



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104460** (13) **C2**  
(51) МПК (2014.01)

**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 35/02** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 5/20** (2006.01)  
**C07K 19/00**  
**G01N 33/574** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2011 12795**  
(22) Дата подання заявки: **31.03.2010**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.02.2014**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/211,695, 61/166,217, 61/266,972**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **01.04.2009, 02.04.2009, 04.12.2009**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US, US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.02.2012, Бюл.№ 3**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.02.2014, Бюл.№ 3**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2010/029516, 31.03.2010**

(72) Винахідник(и):  
**Елкінс Крісті (US), Полсон Ендрю (US), Ебенс Аллен (US), Адамс Камелія (US), Чжен Бін (US), Джунутула Джагатх Р. (US), Хонго Джо-Енн (US), У Янь (US)**  
(73) Власник(и):  
**ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, United States of America (US)**  
(74) Представник:  
**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
WO2006039238 A2, 13.04.2006.  
WO2006076691 A2, 20.07.2006.  
WO2008109533 A2, 12.09.2008.  
WO0138490 A2, 31.05.2001.  
WO2005117986 A2, 15.012.2005.  
WO2006034488 A2, 30.03.2006.  
WO2005063299 A2, 14.07.2005.  
ISE TOMOKO ET AL: "Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2 protein on lymphoma cell lines and hairy cell leukemia cells detected by novel monoclonal antibodies" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 11, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 87-96.  
ISE T ET AL: "Elevation of soluble CD307 (IRTA2/FcRH5) protein in the blood and expression on malignant cells of patients with multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia, and mantle cell lymphoma" LEUKEMIA, MACMILLAN PRESS LTD, US LNKD- DOI:10.1038/SJ.LEU.2404445, vol. 21, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 169-174.  
POLSON ANDREW G ET AL: "Expression pattern of the human FcRH/IRTA receptors in normal tissue and in B-chronic lymphocytic leukemia" INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB LNKD- DOI:10.1093/INTIMM/DXL069, vol. 18, no. 9, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 1363-1373.

UA 104460 C2

**(54) АНТИТІЛА ДО FcRCH5, ЇХ ІМУНОКОН'ЮГАТИ Й СПОСОБИ ЇХНЬОГО ЗАСТОСУВАННЯ**

---

**(57) Реферат:**

Даний винахід належить до антитіл, специфічних до FcRH5, композицій, що містять вказані антитіла і прийнятні для використання в лікуванні гематобластозів у ссавців, а також способи застосування вказаних композицій для вказаних цілей.

Перехресне посилання на родинні заявки на винахід

Дана заявка на винахід заявляє про пріоритет відповідно до Розділу 119(д) і має перевагу перед попередньою заявкою на патенти США No. 61/211695 від 1 квітня 2009 р., 61/166217 від 2 квітня 2009 р. і 61/266972 від 4 грудня 2009 р., опис яких включено сюди у всій своїй повноті за допомогою посилання.

Посилання на список послідовностей

Дана заявка на винахід містить перелік послідовностей, що був отриманий за допомогою EFS-Web і включений у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті. Зазначена копія ASCII була створена 10.08.2012, файл був названий GNE0350NATIONAL2.txt і має розмір 93407 байт.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід описує композиції, які використовують для лікування гематобластозів у ссавців, а також способи використання таких композицій для зазначених цілей.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Злоякісні пухлини (рак) є другою провідною причиною смертності в Сполучених Штатах Америки після серцево-судинних захворювань (Boring et al., CA Cancer J. Clin. 43:7 (1993)). Рак характеризується збільшенням кількості патологічних клітин (або клітин новоутворення), що відбулися зі здорової тканини, з утворенням пухлинної маси, інвазією таких клітин новоутворення в прилягаючі тканини й утворенням злоякісних клітин, які, зрештою, поширюються за допомогою кровоносної або лімфатичної системи в регіональні лімфатичні вузли й віддалені ділянки організму в результаті процесу, який має назву метастази. При наявності раку клітини проліферують в умовах, при яких здорові клітини не почали б зростати. Рак проявляє себе у вигляді цілого ряду форм, які характеризуються по різній ступені інвазивності й агресивності.

Види раку, що включають клітини, які утворюються в ході гематопоезу, тобто процесу утворення клітинних елементів крові, таких як лімфоцити, лейкоцити, тромбоцити, еритроцити й клітини - природні кілери, відносяться до гематобластозів. Лімфоцити, що знаходяться у крові й лімфатичній тканині, відіграють важливу роль в імунній відповіді й підрозділяються на два основних класи лімфоцитів: В-лімфоцити (В-клітини) і Т-лімфоцити (Т-клітини), які опосередковують гуморальний й клітинно-опосередкований імунітет, відповідно.

В-клітини дозрівають у кістковому мозку, і при виході з кісткового мозку такі клітини мають можливість експресувати на своїй поверхні антигензв'язуюче антитіло. При першій зустрічі нативного антитіла з антигеном, до якого специфічно мембранозв'язане антитіло, клітина починає швидко ділитися, і її потомство диференціює в В-клітини пам'яті й ефекторні клітини, які мають назву «плазмочити». В-клітини пам'яті мають більшу тривалість життя й продовжують експресувати мембранозв'язане антитіло з такою ж самою специфічністю, що й вихідна батьківська клітина. Плазмочити не виробляють мембранозв'язане антитіло, але замість цього виробляють антитіло у формі, що припускає секрецію. Секретовані антитіла є основною молекулою-ефектором у гуморальному імунітеті.

Т-клітини дозрівають у тимусі, що забезпечує середовище для проліферації й диференціації незрілих Т-клітин. Під час дозрівання Т-клітин, останні піддаються реаранжуванню генів, відповідальних за рецептор Т-клітин і позитивний і негативний відбір, що дозволяє визначити фенотип клітинної поверхні зрілої Т-клітини. Характерними маркерами клітинної поверхні зрілих Т-клітин є комплекс CD3: Т-клітинний рецептор і один із со-рецепторів (CD4 або CD8).

У спробах відкрити ефективні клітинні мішені для лікування раку, дослідники вирішили ідентифікувати трансмембранні або зв'язані іншим чином з мембраною поліпептиди, які специфічним чином експресуються на поверхні ракових клітин одного або декількох окремих видів у порівнянні з одним або декількома типами здорових неракових клітин. Часто такі мембранозв'язані поліпептиди експресуються у більшій кількості на поверхні ракових клітин, ніж на поверхні неракових клітин. Ідентифікація таких пухлиноасоційованих антигенів-поліпептидів клітинної поверхні дозволила специфічно використовувати ракові клітини як мішень для їхнього руйнування в ході терапії, яка ґрунтується на використанні антитіл. У цьому випадку повідомляється, що терапія, яка ґрунтується на використанні антитіла, виявилася дуже ефективною в лікуванні певних видів рака. Наприклад, ГЕРЦЕПТИН® і РІТУКСАН® (обидва виробництва Genentech Inc., Південний Сан-Франциско, шт. Каліфорнія) є антитілами, які з успіхом використовувалися для лікування раку молочної залози й неходжкинської лімфоми, відповідно. Зокрема, ГЕРЦЕПТИН® є рекомбінантним гуманізованим ДНК-похідним моноклональним антитілом, що вибірково зв'язується з позаклітинним доменом протоонкогену людського епідермального фактора росту 2 (HER2). Гіперекспресія білка HER2 відзначається в 25-30% випадків первинного раку молочної залози. РІТУКСАН® був отриманий шляхом генної

інженерії й представлений химерним мишачим/людським моноклональним антитілом, дія якого спрямована проти антигену CD20, що перебуває на поверхні нормальних і злоякісних В-лімфоцитів. Обидва таких антитіла виробляються рекомбінантним способом у клітинах яєчників китайського хом'ячка (СНО-клітинах).

У ході інших спроб відкрити ефективні клітинні мішені для лікування раку дослідники ідентифікували (1) не пов'язані з мембраною поліпептиди, які специфічно виробляються одним або декількома типами ракових клітин у порівнянні з одним або декількома окремими типами неракових здорових клітин, (2) поліпептиди, які виробляються раковими клітинами на такому рівні експресії, що істотно перевищує такий самий рівень однієї або декількох здорових неракових клітин, або (3) поліпептиди, експресія яких особливо обмежена тільки одним (або дуже обмеженою кількістю різних типів) типом тканини як при наявності, так і при відсутності раку (наприклад, здорова тканина передміхурової залози й тканина пухлини передміхурової залози). Такі поліпептиди можуть залишатися локалізованими усередині клітини або можуть секретуватися раковими клітинами. Більше того, такі поліпептиди можуть експресуватися не тільки раковими клітинами, але також й клітинами, які виробляють і/або секретують поліпептиди, що володіють впливом, який посилює або підвищує зростання ракових клітин. Подібні секретуючі поліпептиди часто представлені білками, що надають раковим клітинами перевагу в зростанні в порівнянні зі здоровими клітинами, і включають, наприклад, ангіогенні фактори, фактори клітинної адгезії, фактори росту й т.п. Ідентифікація антагоністів подібних, не пов'язаних з мембраною поліпептидів, як очікується, може допомогти виявити ефективні терапевтичні агенти для лікування подібних типів раку. Більше того, ідентифікація схеми експресії таких поліпептидів виявиться корисною для діагностики окремих типів раку в ссавців.

Незважаючи на представлені вище досягнення в лікуванні раку в ссавців, існує велика потреба в додаткових терапевтичних агентах, що дозволяють визначити наявність пухлини в ссавця й ефективно інгібувати зростання клітин новоутворення, відповідно. Відповідно до цього, метою даного винаходу є ідентифікація поліпептидів, пов'язаних із клітинною мембраною, секретованих або внутрішньоклітинних поліпептидів, експресія яких особливо обмежена тільки одним типом тканини (або дуже обмеженою кількістю типів тканин), кровотворними тканинами, як у присутності, так і у відсутності раку, а також використання таких поліпептидів і їхніх кислот, що кодуєть, для одержання композицій, які можуть використовуватися для лікування й/або визначення гематобластозів у ссавців.

При В-клітинних злоякісних новоутвореннях, включаючи В-клітинний лімфому і мієлому, часто зустрічаються аномалії хромосоми 1q21, однак гени, які задіяні в ході таких аберацій, здебільшого невідомі. Хромосомні аномалії дисків 1q21-q23 зустрічаються найчастіше серед порушень геному при В-клітинній неходжкінській лімфомі й множинній мієломі. Серед підтипів неходжкінської лімфоми, точки розриву транслокацій 1q21-q23, включаючи транслокації й дуплікації, часто відзначалися у вигляді одиночної хромосомної аномалії при фолікулярній і дифузійній В-крупноклітинній лімфомі (ДВКЛ), В-клітинному лімфомі маргінальної зони й лімфомі Беркитта. Шляхом клонування точок розриву хромосомальної транслокації t(1:14)(q21;q32) у клітинній лінії мієломи було виявлено два гени, які були названі геном рецептора суперсімейства імуноглобулінів, асоційованим із транслокацією (IRTA), 1 і IRTA2. IRTA2 ідентичний послідовностям, які позначають BXMAS1 (Nakayama et al., Biochim. Biophys. Res. Commun. 285:830-7, 2001) і FcRH5 (Davis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9772-7, 2001). IRTA1 і IRTA2 є членами сімейства родинних генів IRTA.

