



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108631** (13) **C2**
(51) МПК
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2012 08485</p> <p>(22) Дата подання заявки: 28.01.2011</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.05.2015</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 20100143, 61/299,524</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 29.01.2010, 29.01.2010</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: NO, US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.10.2012, Бюл.№ 19</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.05.2015, Бюл.№ 10</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2011/051231, 28.01.2011</p>	<p>(72) Винахідник(и): Ларсен Рой Г. (NO), Дале Йостейн (NO), Брюленд Ойвінд С. (NO)</p> <p>(73) Власник(и): НОРДІК НАНОВЕКТОР АС, Kjelsasveien 163 B, N-0884 Oslo, Norway (NO)</p> <p>(74) Представник: Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: GJERMUND HENRIKSEN ET AL: "Bi-labelled antibody and Bi-labelled streptavidin. Comparison of targeting efficiency of a lymphoma cell line in vitro", JOURNAL OF LABELLED COMPOUNDS AND RADIOPHARMACEUTICALS, vol. 34, no. 12, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 1039-1046, XP55007261 E. SMELAND ET AL: "Characterization of Two Murine Monoclonal Antibodies Reactive with Human B Cells", SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 21, 1 January 1985 (1985-01-01), pages 205-214, XP55007334 PRESS O W ET AL: "RADIOLABELED-ANTIBODY THERAPY OF B-CELL LYMPHOMA WITH AUTOLOGOUS BONE MARROW SUPPORT", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, WALTHAM, MA, US, vol. 329, no. 17, 21 October 1993 (1993-10-21), pages 1219-1224, XP008075157 KAMINSKI MARK S ET AL: "Imaging, dosimetry, and radioimmunotherapy with iodine-131-labeled anti-CD37 antibody in B-cell lymphoma", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 10, no. 11, 1 November 1992 (1992-11-01), pages 1696-1711, XP009121992 WO 2009/019312 A2, 12.02.2009</p>
--	--

(54) РАДІОІМУНОКОН'ЮГАТИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

UA 108631 C2

Заявлений винахід стосується радіоімунокон'югата, що зв'язує CD37 людини, фармацевтичної композиції, яка включає такий радіоімунокон'югат, та їх застосування для лікування В-клітинних злоякісних захворювань.

Заявлений винахід стосується радіоімунотерапії гематологічного раку з міченими радіоактивним ізотопом моноклональними антитілами з неочікуване високою цитотоксичністю.

Терапія з міченими радіоактивним ізотопом антитілами, що застосовують проти неходжкінської лімфоми (NHL) сьогодні є затвердженим методом. На ринку є два продукти під торговельними марками Zevalin™ та Bexxar™ та обидва спрямовані до антигену CD20 (Jacene et al., 2007).

Імунотерапевтичний агент ритуксимаб (Rituxan™/Mabthera™) також спрямований до антигену D20. Однією проблемою у лікуванні проти такої цілі є можливість імунофенотипного дрейфу під час перебігу хвороби (Ngo et al., 2009), що може привести до зменшення результатів терапії CD20, що повторюють протягом часу у вигляді терапії ритуксимабом або при застосуванні радіоімунотерапії (RIT) на основі CD20 після тривалої терапії ритуксимабом.

Багато пацієнтів, що отримують спрямовану до CD20 терапію, в кінцевому рахунку зазнають рецидив (Buchegger et al., 2006; Gordon et al 2004). Отже, існує суттєва потреба у радіоімунотерапії (далі RIT) пацієнтів з NHL, що буде спрямована до іншого антигену, ніж CD20.

На початку розвитку RIT, у якості мішеней було обрано два антигени, CD37 та CD20 (Press et al., 2001). Був зроблений висновок, що орієнтована на CD20 RIT є більш доречною, отже від розвитку спрямованої до CD37 радіоімунотерапії відмовилися. Таким чином, відомо, що моноклональні антитіла є прийнятними для застосування у RIT проти лімфоми, але спрямований до CD20 радіоімунотерапевт (RIC) значно перевершує радіоімунотерапевт, спрямований до CD37. (Press et al., 2001).

В останні роки до CD37 знову привернули увагу (Heider et al., 2009; Grosmaire, 2007), головним чином розглядаючи його в якості мішені для імунотерапії з застосуванням химерних або гуманізованих констрактів антитіл. Ці роботи вчать відмовитися від застосування звичайних мишачих моноклональних антитіл IgG, оскільки мишачі антитіла можуть викликати продукування анти-мишачих антитіл людини (HAMA) у пацієнтів, що може викликати дискомфорт та зниження ефективності імунотерапії.

Для RIT, звичайні мишачі моноклональні антитіла, як і раніше, вважаються цікавими, оскільки загальні застосовані дози білка є нижчими та нема потреби у повторному лікуванні в тій же мірі, як у імунотерапії. Також, очищення мишачих IgG, як правило, проходить трохи швидше, ніж гуманізованих або химерних версій тих же саме IgG, що може бути більш прийнятним в умовах опромінення всього тіла при застосуванні RIT, принаймні у деяких параметрах. Слід зазначити, що обидва препарати, Bexxar та Zevalin отримані на основі мишачих антитіл.

Заявлений винахід стосується анти-CD37 мишачого антитіла ННІ у якості носія для радіоізоотопу. Перший клон гібридоми, що продукує мишачі анти-CD37 антитіла ННІ розробили у 1980'х роках (Smeland et al., 1985) та антитіла ННІ протягом декількох років були у продажу для застосування *in vitro* у імуногістохімії.

Раніше не розглядали прийнятність антитіл ННІ для радіоімунотерапії з точки зору біорозподілення та клітинної цитотоксичності, отже ця робота була розпочата для оцінки прийнятності ННІ у радіоімунотерапії. На відміну від попередніх клінічних та доклінічних досліджень з анти-CD37 RIC, де застосовували безпосереднє мічення радіоактивним ізотопом ¹³¹I тирозинових залишків з застосуванням хлорамінТ/ йодогенового способів, ННІ мітили радіоактивним ізотопом через хелатор з застосуванням металічного радіонукліду замість галогену.

Застосування металічного радіонукліду, міченого через хелатор-лінкер може бути корисним, оскільки застосування ¹³¹I -міченого антитіла пов'язано з опроміненням щитовидної залози різною кількістю йоду, що вивільняється від RIC.

У попередньому дослідженні для оцінки прийнятності ННІ для продукування радіоімунотерапевтичного кон'югату, CHX-A-DTPA кон'югували з ННІ та кон'югат мітили ²⁰⁵Bi, ²⁰⁶Bi для моделювання *in vitro* (Henriksen et al., 1997).

Поглинання у клітинній лінії Raji порівнювали з вісмутом, кон'югованим до ННІ або зі стрептавідином. У останньому випадку, клітини попередньо насичували біотинільованими -ННІ.

Знайдено, що обмежуючим фактором був ряд хелаторів, необхідний для забезпечення функціональної RIC при застосуванні ²¹²Bi або ²¹³Bi мічення. Тому було запропоновано застосування біотинільованих ННІ замість RIC на основі ННІ. Після зв'язування з клітинами, біотинільовані ННІ можуть бути мішенню для міченого радіоактивним ізотопом стрептавідину.

Отже, дослідження передбачає, що ННІ, мічені радіонуклідом з альфа-випромінюванням будуть менш корисними через недостатню специфічну активність концентрацій хелатора, що вважаються прийнятними для збереження достатній зв'язувальній здатності ННІ.

Також в дослідженні було зазначено, що бета - випромінювач буде ще менш прийнятним для отримання функціональної RIC порівняно з альфа - випромінювачем (Henriksen et al, 1997),

оскільки автори встановили, що, для хвороби, що поширюється, для отримання достатнього результату необхідно глибинно - сфокусоване опромінення пухлини, отже, цільова радіотерапія з бета - випромінювачем повинна бути зниженою.

Таким чином, вищезазначене дослідження радить відмовитися від застосування безпосередньо хелатованих ННІ у радіоімунотерапії та також від застосування ННІ у RIC на основі бета-випромінювача.

Заявлений винахід стосується радіоімунокон'югата, що зв'язує CD37 людини, що складається з мишачого моноклонального антитіла ННІ, лінкера та радіонукліда, вибраного з групи, що охоплює ^{211}At , ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{194}Ir , ^{166}Ho , ^{159}Gd , ^{153}Sm , ^{149}Pm , ^{142}Pr , ^{111}Ag , ^{109}Pd , ^{77}As , ^{67}Cu , ^{47}Sc та ^{177}Lu .

У одному втіленні заявленого винаходу, лінкер є хелатуючим лінкером та радіонуклід є ^{177}Lu .

Один аспект заявленого винаходу стосується фармацевтичної композиції, що містить радіоімунокон'югат заявленого винаходу та фармацевтично прийнятний носій.

У одному втіленні заявленого винаходу, фармацевтична композиція заявленого винаходу містить одне або декілька додаткових антитіл або радіоімунокон'югатів.

У іншому втіленні заявленого винаходу, одне або декілька додаткових антитіл або радіоімунокон'югатів спрямоване до CD20.

Ще одне втілення заявленого винаходу стосується фармацевтичної композиції заявленого винаходу для лікування злоякісних В - клітин, що експресують антиген CD37

У одному втіленні заявленого винаходу фармацевтична композиція призначена для лікування неходжкінської лімфоми та хронічного лімфолейкозу.

Один аспект заявленого винаходу стосується застосування радіоімунокон'югату заявленого винаходу для лікування В- клітинних злоякісних новоутворень.

Одне втілення заявленого винаходу стосується застосування радіоімунокон'югату заявленого винаходу, що вводять у комбінації з або на додаток до іншої терапії.

У одному втіленні заявленого винаходу, терапія є вибраною з групи, що охоплює попереднє лікування, хіміотерапію, терапію з моноклональними антитілами, хірургію, радіотерапію, та/або фотодинамічну терапію.

У іншому втіленні заявленого винаходу терапія охоплює попереднє лікування з застосуванням анти-CD20 та/або анти-CD37 моноклональних антитіл перед лікуванням з радіоімунокон'югатом заявленого винаходу.

Один аспект заявленого винаходу стосується способу лікування В- клітинних злоякісних пухлин, вибраних з неходжкінської лімфоми та хронічного лімфолейкозу, що полягає у введенні ефективної кількості фармацевтичної композиції заявленого винаходу.

Інший аспект заявленого винаходу стосується набору для отримання радіоімунокон'югату заявленого винаходу, що складається з двох або декількох флаконів, де один флакон містить кон'югат, що містить хелатор, зв'язаний з мишачими моноклональними антитілами ННІ; та другий флакон містить радіонуклід.

Одне втілення заявленого винаходу стосується набору заявленого винаходу, де зміст одного або декількох флаконів є або ліофілізованим або знаходиться у розчині.

У іншому втіленні заявленого винаходу радіоімунокон'югат отримують перемішуванням змісту двох флаконів.

Стислий опис фігур.

Фіг. 1

Клітинні антитіла, отримані негайно (А) та через 96 годин (В) після промивання для інкубування клітин Raji, Rael та Daudi з ^{111}In -ННІ, ^{111}In – ритуксимаб, ^{125}I -ННІ та ^{125}I -ритуксимаб.

Фіг. 2

Активність зв'язування з клітинами Daudi після інкубування з ^{177}Lu -ННІ або ^{177}Lu -ритуксимаб протягом 2 год. (А) та 18 год. (В). Блоковані клітини блокували зі 100 г/мл немічених антитіл.

Фіг. 3

Зростання клітин Daudi, інкубованих з ^{177}Lu -ННІ (А) або ^{177}Lu -ритуксимаб (В) протягом 2 год. перед промиванням.

Фіг. 4

Зростання клітин Daudi, інкубованих з ^{177}Lu -ННІ (А) або ^{177}Lu -ритуксимаб (В) протягом 18 год. перед промиванням.

Фіг. 5

Біорозподілення ^{111}In – мітки крізь хелатор до ННІ у мишах з ксенотрансплантатами Daudi.

Фіг. 6

FITC- гістограми немічених клітин Daudi, клітин Daudi, мічених тільки з вторинними антитілами або мічених з NHI, ON.108, IPO.24 або 6D263.

Фіг. 7

Біорозподілення ^{177}Lu - у голих мишей жіночої статі з пухлиною Daudi.

5 Фіг. 8

Терапія мишей з внутрішньовенно введеними клітинами Daudi. Виживання мишей, що отримали 50 та 100 МБк / кг ^{177}Lu -NHI, "холодний" (той, що не містить радіоактивних речовин) NHI, "холодний" ритуксимаб та NaCl.

Заявлений винахід стосується застосування антитіл NHI у радіоімунотерапії.

