Her2/neu madalam ekspressioon kui SK-BR-3 puhul, rinnakartsinoomi rakuliin). Teiste munasarjakartsinoomi rakuliinide hulka, mida võib kasutada märklaudrakkudena

5 leiutiskirjelduse kohastes meetodites, kuuluvad OVCAR-8 (Hamilton *et al.*, 1983, *Cancer Res.* 43: 5379–89); SK-OV-3 (ATCC registreerimisnumber HTB-77); Caov-3 (ATCC registreerimisnumber HTB-75); PA-1 (ATCC registreerimisnumber CRL-1572); OV-90 (ATCC registreerimisnumber CRL-11732); ja OVCAR-4. Teiste rinnavähi rakuliinide hulka, mida võib kasutada leiutiskirjelduse kohastes meetodites, kuuluvad BT-549

10 (ATCC registreerimisnumber HTB-122), MCF7 (ATCC registreerimisnumber HTB-22) ja Hs578T (ATCC registreerimisnumber HTB-126), millest kõik on kättesaadavad NCI hoidlast ja ATCC-st. Teiste rakuliinide hulka, mida võib kasutada leiutiskirjelduse kohastes meetodites, kuuluvad mittepiiravalt CCRF-CEM (leukeemia); HL-60 (TB, leukeemia); MOLT-4 (leukeemia); RPMI-8226 (leukeemia); SR (leukeemia); A549

15 (mitteväikerakuline kopsuvähk); EKVX (mitteväikerakuline kopsuvähk); HOP-62 (mitteväikerakuline kopsuvähk); HOP-92 (mitteväikerakuline kopsuvähk); NC1-H226 (mitteväikerakuline kopsuvähk); NC1-H23 (mitteväikerakuline kopsuvähk); NC1-H322M (mitteväikerakuline kopsuvähk); NC1-H460 (mitteväikerakuline kopsuvähk); NC1-H522 (mitteväikerakuline kopsuvähk); COLO 205 (käärsoolevähk); HCC-2998

20 (käärsoolevähk); HCT-116 (käärsoolevähk); HCT-15 (käärsoolevähk); HT29 (käärsoolevähk); KM12 (käärsoolevähk); SW-620 (käärsoolevähk); SF-268 (kesknärvisüsteemi vähk); SF-295 (kesknärvisüsteemi vähk); SF-539 (kesknärvisüsteemi vähk); SNB-19 (kesknärvisüsteemi vähk); SNB-75 (kesknärvisüsteemi vähk); U251 (kesknärvisüsteemi vähk); LOX 1MV1 (melanoom); MALME-3M (melanoom); M14

25 (melanoom); SK-MEL-2 (melanoom); SK-MEL-28 (melanoom); SK-MEL-5 (melanoom); UACC-257 (melanoom); UACC-62 (melanoom); IGR-OV1 (munasarjavähk); OVCAR-3, 4, 5, 8 (munasarjavähk); SK-OV-3 (munasarjavähk); 786-0 (neeruvähk); A498 (neeruvähk); ACHN (neeruvähk); CAK1-1 (neeruvähk); SN12C (neeruvähk); TK-10 (neeruvähk); UO-31 (neeruvähk); PC-3C (eesnäärmevähk);

30 DU-145 (eesnäärmevähk); NCI/ADR-RES (rinnavähk); MDA-MB-231/ATCC (rinnavähk); MDA-MB-435 (rinnavähk); DMS 114 (väikerakuline kopsuvähk); ja SHP-77 (väikerakuline kopsuvähk); millest kõik on kättesaadavad NCI-st.

[0228] Näitlik analüüsimetod leiutisekohaste antikehade terapeutiliste antikehade ADCC aktiivsusele avaldatava mõju kindlaks määramiseks on ^{51}Cr vabanemise analüüs, mis hõlmab järgnevat: märklaudrakkude määrgistamine $[^{51}\text{Cr}]\text{Na}_2\text{CrO}_4$ -ga (seda rakumembraani läbistavat molekuli kasutatakse laialdaselt määrgistamiseks, kuna see seob tsütoplasma valke ja kuigi see vabaneb rakkudest spontaanselt aeglase kineetikaga, vabaneb see massiliselt pärast märklaudrakkude lüüsi); eelistatult ekspresseerivad märklaudrakud ühte või mitut kasvaja antigeeni, opsoniseerides märklaudrakke ühe või mitme antikehaga, mis seovad immunospetsiifiliselt märklaudrakkude pinnal ekspresseeritud kasvaja antigeene leiutisekohase antikeha, näiteks 8B5.3.4 juuresolekul või puudumisel, radiomäärgistatud märklaudrakkude kombineerimine efektorrakkudega mikrotiiterplaadil märklaudrakkude ja efektorrakkude sobivas suhtes; rakkude segu inkubeerimine eelistatult 16–18 tundi, eelistatult temperatuuril 37 °C; supernatantide kokku kogumine; ja radioaktiivsuse analüüsimine supernatandi proovides. Seejärel saab kindlaks määrata terapeutiliste antikehade tsütotoksilisuse leiutisekohaste antikehade juuresolekul või puudumisel, näiteks alljärgnevat valemit kasutades: Spetsiifilise lüüsi protsent = $(\text{katse lüüs} - \text{antikehast sõltumatu lüüs} / \text{maksimaalne lüüs} - \text{antikehast sõltumatu lüüs}) \times 100\%$. Graafiku genereerimiseks võib varieerida märklauda ja efektorraku suhet või antikeha kontsentratsiooni.

[0229] Leiutisekohaseid antikehi võib iseloomustada antikehast sõltuva rakkude vahendatud tsütotoksilisuse (ADCC) osas vastavalt varem kirjeldatud meetodile, vt näiteks Ding *et al.*, *Immunity*, 1998, 8: 403–411.

[0230] Leiutisekohaseid antikehi võib iseloomustada ka terapeutiliste antikehade ADCC aktiivsuse parandamise funktsiooni osas *in vitro* põhinevas analüüsis ja/või loomudelis.

[0231] Samuti on hõlmatud leiutisekohaste antikehade kasvajaspetsiifilise ADCC parandamise funktsiooni kindlaks määramine, kasutades selleks munasarjavähi mudelit ja/või rinnavähi mudelit.

30

[0232] Eelistatult kasutatakse ADCC analüüside tegemiseks rohkem kui ühte vähi rakuliini, mida iseloomustab vähemalt ühe vähi antigeeni ekspressioon, kus nimetatud vähi antigeeni ekspressioon varieerub kasutatud rakuliinide lõikes. Soovimata siinkohal

5 lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, võimaldab ADCC analüüside läbi viimine rohkem kui ühes rakuliinis, kus vähi antigeeni ekspressioonitase on erinev, määrata kindlaks leiutisekohaste antikehade kasvaja kliirensi rangust. Ühes teostuses kasutatakse ADCC analüüside tegemiseks vähi rakuliine, millel on erinevad vähi antigeeni ekspressiooni tasemed.

[0233] Ühes näitlikus analüüsimetodis võib munasarjakartsinoomi rakuliine OVCAR3 kasutada kasvaja märklauana, mis ekspresseerivad kasvaja antigeene Her2/neu ja TAG-72; inimese monotsüüte, mis ekspresseerivad aktiveerivat Fc γ RIIIA-d ja Fc γ RIIA-d ja 10 inhibeerivat Fc γ RIIB-d võib kasutada efektoritena; ja kasvajaspetsiifilisi hiire antikehi ch4D5 ja chCC49 võib kasutada kasvajaspetsiifiliste antikehadena. OVCAR-3 rakud on kättesaadavad ATCC-st (registreerimisnumber HTB-161). Eelistatult levitatakse OVCAR-3 rakke söötmes, mida on täiendatud 0,01 mg/ml veise insuliiniga. 5×10^6 elujõulist OVCAR-3 rakku võib süstida subkutaanselt (s.c.) vanuse ja kehakaalu poolest 15 kattuvatele atüümilistele karvututele hiirtele Matrigel-iga (Becton Dickinson). Kasvaja hinnangulise kaalu saab arvutada järgmise valemi abil: pikkus – (laius)² / 2; ja eelistatult ei ole see rohkem kui 3 grammi. Ankurdamisest sõltuva kasvaja saab isoleerida 6–8 nädala pärast ning rakkude eraldamiseks võib lisada 1 μ g kollageenaasi (Sigma) kasvaja grammi kohta ja 5 mg/ml RNAasi, lastes need läbi rakukurna ja nailonvõrgu, et isoleerida rakud. 20 Seejärel võib rakud külmutada pikaajaliseks säilitamiseks subkutaanse süstamise jaoks ksenografti mudeli loomiseks.

[0234] Hübridoomid, mis eritavad CC49 ja 4D5 antikehi, on saadaval ATCC registreerimisnumbritega HB-9459 ja CRL-3D463, ning raske ahela ja kerge ahela 25 nukleotiidsed järjestused on avalikus domeenis (Murray *et al.*, 1994 *Cancer* 73 (35): 1057–1066, Yamamoto *et al.*, 1986 *Nature*, 319: 230–234). Eelistatult muudetakse 4D5 ja CC49 antikehad kimäärseteks, kasutades valdkonna asjatundjatele tuntud standardseid meetodeid, nii et inimese Fc järjestus, näiteks inimese IgG1 konstantne piirkond poogitakse hiire antikehade varieeruvale piirkonnale, et pakkuda efektorfunktsiooni. 30 Kimäärsed 4D5 ja CC49 antikehad seonduvad nende varieeruva piirkonna kaudu märklaud-rakuliinidega ja nende Fc piirkonna kaudu Fc γ R-idega, mida ekspresseeritakse inimese efektorrakkudel. CC49 on suunatud TAG-72-le, mis on kõrge molekulmassiga mutsiin, mida ekspresseeritakse kõrgel tasemel paljudel adenokartsinoomi rakkudel ja

munasarjakartsinoomil (Lottich *et al.*, 1985 *Breast Cancer Res. Treat.* 6(1): 49–56; Mansi *et al.*, 1989, *Int. J. Rad. Appl. Instrum B.* 16(2): 127–135; Colcher *et al.*, 1991, *Int. J. Rad. Appl. Instrum B.* 18: 3 95–441). 4D5 antikeha on suunatud inimese epidermaalse kasvufaktori retseptorile 2 (Carter *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285–
5 4289). Seejärel saab leiutisekohaseid antikehi kasutada selleks, et uurida kasvajaspetsiifiliste antikehade ADCC aktiivsuse parandamist inhibeeriva Fc γ RIIB blokeerimise teel. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, parandatakse efektorrakkude aktiveerimisel, mis ekspresseerivad vähemalt ühte aktiveerivat Fc γ R-i, näiteks Fc γ RIIA-d, inhibitsioonireseptori (Fc γ RIIB)
10 ekspressiooni ja see piirab kasvajate kliirensit, kuna Fc γ RIIA ADCC aktiivsus on pärssitud. Kuid leiutisekohased antikehad võivad toimida blokeerimisantikehana, st antikehana, mis ennetab inhibitsioonisignaali aktiveerimist, ning seega hoitakse aktivatsioonisignaali, näiteks ADCC aktiivsust pikema ajavahemiku jooksul ja see võib anda tulemuseks tugeva kasvaja kliirensi.

15

[0235] Eelistatult on leiutisekohased antikehad, mis on mõeldud kasutamiseks ADCC aktiivsuse parandamisel, modifitseeritud, et need sisaldaksid vähemalt ühte aminohappe modifikatsiooni, nii et nende seondumine Fc γ R-iga on vähendatud, enim eelistatult kaotatud. Osadel juhtudel on leiutiskirjelduse kohaseid antikehi modifitseeritud, et need
20 sisaldaksid vähemalt ühte aminohappe modifikatsiooni, mis vähendab konstantse domeeni sidumist aktiveeriva Fc γ R-i, näiteks Fc γ RIIIA või Fc γ RIIA-ga võrreldes leiutiskirjelduse kohase metsiktüüpi antikehaga, säilitades samal ajal maksimaalse Fc γ RIIB-d blokeeriva aktiivsuse. Leiutiskirjelduse kohaseid antikehi võib modifitseerida vastavalt mis tahes valdkonna asjatundjale tuntud või siin avaldatud meetodile. Mis tahes
25 aminohappe modifikatsiooni, mis teadaolevalt häirib efektorfunktsiooni, võib kasutada leiutisekohaste meetodite kohaselt, näiteks neid, mis on avaldatud USA

[0236] patendidokumentides nr US2005/0037000 (sisse antud 9. jaanuaril 2004) ja US2005/0064514 (sisse antud 28. juulil 2004). Osadel juhtudel on leiutiskirjelduse
30 kohaseid antikehi modifitseeritud, nii et positsioon 265 on modifitseeritud, näiteks on positsioon 265 asendatud alaniiniga. Eelistatud juhtudel on leiutiskirjelduse kohase antikeha hiire konstantne piirkond vahetatud vastava inimese konstantse piirkonnaga, mis sisaldab aminohappe asendust positsioonis 265 alaniiniga, nii et efektorfunktsioon on

kaotatud, kuid samal ajal säilib Fc γ RIIB blokeerimisaktiivsus. Ühe aminohappe vahetus IgG1 raske ahela positsioonis 265 on näidanud Fc γ R-ga seondumise märkimisväärset vähendamist vastavalt ELISA analüüsidele, Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.*, 276(9): 6591–6604 ja andnud tulemuseks kasvaja massi vähenemise. Teistel juhtudel on

5 leiutiskirjelduse kohaseid antikehi modifitseeritud, nii et positsioon 297 on modifitseeritud, näiteks positsioon 297 on asendatud glutamiiniga, nii et selle tulemusel kõrvaldatakse N-seotud glükosüülimissait (vt näiteks Jefferies *et al.*, 1995, *Immunol. lett* 44: 111–117; Lund *et al.*, 1996, *J. Immunol.*, 157: 4963–4969; Wright *et al.*, 1994, *J. Exp. Med.* 180: 1087–1096; White *et al.*, 1997; *J. Immunol.* 158: 426–435. Teadaolevalt kaotab

10 modifikatsioon selles saidis kogu interaktsiooni Fc γ R-idega. Eelistatud juhtudel on leiutiskirjelduse kohase antikeha hiire konstantne piirkond vahetatud vastava inimese konstantse piirkonnaga, mis sisaldab aminohappe asendust positsioonis 265 ja/või 297, nii et efektorfunktsioon on kaotatud, kuid samal ajal säilib Fc γ RIIB blokeerimisaktiivsus.

15 **[0237]** Üks näitlik analüüsimeetod kasvajaspetsiifiliste antikehade ADCC aktiivsuse kindlaks määramiseks leiutisekohaste antikehade juuresolekul ja puudumisel on mitteradioaktiivne euroopiumil põhinev fluorestsentsanalüüs (BATDA, Perkin Elmer) ja see võib hõlmata järgnevat: märklaudrakkude märgistamine fluorestsentsi parandava estri akteoksüülmetüülestriga, mis moodustab hüdrofiilse ligandi (TDA) rakkude membraaniga

20 estrite hüdrolüüsi teel; see kompleks ei ole suuteline rakust lahkuma ja seda vabastatakse üksnes rakulüüsi käigus efektorite poolt; märgistatud märklaudade lisamine efektorrakkudele kasvajavastaste antikehade ja leiutisekohase antikeha juuresolekul; märklauda ja efektorrakkude segu inkubeerimine 6 kuni 16 tundi, eelistatult temperatuuril 37 °C. ADCC aktiivsuse ulatuse analüüsimiseks võib mõõta ligandi kogust, mis

25 vabastatakse ja mis avaldab vastastiktoimet euroopiumiga (DELFLIA reaktiiv; PerkinElmer). Ligand ja euroopium moodustavad väga stabiilse ja kõrge fluorestsentsi määraga kelaadi (EuTDA) ning mõõdetud fluorestsents on vahetult proportsionaalne lüüsitud rakkude arvuga. Spetsiifilise lüüsi protsendi arvutamiseks võib kasutada järgmist valemit: (katse lüüs – antikehast sõltumatu lüüs / maksimaalne lüüs – antikehast sõltumatu

30 lüüs \times 100%).

[0238] Osades teostustes, kus fluorestsentsil põhinevate ADCC analüüside tundlikkus on terapeutiliste antikehade ADCC aktiivsuse tuvastamiseks liiga madal, hõlmab leiutis

radioaktiivsusel põhinevaid ADCC analüüse, näiteks ^{51}Cr vabanemise analüüsi. Radioaktiivsusel põhinevaid analüüse võib teha fluorestsentsil põhinevate ADCC analüüsides asemel või nendega kombineeritult.

- 5 **[0239]** Näitlik ^{51}Cr vabanemise analüüs leiutisekohaste antikehade iseloomustamiseks võib hõlmata järgnevat: $1-2 \times 10^6$ märklaudraku, näiteks OVCAR-3 rakkude märgistamine ^{51}Cr -iga; märklaudrakkude opsoniseerimine antikehadega 4D5 ja CC49 leiutisekohaste antikehade juuresolekul ja puudumisel; ja 5×10^3 raku lisamine 96 süvendiga plaadile. Eelistatult on 4D5 ja CC49 kontsentratsioonid vahemikus 1–15 $\mu\text{g/ml}$;
- 10 opsoniseeritud märklaudrakkude lisamine monotsüütidest saadud makrofaagidele (MDM) (efektorrakud); eelistatult suhtes, mis on vahemikus 10 : 1 kuni 100 : 1; rakkude segu inkubeerimine 16–18 tundi temperatuuril 37 °C; supernatantide kokku kogumine; ja radioaktiivsuse analüüsimine supernatandis. Seejärel saab kindlaks määrata 4D5 ja CC49 tsütotoksilisuse leiutisekohase antikeha juuresolekul ja puudumisel, kasutades näiteks
- 15 järgmist valemit: spetsiifilise lüüsi protsent = $(\text{katse lüüs} - \text{antikehast sõltumatu lüüs} / \text{maksimaalne lüüs} - \text{antikehast sõltumatu lüüs}) \times 100\%$.

- [0240]** Fc γ RIIB antikehade *in vivo* aktiivsust saab kindlaks määrata inimese kasvaja ksenograafi mudelites. Kasvajate moodustamiseks võib kasutada mis tahes eespool
- 20 kirjeldatud vähi rakuliine. Osadel juhtudel võib kasvaja olla moodustatud kahe vähi rakuliiniga, kus esimest vähi rakuliini iseloomustab vähi antigeeni madal ekspressioon ja teist rakuliini iseloomustab sama vähi antigeeni kõrge ekspressioon. Seejärel võib kasvaja kliirensi kindlaks määramiseks kasutada valdkonna asjatundjale tuntud meetodeid, kasutades kasvajavastast antikeha, mis seob immunospetsiifiliselt vähi antigeeni esimesel
- 25 ja teisel vähi rakuliinil, ja sobivat hiiremudelit, näiteks Balb/c karvutu hiire mudelit (näiteks Jackson Laboratories, Taconic), kuhu on adoptiivselt üle viidud inimese monotsüüdid ja MDM-id efektorrakudena. Seejärel võib mis tahes eespool kirjeldatud antikehi testida selles loomudelis, et hinnata leiutisekohase Fc γ RIIB vastase antikeha rolli kasvaja kliirensis. Kasutamiseks sobivate hiirte hulka kuuluvad näiteks Fc γ RIII -/-
- 30 (kus Fc γ RIIA on välja lülitatud); Fc γ -/- karvutud (kus Fc γ RI ja Fc γ RIIA on välja lülitatud); või inimese Fc γ RIIB sisselülitatud geeniga hiired või transgeensed sisselülitatud geeniga hiired, kus hiire fcgr2 ja fcgr3 lookused 1. kromosoomil on

inaktiveeritud ja hiired ekspresseerivad inimese FcγRIIA-d, inimese FcγRIIA-d inimese FcγRIIB-d, inimese FcγRIIC-d, inimese FcγRIIIA-d ja inimese FcγRIIIB-d.

[0241] Üks näitlik meetod leiutisekohase antikeha *in vivo* aktiivsuse testimiseks võib
 5 hõlmata järgmist: ksenograafi hiiremudeli moodustamine, kasutades selleks vähi rakuliini, mida iseloomustab vähi antigeeni ekspressioon, ning leiutisekohase antikeha mõju kindlaks määramine antikehal, mis on spetsiifiline vähi antigeeni suhtes, mida ekspresseeritakse vähi rakuliinis kasvaja kliirensi vahendamisel. Eelistatult kasutatakse *in vivo* aktiivsuse testimiseks paralleelselt kahte vähi rakuliini, kus esimest vähi rakuliini
 10 iseloomustab esimene vähi antigeen, mida ekspresseeritakse madalatel tasemetel, ja teist vähi rakuliini iseloomustab sama vähi antigeen, mida ekspresseeritakse esimese vähi rakuliiniga võrreldes kõrgemal tasemel. Sellest tulenevad suurendavad need katsed leiutisekohase antikeha kasvaja kliirensis esineva rolli hindamise rangust. Näiteks võivad kasvajakasvajad olla moodustatud IGROV-1 rakuliiniga ning võib hinnata leiutisekohase
 15 FcγRIIB vastase antikeha mõju Her2/neu spetsiifilise antikeha kasvaja kliirensis. Ksenograafi kasvajamudelite moodustamiseks võib 5×10^6 elujõulist rakku, näiteks IGROV-1, SKBR3 rakku süstida, näiteks süstida subkutaanselt hiirtele, näiteks kaheksale vanuse ja kehakaalu poolest kattuvale emasele atüümilisele karvutule hiirele, kasutades selleks näiteks Matrigel-i (Becton Dickinson). Kasvaja hinnangulise kaalu saab kindlaks
 20 määrata järgmise valemi abil: pikkus \times (laius)² / 2; ja eelistatult ei ole see rohkem kui 3 grammi. IGROV-1 rakkude subkutaanne süstimine põhjustab kiiresti kasvavaid kasvajakasvajaid, samas kui intraperitoneaalne viis kutsub esile peritoneaalset kartsinomatoosi, mis tapab hiired kahe kuuga (Benard *et al.*, 1985, *Cancer Res.* 45: 4970–4979). Kuna IGROV-1 rakud moodustavad kasvajakasvajaid 5 nädala jooksul, siis esimesel päeval pärast kasvajakasvajate
 25 süstimist süstitakse monotsüüdid kui efektorid intraperitoneaalselt koos Her2/neu suhtes spetsiifilise terapeutilise antikeha, näiteks Ch4D5, ja leiutisekohase antikeha; näiteks kimäärse 8B5.3.4 antikehaga („ch8B5.3.4”) vastavalt eespool kirjeldatule. Eelistatult süstitakse antikehasid kontsentratsioonis 4 µg hiire kehakaalu (mbw) iga grammi kohta. Esimesele süstile järgnevad antikehad kord nädalas tehtavad süstid 4–6 nädala jooksul
 30 kontsentratsioonis 2 µg/nädal. Inimese efektorrakke täiendatakse kord kahe nädala jooksul. Üks hiirte rühm ei saa terapeutilist antikeha, kuid neile süstitakse kimäärset 4D5, mis sisaldab N297A mutatsiooni, ja inimese IgG1 vastavalt kasvajakasvajate ja FcγRIIB

vastaste antikehade isotüübi kontrollantikehadena. Hiired võib paigutada neljast hiirest koosnevatesse rühmadesse ja neid jälgitakse kolm korda nädalas.

[0242] Alljärgnevas tabelis 5 on välja toodud kasvaja kliirensi uuringute näitlik ülesehitus vastavalt käesolevale leiutisele. Tabelis 5 näidatu kohaselt on selleks, et testida leiutisekohase antikeha rolli kasvaja kliirensis, vaja kuut kaheksast hiirest koosnevat rühma, kus kasutatakse ühe märklaud- ja efektorraku kombinatsiooni ja kus kasutatakse antikeha kontsentratsiooni kahte erinevat kombinatsiooni. Rühmas A süstitakse üksnes kasvajakke; rühmas B süstitakse kasvajakke ja monotsüüte; rühmas C süstitakse kasvajakke, monotsüüte ja kasvajakkest antikeha (ch4D5); rühmas D süstitakse kasvajakke, monotsüüte, kasvajakkest antikeha ja FcγRII vastast antikeha; rühmas E süstitakse kasvajakke, monotsüüte ja FcγRIIB vastast antikeha; rühmas F süstitakse kasvajakke, monotsüüte, Ch4D5 (N297Q) ja inimese IgG1. Valdkonna asjatundja saab aru, et kirjeldatud kasvajamudelites võib testida erinevate antikeha kombinatsioonide erinevaid antikeha kontsentratsioone. Eelistatult viiakse eespool kirjeldatud katsega paralleelselt läbi uuringud, milles kasutatakse rinnavähi rakuliini, näiteks SKBR3.

TABEL 5. NÄITLIK KATSE ÜLESEHITUS HIIRTE PUHUL

8 hiirt/ rühm	Kasvaja- rakud, subku- taanselt 0. päeval	Mono- tsüü- did, intra- perito- neaal- selt 1. päeval	ch4D5 kont- sentratsioo- nis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta, 1. päe- val intrape- ritoneaalselt	ch4D5 N297Q kontsentratsi- oonis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta 1. päeval intra- peritoneaalselt	ch8B5.3.4 N297Q kont- sentratsioonis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta, 1. päeval intra- peritoneaalselt	Inimese IgG1 kontsentratsio onis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta, 1. päeval intra- peritoneaalselt
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	-	-	-
D	+	+	+	-	+	-

8	Kasvaja- hiirt/ rühm	Kasvaja- rakud, subku- taanselt 0. päeval	Mono- tsüü- did, intra- perito- neaal- selt 1. päeval	ch4D5 kont- sentratsioo- nis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta, 1. päe- val intrape- ritoneaalselt	ch4D5 N297Q kontsentratsi- oonis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta 1. päeval intra- peritoneaalselt	ch8B5.3.4 N297Q kont- sentratsioon 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta, 1. päeval intra- peritoneaalselt	Inimese IgG1 kontsentratsio- onis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta, 1. päeval intra- peritoneaalselt
E	+	+	-	-	+	-	
F	+	+	-	+	-	+	

[0243] Ksenografi kasvjamudelite lõpp-punkt määratakse kindlaks kasvajate suuruse, hiirte kehakaalu, ellujäämise aja ning vähi histokeemilise ja histopatoloogilise uurimise alusel, kasutades selleks valdkonna asjatundjale tuntud meetodeid. Igat tabelis 5 välja toodud hiirte rühma hinnatakse. Eelistatult jälgitakse hiiri kolm korda nädalas. Kasvaja kasvu kriteeriumid võivad olla kõhupuhitus, tuntava massi olemasolu kõhuõõnes. Eelistatult arvutatakse kasvaja massi prognoosid inokulatsioonist möödunud päevade arvu suhtes. Rühma D hiirte eespool nimetatud kriteeriumite võrdlus võrreldes nimetatud kriteeriumitega teistes rühmades määratleb leiutisekohase antikeha rolli kasvaja kliirensi parandamisel. Eelistatult on antikehaga ravitud loomad jälgimise all veel kaks kuud pärast kontrollrühma.

[0244] Alternatiivsetes näidetes võib leiutisekohaste antikehade *in vivo* aktiivsuse kindlaks tegemisel kasutada pigem inimese FcβRIIB sisselülitatud geeniga hiiri, mis ekspresseerivad inimese FcβRIIB-d hiire efektorakkudel, kui efektorakkude adoptiivset üle viimist. Asutavaid hiiri, mis ekspresseerivad inimese FcγRIIB-d, saab genereerida inimese FcγRIIB hiire FcγRIIB lookusele „sisselülitamise” teel. Asutajad saab seejärel tagasi ristata karvutule taustale ja need ekspresseerivad inimese FcγRIIB retseptorit. Saadud hiire efektorrakud ekspresseerivad endogeenseid aktiveerivaid FcγRI ja FcγRIIA ja inhibeerivad inimese FcγRIIB retseptoreid.

[0245] Leiutisekohaste antikehade *in vivo* aktiivsust võib lisaks testida ksenograafi hiiremudelil, millel on inimese primaarsest kasvajast saadud rakud, näiteks inimese primaarsest munasarja- ja rinnakartsinoomist saadud rakud. Vähipatsientidelt võetud astsiitide ja rinnakelme efusiooni proove võib testida Her2/neu ekspressiooni osas, kasutades selleks valdkonna asjatundjale tuntud meetodeid. Munasarjakartsinoomi all kannatavatelt patsientidelt võetud proovide töötlemiseks võib astsiite tsentrifuugida kiirusel 6370 g 20 minutit temperatuuril 4 °C, lüüsida punaseid vererakke ja pesta rakke PBS-iga. Kui Her2/neu ekspressioon kasvajarakkudes on kindlaks määratud, siis võib subkutaanse inokulatsiooni jaoks välja valida kaks proovi, keskmise ja kõrge ekspresseerija, et luua ksenograafi kasvajamudel. Seejärel võib isoleeritud kasvjarakud süstida intraperitoneaalselt hiirtele, et laiendada rakke. Ligikaudu 10 hiirt võib süstida intraperitoneaalselt ja iga hiire astsiidid võib lisaks kanda edasi kahele hiirele, et saada kokku 20 hiire astsiidid, mida saab kasutada 80 hiirest koosneva rühma süstimiseks. Rinnakelme efusiooni proovide töötlemiseks võib kasutada sarnast meetodit nagu astsiitide puhul. Rinnakelme efusiooni proovidest saadud Her2/neu+ kasvjarakud võib süstida hiirte ülemisse paremasse ja vasakusse udaranäärmesse.

[0246] Osades näidetes, kui neoplastiliste rakkude protsent astsiitide või rinnakelme efusiooni proovides on võrreldes teiste rakuliste alamkogumitega madal, siis võib neoplastilisi rakke laiendada *in vitro*. Teistes näidetes võib kasvjarakkude puhastamiseks kasutada CC49 antikehaga (anti-TAG-72)-kaetud magnethelmeid vastavalt varem kirjeldatule, vt näiteks Barker *et al.*, 2001, *Gynecol. Oncol.* 82: 57, 63. Lühidalt öeldes võib CC49 antikehaga kaetud magnethelmeid kasutada munasarja kasvjarakkude eraldamiseks, mis eemalduvad helmestest üle öö temperatuuril 37 °C inkubeerimise teel. Osades teostustes, kui kasvjarakkudel puudub TAG-72 antigeen, kasutada kasvjarakkude rikastamiseks negatiivset ammendamist, kasutades selleks antikehade kokteili, mida pakub näiteks ettevõtte Stem Cell Technologies, Inc., Kanada.

[0247] Astsiitide ja rinnakelme efusiooni proovidest saadud kasvjarakkude mittekasvaja rakkudest eraldamiseks võib lisaks Her2/neu-le kasutada ka teisi kasvajamarkereid. Rinnakelme efusiooni või rinnakoe puhul on hiljaaegu teatatud, et markeritena võib kasutada CD44 (adhesioonimolekul), B38.1 (rinna- / munasarjavähi spetsiifiline marker), CD24 (adhesioonimolekul), vt näiteks Al Hajj, *et al.*, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

100: 3983, 8. Kui kasvajarakud on puhastatud, siis võib need nende laiendamiseks süstida subkutaanselt hiirtele.

5 [0248] Eelistatult viiakse patsientide astsiitidel ja rinnakelme efusioonil läbi immunohistokeemilised ja histokeemilised analüüsid, et analüüsida kasvaja struktuurilisi omadusi. Sellised meetodid on valdkonna asjatundjale tuntud ja leiutisega hõlmatud. Markerite hulka, mida võib jälgida, kuuluvad näiteks tsütokeratiin (et tuvastada munasarjakasvaja ja mesotelioomi rakud põletikulistest ja mesenhümaalsetest rakkudest); kalretiniin (et eristada mesotelioomi rakke Her2neu-positiivsetest kasvajarakkudest); ja 10 CD45 (et eristada põletikulisi rakke ülejäänud proovides sisalduvast rakupopulatsioonist). Täiendavate markerite hulka, mida võib jälgida, kuuluvad CD3 (T-rakud), CD20 (B-rakud), CD56 (NK-rakud) ja CD 14 (monotsüüdid). Valdkonna asjatundja saab aru, et eespool kirjeldatud immunohistokeemilisi ja histokeemilisi meetodeid rakendatakse analoogselt mis tahes leiutisekohastes meetodites kasutamiseks sobivate kasvajarakkude 15 puhul. Pärast kasvajarakkude subkutaanset inokulatsiooni jälgitakse hiiri kliiniliste ja anatoomiliste muutuste osas. Vajaduse korral võib hiired lahata, et korreleerida kogu kasvaja koorem spetsiifilise elundi lokaliseerimisega.

20 [0249] Ühes spetsiifilises näites kasutatakse kasvajate moodustamiseks kartsinoomi rakuliine, näiteks IGROV-1, OVCAR-8, SK-B ja OVCAR-3 rakke ning inimese munasarjakartsinoomi astsiite ja rinnavähi all kannatavatelt patsientidelt saadud rinnakelme efusiooni. Eelistatult sisaldavad astsiidid nii testitavate antikehade efektoreid kui ka kasvaja märklaudu. Inimese monotsüüdid viiakse üle efektoritena.

25 [0250] Leiutisekohaste antikehade *in vivo* aktiivsust võib testida ka loomudelil, näiteks Balb/c karvututel hiirtel, kellele on süstitud FcγRIIB-d ekspresseerivaid rakke, sealhulgas mittepiiravalt SK-BR-3 ATCC registreerimisnumbriga HTB-30 (vt näiteks Tremp *et al.*, 1976, *Cancer Res.* 33–41); B-lümfotsüüte; Burkitti lümfoomist saadud rakke, näiteks Raji rakke ATCC registreerimisnumbriga CCL-86 (vt näiteks Epstein *et al.*, 1965, *J. Natl. 30 Cancer Inst.* 34: 231–240), Daudi rakke ATCC registreerimisnumbriga CCL-213 (vt näiteks Klein *et al.*, 1968, *Cancer Res.* 28: 1300–1310); munasarjakartsinoomi rakuliine, näiteks OVCAR-3 ATCC registreerimisnumbriga HTB-161 (vt näiteks Hamilton, Young

et al., 1983), SK-OV-3, PA-1, CAOv3, OV-90 ja IGROV-1 (saadaval NCI hoidlast, Benard *et al.*, 1985, *Cancer Research*, 45: 4970–9).

[0251] Näitlik analüüsimeetod leiutisekohaste antikehade *in vivo* aktiivsuse mõõtmiseks võib hõlmata järgnevat: Balb/c emastele karvututele hiirtele (Taconic, MD) süstitakse 0. päeval rakke, mis ekspresseerivad FcγRIIB-d, näiteks 5×10^6 Daudi rakku, näiteks subkutaanselt. Hiirtele (näiteks viis hiirt rühma kohta) süstitakse intraperitoneaalselt ka PBS-i (negatiivne kontroll), ch 4.4.20 (FITC vastane antikeha) negatiivse kontrollina ning positiivse kontrollina mõnda muud terapeutilist vähivastast antikeha, näiteks siin avaldatud antikehi, näiteks rituksaani (näiteks kontsentratsioonis 10 µg/g) või 10 µg/g ch8B5.3.4 kord nädalas alates katse algusest (päevast 0). Hiiri jälgitakse pärast süstimist näiteks kaks korda nädalas ning kasvaja suuruse (pikkus ja laius) kindlaks määramiseks kasutatakse näiteks nihikut. Kasvaja massi prognoosimiseks kasutatakse valemit: $(\text{pikkus} \times \text{laius}^2) / 2$.

15

[0252] Eelistatult on leiutisekohastel antikehadel kasvaja vähendamisel parem tõhusus kui vähivastasel terapeutilisel antikehal, kui neid manustatakse samas annuses, näiteks 10 µg/g vähemalt 14 päeva, vähemalt 21 päeva, vähemalt 28 päeva või vähemalt 35 päeva jooksul. Enim eelistatud juhtudel vähendavad leiutisekohased antikehad kasvaja suurust vähemalt 10 korda, vähemalt 100 korda, vähemalt 1000 korda võrreldes samas annuses vähivastase terapeutilise antikeha manustamisega. Veel ühes teisel eelistatud juhul kaotavad leiutisekohased antikehad kasvaja täielikult.

20

5.3.1. ANTIKEHA KODEERIVAD POLÜNUKLEOTIIDID

[0253] Leiutiskirjeldus hõlmab ka polünukleotiide, mis kodeerivad leiutisekohaseid antikehi (näiteks hiire monoklonaalne antikeha, mis on valmistatud hübriidoomi kloonist 8B5.3.4, 2B6, 3H7, 1D5, 2E1, 2H9, 2D11 või 1F2, millel on vastavad ATCC registreerimisnumbrid PTA-7610, PTA-4591, PTA-4592, PTA-5958, PTA-5961, PTA-5962, PTA-5960 ja PTA-5959) või teisi monoklonaalseid antikehi, mida valmistatakse leiutiskirjelduse kohaste meetodite abil, ja nende humaniseeritud versioone, ning nende valmistamise meetodeid.