FcRH5 (або IRTA2) є поверхневим клітинним рецептором, гомологічним сімейству рецепторів Fc. Він звичайно експресує в зрілих В-клітинах і має різний розподіл у периферичних лімфоїдних органах у порівнянні з FcRH4 (IRTA1). IRTA1 експресує в В-клітинах маргінальної зони, у той час як IRTA2 також експресує в центроцитах і імунобластах зародкового центру. Експресія IRTA2 припиняється в клітинних лініях множинної мієломи й лімфоми Беркитта з аномаліями 1q21 (див. Miller et al., Blood 99:2662-2669, 2002). Висока частота залучення структурних перебудов 1q21 в В-клітинах злоякісних новоутворень вказує, що IRTA1 і IRTA2 відіграють критичну роль у патогенезі таких захворювань (див. опубліковану РСТ заяву No. WO 01/38490; опубліковану заяву на патент США No. 20080292632, зміст якої включено в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання) (див. також Polson, et al. Int Immunol. 2006 Sep;18(9):1363-73).

Беручи до уваги експресію FcRH5, кращим буде вироблення терапевтичних антитіл до антигену FcRH5, ніж створення мінімальної або відсутньої антигенності при введенні пацієнтам, особливо при хронічному лікуванні. Даний винахід задовольняє такий й інші потреби. Даний винахід представляє антитіла до FcRH5, які допоможуть перебороти обмеження терапевтичних композицій, що використовують у цей час, а також додаткові переваги, які виявляються



очевидними на основі представленого нижче докладного опису.

Використання кон'югатів антитіло-препарат (КАП), тобто імунокон'югатів, для локальної поставки цитотоксичних або цитостатичних агентів, тобто препаратів для загибелі або інгібування пухлинних клітин при лікуванні раку (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549; Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26:151-172; US 4975278), дозволяє робити цілеспрямовану поставку молекули препарату до пухлин, а також їхнє внутрішньоклітинне нагромадження, при цьому системне введення таких некон'югованих лікарських препаратів може призвести до неприпустимих рівнів токсичності для здорових клітин, а також пухлинних клітин, які повинні елімінуватися (Baldwin et al (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera et al (ed.s), pp. 475-506). Спроби для поліпшення терапевтичного індексу, тобто максимальної ефективності й мінімальної токсичності КАП, були спрямовані на вибірковість поліклональних (Rowland et al (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87) і моноклональних антитіл (MAT), а також властивості зв'язування й вивільнення препарату (Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549). Молекули препаратів, які використовують у кон'югатах препарату з антитілом, включають білки бактеріальних токсинів, такі як дифтерійний токсин, білки токсинів рослин, такі як рицин, невеликі молекули, такі як аурістатини, гелданамицин (Mandler et al (2000) *J. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), майтансіноїди (EP 1391213; Liu et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), калихіміцин (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342), дауномицин, доксорубіцин, метотрексат і віндесин (Rowland et al (1986) див. вище). Молекули препаратів можуть впливати на цитотоксичні й цитостатичні механізми, включаючи зв'язування тубуліну, зв'язування ДНК або інгібування топоізомерази. Деякі цитотоксичні препарати можуть бути неактивними або менш активними при кон'югації з більшими антитілами або лігандами білкових рецепторів.

Білки аурістатин, аурістатин Е (АЕ) і монометилаурістатин (ММАН), синтетичні аналоги доластатина (WO 02/088172), були кон'юговані у вигляді молекул препарату з: (i) химерними моноклональними антитілами сBR96 (специфічними до антигену Y Льюїса карциноми); (ii) сAC10, специфічному до CD30 гомобластозів (Klussman, et al (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773; Doronina et al (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784; Francisco et al (2003) *Blood* 102(4):1458-1465; US 2004/0018194; (iii) антитілами до CD20, такими як рітуксан (WO 04/032828) для лікування видів раку з експресією CD20 і імунних розладів; (iv) антитілами до ЕрhB2R 2H9 для лікування колоректального раку (Mao et al (2004) *Cancer Research* 64(3):781-788); (v) антитілом до Е-селектину (Bhaskar et al (2003) *Cancer Res.* 63:6387-6394); (vi) трастузумабом (ГЕРЦЕПТИН®, US 2005/0238649), і (vi) антитілами до CD30 (WO 03/043583). Варіанти аурістатина Е описані в патентах США No. 5767237 і 6124431. Монометиловий аурістатин Е, кон'югований з моноклональними антитілами, описаний в Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Том 45, номер анотації 623 (від 28 березня 2004 р.). Аналоги аурістатина ММАН і ММАН були кон'юговані із цілим рядом антитіл (US 2005/0238649).

Стандартні способи приєднання, тому що зв'язування за допомогою ковалентних зв'язків, молекули препарату з антитілом звичайно призводять до гетерогенної суміші молекул, у якій молекули препаратів приєднані до цілого ряду ділянок антитіла. Наприклад, цитотоксичні препарати звичайно кон'юговані з антитілами за допомогою численних залишків лізіна антитіла, що призводить до утворення гетерогенної суміші кон'югата антитіло-препарат. Залежно від умов реакції, гетерогенна суміш звичайно складається з антитіл з 0 до приблизно 8 або більше приєднаними молекулами. Крім того, у кожній підгрупі кон'югатів з тим або іншим цілочисловим співвідношенням молекул препаратів до антитіла існує потенційно гетерогенна суміш, у якій молекула препарату приєднана до різних ділянок антитіла. Аналітичні й препаративні способи можуть виявитися недостатніми для сепарації й характеристики молекул кон'югатів антитіло-препарат у гетерогенній суміші, яка утворена в результаті реакції кон'югації. Антитіла представлені великими, комплексними й структурно різними біомолекулами, що часто містять багато реакційних функціональних груп. Їхня реакційна здатність із лінкерними реагентами й проміжними сполуками препарат-лінкер залежать від факторів, таких як рН, концентрація, концентрація солі й ко-розчинники. Більше того, багатоетапний процес кон'югації може бути невідтворним через труднощі в контролі умов реакції й характеристики реагентів і проміжних речовин.

Тіоли (цистеїн) реакційноздатні при нейтральному значенні рН, на відміну від більшості амінів, які протоновані й менш нуклеофільні при рН близько 7. Оскільки незв'язані групи тіолів (меркаптани, сульфгідрил) відносно реакційноздатні, білки із цистеїновими залишками часто існують в окисленій формі у вигляді дисульфідно-зв'язаних олігомерів або мають внутрішні дисульфідні групи. Позаклітинні білки звичайно не мають вільних тіолів (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, стор. 55). Цистеїнові тіолові групи антитіла звичайно більше реакційноздатні, тобто більш нуклеофільні, відносно електрофільних реагентів кон'югації, ніж аміні або гідроксильні групи антитіла. Цистеїнові залишки були включені в білки шляхом процедур генної інженерії (рекомбінації) для утворення ковалентних зв'язків з лігандами або утворення нових внутрімолекулярних дисульфідних містків (Better et al (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; US 6248564). Проте, процедура рекомбінації у тіолових групах цистеїну шляхом мутації різних амінокислотних залишків білка в цистеїнові амінокислоти потенційно проблематична, особливо у випадку неспарених (незв'язаного Цис) залишків або залишків, які відносно доступні для реакції або окислювання. У концентрованих розчинах білка, наприклад, періплазмі *E. coli*, супернатанта культури або частково, або повністю очищеного білка, неспарені залишки Цис на поверхні білка можуть зв'язуватися й окислятися з утворенням міжмолекулярних дисульфідних зв'язків, і, отже, димерів або мультимерів. Утворення дисульфідного димеру приводить до неактивності нового Цис для кон'югації із препаратом, лігандом або іншою міткою. Крім того, якщо білок при окислюванні утворить внутрімолекулярний дисульфідний місток між новими включеними й існуючими залишками Цис, обидві тіолові групи Цис недоступні для активної ділянки й взаємодій. Крім того, білок може залишатися неактивним або неспецифічним при неправильному скручуванні або втраті третинної структури (Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311:1-9).

Антитіла з уведеним шляхом рекомбінації цистеїном були розроблені у вигляді фрагментів антитіла FAb (tioFab) і експресуються у вигляді моноклональних антитіл IgG повної довжини (TioMAT) (Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41-52; US 2007/0092940, зміст включений у вигляді посилання). TioFab і TioMAT були кон'юговані за допомогою лінкерів у положенні нових уведених тіолів цистеїну з використанням тіо-реакційних лінкерних реагентів і препарат-лінкерних реагентів для одержання кон'югатів антитіло-препарат (Tio КАП).

Всі процитовані тут посилання, включаючи заявки на патенти й публікації, включені у вигляді посилання у всій своїй повноті.

#### СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

Винахід описує антитіла до FcRH5 або їхні функціональні фрагменти, а також спосіб їх використання в лікуванні гематобластозів.

В одному аспекті винахід описує антитіло, що зв'язується, переважно специфічно, з кожним з описаних вище або нижче поліпептидів. У деяких випадках антитіло представлене моноклональним антитілом, фрагментом антитіла, включаючи фрагменти Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> і Fv, діатілом, антитілом з одним доменом, химерним антитілом, гуманізованим антитілом, однокланцюговим антитілом або антитілом, що конкурентним чином інгібує зв'язування поліпептидного антитіла до FcRH5 з відповідною антигенною детермінантою. Антитіла даного винаходу можуть бути в деяких випадках представлені у вигляді кон'югатів із препаратами-інгібіторами росту або цитотоксичним агентом, наприклад, токсином, включаючи, наприклад, аурістатин, майтансиноїд, похідне долостатину або каліхіміцину, антибіотик, радіоактивний ізотоп, нуклеолітичний фермент або т.п. Антитіла даного винаходу можуть у деяких випадках вироблятися в клітинах CHO або бактеріальних клітинах, і переважно індукувати загибель клітини, з якої вони зв'язуються. З метою визначення, антитіла даного винаходу можуть бути позначені, приєднані до твердого субстрату або т.п.

В одному аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що моновалентна афінність (тобто афінність антитіла як фрагмента Fab до FcRH5) або афінність у двовалентній формі антитіла до FcRH5 (тобто афінність антитіла як фрагмента IgG до FcRH5) практично така ж сама, нижче або вище, ніж моновалентна афінність або афінність у двовалентній формі, відповідно, мишачого антитіла (наприклад, афінність мишачого антитіла як фрагмента Fab або фрагмента IgG до FcRH5) або химерного антитіла (наприклад, афінність химерного антитіла як фрагмента Fab або фрагмента IgG до FcRH5), що складається або включає послідовність варіабельного домену легкого ланцюга й важкого ланцюга, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 19) й Фігурі 10 (SEQ ID NO:21).