10 Комбінація металу радіонукліду, лінкеру та анти-CD37 моноклональних антитіл несподівано показала, що мічені радіоактивним ізотопом NHI мають прийнятне біорозподілення та поглинання пухлиною у ксенотрансплантаті/моделі голої миші.

Це важлива інформація, що свідчить про прийнятність для застосування у радіоімунотерапії.

15 Заявлений винахід неочікуване показав, що радіоімунокон'югат ^{177}Lu -NHI показав суттєву цитотоксичність у клітинах пухлин, що поширюються та що ^{177}Lu -NHI був більш цитотоксичним для пухлинних клітин при даній дозі, ніж ^{177}Lu -ритуксимаб.

Це відкриття було несподіваним, оскільки більша радіоактивність зв'язувалася з клітиною та збереження зв'язаних радіонуклідів було подібним або кращим для ^{177}Lu -ритуксимаб.

20 Це свідчить проти загальноприйнятої думки про те, що анти-CD20 антитіла є більш кращими для радіоімунотерапії, ніж анти-CD37 антитіла.

Крім того, справжня робота відрізняється від попередньої точки зору тим, що бета-випромінювач та глибинно-сфокусоване опромінювання, що неприйнятні у дисемінованих клітинах, можуть мати важливе значення для отримання задовільного результату (Henriksen et al., 1997).

25 Причина спостереженого явища досі не ясна. Дані експериментів з різними дозуваннями немічених NHI та ритуксимабу не дають жодних результатів з неміченими антитілами у застосованому аналізі зростання.

Одним з можливих пояснень може бути те, що серед CD37 існує менше число клітин з дуже низької щільності антигену, ніж серед CD20, хоча CD20 в середньому проявляють сильнішу експресію у застосованій клітинній лінії.

Дані по утримуванию не надають кращого утримувания через інтерналізацію CD37, що може бути можливим поясненням, оскільки було повідомлено про наявність деякої інтерналізації з антигеном CD37 (Press et al, 2001).

35 Отже, заявлений винахід стосується а радіоімунокон'югату, що зв'язує CD37 людини, що містить мишаче моноклональне антитіло NHI, лінкер та радіонуклід, вибраний з групи, що охоплює ^{211}At , ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{194}Ir , ^{166}Ho , ^{159}Gd , ^{153}Sm , ^{149}Pm , ^{142}Pr , ^{111}Ag , ^{109}Pd , ^{77}As , ^{67}Cu , ^{47}Sc та ^{177}Lu .

У одному втіленні заявленого винаходу, лінкер є хелатуючим лінкером.

У іншому втіленні заявленого винаходу, радіонуклід є ^{177}Lu .

40 У іншому втіленні, радіонуклід є іншим бета- або альфа - випромінювачем.

Заявлений винахід припускає, з даними *in vitro*, що мічені радіоактивним ізотопом NHI більш ефективно зв'язуються з CD37 антигеном, ніж мічений радіоактивним ізотопом ритуксимаб зв'язується з CD20 антигеном, тобто, вони досягають максимального зв'язування з антигеном з меншою потрібною кількістю циркулюючих антитіл (Таблиця 2, Фіг. 2).

45 Потрібно також менше часу для досягнення максимального зв'язування (Фіг. 2). Ці особливості можуть бути важливими *in vivo* також тому, що це означає, що пухлинні клітини можуть захоплювати RIC навіть при низькій концентрації циркулюючих антитіл, відтворюючи ситуацію, що може траплятися у менш прийнятних ділянках твердих пухлин та для одиничних пухлинних клітин та мікрометастазів, розташованих у віддалених ділянках нормальних тканин.

50 Це значно відрізняється від попередніх даних, що свідчили про те, що підвищена концентрація антитіл потребує інших анти-CD37 антитіл, ніж NHI (Bernstein et al., 1990), також у порівнянні з анти-CD20 антитілами (Press et al., 1993), для насичення антигену та отримання бажаного біорозподілення.

55 Додатково, заявлений винахід показує, що NHI має деякі інші антиген-зв'язувальні властивості порівняно з групою трьох інших анти-CD37 антитіл, незважаючи на те, що всі антитіла по суті зв'язуються з тим же епітопом.

Блокуючі експерименти, тобто експерименти з застосуванням клітин, попередньо насичених неміченими антитілами, показали те, що NHI блокуватиме CD37 на живих клітинах від зв'язування з міченими радіоактивним ізотопом NHI значно краще, ніж три інших анти-CD37 антитіла.

60

У клітинному аналізі порівняння мічених радіоактивним ізотопом антитіл, ННІ показав значно кращу імунореактивну фракцію у порівнянні з трьома іншими антитілами.

Під імунореактивною фракцією мається на увазі фракція антитіл, що може зв'язувати антиген, якщо є необмежене перевищення антигенів. Різні антитіла можуть мати різну здатність до збереження імунореактивності після проведення процедури мічення. Результати, наведені у Прикладі 6, Експерименті IV, Таблиці 5 показують, що імунореактивність ННІ краще зберігалася, ніж імунореактивність трьох комерційно доступних антитіл.

З іншого боку, імуногістохімічні аналізи показали, що три антитіла дають забарвлення зрізів тканин з зафіксованих у парафіні зразків пухлин у той час, як ННІ його не дають. Відмінності у взаємодіях антитіло - антиген не виявляються за допомогою проточної цитометрії.

Гістограми проточної цитометрії для ННІ та трьох інших анти-CD37 антитіл (Фіг. 6) були схожими. В цілому, ці дані показують, що ННІ мають значну індивідуальну взаємодію з антигеном, що у деяких аспектах не може бути передбаченою у дослідженнях з іншими анти-CD37 антитілами.

Описаний тут новий анти-CD37 радіоімунокон'югат з сильними цитотоксичними властивостями складається з мишачих моноклональних антитіл ННІ, хелатуючого лінкера та бета-випромінювача ^{177}Lu .

Радіонуклід може бути прикріпленим до антитіла шляхом першої реакції біфункціонального хелатора, наприклад p-SCN-bn-DOTA (Macrocyclics, Tx, USA), з антитілом, після чого слідує очищення з метою видалення некон'югованого хелатора та реакція кон'югату хелатора з антитілом з радіонуклідом, після чого слідує ще одне очищення для видалення будь-якого некон'югованого радіонукліда.

Альтернативно, хелатор та радіонуклід можуть спочатку бути об'єднані та потім кон'юговані з антитілами.

Хелатуючі лінкери, як то, наприклад p-SCN-bn-DOTA, можуть бути застосованими для кон'югації інших металічних радіонуклідів з ННІ шляхом, аналогічним наведеному для ^{177}Lu .

Може бути застосований будь-який тип лінкера з достатньою здатністю до утворювання комплексів та з функціональною групою, що дозволяє пряму або непряму кон'югацію з білком або пептидом. Приклади таких лінкерів описано у літературі (наприклад Brechbiel, 2008; Liu, 2008). Деякі корисні приклади являють собою біфункціональні циклічні хелатори, подібні до p-SCN-bn-DOTA, DOTA-NHS-естер; біфункціональні лінійні хелатори, подібні до p-SCN-Bn-DTPA та CHX-A"-DTPA.

Радіонукліди у заявленому винаході переважно кон'югують з цільовою молекулою з застосуванням біфункціональних хелаторів, що можуть бути циклічними, лінійними або розгалуженими. Особливу увагу можна зробити на поліаміно-полікислі хелатори, що містять циклічний, лінійний або розгалужений поліазаалкіновий каркас з кислими (наприклад карбоксиалкільними) групами, приєднаними до нітрогенів каркасу.

Приклади прийнятих хелаторів охоплюють похідні DOTA, як то p-5 ізотіоціанатобензил - 1,4,7, 10 - тетраазаціклододекан - 1,4,7, 10- тетраоцтову кислоту (p-SCN-Bz-DOTA) та похідні DTPA, як то p - ізотіоціанатобензил – діетилентриамінпентаоцтову кислоту (p-SCN-Bz-DTPA), перші з яких є циклічними хелаторами, а останні - лінійними хелаторами.

Металування комплексоутворюючої частини може бути здійснено перед або після кон'югації комплексоутворюючої частини з цільовою групою.

Взагалі, процедура мічення радіоактивним ізотопом є більш зручною з точки зору витраченого часу тощо, якщо хелатор є кон'югованим з антитілом перед початком мічення радіоактивним ізотопом.

Принципи отримання мічених радіоактивним ізотопом кон'югатів з застосуванням прикріплених до антитіл хелаторів більш докладно описані, наприклад у Liu, 2008.

Отже, ННІ можна застосувати для отримання радіоімунокон'югатів з відмінностями у властивостях опромінювання та з ефективними періодами напіврозпаду.

Наприклад, радіоімунокон'югат анти-CD37, що складається з мишачого моноклонального антитіла ННІ, хелатуючого лінкера радіонукліда, що є альфа- або бета- випромінювачем, що охоплює, але без обмеження, ^{177}Lu , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{225}Ac , ^{227}Th , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{199}Au , ^{194}Ir , ^{166}Ho , ^{159}Gd , ^{153}Sm , ^{149}Pm , ^{142}Pr , ^{111}Ag , ^{109}Pd , ^{77}As , ^{67}Cu , ^{47}Sc може бути отриманим та застосованим для отримання фармацевтичних препаратів та з терапевтичною метою.

Радіоімунотерапевтичний продукт на основі ННІ звичайно може бути наданий у вигляді фармацевтичної композиції, що складається з радіонукліду відповідно до вищезазначеного опису, пов'язаного через хелатор до мишачого моноклонального антитіла ННІ, що розчинений у буферному розчині, що у значній мірі підтримує хімічну цілісність радіоімунокон'югату та буде фізіологічно прийнятним для інфузії пацієнтам.

Отже, аспект заявленого винаходу стосується фармацевтичної композиції, що містить а радіоімунокон'югат заявленого винаходу та фармацевтично прийнятний носій та/або наповнювач.

Фармацевтично прийнятні носії охоплюють, але без обмеження, нетоксичні буфери, наповнювачі, ізотонічні розчини тощо. Зокрема, фармацевтичний носій може бути, але без обмеження, нормальним фізіологічним розчином (0.9 %), напівнормальним фізіологічним розчином, лактатом Рінгера, 5 % декстрозою, розчином 3.3 % декстрози / 0.3 % фізіологічного розчину. Фізіологічно прийнятний носій може містити радіолітичний стабілізатор, наприклад аскорбінову кислоту, що захищає цілісність радіофармацевтичного препарату протягом зберігання та відвантаження.

Одне втілення заявленого винаходу стосується фармацевтичної композиції заявленого винаходу та одного або декількох додаткових антитіл або радіоімунокон'югатів. Антитіла охоплюють, але без обмеження, Ритуксимаб, Епратузумаб, L19, F8, F16, Галіксимаб, Торалізумаб, Алемтузумаб, Офатумумаб, Велтузумаб, Афутузумаб, Тозітумомаб, Редітукс та Ібрітумомаб.

Радіоімунокон'югати охоплюють, але без обмеження, Зевалін та Бексар.

У іншому втіленні заявленого винаходу, одне або декілька додаткових антитіл або радіоімунокон'югатів спрямоване до CD20. Антитіла охоплюють, але без обмеження, Ритуксимаб, Велтузумаб, Офатумумаб, Афутузумаб, Тозітумомаб, Редітукс та Радіоімунокон'югати охоплюють, але без обмеження, Зевалін та Бексар.

Подальше втілення заявленого винаходу стосується фармацевтичної композиції заявленого винаходу для лікування злоякісних В - клітин, що експресують антиген CD37.

Одне втілення заявленого винаходу стосується фармацевтичної композиції для лікування неходжкінської лімфоми та хронічного лімфолейкозу.

Як звичайно визначено, під " тотожністю " тут мається на увазі тотожність послідовностей серед генів або білків на нуклеотидному або амінокислотному рівні, відповідно. Отже, в даному контексті " тотожність послідовностей " є мірою тотожності між білками на рівні амінокислот та мірою тотожності між нуклеїновими кислотами на нуклеотидній рівні.

Тотожність послідовності білка може бути визначена порівнянням амінокислотної послідовності у вибраній позиції у кожній послідовності при вирівнюванні послідовностей.

Так само, тотожність послідовності нуклеїнової кислоти може бути визначена порівнянням нуклеотидної послідовності у вибраній позиції у кожній послідовності при вирівнюванні послідовностей.

Для визначення відсотка тотожності двох послідовностей нуклеїнової кислоти або двох амінокислот, для оптимального порівняння послідовності вирівнюють (наприклад для оптимального вирівнювання з другою амінокислотою або нуклеотидною послідовністю у першу амінокислотну або нуклеотидну послідовність можуть бути введені пробіли). Потім порівнюють амінокислотні залишки або нуклеотиди у відповідних амінокислотних або нуклеотидних позиціях.