30

[0254] Leiutiskirjeldus hõlmab polünukleotiidi, mis kodeerib 8B5.3.4 antikeha ATCC registreerimisnumbriga PTA-7610 varieeruvat rasket ahelat, mis on avaldatud järjestuses SEQ ID NO: 2. Leiutiskirjeldus hõlmab ka polünukleotiidi, mis kodeerib 8B5.3.4 antikeha ATCC registreerimisnumbriga PTA-7610 varieeruvat kerget ahelat, mis on avaldatud

5 järjestuses SEQ ID NO: 1.

[0255] Leiutiskirjelduse kohased meetodid hõlmavad ka polünukleotiide, mis hübridiseeruvad erineva rangusega tingimustes, näiteks kõrge ranguse, vahepealse või madala rangusega tingimustes polünukleotiidideks, mis kodeerivad leiutisekohast

10 antikeha. Hübridisatsiooni võib läbi viia erineva rangusega tingimustes. Näiteks ja mittepiiravalt on protseduurid, milles kasutatakse madala rangusega tingimusi, alljärgnevad (vt ka Shilo ja Weinberg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 6789–6792). DNA-d sisaldavaid filtreid eeltöödeldakse 6 tundi temperatuuril 40 °C lahuses, mis sisaldab 35% formamiidi, 5 × SSC-d, 50 mM Tris-HCl-i (pH 7,5), 5 mM EDTA-t, 0,1%

15 PVP-d, 0,1% Ficolli, 1% BSA-d ja 500 µg/ml denatureeritud lõhe sperma DNA-d. Hübridisatsioonid viiakse läbi samas lahuses, tehes järgmised muudatused: kasutatakse 0,02% PVP-d, 0,02% Ficolli, 0,2% BSA-d, 100 µg/ml lõhe sperma DNA-d, 10% (mass-mahu järgi) dekstraansulfaati ja 5–20 × 10⁶ cpm ³²P-märgistatud indikaatorit. Filtreid inkubeeritakse hübridisatsioonisegus 18–20 tundi temperatuuril 40 °C ja seejärel pestakse

20 1,5 tundi temperatuuril 55 °C lahuses, mis sisaldab 2 × SSC-d, 25 mM Tris-HCl-i (pH 7,4), 5 mM EDTA-t ja 0,1% SDS-i. Pesulahus asendatakse värske lahusega ja inkubeeritakse veel 1,5 tundi temperatuuril 60 °C. Filtrid tehakse kuivatuspaberiga kuivaks ja paljastatakse autoradiograafia jaoks. Vajaduse korral pestakse filtreid kolmandat korda temperatuuril 65–68 °C ja viiakse uuesti kilega kokku. Teised madala

25 rangusega tingimused, mida võib kasutada, on tehnika tasemes hästi tuntud (näiteks liigiüleste hübridisatsioonide jaoks kasutamise korral). Näiteks ja mittepiiravalt on protseduurid, milles kasutatakse kõrge rangusega tingimusi, alljärgnevad. DNA-d sisaldavate filtrite eelhübridisatsioon viiakse läbi 8 tundi kuni üle öö temperatuuril 65 °C puhvril, mis koosneb 6 × SSC-st, 50 mM Tris-HCl-ist (pH 7,5), 1 mM EDTA-st, 0,02%

30 PVP-st, 0,02% Ficollist, 0,02% BSA-st ja 500 µg/ml denatureeritud lõhe sperma DNA-st. Filtreid hübridiseeritakse 48 tundi temperatuuril 65 °C eelhübridisatsiooni segus, mis sisaldab 100 µg/ml denatureeritud lõhe sperma DNA-d ja 5–20 × 10⁶ cpm ³²P-märgistatud indikaatorit. Filtreid pestakse 1 tund temperatuuril 37 °C lahuses, mis sisaldab 2 × SSC-

d, 0,01% PVP-d, 0,01% Ficoll ja 0,01% BSA-d. Sellele järgneb pesemine $0,1 \times \text{SSC}$ -s temperatuuril $50\text{ }^\circ\text{C}$ 45 minutit enne autoradiograafiat. Teised kõrge rangusega tingimused, mida võib kasutada, on tehnika tasemes hästi tuntud. Sobivate tingimuste selekteerimine, näiteks ranguse osas, on tehnika tasemes hästi tuntud (vt näiteks Sambrook *et al.*, 1989, „Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2. väljaanne, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; vt ka Ausubel *et al.* (toim.) publikatsioonis „Current Protocols in Molecular Biology; series of laboratory technique manual”, © 1987–1997, Current Protocols, © 1994–1997; John Wiley and Sons, Inc.; vt eelkõige Dyson, 1991, „Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis” publikatsioonis „Essential Molecular Biology: A Practical Approach”, vol. 2, T.A. Brown (toim.), lk 111–156, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK).

[0256] Polünukleotiide võib saada ja polünukleotiidide nukleotiidjärjestusi võib kindlaks määrata mis tahes tehnika tasemes tuntud meetodi abil.

15

[0257] Antikeha kodeeriva polünukleotiidi võib genereerida mis tahes sobivast allikast pärit nukleiinhappest (näiteks cDNA teek, mis on genereeritud, või nukleiinhape, eelistatult polü-A+ RNA, mis on isoleeritud mis tahes antikeha ekspresseerivast koest või rakkudest, näiteks hübridoomi rakkudest, mis on selekteeritud seoses leiutisekohase antikeha, näiteks m8B5.3.4 ekspressiooniga) Ig-spetsiifiliste indikaatoritega hübridiseerimise ja/või PCR-i võimendamise teel, kasutades sünteetilisi primereid, mida saab hübridiseerida järjestuse 3' ja 5' otsteks, või kloonimise teel, kasutades oligonukleotiidi indikaatorit, mis on spetsiifiline konkreetse geenijärjestuse suhtes, et tuvastada näiteks cDNA kloon cDNA teegist, mis kodeerib antikeha. PCR-i abil saadud võimendatud nukleiinhapped võib seejärel kloonida replitseeritavatesse kloonimisvektoritesse, kasutades selleks mis tahes tehnika tasemes hästi tuntud meetodit.

25

[0258] Kui antikeha nukleotiidne järjestus on kindlaks määratud, võib antikeha nukleotiidse järjestuse manipuleerimiseks kasutada mis tahes nukleotiidse järjestuste manipuleerimise valdkonnas hästi tuntud meetodeid, näiteks rekombinantse DNA tehnikaid, saitsuunatud mutageneesi, PCR-i jne (vt näiteks tehnikaid, mida on kirjeldatud publikatsioonides Sambrook *et al.*, 1990, „Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2. väljaanne, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY ja Ausubel *et al.*

30

(toim.), 1998, „Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons, NY), et genereerida antikehi, millel on teistsugune aminohappejärjestus, et näiteks luua aminohappe asendusi, deletsioone ja/või insertioone.

5 [0259] Ühel spetsiifilisel juhul sisestatakse üks või mitu CDR-i raampiirkonnadesse, kasutades selleks rutiinseid rekombinantse DNA tehnikaid. Nimetatud raampiirkonnad võivad olla looduslikult esinevad või konsensus-raampiirkonnad ja eelistatult inimese raampiirkonnad (vt näiteks Chothia *et al.*, 1998, *J. Mol. Biol.* 278: 457–479 inimese raampiirkondade loeteluga tutvumiseks). Eelistatult kodeerib raampiirkondade ja CDR-
10 ide kombinatsiooniga genereeritud polünukleotiid antikeha, mis seondub spetsiifiliselt Fc γ RIIB-ga suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha seondub Fc γ RIIA-ga. Eelistatult võib eespool kirjeldatu kohaselt olla raampiirkonnades asendatud üks või mitu aminohapet ja eelistatult parandavad need aminohappeasendused leiutisekohaste antikehade seondumist Fc γ RIIB-ga.

15

[0260] Ühel teisel juhul võib inimese kogusid või mis tahes muid tehnika tasemes kättesaadavaid kogusid sõeluda tehnika tasemes tuntud standardsete tehnikate abil, et kloonida leiutisekohaseid antikehi kodeerivaid nukleiinhappeid.

20 5.3.2. ANTIKEHADE REKOMBINANTNE EKSPRESSIOON

[0261] Kui leiutisekohast antikeha kodeeriv nukleiinhappejärjestus on saadud, siis võib antikeha tootmiseks kasutatava vektori valmistada rekombinantse DNA tehnoloogia abil, kasutades selleks tehnika tasemes hästi tuntud tehnikaid. Valdkonna asjatundjale tuntud meetodid võimaldavad konstrueerida ekspressioonivektoreid, mis sisaldavad antikeha
25 kodeerivaid järjestusi ning vajalikke transkriptsiooni ja translatsiooni juhtsignaale. Nende meetodite hulka kuuluvad näiteks *in vitro* rekombinantse DNA tehnikad, sünteesitehnikad ja *in vivo* geneetilise rekombineerimise tehnikad. (Vt näiteks tehnikaid, mida on kirjeldatud publikatsioonides Sambrook *et al.*, 1990, „Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 2. väljaanne, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY ja
30 Ausubel *et al.* (toim.), 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY).

[0262] Antikeha nukleotiidset järjestust sisaldava ekspressioonivektori võib viia peremeesrakku tavapäraste tehnikate abil (näiteks elektroporatsioon, liposomaalne transfektsioon ja kaltsiumfosfaadiga sadestamine) ning seejärel kasvatatakse transfekteeritud rakke tavapäraste tehnikate abil, et toota leiutisekohast antikeha.

5 Spetsiifilistel juhtudel reguleeritakse antikeha ekspressiooni konstitutiivse, indutseeritava või koespetsiifilise promotori abil.

[0263] Peremeesrakud, mida kasutatakse leiutisekohaste rekombinantsete antikehade ekspresseerimiseks, võivad olla bakterirakud, näiteks *Escherichia coli*, või eelistatult

10 eukarüootsed rakud, eelkõige terve rekombinantse immunoglobuliini molekuli ekspressiooni jaoks. Eelkõige on imetajarakud, näiteks hiina hamstri munasarja rakud (CHO) koos vektoriga, näiteks inimese tsütomegaloviirusest saadud peamise vahepealse varajase geeni promotori elemendiga, tõhus ekspressioonisüsteem antikehade jaoks (Foecking *et al.*, 1998, *Gene* 45: 101; Cockett *et al.*, 1990, *Bio/Technology* 8: 2).

15

[0264] Leiutisekohaste antikehade ekspresseerimiseks võib kasutada mitmeid peremehe-ekspressioonivektori süsteeme. Selliste peremeesraku ja ekspressioonivektori süsteemide hulka kuuluvad vehiikulid, mille abil saab antikehi kodeerivaid järjestusi toota ja seejärel puhastada, kuid nende hulka kuuluvad ka rakud, mis võivad sobivat nukleotiidi

20 kodeerivate järjestustega muundamise või transfekteerimise korral ekspresseerida leiutisekohaseid antikehi *in situ*. Nende hulka kuuluvad mittepiiravalt mikroorganismid, näiteks bakterid (näiteks *E. coli* ja *B. subtilis*), mis on muundatud rekombinantse bakteriofaagi DNA, plasmidi DNA või kosmiidi DNA ekspressioonivektoritega, mis sisaldavad immunoglobuliini kodeerivaid järjestusi; pärmseened (näiteks *Saccharomyces*,

25 *Pichia*), mis on muundatud rekombinantsete pärmseene ekspressioonivektoritega, mis sisaldavad immunoglobuliini kodeerivaid järjestusi; putuka rakusüsteemid, mis on nakatatud rekombinantsete viiruse ekspressioonivektoritega (näiteks bakuloviirus), mis sisaldavad immunoglobuliini kodeerivaid järjestusi; taime rakusüsteemid, mis on nakatatud rekombinantsete viiruse ekspressioonivektoritega (näiteks lillkapsa

30 mosaiikviirus (CaMV) ja tubaka mosaiikviirus (TMV)), või mis on muundatud rekombinantsete plasmidi ekspressioonivektoritega (näiteks Ti plasmid), mis sisaldavad immunoglobuliini kodeerivaid järjestusi; või imetaja rakusüsteemid (näiteks COS, CHO, BHK, 293, 293T, 3T3 rakud, lümfirakud (vt US 5 807 715), Per C.6 rakud (roti võrkkesta

rakud, välja töötanud Crucell)), mis sisaldavad rekombinantseid ekspresioonikonstrukte, mis sisaldavad imetaja rakkude genoomist (näiteks metallotioneiini promootor) või imetaja viirustest saadud promootoreid (näiteks adenoviiruse hiline promootor; vaktsiiniaviiruse 7,5K promootor).

5

[0265] Bakteriaalsetes süsteemides võib ekspresseeritava antikeha kavandatud kasutusviisist sõltuvalt kasulikult selekteerida mitmeid ekspresioonivektoreid. Näiteks kui antikeha farmatseutiliste kompositsioonide genereerimiseks on vaja toota sellist valku suures koguses, siis võivad olla soovitatavad vektorid, mis suunavad liitvalgu produktide kõrgete tasemete ekspressiooni, mis on hõlpsasti puhastatavad. Selliste vektorite hulka kuuluvad mittepiiravalt *E. coli* ekspresioonivektor pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, *EMBO J.* 2: 1791), milles antikeha kodeeriv järjestus on vektorisse individuaalselt ligeeritav ühes raamis lac Z-d kodeeriva piirkonnaga, nii et selle tulemusel saadakse liitvalk; pIN vektorid (Inouye ja Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101–3109; Van Heeke ja Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24: 5503–5509). Võõrpäritolu polüpeptiidide ekspresseerimiseks glutadiion-S-transferaasiga (GST) seotud liitvalkudena võib kasutada ka pGEX vektoreid. Sellised liitvalgud on üldiselt lahustuvad ning on lüüsitud rakkudest kergesti puhastatavad absorbeerimise ja sidumise teel maatriksi glutatiooni-agarooši helmestele, millele järgneb elueerimine vaba glutatiooni juuresolekul. pGEX vektorid on välja töötatud sisaldama trombiini või Xa faktori proteaasi lõikamissaite, mis võimaldavad kloonitud geeniproducti vabastamist GST fragmendi küljest.

[0266] Putuka rakkudel põhinevas süsteemis kasutatakse võõrpäritolu geenide ekspresiooniks vektorina *Autographa californica* nukleaarse polühedroosi viirust (AcNPV). Viirus kasvab *Spodoptera frugiperda* rakkudes. Antikeha kodeeriva järjestuse võib kloonida individuaalselt viiruse asendatavatesse piirkondadesse (näiteks polühedriini geeni) ja paigutada AcNPV promootori (näiteks polühedriini promootori) kontrolli alla.

[0267] Imetajalt pärinevates peremeesrakkudes võib kasutada mitmeid viirusel põhinevaid ekspresioonisüsteeme. Adenoviiruse kasutamisel ekspresioonivektorina võib huvipakkuva antikeha kodeeriva järjestuse ligeerida adenoviiruse transkriptsiooni/translatsiooni kontrollkompleksi, näiteks hilise promootori ja kolmeosalise liiderjärjestusega. Saadud kimäärse geeni võib seejärel sisestada

adenoviiruse genoomi *in vitro* või *in vivo* rekombinatsiooni teel. Viiruse genoomi vähem olulisse piirkonda (näiteks E1 või E3 regiooni) sisestamine annab tulemuseks rekombinantse viiruse, mis on elujõuline ning võimeline immunoglobuliini molekuli ekspressiooniks infekteeritud peremeesorganismides. (Vt näiteks Logan ja Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 355–359). Sisestatud antikeha kodeerivate järjestuste efektiivse translatsiooni jaoks võib vaja minna spetsiifilisi initsiatsioonisignaale. Nende hulka kuuluvad ATG initsiatsioonikoodon ja selle naaberjärjestused. Ühtlasi peab initsiatsioonikoodon terve inserdi translatsiooni tagamiseks olema samas faasis nõutava kodeeriva järjestuse lugemisraamiga. Nimetatud eksogeensed translatsiooni juhtsignaalid ja initsiatsioonikoodonid võivad olla erinevat päritolu, sealhulgas nii looduslikud kui ka sünteetilised. Ekspressiooni efektiivsust on võimalik suurendada sobivate transkriptsiooni enhanserelementide, transkriptsiooni terminaatorite jne lisamise teel (vt Bittner *et al.*, 1987, *Methods in Enzymol.* 153: 51–544).

15 **[0268]** Lisaks on võimalik valida peremeesraku tüve, mis moduleerib sisestatud järjestuste ekspressiooni või modifitseerib ja töötleb konkreetsel soovitud moel geeniproducti. Valguproduktide sellised modifikatsioonid (näiteks glükosüülimine) ja töötlus (näiteks lõikamine) võib omada tähtsust valgu funktsioneerimise seisukohast. Erinevatel peremeesrakkudel on valkude ja geeniproductide translatsioonijärgseks töötlemiseks ja modifitseerimiseks iseloomulikud ja spetsiifilised mehhanismid. Ekspresseeritava võõrpäritolu valgu õige modifitseerimise ja töötlemise tagamiseks on võimalik valida sobivad rakuliinid või peremeesrakkude süsteemid. Selleks võib kasutada eukarüootseid peremeesrakke, mis sisaldavad rakumehhanisme primaarse transkripti õigeks töötlemiseks ning glükosüülimiseks ja geeniproducti fosforüülimiseks. Selliste imetaja 25 peremeesrakkude hulka kuuluvad mittepäiravalt CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 ja T47D, CRL7030 ja Hs578Bst.

[0269] Rekombinantsete valkude pikaajaliseks kõrge saagisega tootmise puhul eelistatakse stabiilset ekspressiooni. Näiteks on võimalik konstrueerida rakuliine, mis ekspresseerivad stabiilselt leiutisekohast antikeha. Selle asemel, et kasutada ekspressioonivektoreid, mis sisaldavad viiruse replikatsiooni alguskohti, võib peremeesrakke muundada DNA-ga, mida kontrollivad sobivad ekspressiooni kontrollielemendid (näiteks promootor, enhanser, järjestused, transkriptsiooni

terminaatorid, poliadenülatsioonikohad jne), ja selekteeritav marker. Pärast võõra DNA sisestamist võib konstrueeritud rakkudel lasta kasvada 1–2 päeva rikastatud söötmes ja seejärel viia need üle selektiivsesse söötmesse. Rekombinantse plasmidi selekteeritav marker annab sellele seleksioonile resistentsuse ning võimaldab rakkudel plasmidi stabiilselt oma kromosoomidesse integreerida ja kasvada kolleteks, mida on omakorda võimalik kloonida ning laiendada rakuliinideks. Seda meetodit võib kasulikult kasutada rakuliinide konstrueerimiseks, mis ekspresseerivad leiutisekohaseid antikehi. Selliselt konstrueeritud rakuliinid võivad olla eriti kasulikud otseselt või kaudselt leiutisekohaste antikehadega interakteeruvate ühendite sõelumiseks ja hindamiseks.

10

[0270] Kasutada võib mitmeid seleksioonisüsteeme, sealhulgas võib mittepiiravalt lihtherpeseviiruse tümidiinkinaasi (Wigler *et al.*, 1977, *Cell* 11: 223), hüpoksantiinguaniinfosforibosüültransferaasi (Szybalska ja Szybalski, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 202) ja adeniin-fosforibosüültransferaasi (Lowy *et al.*, 1980, *Cell* 22: 817) geene kasutada vastavalt tk-, hgp_rt- või ap_rt-rakkudes. Samuti võib metaboliidivastast resistentsust kasutada alusena järgmiste geenide selekteerimiseks: dhfr, mis annab resistentsuse metotreksaadi suhtes (Wigler *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 357; O'Hare *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527); gpt, mis annab resistentsuse mükofenoolhappe suhtes (Mulligan ja Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072); neo, mis annab resistentsuse aminoglükosiid G-418 suhtes *Clinical Pharmacy* 12: 488–505; Wu ja Wu, 1991, 3: 87–95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573–596; Mulligan, 1993, *Science* 260: 926–932; ja Morgan ja Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191–217; mai 1993, *TIB TECH* 11(5): 155–215). Rekombinantse DNA tehnoloogia tehnika tasemes laialdaselt tuntud meetodeid, mida võib kasutada, on kirjeldatud publikatsioonides Ausubel *et al.* (toim.), 1993, „Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, „Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual”, Stockton Press, NY; ja Dracopoli *et al.* (toim.), 1994, „Current Protocols in Human Genetics”, 12. ja 13. peatükk, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin *et al.*, 1981, *J. Mol. Biol.* 150: 1; ja hügro, mis annab resistentsuse hügromütsiini suhtes (Santerre *et al.*, 1984, *Gene* 30: 147).

30

[0271] Leiutisekohase antikeha ekspressioonitasemeid on võimalik suurendada vektori võimendamise teel (ülevaate saamiseks vt Bebbington ja Hentschel, „The use of vectors

based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning”, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). Kui antikeha ekspresseerivas vektorsüsteemis leiduv marker on võimendatav, suurendab peremeesraku kultuuris leiduva inhibiitori kontsentratsiooni suurendamine markergeeni koopiate arvu. Kuna
5 võimendatud piirkond on seotud antikeha nukleotiidsel järjestusega, siis suureneb ka antikeha tootmine (Crouse *et al.*, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 257).

[0272] Peremeesraku võib samaaegselt transfekteerida kahe leiutisekohase ekspressioonivektoriga, kus esimene vektor kodeerib raskest ahelast tuletatud polüpeptiidi
10 ja teine kergest ahelast tuletatud polüpeptiidi. Kaks vektorit võivad sisaldada identseid selekteeritavaid markereid, mis võimaldavad raske ja kerge ahela polüpeptiidide võrdset ekspressiooni. Alternatiivselt võib kasutada üksikut vektorit, mis kodeerib nii raske kui ka kerge ahela polüpeptiide. Sellistes olukordades tuleks kerge ahel paigutada raskest ahelast ettepoole, et vältida toksilise vaba raske ahela liiasust (Proudfoot, 1986, *Nature* 322: 52;
15 Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2197). Raske ja kerge ahela kodeerivad järjestused võivad sisaldada cDNA-d või genoomset DNA-d.

[0273] Kui leiutisekohane antikeha on rekombinantselt ekspresseeritud, võib seda puhastada mis tahes antikeha puhastamise valdkonnas tuntud meetodi abil, näiteks
20 kromatograafia (näiteks ionvahetus-, afiinsus- (eelkõige afiinsuskromatograafia spetsiifilise antigeeni suhtes pärast valku A) ja suuruseraldus-kolonnkromatograafia), tsentrifuugimise, diferentsiaalse lahustuvuse ja mis tahes muu valkude puhastamiseks kasutatava standardse tehnika abil.

25 **5.4. PROFÜLAKTILISED JA TERAPEUTILISED MEETODID**

[0274] Samuti on kirjeldatud antikehadel põhinevaid ravimeetodeid, mis hõlmavad ühe
või mitme leiutisekohase antikeha manustamist loomale, eelistatult imetajale ja enim eelistatult inimesele sellise haiguse, häire või infektsiooniga seotud sümptomite ennetamiseks, ravimiseks või leevendamiseks, mis on seotud Fc γ RIIB ebatüüpiliste
30 tasemete või aktiivsusega ja/või mis on ravitavad Fc γ RIIB aktiivsusega seotud immuunfunktsiooni muutmise teel, või need parandavad teise terapeutilise antikeha

tsütotoksilist toimet või parandavad vaktsiini kompositsiooni tõhusust. Osadel juhtudel on ühe või mitme leiutisekohase antikeha manustamisega tehtav ravi kombineeritud ühe või mitme teise ravimeetodi, näiteks mittepiiravalt keemiaravi, kiiritusravi, hormoonravi ja/või bioloogilise ravi / immuunravi manustamisega.

5

[0275] Antikehi võib pakkuda farmatseutiliselt vastuvõetavates kompositsioonides tehnika tasemes või siin kirjeldatu kohaselt. Aallpool üksikasjalikult kirjeldatu kohaselt võib leiutisekohaseid antikehi kasutada vähi (eelkõige passiivse immuunravi või vähivaktsiini tõhususe parandamiseks), autoimmuunhaiguse, põletikuliste häirete või allergiate ravimise meetodites (et näiteks parandada allergia ravimiseks mõeldud vaktsiini tõhusust).

[0276] Fc γ RIIB (CD32B) puhul on leitud, et seda ekspresseeritakse järgmistes koetüüpides: rasvkude, B-rakud, luud, aju, kõhred, käärsool, endokriin, silm, loode, seedetrakt, eritus- ja suguelundid, idurakud, pea ja kael, neer, kops, lümfisõlm, lümforetikulaarne kude, rinnanääre, lihased, närvikude, munasarjad, kõhunääre, kõhunäärme saarekesed, ajuripats, platsenta, võrkkest, nahk, pehmekude, liigesevõie ja emakas (andmed kogutud USA Riikliku Vähiinstituudi vähi genoomi anatoomia projektist). Seega võib leiutisekohaseid antikehi kasutada mis tahes nimetatud kudedes Fc γ RIIB aktiivsuse agoniseerimiseks või antagoniseerimiseks. Näiteks ekspresseeritakse Fc γ RIIB-d platsentas ja sellel võib olla oma roll IgG transpordis lootele ja immuunkomplekside püüdmisel (Lyden *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 166: 3882–3889). Teatavatel leiutisekohastel juhtudel võib Fc γ RIIB vastast antikeha kasutada aborti esile kutsuva vahendina.

25

[0277] Leiutajad avastasid, et üllatuslikult ei ekspresseeri neutrofiilid FC γ RIIB märkimisväärseid tasemeid. Sellest tulenevalt pakutakse meetodeid ja farmatseutilisi kompositsioone nendes meetodites kasutamiseks, mis sisaldavad teatavas koguses CD32-spetsiifilist antikeha, mis seondub kasvajarakkude ja mitteneutrofiilidest rakutüüpide, näiteks makrofaagidega ja avaldab neile toimet, kuid ei seo tuvastatavalt neutrofiile või ei avalda neile tuvastatavat toimet. Teatavatel juhtudel võib leiutisekohaseid antikehi kasutada CD32B⁺ rakkude, näiteks makrofaagide, või CD32B-d ekspresseerivate kasvajarakkude vähendamiseks.

30

[0278] Leiutisekohaseid antikehi, mis toimivad haiguse, häire või infektsiooni profülaktilise ja/või raviainena, manustada loomale, eelistatult imetajale ja enim eelistatult inimesele, et ravida, ennetada või paremaks muuta ühte või mitut nimetatud haiguse, häire või infektsiooniga seotud sümptomit. Leiutisekohaseid antikehi võib manustada ühe või

5 mitme profülaktilise ja/või raviainega kombineeritult, mis on kasulikud sellise haiguse, häire või infektsiooni ravimisel, ennetamisel või kontrolli all hoidmisel, mis on seotud FcγRIIB ebatüüpiliste tasemetega või aktiivsusega ja/või mis on ravitavad FcγRIIB aktiivsusega seotud immuunfunktsiooni muutmise teel. Ühte või mitut leiutisekohast antikeha võib manustada imetajale, eelistatult inimesele ühe või mitme teise vähi

10 ravimiseks kasuliku raviainega samaaegselt. Termin „samaaegselt” ei ole piiratud profülaktiliste või raviainete manustamisega täpselt samal ajal, vaid pigem mõeldakse selle all seda, et leiutisekohaseid antikehi ja teist ainet manustatakse ravialusele järjestikku ja teatud ajalise vahega, nii et leiutisekohased antikehad saavad toimida koos teise ainega, et pakkuda suuremat kasu, kui pakuks nende muul viisil manustamine. Näiteks võib igat

15 profülaktilist või raviainet manustada samal ajal või järjestikku mis tahes järjekorras erinevatel ajahetkedel; kuid kui neid ei manustata samaaegselt, siis tuleks neid manustada ajaliselt piisavalt lähedastikku, et pakkuda soovitud terapeutilist või profülaktilist mõju. Igat raviainet võib manustada eraldi, mis tahes sobivas vormis ja ükskõik millisel sobival viisil.

20 [0279] Erinevatel juhtudel manustatakse profülaktilisi või raviaineid vähem kui 1-tunnise vahega, ligikaudu 1-tunnise vahega, ligikaudu 1-tunnise kuni ligikaudu 2-tunnise vahega, ligikaudu 2-tunnise kuni ligikaudu 3-tunnise vahega, ligikaudu 3-tunnise kuni ligikaudu 4-tunnise vahega, ligikaudu 4-tunnise kuni ligikaudu 5-tunnise vahega, ligikaudu 5-tunnise kuni ligikaudu 6-tunnise vahega, ligikaudu 6-tunnise kuni ligikaudu 7-tunnise

25 vahega, ligikaudu 7-tunnise kuni ligikaudu 8-tunnise vahega, ligikaudu 8-tunnise kuni ligikaudu 9-tunnise vahega, ligikaudu 9-tunnise kuni ligikaudu 10-tunnise vahega, ligikaudu 10-tunnise kuni ligikaudu 11-tunnise vahega, ligikaudu 11-tunnise kuni ligikaudu 12-tunnise vahega, mitte rohkem kui 24-tunnise vahega või mitte rohkem kui 48-tunnise vahega. Eelistatud juhtudel manustatakse kahte või enamat komponenti

30 patsiendi ühe külastuse jooksul.

[0280] Siin pakutud annuse kogused ja manustamise sagedused on hõlmatud väljenditega „terapeutiliselt efektiivne” ja „profülaktiliselt efektiivne”. Lisaks varieeruvad annus ja

sagedus tüüpiliselt vastavalt iga patsiendi eriomastest teguritest, mis sõltuvad konkreetselt manustatavatest ravi- või profülaktilistest ainetest, vähi raskusastmest ja tüübist, manustamisviisist ning patsiendi vanusest, kehakaalust, ravivastusest ja varasemast haigusloost. Valdkonna asjatundja suudab valida sobivad raviskeemid, võttes arvesse
5 nimetatud tegureid ja järgides näiteks annuseid, mis on avaldatud erialases kirjanduses ja soovitatud publikatsioonis „Physician's Desk Reference” (56. väljaanne, 2002).

[0281] Leiutisekohaseid antikehi võib kasulikult kasutada ka teiste monoklonaalsete või kimäärsete antikehade, Fc liitvalkude või lümfokiinide, tsütokiinide või hematopoeetiliste
10 kasvufaktoritega (näiteks IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10 ja TGF- β) kombineeritult, mis parandavad Fc γ RIIB-d, et näiteks suurendada efektorrakkude arvu või aktiivsust, mis avaldavad interaktsiooni antikehadega, ja suurendada immuunreaktsiooni. Teatavates teostustes on tsütokiin konjugeeritud Fc γ RIIB vastase antikehaga.

15 [0282] Leiutisekohaseid antikehi võib kasulikult kasutada ka ühe või mitme ravimiga kombineeritult, mida kasutatakse haiguse, häire või infektsiooni ravimiseks, näiteks vähivastaste ainete, põletikuvastaste ainete või viirusevastaste ainetega kombineeritult, näiteks vastavalt allpool jagudes 5.4.6 ja 5.4.5 kirjeldatule.

20 **5.4.1. VÄHID**

[0283] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada üksi või kombineeritult teiste
25 terapeutiliste antikehadega, mis tehnika tasemes teadaoleva kohaselt ennetavad, inhibeerivad või vähendavad vähirakkude primaarsete kasvajate või metastaaside kasvu. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada kombineeritult antikehadega, mida kasutatakse
30 vähi immuunravis ning see võib hõlmata leiutisekohaste antikehade kasutamist teise terapeutilise kombineeritult antikehaga, et parandada sellise immuunravi tõhusust, suurendades terapeutilise antikeha efektorfunktsiooni, näiteks ADCC, CDC, fagotsütoosi, opsoniseerimise jne tugevust. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetselt toimemehhanismist, blokeerivad leiutisekohased antikehad Fc γ RIIB-d, eelistatult
monotsüütidel ja makrofaagidel, ning seega parandavad kasvajaspetsiifiliste antikehade kliinilisest tõhususest saadavat terapeutilist kasu, näiteks Fc γ R-ide aktiveerimise poolt

vahendatud kasvajate kliirensi parandamise teel. Sellest tulenevalt pakutakse leiutiskirjelduses sellise vähi ennetamise või ravimise meetodeid, mida iseloomustab vähi antigeen, kui leiutisekohast antikeha manustatakse kombineeritult teise antikehaga, mis seob spetsiifiliselt vähi antigeeni ja on tsütotoksiline. Leiutisekohased antikehad on kasulikud vähi ennetamiseks või ravimiseks, eelkõige vähi antigeeni spetsiifiliste tsütotoksilise toimega terapeutiliste antikehade tsütotoksilise toime võimendamisel, et parandada kasvajarakkude tapmist leiutisekohaste antikehade poolt ja/või parandada näiteks terapeutiliste antikehade ADCC aktiivsust või CDC aktiivsust. Leiutisekohaseid antikehi võib manustada Fc liitvalkudega. Leiutisekohane antikeha võib üksi või kombineeritult tsütotoksilise terapeutilise antikehaga manustamisel inhibeerida või vähendada vähirakkude primaarse kasvaja kasvu või vähirakkude metastaasi vähemalt 99%, vähemalt 95%, vähemalt 90%, vähemalt 85%, vähemalt 80%, vähemalt 75%, vähemalt 70%, vähemalt 60%, vähemalt 50%, vähemalt 45%, vähemalt 40%, vähemalt 45%, vähemalt 35%, vähemalt 30%, vähemalt 25%, vähemalt 20% või vähemalt 10% võrreldes primaarse kasvaja kasvu või metastaasiga nimetatud leiutisekohase antikeha puudumisel. Ühel eelistatud juhul inhibeerivad või vähendavad leiutisekohased antikehad kombineeritult tsütotoksilise terapeutilise antikehaga primaarse kasvaja kasvu või vähi metastaasi vähemalt 99%, vähemalt 95%, vähemalt 90%, vähemalt 85%, vähemalt 80%, vähemalt 75%, vähemalt 70%, vähemalt 60%, vähemalt 50%, vähemalt 45%, vähemalt 40%, vähemalt 45%, vähemalt 35%, vähemalt 30%, vähemalt 25%, vähemalt 20% või vähemalt 10% võrreldes kasvu või metastaasiga nimetatud antikehade puudumisel.

[0284] Üleminek normaalsest olekust pahaloomulisse olekusse on mitmeetapiline protsess, mis hõlmab geneetilisi ja epigeneetilisi muutusi. Rakke reguleerivas skeemis esineb mitmeid muutusi, mis lihtsustavad seda edasiminekut, mis võimaldab kasvajarakkudel lõpliku diferentseerumise ja liikumatusse kohustusest kõrvale hiilida, mis tavaliselt reguleerib kudede homöostaasi. Vähirakkude invasiivsuses ja metastaatilises potentsiaalis on täheldatud teatavate geenide osalemist, näiteks CSF-1 (kolooniat stimuleeriv faktor 1 ehk makrofaagide kolooniat stimuleeriv faktor). Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, võib CSF-1 vähendada kasvaja progressiooni ja metastaasi, värvates makrofaage kasvaja asukohta, kus need soodustavad kasvaja progressiooni. Arvatakse, et makrofaagidel on kasvaja progressiooni ja metastaasi vahendamisel troofiline roll, tõenäoliselt angiogeensete faktorite, näiteks tümidiini

- fosforülaasi, vaskulaarse endoteelist tuletatud kasvufaktori sekretsiooni tõttu; kasvufaktorite, näiteks epidermaalse kasvufaktori sekretsiooni tõttu, mis võib toimida parakriinse faktorina kasvajarakkudel, ning seeläbi võivad need soodustada kasvajarakkude migratsiooni ja invasiooni veresoontesse. (Vt näiteks Lin *et al.*, 2001, *J. Exp. Med.* 193(6): 727–739; Lin *et al.*, 2002, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7(2): 147–162; Scholl *et al.*, 1993, *Molecular Carcinogenesis*, 7: 207–211; Clynes *et al.*, 2000, *Nature Medicine*, 6(4): 443–446; Fidler *et al.*, 1985, *Cancer Research*, 45: 4714–4726).
- 5
- 10 **[0285]** Leiutisekohased antikehad võivad blokeerida makrofaagide vahendatud kasvajarakkude progressiooni ja metastaase. Leiutisekohased antikehad on eriti kasulikud tahkete kasvaja ravimisel, mille korral esineb makrofaagide sissetungimist. Leiutisekohased antagonistlikud antikehad on eriti kasulikud kasvajarakkude metastaaside kontrolli all hoidmiseks, näiteks vähendamiseks või kõrvaldamiseks,
- 15 vähendades või kõrvaldades selleks makrofaagide populatsiooni, mis paikneb kasvaja asukohas. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada üksi, et hoida kasvajarakkude metastaasi kontrolli all. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, seovad leiutisekohased antagonistlikud antikehad üksi manustamise korral inhibeerivat Fc γ RIIB-d makrofaagidel ja vähendavad tõhusalt makrofaagide
- 20 populatsiooni ning seega piiravad kasvajarakkude progressiooni. Leiutisekohased antagonistlikud antikehad vähendavad või eelistatult kõrvaldavad makrofaagid, mis paiknevad kasvaja asukohas, kuna eelistatult ekspresseeritakse Fc γ RIIB-d aktiveeritud monotsüütidel ja makrofaagidel, sealhulgas kasvajasse sissetungivatel makrofaagidel. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada vähkide ravimisel, mida iseloomustab CSF-1
- 25 ületootmine, sealhulgas mittepiiravalt rinna-, emaka- ja munasarjavähi ravimisel.
- [0286]** Samuti on kirjeldatud antikehasid, mis tõhusalt vähendavad või kõrvaldavad immuunrakke, mis ei ole makrofaagid ja mis ekspresseerivad Fc γ RIIB-d, näiteks dendriittrakke ja B-rakke. Immuunrakkude tõhus vähendamine või kõrvaldamine
- 30 leiutisekohaseid antikehi kasutades võib ulatuda immuunrakkude populatsiooni vähendamiseni 50%, 60%, 70%, 80%, eelistatult 90% ja enim eelistatult 99% võrra. Seega on leiutisekohastel antikehadel parem terapeutiline tõhusus üksi või teise antikeha, näiteks terapeutilise antikeha, näiteks kasvajakasvaste antikehade, viirusevastaste antikehade ja

mikroobivastaste antikehadega kombineeritult. Terapeutilistel antikehadel võib olla spetsiifilisus vähirakkude või põletikuliste rakkude suhtes. Teine antikeha võib siduda normaalseid rakke. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, kui leiutisekohaseid antikehi kasutatakse üksi, et vähendada

5 Fc γ RIIB-d ekspresseerivaid immuunrakke, siis jaotatakse rakkude populatsioon ümber, nii et alles jäävatel rakkudel on tõhusalt aktiveerivad Fc retseptorid ja seega leevendatakse pärssimist Fc γ RIIB poolt. Teise antikeha, näiteks terapeutilise antikehaga kombineeritult kasutamise korral parandatakse teise antikeha tõhusust antikeha Fc vahendatud efektorfunktsiooni suurendamise teel.