В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється

тим, що афінність антитіла в його двовалентній формі до FcRH5 (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить 0,4 nM, 0,2 nM або 0,5 nM.

В одному аспекті винаходу описане антитіло, що зв'язується з FcRH5 і відрізняється тим, що таке антитіло складається, щонайменше, з одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести гіперваріабельних ділянок (HVR), які вибирають з наступних груп:

- (i) HVR-L1, що включає послідовність KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)
- (ii) HVR-L2, що включає послідовність SASYRYT (SEQ ID NO: 27)
- (iii) HVR-L3, що включає послідовність QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)
- (iv) HVR-H1, що включає послідовність GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 69)
- (v) HVR-H2, що включає послідовність ATISSGGSLTFYLDSDVR (SEQ ID NO: 70); і
- (vi) HVR-H3, що включає послідовність PIPDYALDY (SEQ ID NO: 71).

В іншому варіанті втілення винаходу HVR-H2 має послідовність SEQ ID NO: 36. В іншому варіанті втілення винаходу антитіло включає 1 консенсусну послідовність каркасної ділянки підгрупи к людини. У ще одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з консенсусної послідовності каркасної ділянки підгрупи III важкого ланцюга людини. В іншому варіанті втілення винаходу антитіло включає варіабельний домен легкого ланцюга, що має, щонайменше, 90% ідентичність амінокислотної послідовності в порівнянні з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 19. В одному варіанті втілення винаходу антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що має, щонайменше, 90% ідентичність амінокислотної послідовності в порівнянні з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 21. В іншому варіанті втілення винаходу антитіло включає варіабельний домен легкого ланцюга, що має, щонайменше, 90% ідентичність амінокислотної послідовності в порівнянні з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 19.

У ще одному варіанті втілення винаходу антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що має, щонайменше, 90% ідентичність амінокислотної послідовності в порівнянні з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 21. В одному варіанті втілення винаходу антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що складається з одного, двох, трьох або чотирьох амінокислотних послідовностей каркасних ділянок, які вибирають з SEQ ID NO: 31, 32, 33 і 34. В інших варіантах втілення винаходу антитіло включає варіабельний домен легкого ланцюга, що складає з одного, двох, трьох або чотирьох амінокислотних послідовностей каркасних ділянок, які вибирають з SEQ ID NO: 22, 23, 24 і 25. В іншому варіанті втілення винаходу антитіло включає варіабельний домен важкого ланцюга, що складається з одного, двох, трьох або чотирьох амінокислотних послідовностей каркасних ділянок, що мають, щонайменше, 90% ідентичність амінокислотної послідовності в порівнянні з амінокислотними послідовностями, вибраними з SEQ ID NO: 31, 32, 33 і 34. В інших варіантах втілення винаходу антитіло включає варіабельний домен легкого ланцюга, що складається з одного, двох, трьох або чотирьох амінокислотних послідовностей каркасних ділянок, що мають, щонайменше, 90% ідентичності амінокислотної послідовності в порівнянні з амінокислотними послідовностями, вибраними з SEQ ID NO: 22, 23, 24 і 25.

В одному аспекті винаходу описане антитіло, що зв'язується з FcRH5 і відрізняється тим, що зазначене антитіло складається, щонайменше, з одного варіанта HVR, при цьому послідовність такого варіанта HVR включає модифікацію, щонайменше, одного залишку послідовності, що зазначена як SEQ ID NO: 26, 27, 28, 35, 36 або 37. В одному варіанті втілення винаходу модифікація представлена заміщенням, вставкою або делецією.

В іншому варіанті втілення винаходу, щонайменше, ділянка послідовності каркасної ділянки представлена консенсусною послідовністю каркасної ділянки.

В іншому варіанті втілення винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що моновалентна афінність антитіла до людського FcRH5 практично така ж сама, що й моновалентна афінність мишачого антитіла, що включає послідовність варіабельного домену легкому ланцюгу й важкому ланцюгу, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 19) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 21).

В одному аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що моновалентна афінність антитіла до людського FcRH5, щонайменше, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 разів більше, ніж моновалентна афінність мишачого антитіла, що включає послідовність варіабельного домену легкому ланцюгу й важкому ланцюгу, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 19) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 21).

В одному аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що моновалентна афінність антитіла до людського FcRH5, щонайменше, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 або 60 разів менше, ніж моновалентна афінність мишачого антитіла, що включає послідовність варіабельного домену легкому ланцюгу й важкому ланцюгу, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і Фігурі 10

(SEQ ID NO: 20).

В іншому аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла в його двовалентній формі до людського FcRH5 практично така ж сама, що й афінність мишачого антитіла в його двовалентній формі, що включає послідовність варіабельного домену легкому ланцюгу й важкому ланцюгу, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 20).

В одному аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до людського FcRH5 у його двовалентній формі, щонайменше, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 разів більше, ніж афінність мишачого або химерного антитіла в його двовалентній формі, що включає послідовність варіабельного домену легкому ланцюгу й важкому ланцюгу, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 20).

В іншому аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до людського FcRH5 у його двовалентній формі, щонайменше, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 або 60 разів менше, ніж афінність мишачого або химерного антитіла в його двовалентній формі, що включає послідовність варіабельного домену легкому ланцюгу й важкому ланцюгу, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 20).

У ще одному аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність такого антитіла в його двовалентній формі до людського FcRH5 становить 0,4 нМ. В одному варіанті втілення винаходу афінність антитіла в його двовалентній формі до людського FcRH5 становить  $0,4 \pm 0,04$  нМ.

У ще одному аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність такого антитіла в його двовалентній формі до людського FcRH5 становить 0,2 нМ. В одному варіанті втілення винаходу афінність антитіла в його двовалентній формі до людського FcRH5 становить  $0,2 \pm 0,02$  нМ.

У ще одному аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність такого антитіла в його двовалентній формі до людського FcRH5 становить 0,5 нМ. В одному варіанті втілення винаходу афінність антитіла в його двовалентній формі до людського FcRH5 становить  $0,5 \pm 0,01$  нМ.

У всіх аспектах винаходу афінність зв'язування виражена у вигляді значення  $K_d$ . В одному аспекті винаходу афінність зв'язування вимірюється за допомогою аналізу Біасоре або радіоімуноаналізу.

У ще одному аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що гуманізоване антитіло при його кон'югації із цитотоксичним агентом інгібує ріст клітин пухлини.

В іншому аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що гуманізоване антитіло при його кон'югації із цитотоксичним агентом інгібує ріст клітин пухлини.

В одному варіанті втілення винаходу гуманізоване антитіло й химерне антитіло є моновалентними або бівалентними. В іншому варіанті втілення винаходу гуманізоване антитіло й химерне антитіло включають одну ділянку Fab, приєднану до ділянки Fc.

В іншому аспекті винахід описує антитіло, що складається з варіабельного домену важкого ланцюга, що включає послідовність HVR1-HC, HVR2-HC і/або HVR3-HC, зазначену на Фігурі 11 (SEQ ID NO: 35-37). В одному варіанті втілення винаходу варіабельний домен включає послідовність FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC і/або FR4-HC, зазначену на Фігурі 11 (SEQ ID NO: 31-34). В іншому варіанті втілення винаходу антитіло включає послідовність CH1 і/або Fc, зазначену на Фігурі 11 (SEQ ID NO: 38 і/або 39).

У ще одному аспекті винахід описує антитіло, що складається з варіабельного домену легкого ланцюга, що включає послідовність HVR1-LC, HVR2-LC і/або HVR3-LC, зазначену на Фігурі 11 (SEQ ID NO: 26-28). В одному варіанті втілення винаходу варіабельний домен включає послідовність FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC і/або FR4-LC, зазначену на Фігурі 11 (SEQ ID NO: 22-25). В іншому варіанті втілення винаходу антитіло включає послідовність CL1, зазначену на Фігурі 11 (SEQ ID NO: 29).

В одному аспекті винахід описує поліпептид, що складається з послідовності, що зазначена на Фігурі 10 (SEQ ID NO: 21). В іншому аспекті винахід описує поліпептид, що складається з послідовності, що зазначена на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 19).

В іншому аспекті винахід описує антитіло, отримане в процесі (а) культивування клітини, яка експресує антитіло, що складається з описаного тут варіабельного домену важкого ланцюга й описаного тут варіабельного домену легкого ланцюга; і (б) ізоляції антитіла із зазначеної клітини, що культивується.

В іншому аспекті винахід описує антитіло, що складається з описаного тут варіабельного

домену важкого ланцюга й описаного тут варіабельного домену легкого ланцюга. В одному варіанті втілення винаходу антитіло моновалентно й включає ділянку Fc.

В одному аспекті винахід описує полінуклеотид, що кодує описане тут антитіло. В одному варіанті втілення винахід описує вектор, що складається з полінуклеотида. В іншому варіанті втілення винахід описує клітину-хазяїна, що включає вектор.

[0001] В одному аспекті винахід включає антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном і складається з одного або декількох незв'язаних амінокислот цистеїн і послідовності, яка вибрана з SEQ ID NO: 251-298. Антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном може зв'язуватися з поліпептидом FcRH5. Антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном може бути отримане шляхом процесу, що включає заміну одного або декількох амінокислотних залишків вихідного антитіла до FcRH5 цистеїном.

В одному аспекті винахід включає антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном, що включає одну або кілька незв'язаних амінокислот цистеїн, при цьому антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном зв'язується з поліпептидом FcRH5 й таке антитіло одержують за допомогою процесу, що складається із заміни одного або декількох амінокислотних залишків вихідного антитіла до FcRH5 цистеїном, при цьому вихідне антитіло включає, щонайменше, одну послідовність HVR, яка вибрана з:

- (i) HVR-L1, що включає послідовність KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)
- (ii) HVR-L2, що включає послідовність SASYRYT (SEQ ID NO: 27)
- (iii) HVR-L3, що включає послідовність QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)
- (iv) HVR-H1, що включає послідовність GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 69)
- (v) HVR-H2, що включає послідовність ATISSGGS�TFYLD SVR (SEQ ID NO: 70); і
- (vi) HVR-H3, що включає послідовність PIPDYYALDY (SEQ ID NO: 71).

Антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном може бути представлено моноклональним антитілом, фрагментом антитіла, химерним антитілом, гуманізованим антитілом, однокланцевим антитілом або антитілом, що конкурентним чином інгібує зв'язування поліпептидного антитіла до FcRH5 з відповідною антигенною детермінантою. Антитіла даного винаходу можуть бути в деяких випадках представлені кон'югатами з агентом, що інгібує зростання, або цитотоксичним агентом, таким як токсин, включаючи, наприклад, аурістатин або майтансиноїд. Антитіла даного винаходу можуть у деяких випадках вироблятися в клітинах CHO або бактеріальних клітинах, і переважно інгібують зростання або проліферацію або індують загибель клітини, з якої вони зв'язуються. З метою діагностики, антитіла даного винаходу можуть бути позначені, приєднані до твердого субстрату або т.п.