Коли позиція у першій послідовності зайнята таким саме амінокислотним залишком або нуклеотидом, як у відповідній позиції у другій послідовності, тоді молекули вважаються ідентичними по цій позиції. Відсоток тотожності між двома послідовностями є функцією кількості ідентичних позицій, що мають послідовності (наприклад % тотожності = # ідентичних позицій / загальний # позицій (наприклад позиції, що перекриваються) x 100). У одному втіленні, дві послідовності мають однакову довжину.

Будь-хто може вирівняти послідовності та підрахувати кількість ідентичних нуклеїнових кислот або амінокислот вручну. Альтернативно, вирівнювання двох послідовностей для визначення відсотка тотожності може бути здійснено з застосуванням математичного алгоритму, як то алгоритм, включений у програми NBLAST та XBLAST. Пошук нуклеотидів BLAST для отримання нуклеотидних послідовностей, гомологічних молекулам нуклеїнової кислоти винаходу може бути проведений з застосуванням програми NBLAST, сума балів = 100, довжина слова = 12,. Пошук білків BLAST для отримання амінокислотних послідовностей, гомологічних білковим молекулам винаходу може бути проведений з застосуванням програми XBLAST, сума балів = 50, довжина слова = 3.

Для отримання вирівнювань з пробілами з порівняльною метою можна застосувати програму Gapped BLAST. Альтернативно, для здійснення повторного пошуку, що визначає віддалені відносини між молекулами може бути застосована програма PSI-Blast. При застосування програм NBLAST, XBLAST та Gapped BLAST можуть бути застосовані параметри відповідних програм по замовчуванню, див. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Альтернативно,

тотожність послідовності можна обчислити після вирівнювання послідовностей, наприклад за допомогою програми BLAST у базі даних EMBL (www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST).

Звичайно, для вирівнювання можуть бути застосовані параметри по замовчуванню щодо, наприклад " матриці заміщень " та " штрафу за внесення пробілу ". У контексті заявленого винаходу, прийнятими будуть параметри по замовчуванню BLASTN та PSI BLAST.

Відсоток тотожності між двома послідовностями можна визначити з застосуванням способів, подібних до вищезазначених, зі створенням пробілів або без них. При підрахуванні відсотку тотожності беруться на увагу тільки точні збіги.

У одному втіленні, винахід стосується виділеної нуклеїнової кислоти, що містить послідовність, що має 80 % тотожності з послідовністю VH антитіла HH 1 (SEQ ID NO: 1) та/або з послідовністю VL (SEQ ID NO: 3).

У одному втіленні, винахід стосується виділеної нуклеїнової кислоти, що містить VH послідовність антитіла HH 1 (SEQ ID NO: 1) та/або VL послідовність (SEQ ID NO: 3).

У іншому втіленні, винахід стосується виділеної нуклеїнової кислоти, що містить послідовність, що має принаймні 90 % тотожності з послідовністю VH антитіла HH 1 (SEQ ID NO: 1) та/або з послідовністю VL (SEQ ID NO: 3), як то 90 % тотожності, 91 % тотожності, 92 % тотожності, 93 % тотожності, 94 % тотожності, 95 % тотожності, 96 % тотожності, 97 % тотожності, 98 % тотожності або 99 % тотожності.

У іншому втіленні, винахід стосується антитіла, що містить поліпептидну послідовність, що має 80 % тотожності з послідовністю VH антитіла HH1 (SEQ ID NO: 2) та/або з послідовністю VL (SEQ ID NO: 4).

У іншому втіленні, винахід стосується антитіла, що містить поліпептидну послідовність VH антитіла HH1 (SEQ ID NO: 2) та/або послідовність VL (SEQ ID NO: 4).

У іншому втіленні заявленого винаходу, антитіло містить послідовність, що має принаймні 90 % тотожності з послідовністю VH антитіла HH1 (SEQ ID NO: 2) та/або з послідовністю VL (SEQ ID NO: 4), як то 90 % тотожності, 91 % тотожності, 92 % тотожності, 93 % тотожності, 94 % тотожності, 95 % тотожності, 96 % тотожності, 97 % тотожності, 98 % тотожності або 99 % тотожності.

Генетична мінливість спричинена мінливістю у порядку основ у нуклеотидах у генах. Ця мінливість викликає мутації в генах та потім в білках, що ці гени кодують.

Ці мутації можуть бути або сенс- або місенс- мутаціями або заміщеннями.

Одне втілення заявленого винаходу стосується виділеної послідовності нуклеїнового VH ланцюга моноклонального антитіла HH1 (SEQ ID NO: 1) та/або VL ланцюга (SEQ ID NO: 3) що містить принаймні 50, наприклад 20, наприклад 10, наприклад 5, наприклад 4, наприклад 3, наприклад 2, наприклад 1 сенс- мутацію.

Інше втілення заявленого винаходу стосується виділеної послідовності нуклеїнової кислоти VH ланцюга моноклонального антитіла HH1 (SEQ ID NO: 1) та/або VL ланцюга (SEQ ID NO: 3), що містить 0-50, наприклад 1-50, наприклад 0-20, наприклад 1-20, наприклад 0-10, наприклад 1-10, наприклад 0-5, наприклад 1-5, наприклад 3, наприклад 1 сенс- мутацію.

Місенс- мутація (тип несинонімічної мутації) є точковою мутацією зі зміненням одиничного нуклеотиду, що веде до кодування кодоном іншої амінокислоти (мутації, що змінюють амінокислоту на стоп-кодон вважаються не місенс- мутаціями, а нонсенс- мутаціями). Місенс- мутація може зробити отриманий білок нефункціональним.

Однак, не всі місенс- мутації призводять до помітних змінень білка. Якщо одну амінокислоту може бути заміщено на другу з дуже схожими хімічними властивостями, то у такому разі білок може нормально функціонувати. Це має назву нейтральної, " тихої " або консервативної мутації.

Альтернативно, амінокислотні заміщення можуть траплятися у такій ділянці білка, що не має значної дії на його вторинну структуру або функцію. При кодуванні амінокислоти більш ніж одним кодоном (так зване " дегенеративне кодування "), де мутація у кодоні може не викликати будь-якого змінень у трансляції; це буде вважатися синонімічною мутацією (вид тихої мутації), а не місенс-мутацією.

Одне втілення заявленого винаходу стосується антитіла, що містить поліпептидну послідовність VH ланцюга моноклонального антитіла HH1 (SEQ ID NO: 1) та/або VL ланцюга (SEQ ID NO: 3) що містить принаймні 50, наприклад 20, наприклад 10, наприклад 5, наприклад 4, наприклад 3, наприклад 2, наприклад 1 місенс- мутацію.

Одне втілення заявленого винаходу стосується антитіла, що містить поліпептидну послідовність VH ланцюга моноклонального антитіла HH1 (SEQ ID NO: 1) та/або VL ланцюга (SEQ ID NO: 3) що містить 0-50, наприклад 1-50, наприклад 0-20, наприклад 1-20, наприклад 0-10, наприклад 1-10, наприклад 0-5, наприклад 1-5, наприклад 3, наприклад 1 місенс- мутацію.

Консервативним заміщенням є заміщення однієї амінокислоти на іншу зі, звичайно, подібними властивостями, таким чином, що загальне функціонування, швидше за все, не буде серйозно змінено.

У іншому втіленні заявленого винаходу місенс- мутації є консервативними мутаціями або заміщеннями.

Подальше втілення заявленого винаходу стосується виділеної послідовності нуклеїнової кислоти або поліпептидної послідовності з 80 % тотожністю до послідовності змінного важкого ланцюга (SEQ ID NO: 2) та/або змінного легкого ланцюга (SEQ ID NO: 4) NHI, де мінливість послідовності є у вигляді консервативних заміщень.

Інше втілення заявленого винаходу стосується послідовності з тотожністю у 80 %, з тотожністю у 90 %, з тотожністю у 91 %, з тотожністю у 92 %, з тотожністю у 93 %, з тотожністю у 94 %, з тотожністю у 95 %, з тотожністю у 96 %, з тотожністю у 97 %, з тотожністю у 98 % або з тотожністю у 99 %, де мінливість послідовності є у вигляді консервативних заміщень.

З метою покращення стадії мічення радіоактивним ізотопом може бути бажаним вводити екстра лізину у, наприклад Fc частку NHI. Це може зменшити ймовірність приєднання хелаторів зв'язування лізину до сайтів об'єднання антигену з антитілом, тим самим скорочуючи ризик виникнення зниженої імунореактивності під час мічення радіоактивним ізотопом.

Способи введення лізину у, наприклад Fc частку NHI, є добре відомими, наприклад, див. Hemminki et al., 1995.

Одне втілення заявленого винаходу стосується радіоімунокон'югату заявленого винаходу, модифікованого 10 Lys у Fc частці NHI, як то 8 Lys, як то 6 Lys, як то 5 Lys, як то 4 Lys, як то 3 Lys, як то 2 Lys, як то 1 Lys.

Фармацевтичний розчин відповідно до заявленого винаходу може бути терапевтично застосований проти злоякісних клітин, що експресують антиген CD37, в тому числі, але без обмеження, для лікування не-ходжкінської лімфоми та хронічного лімфолейкозу.

Іншим застосуванням може бути лікування аутоімунних захворювань та лікування шкідливих дій, пов'язаних з трансплантацією. Може бути застосована терапія на основі, але без обмеження, бета- випромінювання або альфа- випромінювання або їх комбінації.

Може бути застосована терапія або у вигляді монотерапії або у комбінації з іншими терапіями, переважно зі стандартними способами лікування. Такими іншими терапіями може бути попереднє лікування, хірургія, хіміотерапія, імунотерапія, фотодинамічна терапія, радіоімунотерапія або комбінація двох або декількох цих терапій. Під введенням мається на увазі внутрішньовенне вливання або внутрішньовенна ін'єкція. Зокрема, радіоімунокон'югат заявленого винаходу може бути безпосередньо введено у вену за допомогою периферичній канюлі, приєднаний до крапельній камері, що запобігає створення повітряної емболії та дозволяє оцінити швидкість потоку до пацієнта.

У одному втіленні радіоімунокон'югат може бути введено декілька разів.

У іншому втіленні заявленого винаходу, радіоімунокон'югат може бути введено декілька разів, але з різними радіонуклідами, наприклад, після бета- радіоімунотерапії може слідувати альфа- радіоімунотерапія або навпаки.

Один аспект заявленого винаходу стосується застосування радіоімунокон'югату заявленого винаходу у лікуванні В- клітинних злоякісних пухлин.

Одне втілення заявленого винаходу стосується застосування радіоімунокон'югату заявленого винаходу, введеного у комбінації з або на додачу до іншої терапії.

У одному втіленні заявленого винаходу інші види терапії вибрані від попереднього лікування, хіміотерапії, терапії моноклональними антитілами, хірургії, радіотерапії, та/або фотодинамічної терапії.

У іншому втіленні заявленого винаходу інші види терапії являють собою трансплантацію кісткового мозку або трансплантацію стовбурових клітин та/або терапію.

Інше втілення заявленого винаходу стосується терапевтичного попереднього лікування з застосуванням моноклональних антитіл анти-CD20 та/або анти-CD37 перед лікуванням з радіоімунокон'югатом заявленого винаходу.

Один аспект заявленого винаходу стосується способу лікування В-клітинного злоякісного захворювання, вибраного з не-ходжкінської лімфоми та хронічного лімфолейкозу, що полягає у введенні ефективної кількості фармацевтичної композиції заявленого винаходу.

У втіленні заявленого винаходу, дозування антитіл дорівнює 1-1000 мг на пацієнта, більш бажано 5-50 мг на пацієнта та ¹⁷⁷Lu, що дорівнює 1-200 МБк/кг, більш переважно 10-100 МБк/кг маси тіла.

Один аспект заявленого винаходу стосується набору для отримання радіоімунокон'югату заявленого винаходу, що складається з двох або декількох флаконів, де один флакон містить

кон'югат, що містить хелатор, зв'язаний з мишачими моноклональними антитілами HH1; та другий флакон містить радіонуклід. Для набору може знадобитися проведення деяких процедур, наприклад мічення радіоактивним ізотопом та/або очищення перед вливанням.

Одне втілення заявленого винаходу стосується набору заявленого винаходу, де зміст одного або декількох флаконів знаходиться або у ліофілізованому стані або у розчині.

Кінцевий продукт отримують перемішуванням вмісту двох флаконів з отриманням радіоімунокон'югату. Отже, у іншому втіленні заявленого винаходу радіоімунокон'югат отримують перемішуванням вмісту двох флаконів. Цей продукт може потребувати очищення перед застосуванням.