10

[0287] Vähkide ja seotud häirete hulka, mida saab ravida või ennetada kirjeldatud meetodite ja käesoleva leiutise kohaste kompositsioonide abil, kuuluvad mittepiiravalt järgnevad: leukeemiad, sealhulgas mittepiiravalt äge leukeemia, äge lümfotsütaarne leukeemia, ägedad müelotsütaarsed leukeemiad, näiteks müeloblastne,

15 promüelotsütaarne, müelomonotsütaarne, monotsütaarne, erütroleukeemiline leukeemia ja müelodüsplastiline sündroom, kroonilised leukeemiad, näiteks mittepiiravalt krooniline müelotsütaarne (granulotsütaarne) leukeemia, krooniline lümfotsütaarne leukeemia, karvrakuline leukeemia; tõeline polütsüteemia; lümfoomid, näiteks mittepiiravalt Hodgkini tõbi, mitte-Hodgkini tõbi; hulgimüeloomid, näiteks mittepiiravalt aeglaselt

20 arenev hulgimüeloom, mittesekretoorne müeloom, osteosklerootiline müeloom, plasmarakuline leukeemia, solitaarne plasmotsütoom ja ekstramedullaarne plasmotsütoom; Waldenströmi makroglobulineemia; ebaselge tähendusega monoklonaalne gammopaatia; healoomuline monoklonaalne gammopaatia; raske ahela haigus; luu- ja sidekoe sarkoomid, sealhulgas mittepiiravalt luusarkoom, osteosarkoom,

25 kondrosarkoom, Ewingi sarkoom, pahaloomuline hüdrakuline kasvaja, luukoe fibrosarkoom, kordoom, periosteaalne sarkoom, pehmekoe sarkoomid, angiosarkoom (hemangiosarkoom), fibrosarkoom, Kaposi sarkoom, leiomüosarkoom, liposarkoom, lümfangiosarkoom, neurilemmoom, rabdomyosarkoom, sünoviaalne sarkoom; ajukasvajad, sealhulgas mittepiiravalt glioom, astrotsütoom, ajutüveglioom,

30 endodütoom, oligodendroglioom, mittegliaalne kasvaja, akustiline neurinoom, kraniofarüngioom, medulloblastoom, meningioom, pineotsütoom, pineoblastoom, primaarne ajulümfoom; rinnavähk, sealhulgas mittepiiravalt adenokartsinoom, lobulaarne (väikerakuline) kartsinoom, intraduktaalne kartsinoom, medullaarne rinnavähk,

mutsiinosne rinnavähk, tubulaarne rinnavähk, papillaarne rinnavähk, Pageti tõbi ja põletikuline rinnavähk; neerupealiste vähk, sealhulgas mittepiiravalt feokromotsütoom ja adrenokortikaalne kartsinoom; kilpnäärmevähk, näiteks mittepiiravalt papillaarne või follikulaarne kilpnäärmevähk, medullaarne kilpnäärmevähk ja anaplastiline

5 kilpnäärmevähk; kõhunäärmevähk, sealhulgas mittepiiravalt insulinoom, gastrinoom, glükagonoom, vipoom, somatostatiini eritav kasvaja, ja kartsinoid või saarekeste rakkude kasvaja; ajuripatsi vähid, sealhulgas mittepiiravalt Cushingi tõbi, prolaktiini eritav kasvaja, akromegaalia ja magediabeet; silmavähid, sealhulgas mittepiiravalt silma melanoom, näiteks vikerkesta melanoom, soonkesta melanoom ja tsiliaarkeha melanoom,

10 ja retinoblastoom; tupevähid, sealhulgas mittepiiravalt lamerakuline kartsinoom, adenokartsinoom ja melanoom; häbemevähk, sealhulgas mittepiiravalt lamerakuline kartsinoom, melanoom, adenokartsinoom, basaarakuline kartsinoom, sarkoom ja Pageti tõbi; emakakaelavähid, sealhulgas mittepiiravalt lamerakuline kartsinoom ja adenokartsinoom; emakavähid, sealhulgas mittepiiravalt endometrioidne kartsinoom ja

15 emakasarkoom; munasarjavähid, sealhulgas mittepiiravalt munasarja epiteeli kartsinoom, piiripealne kasvaja, idurakuline kasvaja ja strooma kasvaja; söögitoruvähid, sealhulgas mittepiiravalt lamerakuline vähk, adenokartsinoom, adenotsüstiline kartsinoom, mukoepidermoidne kartsinoom, adenoskvamoosne kartsinoom, sarkoom, melanoom, plasmotsütoom, verrukoosne kartsinoom ja kaerarakuline (väikerakuline) kartsinoom;

20 maovähid, sealhulgas mittepiiravalt adenokartsinoom, seenestuv (polüpoidne), haavandiline, pindmise levikuga, hajusa levikuga, pahaloomuline lümfoom, liposarkoom, fibrosarkoom ja kartsinosarkoom; käärsoolevähid; pärakuvähid; maksavähid, sealhulgas mittepiiravalt hepatotsellulaarne kartsinoom ja hepatoblastoom, kusepõievähid, sealhulgas mittepiiravalt adenokartsinoom; kolangiokartsinoomid, sealhulgas

25 mittepiiravalt papillaarne, nodulaarne ja difuusne; kopsuvähid, sealhulgas mittepiiravalt mitteväikerakuline kopsuvähk, lamerakuline kartsinoom (epidermoidne kartsinoom), adenokartsinoom, suurearakuline kartsinoom ja väikerakuline kopsuvähk; munandivähid, sealhulgas mittepiiravalt germinaalne kasvaja, seminoom, anaplastne, klassikaline (tüüpiline), spermatotsüütne, mitteseminoom, embrüonaalne kartsinoom, teratoomi

30 kartsinoom, kooriokartsinoom (munandikoti kartsinoom), eesnäärmevähid, sealhulgas mittepiiravalt adenokartsinoom, leiomyosarkoom ja rhabdomyosarkoom; peenisevähid; suuvähid, sealhulgas mittepiiravalt lamerakuline kartsinoom; basaalsed vähid; süljenäärme vähid, sealhulgas mittepiiravalt adenokartsinoom, mukoepidermoidne

kartsinoom ja adenotsüstiline kartsinoom; neeluvähid, sealhulgas mittepiiravalt lamerakuline vähk ja verrukoosne; nahavähid, sealhulgas mittepiiravalt basaalrakuline kartsinoom, lamerakuline kartsinoom ja melanoom, pindmise levikuga melanoom, nodulaarne melanoom, lentigo pahaloomuline melanoom, akraal-lentiginoosne melanoom; neeruvähid, sealhulgas mittepiiravalt neerurakuline vähk, adenokartsinoom, hüpernefroom, fibrosarkoom, üleminekurakuline vähk (neeruvaagna/ureetra); Wilmsi kasvaja; põievähid, sealhulgas mittepiiravalt üleminekurakuline kartsinoom, lamerakuline vähk, adenokartsinoom, kartsinosarkoom. Lisaks kuuluvad vähkide hulka müksosarkoom, osteogeenne sarkoom, endoteliosarkoom, lümfangioendoteliosarkoom, mesotelioom, sünoovium, hemangioblastoom, epiteliaalne kartsinoom, tsüstadenokartsinoom, bronhogeenne kartsinoom, higinäärme kartsinoom, rasunäärme kartsinoom, papillaarne kartsinoom ja papillaarsed adenokartsinoomid (selliste häirete kohta ülevaate saamiseks vt Fishman *et al.*, 1985, „Medicine”, 2. väljaanne, J.B. Lippincott Co., Philadelphia ja Murphy *et al.*, 1997, „Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery”, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., USA).

[0288] Sellest tulenevalt on siin kirjeldatud meetodid ja leiutisekohased kompositsioonid samuti kasulikud erinevate vähkide või teiste ebanormaalsete proliferatiivsete haiguste, sealhulgas (mittepiiravalt) järgnevate ravimisel või ennetamisel: kartsinoom, sealhulgas põie-, rinna-, käärsoole, neeru-, maksa-, kopsu-, munasarja, kõhunäärme, mao-, emakakaela, kilpnäärme ja nahakartsinoom; sealhulgas lamerakuline kartsinoom; lümfoidse liini hematopoeetilised kasvajakasvajad, sealhulgas leukeemia, äge lümfotsütaarne leukeemia, äge lümfoblastne leukeemia, B-rakuline lümfoom, T-rakuline lümfoom, Burkitti lümfoom; müeloidse liini hematopoeetilised kasvajakasvajad, sealhulgas ägedad ja kroonilised müelogeensed leukeemiad ja promüelotsütaarne leukeemia; mesenhümaalset päritolu kasvajakasvajad, sealhulgas fibrosarkoom ja rabdomüosarkoom; muud kasvajakasvajad, sealhulgas melanoom, seminoom, teratokartsinoom, neuroblastoom ja glioom; kesk- ja perifeerse närvisüsteemi kasvajakasvajad, sealhulgas astrotsütoom, neuroblastoom, glioom ja schwannoom; mesenhümaalset päritolu kasvajakasvajad, sealhulgas fibrosarkoom, rabdomüosarkoom ja osteosarkoom; ja teised kasvajakasvajad, sealhulgas melanoom, pigmentne kseroderma, keratoakantoom, seminoom, follikulaarne kilpnäärmevähk ja teratokartsinoom. Samuti on mõeldav, et siin kirjeldatud meetodite ja leiutisekohaste kompositsioonide abil võib ravida ka vähke, mida põhjustavad apoptoosi puhul esinevad

kõrvalekalded. Selliste vähkide hulka võivad kuuluda mittepiiravalt follikulaarsed lümfoomid, p53 mutatsioonidega kartsinoomid, hormoonidest sõltuvad rinna-, eesnäärme ja munasarja kasvaja, ning vähieelsed haiguskolded nagu perekondlik adenomatoosne polüpoos ja müelodüsplastilised sündroomid. Osadel juhtudel ravitakse või ennetatakse

5 pahaloomulisi või düsproliferatiivseid muutusi (näiteks metaplaasiaid ja düsplaasiaid) või hüperproliferatiivseid häireid siin kirjeldatud meetodite ja leiutisekohaste kompositsioonide abil munasarjas, põies, rinnas, käärsooles, kopsus, nahas, kõhunäärmes või emakas. Teistel juhtudel ravitakse või ennetatakse siin kirjeldatud meetodite ja leiutisekohaste kompositsioonide abil sarkoomi, melanoomi või leukeemiat.

10

[0289] Vähi antigeenidega seotud vähkide ravimiseks või ennetamiseks võib manustada leiutisekohaseid antikehi sellise antikehaga kombineeritult, mis seob vähi antigeeni ja on tsütotoksiline. Leiutisekohased antikehad võivad parandada konkreetse vähi antigeeni vastu suunatud antikeha antikeha-vahendatud tsütotoksilist mõju. Näiteks võib

15 leiutisekohaste meetodite ja kompositsioonide abil ravida või ennetada mittepiiravalt järgmiste vähi antigeenidega seotud vähke. KS 1/4 pan-kartsinoomi antigeen (Perez ja Walker, 1990, *J. Immunol.* 142: 32–37; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7(4): 407–415), munasarjakartsinoomi antigeen (CA125) (Yu *et al.*, 1991, *Cancer Res.* 51(2): 48–475), prostaatiline happe fosfaat (Tailor *et al.*, 1990, *Nucl. Acids Res.* 18(1): 4928),

20 eesnäärmespetsiifiline antigeen (Henttu ja Vihko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10(2): 903–910; Israeli *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53: 227–230), melanoomiga seotud antigeen p97 (Estin *et al.*, 1989, *J. Natl. Cancer Instit.* 81(6): 445–44), melanoomi antigeen gp75 (Vijayasardahl *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.* 171(4): 1375–1380), kõrge molekulmassiga melanoomi antigeen (HMW-MAA) (Natali *et al.*, 1987, *Cancer* 59: 55–

25 53; Mittelman *et al.*, 1990, *J. Clin. Invest.* 86: 2136–2144)), eesnäärme-spetsiifiline membraani antigeen, kartsinoembrüonaalne antigeen (CEA) (Foon *et al.*, 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13: 294), polümorfne epiteliaalne mutsiini antigeen, inimese piimarasva gloobuli antigeen, pärasoolekasvajaga seotud antigeenid, näiteks: CEA, TAG-72 (Yokata *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52: 3402–3408), CO17-1A (Ragnhammar *et al.*, 1993, *Int. J. Cancer* 53: 751–758); GICA 19-9 (Herlyn *et al.*, 1982, *J. Clin. Immunol.* 2: 135), CTA-1

30 ja LEA, Burkitti lümfoomi antigeen-38.13, CD19 (Ghetie *et al.*, 1994, *Blood* 83: 1329–1336), inimese B-lümfoomi antigeen-CD20 (Reff *et al.*, 1994, *Blood* 83: 435–445), CD33 (Sgouros *et al.*, 1993, *J. Nucl. Med.* 34: 422–430), melanoomi-spetsiifilised antigeenid,

näiteks gangliosiid GD2 (Saleh *et al.*, 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390–3398), gangliosiid GD3 (Shitara *et al.*, 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36: 373–380), gangliosiid GM2 (Livingston *et al.*, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12: 1036–1044), gangliosiid GM3 (Hoon *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53: 5244–5250), kasvajaspetsiifilise siirdamise tüüpi rakupinna

5 antigeen (TSTA), näiteks viiruse poolt esilekutsutud kasvaja antigeenid, sealhulgas T-antigeeni DNA kasvaja viirused ja RNA kasvaja viiruste ümbrikantigeenid, onkofetaalne antigeen-alfafetoproteiin, näiteks käärsoole CEA, põiekasvaja onkofetaalne antigeen (Hellstrom *et al.*, 1985, *Cancer Res.* 45: 2210–2188), diferentseerumise antigeen, näiteks inimese kopsukartsinoomi antigeen L6, L20 (Hellstrom *et al.*, 1986, *Cancer Res.* 46:

10 3917–3923), fibrosarkoomi antigeenid, inimese leukeemia T-raku antigeen-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee *et al.*, 1988, *J. of Immun.* 141: 1398–1403), neoglükoproteiin, sfingolipiidid, rinnavähi antigeen, näiteks EGFR (epidermaalse kasvufaktori retseptor), HER2 antigeen (p185^{HER2}), polümorfne epiteliaalne mutsiin (PEM) (Hilkens *et al.*, 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17: 359), inimese pahaloomulise lümfotsüüdi antigeen-APO-1

15 (Bernhard *et al.*, 1989, *Science* 245: 301–304), diferentseerumise antigeen (Feizi, 1985, *Nature* 314: 53–57) näiteks I antigeen, mida leidub loote erütrotsüütides ja primaarses endotermis, I(Ma), mida leidub mao adenokartsinoomides, M18 ja M39, mida leidub rinna epiteelis, SSEA-1, mida leidub müeloidsetes rakkudes, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, ja D156-22, mida leidub pärasoolevähis, TRA-1-85 (veregrupp H), C 14, mida leidub

20 käärsoole adenokartsinoomis, F3, mida leidub kopsu adenokartsinoomis, AH6, mida leidub maovähis, Y hapten, Le^y, mida leidub embrüonaalse kartsinoomi rakkudes, TL5 (veregrupp A), EGF-retseptor, mida leidub A431 rakkudes, E₁ seeria (veregrupp B), mida leidub kõhunäärmevähis, FC10.2, mida leidub embrüonaalse kartsinoomi rakkudes, mao adenokartsinoomis, CO-514 (veregrupp Le^a), mida leidub adenokartsinoomis, NS-10,

25 mida leidub adenokartsinoomides, CO-43 (veregrupp Le^b), G49, EGF-retseptor (veregrupp ALe^b/Le^y), mida leidub käärsoole adenokartsinoomis, 19.9, mida leidub käärsoolevähis, maovähi mutsiinides, T₅A₇, mida leidub müeloidsetes rakkudes, R₂₄, mida leidub melanoomis, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2}, M1: 22: 25: 8, mida leidub embrüonaalse kartsinoomi rakkudes ja SSEA-3, SSEA-4, mida leidub 4–8-raku

30 staadiumis olevates loodetes. Nimetatud antigeen võib olla T-raku retseptorist tuletatud peptiid kutaanses T-rakulisest lümfoomist (vt Edelson, 1998, *The Cancer Journal* 4: 62).

[0290] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud terapeutiliste vähi antikehadega kombineeritult, et parandada ravi tõhusust. Näiteks võib leiutisekohaseid antikehi kasutada mis tahes tabelis 7 loetletud antikehadega, mis on demonstreerinud terapeutilist kasulikkust vähiravis. Leiutisekohased antikehad parandavad terapeutiliste vähi antikehade ravi tõhusust, parandades nimetatud terapeutiliste vähi antikehade vähemalt ühte antikeha vahendatud efektorfunktsiooni. Antikehasid võib kasutada selleks, et parandada ravi tõhusust, parandades nimetatud terapeutiliste vähi antikehade komplemendist sõltuvat kaskaadi. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada ravi tõhususe parandamiseks, parandades märklaud-kasvajarakkude fagotsütoosi ja opsoniseerimist. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada ravi tõhususe parandamiseks, parandades ADCC-d märklaud-kasvajarakkude hävitamisel.

[0291] Leiutisekohaseid antikehi võib samuti kasutada tsütosiini-guaaniini dinukleotiididel („CpG”) põhinevate produktidega kombineeritult, mis on välja töötatud (Coley Pharmaceuticals) või mida töötatakse praegu välja kaasasündinud või omandatud immuunvastuste aktivaatoritena. Näiteks hõlmab leiutis of CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals) kasutamist leiutisekohastes meetodites ja kompositsioonides vähi ravimiseks ja/või ennetamiseks (vt ka Warren *et al.*, 2002, *Semin Oncol.*, 29(1 Suppl 2): 93–97; Warren *et al.*, 2000, *Clin Lymphoma*, 1(1): 57–61.

20

[0292] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada kombineeritult mis tahes terapeutilise antikehaga, mis ei vahenda selle terapeutilist mõju rakkude tapmise kaudu, et võimendada antikeha terapeutilist toimet. Samuti on kirjeldatud leiutisekohaste antikehade kasutamist kombineeritult agonistliku aktiivsusega apoptoosi indutseeriva terapeutilise antikeha, näiteks Fas-i vastase antikehaga. Fas-i vastased antikehad on tehnika tasemes tuntud ja nende hulka kuuluvad näiteks Jo2 (Ogasawara *et al.*, 1993, *Nature* 364: 806) ja HFE7 (Ichikawa *et al.*, 2000, *Int. Immunol.* 12: 555). Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda konkreetsetest toimemehhanismidest, on Fc γ RIIB puhul täheldatud, et see soodustab Fas-i vastase antikeha vahendatud apoptoosi, vt näiteks Xu *et al.*, 2003, *Journal of Immunology*, 171: 562–568. Fc γ RIIB rakuväline domeen võib toimida ristsidumise aina Fas-retseptorite jaoks, põhjustades funktsionaalse kompleksi moodustumist ja soodustades Fas-ist sõltuvat apoptoosi. Osadel juhtudel blokeerivad leiutisekohased antikehad Fas-i vastaste antikehade ja Fc γ RIIB interaktsiooni, põhjustades Fas-i

30

- vahendatud apoptootilise aktiivsuse vähenemist. Leiutisekohased antikehad, mis annavad tulemuseks Fas-i vahendatud apoptootilise aktiivsuse vähenemise, on eriti kasulikud Fas-i vastaste antikehadega kombineeritult, millel on soovimatud kõrvalmõjud, näiteks hepatotoksilisus. Teistel juhtudel parandavad leiutisekohased antikehad Fas-i vastaste antikehade ja Fc γ RIIB interaktsiooni, põhjustades Fas-i vahendatud apoptootilise aktiivsuse paranemist. Leiutisekohaste antikehade kombinatsioonil agonistliku aktiivsusega apoptoosi esile kutsuvate terapeutiliste antikehadega on parem terapeutiline tõhusus.
- 5
- 10 **[0293]** Siin kirjeldatud meetodites kasutatud apoptoosi esile kutsuvad terapeutilised antikehad võivad olla spetsiifilised mis tahes surmaretseptori suhtes, mis tehnika tasemes teadaoleva kohaselt moduleerib apoptootilist rada, näiteks TNFR retseptorite perekond.
- [0294]** Kirjeldatud on kahjustunud apoptoosi vahendatud signaliseerimisega haiguste, näiteks vähi või autoimmuunhaiguse ravimise meetodit, näiteks puuduliku Fas-i vahendatud apoptoosiga haiguse ravimise meetodit, kus nimetatud meetod hõlmab leiutisekohase antikeha manustamist Fas-i vastase kombineeritult antikehaga.
- 15
- [0295]** Leiutisekohased agonistlikud antikehad võivad olla eriti kasulikud mittehematopoeetilist päritolu kasvajate, sealhulgas melanoomirakkude kasvajate ravimiseks. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, on leiutisekohaste agonistlike antikehade tõhusus osaliselt tingitud Fc γ RIIB-d inhibeeriva raja aktivatsioonist, kuna mittehematopoeetilist päritolu kasvajakasvajad, sealhulgas melanoomirakkude kasvajakasvajad ekspresseerivad Fc γ RIIB-d. Hiljutised uuringud on tõepoolest näidanud, et Fc γ RIIB ekspressioon melanoomirakkudes moduleerib kasvaja kasvu vahetu interaktsiooni teel kasvajakasvajastaste antikehadega (näiteks kasvajakasvajastaste antikehade Fc-piirkonna sidumise teel) intratsütoplasmaatilisel sõltuval viisil (Cassard *et al.*, 2002, *Journal of Clinical Investigation*, 110(10): 1549–1557).
- 20
- 25
- 30 **[0296]** Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada kombineeritult terapeutiliste antikehadega, mis seonduvad immunospetsiifiliselt kasvaja antigeenidega, mida ei ekspresseerita kasvajakasvajarakkudel endil, vaid pigem ümbritsevates reaktiivsetes ja kasvajakasvajarakkudes, mis hõlmavad kasvajakasvajarakkude stroomat. Kasvajakasvajarakkude

strooma sisaldab endoteelirakke, mis moodustavad uusi veresooni, ja strooma fibroblaste, mis ümbritsevad kasvaja veresoonkonda. Leiutisekohast antikeha võib kasutada kombineeritult antikehaga, mis seob immunospetsiifiliselt kasvaja antigeeni endoteelirakul. Leiutisekohast antikeha võib kasutada kombineeritult antikehaga, mis seob immunospetsiifiliselt kasvaja antigeeni fibroblastil, näiteks fibroblasti aktivatsiooni valk (FAP). FAP on 95 KDa suurune homodimeerne II tüüpi glükovalk, mida ekspresseeritakse kõrgel määral paljude tahkete kasvajate, sealhulgas mittepiiravalt kopsu-, rinna- ja pärasoole kartsinoomide strooma fibroblastides. (Vt näiteks Scanlan *et al.*, 1994; *Proc. Natl. Acad. USA*, 91: 5657–5661; Park *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274: 36 505 – 36 512; Rettig *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3110–3114; Garin-Chesa *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7235–7239). Antikehad, mis seovad immunospetsiifiliselt FAP-i, on tehnika tasemes tuntud ja käesoleva leiutisega hõlmatud, vt näiteks Wuest *et al.*, 2001, *Journal of Biotechnology*, 159–168; Mersmann *et al.*, 2001, *Int. J. Cancer*, 92: 240–248; patent US 6 455 677.

15

[0297] Hiljaaegu on IgE-de puhul täheldatud, et need vahendavad kasvaja kasvu ning IgE-suunatud vahetu ülitundlikkuse ja allergilise põletiku reaktsioonid on välja pakutud võimalike looduslike mehhanismidena, mis osalevad kasvajavastastes reaktsioonides (ülevaate saamiseks vt näiteks Mills *et al.*, 1992, *Am. Journal of Epidemiol.* 122: 66–74; Eriksson *et al.*, 1995, *Allergy* 50: 718–722). Üks hiljutine uuring on näidanud, et kasvajarakkude koormamine IgE-dega vähendab kasvaja kasvu, põhjustades osadel juhtudel kasvama äratõukamist. Nimetatud uuringu kohaselt on IgE-ga koormatud kasvajarakkudel terapeutiline potentsiaal ning lisaks annavad need pikaajalise kasvajavastase immuunsuse, sealhulgas kaasasündinud immuunsuse efektormehhanismi ja T-rakkude vahendatud adaptiivse immuunvastuse aktivatsiooni, vt Reali *et al.*, 2001, *Cancer Res.* 61: 5516–5522; mis on siin tervikuna viitega hõlmatud. Leiutisekohaseid antagonistlikke antikehi võib kasutada vähi ravimisel ja/või ennetamisel IgE-de manustamisega kombineeritult, et parandada IgE vahendatud vähiravi tõhusust. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, parandavad leiutisekohased antikehad kasvajate IgE-ga ravimise terapeutilist tõhusust, blokeerides inhibeeriva raja. Leiutisekohased antagonistlikud antikehad võivad parandada IgE vahendatud vähiravi terapeutilist tõhusust (i) kasvaja kasvu edasilükkamise parandamise teel; (ii) kasvaja progressiooni kiiruse vähendamise parandamise teel; (iii) kasvaja

äratõukamise parandamise teel; või (iv) kaitsva immuunsuse parandamise teel võrreldes vähi ravimisega üksnes IgE-d kasutades.

5 [0298] Vähiravimid ja nende annused, manustamisviisid ja soovituslik kasutamine on tehnika tasemes tuntud ja neid on kirjeldatud erialases kirjanduses, vt näiteks „Physician's Desk Reference” (56. väljaanne, 2002).

5.4.1.1. B-RAKULISED PAHALOOMULISED KASVAJAD

10 [0299] Samuti on kirjeldatud ravimeetodeid, mis hõlmavad FcγRIIB vastase antikeha manustamist loomale, eelistatult imetajale ja enam eelistatult inimesele, et B-rakulist pahaloomulist kasvajat või selle ühte või mitut sümptomit ennetada, ravida, kontrolli all hoida või paremaks muuta. Need ravimeetodid on praeguste ravimeetoditega võrreldes paremad. Teatavatel juhtudel võib praegustele ravimeetoditele raskesti alluvaid patsiente ravida leiutisekohaste meetoditega. Osades näidetes on ühe või mitme leiutisekohase
15 antikeha manustamisega tehtav ravi kombineeritud ühe või mitme teise ravimeetodi, näiteks mittepiiravalt keemiaravi, kiiritusravi, hormoonravi ja/või bioloogilise ravi / immuunravi manustamisega.

20 [0300] Samuti on kirjeldatud raviprotokolle, mis pakuvad paremaid profülaktilisi ja terapeutilisi profiile kui praegused ühel toimeainel põhinevad ravimeetodid või kombineeritud ravimeetodid B-rakulise pahaloomulise kasvaja või selle ühe või mitme sümptomi ravimiseks. Pakutakse FcγRIIB vastasel antikehal põhinevaid ravimeetodeid B-rakulise pahaloomulise kasvaja või selle ühe või mitme sümptomi ennetamiseks, ravimiseks, kontrolli all hoidmiseks või paremaks muutmiseks. Eelkõige pakutakse
25 profülaktilisi ja terapeutilisi protokolle B-rakulise pahaloomulise kasvaja või selle ühe või mitme sümptomi ennetamiseks, ravimiseks, kontrolli all hoidmiseks või paremaks muutmiseks, mis hõlmavad FcγRIIB-spetsiifilise antikeha, selle analoogi, derivaadi või antigeeni fragmendi manustamist seda vajavale ravialusele.

30 [0301] Leiutisekohased agonistlikud antikehad on kasulikud mis tahes B-rakuliste pahaloomuliste kasvajate, eelkõige mitte-Hodgkini lümfoomi ja kroonilise lümfotsütaarse

leukeemia ravimiseks või ennetamiseks. Teiste B-rakuliste pahaloomuliste kasvajate hulka kuuluvad väikeserakuline lümfotsütaarne lümfoom, Burkitti lümfoom, mantelrakulised lümfoomid, difuussed väikeste lõhustatud rakkudega lümfoomid, enamik follikulaarseid lümfoome ja osad difuussed suurerakulised B-rakulised lümfoomid (DLBCL). FcγRIIB on kromosomaalse translokatsiooni deregulatsiooni märklaud 5 (DLBCL). lümfoomi, eelkõige B-rakulise mitte-Hodgkini lümfoomi korral (See Callanan M.B. *et al.*, 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(1): 309–314). Seega on leiutisekohased antikehad kasulikud mis tahes B-rakkude liini kuuluva kroonilise lümfotsütaarse leukeemia ravimiseks või ennetamiseks. B-rakkude liini kuuluva 10 kroonilise lümfotsütaarse leukeemia kohta on ülevaate teinud Freedman (ülevaadet vt Freedman, 1990, *Hemtaol. Oncol. Clin. North Am.* 4: 405). Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, inhibeerivad või ennetavad leiutisekohased agonistlikud antikehad B-rakulisi pahaloomulisi kasvajaid, inhibeerides B-rakkude proliferatsiooni ja/või aktivatsiooni. Samuti on kirjeldatud leiutisekohaste 15 agonistlike antikehade kasutamist teiste tehnika tasemes tuntud ravimeetoditega (näiteks keemiaravi ja kiiritusravi) kombineeritult B-rakuliste pahaloomuliste kasvajate ennetamiseks ja/või ravimiseks. Lisaks on kirjeldatud leiutisekohaste agonistlike antikehade kasutamist teiste tehnika tasemes tuntud antikehadega kombineeritult B-rakuliste pahaloomuliste kasvajate ravimiseks ja/või ennetamiseks. Näiteks võib 20 leiutisekohaseid agonistlikke antikehi kasutada C22 või CD19 vastaste antikehade, mille on avaldanud Goldenberg *et al.* (USA patent nr 6 306 393), CD20 vastaste antikehade, CD33 vastaste antikehade või CD52 vastaste antikehadega kombineeritult.

[0302] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada ka näiteks mittepiiravalt järgnevatega 25 kombineeritult: Oncoscint (märklaud: CEA), Verluma (märklaud: GP40), Proscint (märklaud: PSMA), CEA-SCAN (märklaud: CEA), Rituxin (märklaud: CD20), hertseptiin (märklaud: HER-2), Campath (märklaud: CD52), Mylotarge (märklaud: CD33), LymphoCide (CD22), Lymphocide Y-90 (CD22) ja Zevalin (märklaud: CD20).

5.4.2. AUTOIMMUUNHAIGUS JA PÕLETIKULISED HAIGUSED

[0303] Leiutisekohaseid agonistlikke antikehi võib kasutada autoimmuunhaiguste või põletikuliste haiguste ravimiseks või ennetamiseks. Kirjeldatud on ravialusel autoimmuun- või põletikulise häirega seotud ühe või mitme sümptomi ennetamise, ravimise või kontrolli all hoidmise meetodeid, mis hõlmavad nimetatud ravialusele terapeutiliselt efektiivses koguses leiutisekohaste antikehade või nende fragmentide manustamist. Samuti pakutakse ravialusel põletikulise häirega seotud ühe või mitme sümptomi ennetamise, ravimise või kontrolli all hoidmise meetodeid, mis hõlmavad lisaks nimetatud ravialusele terapeutiliselt efektiivses koguses ühe või mitme põletikuvastase aine manustamist. Lisaks pakutakse autoimmuunhaigusega seotud ühe või mitme sümptomi ennetamise, ravimise või kontrolli all hoidmise meetodeid, mis hõlmavad lisaks nimetatud ravialusele terapeutiliselt efektiivses koguses ühe või mitme immunomoduleeriva aine manustamist. Jaos 5.4.5 pakutakse põletikuvastaste ainete ja immunomoduleerivate ainete mittepiiravaid näiteid.

15

[0304] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada ka mis tahes tehnika tasemes tuntud antikehadega kombineeritult autoimmuunhaiguse või põletikulise haiguse ravimiseks ja/või ennetamiseks. Antikehade või Fc liitvalkude mittepiirav näide, mida kasutatakse põletikuliste häirete ravimiseks või ennetamiseks, on välja toodud tabelis 6A, ja antikehade või Fc liitvalkude mittepiirav näide, mida kasutatakse autoimmuunhäire ravimiseks või ennetamiseks, on välja toodud tabelis 6B. Leiutisekohased antikehad võivad näiteks parandada tabelites 6A ja 6B välja toodud terapeutiliste antikehade või Fc liitvalkudega ravimise tõhusust. Näiteks võivad leiutisekohased antikehad parandada immuunvastust ravialusel, keda ravitakse mis tahes tabelites 6A või 6B välja toodud antikehade või Fc liitvalkudega.

25

[0305] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada ka näiteks mittepiiravalt Orthoclone OKT3, ReoPro, Zenapax-i, Simulec-i, Rituximab-i, Synagis-e ja Remicade-iga kombineeritult.

30

[0306] Leiutisekohaseid antikehi võib samuti kasutada tsütosiini-guaaniini dinukleotiididel („CpG”) põhinevate produktidega kombineeritult, mis on välja töötatud (Coley

Pharmaceuticals) või mida töötatakse praegu välja kaasasündinud või omandatud immuunvastuste aktivaatoritena. Näiteks hõlmab leiutiskirjeldus CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals) kasutamist siin kirjeldatud meetodites ja kompositsioonides autoimmuun- või põletikuliste häirete ravimiseks ja/või ennetamiseks

5 (Weeratna *et al.*, 2001, *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 32(1): 65–71).