В одному аспекті винахід описує способи для одержання антитіл по винаходу. Наприклад, винахід описує спосіб одержання антитіла до FcRH5 (який, як це визначено в даній заявці, включає антитіло повної довжини або його фрагмент), і такий спосіб включає експресію в підходящій клітині-хазяїні рекомбінантного вектора по винаходу, що кодує зазначене антитіло (або його фрагмент), і відновлення зазначеного антитіла.

В іншому аспекті винахід описує біспецифічне антитіло, здатне зв'язуватися з одною клітиною, що експресує FcRH5, і іншою клітиною, що експресує антиген-мішень на клітинній поверхні. В одному варіанті втілення винаходу друга клітина представлена Т-клітиною. В одному варіанті втілення винаходу антиген-мішень на клітинній поверхні представлений CD3. У певних варіантах втілення винаходу біспецифічне антитіло представлене антитілом з опуклістю. В одному варіанті втілення винаходу біспецифічне антитіло аглікозильовано. В одному варіанті втілення винаходу біспецифічне антитіло виробляється в клітині-хазяїні *Escherichia coli*. В одному варіанті втілення винаходу біспецифічне антитіло не містить одну або більше ефекторних функцій Fc. В одному варіанті втілення винаходу біспецифічне антитіло не володіє A3KQ.

В одному аспекті винахід представлений фармацевтичною композицією, що включає антитіло по винаходу або кон'югат антитіло-препарат, а також фармацевтично прийнятний розріджувач, носій або допоміжну речовину.

В одному аспекті винахід описує готовий виріб, що складається з контейнера, що включає композицію, при цьому композиція складається з одного або декількох антитіл до FcRH5.

В одному аспекті винахід описує набір, що складається з одного контейнера з композицією, що включає одне або кілька антитіл до FcRH5, і іншого контейнера, що включає буфер.

В одному аспекті винахід описує використання антитіла до FcRH5 у вигляді лікарської форми для терапевтичного й/або профілактичного використання для лікування захворювання, такого як рак, пухлина й/або порушення проліферації клітин.

В одному аспекті винахід описує використання готового продукту у вигляді лікарської форми для терапевтичного й/або профілактичного використання для лікування захворювання, такого

як рак, пухлина й/або порушення проліферації клітин.

В одному аспекті винахід описує використання набору у вигляді лікарської форми для терапевтичного й/або профілактичного використання для лікування захворювання, такого як рак, пухлина й/або порушення проліферації клітин.

5 В одному аспекті винахід описує спосіб інгібування росту клітини, що експресує FcRH5, і зазначений спосіб містить у собі контакт згаданої клітини з антитілом по винаходу, що призводить до інгібування росту що зазначена клітини. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

10 В одному аспекті винахід описує спосіб терапевтичного лікування ссавця, що має ракову пухлину, що складається із клітин, що експресує FcRH5, і зазначений спосіб складається із введення згаданому ссавцеві терапевтично ефективної кількості антитіла по винаходу, що дозволяє ефективно вилікувати зазначеного ссавця. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

15 В одному аспекті винахід описує спосіб лікування або запобігання порушення проліферації клітин, що викликається гіперекспресією FcRH5; зазначений спосіб складається із введення пацієнтові, що потребує у такому лікуванні, ефективної кількості антитіла по винаходу, що дозволяє ефективно вилікувати або запобігти згаданому порушенню клітинної проліферації. В одному варіанті втілення винаходу згадане порушення проліферації представлене раком. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

20 В одному аспекті винахід описує спосіб інгібування росту клітини, при цьому ріст такої клітини, щонайменше, залежить від ефекту, що потенціює зростання FcRH5; зазначений спосіб складається з контакту згаданої клітини з ефективною кількістю антитіла по винаходу, що призводить до інгібування росту згаданої клітини. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

25 В одному аспекті винахід описує спосіб терапевтичного лікування пухлини у ссавця, при цьому зростання такої пухлини, щонайменше, залежить від ефекту, що потенціює зростання FcRH5; зазначений спосіб складається з контакту згаданої клітини з ефективною кількістю антитіла по винаходу, що призводить до ефективного лікування згаданої пухлини. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

30 В одному аспекті винахід описує спосіб лікування рака, що складається із введення пацієнтові фармацевтичної композиції, що включає описаний тут кон'югат, прийнятний розріджувач, носій або допоміжну речовину.

35 В одному аспекті винахід описує спосіб інгібування проліферації В-клітин, що складається із впливу на клітину імункон'югатом, що включає антитіло по винаходу, в умовах, що забезпечують зв'язування імункон'югата з FcRH5.

40 Спосіб даного винаходу може додатково включати інші етапи лікування. Наприклад, в одному варіанті втілення винаходу спосіб додатково включає етап, у ході якого клітина-мішень і/або тканина-мішень (наприклад, ракова клітина) піддається впливу лікуванню опроміненням або препаратом хіміотерапії.

45 В одному аспекті винахід описує способи, що складаються із введення ефективної кількості антитіла до FcRH5 у комбінації з ефективною кількістю іншого терапевтичного агента (наприклад, антиангіогеного препарату, іншого антитіла, хіміотерапевтичного препарату, цитотоксичного агента, імуносупресанта, проліків, цитокіна, цитотоксичної радіотерапії, кортикостероїда, протипухлинного препарату, антиканцероматозної вакцини, анальгетика або препарату-інгібітора росту). Наприклад, антитіла до FcRH5 або імункон'югати використовуються в комбінаціях із протираковим препаратом або антиангіогеним препаратом для лікування різних станів новоутворень і станів при відсутності новоутворень. В окремих прикладах антитіла до FcRH5 використовуються в комбінації із препаратами Велкаде® (бортезоміб), Ревлімід® (леналідомід), тамоксифен, летрозол, екземестан, анастрозол, іринотекан, цетуксимаб, фулвестрант, вінорелбін, бевацизумаб, вінкрістин, цисплатин, гемцитабін, метотрексат, вінбластин, карбоплатин, паклітаксел, доцетаксел, пеметрексед, 5-фторурацил, доксорубіцин, бортезоміб, леналідомід, дексаметазон, мелфалан, преднізон, вінкрістин, талідомід.

50 Залежно від специфічних показань щодо виду раку, що піддається лікуванню, комбінована терапія по винаходу може бути скомбінована з додатковими терапевтичними агентами, такими

як препарати хіміотерапії, або додатковими видами терапії, такими як променева терапія або хірургія. У комбінованій терапії по винаходу може використовуватися багато відомих хіміотерапевтичних препаратів. Переважно будуть використовуватися ті хіміотерапевтичні препарати, які є стандартними для лікування за специфічними показниками. Доза або частота прийому кожного терапевтичного агента, що використовується в комбінованій терапії, переважно такі ж самі або менші, ніж доза або частота прийому відповідного агента, що використовується при монотерапії.

В іншому аспекті винахід описує будь-які представлені тут антитіла до FcRH5, що відрізняються тим, що антитіло до FcRH5 включає обумовлену мітку.

В одному аспекті винахід описує спосіб визначення присутності FcRH5 у зразку, що підозрюється на вміст FcRH5; зазначений спосіб містить у собі вплив згаданого зразка антитілом по винаходу з наступним визначенням зв'язування згаданого антитіла з FcRH5 у зразку, при цьому таке зв'язування антитіла з FcRH5 у зразку є доказом присутності білка в згаданому зразку.

В одному аспекті винахід описує спосіб діагностики порушення проліферації клітин, що викликається підвищенням кількості клітин, таких як В-клітин, що експресують FcRH5; спосіб полягає в контакті досліджуваних клітин у біологічному зразку з кожним із зазначених вище антитіл, визначенні рівня антитіла, пов'язаного з досліджуваними клітинами в зразку, шляхом визначення зв'язування антитіла з FcRH5, і порівнянні рівня пов'язаного із клітинами антитіла в контрольному зразку, при цьому рівень зв'язаного антитіла нормалізується щодо кількості FcRH5-клітин, що експресують у досліджуваних і контрольних зразках, і, крім того, більш високий рівень зв'язаного в досліджуваному зразку антитіла в порівнянні з контрольним зразком указує на присутність порушення клітинної проліферації, викликаного клітинами, що експресують FcRH5.

В одному аспекті винахід описує спосіб виявлення розчинного FcRH5 у крові або сироватці, і такий спосіб полягає у контакті досліджуваного зразка крові або сироватки ссавця, підозрюваного на наявність порушення В-клітинної проліферації, з антитілом до FcRH5 з наступним визначенням підвищення розчинного FcRH5 у досліджуваному зразку в порівнянні з контрольним зразком крові або сироватки здорового ссавця.

В одному аспекті винахід описує спосіб зв'язування антитіла по винаходу із клітиною, що експресує FcRH5, і такий спосіб полягає в контакті згаданої клітини з антитілом по винаходу. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фігура 1 відображає легкий ланцюг химерного антитіла 7D11 до FcRH5 людини (ДНК).

Фігура 2 відображає легкий ланцюг химерного антитіла 7D11 до FcRH5 людини (амінокислоти).

Фігура 3 відображає важкий ланцюг химерного антитіла 7D11 до FcRH5 людини (ДНК).

Фігура 4 відображає важкий ланцюг химерного антитіла 7D11 до FcRH5 людини (амінокислоти).

Фігура 5 відображає легкий ланцюг химерного антитіла до FcRH5 (mAb10A8) людини (ДНК).

Фігура 6 відображає легкий ланцюг химерного антитіла до FcRH5 (mAb10A8) людини (амінокислоти).

Фігура 7 відображає важкий ланцюг химерного антитіла до FcRH5 (mAb10A8) людини (ДНК).

Фігура 8 відображає важкий ланцюг химерного антитіла до FcRH5 (mAb10A8) людини (амінокислоти).

Фігура 9 відображає вирівнювання варіабельних легких ланцюгів мишачого антитіла 10A8 і гуманізованого антитіла 10A8v1 відносно консенсусної послідовності домену VL капа 1 (huKI) (SEQ ID NO: 64).

Фігура 10 відображає вирівнювання варіабельних легких ланцюгів мишачого антитіла 10A8 і гуманізованого антитіла 10A8v1 щодо підгрупи консенсусної послідовності людського домену VH (huIII) (SEQ ID NO: 65).

Фігура 11 представляє амінокислотні послідовності антитіла по винаходу (Hu10A8 v1).

Фігура 12 представляє амінокислотні послідовності поліпептидних ланцюгів Tio-MAT по винаходу із включенням у ході процедури рекомбінації цистеїном.

Фігура 13 представляє амінокислотні послідовності поліпептидних ланцюгів Tio-MAT по винаходу із включенням у ході процедури рекомбінації цистеїном.

Фігура 14 представляє перехресну реакційноздатність антитіл до FcRH5.

Фігура 15 представляє перехресну реакційноздатність антитіл до FcRH5.

Фігура 16 представляє перехресну реакційноздатність антитіл до FcRH5.

Фігура 17 представляє FACS-аналіз антитіл до FcRH5.

Фігура 18 представляє титрацію антитіла до FcRH5.

Фігура 19 представляє титрацію антитіла до FcRH5.