Приклад 1. Мічення HH1 радіоактивним ізотопом.

Йодування: антитіла мітили ^{125}I непрямым йодуванням з застосуванням IODOGEN pre-coated iodination tubes (Pierce, Rockford, IL) відповідно з інструкціями виробника.

Мічення ^{111}In та ^{177}Lu : антитіла спочатку вступили у реакцію з хелатором (p-SCN-Bn-DTPA або p-SCN-Bn-DOTA).

Хелатор DTPA або DOTA розчинили у 0.05 М HCl, після чого додали до антитіл, pH яких відрегулювали до 8 шляхом промивання з карбонатним буфером у співвідношенні 5: 1. Потім pH знову перевірили та у разі необхідності відрегулювали. Розчин струшували протягом 60 хв. при кімнатній температурі, після чого реакцію зупинили додаванням 50 мкл 200 мМ розчину гліцина (на мг антитіл). Для видалення вільного хелатора, кон'юговані антитіла промили 4-5 разів з PBS (PAA) та потім відрегулювали pH до 5 промиванням з ацетатом амонію. Далі до 0.5 мг DOTA-Ab додали ^{111}In або ^{177}Lu (Perkin Elmer, Boston, Ma, USA) та суміш струшували протягом години при 42 °C. Зрештою, продукт очистили елюванням на гель-фільтраційній колонці, наприклад Sephadex G-25 PD10 (GE health) або подібній. Загальний вихід мічення був у діапазоні 17 % - 63 %.

Якість радіоімунокон'югатів вимірювали з застосуванням клітин лімфоми та модифікованого способу Ліндмо. Для компенсування незначної специфічної активності ^{111}In - кон'югатів застосували концентрації клітин до 108 клітин на мл. Для ^{125}I (що мав найвищу специфічну активність) було достатнім застосування концентрацій клітин до 4×10^7 клітин на мл.

Імунореактивність та специфічну активність для радіоімунокон'югатів можна побачити у Таблиці 1.

Приклад 2. Параметри зв'язування.

Постійну швидкості асоціації, k_a , рівноважну постійну дисоціації, K_d та середню кількість сайтів зв'язування, B_{max} , визначили за допомогою одноетапного способу підбору кривих (Dahle et al. 2007). Параметри зв'язування вимірювали для HH1 та ритуксимабу а також для трьох різних клітинних ліній лімфоми: клітин Raji, Rael та Daudi (Таблиця 2). Специфічність зв'язування вимірювали у якості функції часу та концентрації антитіл та рішення диференціального рівняння, що описує чистий коефіцієнт утворення комплексу антиген - антитіло було пристосоване до точок експериментальних даних з застосуванням в якості параметрів постійної швидкості асоціації, k_a , рівноважної постійної дисоціації, K_d та середньої кількості сайтів зв'язування, B_{max} . Було застосовано п'ять мільйонів клітин на мл, чотири концентрації ^{125}I - мічених антитіл (100 нг/мл, 1000 нг/мл, 5000 нг/мл та 10000 нг/мл) та 7 моментів часу інкубування (5 хв, 10 хв, 20 хв, 30 хв, 1 год., 1.5 год. та 2 год.). Після інкубування, клітини двічі промили з PBS та потім підраховували у гамма-лічильнику.

Приклад 3. Утримування клітинно-фіксованих антитіл.

Утримування клітинно-фіксованих антитіл безпосередньо та через 96 годин після промивання вимірювали після інкубування клітин Raji, Rael та Daudi з ^{111}In -HH1, ^{111}In - ритуксимаб, ^{125}I -HH1 та ^{125}I - ритуксимаб (Фіг. 1).

Один мільйон клітин у 1 мл середовища RPMI 1640 з 10 % ембріональної телячої сироватки, 1 % L- глютаміном та 1 % пеніцилін/стрептоміцином інкубували з 1 г/мл ^{125}I - або ^{111}In - міченими HH1 або ритуксимабом протягом однієї години, двічі промили середовищем та потім ще інкубували протягом 5 днів. Активність клітинного зв'язування визначили безпосередньо після промивання (Фіг. 1A) та після 4 днів інкубування (Фіг. 1B) шляхом вимірювання кількості клітин (Vi Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) та дози радіоактивності на відкаліброваному гамма-детекторі (Cobra II auto-gamma detector, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA).

Приклад 4. Лікування клітин лімфоми in vitro ^{177}Lu -HH1 або ^{177}Lu - ритуксимаб.

Експеримент I: Приєднання ^{177}Lu -HH1 до клітин Daudi.

1 мл суспензії клітин Daudi (один мільйон клітин у 1 мл) засіяли у 24 пробірки, половину з них блокували 100 г/мл або HH1 або ритуксимаб та інкубували протягом 30 хв. при 37 °C. Потім, у кожну пробірку додали або ^{177}Lu -HH1 або ^{177}Lu - ритуксимаб до кінцевої концентрації у 0, 1, 2.5,

5, 10 або 20 мкг/мл та інкубували далі при 37 °С. Питома активність дорівнювала 91.6 кБк / г для ^{177}Lu -ННІ та 136.6 кБк/ мг для ^{177}Lu -ритуксимаб.

Значення доданої активності вимірювали протягом періоду інкубування за допомогою гамма - детектора (Cobra II auto-gamma detector, Packard Instrument Company). Через дві години, половину клітин промили та виміряли активність клітинного зв'язування (Фіг. 2А) у той час, як іншу половину клітин інкубували протягом ночі (18 год.) перед промиванням та вимірюванням активності клітинного зв'язування (Фіг. 2В).

Після двох годин інкубування не було відмічено різниці між клітинами, що інкубували з ННІ та клітинами, що інкубували з ритуксимаб, тим часом, як через 18 годин інкубування, активність клітинного зв'язування була двічі вищою для клітин, інкубованих з ритуксимаб, ніж для клітин, інкубованих з ННІ (Фіг. 2).

Таблиці 3 та 4 вказують на те, що мічені радіоактивним ізотопом ННІ насичають антиген швидше та при більш низькій концентрації антитіл, ніж ритуксимаб. Неспецифічне зв'язування, схоже, є подібним для двох радіоімунокон'югатів (IC), та підвищується з підвищенням концентрації RIC у середовищі.

Максимальна кількість специфічно пов'язаного ^{177}Lu була приблизно вдвічі вищою для ритуксимабу, ніж для ННІ. Однак, при дозуванні у 1 г/мл, не було майже ніяких відмінностей у кількості специфічно прив'язаних радіоактивних атомів.

Експеримент II: Двохгодинне інкубування з ^{177}Lu -IgG: результати зростання клітин.

Клітини Daudi інкубували з радіоімунокон'югатами, як у Експерименті I (Фіг. 2 А).

Зростання клітин Daudi після 2 годин інкубування з ^{177}Lu -ННІ або ^{177}Lu - ритуксимаб вимірювали засіванням 50.000 клітин з кожної пробірки у три лунки шести 12- лункових планшетів. Наступні 14 днів кількість клітин вимірювали впродовж декількох моментів часу з застосуванням автоматичної системи візуалізації (Clone Select Imager, Gentix Ltd, Hampshire, UK).

Не спостерігалось жодного впливу окремих немічених антитіл на зростання клітин. Однак, блоковані клітини, оброблені ^{177}Lu - антитілами, явно зростали не так швидко, як необроблені контрольні клітини, що свідчить про дію на клітини незв'язаних ^{177}Lu - антитіл або неспецифічно зв'язаних ^{177}Lu - антитіл (Фіг. 3).

Обробка неблокованих клітин ^{177}Lu - антитілами призвела до збільшення затримки зростання на 44 % для клітин, оброблених 10 мкг/мл ^{177}Lu -ННІ (Фіг. 3 А) та на 31 % для клітин, оброблених 10 г/мл ^{177}Lu -ритуксимаб (Фіг. 3 В).

При обробці кількістю у 20 г/мл різниця між двома антитілами була навіть більшою, оскільки відновлення зростання клітин, оброблених ^{177}Lu -ННІ було відсутнім. Цей результат був неочікуваним, оскільки клітини помітили тією ж кількістю антитіл (Фіг. 2 А).

Експеримент III: 18 - годинне інкубування з ^{177}Lu -IgG: результати зростання клітин.

Клітини Daudi інкубували з радіоімунокон'югатами подібно до Експерименту I (Фіг. 2 В). Зростання клітин Daudi після 18 годин інкубування з ^{177}Lu -ННІ або ^{177}Lu -ритуксимаб вимірювали засіванням 50.000 клітин у три лунки шести 12- лункових планшетів.

Наступні 14 днів кількість клітин вимірювали впродовж декількох моментів часу з застосуванням автоматичної системи візуалізації (Clone Select Imager, Gentix Ltd, Hampshire, UK). Впливу окремо взятих немічених антитіл на зростання клітин відмічено не було.

Інгібування зростання клітин у блокованих клітинах, оброблених ^{177}Lu - антитілами у цьому експерименті було вищим (Фіг. 4), ніж у Експерименті II (Фіг. 3) завдяки 16 годинному підвищенню часу інкубування з радіоімунокон'югатом у середовищі.

Обробка неблокованих клітин ^{177}Lu - антитілами призвела до збільшення затримки зростання на 107 % для клітин, оброблених 2.5 мг/мл ^{177}Lu -ННІ (Фіг. 4 А) та на 52 % для клітин, оброблених 2.5 мкг/мл ^{177}Lu - ритуксимаб (Фіг. 4 В). Цей результат був неочікуваним, оскільки після 18 - годинного інкубування, клітини, мічені ^{177}Lu -ритуксимаб мали вдвічі більшу додану активність клітинного зв'язування, ніж клітини, мічені ^{177}Lu -ННІ (Фіг. 2 В).

Приклад 5. Біорозподілення ННІ.

Біорозподілення ^{111}In - мічених ННІ досліджували на BALB/c-nude (nu/nu) мишах з ксенотрансплантатами Daudi, що мали розмір на початку досліджувань у 32-256 мм³.

Мічення радіоактивним ізотопом проводили з застосуванням pSCN-Bz-DOTA у якості біфункціонального хелатуючого агента, що утворює комплекс з радіонуклідом та приєднує його до антитіла (Див. Приклад 1). Препарат вводили до кожної тварини шляхом ін'єкції 100 мкл розчину у хвостову вену.

Кожній тварині ввели препарат з активністю у 120 кБк. На момент часу було застосовано 5 тварин. Розтини проводили після зсуву шийних хребців у різні моменти часу після ін'єкції. Було визначено вагу кожного зразка тканини та ^{111}In вимірювали за допомогою відкаліброваного

гамма - детектора (Cobra II auto-gamma detector, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA). Зразки ін'єкційних препаратів застосували у якості вихідних точок у процедурах вимірювання.

Поглинання ^{111}In -ННІ через 24 години після ін'єкції у мишей з ксенотрансплантатами Daudi та біорозподілення у нормальних тканинах наведено у Фіг. 5.

Мічене радіоактивним ізотопом антитіло мало відповідний пухлинний таргетинг та біорозподілення. Хелатор - кон'югат ^{111}In -ННІ показав добру стабільність *in vivo*.

Приклад 6. Порівняння ННІ з трьома іншими анти-CD37 антитілами.

Експеримент 1: антиген-блокуюча здатність анти-CD37 антитіл порівняно з міченими радіоактивним ізотопом ННІ.

Для перевірки, чи може взаємодія антигену ННІ бути блокованою іншими анти-CD37 антитілами, клітини Daudi блокували попереднім інкубуванням з антитілами ННІ, О.Н.108, IPO-24 або 6D263. Клітини Daudi (2 млн./мл) інкубували протягом 15 хвилин з антитілами ННІ, О.Н.108, IPO-24 або 6D263 (20 мг/мл), додали ^{125}I - мічені ННІ антитіла та ще інкубували протягом 1 години.

Потім клітини центрифугували, тричі промили та підраховали значення активності у супернатанті та клітинному осаді з застосуванням рентгенівського/гамма лічильника.

У порівнянні з ННІ блокованих клітин, приєднана фракція ^{125}I - мічених ННІ була на 48 %, 44 % та 51 % вищою для О.Н.108, IPO-24 або 6D263 блокованих клітин, відповідно.

Отже, антигенне зв'язування ^{125}I -ННІ краще блокувалося ННІ, ніж трьома іншими антитілами, що свідчить про певні відмінності у їх взаємодії з антигеном. На закінчення треба відмітити, що ННІ має значно інші антиген - зв'язувальні властивості порівняно з групою трьох інших анти-CD37 моноклональних антитіл.

Експеримент II: Зв'язування антитіл з зафіксованими у парафіні зразками тканини лімфоми.