[0307] Autoimmuunhäirete näidete hulka, mida võib ravida leiutisekohaste antikehade manustamise teel, kuuluvad mittepiiravalt koldeline alopeetsia, anküloseeriv spondüliit, antifosfolipiidsündroom, autoimmuunne Addisoni tõbi, neerupealiste

10 autoimmuunhaigused, autoimmuunne hemolüütiline aneemia, autoimmuunne hepatiit, autoimmuunne munasarjapõletik ja munandipõletik, autoimmuunne trombotsütopeenia, Behceti tõbi, bulloosne pemfigoid, kardiomiopaatia, tsöliaakia-dermatiit, kroonilise väsimuse ja immuunsüsteemi häire sündroom (CFIDS), krooniline põletikuline demüeliniseeriv polüneuropaatia, Churg-Straussi sündroom, armistav pemfigoid,

15 CREST-i sündroom, külma aglutiniini tõbi, Crohni tõbi, diskoidne luupus, essentsiaalne segatüüpi krüoglobulineemia, fibromüalgia-fibromüosiit, glomerulonefriit, Gravesi tõbi, Guillain-Barre, Hashimoto türeoidiit, idiopaatiline kopsufibroos, idiopaatiline trombotsütopeeniline purpura (ITP), IgA neuropaatia, juveniilne artriit, lame lihhen, erütematoosluupus, Ménière'i tõbi, segatüüpi sidekoe haigus, hulgiskleroos, I tüüpi ehk

20 immuunsüsteemi vahendatud diabeet, generaliseerunud müasteenia, harilik villtõbi, pernitsiosne aneemia, nodoosne polüarteriit, polükondriit, polüglandulaarsed sündroomid, reumaatiline polümüalgia, polümüosiit ja dermatomüosiit, primaarne agammaglobulineemia, primaarne biliaarne tsirroos, psoriaas, psoriaatiline artriit, Raynaudi nähtus, Reiteri sündroom, reumatoidartriit, sarkoidoos, sklerodermia, Sjögreni

25 sündroom, jäiga inimese sündroom, süsteemne erütematoosluupus, erütematoosluupus, takayasu arteriit, temporaalarteriit / hiidrakuline arteriit, haavandiline koliit, uveiid, vaskuliidid, näiteks herpetiformne dermatiit, vaskuliit, vitiliigo ja Wegeneri granulomatoos. Põletikuliste häirete näidete hulka kuuluvad mittepiiravalt astma, entsefaliit, põletikuline soolehaigus, krooniline obstruktiivne kopsuhaigus (COPD),

30 allergilised häired, septiline šokk, kopsufibroos, mittediferentseerunud spondüloartropaatia, mittediferentseerunud artropaatia, artriit, põletikuline osteolüüs ja krooniliste viirus- või bakteriaalsete infektsioonide tagajärjel tekkinud krooniline põletik. Jaos 3.1 kirjeldatu kohaselt on osad autoimmuunhäired seotud põletikulise

- haigusseisundiga. Seega esineb autoimmuunhäirete ja põletikuliste häirete osas teatud kattumisi. Sellest tulenevalt võib teatud autoimmuunhaigusi iseloomustada põletikuliste häiretena. Põletikuliste häirete näidete hulka, mida saab ennetada, ravida või kontrolli all hoida leiutisekohaste meetodite kohaselt, kuuluvad mittepiiravalt astma, entsefaliit,
- 5 põletikuline soolehaigus, krooniline obstruktiivne kopsuhaigus (COPD), allergilised häired, septiline šokk, kopsufibroos, mittediferentseerunud spondüloartropaatia, mittediferentseerunud artropaatia, artriit, põletikuline osteolüüs ja krooniliste viirus- või bakteriaalsete infektsioonide tagajärjel tekkinud krooniline põletik.
- 10 **[0308]** Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada autoimmuunhaiguse ravimiseks, mida esineb valdavalt ühel sool. Näiteks on Gravesi tõve ülekaalukat esinemist naistel seostatud Fc γ RIIB2 ekspressiooniga (vt Estienne *et al.*, 2002, *FASEB J.* 16: 1087–1092).
- [0309]** Leiutisekohaseid antikehi võib samuti kasutada põletikuliste häirete all
- 15 kannatavatel loomadel, eelkõige imetajatel esineva põletiku vähendamiseks. Ühes konkreetses näites vähendab antikeha loomal põletikku vähemalt 99%, vähemalt 95%, vähemalt 90%, vähemalt 85%, vähemalt 80%, vähemalt 75%, vähemalt 70%, vähemalt 60%, vähemalt 50%, vähemalt 45%, vähemalt 40%, vähemalt 45%, vähemalt 35%, vähemalt 30%, vähemalt 25%, vähemalt 20% või vähemalt 10% võrreldes põletiku
- 20 ulatusega loomal, kellele ei ole nimetatud antikeha manustatud. Ühes teises näites vähendab antikehade kombinatsioon loomal põletikku vähemalt 99%, vähemalt 95%, vähemalt 90%, vähemalt 85%, vähemalt 80%, vähemalt 75%, vähemalt 70%, vähemalt 60%, vähemalt 50%, vähemalt 45%, vähemalt 40%, vähemalt 45%, vähemalt 35%, vähemalt 30%, vähemalt 25%, vähemalt 20% või vähemalt 10% võrreldes põletiku
- 25 ulatusega loomal, kellele ei ole nimetatud antikehi manustatud.

Tabel 6A. Põletikuliste haiguste ja autoimmuunhaiguste ravimiseks sobivad antikehad, mida võib kasutada leiutisekohaste antikehadega kombineeritult

Antikeha nimetus	Märklaud-antigeen	Produkti tüüp	Isotüüp	Sponsorid	Näidustus
5G1.1	Komplement (C5)	Humani-seeritud	IgG	Alexion Pharm Inc	Reumatoidartriit
5G1.1	Komplement (C5)	Humani-seeritud	IgG	Alexion Pharm Inc	SLE
5G1.1	Komplement (C5)	Humani-seeritud	IgG	Alexion Pharm Inc	Nefriit
5G1.1-SC	Komplement (C5)	Humani-seeritud	ScFv	Alexion Pharm Inc	Tehisvereringe
5G1.1-SC	Komplement (C5)	Humani-seeritud	ScFv	Alexion Pharm Inc	Südameinfarkt
5G1.1-SC	Komplement (C5)	Humani-seeritud	ScFv	Alexion Pharm Inc	Angioplastika
ABX-CBL	CBL	Inimese		Abgenix Inc	GvHD
ABX-CBL	CD 147	Hiire	IgG	Abgenix Inc	Siiriku äratõukereaktsioon
ABX-IL8	IL-8	Inimese	IgG2	Abgenix Inc	Psoriaas
Antegren	VLA-4	Humani-seeritud	IgG	Athena/Elan	Hulgiskleroos
CD 11a vastane antikeha	CD11a	Humani-seeritud	IgG1	Genentech Inc/Xoma	Psoriaas
CD18 vastane antikeha	CD18	Humani-seeritud	Fab'2	Genentech Inc	Südameinfarkt

Antikeha nimetus	Märklaud-antigeen	Produkti tüüp	Isotüüp	Sponsorid	Näidustus
LFA1 vastane antikeha	CD18	Hiire	Fab'2	Pasteur-Merieux/ Immunotech	Siiriku äratõukereaktsioon
Antova	CD40L	Humaniseeritud	IgG	Biogen	Siiriku äratõukereaktsioon
Antova	CD40L	Humani-seeritud	IgG	Biogen	SLE
BTI-322	CD2	Roti	IgG	Medimmune Inc	GvHD, psoriaas
CDP571	TNF-alfa	Humani-seeritud	IgG4	Celltech	Crohni tõbi
CDP571	TNF-alfa	Humani-seeritud	IgG4	Celltech	Reumatoidartriit
CDP850 Corsevin M	E-selektiini faktor VII	Humani-seeritud kimäärne		Celltech Centocor	Psoriaasi antikoagulant
D2E7	TNF-alfa	Inimese		CAT/BASF	Reumatoidartriit
Hu23F2G	CD11/18	Humani-seeritud		ICOS Pharm Inc	Hulgiskleroos
Hu23F2G	CD11/18	Humani-seeritud	IgG	ICOS Pharm Inc	Insult
IC14	CD14			ICOS Pharm Inc	Toksiline šokk
ICM3	ICAM-3	Humani-seeritud		ICOS Pharm Inc	Psoriaas
IDEC-114	CD80	Primati-seeritud		IDEC Pharm/Mitsubishi	Psoriaas

Antikeha nimetus	Märklaud-antigeen	Produkti tüüp	Isotüüp	Sponsorid	Näidustus
IDEC-131	CD40L	Humani-seeritud		IDEC Pharm/Eisai	SLE
IDEC-131	CD40L	Humani-seeritud		IDEC Pharm/Eisai	Hulgiskleroos
IDEC-151 IDEC-152	CD4 CD23	Primati-seeritud	IgG 1	IDEC Pharm/Glaxo SmithKline IDEC Pharm	Reumatoidartriit, astma / allergia
Infliksimaab	TNF-alfa	Kimäärne	IgG 1	Centocor	Reumatoidartriit
Infliksimaab	TNF-alfa	Kimäärne	IgG 1	Centocor	Crohni tõbi
LDP-01	Beeta 2-integriin	Humani-seeritud	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Insult
LDP-01	Beeta 2-integriin	Humani-seeritud	IgG	Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Siiriku äratõukereaktsioon
LDP-02	Alfa-4 beeta-7	Humani-seeritud		Millennium Inc (LeukoSite Inc.)	Haavandiline koliit
MAK-195F	TNF-alfa	Hiire	Fab'2	Knoll Pharm, BASF	Toksiline šokk
MDX-33	CD64 (FcR)	Inimese		Medarex/Centeon	Autoimmuused hematoloogilised häired
MDX-CD4	CD4	Inimese	IgG	Medarex/Eisai / Genmab	Reumatoidartriit
MEDI-507	CD2	Humani-seeritud		Medimmune Inc	Psoriaas

Antikeha nimetus	Märklaud-antigeen	Produkti tüüp	Isotüüp	Sponsorid	Näidustus
MEDI-507	CD2	Humani-seeritud		Medimmune Inc	GvHD
OKT4A	CD4	Humani-seeritud	IgG	Ortho Biotech	Siiriku äratõukereaktsioon
Ortokloon OKT4A	CD4	Humani-seeritud	IgG	Ortho Biotech	Autoimmuunhaigus
Ortokloon / CD3 vastane OKT3	CD3	Hiire	mIgG2a	Ortho Biotech	Siiriku äratõukereaktsioon
RepPro / abtsiksimaab	gpIIbIIIa	Kimäärne	Fab	Centocor / Lilly	Koronaarse angioplastika tüsistused
rhuMab-E25	IgE	Humani-seeritud	IgG 1	Genentech / Novartis / Tanox Biosystems	Astma / allergia
SB-240563	IL5	Humani-seeritud		GlaxoSmithKline	Astma / allergia
SB-240683	IL-4	Humani-seeritud		GlaxoSmithKline	Astma / allergia
SCH55700	IL-5	Humani-seeritud		Celltech / Schering	Astma / allergia
Simulect	CD25	Kimäärne	IgG 1	Novartis Pharm	Siiriku äratõukereaktsioon
SMART a-CD3	CD3	Humani-seeritud		Protein Design Lab	Autoimmuunhaigus
SMART a-CD3	CD3	Humani-seeritud		Protein Design Lab	Siiriku äratõukereaktsioon

Antikeha nimetus	Märklaud-antigeen	Produkti tüüp	Isotüüp	Sponsorid	Näidustus
SMART a-CD3	CD3	Humani-seeritud	IgG	Protein Design Lab	Psoriaas
Zenapax	CD25	Humani-seeritud	IgG 1	Protein Design Lab / Hoffman-La Roche	Siiriku äratõukereaktsioon

Tabel 6B. Antikehad ja Fc liitvalgud autoimmuunhäirete korral

Antikeha	Näidustus	Märklaud-antigeen
ABX-RB2		Antikeha CBL antigeeni suhtes T-rakkudel, B-rakkudel ja NL-rakkudel; täielikult inimese antikeha Xenomouse hiirtelt
IL1-ra	Reumatoidartriit	Rekombinantne põletikuvastane valk
sTNF-RI	Krooniline põletikuline haigus, reumatoidartriit	Lahustuv kasvaja nekroosifaktor a - I tüüpi retseptor, blokeerib TNF-i toimet
5c8 (CD-40 ligandi vastane antikeha)	II faasi uuringud peatati 1999. aasta oktoobris, et uurida „kahjulikke mõjusid”	CD-40
IDEC 131	Süsteemne erütematoosluupus (SLE)	Humaniseeritud CD40-vastane antikeha
IDEC 151	Reumatoidartriit	Primatiseeritud; CD4 vastane antikeha
IDEC 152	Astma	Primatiseeritud; CD23 vastane antikeha
IDEC 114	Psoriaas	Primatiseeritud; CD80 vastane antikeha
MEDI-507	Reumatoidartriit; hulgiskleroos; Crohni tõbi; psoriaas	CD2 vastane antikeha

Antikeha	Näidustus	Märklaud-antigeen
LDP-02 (b7 vastane monoklonaalne antikeha)	Põletikuline soolehaigus, Crohni tõbi, haavandiline koliit	a4b7 integriini retseptor valgetel vererakkudel (leukotsüütidel)
SMART gamma-interferooni vastane antikeha	Autoimmuunhäired	Gamma-interferooni vastane antikeha
Verteporfiin	Reumatoidartriit	
Talomiid (talidomiid)	Leepira - turul heakskiidetud, Crohni tõbi, reumatoidartriit	Kasvaja nekroosifaktor-alfa (TNF-alfa) inhibiitor
SelCID-d (selektiivsed tsütokiini inhibeerivad ravimid)		Äärmiselt spetsiifilised fosfodiesteraasi 4. tüüpi ensüümi (PDE-4) inhibiitorid, suurendavad cAMP-i (tsüklilise adenosinmonofosfaadi) tasemeid, aktiveerivad valgukinaas-A-d (PKA), blokeerivad transkriptsioonifaktorit NK-kB, ennetavad TNF-a geeni transkriptsiooni
		Vähendavad TNF-a tootmist
IMiD-id (immunomoduleerivad ravimid)	Üldised autoimmuunhäired	Talidomiidi struktuurilised analoogid, inhibeerivad TNF-a-d
MDX-33	Autoimmuunreaktsiooni-destingitud verehäired, idio-paatiline trombotsütopeeniline purpura (ITP),	FcRI retseptorite vastane monoklonaalne antikeha

Antikeha	Näidustus	Märklaud-antigeen
	autoimmuunne hemolüütiline aneemia	
MDX-CD4	Ravib reumatoidartriiti ja teisi autoimmuunhäireid	CD4 retseptori molekuli vastane monoklonaalne antikeha
VX-497	Autoimmuunhäired, hulgiskleroos, reumatoidartriit, põletikuline soolehaigus, luupus, psoriaas	Inosiinmonofosfaadi dehüdrogenaasi inhibiitor (ensüüm, mida on vaja uue RNA ja DNA valmistamiseks, kasutatakse nukleotiidide tootmisel, vajalik lümfotsüütide proliferatsiooni jaoks)
VX-740	Reumatoidartriit	ICE interleukiin-1 beeta inhibiitor (teisendav ensüüm, kontrollib radasid, mis põhjustavad agressiivset immuunreaktsiooni, reguleerib tsütokiine)
VX-745	Spetsiifiline põletiku suhtes, mis osaleb immuunreaktsiooni avaldumise ja põletiku progressiooni keemilises signaliseerimises	P38MAP kinaasi mitogeeni aktiveeritud valgukinaasi inhibiitor
Enbrel (etanertsept)		Suunatud TNF-ile (kasvaja nekroosifaktor)
IL-8		IL-8 (interleukiin-8) vastane täielikult inimese monoklonaalne antikeha (blokeerib IL-8-t, blokeerib põletikulist reaktsiooni)
5G1.1	Reumatoidartriit, pemfigoid (ohtlik nahalööve), psoriaas, luupus	C5 komplemendi inhibiitor
Apogeen MP4		Rekombinantne antigeen, mis hävitab selektiivselt T-rakkudega seotud haigust,

Antikeha	Näidustus	Märklaud-antigeen
		kutsub esile T-rakkude apoptoosi, kõrvaldatakse programmeeritud rakusurma abil, ei ründa enam organismi enda rakke, spetsiifilised apogeenid on suunatud spetsiifilistele T-rakkudele

5.4.3. ALLERGIA

- [0310] Kirjeldatud on seda vajaval ravialusel IgE vahendatud ja/või Fc γ RI vahendatud allergilise häire ravimise või ennetamise meetodeid, mis hõlmavad nimetatud ravialusele terapeutiliselt efektiivses koguses leiutisekohaste agonistlike antikehade või nende fragmentide manustamist. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, on leiutisekohased antikehad kasulikud Fc ϵ RI esile kutsutud nuumrakkude aktivatsiooni inhibeerimisel, mis aitab kaasa ägeda ja hilises faasis allergiliste reaktsioonide tekkele (Metcalf D. *et al.*, 1997, *Physiol. Rev.* 77: 1033). Eelistatult on leiutisekohastel agonistlikel antikehadel parem terapeutiline tõhusus ja/või vähem kõrvalmõjusid võrreldes tavapäraste meetoditega, mida tehnika tasemes kasutatakse IgE vahendatud allergiliste häirete ravimiseks ja/või ennetamiseks. IgE vahendatud allergiliste häirete ravimiseks ja/või ennetamiseks kasutatavate tavapäraste meetodite hulka kuuluvad mittepiiravalt põletikuvastased ravimid (näiteks suukaudsed või inhaleeritavad kortikosteroidid astma korral), antihistamiinid (näiteks allergilise nohu ja atoopilise dermatiidi korral), tsüsteinüüleukotrieenid (näiteks astma ravimiseks); IgE vastased antikehad; ja spetsiifiline immuunravi või desensitiseerimine.
- [0311] IgE vahendatud allergiliste reaktsioonide näidete hulka kuuluvad mittepiiravalt astma, allergiline nohu, seedetrakti allergiad, eosinofiilia, konjunktiviit, atoopiline dermatiit, urtikaaria, anafülaksia või glomerulonefriit.

[0312] Samuti on kirjeldatud molekule, näiteks immunoglobuliine, mida on konstrueeritud moodustamaks komplekse Fc γ RI ja inimese Fc γ RIIB-ga, st seovad spetsiifiliselt Fc γ RI-d ja inimese Fc γ RIIB-d. Eelistatult on sellistel molekulidel terapeutiline tõhusus IgE ja Fc γ RI vahendatud häirete korral. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, on nende konstrueeritud molekulide terapeutiline tõhusus osaliselt tingitud nende võimest inhibeerida nuumrakkude ja basofiilide funktsiooni.

[0313] Molekulid, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RI-d ja inimese Fc γ RIIB-d, võivad olla kimäärsed liitvalgud, mis sisaldavad sidumissaiti Fc γ RI jaoks ja sidumissaiti Fc γ RIIB jaoks. Sellised molekulid võivad olla konstrueeritud valdkonna asjatundjale tuntud standardsetele rekombinantse DNA metodoloogiate kohaselt. Eelistatult sisaldab leiutiskirjelduse kohastes meetodites kasutamiseks sobiv kimäärne liitvalk leiutisekohase Fc γ RIIB vastase monoklonaalse antikeha F(ab') üksikut ahelat, mis on liidetud piirkonnaga, mida kasutatakse sillana huFc γ sidumiseks Fc γ RIIB vastase monoklonaalse antikeha F(ab') üksiku ahela C-terminaalse piirkonnaga. Üks näitlik kimäärne liitvalk, mis sobib kasutamiseks leiutiskirjelduse kohastes meetodites, sisaldab järgnevat: V_L/C_H (Fc γ RIIB) – liigendpiirkond – V_H/C_H (Fc γ RIIB) – LINKER – C_Hε2-C_Hε3-C_Hε4. Kimäärsete molekulide jaoks sobiv linker võib olla viie, kümne, eelistatult viieteistkümne aminohappe pikkune. Linkeri pikkus võib varieeruda, et pakkuda molekuli optimaalset sidumist nii Fc γ RIIB kui ka Fc γ RI-ga. Ühes konkreetses teostuses on linker 15 aminohappe pikkune linker, mis koosneb järjestusest:

(Gly₄Ser)₃. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, lihtsustab paindlik peptiidlinker ahela paardumist ja minimeerib võimalikku ümbervoltimist ning see võimaldab ka kimäärsel molekulil ulatuda kahe retseptorini, st Fc γ RIIB-ni ja Fc γ RI-ni rakkudel ja neid ristsiduda. Eelistatult kloonitakse kimäärne molekul imetaja ekspressioonivektorisse, näiteks pCI-neo, ühilduva promootori, näiteks tsütomegaloviiruse promootoriga. Leiutiskirjelduse kohaste meetodite kohaselt valmistatud liitvalk sisaldab sidumissaiti FcεRI (C_Hε2C_Hε3) ja Fc γ RIIB (V_L/C_L – liigendpiirkond – V_H/C_H) jaoks. Leiutisekohaste meetodite kohaselt valmistatud liitvalku kodeeriv nukleiinhape transfekteeritakse eelistatult 293

rakku ning eritatud valgu puhastamiseks kasutatakse tehnika tasemes tuntud tavapäraseid meetodeid.

[0314] Kimäärsete molekulide seondumist nii inimese FcεRI kui ka FcγRIIB-ga võib hinnata valdkonna asjatundjale tuntud FcγR-ga seondumise kindlaks määramiseks kasutatavaid tavapäraseid meetodeid kasutades. Eelistatult on leiutisekohastel kimäärsetel molekulidel terapeutiline tõhusus IgE vahendatud häirete ravimisel, näiteks antigeeni suunatud degranulatsiooni inhibeerimise ja rakkude aktivatsiooni inhibeerimise teel. Leiutisekohaste kimäärsete molekulide tõhusust IgE suunatud FcεRI vahendatud nuumrakkude degranulatsiooni blokeerimisel saab enne nende inimesetel kasutamist kindlaks määrata transgeensetel hiirtel, keda on töödeldud, et need ekspresseeriks inimese FcεRa-d ja inimese FcγRIIB-d.

[0315] Leiutiskirjeldusega esitatakse bispetsiifiliste antikehade kasutamine IgE vahendatud ja/või FcγRI vahendatud allergiliste häirete ravimiseks ja/või ennetamiseks. Bispetsiifiline antikeha (BsAb) seondub kahe erineva epitoobiga tavaliselt erinevatel antigeenidel. Bispetsiifilistel antikehadel on potentsiaalne kliiniline kasulikkus ja neid on kasutatud viiruste, viirusega nakatunud rakkude ja bakteriaalsete patogeenide sihtmärgistamiseks ning trombolüütiliste ainete vereklompidesse kohale toimetamiseks (Cao Y., 1998 *Bioconj. Chem* 9: 635–644; Koelemij *et al.*, 1999, *J. Immunother.*, 22, 514–524; Segal *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 11, 558–562). Tehnoloogia BsIgG ja teiste sarnaste bispetsiifiliste molekulide tootmiseks on kättesaadav (vt näiteks Carter *et al.*, 2001 *J. of Immunol. Methods*, 248, 7–15; Segal *et al.*, 2001, *J. of Immunol. Methods*, 248, 7–15). Leiutisega esitatakse bispetsiifilised antikehad, mis sisaldavad FcγRIIB vastase antikeha ühte F(ab') fragmenti ja kättesaadava huIgE vastase monoklonaalse antikeha ühte F(ab') fragmenti, mis agregeerib kahte retseptorit FcγRIIB-d ja FcεRI-d sama raku pinnal. Leiutiskirjelduse kohastes meetodites kasutamiseks sobivate bispetsiifiliste antikehade genereerimiseks võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud ja siin avaldatud metodoloogiat. Ühes konkreetses teostuses valmistatakse bispetsiifilisi antikehi FcγRIIB vastase antikeha ja huIgE vastase antikeha F(ab') fragmentide keemilise ristsidumise teel vastavalt varem kirjeldatule, vt näiteks Glennie *et al.*, 1995, „Tumor Immunobiology”, Oxford University press, Oxford, lk 225). F(ab') fragmente võib valmistada piiratud proteolüüsi teel pepsiiniga ja redutseerida merkaptotoetanoolamiiniga, et saada Fab'

fragmendid, millel on vabad liigendpiirkonna sulfhüdrüülrühmad (SH-rühmad). SH-rühm ühel Fab' (SH) fragmentidest võib olla alküülitud liiases koguses 0-fenüleendimaleimiidiga (0-PDM), et pakkuda vaba maleimiidrühma (mal). Fab'(mal) ja Fab'(SH) kaks preparaati võib kombineerida sobivas vahekorras, eelistatult 1 : 1, et genereerida heterodimeersed konstruktid. Bispetsiifilisi antikehi võib puhastada suuruseralduskromatograafia abil ja iseloomustada HPLC abil, kasutades valdkonna asjatundjale tuntud meetodeid.

[0316] Konkreetsemalt öeldes hõlmab leiutis bispetsiifilisi antikehi, mis sisaldavad esimest raske ahela ja kerge ahela paari, mis seob Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud raske ahela ja kerge ahela paar seob Fc γ RIIA-d, ja teist raske ahela ja kerge ahela paari, mis seob IgE retseptorit, tingimusel, et nimetatud esimene raske ahela ja kerge ahela paar seob kõigepealt Fc γ RIIB-d. Leiutisekohaste bispetsiifiliste antikehade konstrueerimiseks võib kasutada tehnika tasemes tuntud standardseid tehnikaid, et tagada, et Fc γ RIIB-ga seondumine eelneb IgE retseptoriga seondumisele. Valdkonna asjatundjale on arusaadav, kuidas konstrueerida bispetsiifilisi antikehi, näiteks selliselt, et nimetatud bispetsiifilised antikehad seovad Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikehad seovad IgE retseptorit. Lisaks võib bispetsiifilisi antikehi konstrueerida tehnika tasemes tuntud tehnikate abil, nii et antikeha liigendpiirkonna suurust saab suurendada pikkuse osas, näiteks linkerite lisamise teel, et pakkuda bispetsiifilisi antikehi, millel on piisavalt paindlikkust, et siduda IgE retseptorit ja Fc γ RIIB retseptorit samal rakul.

[0317] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada ka teiste tehnika tasemes tuntud terapeutiliste antikehade või ravimitega kombineeritult IgE vahendatud allergiliste häirete ravimiseks või ennetamiseks. Näiteks võib leiutisekohaseid antikehi kasutada mis tahes alljärgnevatega kombineeritult: aselastiin, Astelin, beklometasoonpropionaadi inhalaator, Vanceril, beklometasoonpropionaadi ninainhalaator/-sprei, Vancenase, budesoniidi ninainhalaator/-sprei Beconase, tsetirisiin Rhinocort, kloorfeniramiin Zyrtec, pseudoefedriin, Deconamine, Sudafed, kromolüün, Nasalcrom, Intal, Opticrom, desloratadiin, Clarinex, feksofenadiin ja pseudoefedriin, Allegra-D, feksofenadiin, Allegra flunisoliidi ninasprei, flutikasoonpropionaadi ninainhalaator/-sprei Nasalide, Flonase flutikasoonpropionaadi suukaudne inhalaator, Flovent, hüdroksüsiin, Vistaril, Ataraxloratadine, pseudoefedriin, Claritin-D, loratadiin, Claritin, prednisoloon,

Prednisolone, suukaudne vedelik PEDIAPRED, prednisoon Medrol, Deltasone, vedel Predsalmeterol, triamtsinoloonatsetoniidi inhalaator Serevent, triamtsinoloonatsetoniidi ninainhalaator/-sprei Azmacort, Nasacort või NasacortAQ. Leutisekohaseid antikehi võib kasutada tsütosiini-guaniini dinukleotiididel („CpG”) põhinevate produktidega

5 kombineeritult, mis on välja töötatud (Coley Pharmaceuticals) või mida töötatakse praegu välja kaasasündinud või omandatud immuunvastuste aktivaatoritena. Näiteks on kirjeldatud CpG 7909, CpG 8916, CpG 8954 (Coley Pharmaceuticals) kasutamist leutiskirjelduse kohastes meetodites ja kompositsioonides IgE vahendatud allergiliste häirete ravimiseks ja/või ennetamiseks (vt ka Weeratna *et al.*, 2001, *FEMS Immunol Med*

10 *Microbiol.*, 32(1): 65–71).

[0318] Lisaks on kirjeldatud leutisekohaste antikehade kasutamist mis tahes tehnika tasemes tuntud allergiliste häirete ravimiseks kasutatavate terapeutiliste antikehadega kombineeritult, näiteks Xolair™ (omalisumaab; Genentech); rhuMAB-E25 (BioWorld

15 Today, 10. november 1998, lk 1; Genentech); CGP-51901 (IgE vastane humaniseeritud antikeha) jne.

[0319] Lisaks võib leutisekohaseid antikehi kasutada teiste tehnika tasemes tuntud allergiliste häirete ravimiseks kasutatavate kompositsioonidega kombineeritult.

20 Konkreetsed meetodid ja kompositsioonid on avaldanud Carson *et al.* (US 6 426 336; US 2002/0035109 A1; US 2002/0010343).

5.4.4. IMMUNOMODULEERIVAD AINED JA PÕLETIKUVASTASED AINED

[0320] Samuti on kirjeldatud autoimmuunhaiguste ja põletikuliste haiguste ravimise

25 meetodeid, mis hõlmavad käesoleva leiutise kohaste antikehade manustamist koos teiste raviainetega. Immunomoduleerivate ainete näidete hulka kuuluvad mittepiiravalt metotreksaat, ENBREL, REMICADE™, leflunomiid, tsüklofosfamiid, tsüklosporiin A ja makroliidi antibiootikumid (näiteks FK506 (takrolimus)), metüülprednisoloon (MP), kortikosteroidid, steroidid, mükofenolaatmofetiil, rapamütsiin (siroliimus), misoribiin,

30 deoksüspergualiin, brekinaar, malononitriloamiinid (näiteks leflunamiid), T-raku retseptori modulaatorid ja tsütokiini retseptori modulaatorid.

[0321] Põletikuvastased ained on näidanud edukust põletikuliste ja autoimmuunhäirete ravimisel ning on praegu tavalised ja standardsed ravimid selliste häirete korral. Leuitisekohastes meetodites võib kasutada mis tahes valdkonna asjatundjale hästi tuntud põletikuvastast ainet. Põletikuvastaste ainete mittepiiravate näidete hulka kuuluvad

5 mittesteroidsed põletikuvastased ravimid (MSPVR-id), steroidsed põletikuvastased ravimid, beeta-agonistid, antikolinergilised ained ja metüülksantiinid. MSPVR-ide näidete hulka kuuluvad mittepiiravalt aspiriin, ibuprofeen, tselekoksiib (CELEBREX™), diklofenak (VOLTAREN™), etodolak (LODINE™), fenoprofeen (NALFON™), indometatsiin (INDOCIN™), ketoralak (TORADOL™), oksaproosiin (DAYPRO™),

10 nabumentoon (RELAFEN™), sulindak (CLINORIL™), tolmentiin (TOLECTIN™), rofekoksiib (VIOXX™), naprokseen (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeen (ACTRON™) ja nabumetoon (RELAFEN™). Sellised MSPVR-id toimivad tsüklooksügenaasi ensüümi (näiteks COX-1 ja/või COX-2) inhibeerimise teel. Steroidsete põletikuvastaste ravimite näidete hulka kuuluvad mittepiiravalt glükokortikoidid,

15 deksametasoon (DECADRON™), kortisoon, hüdrokortisoon, prednisoon (DELTASONE™), prednisoloon, triamtsinoloon, asulfidiin ja eikosanoidid, näiteks prostaglandiinid, tromoksaanid ja leukotrieenid.

5.4.5. VÄHIVASTASED AINED JA TERAPEUTILISED ANTIKEHAD

20 [0322] Lisaks on avaldatud ühe või mitme angiogeneesi inhibiitori manustamine, mille hulka kuuluvad mittepiiravalt: angiostatiin (plasminogeeni fragment); angiogeneesivastane antitrombiin III; angiosüüm; ABT-627; Bay 12-9566; benefiin; bevatsisumaab; BMS-275291; kõhrest saadud inhibiitor (CDI); CAI; CD59 komplemendi fragment; CEP-7055; Col 3; kombretastatiin A-4; endostatiin (kollageen XVIII fragment);

25 EGFr-i blokaatorid/inhibiitorid (Iressa®, Tarceva®, Erbitux® ja ABX-EGF); fibronektiini fragment; Gro-beeta; halofunginoon; heparinaasid; hepariinheksasahhariidi fragment; HMV833; inimese koorioni gonadotropiin (hCG); IM-862; interferoon-alfa / -beeta / -gamma; interferooni poolt indutseeritav valk (IP-10); interleukiin-12; kringle 5 (plasminogeeni fragment); marimastaat; metalloproteinaasi inhibiitorid (TIMP-id); 2-

30 metoksüöstradiool; MMI 270 (CGS 27023A); MoAb IMC-1C11; neovastaat; NM-3; panseem; PI-88; platsenta ribonukleaasi inhibiitor; plasminogeeni aktivaatori inhibiitor;

trombotsüüdi faktor-4 (PF4); prinomastaat; prolaktiini 16 kDa fragment; proliferiini sarnane valk (PRP); PTK 787/ZK 222594; retinoidid; solimastaat; skvalamiin; SS 3304; SU 5416; SU6668; SU11248; tetrahüdrokortisool-S; tetratiomolüüdaat; talidomiid; trombospondiin-1 (TSP-1); TNP-470; transformeeriv kasvufaktor-beeta (TGF- β);
 5 vaskulostatiin; vasostatiin (kalretikuliini fragment); ZD6126; ZD 6474; farnesüültransferaasi inhibiitorid (FTI); ja bifosfonaadid.