5 Фігура 20 представляє FACS-аналіз Tio-MAT по винаходу.

Фігура 21 представляє FACS-аналіз Tio-MAT по винаходу.

Фігура 22 представляє FACS-аналіз Tio-MAT по винаходу.

Фігура 23 представляє FACS-аналіз Tio-MAT по винаходу.

Фігура 24 представляє FACS-аналіз кон'югованого антитіла по винаходу.

10 Фігура 25 представляє FACS-аналіз кон'югованого антитіла по винаходу.

Фігура 26 представляє вплив антитіл по винаходу на середній об'єм пухлини.

Фігура 27 представляє вплив антитіл по винаходу на середню масу тіла.

Фігура 28 представляє вплив антитіл по винаходу на середній об'єм пухлини.

Фігура 29 представляє вплив антитіл по винаходу на середню масу тіла.

15 Фігура 30a представляє вплив кон'югатів антитіл по винаходу на середній об'єм пухлини.

Фігура 30b представляє вплив кон'югатів антитіл по винаходу на середню масу тіла.

Фігура 31 представляє аналіз відповіді на одиничну дозу сполуки.

Фігура 32 представляє аналіз відповіді на одиничну дозу сполуки.

20 Фігура 33 представляє нуклеотидну послідовність (SEQ ID NO: 58) PRO820 кДНК, при цьому SEQ ID NO: 58 є клоном, позначеним у тексті даної заявки як «DNA56041-1416» (який також вказаний у цьому тексті як «FcRH5»). Нуклеотидна послідовність, що кодує FcRH5 разом зі старт- і стоп-кодонами, зазначена жирним і підкресленим шрифтом. (Див. Goddard et al. патент США No. 7491529).

25 Фігура 34 представляє амінокислотну послідовність (SEQ ID NO: 59), яку отримано з послідовності, що кодує, SEQ ID NO: 59, що зазначена на Фігурі 33. (Див. Goddard et al. патент США No. 7491529).

30 Фігура 35A-B представляє нуклеотидну послідовність (SEQ ID NO: 602) PRO52387 кДНК, при цьому SEQ ID NO: 60 є клоном, позначеним у тексті даної заявки як «DNA257845» (який також вказаний у цьому тексті як «FcRH5»). Нуклеотидна послідовність, що кодує FcRH5 разом зі старт- і стоп-кодонами, зазначена жирним і підкресленим шрифтом (див. Chang et al. Оpubлікована заявка на патент США No. 20060251662).

Фігура 36 представляє амінокислотну послідовність (SEQ ID NO: 61), що отримана з послідовності, що кодує, SEQ ID NO: 61, що зазначена на Фігурі 36A-B (див. Chang et al. Оpubлікована заявка на патент США No. 20060251662).

35 Фігура 37 представляє нуклеотидну послідовність (SEQ ID NO: 62) PRO314992 кДНК, при цьому SEQ ID NO: 62 є клоном, позначеним у тексті даної заявки як «DNA676969» (який також вказаний у цьому тексті як «FcRH5»).

Фігура 38 представляє амінокислотну послідовність (SEQ ID NO: 63), отриману з послідовності, що кодує, SEQ ID NO: 63, що зазначена на Фігурі 37.

40 Фігура 39 представляє вплив комбінованого введення імунокон'югата антитіла й, щонайменше, одного хіміотерапевтичного препарату на середній об'єм пухлини у мишей.

Фігура 40 представляє процентну зміну маси тіла для тварин у кожній групі прийому доз.

Фігура 41 представляє вплив комбінованого введення імунокон'югата антитіла й, щонайменше, одного хіміотерапевтичного препарату на середній об'єм пухлини в мишей.

Фігура 42 представляє процентну зміну маси тіла для тварин у кожній групі прийому доз.

45 Фігура 43 представляє вплив комбінованого введення імунокон'югата антитіла й, щонайменше, одного хіміотерапевтичного препарату на середній об'єм пухлини в мишей.

Фігура 44 представляє процентну зміну маси тіла для тварин у кожній групі прийому доз.

Фігура 45 представляє вплив кон'югатів антитіл по винаходу на середній об'єм пухлини.

Фігура 46 представляє вплив кон'югатів антитіл по винаходу на середню масу тіла.

50 Фігура 47 представляє вплив кон'югатів антитіл по винаходу на середній об'єм пухлини.

Фігура 48 представляє вплив кон'югатів антитіл по винаходу на середню масу тіла.

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС КРАЩИХ ВАРІАНТІВ ВТІЛЕННЯ ВИНАХОДУ

55 Винахід описує способи, композиції, набори й готові вироби для ідентифікації композицій для лікування гематобластозів у ссавців, а також способи використання таких композицій для даних цілей.

У даній заявці на винахід надається опис способів, композицій, наборів і готових виробів.

#### I. Загальні способи

60 Практичне застосування даного винаходу буде включати, якщо інше не зазначено, стандартні способи молекулярної біології (включаючи процедури рекомбінації), мікробіології, цитології, біохімії й імунології, відомі фахівцям в даній області. Подібні способи у всій своїй



повноті описані в літературі, наприклад, в "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

## II. Визначення

Для інтерпретації даного винаходу будуть застосовуватися представлені нижче визначення й, де це можливо, терміни, які використовували в однині, будуть приводитися в множині й навпаки. У випадку якщо будь-яке визначення йде врозріз будь-якому включеному в дану заявку документу у вигляді посилання, вирішальним буде визначення яке тут представлено.

У контексті даного винаходу термін «поверхневий маркер В-клітини» або «поверхневий антиген В-клітини» позначає антиген, що експресується на поверхні В-клітини, що може служити мішенню для антагоніста, що з ним зв'язується, і може бути представлений (не обмежуючись) антитілами до поверхневого антигену В-клітин або розчинній формі поверхневого антигену В-клітини, що приводить до антагонізму зв'язування ліганду з антигеном В-клітини, що зустрічається в природі. Поверхневі маркери В-клітин включають лейкоцитарні поверхневі маркери CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 і CD86 (опис див. в The Leukocyte Antigen Facts Book, 2<sup>nd</sup> Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Інші поверхневі маркери В-клітин включають RP105, FcRH2, B-cell CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btlg, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA і 239287. Окремий поверхневий маркер В-клітин, що цікавить, переважно експресується на В-клітинах у порівнянні з іншими тканинами ссавців, що не містять В-клітин, і такий маркер може експресуватися на попередниках В-клітин й зрілих В-клітинах.

У контексті даного винаходу термін «FcRH5» відноситься до будь-якого нативного FcRH5, що отриманий в будь-якого хребетного, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, людина, яванський макак) і гризуни (наприклад, миші й пацюки), якщо не зазначене інше. У контексті даного винаходу людський FcRH5 також вказується як «TAHO18» або «PRO85143» (SEQ ID NO: 2) і кодується нуклеотидною послідовністю (SEQ ID NO: 1), також вказується як «DNA340394». У контексті даного винаходу FcRH5 яванського макака також вказується як «супо FcRH5». Термін «FcRH5» охоплює не підданий процесінгу FcRH5 «повної довжини», а також будь-яку форму FcRH5, одержувану в результаті процесінгу в клітині. Термін також включає варіанти FcRH5, що зустрічаються в природі, наприклад, сплайс-варіанти, алельні варіанти й ізоформи. Описані тут поліпептиди FcRH5 можуть бути ізольовані із цілого ряду джерел, таких як різні типи тканин людини або інших джерел, або отримані шляхом рекомбінації або синтезу. Термін «поліпептид FcRH5 з нативною послідовністю» включає поліпептид, що має таку ж амінокислотну послідовність, що й відповідний поліпептид FcRH5, що зустрічається в природі. Такі поліпептиди FcRH5 з нативною послідовністю можуть бути ізольовані із природних джерел або отримані шляхом рекомбінації або синтезу. Термін «поліпептид FcRH5 з нативною послідовністю» включає, зокрема, вкорочені або секретуючі форми специфічного поліпептиду FcRH5, що зустрічаються в природі (наприклад, послідовність позаклітинного домену), варіантні форми, що зустрічаються в природі (наприклад, сплайс-форми) і алельні варіанти поліпептиду, що зустрічаються в природі. У певних варіантах втілення винаходу описані тут поліпептиди FcRH5 з нативною послідовністю представлені зрілими поліпептидами або поліпептидами з нативною послідовністю повної довжини, які включають амінокислотні послідовності повної довжини, представлені на супровідних фігурах. Старт- і стоп-кодони (якщо зазначені) приводяться на фігурах жирним підкресленим шрифтом. Залишки нуклеїнових кислот, зазначені на супровідних фігурах як «N», являють собою залишок будь-якої нуклеїнової кислоти. Однак на супровідних фігурах описані тут поліпептиди FcRH5 починаються із залишків метіоніну, зазначених на фігурах у положенні 1, при цьому приблизно й можливо, що інші залишки метіоніну, розташовані у верхнім і нижнім положеннях від положення 1 на фігурах, можуть використовуватися в якості стартового амінокислотного залишку для поліпептидів FcRH5.

У контексті даного винаходу « $\mu$ 10A8» або «MA10A8» або «антитіло до FcRH5 (10A8) миші» або «мишаче антитіло до FcRH5 (10A8)» специфічним чином відноситься до мишачого моноклонального антитіла до FcRH5, при цьому таке мишаче моноклональне антитіло до FcRH5 складається з варіабельного домену легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 18 (Фігура 9) і варіабельного домену важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 20 (Фігура 10).

Мишаче моноклональне антитіло до FcRH5 може бути придбане у комерційних джерел.

У контексті даного винаходу «ch10A8» або «chMAFcRH5 (10A8)» або «chFcRH5 (10A8)» або «химерне антитіло MAFcRH5 (10A8)» специфічним чином відноситься до химерного антитіла до людського FcRH5, при цьому таке химерне антитіло до людського FcRH5 складається з легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 15 (Фігура 6). Легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 15 надалі включає варіабельний домен, представлений на Фігурі 9, а також константний домен легкого ланцюга IgG1 людини. Химерне антитіло до людського FcRH5 (10A8) додатково містить важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 17 (Фігура 8). Важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 17 надалі включає варіабельний домен, представлений на Фігурі 10, а також константний домен важкого ланцюга IgG1 людини.

У контексті даного винаходу «ch7D11» або «chMAFcRH5 (7D11)» або «chFcRH5 (7D11)» або «химерне антитіло MAFcRH5 (7D11)» специфічним чином відноситься до химерного антитіла до людського FcRH5, при цьому таке химерне антитіло до людського FcRH5 складається з легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO: 11 (Фігура 2), що включає константний домен легкого ланцюга людського IgG1. Химерне антитіло до людського FcRH5 (7D11) додатково містить важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO: 13 (Фігура 4), що включає константний домен важкого ланцюга людського IgG1.

У контексті даного винаходу «антитіло до cynoFcRH5» або «антитіло до cyno FcRH5» відноситься до антитіл, що зв'язуються з FcRH5 яванського макака.