Для порівняння здатності ННІ та трьох комерційно наявних CD37 антитіл приєднуватися до зафіксованої тканини лімфоми, зразки біопсії від пацієнтів з лімфомою зафіксували у формаліні, закріпили у парафіні та розрізали на 10 мкм зрізи, що розмістили на предметне скло.

Зразки, помічені антитілами ННІ, IPO.24, ON.108 та 6D263 та ступінь мічення визначили з застосуванням анти-мишачих поіклональних антитіл кролів та забарвлення пероксидазою.

Антитіла IPO.24 та ON.108 показали найсильніший рівень мічення зразків лімфоми. Мічення антитілами 6D263 було трохи слабшим. Мічення зрізів антитілами ННІ було незначним.

Отже, оскільки ННІ не зв'язуються, на відміну від трьох інших анти-CD37 антитіл, можна зробити висновок про те, що ННІ має суттєво іншу антигенну взаємодію.

Експеримент III: Проточна цитометрія антитіл ННІ, IPO.24, ON.108 та 6D263.

Для визначення відмінностей у експресії антигену, що визначена за допомогою різних антитіл CD37 у порівнянні з ННІ, клітини Daudi двічі промили середовищем RPMI 1640 з 5 % ембріональної телячої сироватки та помітили 10 мкг/м первинних антитіл ННІ, IPO.24, ON.108 та 6D363 протягом 0.5 годин в льоді у 0.2 мл середовища з 10 % FCS.

Потім клітини двічі промили PBS з 0.25 % FCS та FITC-міченими поліклональними анти-мишачими IgG Fab" 2 кролів (розведеними 1: 20) (Фіг. 6) протягом 0.5 годин в льоді. Флуоресцентність з FITC - міткою визначили випромінювання 488 - нм лазеру у проточному цитометрі.

Мертві клітини та дублети усунули за допомогою прямого світлорозсіювання, бічного світлорозсіювання та сигналів йодистого пропідію. Значної мінливості між різними гістограмами FITC різних антитіл CD37 (Фіг. 6) не спостерігалось.

На закінчення треба відзначити, що ННІ та три інших анти-CD37 антитіла IPO.24, ON.108 та 6D363 при застосуванні проточної цитометрії дають схожі гістограми.

Експеримент IV: Зв'язувальна фракція для ННІ та трьох існуючих у продажу анти-CD37 антитіл.

Було проведено порівняння зв'язувальної фракції ННІ з О.Н.108, IPO-24 або 6D263 антитілами (Santa Cruz Biotechnology) з застосуванням клітин Daudi. Клітинні суспензії, що являли собою великий надлишок антигену та складалися з 60 мільйонів клітин Daudi у 0.2 мл середовища RPMI 1640 з 5 % ембріональної телячої сироватки блокували протягом 15 хвилин з ННІ, О.Н.108, IPO-24 або антитілами 6D263 (500 мг/мл) для обчислення неспецифічного зв'язування антитіл. Інші паралелі були розблоковані.

Потім додали ^{125}I - мічені антитіла ННІ, О.Н.108, IPO-24 або 6D263 (5-10 нг/мл) та клітини інкубували протягом 2 годин при 4 °C з обережним струшуванням. Після цього, клітини центрифугували та двічі промили PBS з 1 % FCS. Клітинний осад перенесли у скляні флакони та перелічили за допомогою гамма-лічильника.

Зв'язувальну фракцію визначили у вигляді різниці у активності для неблокованих та блокованих флаконів у порівнянні з доданою активністю. Антитіла ННІ показали значно більш високу зв'язувальну фракцію порівняно з іншими антитілами CD37 (Таблиця 5). На закінчення треба відзначити, що антитіла ННІ показали значно вищу імунореактивність проти живих клітин порівняно з IPO.24, ON.108 та 6D363 при аналогічному міченні антитіл радіоактивним ізотопом.

Цей результат вказує на те, що ННІ має суттєво іншу антигенну взаємодію, ніж три інших антитіла.

Приклад 7. ДНК та амінокислотна послідовність легко- та важколанцюгових змінних регіонів.

Генна та білкова послідовність змінних регіонів анти-CD37 антитіл ННІ виглядає наступним чином:

Послідовність гена VH aCD37 відповідно до SEQ ID NO: 1 та послідовність білка VH aCD37 відповідно до SEQ ID NO: 2.

VH aCD37

gagatccagctgcagcagctctggacctgagctgggaagcctggggcttcagtgaaggta

E I Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K V

tcctgcaaggctctctggttactcattcactgactacaacatgtactgggtgaagcagagc

S C K A S G Y S F T D Y N M Y W V K Q S

catggaagagccttgagtgattggatatattgatccttacaatgggtgatactacac

H G K S L E W I G Y I D P Y N G D T T Y

aaccagaagtcaagggcaagggccacattgactgttgacaagtctccagcacagccttc

N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A F

atccatctcaacagcctgacatctgaggactctgcagctctattactgtgaagatcccct

I H L N S L T S E D S A V Y Y C A R S P

tatggtcactatgctatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca

Y G H Y A M D Y W G Q G T S V T V S S

Послідовність гена VL aCD37 відповідно до SEQ ID NO: 3 та послідовність білка VL aCD37 відповідно до SEQ ID NO: 4.

VL aCD37

gacattgtgatgacccagctctcacaactctgtccacatcagtaggagacaggggtcagc

D I V M T Q S H K L L S T S V G D R V S

atcacctgcaaggccagtcaggatgtgagtactgctgtagactggtatcaacagaaacca

I T C K A S Q D V S T A V D W Y Q Q K P

ggacaatctcctaaactactgattaactgggcatccaccggcacactggagtcctgat

G Q S P K L L I N W A S T R H T G V P D

cgcttcacaggcagtggtatctgggacagattatactctcaccatcagcagtatgcaggct

R F T G S G S G T D Y T L T I S S M Q A

gaagacctggcactttattactgtcgacaacattatagcactccattcacgttcggctcg

E D L A L Y Y C R Q H Y S T P F T F G S

gggacaaagttgaaataaaa

G T K L E I K

Амінокислотна послідовність значно відрізняється від амінокислотної послідовності CD37 - зв'язуючих антитіл АО (Heider et al., 2009). Перекривання між змінним легким ланцюгом ННІ та АО дорівнює 56 %, у той час, як перекривання між змінним важким ланцюгом дорівнює 82 %.

Приклад 8. Зв'язування мічених радіоактивним ізотопом ННІ клітинами, насиченими ритуксимабом антитіл CD20.

Пацієнти з не-ходжкінською лімфомою часто отримують ритуксимаб у якості стандартної терапії. Було б корисно, якщо б мічені радіоактивним ізотопом ННІ могли бути застосовані у пацієнтів, навіть якщо вони проходять терапію з ритуксимаб. У якості моделі застосовували клітини лімфому Daudi, що експресують обидва антигени CD20 та CD37.

Клітини лімфому Daudi (3, 3 мільйона у 0.5 мл) попередньо або спільно обробили надлишковими кількостями (100 мкг/мл ритуксимаб) протягом 5 хвилин та потім додали 1 мкг ¹²⁵I - мічених ННІ або додали ¹²⁵I - мічені ННІ без попередньої обробки ритуксимабом. Для визначення неспецифічного зв'язування ¹²⁵I-ННІ застосували таку ж саме конфігурацію, як вказано вище, але з попередньою обробкою неміченими ННІ (10 мкг/мл). Клітини інкубували протягом двох годин у PBS при кімнатній температурі, перелічили за допомогою гамма-лічильника, тричі промили у 1 мл PBS, потім центрифугували та ще раз перелічили на радіоактивність клітинного зв'язування.

З попередньою /спільною обробкою ритуксимабом, 26.0 % (загальне зв'язування - 27.4 % мінус неспецифічне зв'язування - 1.4 %) доданого ¹²⁵I-ННІ специфічно зв'язувалося з клітинами.

Без попередньої /спільної обробки ритуксимабом, специфічно зв'язувалося 25.5 % (26.9-1.4) (всі числові дані наведені у вигляді середнього від трьох паралельних серій). Тобто, була відсутня значна різниця у зв'язуванні ^{125}I -HH1, пов'язана з наявністю ритуксимаб.

5 Попередня та спільна обробка надлишковими кількостями ритуксимаб не змінює здатність клітинного зв'язування мічених радіоактивним ізотопом HH1, отже, не в змозі блокувати доступ до антигену CD37.

Це свідчить про те, що радіоімуноterapia з міченими радіоактивним ізотопом HH1 може бути прийнятною для пацієнтів після або під час імуноtherapiї з анти-CD20 антитілами а також для пацієнтів, що не приймають ритуксимаб.

10 Приклад 9. Обробка мишей SCID, внутрішньовенне інокульованих клітинами лімфоми Daudi з застосуванням ^{177}Lu -HH1.

Лікування пацієнтів, що страждають на лімфому за допомогою сучасної CD20 - спрямованої радіоімуноtherapiї може бути проблематичним відносно пацієнтів, що попередньо приймали ритуксимаб через антигенний дрейф та можливе блокування антигену CD20. Тому, може бути 15 більш ефективною радіоімуноtherapiя, що орієнтована на інші антигени. Ми отримали внутрішньовенну пухлинну модель за допомогою внутрішньовенної ін'єкції клітин лімфоми людини мишам з важким комбінованим імунодефіцитом (SCID). При внутрішньовенній інокуляції SCID мишей клітинами лімфоми Daudi, зростання цих пухлинних клітин спричинює розвиток паралічу задніх кінцівок.

20 Експериментальним мишам SCID ввели шляхом внутрішньовенної ін'єкції 10 мільйонів клітин Daudi за один тиждень перед введенням 50 або 100 мБк/кг ^{177}Lu -HH1, 50 г. HH1, 50 г ритуксимаб або NaCl. Мишей перевіряли стосовно появи паралічу задніх кінцівок та втрати ваги а також кожного наступного тижня проводили підрахунок абсолютного вмісту лейкоцитів. За кінцеву точку обрали припинення наявності симптомів виживання. Для отримання мічених 25 радіоактивним ізотопом антитіл, HH1 спочатку помітили p-SCN-Bn-DOTA та очистили. Після заміни буферу, до DOTA-HH1 додали ^{177}Lu -HH1 (Perkin Elmer, Boston, Ma, USA) та суміш струшували протягом 40 хв. при 40 °C. Питома активність для кінцевого продукту дорівнювала приблизно 3200 мБк/мкг. Кожен препарат розчинили у ізотонічному фізіологічному розчині до загального обсягу ін'єкції у 100 мкл на тварину.

30 Середнє безсимптомне виживання сягало 26 днів (діапазон 21 – 33 днів) для фізіологічного розчину, 40 днів (діапазон 23-44) для HH1 та 40 днів (діапазон 33-44) для ритуксимаб (Fig. 8). 80 % тварин були живі через 79 днів після введення ^{177}Lu -HH1 (50 кБк /г). Дві миші у групі тварин, яким ввели 100 кБк /г померли перед будь-якою твариною у групах з фізіологічним розчином та підрахунок клітин крові показав радіотоксичність. Третя тварина з групи 100 кБк /г померла на 35 49 день. Інші тварини (70 %) залишалися живими на 79 день. Виживання мишей, оброблених ^{177}Lu -HH1 було значно вищим, ніж виживання мишей, оброблених NaCl, HH1 або ритуксимаб ($p < 0.005$, Mann Whitney Log Rank Test (логарифмічний ранговий критерій)).

Ці дані показують, що групи, що отримали ^{177}Lu -HH1 з дозуванням у 50 або у 100 кБк /г ваги тіла мали значно краще виживання, ніж групи, що отримали фізіологічний розчин або 40 імуноtherapiю або з HH1 або з ритуксимабом. Дані токсичності свідчать, що активність повинна 40 бути нижче 100 кБк / г ваги тіла. Ці дані вказують на те, що ^{177}Lu -HH1 мають відповідні властивості для радіоімуноtherapiї in vivo.

Приклад 10. Біорозподілення ^{177}Lu -HH1 у голих мишах з CD37, що експресують пухлинні ксенотрансплантати.

45 Обчислено кількість мічених лютецієм-177 антитіл HH1 для розподілення у тканинах in vivo та таргетингу пухлин.

Спочатку антитіла помітили хелатором p-SCN-Bn-DOTA. DOTA розчинили у 0.05M HCl, додали до антитіл у співвідношенні 5: 1 та відрегулювали pH до 8-9 промиванням карбонатним буфером з застосуванням фільтрів Amicon centrifuge filters (Millipore, USA) з границею 50 відокремлення по молекулярній масі компонентів, що затримуються (molecular weight cut-off) у 30 кДа.