[0323] Vähivastaste ainete hulka, mida võib kasutada leiutisekohaste antikehadega kombineeritult erinevatel leiutiskirjelduse kohastel juhtudel, sealhulgas leiutiskirjelduse
 10 kohastes farmatseutilistes kompositsioonides ja ravimvormides ning komplektides, kuuluvad mittepiiravalt: atsivitsiin; akklarubitsiin; akodasooli vesinikkloriid; akroniin; adoselesiin; aldesleukiin; altretamiin; ambomütsiin; ametantroonatsetaat; aminoglutetimiid; amsakriin; anastrosool; antramütsiin; asparaginaas; asperliin; asatsitidiin; asetepa; asotomütsiin; batimastaat; bensotepa; bikalutamiid; bisantreeni
 15 vesinikkloriid; bisnafiid-dimesülaad; biselesiin; bleomütsiinsulfaat; brekvinaarnaatrium; bropirimiin; busulfaan; kaktinomütsiin; kalusteroon; karatsemiid; karbetimeer; karboplatiin; karmustiin; karubitsiini vesinikkloriid; karselesiin; tsedefingool; kloorambutsiil; tsiroleümütsiin; tsiplatiin; kladrubiin; krisnatoolmesülaad; tsüklofosfamiid; tsütarabiin; dakarbasiin; daktinomütsiin; daunorubitsiini vesinikkloriid; detsitabiin;
 20 deksormaplatiin; desaguaniin; desaguaniinmesülaad; diasikuoon; dotsetakseel; doksorubitsiin; doksorubitsiini vesinikkloriid; droloksifeen; droloksifeentsitraat; dromostanoloopropionaat; duasomütsiin; edatreksaat; eflomitiini vesinikkloriid; elsamitrutsiin; enloplatiin; enpromaat; epiropidiin; epirubitsiini vesinikkloriid; erbulosool; esorubitsiini vesinikkloriid; estramustiin; estramustiini fosfaatnaatrium;
 25 etanidasool; etoposiid; etoposiidfosfaat; etopriin; fadrosooli vesinikkloriid; fasarabiin; fenretidiin; floksuridiin; fludarabiinfosfaat; fluorouratsiil; flurotsitabiin; foskidoon; fostrietsiinnaatrium; gemtsitabiin; gemtsitabiini vesinikkloriid; hüdroksüürea; idarubitsiini vesinikkloriid; ifosfamiid; ilmofoosiin; interleukiin II (sealhulgas rekombinantne interleukiin II ehk rIL2); interferoon alfa-2a; interferoon alfa-2b;
 30 interferoon alfa-n1; interferoon alfa-n3; interferoon beeta-I a; interferoon gamma-I b; iproplatiin; irinotekaani vesinikkloriid; lanreotiidatsetaat; letrosool; leuproliidatsetaat; lisarosooli vesinikkloriid; lometekstroolnaatrium; lomustiin; losoksantroni vesinikkloriid; masoprokool; maitansiin; meklooretamiini vesinikkloriid;

megestroolatsetaat; melengestroolatsetaat; melfalaan; menogariil; merkaptopuriin; metotreksaat; metotreksaatnaatrium; metopriin; meturedepa; mitindomiid; mitokartsiin; mitokromiin; mitogillin; mitomaltsiin; mitomütsiin; mitospeer; mitotaan; mitoksantrooni vesinikkloriid; mükofenoolhape; nokodasool; nogalamütsiin; ormaplatiin; oksisuraan;

5 paklitakseel; pegaspargaas; peliomütsiin; pentamustiin; peplomütsiinsulfaat; perfosfamiid; pipobromaan; piposulfaan; piroksantrooni vesinikkloriid; plikamütsiin; plomestaan; porfimeernaatrium; porfiromütsiin; prednimustiin; prokarbasiini vesinikkloriid; puromütsiin; puromütsiini vesinikkloriid; pürasofuriin; ribopriin; rogletimiid; safingool; safingooli vesinikkloriid; semustiin; simtraseen;

10 sparfosaatnaatrium; sparsomütsiin; spirogermaaniumi vesinikkloriid; spiromustiin; spiroplatiin; streptonigrin; streptosotsiin; sulofenuur; talisomütsiin; tekogalaannaatrium; tegafuur; teloksantrooni vesinikkloriid; temoporfiin; teniposiid; teroksiroon; testolaktoon; tiamipriin; tioguaaniin; tiotepa; tiasofuriin; tirapasamiin; toremifeentsitraat; trestoloonatsetaat; tritsiribiinfosfaat; trimetreksaat; trimetreksaadi glukuronaat;

15 triptoreliin; tubulosooli vesinikkloriid; uratsüülsinep; uredepa; vapreotiid; verteporfiin; vinblastiinsulfaat; vinkristiinsulfaat; vindesiin; vindesiinsulfaat; vinepidiinsulfaat; vinglütsinaatsulfaat; vinleurosiinsulfaat; vinorelbiintartraat; vinrosidiinsulfaat; vinsolidiinsulfaat; vorosool; seniplatiin; sinostatiin; sorubitsiini vesinikkloriid. Teiste vähivastaste ravimite hulka kuuluvad mittepiiravalt: 20-epi-1,25 dihidroksüvitamiin D3;

20 5-etünüüluratsüül; abirateroon; aklarubitsiin; atsüülfulveen; adetsüpenool; adoselesiin; aldesleukiin; ALL-TK antagonistid; altretamiin; ambamustiin; amidoks; amifostiin; aminolevuliinhape; amrubitsiin; amsakriin; anagreliid; anastrosool; andrografoliid; angiogeneesi inhibiitorid; antagonist D; antagonist G; antareliks; antidorsaliseeriv morfogeneetiline valk 1; antiandrogeen, eesnäärme kartsinoom; antiöstrogeen;

25 antineoplastoon; antisenss-oligonukleotiidid; afidikoliini glütsinaat; apoptoosigeeni modulaatorid; apoptoosi regulaatorid; apuriinhape; ara-CDP-DL-PTBA; arginiindeaminaas; asulakriin; atamestaan; atrimustiin; aksinastatiin 1; aksinastatiin 2; aksinastatiin 3; asasetroon; asatoksiin; asatürosiin; bakatiini III derivaadid; balanool; batimastaat; BCR/ABL antagonistid; bensokloriinid; bensoüülstaurosporiin; β -laktaami

30 derivaadid; β -aletiin; beetaklamütsiin B; betuliinhape; bFGF inhibiitor; bikalutamiid; bisantreen; bisasiridinüülspermiin; bisnafiid; bistrateen A; biselesiin; breflaat; bropirimiin; budotitaan; butioniinsulfoksimiin; kaltsipotriool; kalfostiin C; kamptotetsiini derivaadid; kanaripoks IL-2; kapetsitabiin; karboksamiidaminotriasool;

karboksüamidotriasool; CaRest M3; CARN 700; kõhrest saadud inhibiitor; karselesiin; kaseiinkinaasi inhibiitorid (ICOS); kastanospermiin; tsekropiin B; tsetroreliks; kloriinid; klorokiinoksaliinsulfonamiid; tsikaprost; *cis*-porfüriin; kladriibiin; klomifeeni analoogid; klotrimasool; kollismütsiin A; kollismütsiin B; kombretastatiin A4; kombretastatiini analoog; konageniin; krambestidiin 816; krisnatool; krüptofütsiin 8; krüptofütsiin A derivaadid; kuratsiin A; tsüklopentaantrakinoonid; tsükloplataam; tsüpemütsiin; tsütarabiini okfosfaat; tsütolüütiline faktor; tsütostatiin; dakliksimaab; detsitabiin; dehüdrodidemniin B; desloreliin; deksametasoon; deksifosfamiid; deksrasoksaan; deksverapamiil; diasikoon; didemniin B; didoks; dietüülnorspermiin; dihüdro-5-asatsütidiin; 9-dihüdrotaksool; dioksamütsiin; difenüülspiromustiin; dotsetakseel; dokosanool; dolasetroon; doksifluridiin; droloksifeen; dronabinoool; duokarmütsiin SA; ebseleen; ekomustiin; edelfosiin; edrekolomaab; eflornitiin; elemeen; emitefuur; epirubitsiin; epristeriid; estramustiini analoog; östrogeeni agonistid; östrogeeni antagonistid; etanidasool; etoposiidfosfaat; eksemestaan; fadrosool; fasarabiin; fenretiniid; filgrastiim; finasteriid; flavopiridool; fleselastiin; fluasteroon; fludarabiin; fluorodaunorubitsiini vesinikkloriid; forfenimeks; formestaan; fostrietsiin; fotemustiin; gadoliiniumi teksafüriin; galliumnitraat; galotsitabiin; ganireliks; želatinaasi inhibiitorid; gemtsitabiin; glutatiooni inhibiitorid; hepsulfaam; hereguliin; heksametüleenbisatsetamiid; hüperitsiin; ibandroonhape; idarubitsiin; idoksifeen; idramantoon; ilmofosiin; ilomastaat; imidasoakridoonid; imikvimood; immunostimulantpeptiidid; insuliinitalise kasvufaktori-1 retseptori inhibiitor, interferooni agonistid; interferoonid; interleukiinid; jobenguaan; jododoksoorubitsiin; 4-ipomeanool; iroplakt; irsogladiin; isobengasool; isohomohalikondriin B; itasetroon; jasplakinoliid; kahalaliid F; lamellariin-N triatsetaat; lanreotiid; leinamütsiin; lenograstiim; lentinaansulfaat; leptolstatiin; leutrosool; leukeemiat inhibeeriv faktor; leukotsüüdi alfa-inferoon; lineaarse polüamiidi analoog; lipofiilne disahhariidi peptiid; lipofiilsed plaatina ühendid; lissoklinamiid 7; lobaplatiin; lombritsiin; lometreksool; lonidamiin; losoksantroon; lovastatiin; loksoribiin; lurtotekaan; luteetsiumteksafüriin; lüsofülliin; lüütilised peptiidid; maitansiin; mannostatiin A; marimastaat; masoprokool; maspiin; matrilüsiini inhibiitorid; matriksmetalloproteinaasi inhibiitorid; menogariil; merbaroon; metereliin; metioninaas; metoklopramiid; MIF inhibiitor; mifepristoon; miltefosiin; mirimostiim; kattumatu kahekiuline RNA; mitoguasoon; mitolaktool; mitomütsiini analoogid; mitonafiid; fibroblasti kasvufaktori mitotoksiin - saporin;

mitoksantroon; mofaroteen; molgramostiim; inimese korioonilise gonadotrofiini monoklonaalne antikeha; monofosforüüllipiid A + müobakteriaalne rakuseina sk; mopidamool; mitme ravimi suhtes resistentse geeni inhibiitor; mitme tuumori supressant-1 põhinev ravi; sinepi vähivastane toimeaine; mükaperoksiid B; mükobakteriaalne rakuseina ekstrakt; müriaporoon; N-atsetüüldinaliin; N-asendatud bensamiidid; nafareliin; 5 nagrestip; naloksoon+pentasotsiin; napaviin; nafterpiin; nartograstiim; nedaplatiin; nemorubitsiin; neridroonhape; neutraalne endopeptidaas; nilutamiid; nizamütsiin; lämmastikoksiidi modulaatorid; lämmastikoksiidi antioksidant; nitrüllüün; O6-bensüülguaniin; oktreotiid; okitsenoon; oligonukleotiidid; onapristoon; ondansetron; 10 ondansetron; oratsiin; suukaudne tsütokiini indutseerija; ormaplatiin; osateroon; oksaliplatiin; oksaunomütsiin; paklitakseel; paklitakseeli analoogid; paklitakseeli derivaadid; palauamiin; palmitoüülrisoksiin; pamidroonhape; panaksütriool; panomifeen; parabaktiin; paselliptiin; pegaspargaas; peldesiin; pentosaani polüsulfaatnaatrium; pentostatiin; pentosool; perflubroon; perfosfamiid; perillüülalkohol; fenasiinomütsiin; 15 fenüülatsetaat; fosfataasi inhibiitorid; pitsibaniil; pilokarpiini vesinikkloriid; pirarubitsiin; piritreksiim; platsetiin A; platsetiin B; plasminogeeni aktivaatori inhibiitor; plaatina kompleks; plaatina ühendid; plaatina-triamiini kompleks; porfimeernaatrium; porfiromütsiin; propüülbisakridoon; prostaglandiin J2; proteasoomi inhibiitorid; valgul A põhinev immuunmodulaator; proteiinkinaasi C inhibiitor; proteiinkinaasi C inhibiitorid, 20 mikroalgaal; proteiin türosiinfosfataasi inhibiitorid; puriinnukleosiidi fosforülaasi inhibiitorid; purpuriinid; pürasooloakridiin; püridoksüülitud hemoglobiini polioksüetüleeni konjugaat; raf antagonistid; raltitrekseed; ramosetroon; ras farnesüülvalgu transferaasi inhibiitorid; ras funktsiooni inhibiitorid; ras-GAP inhibiitorid; demetüülitud retelliptiin; reenum 186 etidronaat; risoksiin; ribosüümid; RII retinamiid; 25 roglėtiimiid; rohitukiin; romurtiid; rokvinimeks; rubiginoon B1; ruboksüül; safingool, saintopiin; SarCNU; sarkofütool A; sargramostiim; Sdi I mimeetik; semustiin; senestseenist tuletatud inhibiitor 1; sense oligonukleotiidid; signaali transduktsiooni inhibiitorid; signaali transduktsiooni modulaatorid; üheaahelaline antigeneeni seondumisvalk; sisofiraan; sobusoksaan; naatriumborokaptaat; naatriumfenüülatsetaat; 30 solverool; somatomeediini seondumisvalk; sonermiin; sparfosiiinhape; spikamütsiin D; spiromustiin; splenopentiin; spongistatiin 1; skvaalamiin; tüviraku inhibiitor; tüvirakkude poolestumise inhibiitorid; stipiamiid; stromelüsiini inhibiitorid; sulfinosiin; superaktiivne vasoaktiivse soolepeptiidi antagonist; suradista; suramiin; svainsoniin; sünteetilised

glükosaminoglükaanid; tallimustiin; tamoksifeeni metiodiid; tauromustiin; tasaroteen; tekogalaannaatrium; tegafuur; tellurapürüülum; telomeraasi inhibiitorid; temoporfiin; temosolomiid; teniposiid; tetraklorodekaoksiid; tetrasomiin; taliblastiin; tiokoraliin; trombopoietiin; trombopoietiini mimeetik; tümalfasiin; tümopoietiini retseptori agonist; 5 tümotrinaan; türoidi stimuleeriv hormoon; tinaetüületiopurpuriin; tirapasamiin; titanotseeni bikloriid; topsentiin; toremifeen; totipotentne tüviraku faktor; translatsiooni inhibiitorid; tretinoiin; triatsetüüluridiin; tritsiribiin; trimetrekstaat; triptoreliin; tropisetroon; turosteriid; türosiinkinasi inhibiitorid; türfostiinid; Ubc inhibiitorid; ubenimeks; urogenitaalsest siinusest tuletatud kasvuinhibiitorfaktor, urokinaasi retseptori antagonistid; vapreotiid; variolin B; vektorsüsteem, erütrotsüüdi geeniteraapia; 10 velaresool; veramiin; verdiinid; verteporfiin; vinorelbiin; vinksaltiin; vitaksiin; vorosool; sanoteroon; seniplatiin; silaskorb; ja sinostatiini stimalameer. Eelistatud täiendavad vähivastased ravimid on 5-fluorouratsiil ja leukovoriin.

15 **[0324]** Terapeutiliste antikehade näidete hulka, mida võib kasutada siin kirjeldatud meetodites, kuuluvad mittepääriavalt HERCEPTIN® (trastusumaab) (Genentech, CA), mis on HER2 vastane humaniseeritud monoklonaalne antikeha metastaatilise rinnavähi all kannatavate patsientide ravimiseks; REOPRO® (abtsiksimaab) (Centocor), mis on glükovalgu IIb/IIIa retseptori vastane antikeha trombotsüütidel vereklompide moodustumise ennetamiseks; ZENAPAX® (daklisumaab) (Roche Pharmaceuticals, Šveits), mis on immunosupressiivne, CD25 vastane humaniseeritud monoklonaalne antikeha ägeda neerusiiriku äratõukereaktsiooni ennetamiseks; PANOREX™ (edrekolomaab), mis on 17-IA rakupinna antigeeni vastane IgG2a hiire antikeha (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2, mis on idiotüübi (GD3 epitoobi) vastane IgG hiire antikeha 20 (ImClone System); Erbitux® (tsetuksimaab), mis on EGFR-i vastane IgG kimäärne antikeha (ImClone System); VITAXIN™, mis on $\alpha V\beta 3$ integriini vastane humaniseeritud antikeha (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03, mis on CD52 vastane IgG1 humaniseeritud antikeha (Leukosite); Smart M195, mis on CD33 vastane IgG humaniseeritud antikeha (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™ 25 (rituksimaab), mis on CD20 vastane IgG1 kimäärne antikeha (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™ (epratusumaab), mis on CD22 vastane IgG humaniseeritud antikeha (Immunomedics); ICM3, mis on ICAM3 vastane humaniseeritud antikeha (ICOS Pharm); IDEC-114, mis on CD80 vastane primatiseeritud antikeha (IDEC

Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™, mis on CD20 vastane radiomärgistatud hiire antikeha (IDEC/Schering AG); IDEC-131, mis on CD40L vastane humaniseeritud antikeha (IDEC/Eisai); IDEC-151, mis on CD4 vastane primatiseeritud antikeha (IDEC); IDEC-152, mis on CD23 vastane primatiseeritud antikeha (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3, mis on CD3 vastane IgG humaniseeritud antikeha (Protein Design Lab); 5G1.1, mis on komplemendi faktor-5 (C5) vastane humaniseeritud antikeha (Alexion Pharm); Humira®, mis on TNF- α vastane inimese antikeha (Abbott Laboratories); CDP870, mis on TNF- α Fab fragmendi vastane humaniseeritud antikeha (Celltech); IDEC-151, mis on CD4 vastane IgG1 primatiseeritud antikeha (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4, mis on CD4 vastane IgG humaniseeritud antikeha (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571, mis on TNF- α vastane IgG4 humaniseeritud antikeha (Celltech); LDP-02, mis on α 4 β 7 vastane humaniseeritud antikeha (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A, mis on CD4 vastane IgG humaniseeritud antikeha (Ortho Biotech); ANTOVA™, mis on CD40L vastane IgG humaniseeritud antikeha (Biogen); ANTEGREN™, mis on VLA-4 vastane IgG humaniseeritud antikeha (Elan); ja CAT-152, mis on TGF- β ₂ vastane inimese antikeha (Cambridge Ab Tech).

[0325] Terapeutiliste antikehade teised näited, mida võib kasutada leiutisekohaste antikehadega kombineeritult, on välja toodud tabelis 7.

20

Tabel 7. Vähiraviks sobivad monoklonaalsed antikehad, mida võib kasutada leiutisekohaste antikehadega kombineeritult

Ettevõte	Toode	Haigus	Märklaud
Abgenix	ABX-EGF	vähk	EGF-retseptor
AltaRex	OvaRex	munasarjavähk	kasvaja antigeen CA125
	BravaRex	metastaatilised vähid	kasvaja antigeen MUC1

Ettevõte	Toode	Haigus	Märklaud
Antisoma	Theragyn (pentumomaabütrium-90)	munasarjavähk	PEM-antigeen
	Therex	rinnavähk	PEM-antigeen
Boehringer Ingelheim	bevatsisumaab	pea- ja kaelavähk	CD44
Centocor / J&J	Panorex	pärasoolevähk	17-1A
	ReoPro	PTCA	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	äge MI	gp IIIb/IIIa
	ReoPro	ajuinsult	gp IIIb/IIIa
Corixa	Bexocar	NHL	CD20
CRC Technology	MAB, idiotüüpiline 105AD7	pärasoolevähi rakud	gp72
Crucell	Anti-EpCAM	vähk	Ep-CAM
Cytoclonal	MAB, kopsuvähk	mitteväikerakuline kopsuvähk	NA
Genentech	hertseptiin	metastaatiline rinnavähk	HER-2
	hertseptiin	varajases staadiumis rinnavähk	HER-2
	rituksaan	korduv / raskesti alluv madala astme või follikulaarne NHL	CD20
	rituksaan	keskmise ja kõrge astme NHL	CD20
	MAB-VEGF	NSCLC, metastaatiline	VEGF
	MAB-VEGF	pärasoolevähk, metastaatiline	VEGF

Ettevõte	Toode	Haigus	Märklaud
	AMD Fab	vanusega seotud kollatähni kärbumine	CD18
	E-26 (teise põlvkonna IgE)	allergiline astma ja nohu	IgE
IDEC	Zevalin (rituksaan + ütrium-90)	madala taseme follikulaarne, korduv või raskesti alluv, CD20-positiivne, B-rakuline NHL ja rituksimaabile raskesti alluv NHL	CD20
ImClone	tsetuksimaab + irinotekaan	raskesti alluv pärasoole kartsinoom	EGF- retseptor
	tsetuksimaab + tsisplatiin ja kiiritusravi	esmakordselt diagnoositud või korduv pea- ja kaelavähk	EGF- retseptor
	tsetuksimaab + gemtsitabiin	esmakordselt diagnoositud metastaatiline kõhunäärme kartsinoom	EGF- retseptor
	tsetuksimaab + tsisplatiin + 5FU või taksool	korduv või metastaatiline pea- ja kaelavähk	EGF- retseptor
	tsetuksimaab + karboplatiin + paklitakseel	esmakordselt diagnoositud mitteväikerakuline kopsukartsinoom	EGF- retseptor
	tsetuksimaab + tsisplatiin	pea- ja kaelavähk (ekstensiiivne ravimatu lokaalne-piirkondlik haigus ja kauged metastaasid)	EGF- retseptor
	tsetuksimaab + kiiritusravi	lokaalselt kaugelearenenud pea- ja kaelakartsinoom	EGF- retseptor

Ettevõte	Toode	Haigus	Märklaud
	BEC2 + <i>Bacillus Calmette Guerin</i>	väikerakuline kopsukartsinoom	matkib gangliosiid CD3
	BEC2 + <i>Bacillus Calmette Guerin</i>	melanoom	matkib gangliosiid CD3
	IMC-1C11	pärasoolevähk maksa metastaasidega	VEGF-retseptor
ImmonoGen	nuC242-DM1	pärasoole-, mao- ja kõhunäärmevähk	nuC242
ImmunoMedics	LymphoCide	mitte-Hodgkini lümfoom	CD22
	LymphoCide Y-90	mitte-Hodgkini lümfoom	CD22
	CEA-Cide	metastaatilised kasvajakasvajad	CEA
	CEA-Cide Y-90	metastaatilised kasvajakasvajad	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-märgistatud arkitumomaab)	pärasoolevähk (radioloogiline kuvamine)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-märgistatud arkitumomaab)	rinnavähk (radioloogiline kuvamine)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-märgistatud arkitumomaab)	kopsuvähk (radioloogiline kuvamine)	CEA
	CEA-Scan (Tc-99m-märgistatud arkitumomaab)	intraoperatiivsed kasvajakasvajad (radioloogiline kuvamine)	CEA

Ettevõte	Toode	Haigus	Märklaud
	LeukoScan (Tc-99m-märgistatud sulesomaab)	pehmekoe infektsioon (radioloogiline kuvamine)	CEA
	LymphoScan (Tc-99m-märgistatud)	lümfoomid (radioloogiline kuvamine)	CD22
	AFP-Scan (Tc-99m-märgistatud)	maksa 7 idurakulised vähid (radioloogiline kuvamine)	AFP
Intracel	HumaRAD-HN (+ ütrium-90)	pea- ja kaelavähk	NA
	HumaSPECT	pärasoole kuvamine	NA
Medarex	MDX-101 (CTLA-4)	eesnäärme- ja muud vähid	CTLA-4
	MDX-210 (her-2 ületootmine)	eesnäärmevähk	HER-2
	MDX-210/MAK	vähk	HER-2
MedImmune	Vitaxin	vähk	$\alpha v\beta 3$
Merck KGaA	MAb 425	erinevad vähid	EGF-retseptor
	IS-IL-2	erinevad vähid	Ep-CAM
Millennium	Campath (alemusumaab)	krooniline lümfotsütaarne leukeemia	CD52
NeoRx	CD20-streptavidiin (+ biotiin-ütrium 90)	mitte-Hodgkini lümfoom	CD20
	Avidicin (albumiin + NRLU13)	metastaatiline vähk	NA
Peregrine	Oncolym (+ jood-131)	mitte-Hodgkini lümfoom	HLA-DR 10-beeta

Ettevõte	Toode	Haigus	Märklaud
	Cotara (+ jood-131)	opereerimatu pahaloomuline glioom	DNA-ga seotud valgud
Pharmacia Corporation	C215 (+ stafülokoki enterotoksiin)	kõhunäärmevähk	NA
	MAB, kopsu- / neeruvähk	kopsu- ja neeruvähk	NA
	nakolomaabtafenatoks (C242 + stafülokoki enterotoksiin)	käärsoole- ja kõhunäärmevähk	NA
Protein Design Labs	Nuvion	T-rakulised pahaloomulised kasvajakud	CD3
	SMART M195	AML	CD33
	SMART 1D10	NHL	HLA-DR antigeen
Titan	CEAVac	kaugelearenenud pärasoolevähk	CEA
	TriGem	metastaatiline melanoom ja väikerakuline kopsuvähk	GD2-gangliosiid
	TriAb	metastaatiline rinnavähk	MUC-1
Trilex	CEAVac	kaugelearenenud pärasoolevähk	CEA
	TriGem	metastaatiline melanoom ja väikerakuline kopsuvähk	GD2-gangliosiid
	TriAb	metastaatiline rinnavähk	MUC-1
Viventia Biotech	NovoMAB-G2 radiomärgistatud	mitte-Hodgkini lümfoom	NA

Ettevõte	Toode	Haigus	Märklaud
	Monopharm C	käärsoole- ja kõhunäärme kartsinoom	SK-1 antigeen
	GlioMab-H (+ geloniini toksiin)	glioom, melanoom ja neuroblastoom	NA
Xoma	rituksaan	korduv / raskesti alluv madala astme või follikulaarne NHL	CD20
	rituksaan	keskmise ja kõrge astme NHL	CD20
	ING-1	adenokartsinoom	Ep-CAM

5.4.6. VAKTSIINITERAAPIA

[0326] Samuti on kirjeldatud ravialusel vaktsiini kompositsiooni suhtes immuunreaktsiooni parandamise meetodit; nimetatud meetod hõlmab nimetatud ravialusele antikeha või selle fragmendi manustamist, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d, ning vaktsiini kompositsiooni manustamist, kus nimetatud antikeha või selle fragment parandab immuunreaktsiooni nimetatud vaktsiini kompositsiooni suhtes. Nimetatud antikeha või selle fragment võib parandada immuunreaktsiooni nimetatud vaktsiini kompositsiooni suhtes, parandades selle antigeeni esitlemist ja/või antigeeni töötlemist, millele nimetatud vaktsiin on suunatud. Leiutisekohaste antikehade või nende fragmentidega kombineeritult on kasulik mis tahes tehnika tasemes tuntud vaktsiini kompositsioon.

15

[0327] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud vähivaktsiinidega kombineeritult, näiteks CanvaxinTM (Cancer Vax, Corporation, melanoom ja käärsoolevähk); Oncophage (HSPPC-96; Antigenics; metastaatiline melanoom); HER-2/neu vähivaktsiin jne. Siin kirjeldatud meetodites ja leiutisekohases kompositsioonides kasutatud vähivaktsiinid võivad olla näiteks antigeenispetiifilised

20

- vaktsiinid, idiotüübi vastased vaktsiinid, dendriitrakkude vaktsiinid või DNA vaktsiinid. Samuti on kirjeldatud leiutisekohaste antikehade kasutamist rakupõhiste vaktsiinidega, mida on kirjeldanud Segal *et al.* (patent US 6 403 080). Leiutisekohaste antikehadega kombineeritult kasutatud rakupõhised vaktsiinid võivad olla autoloogsed või allogeensed.
- 5 Lühidalt öeldes põhinevad Segali jt kirjeldatud vähipõhised vaktsiinid produktil Oponokine ettevõttelt Genitrix, LLC. Oponokine'id on geneetiliselt muundatud tsütokiinid, mis kasvajakakkudega segamise korral kinnituvad automaatselt rakkude pinnale. Kui „dekoreeritud” rakke manustatakse vaktsiinina, siis rakkudel olev tsütokiin aktiveerib kriitilise tähtsusega antigeeni esitlevad rakud vastuvõtja organismis,
- 10 võimaldades samal ajal antigeeni esitlevatel rakkudel kasvajakakke alla neelata. Seejärel on antigeeni esitlevad rakud suutelised juhendama T-tapjarakke, et need leiaksid üles ja hävitaksid sarnased kasvajakarakud kogu organismis. Seega muudab Oponokine kasvajakarakud tugevaks kasvjavastaseks immunoterapeutikumiks.
- 15 **[0328]** Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud allergia vaktsiinidega kombineeritult. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada näiteks rekombinantsete hübridmolekulidega kombineeritult, mis kodeerivad peamisi timuti õietolmu allergeene, mida kasutatakse heintaimede õietolmu allergia vastu vaktsineerimiseks, nagu on kirjeldanud Linhart *et al.* (2000, *FASEB Journal*, 16(10):
- 20 1301–1303). Lisaks võib leiutisekohaseid antikehi kasutada DNA-põhiste vaktsiinidega kombineeritult, mida on kirjeldanud Horner *et al.* (2002, *Allergy*, 57 Suppl, 72: 24–29). Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada *Bacille Calmett-Guerin* („BCG”) vaktsiiniga kombineeritult, nagu on kirjeldanud Choi *et al.* (2002, *Ann. Allergy Asthma Immunology*, 88(6): 584–591) ja Barlan *et al.* (2002, *Journal Asthma*, 39(3): 239–246), et vähendada
- 25 IgE sekretsiooni. Leiutisekohased antikehad on kasulikud toiduallergiate ravimisel. Eelkõige võib leiutisekohaseid antikehi kasutada vaktsiinide või muude tehnika tasemes tuntud immuunravi meetoditega kombineeritult (vt Hourihane *et al.*, 2002, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2(3): 227–231) maapähkliallergia ravimiseks.
- 30 **[0329]** Kirjeldatud meetodeid ja leiutisekohaseid kompositsioone võib kasutada selliste vaktsiinidega kombineeritult, mille puhul on soovitud immuunsus antigeeni(de) suhtes. Sellised antigeenid võivad olla mis tahes tehnika tasemes tuntud antigeenid. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada immuunreaktsiooni parandamiseks, näiteks

nakkusetekitajate, haigestunud või ebanormaalsete rakkude, näiteks mittepiiravalt bakterite (näiteks gram-positiivsete bakterite, gram-negatiivsete bakterite, aeroobsete bakterite, spiroheetide, mükobakterite, riketsiate, klamüüdiate jne), parasiitide, seente (näiteks *Candida albicans*, *Aspergillus* jne), viiruste (näiteks DNA viiruste, RNA viiruste jne) või kasvajate suhtes. Viirusinfektsioonide hulka kuuluvad mittepiiravalt inimese immuunpuudulikkuse viirus (HIV); A-hepatiidi viirus, B-hepatiidi viirus, C-hepatiidi viirus, D-hepatiidi viirus või muud hepatiidi viirused; tsütomegaloviirused, lihtherpeseviirus-1 (-2, -3, -4, -5, -6), inimese papilloomiviirused; respiratoorsüntsüüaalse viirus (RSV), paragripiviirus (PIV), Epstein-Barri viirus, inimese metapneumoviirus (HMPV), gripiviirus, tõsine äge respiratoorne sündroom (SARS) või mis tahes muud viirusinfektsioonid.

[0330] Samuti on kirjeldatud meetodeid ja vaktsiini kompositsioone, mis hõlmavad leiutisekohase antikeha, antigeeni ja tsütokiini kombinatsioone. Eelistatult on nimetatud tsütokiini IL-4, IL-10 või TGF- β .

[0331] Samuti on kirjeldatud leiutisekohaste antikehade kasutamist, et parandada humoraalset ja/või rakkude vahendatud reaktsiooni vaktsiini kompositsiooni antigeeni(de) suhtes, mis sarnaneb leiutisekohaste antikehade kasutamisele konkreetse häire ennetamiseks või ravimiseks, kus paremaks muudetud immuunreaktsioon konkreetse antigeeni või konkreetsete antigeenide suhtes on tõhus haiguse või häire ravimiseks või ennetamiseks. Selliste haiguste ja häirete hulka kuuluvad mittepiiravalt viirusinfektsioonid, näiteks HIV, CMV, hepatiit, herpesviirus, leetrid jne, bakteriaalsed infektsioonid, seen- ja parasiitsed infektsioonid, vähid ja mis tahes muud haigused või häired, mida on võimalik ravida või ennetada immuunreaktsiooni parandamise teel konkreetse antigeeni või konkreetsete antigeenide suhtes.

5.5. KOMPOSITSIOONID JA MANUSTAMISE MEETODID

[0332] Leiutisega esitatakse farmatseutilised kompositsioonid, mis sisaldavad leiutisekohaseid antikehi. Konkreetsemalt öeldes esitatakse leiutisega farmatseutiline kompositsioon, mis sisaldab (i) terapeutiliselt efektiivses koguses isoleeritud antikeha või

selle antigeeni siduvat fragmenti mis tahes nõudluspunkti 1–12 kohaselt; ja (ii) farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat. Samuti on kirjeldatud haiguse, häire või infektsiooniga seotud ühe või mitme sümptomi ravimise, profülaktika ja paremaks muutmise meetodeid, mis hõlmavad ravialusele efektiivses koguses leiutisekohase liitvalgu või konjugeeritud molekuli või farmatseutilise kompositsiooni manustamist, mis sisaldab leiutisekohast liitvalku või konjugeeritud molekule. Eelistatult on antikeha või liitvalk või konjugeeritud molekul sisuliselt puhas (st sisuliselt vaba ainetest, mis piiravad selle mõju või põhjustavad soovimatuid kõrvalmõjusid). Konkreetsemalt öeldes võib nimetatud ravialune olla loom, eelistatult imetaja, näiteks mitteprimaat (näiteks veised, sead, hobused, kassid, koerad, rotid jne) ja primaat (näiteks ahv, näiteks jaava makaak ja inimene). Eelistatult on nimetatud ravialune inimene.

[0333] Erinevad manustamissüsteemid on tuntud ja neid võib kasutada leiutisekohaseid antikehi sisaldava kompositsiooni manustamiseks, näiteks kapseldamine liposoomidesse, mikroosakestesse, mikrokapslitesse, rekombinantsed rakud, mis on suutelised ekspresseerima antikeha või liitvalku, retseptori vahendatud endotsütoos (vt näiteks Wu ja Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429–4432), nukleiinhappe konstrueerimine retroviraalse või muu vektori osana jne.

[0334] Teatud juhtudel on leiutisekohased antikehad valmistatud liposoomides leiutisekohaste antikehade suunatud kohale toimetamiseks. Liposoomid on vesiikulid, mis koosnevad kontsentriselt järjestatud fosfolipiidi kaksikkihtidest, mis kapseldavad veefaasi. Tavaliselt sisaldavad liposoomid erinevat tüüpi lipiide, fosfolipiide ja/või pindaktiivseid aineid. Liposoomide koostisosad on paigutatud kahekihilises konfiguratsioonis, mis sarnaneb lipiidide paigutusele bioloogilistes membraanides. Liposoomid on eriti eelistatud kohaletoimetamise vehiikulid, mis on osaliselt tingitud nende bioühilduvusest, madalast immunogeensusest ja madalast toksilisusest. Liposoomide valmistamise meetodid on tehnika tasemes tuntud, vt näiteks Epstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688; Hwang *et al.*, 1980 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030–4034; USA patendid nr 4 485 045 ja 4 544 545.

[0335] Samuti on kirjeldatud pikema seerumi poolestusajaga, st parema tsirkulatsiooniajaga liposoomide valmistamise meetodeid, mis on näiteks avaldatud

patendis US 5 013 556. Eelistatud liposoomid, mida kasutatakse siin kirjeldatud meetodites, ei välju vereringest kiiresti, st neid ei omastata mononukleaarses fagotsütaarses süsteemis. Kasutamiseks sobivad steriilselt stabiliseeritud liposoomid, mille valmistamiseks kasutatakse valdkonna asjatundjale tuntud tavapäraseid meetodeid.

5 Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, sisaldavad steriilselt stabiliseeritud liposoomid lipiidi koostisosi koos mahukate ja äärmiselt paindlike hüdrofiilsete fragmentidega, mis vähendab liposoomide soovimatut reaktsiooni seerumi valkudega, vähendab opsoniseerimist seerumi koostisosadega ja vähendab äratundmist MPS-i poolt. Steriilselt stabiliseeritud liposoomide valmistamiseks

10 kasutatakse eelistatult polüetüleenglükooli. Liposoomide ja steriilselt stabiliseeritud liposoomi valmistamise kohta ülevaate saamiseks vt näiteks Bendas *et al.*, 2001 *BioDrugs*, 15(4): 215–224; Allen *et al.*, 1987 *FEBS Lett.* 223: 42–46; Klibanov *et al.*, 1990 *FEBS Lett.*, 268: 235–237; Blum *et al.*, 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1029: 91–97; Torchilin *et al.*, 1996, *J. Liposome Res.* 6: 99–116; Litzinger *et al.*, 1994, *Biochim. Biophys. Acta*,

15 1190: 99–107; Maruyama *et al.*, 1991, *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 1620–1622; Klibanov *et al.*, 1991, *Biochim Biophys Acta*, 1062; 142–148; Allen *et al.*, 1994, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 13: 285–309. Samuti võib kasutada liposoomi, mis on kohandatud konkreetsele elundile suunamiseks, vt näiteks USA patent nr 4 544 545, või konkreetsele rakule suunamiseks, vt näiteks USA patenditaotluse publikatsioon nr 2005/0074403. Leiutisekohastes

20 kompositsioonides ja siin kirjeldatud meetodites kasutamiseks eriti kasulikke liposoomi võib genereerida pöördfaasilise aurustamismeetodi abil koos lipiidi kompositsiooniga, mis sisaldab fosfatidüülkoliini, kolesterooli ja PEG-deriveeritud fosfatidüületanolamiini (PEG-PE). Liposoomid surutakse läbi kindlaksmääratud poori suurusega filtreid, et saada soovitud diameetriga liposoomid. Osadel juhtudel võib leiutisekohase antikeha fragmendi,

25 näiteks F(ab') fragmendi konjugeerida liposoomidega, kasutades selleks varem kirjeldatud meetodeid, vt näiteks Martin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286–288.

[0336] Leiutisekohaseid antikehi võib valmistada ka immunoliposoomidena. Immunoliposoomid osutavad liposomaalsele kompositsioonile, kus leiutisekohane

30 antikeha või selle fragment seotakse kovalentselt või mittekovalentselt liposoomi pinnale. Antikeha liposoomi pinnale sidumise keemia on tehnika tasemes tuntud, vt näiteks patent US 6 787 153; Allen *et al.*, 1995, „Stealth Liposomes”, Boca Rotan: CRC Press, 233–244; Hansen *et al.*, 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1239: 133–144. Eelistatult on siin kirjeldatud

meetodites ja leiutisekohastes kompositsioonides kasutamiseks sobivad immunoliposoomid lisaks steriilselt stabiliseeritud. Eelistatult on leiutisekohased antikehad kovalentselt või mittekovalentselt seotud hüdrofoobse ankruga, mis on stabiilselt juurdunud liposoomi lipiidi kaksikkihis. Hüdrofoobsete ankrute näidete hulka kuuluvad mittepiiravalt fosfolipiidid, näiteks fosfatidüületanolamiin (PE), fosfatidüülinositol (PI). Antikeha ja hüdrofoobse ankruga vahel kovalentse sideme saavutamiseks võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud biokeemilisi strateegiaid, vt näiteks J. Thomas August (toim.), 1997, „Gene Therapy: Advances in Pharmacology”, 40, Academic Press, San Diego, CA., lk 399–435, mis on siin tervikuna viitega hõlmatud.

Näiteks võib antikeha molekulil olev funktsionaalne rühm reageerida hüdrofoobse ankruga seotud liposoomil oleva aktiivse rühmaga, näiteks võib antikehal oleva lüsiini kõrvalahela aminorühma siduda *N*-glutarüül-fosfatidüületanolamiiniga seotud liposoomiga, mis on aktiveeritud vees lahustuva karbodiimiidiga; või redutseeritud antikeha tiolrühma võib siduda liposoomidega tiolrühma suhtes reaktiivsete ankrute, näiteks püridüülpropionüül-fosfatidüületanolamiini kaudu. Vt näiteks Dietrich *et al.*, 1996, *Biochemistry*, 35: 1100–1105; Loughrey *et al.*, 1987, *Biochim. Biophys. Acta*, 901: 157–160; Martin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286–288; Martin *et al.*, 1981, *Biochemistry*, 20: 4429–4438. Kuigi siinkohal ei soovita lähtuda ühestki konkreetsest toimemehhanismist, on leiutisekohast antikeha sisaldavad immunoliposomaalsed preparaadid raviainetena eriti tõhusad, kuna need toimetavad antikeha märklaudraku tsütoplasmasse, st rakku, mis sisaldab FcγRIIB retseptorit, millega nimetatud antikeha seondub. Eelistatult on immunoliposoomidel pikem poolestusaeg veres, konkreetselt märklaudrakkudes, ning neid saab sisestada märklaudrakkude tsütoplasmasse, vältides seeläbi raviaine kaotust või selle lagundamist endolüüsosomaalse raja poolt.

25

[0337] Kirjeldatud on leiutisekohast antikeha või selle fragmenti. Immunoliposoomid võivad lisaks sisaldada ühte või mitut täiendavat raviainet, näiteks siin avaldatud raviaineid.