У контексті даного винаходу «10A 8-щеплений» або «10A 8-щеплене «гуманізоване» антитіло» або «щеплений hu10A8» специфічним чином відноситься до щепленого фрагмента, яке одержане шляхом щеплення гіперваріабельних ділянок з мишачого антитіла 10A8 до FcRH5 (mu10A8) до акцептора – консенсусної послідовності VL капа I (huKI) людини й консенсусної послідовності VH (huIII) підгрупи III людини (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)) (див. Приклад 1 і Фігури 9 (SEQ ID NO: 19) і 10 (SEQ ID NO: 21)). У контексті даного винаходу «hu10A8» або «hu10A8 v1» специфічним чином відноситься до гуманізованого антитіла 10A8.

У контексті даного винаходу термін «модифікація» амінокислотного залишку/положення відноситься до зміни первинної послідовності амінокислот у порівнянні з вихідною послідовністю амінокислот, при цьому така зміна виникає в результаті зміни послідовності, що утягує зазначені амінокислотні залишки/положення. Наприклад, типові модифікації включають заміну залишку (або в зазначеному положенні) іншою амінокислотою (наприклад, заміна консервативної або неконсервативної амінокислоти), вставку однієї або декількох (звичайно менш 5 або 3) амінокислот, що прилягають до зазначеного залишку/положення, і делецію зазначеного залишку/положення. Термін «заміна амінокислоти» або його варіанти відноситься до заміни існуючого залишку амінокислоти в попередньо певній (вихідній) амінокислотній послідовності іншим амінокислотним залишком. Звичайно й більш переважно, щоб така модифікація привиди до зміни щонайменше в показнику фізикобіохімічної активності варіантного поліпептиду в порівнянні з поліпептидом, що включає вихідну амінокислотну послідовність (тобто послідовність «дикого типу»). Наприклад, у випадку антитіла, фізикобіохімічна активність, що піддається зміні, може бути представлена афінністю зв'язування, здатністю зв'язування й/або ефектом зв'язування на молекулу-мішень.

Термін «антитіло» використовується в самому широкому своєму вмісті й специфічним чином охоплює, наприклад, одиночні моноклональні антитіла до FcRH5 (включаючи агоністичні, антагоністичні, нейтралізуючі антитіла, інтактні моноклональні антитіла або антитіла повної довжини), композиції з антитілом до FcRH5, що володіють поліепітопною специфічністю, поліклональні антитіла, мультівалентні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла доти, поки вони мають необхідну біологічну активність), утворені, по меншій мері із двох інтактних антитіл, одностанцюгові антитіла до FcRH5, а також фрагменти антитіла до FcRH5 (див. нижче), включаючи фрагменти Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> і Fv, діатела, антитіла з одним доменом (sdAT) доти, поки вони мають необхідну біологічну або імунологічну активність. У даному тексті термін «імуноглобулін» (Ig) використовується взаємозамінним чином з антитілом. Антитіло може бути представлено людським, гуманізованим антитілом і/або антитілом з дозрілою афінністю.

Термін «антитіло до FcRH5» або «антитіло, що зв'язується з FcRH5» відноситься до антитіла, яке здатне зв'язуватися з FcRH5 з достатньою афінністю, таким чином, зазначене антитіло може використовуватися в якості діагностичного й/або терапевтичного агента при зв'язуванні з FcRH5. Найкраще, щоб ступінь зв'язування антитіла до FcRH5 з неспорідненим і не стосовним до FcRH5 білком становила менш 10% від показника зв'язування антитіла з FcRH5, як це обмірювано, наприклад, за допомогою радіоімуноаналізу (PIA). У певних

варіантах втілення винаходу антитіло, що зв'язується з FcRH5, має константу дисоціації ( $K_d$ ), рівну  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ або  $\leq 0,1$  нМ. У певних варіантах втілення винаходу антитіло до FcRH5 зв'язується з антигенною детермінантою FcRH5, що є присутньою в FcRH5, отриману від різних видів.

«Ізольоване антитіло» представлено антитілом, що було ідентифіковано й виділене й/або відновлене з компонента в природному середовищі. Забруднюючі (домішкові) компоненти в природному середовищі являють собою матеріали, які можуть перешкодити терапевтичному використанню антитіла, і такі матеріали можуть включати ферменти, гормони й інші білкові й небілкові розчинені речовини. У кращих варіантах втілення винаходу антитіло буде очищатися (1) до значення більше 95% по вазі антитіла, як це визначено по способі Фоліна-Чикальтеу, і найбільш переважно більш ніж 99% по вазі; (2) до ступеня, достатнього для одержання щонайменше 15 залишків N-кінцевої або внутрішньої амінокислотної послідовності шляхом використання секвенатору з обертовою склянкою; або (3) до досягнення однорідності, обумовленої способом електрофореза в поліакриламідному гелі в умовах, що відновлюють і, що не відновлюють, з використанням Кумаси синього або сребрянки. Ізольоване антитіло включає антитіло *in situ* у рекомбінантних клітинах, при цьому, щонайменше, один компонент природного середовища антитіла буде відсутній. Як правило, ізольоване антитіло будуть одержувати, щонайменше, з одним етапом очищення.

Основна одиниця 4-ланцюгового антитіла представлена гетеротетрамерним глікопротеїном, що складається із двох ідентичних легких (L) ланцюгів і двох ідентичних важких (H) ланцюгів (антитіло до IgM складається з 5 основних гетеротетрамерних одиниць разом з додатковим поліпептидом, що має назву J-ланцюга, і, отже, включає 10 ділянок зв'язування антигену, у той час як секретуючі антитіла до IgA можуть полімеризуватися з утворенням полівалентних комплексів, що включають 2-5 основних 4-ланцюгових одиниць разом з J-ланцюгом). У випадку IgG, 4-ланцюгова одиниця звичайно має масу 150 000 дальтон. Кожний L-ланцюг приєднується до H-ланцюга одним ковалентним дисульфідним зв'язком, у той час як два H-ланцюги приєднуються один до одного одним або декількома дисульфідними зв'язками залежно від ізотипа H-ланцюга. Кожен H- і L-ланцюг також має дисульфідні містки між ланцюгами, розташовані на однаковій відстані. Кожний H-ланцюг на своєму N-кінці має варіабельний домен ( $V_H$ ), за яким йдуть три константних доменів ( $C_H$ ) для кожної  $\alpha$  і  $\gamma$  ланцюгів, і чотири домени  $C_H$  для ізотипів  $\mu$  і  $\epsilon$ . Кожний L-ланцюг на своєму N-кінці має варіабельний домен ( $V_L$ ), за яким треба константний домен ( $C_L$ ) на іншому кінці.  $V_L$  розташований відносно  $V_H$  і  $C_L$  розташований щодо першого константного домену важкого ланцюга ( $C_H1$ ). Окремі амінокислотні залишки, як вважається, утворюють границю зіткнення між варіабельними доменами легкого й важкого ланцюга. Комплементарне спарювання  $V_H$  і  $V_L$  утворює одну антигензв'язуючу ділянку. Структура й властивості різних класів антитіл представлені, наприклад, в Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, стор. 71 і Розділі 6.

L-ланцюг, отриманий у будь-кого з видів хребетних, може відноситися до одного із двох чітко, видів, що різняться, що мають назву капа й лямбда, ґрунтуючись на амінокислотних послідовностях їх константних доменів. Залежно від амінокислотної послідовності константного домену важких ланцюгів ( $C_H$ ), імуноглобуліни можуть відноситися до різних класів або ізотипам. Існує п'ять класів імуноглобулінів: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, що мають важкі ланцюги, що позначають як  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  і  $\mu$ , відповідно. Класи  $\gamma$  і  $\alpha$  надалі підрозділяються на підкласи на основі щодо невеликих розходжень у послідовності  $C_H$  і функціях, наприклад, у людини виробляються наступні підкласи: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2.

Термін «варіабельна ділянка» або «варіабельний домен» антитіла відноситься до домену на амінному кінці важкого або легкого ланцюга антитіла. Варіабельний домен важкого ланцюга може позначатися як « $V_H$ ». Варіабельний домен легкого ланцюга може позначатися як « $V_L$ ». Ці домени є звичайно найбільш варіабельними ділянками антитіла й містять антигензв'язуючі ділянки.

Термін «варіабельний» відноситься до того факту, що певні сегменти варіабельних доменів істотно різняться у своїй послідовності в антитілах. Домен V опосередковує зв'язування антигену й визначає специфічність окремого антитіла до свого окремого антигену. Однак, варіабельність уздовж амінокислотної послідовності варіабельних доменів з 110 залишків розподілена нерівномірно. Навпроти, ділянки V включають відносно інваріантні фрагменти, які мають назву каркасні ділянки (КД), з 15-30 амінокислот, розділених більше короткими ділянками із сильною варіабельністю, які називаються «гіперваріабельними ділянками» і мають довжину 9-12 амінокислот. Варіабельні домени нативних важких і легких ланцюгів складаються із чотирьох КД, що здобувають здебільшого  $\beta$ -конфігурацію, і приєднані до трьох

гіперваріабельним ділянкам, які утворюють петлю, що з'єднує й у деяких випадках утворюючи частину  $\beta$ -структури. Гіперваріабельні ділянки в кожному ланцюзі втримуються в безпосередній близькості КД й разом з гіперваріабельними ділянками іншого ланцюга сприяють утворенню антигензв'язуючої ділянки антитілу (див. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Константні домени не беруть участь безпосереднім чином у зв'язування антитіла з антигеном, але мають різні ефекторні функції, такі як участь антитіла у виникненні антитілозалежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ).

«Інтактне» антитіло являє собою антитіло, що складається з антигензв'язуючої ділянки й  $C_L$ , а також, щонайменше, константних доменів важкого ланцюга  $C_H1$ ,  $C_H2$  і  $C_H3$ . Константні домени можуть бути представлені константними доменами з нативною послідовністю (наприклад, константні домени з нативною послідовністю людини) або варіантом нативної амінокислотної послідовності. Переважно, інтактне антитіло володіє однією або декількома ефекторними функціями.

У контексті даного винаходу термін «незв'язане антитіло» позначає антитіло, що не кон'юговано із цитотоксичноюмолекулою або радіоміткою.

«Фрагменти антитіла» включають ділянку інтактного антитіла, переважно антигензв'язуючий або варіабельну ділянку інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіла включають фрагменти Fab, Fab',  $F(ab')_2$  і Fv, діатіла, лінійні антитіла (див. патент США No. 5641870, Приклад 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]), молекули одноланцюгових антитіл і мультиспецифічні антитіла, утворені із фрагментів антитіл. В одному варіанті втілення винаходу фрагмент антитіла складається з антигензв'язуючої ділянки інтактного антитіла зі збереженою здатністю зв'язувати антиген.