Потім pH знову перевірили та у разі необхідності відрегулювали. Розчин струшували протягом 60 хв. при кімнатній температурі, та потім реакцію призупинили додаванням 50 мкл 200 мМ розчину гліцина (на мг антитіл). Для видалення вільного хелатора кон'юговані антитіла 55 4-5 разів промили PBS (PAA) (з застосуванням Amicon та центрифугування) та потім відрегулювали pH до 5 промиванням з ацетатом амонію. Потім змішали ^{177}Lu (Perkin Elmer, Boston, Ma, USA) з 0.5 мг DOTA-HH1 у 2 мл поліпропіленовій пробірці (Eppendorf, Germany) та суміш струшували години при 40 °C. Значення питомої активності звичайно дорівнювали 25-120 мБк/кг для ^{177}Lu -кон'югатів.

Якість радіоімунокон'югатів вимірювали з застосуванням клітин лімфоми та за допомогою модифікованого способу Ліндмо. Були застосовані концентрації клітин до 108 клітин/мл. Кон'югати, застосовані у експерименті, мали імунореактивність вище, ніж 50 %.

Біорозподілення ^{177}Lu -HNI визначали у голих мишах BALB/c nude (nu/nu) чоловічої статі, імплантованих за три тижні перед початком досліджень 1-1 - 1 мм пухлинними ксенотрансплантатами Daudi. Препарати вводили ін'єкцією 100 мкл розчину у хвостову вену кожної тварини. Середня активність для ^{177}Lu -HNI дорівнювала 500 кБк на мишу. На момент часу застосували чотири - п'ять тварин. Розтини проводили після зсуву шийних хребців у різні моменти часу після ін'єкції. Було визначено вагу кожного зразка тканини та проведені вимірювання ^{177}Lu на відкаліброваному гамма-детекторі (Cobra II auto-gamma detector, Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA). Зразки ін'єкційних препаратів застосували в якості посилення у процедурах вимірювання. Поглинання та утримування ^{177}Lu -мічених HNI та у нормальних тканинах BALB/c-nude (nu/nu) голих мишах жіночої статі з ксенотрансплантатами Daudi наведено у Фіг. 7. Не існувало жодних ознак перерозподілу радіонуклідів від/до будь-яких органів після початкового поглинання радіоімунокон'югатів, що вказує на стабільність радіоімунокон'югатів.

Ін'єкція ^{177}Lu -HNI голим мишам з пухлинами показала низький рівень поглинання кістками. Як відомо, вільний ^{177}Lu накопичується у кістках, отже, цей результат свідчить про те, що радіоімунокон'югат був стійким in vivo. Поглинання у пухлинах було значно більшим, ніж у інших органах у більш пізніх точках часу. Це свідчить про те, що ^{177}Lu має відповідний період напівжиття для радіоімунотерапії з застосуванням антитіл HNI.

Дані біорозподілення ^{177}Lu -HNI показують їх поглинання та виведення у відповідній нормальній тканині та значне утримування у CD37, що експресують пухлинні ксенотрансплантати.

Антитіла HNI начебто є краще прийнятими для радіоімунотерапії. Кон'югат ^{177}Lu -HNI здається, є особливо прийнятним, тому що бажані співвідношення пухлинної до нормальної тканини були отримані до розпаду більшої частки радіонуклідів.

Таблиця 1

Імунореактивність та питома активність радіоімунокон'югатів.

Радіоімунокон'югат	IRF1 [†] (%)	Питома активність [†] мБк/мг	# експ.
^{125}I -HNI	66±17 (39-92)	75±15 (51-104)	17
^{111}In -HNI	66±14 (51-78)	22±12 (9-32)	3
^{177}Lu -HNI	56	92	1
^{125}I -ритуксимаб	62±6 (54-68)	69±30 (34-118)	6
^{111}In -ритуксимаб	45	16	1
^{177}Lu -ритуксимаб	60	137	1
[†] Середнє ± SD (діапазон)			

30 SD - стандартне відхилення

Таблиця 2

Середня кількість антигенів (Bmax) у клітинах Raji, Rael та Daudi, рівноважна постійна дисоціації (Kd) та постійна швидкості асоціації (Ka) для антитіл ритуксимаб та HNI.

Антитіло	Клітинна лінія	Bmax (антиген/клітина)	Kd (нМ)	Ka (нМ/год.)
HNI	Raji	146 000±7 600	6.3±1.7	0.36±0.14
HNI	Rael	263 000±27 000	12.7±5.5	0.07±0.01
HNI	Daudi	340 000±5 000	2.7±0.3	0.72±0.07
ритуксимаб	Raji	272 000±69 000	4.8±0.9	0.08±0.006
ритуксимаб	Rael	626 000±36 000	12.0±2.0	0.08±0.007

Таблиця 3

Кількість зв'язаних атомів ^{177}Lu на клітину Daudi через дві години інкубування.

Доза антитіла (мкг/мл)	^{177}Lu -HHI			^{177}Lu - ритуксимаб		
	неблоковані	блоковані	специфічні	неблоковані	блоковані	специфічні
0 ^a	12	7	5	8	53	-45
1	8318	449	7869	8554	372	8182
2,5	9105	720	8385	11629	885	10744
5	10025	1837	8188	13658	2019	11639
10	13646	3521	10125	17344	2769	14575
20	16290	8473	7812	30095	9709	20386

(^a - різні значення для контрольних зразків свідчать про мінливість фонового випромінювання у лічильнику).

5

Таблиця 4

Кількість зв'язаних атомів ^{177}Lu на клітину Daudi через 18 годин інкубування.

Доза антитіла (мкг/мл)	^{177}Lu -HHI			^{177}Lu - ритуксимаб		
	неблоковані	блоковані	Чиста сума	неблоковані	блоковані	Чиста сума
0 ^a	12	5	7	10	53	-43
1	10327	301	10026	12831	356	12475
2,5	11757	787	10970	18836	1385	17451
5	12123	1857	10266	24097	1871	22226
10	11548	3205	8343	24249	2860	21389
20	15233	5445	9788	26639	5824	20815

Таблиця 5

Зв'язувальна фракція чотирьох анти-
CD37 антитіл.

Антитіло	IRF
HH1	50 %
O.N. 108	24 %
IPO-24	16 %
6D263	21 %

Посилання.

- 10 Bernstein ID, Eary JF, Badger CC, Press OW, Appelbaum FR, Martin PJ, Krohn KA, Nelp WB, Porter B, Fisher D, Miller R, Brown S, Levy R, Donnell Thomas E. High dose radiolabelled antibody therapy of lymphoma. Cancer Res. 1990, 50(3 Suppl), 1017s-1021s.
- Brechbiel MW. Bifunctional chelates for metal nuclides. Q J Nucl Med Mol Imaging 2008, 52 (2), 166-173.
- 15 Buchegger F, Antonescu C, Delaloye AB, Helg C, Kovacsics T, Kosinski M, Mach JP, Ketterer N. Long-term complete responses after ^{131}I -tositumomab therapy for relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma. Br J Cancer. 2006, 94(12), 1770-6.
- Dable, J., Krogh, C. F. elhus, K. B., Kaa!hus, O., Larsen, R. H. and Stokke, T. A one-step method for determining the maximum number of bound antibodies, and the affinity and association rate constant of antibody binding. Nuclear Medicine Communications. 2007, 28, 742-747.
- 20 Gordon LI, Molina A, Witzig T, Emmanouilides C, Raubitschek A, Darif M, Schilder RJ, Wiseman G, White CA. Durable responses after ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for CD20+B-cell lymphoma: long-term follow-up of a phase 1/2 study. Blood. 2004, 103(12), 4429-31.

- Grosmaire LS, Hayden-Led better MS, Ledbetter JA, Thompson PA, Simon SA, Brady W. B-cell reduction using CD37-specific and CD20-specific binding molecules. US 2007/0059306 A1
Heather A. Jacene, Ross Filice, Wayne Kasecamp, and Richard L. Wahl.
Comparison of 90Y-Ibritumomab Tiuxetan and 131I-Tositumomab in Clinical Practice. J Nucl Med.
5 2007, 48, 1767-1776.
Heider KH, Borges E, Ostermann E. Anti CD37 antibodies. WO 2009/019312.
Henriksen G, Funderud S, Hoff P. Bi-labelled antibody and Bi-labelled streptavidin. Comparison of targeting efficiency of a lymphoma cell line in vitro. J Labelled Compds Radiopharm. 1997, 34(12), 1039-1046.
10 Hemminki A., Hoffren A-M., Takkinen K., Vehniainen M., Makinen M-L., Pettersson K., Teleman O., Soderlund H., Teeri T.T... Introduction of lysine residues on the light chain constant domain improves the labeling properties of a recombinant Fab fragment. Protein Engineering. Vol. 8, No. 2, pp. 185-191, 1995.
Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of
15 metallic radionuclides. Adv Drug Deliv Rev. 2008, 60 (12), 1347-1370.
Ngo NT, Brodie C, Giles C, Horncastle D, Klammer M, Lampert IA, Rahemtulla A, Naresh KN. The significance of tumour cell immunophenotype in myeloma and its impact on clinical outcome. J Clin Pathol. 2009, 62(11), 1009-15.
Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, Martin PJ, Badger CC, Nelp WB, Glenn S, Butchko G, Fisher
20 D, Porter B, Matthews DC, Fisher LD, and Bernstein ID
Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. N Engl J Med. 1993, 329(17), 1219-24.
Press OW, Leonard JP, Coiffier B, Levy R, Timmerman J. Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2001, 221-40.
25 Smeland E, Funderud S, Ruud E, Kiil Blomhoff H, Godal T. Characterization of two murine monoclonal antibodies reactive with human B cells. Their use in a high-yield, high-purity method for isolation of B cells and utilization of such cells in an assay for B-cell stimulating factor. Scand J Immunol. 1985, 21(3), 205-14.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Радіоімунокон'югат, що зв'язує CD37 людини, що включає:
 - а) мишаче моноклональне антитіло HH1,
 - б) хелатуючий лінкер,
 - 35 в) радіонуклід, вибраний з групи, що складається з ^{177}Lu , ^{225}Ac , ^{227}Th та ^{90}Y .
2. Радіоімунокон'югат, що зв'язує CD37 за п. 1, де радіонуклідом є ^{177}Lu .
3. Фармацевтична композиція, що включає радіоімунокон'югат за будь-яким з пп. 1, 2 та фармацевтично прийнятний носій.
4. Фармацевтична композиція за п. 3, що додатково включає одне або більше додаткових
40 антитіл або радіоімунокон'югатів.
5. Фармацевтична композиція за п. 4, де одне або більше додаткових антитіл або радіоімунокон'югатів, націлених на CD20.
6. Фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 3-5, призначена для лікування злоякісних В-клітин, що експресують антиген CD37.
- 45 7. Фармацевтична композиція за п. 6, призначена для лікування неходжкінської лімфоми та хронічного лімфолейкозу.
8. Застосування радіоімунокон'югата за будь-яким з пп. 1, 2, для лікування В-клітинних злоякісних пухлин.
9. Застосування за п. 8, де радіоімунокон'югат вводять у комбінації з або додатково до іншої
50 терапії.
10. Застосування за п. 9, де терапію вибирають з попереднього лікування, хіміотерапії, терапії за допомогою моноклональних антитіл, хірургії, радіотерапії та/або фотодинамічної терапії.
11. Застосування за пп. 9, 10, де терапія включає попереднє лікування при використанні анти-CD20 та/або анти-CD37 моноклональних антитіл перед лікуванням при використанні
55 радіоімунокон'югата за будь-яким з пп. 1, 2.
12. Спосіб лікування В-клітинного злоякісного захворювання, вибраного з неходжкінської лімфоми та хронічного лімфолейкозу, що включає введення ефективної кількості фармацевтичної композиції за будь-яким з пп. 3-7.
13. Набір для отримання радіоімунокон'югата відповідно до будь-якого з пп. 1, 2, що включає
60 два або більше флаконів, де перший флакон містить кон'югат, що включає хелатор, приєднаний

до мишачого моноклонального антитіла НН1; а другий флакон містить радіонуклід, вибраний з групи, що складається з ^{177}Lu , ^{225}Ac , ^{227}Th та ^{90}Y .

14. Набір за п. 13, де вміст одного або декількох флаконів є або у ліофілізованому стані, або у формі розчину.