30

[0338] Kirjeldatud immunoliposomaalsed kompositsioonid sisaldavad ühte või mitut vesiikulit moodustavat lipiidi, leiutisekohast antikeha või selle fragmenti või derivaati ja valikuliselt hüdrofiilset polümeeri. Vesiikulit moodustav lipiid on eelistatult lipiid, millel on kaks süsivesiniku ahelat, näiteks atsüülahelad ja polaarne pearühm. Vesiikulit

moodustavate lipiidide näidete hulka kuuluvad fosfolipiidid, näiteks fosfatidüülkoliin, fosfatidüületanolamiin, fosfatiidhape, fosfatidüülinositool, sfingomüeliin ja glükolipiidid, näiteks tserebrosiidid, gangliosiidid. Immunoliposomaalsed kompositsioonid võivad lisaks sisaldada hüdrofiilset polümeeri, näiteks polüetüleenglükooli, ja gangliosiidi GM1, mis pikendab liposoomi poolestusaega seerumis. Hüdrofiilsete polümeeride liposoomidega konjugeerimise meetodid on tehnika tasemes hästi tuntud ja leiutisega hõlmatud. Immunoliposoomide ja nende valmistamise meetodite kohta ülevaate saamiseks vt näiteks USA patenditaotluse publikatsioon nr 2003/0044407; PCT rahvusvaheline publikatsioon nr WO 97/38731, Vingerhoads *et al.*, 1994, *Immunomethods*, 4: 259–272; Maruyama, 2000, *Biol. Pharm. Bull.* 23(7): 791–799; Abra *et al.*, 2002, *Journal of Liposome Research*, 12(1 ja 2): 1–3; Park, 2002, *Bioscience Reports*, 22(2): 267–281; Bendas *et al.*, 2001 *BioDrugs*, 14(4): 215–224, J. Thomas August (toim.), 1997, „Gene Therapy: Advances in Pharmacology”, Volume 40, Academic Press, San Diego, CA., lk 399–435.

15

[0339] Leiutisekohase antikeha manustamise meetodite hulka kuuluvad mittepiiravalt parenteraalne manustamine (näiteks intradermaalne, intramuskulaarne, intraperitoneaalne, intravenoosne ja subkutaanne), epiduraalne ja mukosaalne (näiteks intranasaalne ja suukaudne) manustamine. Eelistatult manustatakse leiutisekohaseid antikehi intramuskulaarselt, intravenoosselt või subkutaanselt. Kompositsioone võib manustada mis tahes sobival viisil, näiteks infusiooni või booluse süstimise teel, absorptsioonina läbi epiteelkihi või mukokutaanse kihi (näiteks suu limaskest, päraku ja soolestiku limaskestad jne) ja seda võib manustada koos teiste bioaktiivsete ainetega. Manustamine võib olla süsteemne või lokaalne. Lisaks võib kasutada pulmonaalset manustamist, näiteks inhalaatorit või nebulisaatorit ja aerosoolainega preparaati kasutades. Vt näiteks USA patendid nr 6 019 968; 5 985 20; 5 985 309; 5 934 272; 5 874 064; 5 855 913; 5 290 540; ja 4 880 078; ja PCT publikatsioonid nr WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; ja WO 99/66903.

30

[0340] Leiutises pakutakse ka leiutisekohaste antikehade pakendamist hermeetiliselt suletud mahutisse, näiteks ampulli või kotikesse, millele on märgitud antikeha kogus. Leiutisekohaseid antikehi võib pakkuda steriliseeritud lüofiliseeritud kuivpulbri või veevaba kontsentratsioonina hermeetiliselt suletud mahutis ja seda saab lahustada, näiteks vee

- või soolalahusega sobiva kontsentratsioonini ravialusele manustamiseks. Eelistatult pakutakse leiutisekohaseid antikehi steriilse lüofiliseeritud kuivpulbrina hermeetiliselt suletud mahutis ühikannuses vähemalt 5 mg, enam eelistatult vähemalt 10 mg, vähemalt 15 mg, vähemalt 25 mg, vähemalt 35 mg, vähemalt 45 mg, vähemalt 50 mg või vähemalt
- 5 75 mg. Leiutisekohaseid lüofiliseeritud antikehi tuleks säilitada temperatuuril 2 kuni 8 °C nende originaalmahutis ning antikehi tuleks manustada 12 tunni, eelistatult 6 tunni, 5 tunni, 3 tunni või 1 tunni jooksul pärast nende lahustamist. Alternatiivselt võib leiutisekohaseid antikehi pakkuda vedeliku kujul hermeetiliselt suletud mahutis, millele on märgitud antikeha, liitvalgu või konjugeeritud molekuli kogus ja kontsentratsioon.
- 10 Eelistatult pakutakse antikehasid vedeliku kujul hermeetiliselt suletud mahutis, mis sisaldab vähemalt 1 mg/ml, enam eelistatult vähemalt 2,5 mg/ml, vähemalt 5 mg/ml, vähemalt 8 mg/ml, vähemalt 10 mg/ml, vähemalt 15 mg/kg, vähemalt 25 mg/ml, vähemalt 50 mg/ml, vähemalt 100 mg/ml, vähemalt 150 mg/ml, vähemalt 200 mg/ml antikehi.
- 15 **[0341]** Leiutisekohase kompositsiooni koguse, mis on tõhus häirega seotud ühe või mitme sümptomi ravimisel, ennetamisel või paremaks muutmisel, saab kindlaks määrata standardsete kliiniliste tehnikate abil. Konkreetne preparaadis kasutatav annus sõltub ka manustamisviisist ning haigusseisundist raskusastmest ja see tuleks määrata raviarsti hinnangust ja konkreetse patsiendiga seotud asjaoludest lähtudes. Efektiivsed annused
- 20 võib ekstrapoleerida *in vitro* saadud annusele reageerimise kõveratest või loomumudeli testsüsteemidest.
- [0342]** Leiutises hõlmatud antikehade puhul on patsiendile manustatav annus tavaliselt vahemikus 0,0001 mg kuni 100 mg patsiendi kehakaalu kg kohta. Eelistatavalt on
- 25 patsiendile manustatav annus 0,0001 mg kuni 20 mg, 0,0001 mg kuni 10 mg, 0,0001 mg kuni 5 mg, 0,0001 mg kuni 2 mg, 0,0001 mg kuni 1 mg, 0,0001 mg kuni 0,75 mg, 0,0001 mg kuni 0,5 mg, 0,0001 mg kuni 0,25 mg, 0,0001 mg kuni 0,15 mg, 0,0001 mg kuni 0,10 mg, 0,001 mg kuni 0,5 mg, 0,01 mg kuni 0,25 mg või 0,01 mg kuni 0,10 mg patsiendi kehakaalu kg kohta. Üldiselt on inimese antikehade poolestusaeg inimese kehas võõra
- 30 polüpeptiidi toimel tekkiva immuunreaktsiooni tõttu pikem kui teistelt liikidelt pärit antikehadel. Nõnda on inimese antikehade puhul sageli võimalikud madalamad annused ja harvem manustamine. Lisaks saab leiutisekohaste antikehade või nende fragmentide

annuseid ja manustamise sagedust vähendada antikehade omastamise ja kudedesse tungimise parandamise teel, kasutades selleks modifikatsioone, näiteks lipideerimist.

5 [0343] Patsiendile manustatavate leiutisekohaste antikehade annus võib olla 0,01 mg kuni 1000 mg päevas, kui kasutatakse ühel ainel põhinevat ravi. Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada teiste terapeutiliste kompositsioonidega kombineeritult ja sellisel juhul on patsiendile manustatav annus madalam kui siis, kui nimetatud antikehasid kasutatakse ühel ainel põhineva ravina.

10 [0344] Leiutisekohaseid ravimkompositsioone võib olla kasulik manustada lokaalselt ravi vajavasse piirkonda; selleks võib kasutada mittepiiravalt näiteks lokaalset infusiooni, süstimist või implantaati, kusjuures nimetatud implantaat võib olla poorne, mittepoorne või geeljast materjalist, sh membraanid, näiteks sialastilised membraanid või kiud. Eelistatult tuleb leiutisekohase antikeha manustamisel jälgida, et kasutataks materjale, 15 millesse antikeha või liitvalk ei imenduks.

[0345] Kompositsioone võib kohale toimetada vesiikulis, eelkõige liposoomis (vt Langer, *Science* 249: 1527–1533 (1990); Treat *et al.* publikatsioonis „Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer”, Lopez-Berestein ja Fidler (toim.), Liss, New York, 20 lk 353–365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, lk 317–327; vt üldiselt *ibid.*).

[0346] Kompositsioone võib kohale toimetada toimeainet kontrollitult vabastavas või püsivalt vabastavas süsteemis. Toimeainet püsivalt vabastavate preparaatide valmistamiseks, mis sisaldavad ühte või mitut leiutisekohast antikeha, võib kasutada mis 25 tahes valdkonna asjatundjale tuntud tehnikat. Vt näiteks USA patent nr 4 526 938; PCT publikatsioon WO 91/05548; PCT publikatsioon WO 96/20698; Ning *et al.*, 1996, „Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel”, *Radiotherapy & Oncology* 39: 179–189, Song *et al.*, 1995, „Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions”, *PDA Journal of* 30 *Pharmaceutical Science & Technology* 50: 372–397; Cleek *et al.*, 1997, „Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application”, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853–854; ja Lam *et al.*, 1997, „Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery”, *Proc. Int'l. Symp.*

Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759–760. Toimeainet kontrollitult vabastavas süsteemis võib kasutada pompa (vt Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88: 507; ja Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574). Antikehade kontrollitud vabastamise saavutamiseks võib kasutada polümeerseid materjale (vt näiteks „Medical Applications of Controlled Release”, Langer ja Wise (toim.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); „Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance”, Smolen ja Ball (toim.), Wiley, New York (1984); Ranger ja Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61; vt ka Levy *et al.*, 1985, *Science* 228: 190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25: 351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71: 105); USA patent nr 5 679 377; USA patent nr 5 916 597; USA patent nr 5 912 015; USA patent nr 5 989 463; USA patent nr 5 128 326; PCT publikatsioon nr WO 99/15154; ja PCT publikatsioon nr WO 99/20253). Toimeainet püsivalt vabastavates preparaatides kasutamiseks sobivate polümeeride näited on mittepiiravalt polü(2-hüdroksüetüülmetakrülaad), polü(metüülakrülaad), polü(akrüülhape), polü(etüleen-ko-vinüülakrülaad), polü(metakrüülhape), polüglükoliidid (PLG), polüanhydriidid, polü(N-vinüülpirrolidoon), polü(vinüülalkohol), polüakrüülamiid, polü(etüleenglükool), polülaktiidid (PLA), polü(laktiid-ko-glükoliidid) (PLGA) ja polüortoestrid. Toimeainet kontrollitult vabastava süsteemi võib paigutada terapeutilise märklaua (näiteks kopsude) lähedusse, mille tulemusel läheb vaja vaid murdosa süsteemsest annusest (vt näiteks Goodson publikatsioonis „Medical Applications of Controlled Release”, *supra*, 2, lk 115–138 (1984)). Polümeerseid kompositsioone, mis on kasulikud toimeainet kontrollitult vabastavate implantaatidena, kasutatakse vastavalt Dunn *et al.* (vt U.S. 5 945 155). See konkreetne meetod põhineb polümeeri süsteemist bioaktiivse materjali *in situ* kontrollitud vabastamise terapeutilisel mõjul. Sellist implantaati võib üldiselt paigaldada terapeutilist ravi vajava patsiendi ükskõik millisesse kehapiirkonda. Kasutada võib mittepolümeerseid püsiva kohaletoimetamise süsteemi, kus mittepolümeerseid implantaate ravialuse organismis kasutatakse ravimi kohaletoimetamise süsteemina. Implantaadi organismi paigaldamisel implantaadi orgaaniline lahusti hajub, läheb laiali või imbib kompositsioonist välja ümbritsevasse koevedelikku ning mittepolümeerne materjal hüübib või sadestub järk-järgult, et moodustada tahke, mikroporne maatriks (vt U.S. 5 888 533).

[0347] Toimeainet kontrollitult vabastavaid süsteeme on kirjeldatud ülevaates, mille on koostanud Langer (1990, *Science* 249: 1527–1533). Toimeainet püsivalt vabastavate preparaatide valmistamiseks, mis sisaldavad ühte või mitut leiutisekohast raviainet, võib kasutada mis tahes valdkonna asjatundjale tuntud tehnikat. Vt näiteks USA patent

5 nr 4 526 938; rahvusvahelised publikatsioonid nr WO 91/05548 ja WO 96/20698; Ning *et al.*, 1996, *Radiotherapy & Oncology* 39: 179–189; Song *et al.*, 1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50: 372–397; Cleek *et al.*, 1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853–854; ja Lam *et al.*, 1997, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759–760.

10

[0348] Kui leiutisekohane kompositsioon on antikeha kodeeriv nukleiinhape, võib seda nukleiinhapet manustada *in vivo*, et soodustada selle kodeeritava antikeha ekspressiooni, konstrueerides selle sobiva nukleiinhappe ekspressioonivektori osana ja manustades seda selliselt, et see muutub rakusiseseks, näiteks retroviirusvektori kasutamise (vt USA patent

15 nr 4 980 286) või vahetu süstimise või mikroosakestega pommitamise (näiteks geenipüstoliga; Biolistic, Dupont) või lipiidide või rakupinna retseptorite või transfekteerivate ainete katmise teel või manustades seda homeojärjestuse sarnase peptiididga seotult, mis teadaolevalt suudab siseneda rakutuumale (vt näiteks Joliot *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1864–1868) jne. Alternatiivselt võib nukleiinhappe

20 sisestada rakusiseselt ja sisestada ekspresseerimiseks peremeesraku DNA-sse homoloogilise rekombineerimise teel.

[0349] Antikehade puhul on ravialusele manustatav terapeutiliselt või profülaktiliselt efektiivne annus tavaliselt 0,1 mg kuni 200 mg ravialuse kehakaalu kg kohta. Eelistatult

25 on ravialusele manustatav annus vahemikus 0,1 mg kuni 20 mg ravialuse kehakaalu kg kohta ja enam eelistatult on ravialusele manustatav annus vahemikus 1 mg kuni 10 mg ravialuse kehakaalu kg kohta. Leiutisekohaste antikehade annuseid ja manustamise sagedust võib vähendada ka antikehade või liitvalkude omastamise ja kudedesse (näiteks kopsu) tungimise parandamise teel, kasutades selleks modifikatsioone, näiteks

30 lipideerimist.

[0350] Ravialuse ravimine terapeutiliselt või profülaktiliselt efektiivses koguses leiutisekohaste antikehadega võib hõlmata ühekordset ravi või eelistatult võib see hõlmata

mitut ravikuuri. Ühes eelistatud näites ravitakse ravialust leiutisekohaste antikehadega koguses, mis on vahemikus ligikaudu 0,1 kuni 30 mg kehakaalu kg kohta kord nädalas ligikaudu 1 kuni 10 nädalat, eelistatult 2 kuni 8 nädalat, enam eelistatult ligikaudu 3 kuni 7 nädalat ja veel enam eelistatult ligikaudu 4, 5 või 6 nädalat. Teistes näidetes manustatakse leiutisekohaseid farmatseutilisi kompositsioone kord päevas, kaks korda päevas või kolm korda päevas. Veel teistes näidetes manustatakse farmatseutilisi kompositsioone kord nädalas, kaks korda nädalas, kord kahe nädala tagant, kord kuus, kord kuue nädala tagant, kord kahe kuu tagant, kaks korda aastas või kord aastas. Samuti on arusaadav, et ravi jaoks kasutatavat antikehade efektiivset annust võib konkreetse ravikuuri jooksul suurendada või vähendada.

5.5.1. FARMATSEUTILISED KOMPOSITSIOONID

[0351] Leiutisekohased kompositsioonid hõlmavad suuremahulisi ravimikompositsioone, mis on kasulikud farmatseutiliste kompositsioonide (näiteks ebapuhaste või mittesteriilsete kompositsioonide) tootmisel, ning farmatseutilisi kompositsioone (st ravialusele või patsiendile manustamiseks sobivaid kompositsioone), mida saab kasutada üheannuseliste ravimvormide valmistamisel. Sellised kompositsioonid sisaldavad profülaktiliselt või terapeutiliselt efektiivses koguses siin avaldatud profülaktilist ja/või raviainet või nende ainete kombinatsiooni ja farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat. Eelistatult sisaldavad kompositsioonid profülaktiliselt või terapeutiliselt efektiivses koguses leiutisekohaseid antikehi ja farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat.

[0352] Ühes konkreetses teostuses, mis kuulub määratletud patendinõudluse ulatusse, sisaldab farmatseutiline kompositsioon terapeutiliselt efektiivses koguses antikeha või selle fragmenti, mis seob Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või selle fragment seob Fc γ RIIA-d, tsütotoksilist antikeha, mis seob spetsiifiliselt vähi antigeeni ja farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat. Ühes teises teostuses, mis kuulub määratletud patendinõudluse ulatusse, sisaldab nimetatud farmatseutiline kompositsioon lisaks ühte või mitut vähivastast ainet.

[0353] Ühel konkreetsel juhul tähendab väljend „farmatseutiliselt vastuvõetav” seda, et see on heaks kiidetud föderaalse või riigivalitsuse regulatiivasutuse poolt või seda nimetatakse USA farmakopöas või muudes üldtunnustatud farmakopöades kui ainet, mis on mõeldud loomadel ja konkreetselt inimestel kasutamiseks. Termin „kandja” osutab lahjendile, adjuvandile (näiteks Freundi adjuvant (täielik ja mittetäielik)), abiainele või vehiikulile, millega ravimit manustatakse. Sellised farmatseutilised kandjad võivad olla steriilsed vedelikud, nagu näiteks vesi ja õlid, sealhulgas nafta-, loomsed, taimsed või sünteetilist päritolu õlid, näiteks maapähkliõli, sojaõli, mineraalõli ja seesamiõli. Farmatseutilise kompositsiooni intravenoosse manustamise korral on eelistatud kandja vesi. Vedelate kandjatena, eriti süstitavates lahustes, võib kasutada ka soolalahuseid ja veepõhiseid dekstroosi ja glütserooli lahuseid. Sobivate farmatseutiliste abiainetete hulka kuuluvad tärklis, glükoos, laktoos, sahharoos, želatiin, linnased, riis, jahu, kriit, silikageel, naatriumstearaat, glütseroolmonostearaat, talk, naatriumkloriid, lõssipulber, glütserool, propüleen, glükool, vesi ja etanool. Soovi korral võivad kompositsioonid sisaldada ka väikeses koguses määrgavaid aineid või emulgaatoreid või pH puhveraineid. Need kompositsioonid võivad olla lahuste, suspensioonide, emulsioonide, tablettide, pillide, kapslite, pulbrite ja toimeainet püsivalt vabastavate preparaatide kujul.

[0354] Üldiselt tarnitakse leiutisekohaste kompositsioonide koostisosasid eraldi või kokkusegatult ühikannuse kujul, näiteks kuiva lüofiliseeritud pulbri või veevaba kontsentraadina hermeetiliselt suletud pakendis, nagu näiteks ampullis või kotikeses, millele on märgitud toimeaine kogus. Kui kompositsiooni manustatakse infusiooni teel, siis võib seda doseerida infusioonipudeliga, mis sisaldab steriilset farmatseutiliseks kasutamiseks ette nähtud vett või soolalahust. Kui kompositsiooni manustatakse süstimise teel, siis võib kasutada süstimiseks mõeldud steriliseeritud vee või soolalahuse ampulli, et koostisosad enne manustamist kokku segada.

[0355] Leiutisekohaseid kompositsioone võib valmistada neutraalsetes vormides või sooladena. Farmatseutiliselt sobivate soolade hulka kuuluvad mittepäästavad need, mis on valmistatud anioonidega, näiteks ühendid, mis on tuletatud vesinikkloriid-, fosfor-, etaan-, oksaal- või viinhappest jne ning need, mis on valmistatud katioonidega, näiteks ühendid, mis on tuletatud naatriumist, kaaliumist, ammoniumist, kaltsiumist, raudhüdrosiididest, isopropüülamiinist, trietüülamiinist, 2-etüülaminoetanoolist, histidiinist, prokaiinist jne.

[0356] Leiutiskirjelduses esitatakse ka farmatseutilised kompositsioonid ja komplektid, mis sisaldavad Fc γ RIIB antagonisti, kasutamiseks B-rakulise pahaloomulise kasvaja või selle ühe või mitme sümptomi ennetamisel, ravimisel, kontrolli all hoidmisel või paremaks muutmisel. Konkreetsemalt öeldes esitatakse leiutiskirjelduses farmatseutilised kompositsioonid ja komplektid, mis sisaldavad Fc γ RIIB antagonisti, selle analoogi, derivaati või Fc γ RIIB vastast antikeha või selle antigeeni siduvat fragmenti.

5.5.2. GEENITERAAPIA

[0357] Nukleiinhappeid, mis sisaldavad antikehi või liitvalke kodeerivaid järjestusi, võib manustada haiguse, häire või infektsiooniga seotud ühe või mitme sümptomi ravimiseks, ennetamiseks või paremaks muutmiseks geeniteraapia abil. Geeniteraapia osutab teraapiale, mida viiakse läbi ravialusele ekspresseeritud või ekspresseeritava nukleiinhappe manustamise teel. Nukleiinhapped toodavad nende endi poolt kodeeritud antikeha või liitvalku, mis vahendab terapeutilist või profülaktilist mõju.

15

[0358] Siin võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud geeniteraapia meetodeid. Näitlikke meetodeid on kirjeldatud allpool.

[0359] Geeniteraapia meetodite kohta üldise ülevaate saamiseks vt Goldspiel *et al.*, 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488–505; Wu ja Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87–95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573–596; Mulligan, *Science* 260: 926–932 (1993); Morgan ja Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191–217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5): 155–215; ja Scholl, 2003, *J. Biomed Biotechnol* 2003: 35–47. Rekombinantse DNA tehnoloogia tehnika tasemes laialdaselt tuntud meetodeid, mida võib kasutada, on kirjeldatud publikatsioonides Ausubel *et al.* (toim.), „Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons, NY (1993); ja Kriegler, „Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual”, Stockton Press, NY (1990).

[0360] Leiutisekohane kompositsioon võib sisaldada antikeha kodeerivaid nukleiinhappeid, kus nimetatud nukleiinhapped on ekspressioonivektori osa, mis ekspresseerib antikeha sobivas peremeesorganismis. Konkreetsemalt on sellistel

30

- nukleiinhapetel promootorid, eelistatavalt heteroloogsed promootorid, mis on toimivalt seotud antikeha kodeeriva piirkonnaga, kusjuures nimetatud promootor on indutseeritav või konstitutiivne ning vajaduse korral koespetsiifiline. Kasutamiseks sobivad nukleiinhappe molekulid, milles antikeha kodeerivaid järjestusi ja mis tahes muid soovitud järjestusi flankeeritakse piirkondadega, mis soodustavad homoloogset rekombineerimist soovitud asukohas genoomis, pakkudes seeläbi antikeha kodeerivate nukleiinhapete kromosoomisest ekspressiooni (Koller ja Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932–8935; ja Zijlstra *et al.*, 1989, *Nature* 342: 435–438).
- 5
- 10 **[0361]** Leiutisekohane kompositsioon võib sisaldada liitvalku kodeerivaid nukleiinhappeid, kus nimetatud nukleiinhapped on ekspressioonivektori osa, mis ekspresseerib liitvalku sobivas peremeesorganismis. Konkreetsemalt on sellistel nukleiinhapetel promootorid, eelistatavalt heteroloogsed promootorid, mis on toimivalt seotud liitvalgu kodeeriva piirkonnaga, kusjuures nimetatud promootor on indutseeritav
- 15 või konstitutiivne ning vajaduse korral koespetsiifiline. Ühel teisel juhul kasutatakse nukleiinhappe molekule, milles liitvalgu kodeerivat järjestust ja mis tahes muid soovitud järjestusi flankeeritakse piirkondadega, mis soodustavad homoloogset rekombineerimist soovitud asukohas genoomis, pakkudes seeläbi liitvalgu kodeerivate nukleiinhapete kromosoomisest ekspressiooni.
- 20
- [0362]** Nukleiinhapete toimetamine ravaluse organismi võib olla vahetu, st ravalune viiakse vahetult kokku nukleiinhappe või nukleiinhapet kandvate vektoritega, või kaudne, millisel juhul muundatakse rakud kõigepealt nukleiinhapetega *in vitro* ja seejärel siiratakse ravaluse organismi. Need kaks lähenemisviisi on tuntud vastavalt kui *in vivo*
- 25 või *ex vivo* geeniteraapia.
- [0363]** Nukleiinhappejärjestusi võib manustada vahetult *in vivo*, kus neid ekspresseeritakse kodeeritud produkti tootmiseks. Selle saavutamiseks võib kasutada mis tahes tehnika tasemes tuntud arvukaid meetodeid, näiteks konstrueerides neid sobiva
- 30 nukleiinhappe ekspressioonivektori osana ja manustades seda, nii et need muutuvad rakusisesteks, näiteks defektiivseid või atenueeritud retroviirus- või muid viirusvektoreid kasutades (vt patent US 4 980 286), või süstides vahetult paljast DNA-d, või kasutades mikroosakestega pommitamist (näiteks geenipüstoliga; Biolistic, Dupont), või kattes neid

lipiidide või rakupinna retseptorite või transfekteerivate ainetega, kapseldades liposoomidesse, mikroosakestesse või mikrokapslitesse, või manustades neid peptiidiga seotult, mis teadaolevalt suudab siseneda rakutuuma, manustades seda ligandiga seotult, mis läbib retseptori vahendatud endotsütoosi (vt näiteks Wu ja Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429–4432) (mida võib kasutada retseptoreid spetsiifiliselt ekspresseerivate rakutüüpide märklauaks seadmiseks) jne. Võib moodustada nukleiinhappe ja ligandi komplekse, milles nimetatud ligand sisaldab fusogeenset viiruse peptiidi endosoomide häirimiseks, võimaldades nukleiinhappel vältida lüsosoomaalset lagunemist. Nukleiinhapet võib sihtmärgistada *in vivo* rakuspetsiifilise omastamise ja ekspressiooni jaoks, sihtmärgistades spetsiifilist retseptorit (vt näiteks USA patenditaotluse publikatsioon nr 2005/0002903; PCT publikatsioonid WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188; WO 93/20221). Alternatiivselt võib nukleiinhappe sisestada rakusiseselt ja see võib olla hõlmatud peremeesraku DNA-s ekspresseerimiseks homoloogse rekombineerimise teel (Koller ja Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932–8935; ja Zijlstra *et al.*, 1989, *Nature* 342: 435–438).

[0364] Kasutada võib viirusvektoreid, mis sisaldavad antikeha või liitvalku kodeerivaid nukleiinhappe järjestusi. Näiteks võib kasutada retroviirusvektorit (vt Miller *et al.*, 1993, *Meth. Enzymol.* 217: 581–599). Need retroviirusvektorid sisaldavad viiruse genoomi veatuks pakkimiseks ja peremeesraku DNA-sse sisestamiseks vajalikke komponente. Geeniteraapias kasutatavad antikeha või liitvalku kodeerivad nukleiinhappejärjestused kloonitakse ühte või mitmesse vektorisse, mis lihtsustab nukleotiidsel järjestusel sisestamist ravialuse organismi. Üksikasjalikumad teavet retroviirusvektorite kohta võib leida publikatsioonist Boesen *et al.*, (1994, *Biotherapy* 6: 291–302), milles kirjeldatakse retroviirusvektori kasutamist *mdr1* geeni sisestamiseks hematopoeetilistesse tüvirakkudesse, et suurendada nimetatud tüvirakkude resistentsust keemiaravi suhtes. Teiste retroviirusvektorite kasutamist illustreerivate allikate hulka kuuluvad Clowes *et al.*, 1994, *J. Clin. Invest.* 93: 644–651; Klein *et al.*, 1994, *Blood* 83: 1467–1473; Salmons ja Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4: 129–141; ja Grossman ja Wilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3: 110–114.

[0365] Adenoviirused on teised viirusvektorid, mida võib geeniteraapias kasutada. Adenoviirused on eriti head vahendid geenide kohaletoimetamiseks hingamisteede

epiteelkoesse. Adenoviirused nakatavad looduslikult hingamisteede epiteelkude, kus nad põhjustavad kergekujulist haigust. Teiste adenoviirustel põhinevate kohaletoimetamise süsteemide sihtmärkide hulka kuuluvad maks, kesknärvisüsteem, endoteelirakud ja lihased. Adenoviiruste eelisteks on võime nakatada mittejagunevaid rakke. Kozarsky ja Wilson (*Current Opinion in Genetics and Development* 3: 499–503,1993) annavad ülevaate adenoviirustel põhinevast geeniteraapiast. Publikatsioonis Bout *et al.*(*Human Gene Therapy* 5: 3–10,1994) demonstreeriti adenoviirusvektorite kasutamist geenide ülekandmiseks reesusmakaagi hingamisteede epiteeli. Geeniteraapias adenoviiruste kasutamise teisi juhte võib leida publikatsioonidest Rosenfeld *et al.*, 1991, *Science* 252: 431–434; Rosenfeld *et al.*, 1992, *Cell* 68: 143–155; Mastrangeli *et al.*, 1993, *J. Clin. Invest.* 91: 225–234; PCT publikatsioon WO94/12649; ja Wang *et al.*, 1995, *Gene Therapy* 2: 775–783. Eelistatult kasutatakse adenoviirusvektoreid.

[0366] Geeniteraapias kasutamiseks on välja pakutud ka adenoviirusega seotud viirust (*adeno-associated virus*, AAV) (vt näiteks Walsh *et al.*, 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204: 289–300 ja USA patent nr 5 436 146).

[0367] Üks teine geeniteraapia lähenemisviis hõlmab geeni ülekannet koekultuuris sisalduvatesse rakkudesse selliste meetodite abil nagu elektroporatsioon, lipofektsioon, kaltsiumfosfaadi vahendatud transfektsioon või viirusinfektsioon. Tavaliselt hõlmab nimetatud ülekandemeetod selekteeritava markeri ülekannet rakkudesse. Seejärel nimetatud rakke selekteeritakse, et isoleerida need rakud, mis on ülekantud geeni omastanud ja ekspresseerivad seda. Seejärel toimetatakse need rakud ravialuse organismi.

[0368] Nukleiinhappe võib sisestada rakku enne tulemuseks saadud rekombinantse raku *in vivo* manustamist. Sellist sisestamist võib läbi viia mis tahes tehnika tasemes tuntud meetodi abil, sealhulgas mittepiiravalt transfektsiooni, elektroporatsiooni, mikrosüsti, nukleiinhappejärjestusi sisaldava viirus- või bakteriofaagi vektoriga nakatamise, rakkude ühendamise, kromosoomi vahendatud geeniülekanne, mikroraku vahendatud geeniülekanne, sferoplastide ühendamise jne abil. Paljud tehnikad on võõrgeenide rakkudesse sisestamise valdkonnas tuntud (vt näiteks Loeffler ja Behr, 1993, *Meth. Enzymol.* 217: 599–618, Cohen *et al.*, 1993, *Meth. Enzymol.* 217: 618–644; ja *Clin. Pharma. Ther.* 29: 69–92, 1985), ning neid võib kasutada leiutiskirjelduse kohaselt,

tingimusel, et selle tulemusel ei häirita vastuvõtivate rakkude vajalikke arengulisi ja füsioloogilisi funktsioone. Kasutatav tehnika peaks võimaldama nukleiinhappe stabiilset ülekannet rakku, nii et nukleiinhape on rakus ekspresseeritav ning eelistatult päritav ja ekspresseeritav raku järglastes.

5

[0369] Saadud rekombinantsete rakkude ravialuse organismi toimetamiseks võib kasutada erinevaid tehnika tasemes tuntud meetodeid. Eelistatult manustatakse rekombinantseid vererakke (näiteks hematopoeetilisi tüvirakke või eellasrakke) intravenoosselt. Kasutamiseks kavandatud rakkude kogus sõltub soovitud mõjust, patsiendi seisundist jne ning seda suudab antud valdkonna asjatundja kindlaks määrata.

10

[0370] Rakud, millesse võib nukleiinhapet geeniteraapia eesmärgil sisestada, hõlmavad mis tahes soovitud ja kättesaadavaid rakutüüpe ning nende hulka kuuluvad mittepiiravalt epiteelirakud, endoteelirakud, keratinotsüüdid, fibroblastid, lihasrakud, hepatotsüüdid; vererakud, nagu näiteks T-lümfotsüüdid, B-lümfotsüüdid, monotsüüdid, makrofaagid, neutrofiilid, eosinofiilid, megakarüotsüüdid, granulotsüüdid; erinevad tüvi- või eellasrakud, eelkõige hematopoeetilised tüvi- või eellasrakud, näiteks need, mis on saadud luuüdist, nabaväädiverest, perifeersest verest, loote maksast jne.

15

20 **[0371]** Eelistatult on geeniteraapias kasutatav rakk ravialuse suhtes autoloogne.

[0372] Ühes näites, kus geeniteraapias kasutatakse rekombinantseid rakke, sisestatakse antikeha või liitvalku kodeerivad nukleiinhappejärjestused rakkudesse, nii et neid ekspresseerivad rakud või nende järglased ning seejärel manustatakse saadud rekombinantseid rakke *in vivo* terapeutilise mõju saavutamiseks. Ühes konkreetses näites kasutatakse tüvi- või eellasrakke. Potentsiaalselt on võimalik vastavalt siin kirjeldatule kasutada mis tahes tüvi- ja/või eellasrakke, mida saab isoleerida ja *in vitro* elus hoida (vt näiteks PCT publikatsioon WO 94/08598; Stemple ja Anderson, 1992, *Cell* 71: 973–985; Rheinwald, 1980, *Meth. Cell Bio.* 21A: 229; ja Pittelkow ja Scott, 1986, *Mayo Clinic Proc.* 61: 771).

25

30

[0373] Geeniteraapia otstarbel sisestatav nukleiinhape võib sisaldada kodeeriva piirkonnaga toimivalt ühendatud indutseeritavat promotorit, mille tulemusel on

nukleiinhappe ekspressioon kontrollitav vastava transkriptsiooni indutseerija olemasolu või puudumisega.

5.5.3. KOMPLEKTID

- 5 [0374] Samuti on kirjeldatud farmatseutilist pakki või komplekti, mis sisaldab ühte või mitut leiutisekohaste antikehadega täidetud mahutit. Lisaks võib nimetatud farmatseutiline pakk või kompleks hõlmata ühte või mitut profülaktilist või raviainet, mis on kasulikud haiguse ravimiseks. Samuti on avaldatud farmatseutiline pakk või kompleks, mis sisaldab ühte või mitut mahutit, mis on täidetud ühe või mitme leiutisekohaste
- 10 farmatseutiliste kompositsioonide koostisosaga. Nimetatud mahutitega võib olla kaasas ka farmatseutiliste või bioloogiliste toodete tootmist, kasutamist või müüki reguleeriva valitsusasutuse poolt ette kirjutatud vormis teatis, mis näitab asutuse heakskiitu toota, kasutada või müüa kompositsiooni inimestele manustamiseks.
- 15 [0375] Samuti on avaldatud komplektid, mida võib kasutada eespool kirjeldatud meetodites. Komplekt võib sisaldada ühte või mitut leiutisekohast antikeha. Komplekt võib lisaks sisaldada ühes või mitmes mahutis ühte või mitut teist profülaktilist või raviainet, mis on kasulikud vähi ravimiseks. Komplekt võib lisaks sisaldada ühte või mitut tsütotoksilist antikeha, mis seovad ühte või mitut vähiga seotud vähi antigeeni. Nimetatud
- 20 teine profülaktiline või raviaine võib olla kemoterapeutikum. Profülaktiline või raviaine võib olla bioloogiline või hormonaalne ravim.

5.6. TERAPEUTILISE KASULIKKUSE ISELOOMUSTAMINE JA DEMONSTREERIMINE

- 25 [0376] Leiutiskirjelduse kohaste farmatseutiliste kompositsioonide või profülaktiliste või raviainete mitmeid aspekte testitakse enne inimestel kasutamist eelistatult *in vitro*, näiteks rakukultuuri süsteemis, ja seejärel *in vivo*, näiteks loomumudeli organismis, näiteks närilise loomumudeli süsteemis soovitud terapeutilise toime osas. Näiteks kuuluvad analüüsimeetodite hulka, mida võib kasutada selleks, et määrata kindlaks, kas spetsiifilise

farmatseutilise kompositsiooni manustamine on näidustatud, rakukultuuri analüüsid, milles patsiendi koeproovi kasvatatakse kultuuris, paljastatakse farmatseutilise kompositsiooni jaoks või viiakse sellega muul viisil kokku ning vaadeldakse sellise kompositsiooni mõju koeproovile, näiteks kasvu ja/või pehmes agaris koloonia moodustumise või tubulaarse võrgu moodustumise inhibeerimist või vähendamist kolmemõõtmelise alusmembraani või rakuvälise maatriksi preparaadis. Koeproovi võib saada patsiendi biopsiast. Test võimaldab tuvastada terapeutiliselt kõige tõhusama(d) profülaktilise(d) või terapeutilise(d) molekuli(d) iga patsiendi jaoks. Alternatiivselt võib patsiendilt saadud rakkude kasvatamise asemel kasutada raviainete ja meetodite sõelumiseks kasvaja või pahaloomulise kasvaja rakuliinide rakke. Erinevatel spetsiifilistel juhtudel võib *in vitro* analüüse läbi viia autoimmuun- või põletikulises häires osalevaid rakutüüpe (näiteks T-rakud) esindavate rakkudega, et määrata kindlaks, kas leiutisekohasel farmatseutilisel kompositsioonil on soovitud mõju sellistele rakutüüpidele. Sellise ellujäämise ja/või kasvu hindamiseks võib kasutada paljusid tehnika tasemes tuntud standardseid analüüse; näiteks võib rakuproliferatsiooni hinnata, mõõtes ³H-tümidini inkorporeerimist, otsese rakkude loendamise, tuvastades muutusi tuntud geenide transkriptsiooniaktiivsuses (nagu proto-onkogenees) (näiteks fos, myc) või rakutsükli markerites; raku elujõulisust võib hinnata trüpaansinisega värvides, diferentseerumist võib hinnata visuaalselt morfoloogiliste muutuste, väiksema kasvu ja/või vähenenud kolooniate moodustumise järgi pehmes agaris või tubulaarse võrgu moodustumise järgi kolmemõõtmelise alusmembraani või rakuvälise maatriksi preparaadis jne. Täiendavate analüüsimeetodite hulka kuuluvad parvega ühendamine, CDC, ADCC ja apoptoosi analüüsid vastavalt tehnika tasemes teadaolevale ja näidetes kirjeldatule.