Розщеплення антитіл папаїном призводить до утворення двох ідентичних антигензв'язуючих фрагментів, що мають назву «Fab» фрагменти, і залишкового «Fc» фрагмента, позначення якого відображає легку здатність до кристалізації. Фрагмент Fab складається з повного L-ланцюга разом з доменом варіабельного ділянки H-ланцюга ( $V_H$ ) і першим константним доменом важкого ланцюга ( $C_H1$ ). Кожний Fab фрагмент моновалентен щодо зв'язування антигену, тобто має одну антигензв'язуючу ділянку. Розщеплення антитіла пепсином призводить до утворення одного великого фрагмента  $F(ab')_2$ , що орієнтовно відповідає дисульфідно приєднаним фрагментам Fab; такий великий фрагмент має двовалентну антигензв'язуючу активність і усе ще здатний брати участь у перехресному зв'язуванні антигену. Фрагменти Fab' відрізняються від фрагментів Fab по декількох додатковим залишкам на карбоксильному кінці домену  $C_H1$ , включаючи один або кілька залишків цистеїна із шарнірної ділянки антитіла. У контексті даного винаходу Fab'-SH позначає Fab', у якому цистеїновий залишок (-ки) константних доменів несуть незв'язану тіоліву групу. Фрагменти антитіла  $F(ab')_2$  первісно були отримані як пари фрагментів Fab', що мають між собою шарнірні залишки цистеїну. Також відомі й інші хімічні взаємодії між фрагментами антитіла.

Фрагмент Fc складається з карбоксильних кінців обох H-ланцюгів, які втримуються разом дисульфідними зв'язками. Ефекторні функції антитіл визначаються по послідовності в ділянці Fc, і така ділянка також є крапкою розпізнавання для рецепторів Fc (FcR), що перебувають на певних типах клітин.

«Fv» є найменшим фрагментом антитіла, що містить повну ділянку розпізнавання й зв'язування антигену. Такий фрагмент складається з димера варіабельногодомену одного легкого й одного важкого ланцюгів, що перебувають у близькому, нековалентному зв'язку. В одноланцюгових видах Fv (scFv) один варіабельний домен важкої й один варіабельний домен легкого ланцюга можуть бути ковалентно приєднані з використанням гнучкого пептидного лінкера, таким чином, важкі й легкі ланцюги можуть брати участь в «димерній» структурі, аналогічній такій структурі двухланцюгових видів Fv. При скручуванні таких двох доменів утвориться шість гіперваріабельних петель (3 петлі для кожного ланцюга H і L), що сприяють зв'язуванню антигену амінокислотними залишками й надають антигензв'язуючу специфічність антитілу. Однак навіть одиночний варіабельний домен (або половина Fv, включаючи тільки три CDR, специфічних для антигена) має здатність розпізнавати й зв'язуватися з антигеном, але при більш низькій афінності, ніж вся ділянка зв'язування.

«Одноланцюгові Fv» (або в скороченому виді «sFv» або «scFv») являють собою фрагменти антитіла, що включають домени антитіла  $V_H$  і  $V_L$ , з'єднані в один поліпептидний ланцюг. Переважно, поліпептид sFv буде додатково включати поліпептидний лінкер між доменами  $V_H$  і  $V_L$ , що дозволить sFv утворювати необхідну структуру для зв'язування антигену. Більше докладний опис sFv див. в Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995

(нижче).

Термін «діатіла» відноситься до фрагментів антитіла із двома антигензв'язуючими ділянками, і такі фрагменти включають варіабельний домен важкого ланцюга (VH), приєднаний до варіабельного домену легкого ланцюга (VL) в одному і тому ж поліпептидному ланцюзі (VH-VL). Невеликі фрагменти антитіла одержують шляхом конструювання фрагментів sFv (див. попередню главу) з короткими лінкерами (приблизно 5-10 залишків) між доменами V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub>, таким чином, досягається міжланцюгове (але не внутрішньоланцюгове) спарювання V доменів, що приводить до утворення двовалентного фрагмента, тобто фрагмента із двома антигензв'язуючими ділянками. Діатіла можуть бути двовалентними або біспецифічними. Біспецифічні антитіла представлені гетеродимерами із двох «кросоверних» фрагментів, у яких домени V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub> двох антитіл присутні у двох різних поліпептидних ланцюгах. Діатіла описані більш докладно в EP 404,097; WO 93/11161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); і Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993). Тріатіла й тетратіла також описані в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Термін «моноклональне антитіло» у контексті даного винаходу відноситься до антитіла, яке отримане з популяції практично однорідних антитіл, тобто окремих антитіл, що становлять популяцію і є ідентичними за винятком можливих і виникаючих природно мутацій, які можуть бути присутні у незначних кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними й спрямовані щодо однієї ділянки антигену. Крім того, на відміну від композицій з поліклональними антитілами, які включають різні антитіла, спрямовані щодо різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло спрямоване щодо однієї детермінанти антигену. Крім своєї специфічності, моноклональні антитіла мають перевагу, тому що вони можуть бути синтезовані при відсутності домішок інших антитіл. Модифікатор «моноклональний» не повинен тлумачитися як потребуючий виробництва антитіла яким-небудь окремим способом. Наприклад, моноклональні антитіла, які можуть використовуватися в даному винаході можуть бути отримані способом гібридоми, що був уперше описаний Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), або шляхом рекомбінації ДНК у клітинах бактерій, еукаріотів або рослин (див., наприклад, патент США No. 4816567). «Моноклональні антитіла» також можуть бути ізольовані з фагових бібліотек з використанням способів, описаних, наприклад, в Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) and Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

Описані тут моноклональні антитіла включають «химерні» антитіла, у яких ділянка важкого й/або легкого ланцюгів ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, що отримані в окремих видах або приналежні окремому класу або підкласу антитіл, і ділянка ланцюга (-ів) ідентична або гомологічна відповідним в антитілах, отриманих в інших видів або приналежних іншим класам або підкласам антитіл, а також фрагменти таких антитіл, що володіють необхідною біологічною активністю (патент США No. 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Описані тут химерні антитіла включають «приматизовані» антитіла, що включають варіабельний домен антигензв'язуючих послідовностей, отриманих у нелюдиноподібних приматів (наприклад, мавп Старого світа й т.д.), а також ділянок константних послідовностей людини.

«Гуманізовані» форми антитіл тварин (наприклад, гризунів) представлені химерними антитілами, які містять мінімальну послідовність, отриману з антитіла тварин. Для більшої частини гуманізовані антитіла представлені людськими імуноглобулінами (антитіло-реципієнт), у яких залишки гіперваріабельних ділянок реципієнта заміщені залишком гіперваріабельної ділянки тварини (антитіла-донора), наприклад, миші, пацюка, кролика або нелюдиноподібного примата, при цьому збережена необхідна специфічність, афінність і функціональність. У деяких випадках залишки каркасної ділянки (КД) імуноглобуліну людини заміщаються відповідними залишками тварин. Більш того, гуманізовані антитіла можуть включати залишки, не присутні в антитілі-донорі або антитілі-реципієнті. Такі модифікації здійснюються для посилення дії антитіла. У цілому, гуманізоване антитіло буде складатися практично повністю з, щонайменше, одного, але звичайно двох варіабельних доменів, у яких всі або практично всі гіперваріабельні петлі відповідають імуноглобуліну тварин, і всі або практично всі КД відповідають послідовності імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло буде включати, щонайменше, частину константної ділянки імуноглобуліну (Fc), як правило, імуноглобуліну людини. Додаткову інформацію див. в Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992). Див. також наступні оглядові статті й наведені посилання: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma and Immunol., 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions, 23:1035-1038 (1995); Hurler and Gross, Curr. Op. Biotech., 5:428-433 (1994).

У контексті даного винаходу термін «тіо» відноситься до антитіла із приєднаним у ході

рекомбінації цистеїном, при цьому приставка «hu», при її використанні, відноситься до гуманізованого антитіла.

«Людське антитіло» представлено антитілом, що несе амінокислотну послідовність, що відповідає такій послідовності антитіла, що виробляється людиною й/або, що використовується в кожному зі способів для одержання людських антитіл відповідно до представленого тут опису. Таке визначення людського антитіла специфічним чином виключає гуманізоване антитіло, що включає антигензв'язуючі залишки тваринного походження. Людські антитіла можуть бути отримані з використанням різних відомих науці способів, включаючи бібліотеки фагових дисплеїв. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991). Для одержання людських моноклональних антитіл також доступні способи, описані в Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991). Див. також van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001). Людські антитіла можуть бути отримані шляхом введення антигену трансгенній тварині, що було модифіковано для вироблення таких антитіл у відповідь на вплив антигеном, але при цьому ендогенні локуси були наведені в неактивний стан, наприклад, введення мишам лінії Xenomouse (див., наприклад, патенти США No. 6075181 і 6150584 про технологію XENOMOUSE™). Див. також, наприклад, Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) про людські антитіла, отримані за допомогою способу В-клітинної гібридомі людини.

У контексті даного винаходу термін «гіперваріабельна ділянка», «HVR» або «HV» відноситься до ділянок варіабельності домену антитіла, що відрізняється гіперваріабельністю послідовності й/або утворює структурно обумовлену петлю. Як правило, антитіла включають шість гіперваріабельних ділянок: три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). Кількість що відображені гіперваріабельних ділянок описано в тексті даної заявки. Гіперваріабельні ділянки по Kabat (CDR) ґрунтуються на варіабельності послідовності й використовуються найбільш часто (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Розташування структурних петель визначається по Chothia (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Кінець петлі Chothia CDR-H1 при нумерації з використанням системи нумерації по Kabat варіює від H32 до H34 залежно від довжини петлі (це пояснюється тим, що схема нумерації по Kabat розташовує вставки в H35A і H35B; при відсутності 35A і 35B, петля закінчується на 32; у випадку присутності тільки 35A, петля закінчується на 33; у випадку присутності 35A и 35B, петля закінчується на 34). Гіперваріабельні ділянки MAT являють собою компромісне рішення між Kabat CDR і структурними петлями Chothia, і використовуються програмним комплексом для моделювання MAT Oxford Molecular. «Контактні» гіперваріабельні ділянки ґрунтуються на аналізі наявних складних кристалічних структур. Залишки кожної з таких гіперваріабельних ділянок зазначені нижче.

Петля	Kabat	MAT	Chothia	Контакт
----	----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34	H30-H35B
(Нумерація по Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Нумерація по Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

Гіперваріабельні ділянки можуть включати наступні «розширені гіперваріабельні ділянки»: 24-36 або 24-34 (L1), 46-56 або 50-56 (L2) і 89-97 (L3) в VL і 26-35B (H1), 50-65, 47-65 або 49-65 (H2) і 93-102, 94-102 або 95-102 (H3) в VH. Залишки варіабельного домену пронумеровані згідно Kabat et al. (всі визначення представлені вище).

Залишки «каркасної ділянки» або «КД» представлені залишками варіабельного домену на відміну від залишків гіперваріабельної ділянки, певних у тексті даної заявки.