5

j

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

```

<110> Нордік Нановектор АС
        ЛАРСЕН РОЙ Г.
        ДАЛЕ ЙОСТЕЙН
        БРЮЛЕНД ОЙВІНД С.

<120> РАДІОІМУНОКОН'ЮГАТИ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 46575PC01

<150> 61/299,524
<151> 2010-01-29

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 357
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 1
gagatccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggccttc agtgaaggta      60
tcctgcaagg cttctggtta ctcatctact gactacaaca tgtactgggt gaagcagagc      120
catggaaaga gccttgagtg gattggatat attgatcctt acaatggtga tactacctac      180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actggtgaca agtcctccag cacagccttc      240
atccatctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatccctt      300
tatggctact atgctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca      357

<210> 2
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala      15
1
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr      30
20
Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile      45
35
Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe      60
50
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe      80
65
Ile His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys      95
85
90

```

Ala Arg Ser Pro Tyr Gly His Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 321
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
gacattgtga tgacccagtc tcacaaactc ttgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag actggtatca acagaaacca 120
ggacaatctc ctaaactact gattaactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat tatactctca ccatcagcag tatgcaggct 240
gaagacctgg cactttatta ctgtcgacaa cattatagca ctccattcac gtccggctcg 300
gggacaaagt tggaaataaa a 321

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Leu Leu Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

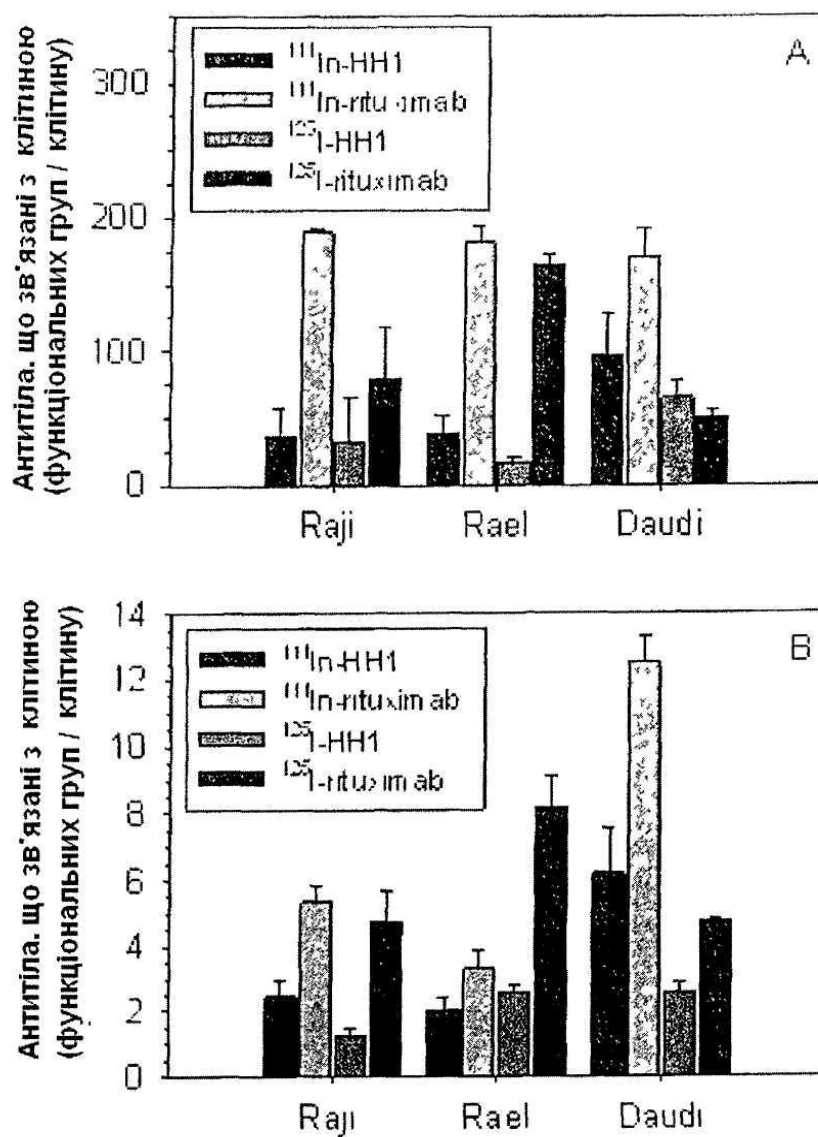
Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Asn Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

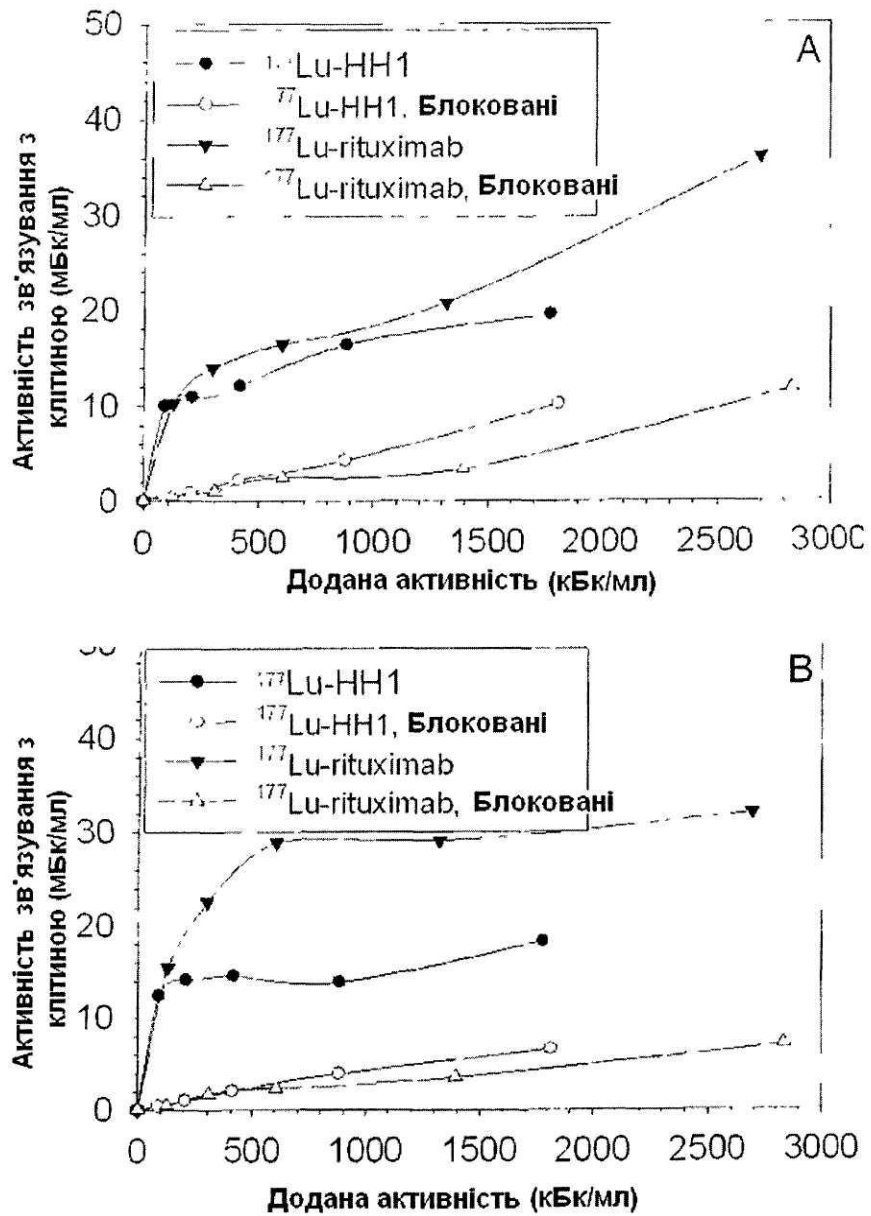
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Ala
65 70 75 80

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

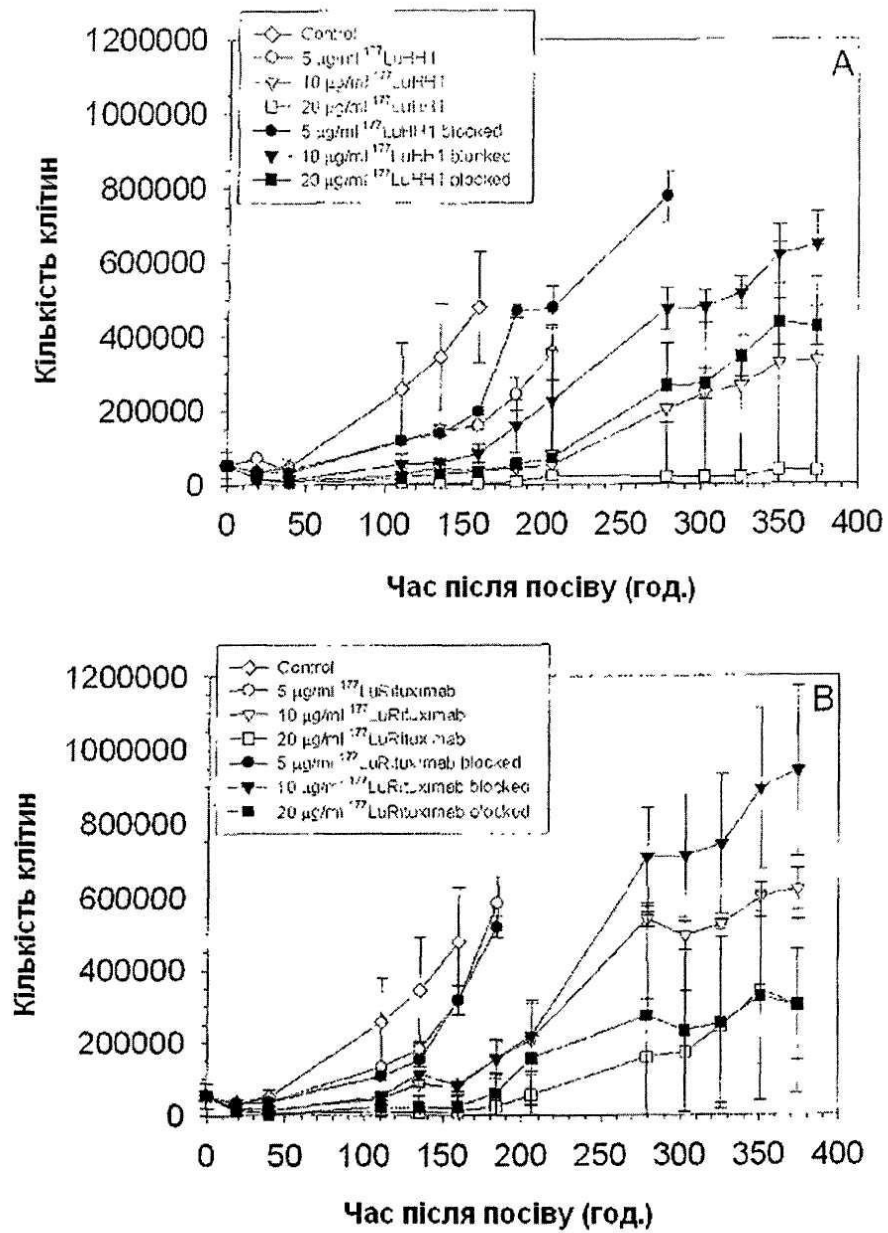
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105