25

[0377] Profülaktiliste ja/või raviainete kombinatsioone võib enne inimestel kasutamist testida sobivates loomudeli süsteemides. Selliste loomudeli süsteemide hulka kuuluvad mittepiiravalt rotid, hiired, kanad, lehmad, ahvid, sead, koerad, küülikud jne. Kasutada võib mis tahes tehnika tasemes hästi tuntud loomsüsteemi. Profülaktiliste ja/või raviainete kombinatsioone võib testida hiire mudeli süsteemis. Sellise mudeli süsteemid on laialdaselt kasutusel ja valdkonna asjatundjale hästi tuntud. Profülaktilisi ja/või raviaineid võib manustada korduvalt. Protseduuri mitmed aspektid võivad varieeruda,

30

näiteks profülaktiliste ja/või raviainete manustamise ajaline režiim ning see, kas selliseid aineid manustatakse eraldi või seguna.

5 [0378] Siin kirjeldatud meetodites kasutamiseks sobivad eelistatud loomudelid on
näiteks transgeensed hiired, kes ekspresseerivad FcγR-i hiire efektorakkudel, näiteks mis
tahes hiiremudel, mida on kirjeldatud patendis US 5 877 396. Siin kirjeldatud meetodites
kasutamiseks sobivate transgeensete hiirte hulka kuuluvad mittepiiravalt hiired, kes
kannavad FcγRIIIA-d, hiired, kes kannavad inimese FcγRIIA-d, hiired, kes kannavad
inimese FcγRIIB-d ja inimese FcγRIIIA-d, hiired, kes kannavad inimese FcγRIIB-d ja
10 inimese FcγRIIA-d.

[0379] Kui siin kirjeldatud profülaktilisi ja/või raviaineid on testitud loomudelil, võib
neid testida kliinilistes uuringutes, et teha kindlaks nende tõhusus. Selle eesmärgi
saavutamiseks viiakse kliinilised uuringud läbi valdkonna asjatundjale tuntud
15 tavapärastele metodoloogiate kohaselt ning leiutisekohaste kompositsioonide optimaalsed
annused ja manustamisviisid ja toksilisuse profiilid saab kindlaks määrata rutiinse
katsetamise abil.

[0380] Kirjeldatud kombineeritud ravimeetodite põletikuvastase toime kindlaks
20 määramiseks võib kasutada erinevaid põletikulise artriidi katselisi loomudeleid, mis on
tehnikas tasemes tuntud ja kirjeldatud publikatsioonis Crofford L.J. ja Wilder R.L.,
„Arthritis and Autoimmunity in Animals” publikatsioonis „Arthritis and Allied
Conditions: A Textbook of Rheumatology”, McCarty *et al.* (toim.), 30. peatükk (Lee and
Febiger, 1993). Kirjeldatud kombineeritud ravimeetodite põletikuvastase toime
25 hindamiseks võib kasutada ka põletikulise artriidi ja autoimmuunsete reumaatiliste
haiguste katselisi ja spontaanseid loomudeleid. Alljärgnevalt on mõned
analüüsimeetodid välja toodud näidetena ja mittepiiravalt.

[0381] Tehnika tasemes tuntud ja laialdaselt kasutatud peamiste artriidi või põletikulise
30 haiguse loomudelite hulka kuuluvad: adjuvandiga indutseeritud artriidi rotimudelid,
kollageeniga indutseeritud artriidi roti- ja hiiremudelid ja antigeeniga indutseeritud artriidi
roti-, küüliku- ja hamstrimudelid, millest kõiki on kirjeldatud artiklis Crofford L.J. ja
Wilder R.L., „Arthritis and Autoimmunity in Animals” publikatsioonis „Arthritis and

Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology”, McCarty *et al.* (toim.), 30. peatükk (Lee and Febiger, 1993).

[0382] Kirjeldatud kombineeritud ravimeetodite põletikuvastase toime hindamiseks võib
5 kasutada karrageeniga indutseeritud artriidi rotimudelit. Karrageeniga indutseeritud
artriiti on kasutatud ka küülikul, koeral ja seal kroonilise artriidi või põletiku uuringutes.
Terapeutilise tõhususe kindlaks määramiseks kasutatakse kvantitatiivset
histomorfomeetrist hindamist. Sellise karrageeniga indutseeritud artriidi mudeli
kasutamiseks sobivaid meetodeid on kirjeldatud publikatsioonis Hansra P. *et al.*,
10 „Carrageenan-Induced Arthritis in the Rat”, *Inflammation*, 24(2): 141–155, (2000).
Samuti kasutatakse laialdaselt sümosaaniga indutseeritud põletiku loommudeleid
vastavalt tehnika tasemes teadaolevale ja kirjeldatule.

[0383] Kirjeldatud kombineeritud ravimeetodite põletikuvastase toime hindamiseks võib
15 mõõta ka karrageeniga indutseeritud käpaturse inhibeerimist rotil, kasutades selleks
muudetud kujul meetodit, mida on kirjeldatud publikatsioonis Winter C. A. *et al.*,
„Carrageenan-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory
Drugs”, *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* 111, 544–547, (1962). Seda analüüsimeetodit on
kasutatud peamise *in vivo* sõelumismeetodina enamike MSPVR-ide põletikuvastase toime
20 osas ning seda käsitletakse inimesel avaldatavat tõhusust prognoosiva meetodina.
Testitavate profülaktiliste või raviainete põletikuvastast toimet väljendatakse testrühma
tagumise käpa kaalu suurenemise inhibeerimise protsendina võrreldes vehiikuliga
annustatud kontrollrühmaga.

[0384] Lisaks võib siin kirjeldatud kombineeritud ravimeetodite tõhususe hindamiseks
25 kasutada põletikulise soolehaiguse loommudeleid (Kim *et al.*, 1992, *Scand. J.*
Gastroentrol. 27: 529–537; Strober, 1985, *Dig. Dis. Sci.* 30(12 Suppl): 3S–10S).
Haavandiline koliit ja Crohni tõbi on inimese põletikulised soolehaigused, mida saab
loomadel esile kutsuda. Sulfaaditud polüsahhariide, sealhulgas mittepiiravalt
30 amülopektiini, karrageeni, amülopektiinsulfaati ja dekstraansulfaati, või keemilisi
ärritajaid, sealhulgas mittepiiravalt trinitrobenseensulfoonhapet (TNBS) ja äädikhapet
võib manustada loomadele suukaudselt, et kutsuda esile põletikulisi soolehaigusi.

[0385] Kirjeldatud kombineeritud ravimeetodite tõhususe hindamiseks võib kasutada ka astma loomudeleid. Ühe sellise mudeli näide on hiire adoptiivse ülekande mudel, milles TH1 või TH2 vastuvõtivate hiirte provotseerimine õhu kaudu leviva allergeeniga annab tulemuseks TH-efektorraku migratsiooni hingamisteedesse ja seda seostatakse intensiivse neutrofiilse (TH1) ja eosinofiilse (TH2) kopsu limaskestast põletikulise reaktsiooniga (Cohn *et al.*, 1997, *J. Exp. Med.* 186: 1737–1747).

[0386] Kirjeldatud kombineeritud ravimeetodite tõhususe hindamiseks võib kasutada ka autoimmuunhäirete loomudeleid. Autoimmuunhäirete, näiteks 1. tüüpi diabeedi, kilpnäärme autoimmuunsuse, süsteemse erütematoosluupuse ja glomerulonefriidi loomudelid on välja töötatud (Flanders *et al.*, 1999, *Autoimmunity* 29: 235–246; Krogh *et al.*, 1999, *Biochimie* 81: 511–515; Foster, 1999, *Semin. Nephrol.* 19: 12–24).

[0387] Lisaks võib siin avaldatud kombineeritud ravimeetodite profülaktilise ja/või terapeutilise kasulikkuse hindamiseks autoimmuun- ja/või põletikuliste haiguste korral kasutada mis tahes valdkonna asjatundjale tuntud analüüsimeetodeid.

[0388] Leiutisekohaste profülaktiliste ja/või raviprotokollide toksilisust ja tõhusust saab kindlaks määrata standardsete farmatseutiliste protseduuridega rakukultuurides või katseloomadel, et näiteks kindlaks määrata LD₅₀ (surmav annus 50% populatsiooni jaoks) ja ED₅₀ (terapeutiliselt efektiivne annus 50% populatsiooni jaoks). Toksilise ja terapeutilise toime vaheline annuse suhe on terapeutiline indeks ja seda saab väljendada ID₅₀ ja ED₅₀ vahelise suhtena. Eelistatud on profülaktilised ja/või raviained, millel on kõrged terapeutilised indeksid. Kuigi toksiliste kõrvaltoimetega profülaktilisi ja/või raviaineid võib kasutada, tuleks panustada sellise manustamissüsteemi loomisesse, mis suunab nimetatud ained haigestunud koosse, et minimeerida kahjustumata rakkude võimalikke kahjustusi ning seeläbi vähendada kõrvalmõjusid.

[0389] Rakukultuuri analüüsides ja loomuringutest saadud andmeid saab kasutada inimestele kasutamiseks mõeldud profülaktiliste ja/või raviainete annuste vahemiku formuleerimisel. Selliste ainete annused langevad eelistatult tsirkuleerivate kontsentratsioonide vahemikku, mis hõlmab vähese toksilisusega või mittetoksilist ED₅₀. Annused võivad nimetatud vahemikus varieeruda olenevalt kasutatavast ravimvormist

- ning manustamisviisist. Leiutiskirjelduse kohases meetodis kasutatud mis tahes aine puhul saab terapeutiliselt efektiivset annust esialgselt hinnata rakukultuuri analüüsist. Annuse võib formuleerida loomudelites, et saavutada tsirkuleeriva plasmakontsentratsiooni ulatus, mis hõlmab IC_{50} (st testitava ühendi kontsentratsioon, mis saavutab maksimaalselt poole võimalikust sümptomite inhibeerimise ulatusest) rakukultuuris määratu kohaselt. Sellist infot võib kasutada inimestele kasulike annuste täpsemaks määramiseks. Vereplasmas esinevaid kontsentratsioone võib mõõta näiteks kõrgsurvevedelikkromatograafiaga.
- 5
- 10 **[0390]** Leiutisekohaselt kasutatud ravimeetodite vähivastase toime kindlaks määramiseks võib kasutada ka erinevaid vähi uurimiseks kasutatavaid katselisi loomudeleid, näiteks SCID hiiremudelit või inimese ksenograftidega transgeenseid hiiri või karvutuid hiiri, loomudeleid, näiteks hamstreid, küülikuid jne, mis on tehnika tasemes tuntud ja mida on kirjeldatud publikatsioonides „Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug
- 15 Development” (1999, toim. Fiebig ja Burger); „Contributions to Oncology” (1999, Karger); „The Nude Mouse in Oncology Research” (1991, toim. Boven ja Winograd); ja „Anticancer Drug Development Guide” (1997, toim. Teicher).
- [0391]** Kirjeldatud protokolle ja kompositsioone testitakse enne inimestel kasutamist soovitud terapeutilise või profülaktilise toime kindlaks määramiseks eelistatult *in vitro* ja seejärel *in vivo*. Raviaineid ja -meetodeid võib sõeluda kasvaja või pahaloomulise kasvaja rakuliinist saadud rakkude abil. Sellise ellujäämise ja/või kasvu hindamiseks võib kasutada paljusid tehnika tasemes tuntud standardseid analüüse; näiteks võib rakuproliferatsiooni hinnata, mõõtes 3H -tümidiini inkorporeerimist, otsese rakkude
- 25 loendamise, tuvastades muutusi tuntud geenide transkriptsiooniaktiivsuses (nagu proto-onkogenees) (näiteks fos, myc) või rakutsükli markerites; raku elujõulisust võib hinnata trüpaansinisega värvides, diferentseerumist võib hinnata visuaalselt morfoloogiliste muutuste, väiksema kasvu ja/või vähenenud kolooniate moodustamise järgi pehmes agaris või tubulaarse võrgu moodustamise järgi kolmemõõtmelise alusmembraani või rakuvälise
- 30 matriksi preparaadis jne.
- [0392]** Ravis kasutamiseks sobivaid ühendeid võib testida enne inimestel testimist sobivates loomudelites, sealhulgas mittepiiravalt rottidel, hiirtel, kanadel, lehmadel,

ahvidel, küülikutel, hamstritel jne, näiteks eespool kirjeldatud loomudelites. Seejärel võib ühendeid kasutada sobivates kliinilistes uuringutes.

- 5 [0393] Lisaks võib siin avaldatud kombineeritud ravimeetodite profülaktilise ja/või terapeutilise kasulikkuse hindamiseks vähi, põletikulise häire või autoimmuunhaiguse ravimiseks või ennetamiseks kasutada mis tahes valdkonna asjatundjale tuntud analüüsimeetodeid.

5.7. DIAGNOSTILISED MEETODID

- 10 [0394] Leiutisekohaseid märgistatud antikehi võib kasutada diagnostilistel eesmärkidel haiguste, häirete või infektsioonide tuvastamiseks, diagnoosimiseks või jälgimiseks. Samuti on kirjeldatud haiguse, häire või infektsiooni, eelkõige autoimmuunhaiguse tuvastamist või diagnoosimist, mis hõlmab järgnevat: (a) Fc γ RIIB ekspressiooni analüüsimine ravaluse rakkudes või koeproovis, kasutades ühte või mitut antikeha, mis
- 15 seonduvad immunospetsiifiliselt Fc γ RIIB-ga; ja (b) antigeeni taseme võrdlemine kontrolltaseme, näiteks normaalsete koeproovide tasemetega, kusjuures analüüsitud antigeeni taseme suurenemine võrreldes kontrollantigeeni tasemega näitab haigust, häiret või infektsiooni.
- 20 [0395] Leiutisekohaseid antikehi võib kasutada Fc γ RIIB tasemete analüüsimiseks bioloogilises proovis, kasutades selleks siin kirjeldatud või valdkonna asjatundjatele tuntud klassikalisi immunohistoloogilisi meetodeid (vt näiteks Jalkanen *et al.*, 1985, *J. Cell. Biol.* 101: 976–985; Jalkanen *et al.*, 1987, *J. Cell. Biol.* 105: 3087–3096). Muude
- 25 valgu geeniekspressiooni tuvastamiseks kasulike antikehal põhinevate meetodite hulka kuuluvad immuunanalüüsid, näiteks ensüüm-immunosorptsiooni analüüs (ELISA) ja radioimmuunanalüüs (RIA). Antikeha analüüsis kasutamiseks sobivad märgised on tehnika tasemes tuntud ja nende hulka kuuluvad ensüümmärgised, näiteks leeliseline fosfataas, glükoosoksüdaas; radioisotoobid, näiteks jood (¹²⁵I, ¹³¹I), süsinik (¹⁴C), väävel (³⁵S), tritium (³H), indium (¹²¹In) ja tehneetsium (^{99m}Tc); luminescentsmärgised, näiteks
- 30 luminool; ja fluorestsentsmärgised, näiteks fluorestsein ja rodamiin.

[0396] Samuti on kirjeldatud inimesel haiguse, häire või infektsiooni tuvastamist ja diagnoosimist. Diagnoosimine võib hõlmata: a) ravialusele efektiivses koguses märgistatud antikeha manustamist (näiteks parenteraalselt, subkutaanselt või intraperitoneaalselt), mis seondub immunospetsiifiliselt Fc γ RIIB-ga; b) 5 manustamisjärgset ooteperoodi, mis võimaldab märgistatud antikehal eelistatult koonduda ravialuse organismis kohtadesse, kus Fc γ RIIB-d ekspresseeritakse (ning selle aja jooksul kahaneb seondumata märgistatud molekuli kogus taustamüra tasemeni); c) taustamüra taseme määramist; ning d) märgistatud antikeha tuvastamist ravialuse organismis, kus märgistatud antikeha taustamüraast kõrgema taseme tuvastamine näitab, et 10 ravialusel on haigus, häire või infektsioon. Antikeha on märgistatud kuvamise fragmendiga, mis on tuvastatav valdkonna asjatundjale tuntud kuvamissüsteemi kasutades. Taustamüra tuvastamiseks võib kasutada erinevaid meetodeid, sealhulgas märgistatud molekuli mõõdetud koguse võrdlemist konkreetse süsteemi varem kindlaks määratud standardtasemega.

15

[0397] Tehnika tasemes on selge, et diagnostiliste kujutiste saamiseks vajaliku kuvamise fragmendi koguse määrab kindlaks ravialuse suurus ja kuvamissüsteem. Radioisotoopse fragmendi kasutamisel on inimesest ravialuse puhul rakendatava radioaktiivsuse kogus tavaliselt vahemikus 5 kuni 20 milliküriid ^{99m}Tc-d. Märgistatud antikeha kuhjub seejärel 20 eelistatult spetsiifilist valku sisaldavate rakkude asukohta. Kasvajate *in vivo* kuvamist on kirjeldatud publikatsioonis S.W. Burchiel *et al.*, „Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments” (13. peatükk publikatsioonis „Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer”, S.W. Burchiel ja B. A. Rhodes (toim.), Masson Publishing Inc. (1982).

25

[0398] Manustamisjärgne ajavahemik, mille jooksul märgistatud molekul saab ravialuse organismis eelistatult teatud kohtadesse koguneda ja seondumata märgistatud molekuli kogus taustamüra tasemeni kahaneda, võib mitmetest muutujatest, sealhulgas kasutatava määrgise tüübist ning manustamisviisist sõltuvalt olla 6 kuni 48 tundi, 6 kuni 24 tundi või 30 6 kuni 12 tundi. Ühes teises näites on manustamisjärgne ajavahemik 5 kuni 20 päeva või 5 kuni 10 päeva.

[0399] Haiguse, häire või infektsiooni jälgimiseks võib haiguse, häire või infektsiooni diagnoosimise meetodit korrata, näiteks üks kuu pärast esmakordset diagnoosi, kuus kuud pärast esmakordset diagnoosi, üks aasta pärast esmakordset diagnoosi jne.

5 [0400] Märgistatud molekuli olemasolu ravialuse organismis saab tuvastada tehnika tasemes tuntud *in vivo* skaneerimise meetodeid kasutades. Kasutatavad meetodid sõltuvad kasutatava märgise tüübist. Valdkonna asjatundja oskab määrata konkreetse märgise tuvastamiseks sobiva meetodi. Leiutisekohastes diagnostilistes meetodites kasutamiseks sobivate meetodite ja vahendite hulka kuuluvad mittepiiravalt arvutitomograafia (CT),
10 kogu keha hõlmavad uuringud, näiteks positronemissioontomograafia (PET), magnetresonantstomograafia (MRI) ja sonograafia.

[0401] Ühes konkreetses näites märgistatakse molekul radioisotoobiga ning selle tuvastamiseks patsiendi organismis kasutatakse kiirgusele reageerivat kirurgilist
15 instrumenti (Thurston *et al.*, patent US 5 441 050). Ühes teises näites märgistatakse molekul fluorestsentsühendiga ning selle tuvastamiseks patsiendi organismis kasutatakse fluorestsentsile reageerivat skaneerimisinstrumenti. Ühes teises näites märgistatakse molekul positrone emiteeriva metalliga ning selle tuvastamiseks patsiendi organismis kasutatakse positronemissioontomograafiat. Veel ühes teises näites märgistatakse molekul
20 paramagnetilise märgisega ning selle tuvastamiseks patsiendi organismis kasutatakse magnetresonantstomograafiat (MRI).

6. NÄITED

6.1. MONOKLONAALSETE ANTIKEHADE VALMISTAMINE

25 [0402] Hiire monoklonaalne antikeha toodeti kloonist 8B5.3.4 ATCC registreerimisnumbriga PTA-7610. Genereeriti hiire monoklonaalne antikeha, mis seob spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud monoklonaalne antikeha seob Fc γ RIIA-d. Transgeensed Fc γ RIIA hiired (genereeritud dr Ravetchi laboris, Rockefelleri Ülikool) immuniseeriti Fc γ RIIB-ga, mis puhastati 293 rakkude
30 supernatandist, mida oli transfekteeritud inimese Fc γ RIIB retseptori rakuvälise domeeni

kodeeriva cDNA-ga, jäägid 1–180. Nende hiirte põrnarakkudest valmistati hübriidoomi rakuliinid ja neid sõeluti antikehade osas, mis seovad spetsiifiliselt Fc γ RIIB-d suurema afiinsusega, kui nimetatud antikehad seovad Fc γ RIIA-d.

5 **6.2. ANTIKEHADE SÕELUMINE JA ISELOOMUSTAMINE**

6.2.1. MATERJALID JA MEETODID

[0403] Hübriidoomi kultuuridest saadud supernatante sõelutakse Fc γ RIIA või Fc γ RIIB vastase immunoreaktiivsuse osas ELISA analüüsi kasutades. Igal juhul kaetakse plaat 100 ng Fc γ RIIA või Fc γ RIIB-ga süvendi kohta. Retseptori suhtes spetsiifilise antikeha sidumist tuvastatakse hiirevastase kitse HRP-ga konjugeeritud antikehaga, jälgides neeldumist lainepikkusel 650 nm.

[0404] ELISA blokeerimiskatses jälgitakse hübriidoomi supernatandist saadud antikeha võimet blokeerida agregeeritud IgG seondumist Fc γ RIIB-ga. Plaat blokeeritakse sobiva „blokeerimisainega”, pestakse kolm korda (200 μ l süvendi kohta) pesupuhvriga (PBS ja 0,1% Tween-i). Plaati eelinkubeeritakse hübriidoomi supernatandiga 1 tund temperatuuril 37 °C. Pärast blokeerimist lisatakse süvenditele fikseeritud koguses agregeeritud biotinüülitud inimese IgG-d (1 μ g süvendi kohta), et võimaldada agregaadil seonduda Fc γ RIIB retseptoriga. Seda reaktsiooni viiakse läbi kaks tundi temperatuuril 37 °C. Seejärel jälgitakse tuvastamist pärast täiendavat pesemist streptavidiini ja mädarõika peroksüdaasi konjugaadiga, mis tuvastab seotud agregeeritud IgG-d. Neeldumine lainepikkusel 650 nm on proportsionaalne seotud agregeeritud IgG-ga.

[0405] β -heksoosaminidaasi vabanemise analüüsis jälgitakse hübriidoomi supernatandist saadud antikeha võimet inhibeerida Fc γ -indutseeritud β -heksoosaminidaasi vabanemist. RBL-2H3 rakke transfekteeeritakse inimese Fc γ RIIB-ga; rakke stimuleeritakse erinevates kontsentratsioonides hiire F(ab)₂ fragmendi vastase kitse antikehaga vahemikus 0,03 μ g/ml kuni 30 μ g/ml; sensitiseeritakse üksnes hiire IgE-ga (kontsentratsioon 0,01 μ g/ml) või Fc γ RIIB vastase antikehaga. Pärast ühetunnist inkubeerimist temperatuuril 37 °C rakud tseentrifuugitakse; supernatant kogutakse kokku; ja rakud lüüsitakse. Supernatandis

vabanenud β -heksoosaminidaasi aktiivsus määratakse kindlaks kolorimeetrilise analüüsi abil, kasutades *p*-nitrofenüül-*N*-atsetüül- β -D-glükoosaminidaasi. Vabanenud β -heksoosaminidaasi aktiivsust ekspresseeritakse vabanenud aktiivsuse protsendina koguaktiivsuse suhtes.

5

- [0406] **BIAcore analüüs.** Antikeha seondumist CD32A-H¹³¹, CD32A-R¹³¹ või CD32B-ga analüüsiti pinnaplasmonresonantsi abil BIAcore 3000 biosensoril (Biacore AB, Uppsala, Rootsi), kasutades selleks 293H rakkudes ekspresseeritud retseptorite lahustuvaid rakuväliseid domeene. Püüdev antikeha, st hiirevastase kitse Fc-spetsiifilise antikeha F(ab')₂ fragment (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) immobiliseeriti CM-5 sensorkiibil vastavalt tootja poolt soovitatud protseduurile. Lühidalt öeldes aktiveeriti sensorkiibi pinnal olevad karboksüülrühmad lahuse süstimisega, mis sisaldas 0,2M *N*-etüül-*N*-(3-dietüülaminopropüül)karbodiimiidi ja 0,05M *N*-hüdrosüsuktsiinimiidi. Seejärel sisestati F(ab')₂ fragment aktiveeritud CM-5 pinnale 10 mM naatriumatsetaadis, pH 5,0, voolukiirusel 5 μ l/min 420 sekundi jooksul ning seejärel lisati 1 M etanoolamiini desaktiveerimiseks. Sidumiskatsed viidi läbi HBS-P puhvril, mis sisaldas 10 mM Hepes-iti, pH 7,4, 150 mM NaCl-i ja 0,005% P20 pindaktiivset ainet. Iga monoklonaalne antikeha püüti CM-5 kiibile, sisestades selleks 300 nM antikeha lahust voolukiirusel 5 μ l/min 240 sekundi jooksul ning seejärel sisestati monomeersed lahustuvad retseptorid kontsentratsiooniga 100 nM ja voolukiirusel 50 μ l/min 120 sekundi jooksul dissotsiatsiooniajaga 180 sekundit. F(ab')₂ GAM pinna regenereerimine viidi läbi 50 mM glütsiini, pH 1,5, ja 50 mM NaOH impulsiga sisestamise teel. Võrdluskõverate saamiseks sisestati igat lahustuvat retseptorit immobiliseeritud F(ab')₂ GAM pinnale ilma püütud antikehata. Võrdluskõverad arvutati maha ja reaktsioonid normaliseeriti püütud antikeha sama tasemeni. Lahustuvate retseptorite püütud antikehadega seondumise kineetiliste parameetrite saamiseks lahutati sidumiskõverad vastava IgG suhtes vastavates kontsentratsioonides. Saadud kõveraid analüüsiti eraldi ka/kd sobitamise abil. K_D väärtused arvutati nelja kõvera keskmiste tulemustena kahes erinevas kontsentratsioonis.
- [0407] **FACS-ANALÜÜS.** CHO rakud, mis ekspresseerivad Fc γ RIIB-d, värvitakse erinevate antikehadega ja neid analüüsitakse FACS-i abil. Ühes katsete seerias märgistatakse rakud vahetult, et määrata kindlaks, kas monoklonaalsed antikehad tunnevad retseptori ära.

- [0408] FACS-katsetes jälgitakse hübriidoomi supernatandist saadud antikeha võimet blokeerida agregeeritud IgG seondumist Fc γ RIIB-ga. Iga proovi kohta inkubeeritakse ligikaudu 1 miljon rakku (CHO rakud, mis ekspresseerivad Fc γ RIIB-d) jääl 30 minutit 2 μ g isotüübi kontrolli (hiire IgG1) või 8B5.3.4 antikehaga. Rakke pestakse ühe korra
- 5 PBS-i + 1% BSA-ga ning inkubeeritakse 1 μ g agregeeritud biotinüülitud inimese IgG-ga 30 minutit jääl. Rakud pestakse ja lisatakse sekundaarsed antikehad, st hiirevastased kitse FITC antikehad, et tuvastada seotud antikeha, ja konjugeeritud streptavidiin-PE, et tuvastada seotud agregeeritud biotinüülitud inimese IgG, ning inkubeeritakse jääl 30 minutit. Rakud pestakse ja neid analüüsitakse FACS-i abil.
- 10
- [0409] B-lümfotsüüdid värvitakse, et tuvastada Fc γ RIIB ja CD20 olemasolu. Iga proovi kohta inkubeeritakse 200 μ l trombotsüütide-leukotsüütide kontsentrati jääl 2 μ g isotüübi kontrolli või monoklonaalsete antikehadega 8B5.3.4. Rakke pestakse ühe korra PBS-i + 1% BSA-ga ja inkubeeritakse 1 μ l hiirevastase kitse PE antikehaga jääl 30 minutit. Rakke
- 15 pestakse ühe korra ja proovidele lisatakse CD20 vastane FITC antikeha (2 μ g) ning neid inkubeeritakse jääl 30 minutit. Kõiki proove pestakse ühe korral PBS-i + 1% BSA-ga ning rakke analüüsitakse FACS-i abil.
- [0410] Inimese PBMC-sid värvitakse 8B5.3.4 ja IV.3 antikehadega ning seejärel hiire tsüaniini (Cy5) vastase kitse konjugeeritud antikehaga (kahe värviga värvimine, kasutades CD20 vastast FITC konjugeeritud antikeha B-lümfotsüütide jaoks, CD14 vastast PE konjugeeritud antikeha monotsüütide jaoks, CD56 vastast PE konjugeeritud antikeha NK-rakkude jaoks ja CD16 vastast PE konjugeeritud antikeha granulotsüütide jaoks).
- 20
- [0411] ADCC ANALÜÜS. 4–5 \times 10⁶ märklaudrakku, mis ekspresseerivad Her2/neu antigeeni (IGROV-1 või SKBR-3 rakud), märgistatakse *bis*(atsetoksümetüül)-2,2': 6',2"-terpüridiin-t-6"-dikarboksülaadiga (DELFLIA BATDA reagent, Perkin Elmer/Wallac). BATDA reagent lisatakse rakkudele ja saadud segu inkubeeritakse temperatuuril 37 °C eelistatult 5% CO₂ tingimustes vähemalt 30 minutit. Seejärel pestakse rakud füsioloogilise
- 25 puhvri, näiteks PBS-iga, millele on lisatud 0,125 mM sulfiinpüraasooli, ja söötmega, mis sisaldab 0,125 mM sulfiinpüraasooli. Märgistatud märklaud-rakud lisatakse efektorrakkudele, näiteks PBMC-dele, et saada efektori ja märklauda suhted ligikaudu 50 :
- 30 1, 75 : 1 või 100 : 1. PBMC isoleerimiseks pannakse Ficoll-Hypaque seadmele (Sigma) ja

tsentrifuugitakse toatemperatuuril 30 minutit kiirusel 500 g. Leukotsüütide kiht kogutakse kokku efektoritena euroopiumil põhinevate ADCC analüüside jaoks. Külmutatud või värskelt isoleeritud uhutud monotsüüte (Advanced Biotechnologies, MD) kasutatakse efektoritena kasvaja märklaud-rakuliinidega erinevates efektori ja märklauda suhetes 100 : 1 kuni 10 : 1 ning antikehade kontsentratsioon on titreeritud vahemikust 1–15 µg/ml. Tsütokiinidega stimuleeritud külmutatud lähtelahuste kujul saadud monotsüüte kasutatakse efektorrakkudena ADCC analüüsid. Kui külmutatud monotsüüdid toimivad optimaalselt, siis kasutatakse neid rutiinselt, vastasel korral kasutatakse värsked rakke. MDM valmistatakse tsütokiinidega GM-CSF või M-CSF töötlemise teel, mis teadaolevalt parandavad monotsüütide elujõulisust ja diferentseerumist kultuuris. MDM-i stimuleeritakse tsütokiinidega ja erinevate FcγR-ide (I, IIA, IIB ja IIIA) ekspressioon määratakse kindlaks FACS analüüsiga.

[0412] Efektor- ja märklaudrakke inkubeeritakse vähemalt kaks tundi ja kuni 16 tundi temperatuuril 37 °C 5% CO₂ tingimustes kasvajakasvatase antikeha juuresolekul, mis on spetsiifiline märklaudrakkudel ekspresseeritava antigeeni Her2/neu antigeeni suhtes, ja FcγRIIB vastase antikeha juuresolekul või puudumisel. Kimäärset 4D5 antikeha, mis on konstrueeritud selliselt, et see sisaldab N297A mutatsiooni, kasutatakse negatiivse kontrollina, kuna see antikeha seob märklaud-kasvajakasvatase selle varieeruva piirkonna kaudu. Glükosüülimise kaotus selles kohas kaotab antikeha Fc piirkonna seondumise FcγR-iga. Kaubanduslikult kättesaadav IgG1/k toimib isotüübi kontrollina FcγRIIB vastase antikeha puhul. Raku supernatandid kogutakse kokku ja lisatakse happelisele euroopiumi lahusele (näiteks DELFIA euroopiumi lahus, Perkin Elmer/Wallac). Moodustatud euroopiumi-TDA kelaatide fluorestsents kvantifitseeritakse aeglahutusega fluoromeetril (näiteks Victor 1420, Perkin Elmer/Wallac). Maksimaalse vabanemise (MR) ja spontaanse vabanemise (SR) kindlaks määramiseks inkubeeritakse rakke vastavalt 1% TX-100 ja üksnes söötmega. Antikehast sõltumatu rakulise tsütotoksilisuse (AICC) mõõtmiseks inkubeeritakse märklaud- ja efektorrakke antikeha puudumisel. Iga analüüs viiakse eelistatult läbi kolmes korduses. Spetsiifilise lüüsi keskmine protsent arvutatakse järgmiselt: Katseline vabanemine (ADCC) – AICC) / (MR – SR) × 100.

6.2.2. 8B5.3.4 KLOONIST TOODETUD MONOKLONAALSE ANTIKEHA ISELOOMUSTAMINE

[0413] 8B5.3.4 kloonist toodetud antikeha vahetu seondumine FcγRIIA ja FcγRIIB-ga.

8B5.3.4 kloonist toodetud monoklonaalse antikeha 8B5.3.4 vahetut seondumist FcγRIIA ja FcγRIIB-ga võrreldi ELISA analüüsi abil, kasutades FcγRIIA ja FcγRIIB-ga kaetud plaate (tabel 8 ja joonis fig 1). 8B5.3.4 hübriidoomi kloonist saadud supernatanti, mis sisaldas MAb 8B5.3.4, testiti (kahes korduses) FcγRIIA ja FcγRIIB-ga spetsiifilise seondumise osas. Hübriidoomi kloonist 8B5.3.4 saadud supernatandil oli FcγRIIB suhtes märkimisväärselt kõrgem afiinsus kui FcγRIIA suhtes, mida näitasid kõrgemad neeldumise väärtused võrreldes positiivsete ja negatiivsete kontrollidega tabelis 8 (joonis fig 1).

TABEL 8. ELISA analüüsi tulemused hübriidoomi klooni 8B5.3.4 poolt toodetud monoklonaalse antikeha 8B5.3.4 FcγRIIA ja FcγRIIB-ga seondumise iseloomustamiseks. Iga näite kohta on esitatud neeldumise väärtused (kahes korduses) lainepikkusel 650 nm.

15

	CD32A-ga kaetud süvendid	CD32B-ga kaetud süvendid
8B5.3.4	0,094	2,044
	0,092	2,028
Negatiivne kontroll	0,071	0,074
	0,065	0,078
Positiivne kontroll	0,340	0,332
	0,352	0,308

[0414] 8B5.3.4 kloonist toodetud monoklonaalse antikeha 8B5.3.4 isotüübi määramine.

MAb 8B5.3.4 isotüüp määrati kindlaks ELISA analüüsi abil (tabel 9 ja joonis fig 2). Antikehasid analüüsiti erinevate näidatud isotüüpide vastu. Joonisel fig 2 välja toodud neeldumise väärtused näitavad, et IgG, IgG1 ja kapa vastastel antikehadel on monoklonaalse antikehaga 8B5.3.4 kõrgeim reaktiivsus, mis näitab, et monoklonaalsel antikehal 8B5.3.4 on IgG1/kapa isotüüp.

20

[0415] TABEL 9. ELISA analüüsi tulemused hübriidoomi kloonid 8B5.3.4 toodetud monoklonaalse antikeha 8B5.3.4 isotüübi iseloomustamiseks. Näidatud antikeha isotüübi kohta on neeldumise väärtused esitatud lainepikkusel 650 nm.

Antikeha isotüüp	Neeldumine lainepikkusel 650 nm
IgG	2,828
IgG3	0,165
IgM	0,105
IgG2a	0,246
IgG2b	0,213
IgG1	2,488
IgA	0,363
kapa	0,511

5

6.2.3. IN VIVO ADCC ANALÜÜSID

6.2.3.1. FcγRIIB ANTIKEHADE AKTIIVSUS KSENOGRAFTI HIIREMUDELITES INIMESE KASVAJA RAKULIINE KASUTADES

[0416] Munasarja- ja rinnakartsinoomi ksenografti mudelite valmistamiseks kasutatakse kuue kuni kaheksa nädala vanuseid emaseid Balb/c karvutuid hiiri (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME; Taconic). Ksenografti mudeli valmistamiseks majutatakse hiired teise klassi bioohutuse tasemega rajatistesse, kasutades kasvajate allikatena astsiitidest tuletatud munasarjavähi rakke ja rinnakelme efusioonist tuletatud rinnavähi rakke. Hiired paigutatakse nende katsete jaoks neljast hiirest koosnevatesse rühmadesse ja neid jälgitakse kolm korda nädalas. Registreeritakse hiirte kehakaalusid ja ellujäämise aega ning kasvavate kasvajate kriteeriumid on kõhupuhitus ja tuntavad kasvajad. Hiirtele, kes näitavad nähtava ebamugavuse märke või kelle kasvaja kaal jõuab 5 grammini, tehakse süsinikdioksiidiga eutanaasia ja nad lahatakse. Antikehaga ravitud loomad pannakse jälgimise alla veel kaheks kuuks pärast kontrollrühma.