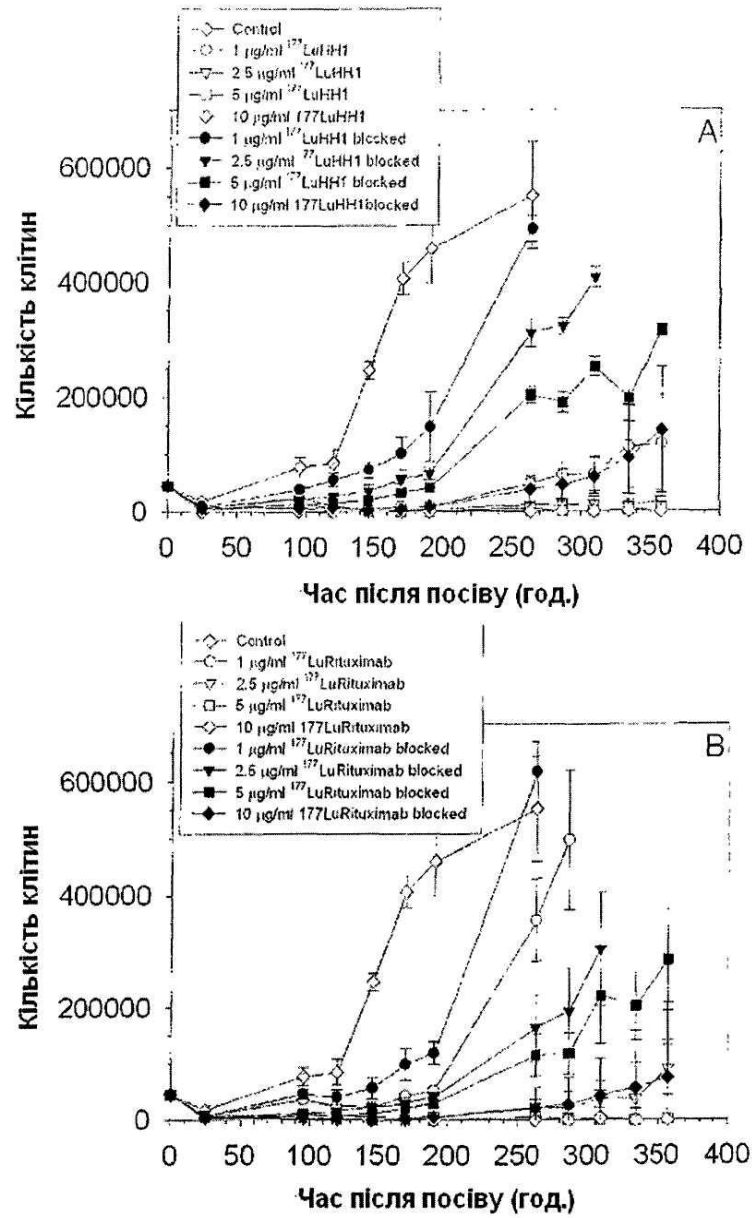
Фиг. 1



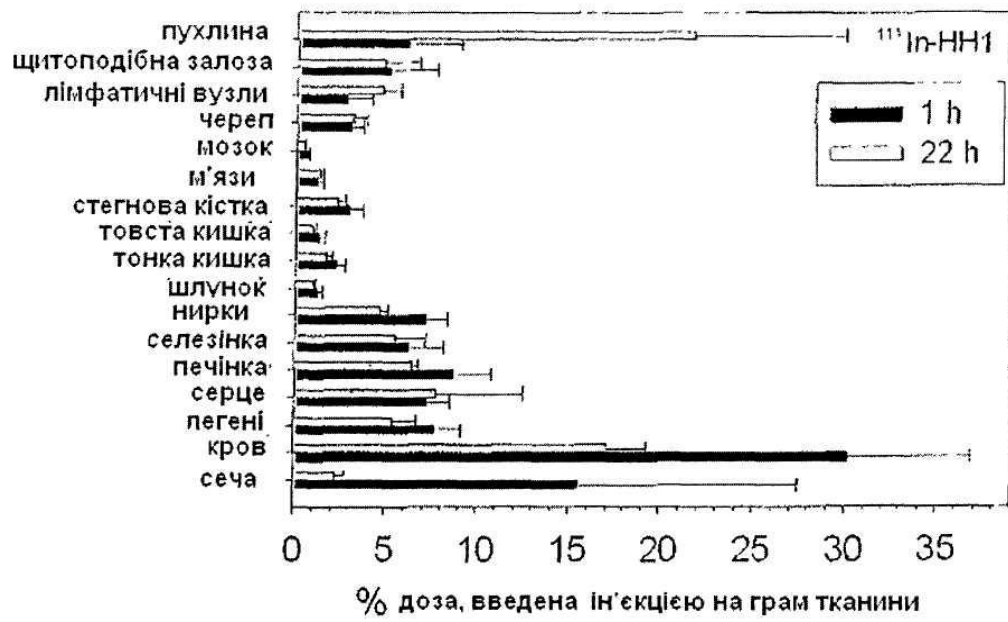
Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5

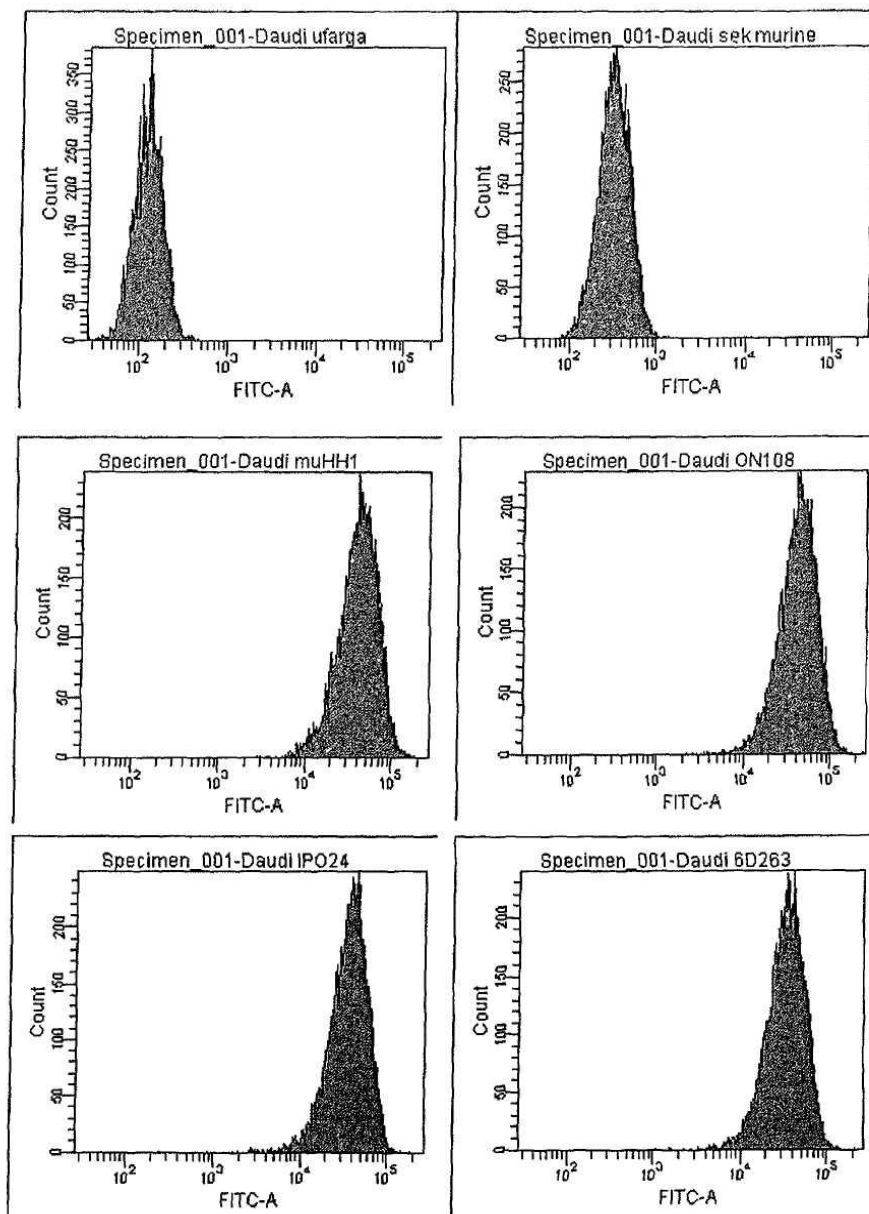
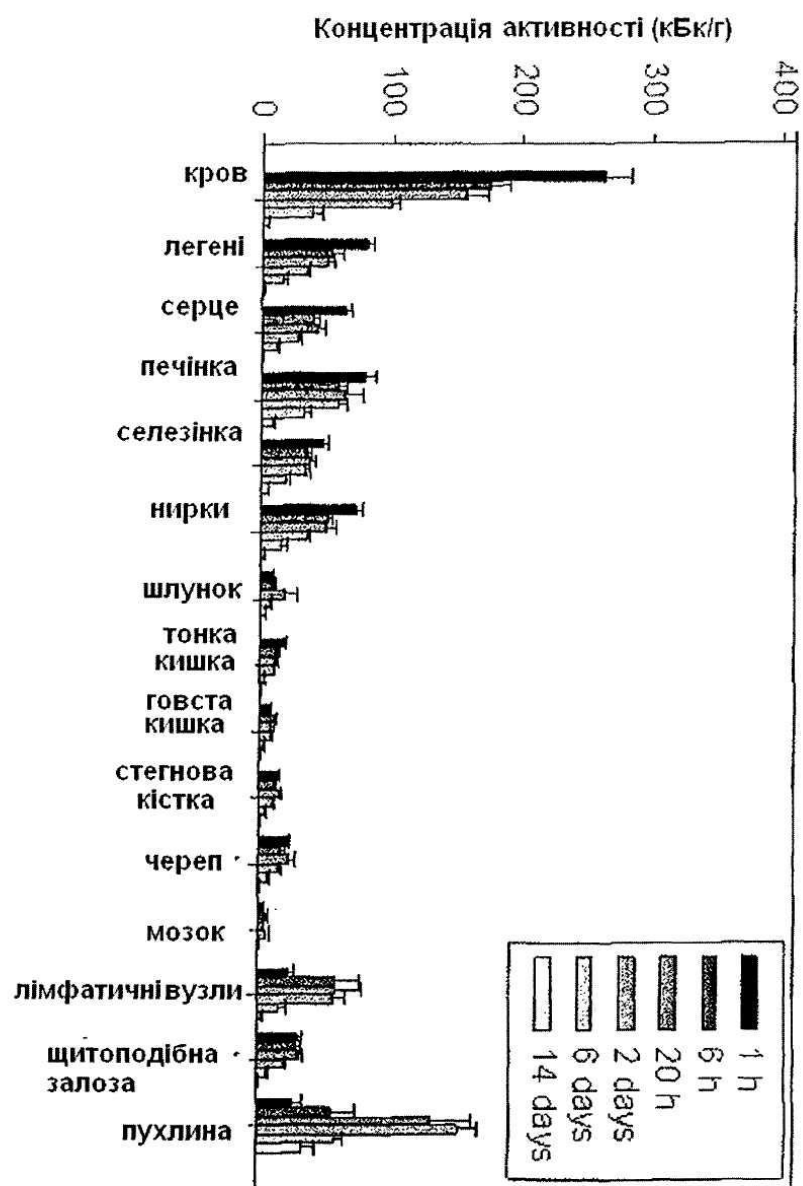
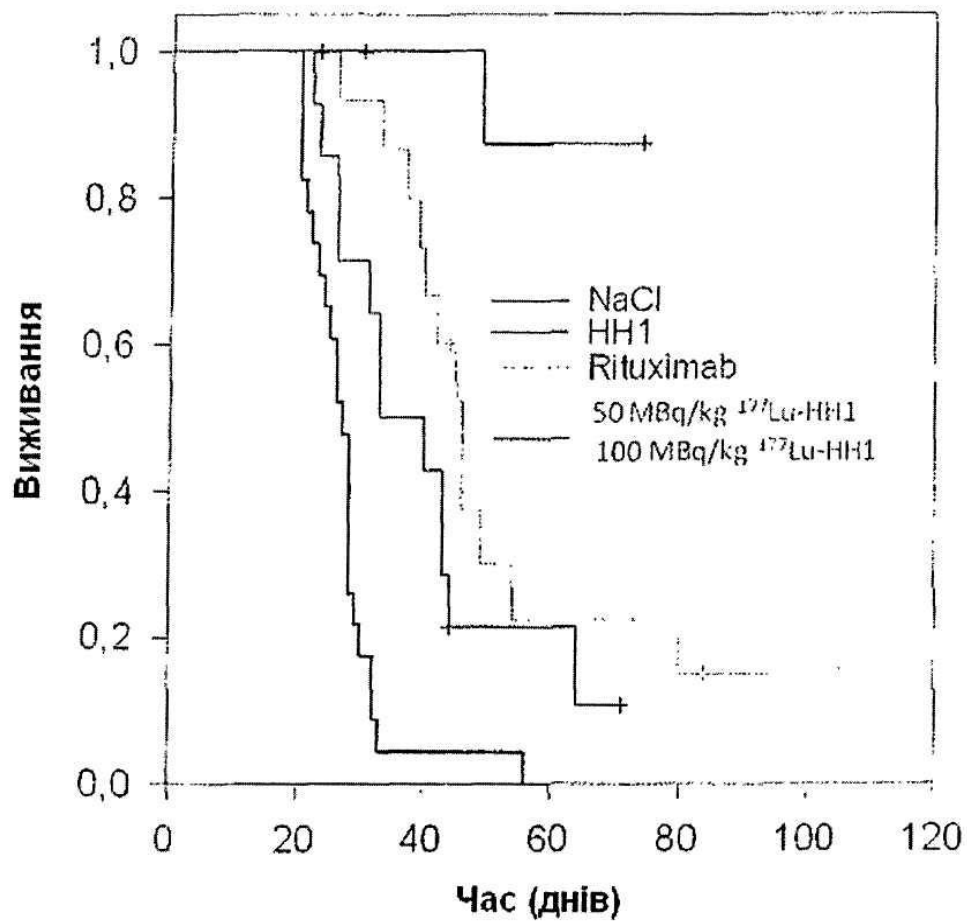


Fig. 6



Фіг. 7



Фіг. 8

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601