- [0417]** *Ksenograafi kasvajakasvatamise moodustamine kasvaja rakuliinidega.* Ksenograafi kasvajakasvatamiseks süstitakse 5×10^6 elujõulist IGROV-1 või SKBR-3 raku subkutaanselt kolmele vanuse ja kehakaalu poolest kattuvale emasele karvutule atüümilisele hiirele Matrigel-iga (Becton Dickinson). Kasvaja hinnanguline kaal arvutatakse järgmise valemi abil: $\text{pikkus} \times (\text{laius})^2 / 2$, mis ei ole rohkem kui 3 grammi. Rakkude *in vivo* läbilaskmiseks nende laiendamise eesmärgil isoleeritakse ankrust sõltuv kasvaja ja rakud eraldatakse 1 μg kollagenaasi (Sigma) kasvaja grammi kohta lisamise teel temperatuuril 37 °C üle öö.
- 10 **[0418]** IGROV-1 rakkude subkutaanne süstimine põhjustab kiiresti kasvavaid kasvajakasvatusi, samas kui intraperitoneaalne viis kutsub esile peritoneaalset kartsinomatoosi, mis tapab hiired kahe kuuga. Kuna IGROV-1 rakud moodustavad kasvajakasvatusi 5 nädala jooksul, siis esimesel päeval pärast kasvajakasvatamist süstitakse monotsüüdid kui efektorid intraperitoneaalselt koos terapeutiliste antikehadega ch4D5 ja ch8B5.3.4
- 15 kontsentratsiooniga 4 μg hiire kehakaalu iga grammi kohta (mbw) (tabel 10). Esimesele süstile järgnevad antikehade kord nädalas tehtavad süstid 4–6 nädala jooksul. Inimese efektorrakke täiendatakse kord kahe nädala jooksul. Üks hiirte rühm ei saa terapeutilist antikeha, kuid neile süstitakse ch4D5 N297A-d ja inimese IgG1 isotüübi kontrollantikehadena vastavalt kasvajakasvatusele ja ch8B5.3.4 antikeha jaoks.
- 20 **[0419]** TABEL 10. Kasvaja kliirensi uuringute ülesehitus, milles kasutatakse Her2neu vastast kimäärset antikeha ch4D5 ja Fc γ RIIB vastast kimäärset antikeha ch8B5.3.4 (või Fc γ RIIB vastast humaniseeritud antikeha (h8B5.3.4)) ksenograafi kasvajakasvatamisel karvututel hiirtel, kasutades ADCC efektorrakkudena adoptiivselt ülekantud inimese
- 25 monotsüüte. MBW (hiire kehakaal).

8	Kasva- hiirt/r ühm	Kasva- jarakud, subku- taanselt 0. päeval	Mono- tsüüdid, intra- peri- tone- aalselt 1. päeval	ch4D5 kontsent- ratsioonis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta, 1. päeval intraperito- neaalselt	ch4D5 N297A kontsentratsio onis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta, 1. päeval intra- peritoneaalselt	ch8B5.3.4 N297A kontsentratsio onis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta, 1. päeval intraperitonea alselt	Inimese IgG1 kontsentratsi oonis 4 µg hiire kehakaalu grammi kohta, 1. päeval intraperitonea alselt
A	+	-	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-	-
C	+	+	+	-	-	-	-
D	+	+	+	-	+	-	-
E	+	+	-	-	+	-	-
F	+	+	-	+	-	+	+

[0420] Tabelis 10 esitatud andmete kohaselt on kuut kaheksast hiirest koosnevat rühma
vaja testida FcγRIIB vastase antikeha kasvaja kliirensis esineva rolli osas ühe märklaua ja
5 efektori kombinatsiooni ja antikehade kontsentratsioonide kahe erineva
kombinatsiooniga. Need rühmad on A) kasvajakud, B) kasvajakud ja monotsüüdid,
C) kasvajakud, monotsüüdid ja kasvaja vastane antikeha ch4D5, D) kasvajakud,
monotsüüdid, kasvajavastane antikeha ch4D5 ja FcγRIIB vastane antikeha, näiteks
ch8B5.3.4, E) kasvajakud, monotsüüdid ja FcγRIIB vastane antikeha, näiteks
10 ch8B5.3.4, ja F) kasvajakud, monotsüüdid ch4D5 N297A ja inimese IgG1. Sarnastes
skeemides võib testida antikeha kontsentratsiooni erinevaid kombinatsioone.

[0421] Uuringud, milles kasutatakse rinnavähi rakuliini SKBR-3 viiakse paralleelselt läbi
IGROV-1 mudeliga, kuna SKBR-3 rakud ületavad Her2/neu-d. See suurendab
15 FcγRIIB vastase antikeha kasvaja kliirensis esineva rolli hindamise rangust. IGROV-1

rakkudega saadud kasvaja kliirensi uuringute tulemusel tehakse modifikatsioone tulevaste teiste märklaudadega tehtavate katsete ülesehitusse.

[0422] Ksenograafi kasvajamudeli lõpp-punkt määratakse kindlaks tabelis 10 välja toodud 5 iga rühma kasvajate suuruse (hiirte kehakaal), ellujäämisaja ja histoloogia aruande alusel. Hiiri jälgitakse kolm korda nädalas; kasvavate kasvajate kriteeriumid on kõhupuhitus ja tuntavate masside olemasolu kõhuõõnes. Arvutatakse kasvaja massi prognoosid inokulatsioonist möödunud päevade arvu suhtes. Fc γ RIIB vastaste antikehade roll kasvaja kliirensi parandamisel määratakse kindlaks nende kolme kriteeriumi alusel tabelis 10 välja 10 toodud rühma D hiirtelt võrreldes teiste hiirerühmadega. Hiirtele, kellele esineb nähtavaid valu märke või kelle kasvaja kaal jõuab 5 grammini, tehakse süsinikdioksiidiga eutanaasia ja nad lahatakse. Antikehaga ravitud loomi järgitakse kahe kuu jooksul pärast seda ajahetke.

15 **6.2.3.2. FC γ RIIB ANTIKEHADE IN VIVO AKTIIVSUS KSENOGRAFTI HIIREMUDELIS INIMESE PRIMAARSEST MUNASARJA- JA RINNAKARTSINOOMIST SAADUD RAKKUDEGA**

[0423] Primaarsed kasvajakud moodustatakse primaarsest munasarja- ja rinnavähist, viies 20 üle kartsinomatoosi all kannatavate patsientide eksudaatidest isoleeritud kasvajakarakud. Selleks et viia need uuringud üle kliinilistesse tingimustesse, hinnatakse ksenograafi mudelit astsiitidest ja rinnakelme efusioonist tuletatud kasvajakarakudega, mis saadi vastavalt kahelt munasarjakartsinoomi ja kahelt rinnakartsinoomi all kannatavalt patsiendilt. Rinnakelme efusiooni kui rinnavähi rakkude allikat ja pahaloomulise rinnakoe siirdamist on edukalt kasutatud ksenograafi hiiremudelite moodustamiseks, vt näiteks 25 Sakakibara *et al.*, 1996, *Cancer J. Sci. Am.* 2: 291. Nendes uuringutes määratakse kindlaks Fc γ RIIB vastase antikeha laiaulatuslikud kasutusvõimalused primaarsete rakkude kasvaja kliirensis. Kasvaja kliirensi testimiseks kasutatakse kasvajavastast antikeha ch4D5 ja Fc γ RIIB vastast antikeha, näiteks ch8B5.3.4 Balb/c karvutute hiirte mudelis adoptiivselt ülekantud inimese monotsüütidega.

[0424] *Inimese astsiitidest ja rinnakelme efusioonist tuletatud primaarsed kasvajakud.* Kasutatakse munasarjavähi all kannatavatelt patsientidelt saadud astsiite ja rinnavähi all kannatavatelt patsientidelt saadud rinnakelme efusioone. Patsientidelt saadud astsiidid ja rinnakelme efusioon võib sisaldada 40–50% kasvajakke ning Her2neu+ kõrge ekspressiooniga kasvajakke kasutatakse ksenograafi mudelite moodustamiseks.

[0425] Astsiitide ja rinnakelme efusiooni proove testitakse enne ksenograafi kasvajakemudeli moodustamist Her2/neu ekspressiooni osas neoplastilistel rakkudel. Määratakse kindlaks neoplastiliste rakkude osakaal võrreldes teiste rakuliste alamkogumitega, mis võivad mõjutada kasvaja mudeli moodustamist. Astsiite ja rinnakelme efusiooni, mis saadi vastavalt munasarja- ja rinnavähi all kannatavatelt patsientidelt, analüüsitakse rutiinselt, et määrata kindlaks Her2/neu+ ekspressiooni tase neoplastilistel rakkudel. Kliinilistes proovides Her2/neu+ neoplastiliste rakkude osakaalu kindlaks määramiseks kasutatakse FACS analüüsi. Her2/neu+ neoplastiliste rakkude kõrge osakaaluga proovid selekteeritakse kasvajakemudeli moodustamiseks Balb/c hiirtel.

[0426] *Histokeemia ja immunohistokeemia.* Munasarjakartsinoomi all kannatavate patsientide astsiitidel ja rinnakelme efusioonil viiakse läbi histokeemilised ja immunohistokeemilised analüüsid, et analüüsida kasvaja struktuurilisi omadusi. Jälgitavad markerid on tsütokeratiin (et tuvastada munasarjakasvaja ja mesotelioomi rakud põletikulistest ja mesenhümaalsetest rakkudest); kalretiniin (et eristada mesotelioomi rakke Her2neu-positiivsetest kasvajakemudelistest); ja CD45 (et eristada põletikulisi rakke ülejäänud proovides sisalduvast rakupopulatsioonist). Täiendavate jälgitavate markerite hulka kuuluvad CD3 (T-rakud), CD20 (B-rakud), CD56 (NK-rakud) ja CD14 (monotsüüdid).

[0427] Immunohistokeemilise värvimise jaoks valmistatakse ette külmutatud lõigud ja parafineeritud koed standardsete tehnikate abil. Külmutatud ja deparafineeritud lõigud värvitakse sarnase värvimisprotokolliga. Kudedes endogeense peroksüdaasi peatamiseks immutatakse slaide 3% vesinikperoksiidis ja pestakse PBS-iga 5 minutit. Lõigud blokeeritakse ja primaarne antikeha ch4D5 lisatakse blokeerimisseerumis 30 minutiks, millele järgneb proovide pesemine PBS-iga kolm korda. Biotiiniga konjugeeritud sekundaarne inimese vastane antikeha lisatakse 30 minutiks ja slaide pestakse PBS-iga 5

minutit. Avidiini ja biotiini peroksüdaasi kompleks (Vector Labs) lisatakse 30 minutiks, millele järgneb pesemine. Värvilmutamiseks inkubeeritakse slaidid värskes substraadi DAB lahuses ja reaktsiooni peatamiseks pestakse neid kraanivees. H ja E-ga värvimiseks slaidid deparafineeritakse ja seejärel hüdreeritakse erinevates alkoholi kontsentratsioonides. Slaidid pestakse kraanivees ja paigutatakse 5 minutiks hematoksüliini. Ülemäärase värvi eemaldamiseks kasutatakse happe ja alkoholi segu, seejärel ammoniaaki ja vett. Slaidid paigutatakse eosini ja sellele järgneb 90 kuni 100% alkoholiga pesemine dehüdreerimiseks. Lõpuks paigutatakse slaidid ksüleeni ja paigaldatakse fiksaatoriga nende pikaajaliseks säilitamiseks. Kõikidel juhtudel määratakse kasvajakude osakaal kindlaks Papanicolaou värvi abil.

[0428] *Histokeemiline värvimine.* Kahelt erinevalt munasarjakartsinoomi all kannatavalt patsiendilt saadud astsiidid värviti hematoksüliini ja eosini (H & E) ja Giemsa-ga, et analüüsida kasvajakude ja teiste rakutüüpide olemasolu.

15

[0429] *Hiiremudelid.* Munasarjakartsinoomi all kannatavalt patsientidelt võetud proovide töötlemiseks tsentrifugeeritakse astsiite kiirusel 6370 g 20 minutit temperatuuril 4 °C, lüüsitakse punaseid vererakke, millele järgneb rakkude pesemine PBS-iga. Igas proovis Her2/neu+ kasvajakude osakaalu alusel selekteeritakse subkutaanse inokulatsiooni jaoks kaks proovi, st keskmine ja kõrge ekspresseerija, et moodustada ksenograafi mudel, et hinnata FcγRIIB vastase antikeha rolli kasvajakliirensis. Varasemate andmete kohaselt moodustavad kasvajakud töötlemata astsiitide rakulisest alamkogumist 40–50% ning pärast puhastamist saadi 2 liitrist astsiitidest ~ 10–50 × 10⁶ kasvajakku (Barker *et al.*, 2001, *Gynecol. Oncol.* 82: 57–63). Isoleeritud astsiidid süstitakse intraperitoneaalselt hiirtele, et laiendada rakke. Ligikaudu 10 hiirt süstitakse intraperitoneaalselt ja iga hiire astsiidid võib lisaks kanda edasi kahele hiirele, et saada kokku 20 hiire astsiidid, mida kasutatakse 80 hiirest koosneva rühma süstimiseks. Rinnakelme efusiooni käsitletakse astsiitidega sarnasel viisil ning Her2/neu+ kasvajakud süstitakse hiirte ülemisse paremasse ja vasakusse udaranäärmesse Matrigelis. Pärast kasvajakude subkutaanset inokulatsiooni jälgitakse hiiri kliiniliste ja anatoomiliste muutuste osas. Vajaduse korral võib hiired lahata, et korreleerida kogu kasvaja koorem spetsiifilise elundi lokaliseerimisega.

25
30

6.3. CD32B-SPETSIIFILISTE MONOKLONAALSETE ANTIKEHADE SÕELUMINE

[0430] CD32B-spetsiifilisi antikehi sõelutakse reaktiivsuse, parvega ühendamise, CDC ja apoptoosi esilekutsumise osas B-rakulise lümfoomi liinides ja B-rakulise pahaloomulise kasvaja all kannatavatelt patsientidelt saadud rakkudes. Rakkude isoleerimist patsientidelt ja reaktiivsuse sõelumist on kirjeldatud eespool.

[0431] *Parvedega ühendamine.* Selleks, et mõõta antikeha võimet käivitada antigeeni ümberjaotumist spetsiaalsetesse membraani mikrodomeenidesse, viiakse sobivalt läbi lipiidide parvedega ühendamine, mõõtes antikeha kogust, mis taastati detergendis lahustumatusse rakufraktsiooni pärast lüüsi 0,5% TX-100-ga temperatuuril 4 °C (Veri *et al.*, 2001, *Mol Cell Bio* 21: 6939–6950; Cragg *et al.*, 2004, *Blood* 103: 2738–43). Ühes tüüpilises teostuses kaetakse rakud jääl huvipakkuva antikehaga ja pestakse. Ühe alikvoodi suhtes viiakse läbi täiendav ristsidumine sobiva sekundaarse antikehaga. Granuleeritud rakkude suhtes viiakse läbi TX-100 detergendiga fraktsioneerimine. Paralleelsed proovid lahustatakse glükopüranosiidiga, mis on detergent, mis teadaolevalt hävitab lipiidide parvi, või vahetult SDS-il põhineva Laemmli proovipuhvriga, et saada rakuga ühendatud antikeha kogukogus. Lahustumatuid fraktsioone analüüsitakse SDS-PAGE-i ja immunoblotanalüüsi abil. Lipiidide parvedesse ümberjaotumine koos täiendava ristsidumisega või ilma selleta registreeritakse densitomeetriliste võrdluste abil.

[0432] *CDC.* CDC hindamiseks kasutatakse ühte mitmest tehnika tasemes tuntud meetodist, näiteks propiidiumjodiidi (PI) eraldamist FACS analüüsis (Cragg *et al.*, 2004, *Blood* 103: 2738–2743) või traditsioonilist radiomärgise vabastamist (näiteks ⁵¹Cr ja ¹¹¹In vabastamist). Lühidalt öeldes inkubeeritakse rakke titreerivates kogustes huvipakkuvate antikehadega 15 minutit temperatuuril 37 °C, seejärel lisatakse seerum (20% lõplikust kontsentratsioonist) komplemendi allikana ja inkubeerimist jätkatakse enne analüüsimist veel 5 minutit. Inimese seerumi kõrge varieeruvuse tõttu kasutatakse standardse komplemendi allikana Pel-Freeze küüliku seerumit. Samuti valmistatakse koondatud normaalse inimese AB seerum. Igat seerumi partiid testitakse kvaliteedi tagamiseks punaste vererakkude lüüsis küüliku seerumi vastu.

[0433] *Apoptoos*. Lahustuvate või plaadil immobiliseeritud CD32B vastaste antikehade poolt esile kutsutud apoptoosi uuritakse standardse FACS-il põhineva metodoloogia abil, kasutades anneksiin-V membraani translokatsiooni ja PI värvimist (Cragg *et al.*, 2004, *Blood* 103: 2738–2743) mitmevärvilises analüüsis, et tuvastada huvipakkuv populatsioon

5 (näiteks Cy5-CD19). Lühidalt öeldes töödeldakse rakke erinevate ajavahemike jooksul (2 kuni 18 tundi) titreerivates kogustes huvipakkuva antikehaga vabas lahuses või 96 süvendiga plaadile immobiliseeritult. Seejärel taastatakse rakud õrnalt kraapimise ja/või tsentrifuugimise teel ja värvitakse 1 ug/ml FITC-i ja anneksiin-V seguga, millele on lisatud 10 ug/ml PI-d, et teha vahet varajase apoptoosi ja sekundaarse nekroosi vahel.

10

6.4. IN VIVO KASVAJA KLIIRENSI UURINGUD LÜMFOOMIDE HIIRE KASVAJA KSENOGRAFTI MUDELITES

[0434] Võime ennetada kasvajaid lümfoomi hiiremudelil on oluline kriteerium, mis võimaldab määrata kindlaks antikeha potentsiaali, et seda saaks kasutada kliinilistes

15 uuringutes.

[0435] NHL-i mudelitena kasutamiseks on kättesaadavad mitmed hästi iseloomustatud Burkitti lümfoomi rakuliinid (Epstein *et al.*, 1966, *J Natl Cancer Inst* 37: 547–559; Klein *et al.*, 1968, *Cancer Res* 28: 1300–1310; Klein *et al.*, 1975, *Intervirology* 5: 319–334;

20 Nilsson *et al.*, 1977, *Intl J Cancer* 19: 337–344; Ohsugi *et al.*, 1980, *J Natl Cancer Inst* 65: 715–718). Lümfoomi ksenografti mudelit on suudetud moodustada karvututel hiirtel sarnaselt varem teatatud mudelitega (Vallera *et al.*, 2003, *Cancer Biother Radiopharm* 18: 133–145; Vuist *et al.*, 1989, *Cancer Res* 49: 3783–3788).

[0436] Lühidalt öeldes siiratakse Burkitti lümfoomi rakuliin Daudi ($5-10 \times 10^6$ rakku) subkutaanselt immuunpuudulikkusega nu/nu hiire tüvesse. BALB/c nu/nu hiire tüve kasutatakse koos adoptiivselt ülekantud inimese PBMC-ga, mis puhastati tervelt doonorilt efektorrakkudena. Valdavat efektorrakkude populatsiooni inimese PBMC-s esindavad NK-rakud, mis avaldavad ADCC-d nende CD16A (FcγRIIIa) kaudu. Samuti kasutatakse

25 nu/nu hiire tüve, milles CD16A geen on välja lülitatud ja mida on geneetiliselt muundatud,

30 et see ekspresseeriks inimese CD16A-d. See CD16A-/-huCD16Atg, nu/nu hiir võimaldab

uurida kasvajakasvatust toimet inimese Fc retseptori kontekstis ning puudub vajadus inimese rakkude adoptiivse ülekande järele.

[0437] Hiiri töödeldakse valitud kimäärseks muudetud antikehaga, süstides seda intraperitoneaalselt 1., 4., 7. ja 15. päeval. Kasutatakse lähteannust 4 ug kehakaalu g kohta, kuid testitakse ka täiendavaid annuseid, et teha kindlaks antikehade suhteline tugevus selles mudelis. Rituksaani ja Campathi kasutatakse võrdlemise eesmärgil. Lisaks uuritakse rituksaani ja Campathiga kombineeritud ravi potentsiaalset sünergia. Nendes uuringutes jälgitakse kasvaja kasvu ja haiguslikkust, et võrrelda antikehaga ravitud ja kontrollrühmi. Hiired hukatakse kohe, kui nad on suremas või uuringu lõpus. Seejärel eemaldatakse kasvajakasv ja viiakse läbi üldine ja mikroskoopiline lahkamine. Tsütopatoloogia parafiinis immutatud lõikudel ja immunohistokeemia külmutatud lõikudel viiakse läbi kasvaja ja rakuliste infiltraatide morfoloogiliseks ja immunoloogiliseks hindamiseks.

Patendinõudlus

1. Isoleeritud antikeha või selle antigeeni siduv fragment, kus nimetatud isoleeritud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment seob spetsiifiliselt loodusliku inimese Fc γ RIIB rakuvälist domeeni suurema afiinsusega, kui nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment seob loodusliku inimese Fc γ RIIA-d, ning kus:

i) nimetatud antikeha on 8B5.3.4 antikeha, mida toodab hübridoomi rakuliin, millel on ATCC registreerimisnumber PTA-7610; või

ii) nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 4, ja kerge ahela varieeruvat domeeni aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 3; või

iii) nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment sisaldab hübridoomi klooni 8B5.3.4, millel on ATCC registreerimisnumber PTA-7610, poolt toodetud antikeha kuut CDR-i, nimetatud kuuel CDR-il on aminohappejärjestused SEQ ID NO: 5–10, kus nimetatud antikeha või antigeeni siduv fragment seondub Fc γ RIIB sama epitoobiga, mida tunneb ära hübridoomi klooni 8B5.3.4 (ATCC registreerimisnumber PTA-7610) toodetud antikeha ning konkureerib nimetatud antikehaga 8B5.3.4 loodusliku inimese Fc γ RIIB-ga seandumisel, ning kus nimetatud antikehal või nimetatud antigeeni siduval fragmendil on dissotsiatsioonikonstant K_d (K_{off}/K_{on}), mis on väiksem kui 5×10^{-9} M lähtuvalt pinnaplasmonresonantsiga kindlaks määratust.

20

2. Antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt nõudluspunktile 1, kus nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment sisaldab hübridoomi klooni 8B5.3.4, millel on ATCC registreerimisnumber PTA-7610, poolt toodetud antikeha kuut CDR-i, nimetatud kuuel CDR-il on aminohappejärjestused SEQ ID NO: 5–10, kus nimetatud antikeha või antigeeni siduv fragment seondub Fc γ RIIB sama epitoobiga, mida tunneb ära hübridoomi klooni 8B5.3.4 (ATCC registreerimisnumber PTA-7610) toodetud antikeha ning konkureerib nimetatud antikehaga 8B5.3.4 loodusliku inimese Fc γ RIIB-ga seandumisel, ning kus nimetatud antikehal või nimetatud antigeeni siduval fragmendil on dissotsiatsioonikonstant K_d (K_{off}/K_{on}), mis on väiksem kui 5×10^{-9} M lähtuvalt pinnaplasmonresonantsiga kindlaks määratust.

30

- 3.** Antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt nõudluspunktile 1, kus nimetatud antikeha on 8B5.3.4 antikeha, mida toodab hübriidoomi rakuliin, mille ATCC registreerimisnumber on PTA-7610.
- 5 **4.** Antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt nõudluspunktile 1 või nõudluspunktile 2, kus nimetatud antikeha on inimese antikeha, monoklonaalne antikeha, üheaahelaline antikeha, bispetsiifiline antikeha või see on humaniseeritud nimetatud 8B5.3.4 antikehast.
- 10 **5.** Antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt nõudluspunktile 1, mis sisaldab raske ahela varieeruvat domeeni aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 4, ja kerge ahela varieeruvat domeeni aminohappejärjestusega SEQ ID NO: 3.
- 15 **6.** Antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt nõudluspunktile 1 või nõudluspunktile 2, millel on Fc domeen, mis sisaldab raske ahela Fc domeenis vähemalt ühte modifikatsiooni.
- 7.** Antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt nõudluspunktile 6, kus antikeha raske ahela Fc domeen sisaldab vähemalt ühte aminohappe asendust positsioonis 240, 243, 20 247, 255, 270, 292, 300, 305, 316, 370, 392, 396, 416, 419 või 421 teise aminohappega selles positsioonis.
- 8.** Antikeha vastavalt nõudluspunktile 7, kus antikeha raske ahela Fc domeenil on leutsiin positsioonis 243, proliin positsioonis 292, leutsiin positsioonis 300, isoleutsiin 25 positsioonis 305 ja leutsiin positsioonis 396.
- 9.** Antikeha fragment vastavalt nõudluspunktile 1 või nõudluspunktile 2, mis on F(ab')₂ fragment või F(ab) fragment.
- 30 **10.** Antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1–9, kus nimetatud antikeha või nimetatud antigeeni siduv fragment on toimivalt seotud heteroloogilise polüpeptiidiga või konjugeeritud raviainega.

11. Antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt nõudluspunktile 10, kus nimetatud raviaine on:

(A) antikeha, mis seondub immunospetsiifiliselt rakupinna retseptoriga, mis ei ole FcγRIIB;

5 või

(B) antikeha, mis seondub immunospetsiifiliselt kasvajaga seotud antigeeniga.

12. Antikeha või selle antigeeni siduv fragment vastavalt nõudluspunktile 1, mis vähendab Ig-Fc seondumist FcγRIIB-ga.

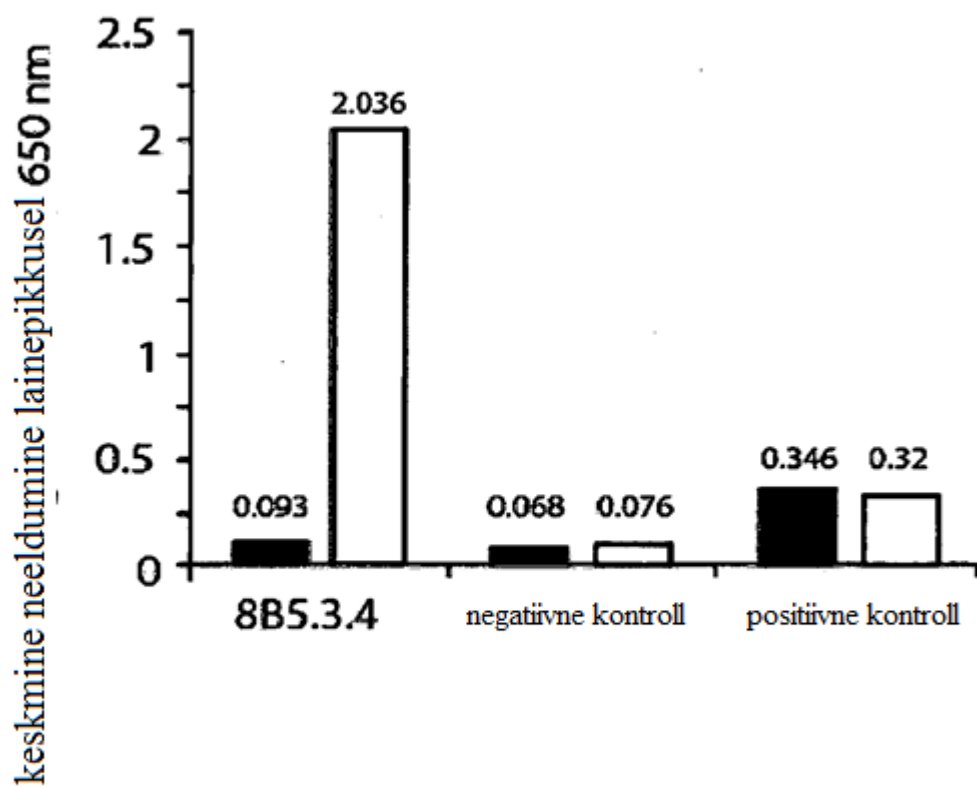
10

13. Farmatseutiline kompositsioon, mis sisaldab (i) terapeutiliselt efektiivses koguses isoleeritud antikeha või selle antigeeni siduvat fragmenti vastavalt mis tahes nõudluspunktile 1–12; ja (ii) farmatseutiliselt vastuvõetavat kandjat.

15 **14.** Farmatseutiline kompositsioon vastavalt nõudluspunktile 13, mis sisaldab lisaks täiendavat ainet, mis on valitud rühmast, kuhu kuuluvad kemoterapeutikum, kiiritusravi aine, hormoonravi aine, immunoterapeutikum, põletikuvastane aine ja immunomoduleeriv aine.

1/4

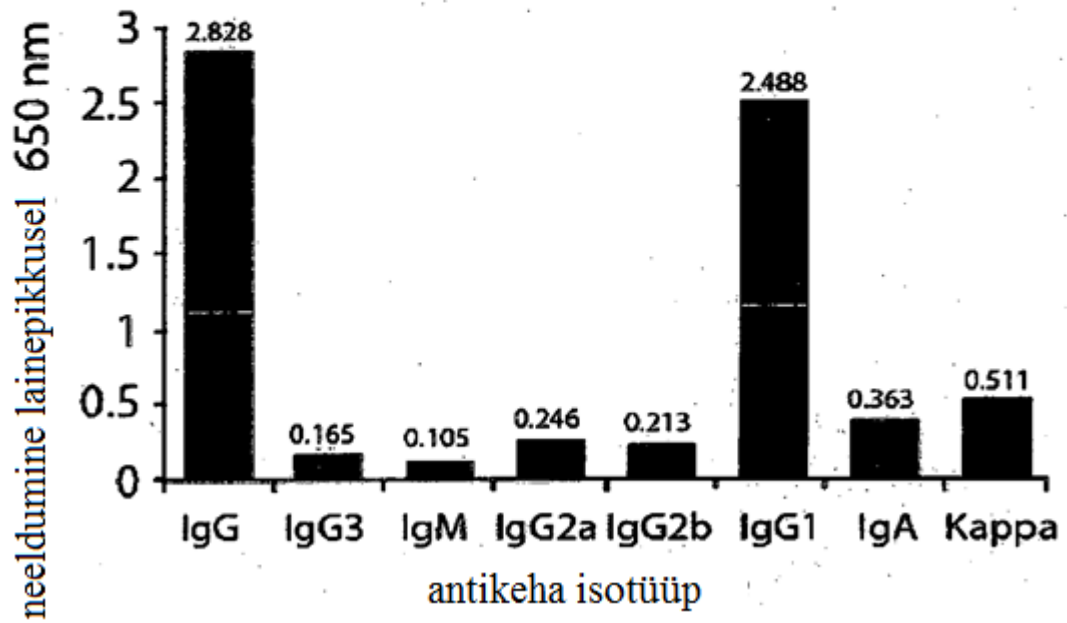
FIG 1



■ CD32A-kaetud süvendid
□ CD32B-kaetud süvendid

2/4

FIG 2



3/4

FIG 3

8B5.3.4 VL nukleotiidne järjestus / aminohappejärjestus

```

gac att cag atg aca cag tct cca tcc tcc cta ctt gcg gcg ctg gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Gly
1           5           10           15
                ┌────────────────── CDR1 ───────────────────┐
gaa aga gtc agt ctc act tgt cgg gca agt cag gaa att agt ggt tac 96
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
                20           25           30
┌──────────┐
tta agc tgg ctt cag cag aaa cca gat gga act att aaa cgc ctg atc 144
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
                35           40           45
                ┌────────── CDR2 ───────────┐
tac gcc gca tcc act tta gat tct ggt gtc cca aaa agg ttc agt ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
                50           55           60
agt gag tct ggg tca gat tat tct ctc acc atc agc agt ctt gag tct 240
Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
                65           70           75           80
                ┌────────── CDR3 ───────────┐
gaa gat ttt gca gac tat tac tgt cta caa tat ttt agt tat ccg ctc 288
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
                85           90           95
┌──────────┐
acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 321
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
                100           105

```


JÄRJESTUSTE LOETELU**[0438]**

- 5 <110> MacroGenics, Inc.
<120> FCgammaRIIB- SPETSIIFILISED ANTIKEHAD JA NENDE KASUTAMISMEETODID
<130> 13783-105016
<140> PCT/US2007/072153
- 10 <141> 2007-06-26
<150> US 60/816,688
<151> 2006-06-26
<160> 12
<170> PatentIn versioon 3.4
- 15 <210> 1
<211> 321
<212> DNA
<213> Tehislik järjestus
<220>
- 20 <223> Sünteetiline
<220>
<221> muu_tunnusjoon
<223> 8B5.3.4 VL nukleotiidjärjestus
<400> 1

```

gacattcaga tgacacagtc tccatcctcc ctacttgccg cgctgggaga aagagtcagt      60
ctcacttgtc gggcaagtca gaaattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca      120
gatggaacta ttaaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa      180
aggttcagtg gcagtgagtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag tcttgagtct      240
gaagatthtg cagactatta ctgtctacaa tatttttagtt atccgctcac gttcgggtgct      300
gggaccaagc tggagctgaa a                                     321

```

<210> 2

<211> 348

<212> DNA

5 <213> Tehislik järjestus

<220>

<223> Sünteetiline

<220>

<221> muu_tunnusjoon

10 <223> 8B5.3.4 VH nukleotiidjärjestus

<400> 2

```

gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc catgaaactc      60
tcttggaag cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcagtct      120
ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca      180
tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgatcc caaaagtagt      240

```

```

gtctacctgc aatgaacag cttaagagct gaagacactg gcatttatta ctgtggggct      300
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcg                      348

```

15 <210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Tehislik järjestus

<220>

20 <223> Sünteetiline

<220>

< 221> MUU_TUNNUSJOON

< 223> 8B5.3.4 VL aminohappejärjestus

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Ala Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

5

<210> 4

< 211> 116

< 212> PRT

< 213> Tehislik järjestus

10

<220>

< 223> Sünteetiline <220>

< 221> MUU_TUNNUSJOON

< 223> 8B5.3.4 VH aminohappejärjestus

<400> 4

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

< 211> 11

< 212> PRT

5 < 213> Tehislik järjestus

<220>

< 223> Sünteetiline

<220>

< 221> MUU_TUNNUSJOON

10 < 223> 8B5.3.4 VL aminohappejärjestus (CDR1)

<400> 5

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
 1 5 10

<210> 6

< 211> 7

15 < 212> PRT

< 213> Tehislik järjestus

<220>

- < 223> Sünteetiline
- <220>
- < 221> MUU_TUNNUSJOON
- < 223> 8B5.3.4 VL aminohappejärjestus (CDR2)
- 5 <400> 6
- Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5
- <210> 7
- < 211> 9
- < 212> PRT
- 10 < 213> Tehislik järjestus
- <220>
- < 223> Sünteetiline
- <220>
- < 221> MUU_TUNNUSJOON
- 15 < 223> 8B5.3.4 VL aminohappejärjestus (CDR3)
- <400> 7
- Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
- <210> 8
- < 211> 5
- 20 < 212> PRT
- < 213> Tehislik järjestus
- <220>
- < 223> Sünteetiline
- <220>

< 221> MUU_TUNNUSJOON

< 223> 8B5.3.4 VH aminohappejärjestus (CDR1)

<400> 8

Asp Ala Trp Met Asp
1 5

5 <210> 9

< 211> 19

< 212> PRT

< 213> Tehislik järjestus

<220>

10 < 223> Sünteetiline

<220>

< 221> MUU_TUNNUSJOON

< 223> 8B5.3.4 VH aminohappejärjestus (CDR2)

<400> 9

Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

15 Val Ile Gly

<210> 10

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> Tehislik järjestus

20 <220>

< 223> Sünteetiline

<220>

< 221> MUU_TUNNUSJOON

< 223> 8B5.3.4 VH aminohappejärjestus (CDR3)

<400> 10

Gly Ala Leu Gly Leu Asp Tyr
1 5

<210> 11

5 < 211> 5

< 212> PRT

< 213> Tehislik järjestus

<220>

< 223> Sünteetiline

10 <220>

< 221> MUU_TUNNUSJOON

< 223> Liitvalk - osaline järjestus

<400> 11

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

15 <210> 12

< 211> 8

< 212> PRT

< 213> Tehislik järjestus

<220>

20 < 223> Sünteetiline

<220>

< 221> MUU_TUNNUSJOON

< 223> Liitvalk - osaline järjestus

<400> 12

Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser
1 5