Термін «залишок варіабельного домену, пронумерованого по Kabat» або «нумерація положення амінокислоти по Kabat», а також його варіації відносяться до системи нумерації, що використовується для варіабельних доменів важкого ланцюга або варіабельних доменів легкого ланцюга при зіставленні антитіл і описаної в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). 3

використанням такої системи нумерації фактична лінійна послідовність амінокислот може містити менше або більше амінокислот, що відповідає вкороченню або вставці в КД або CDR варіабельного домену. Наприклад, варіабельний домен важкого ланцюга може включати одну амінокислотну вставку (залишок 52a згідно Kabat) після залишку 52 H2 і вставлені залишки

5 (наприклад, залишки 82a, 82b, 82c і т.д. згідно Kabat) після залишку 82 КД важкого ланцюга. Нумерація залишків по Kabat може проводитися для окремого антитіла шляхом вирівнювання гомологічних ділянок у послідовності антитіла з «стандартною» пронумерованою послідовністю Kabat.

Система нумерації по Kabat звичайно використовується при вказівці залишку у варіабельному домені (зразкова кількість залишків у легкому ланцюзі 1-107 і у важкому ланцюзі 1-113) (наприклад, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). «Система нумерації EU» або «індекс EU» звичайно використовується при вказівці залишку в константній ділянці важкого ланцюга імуноглобуліну (наприклад, індекс EU повідомляється в Kabat et al., див. вище). Термін «індекс EU по Kabat» відноситься до нумерації залишку людського антитіла до IgG1. Якщо не зазначене інше, посилання на номери залишків у варіабельному домені антитіл позначають нумерацію залишку по системі нумерації Kabat. Якщо не зазначене інше, посилання на номери залишків у варіабельному домені антитіл позначають нумерацію залишку по системі нумерації EU (наприклад, див. попередня заявка на патент США No. 60/640323, Фігури, що відображають нумерацію по EU).

Антитіло з «дозрілою афінністю» представлено антитілом з одним або декількома змінами в одному або декількох ГВУ, що призводить до поліпшення афінності антитіла стосовно антигену в порівнянні з вихідним антитілом, що не володіє такими змінами. Кращі антитіла з дозрілою афінністю будуть мати показники афінності щодо антигену-мішені, вимірювані в наномолях або пікомолях. Антитіла з дозрілою афінністю одержують із використанням способів, відомих науці. Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) описує дозрівання афінності шляхом перестановки домену VH і VL. Випадковий мутагенез залишків HVR і/або каркасної ділянки описаний у наступних джерелах: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

«Блокуюче» антитіло, або антитіло - «антагоніст» представлено антитілом, що інгібує або що знижує біологічну активність антигену, з яким воно зв'язується. Переважні блокуючі антитіла або антитіла-антагоністи значно або повністю інгібують біологічну активність антигену.

У контексті даного винаходу «антитіло-агоніст» позначає антитіло, що імітує щонайменше, одну функціональну властивість поліпептиду, що цікавить.

«Видозалежне антитіло», наприклад, антитіло ссавця до IgE людини, представлено антитілом, що має більшу афінність зв'язування з антигеном одного виду ссавця в порівнянні з гомологом такого антигену іншого виду ссавця. Як правило, видозалежне антитіло «специфічно зв'язується» з антигеном людини (тобто має значення афінності зв'язування (Kd) не більш ніж приблизно  $1 \times 10^{-7}$  М, переважно не більш ніж приблизно  $1 \times 10^{-8}$  М и найбільше переважно не більш ніж приблизно  $1 \times 10^{-9}$  М), але володіє афінністю зв'язування з гомологом антигену іншого виду тварини (ссавця), що, щонайменше, приблизно в 50 разів, або, щонайменше, приблизно в 500 разів, або, щонайменше, приблизно в 1000 разів слабкіше, ніж афінність зв'язування з антигеном людини. Видозалежне антитіло може бути представлено кожним з різних типів антитіл, як це визначено вище, але переважно представлене гуманізованим або людським антитілом.

Термін «афінність зв'язування» звичайно відноситься до сумарної сили всіх нековалентних взаємодій між одним центром зв'язування молекули (наприклад, антитіла) і його партнером, що зв'язує (наприклад, антигеном). Якщо інше не зазначено, у контексті даного винаходу «афінність зв'язування» відноситься до властивості антитілу афінності зв'язування, що відображає 1:1 взаємодію між членами пари, що зв'язується (наприклад, антитіла й антигену). Афінність молекули X до свого партнера Y може бути звичайно представлена по константі дисоціації (Kd). Афінність може бути обмірювана з використанням загальних і відомих науці способів, включаючи способи, описані в даній заявці. Антитіла з низькою афінністю звичайно зв'язуються з антигеном повільно й легко дисоціюють, у той час як антитіла з високої афінністю звичайно зв'язуються з антигеном більш швидко й залишаються зв'язаними довше. У науці відомий цілий ряд способів виміру афінності зв'язування, і будь-який такий спосіб може використовуватися з метою даного винаходу. Нижче представлені специфічні ілюстративні варіанти втілення винаходу.

У контексті даного винаходу термін «або краще» відноситься до афінності зв'язування,

тобто більш сильному зв'язуванню між молекулою і її партнером, що зв'язує. При використанні в контексті даного винаходу термін «або краще» відноситься до більше сильного зв'язування й відображається меншим числовим значенням  $K_d$ . Наприклад, антитіло зі значенням афінності до антигену «0,6 нМ» або краще може мати значення афінності щодо антигену, рівне <0,6 нМ, тобто 0,59 нМ, 0,58 нМ, 0,57 нМ і т.д., або будь-яке інше значення менш 0,6 нМ.

В одному варіанті втілення винаходу термін « $K_d$ » або «значення  $K_d$ » або « $K_d$  значення» вимірюється по аналізу зв'язування радіоміченого антигену (PIA), що виконувався за версією Fab антитіла, що цікавить, і його антигену, як це описано наступним аналізом, у ході якого проводиться вимір зв'язування в розчині Fab з антигеном шляхом вирівнювання Fab з мінімальною концентрацією ( $^{125}$ I)-міченого антигену в присутності серії титрацій неміченого антигену з наступним захопленням зв'язаного антигену на планшеті, покритому антитілом до Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Для встановлення умов для аналізу, пластини мікротитратора (Dynex) покривають 5 мкг/мл зв'язаного антитіла до Fab (Cappel Labs) в 50 мМ натрію карбонату (pH 9,6) і залишають на всю ніч; потім діють 2% (в/о) альбуміном бичачої сироватки у ФСБ протягом двох-п'яти годин при кімнатній температурі (приблизно 23 °C). При використанні неадсорбуючої пластини (Nunc #269620), 100 пМ або 26 пМ [ $^{125}$ I]-антигену змішують із серійними розведеннями Fab, що цікавить (наприклад, що відповідає для оцінки антитіла до VEGF, Fab-12, в Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). Fab, що цікавить потім інкубують протягом всієї ночі, однак інкубація може тривати й довше (наприклад, 65 годин) для забезпечення досягнення рівноваги. Згодом суміші переносять в абсорбуючий планшет для інкубації при кімнатній температурі (наприклад, протягом 1 години). Потім розчин видаляють і пластину промивають вісім разів з використанням 0,1% твіну-20 у ФСБ. Після того, як пластини висохнули, у кожну лунку вносять 150 мкл сцинтиляційної рідини (MicroScint-20; Packard) і пластини піддаються аналізу з використанням гама-лічильника Topcount (Packard) протягом 10 хвилин. Концентрації кожного Fab, які менше або рівні 20% значенню максимального зв'язування, вибирають для використання в аналізах конкурентного зв'язування.

Відповідно до іншого варіанта втілення винаходу значення  $K_d$  вимірюють із використанням аналізів поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25 °C з іммобілізованим антигеном CM5 при ~10 одиниць відповіді (ОВ). Стисло це можна описати в такий спосіб: кристали біодатчика карбоксиметилірованого декстрану (CM5, BIAcore Inc.) активують за допомогою N-етил-N'- (3-диметиламінопропіл)-карбодііміду гідрохлориду (EDC) і N-гідроксисукциніміду (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антиген розводять в 10 мМ натрію ацетату, pH 4,8, у концентрації 5 мкг/мл (приблизно 0,2 мкМ) перед введенням при низькій швидкості 5 мкл/хв для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (ОВ) зв'язаного білка. Після введення антигену, для блокування груп, що не прореагували вводять 1 М етаноламіну. Для проведення кінетичних вимірів дворазові серійні розведення Fab (від 0,78 нМ до 500 нМ) вводять у ФСБ із 0,05% твіну-20 (ФСБТ) при 25 °C при швидкості потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (kon) і дисоціації (koff) розраховуються з використанням простої однозначної моделі зв'язування Ленгмюра (програма аналізу BIAcore, версія 3.2) шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації й дисоціації. Рівноважна константа дисоціації ( $K_d$ ) розраховується як співвідношення koff/kon. Див., наприклад, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Якщо швидкість константи асоціації перевищує 106 M<sup>-1</sup> c<sup>-1</sup>, як це визначено в ході аналізу поверхневого плазмонного резонансу, таке значення швидкості константи асоціації може бути визначено з використанням способу гасіння флуоресценції, що вимірює підвищення або зниження інтенсивності випромінювання флуоресценції (збудження = 295 нМ; емісія = 340 нМ, смуга пропускання 16 нМ) при 25 °C 20 нМ антитіла до антигену (форма Fab) у ФСБ, pH 7,2, у присутності концентрацій, що підвищуються, антигену, обмірюваних спектрометром, наприклад, спектрофотометром з можливістю зупинки потоку (Aviv Instruments) або спектрофотометром SLM-Aminco серії 8000 (ThermoSpectronic) з переміщуваною червоною кюветою.

Відповідно до даного винаходу поняття «швидкість асоціації» або «kon» також можуть бути визначені з використанням того ж самого способу поверхневого плазмонного резонансу, що описаний вище, з використанням BIAcore™-2000 або BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Фраза «практично подібний» або «практично такий самий» у контексті даного винаходу позначає досить високий ступінь подоби між двома числовими значеннями (одне звичайно пов'язане з антитілом по винаходу, а інше - з еталонним антитілом/антитілом порівняння), таким чином, фахівець у даній області зможе побачити різницю між двома значеннями, що має незначну або не має біологічну й/або статистичну значимість у контексті біологічної характеристики, вимірюваної зазначеними значеннями (наприклад, значеннями  $K_d$ ). Різниця



між двома зазначеними значеннями становить переважно менш ніж приблизно 50%, менш ніж приблизно 40%, менш ніж приблизно 30%, менш ніж приблизно 20%, менш ніж приблизно 10% як функція від значення еталонного антитіла/антитіла порівняння.

Фраза «істотно знижений» або «істотно різниться» у контексті даного винаходу позначає досить високий ступінь подоби між двома числовими значеннями (одне звичайно пов'язане з антитілом по винаходу, а інше - з еталонним антитілом/антитілом порівняння), таким чином, фахівець у даній області зможе побачити різницю між двома значеннями, що має статистичну значимість у контексті біологічної характеристики, вимірюваної зазначеними значеннями (наприклад, значеннями  $K_d$ , відповіддю НАМА). Різниця між двома зазначеними значеннями становить переважно більш ніж приблизно 10%, більш ніж приблизно 20%, більш ніж приблизно 30%, більш ніж приблизно 40%, більш ніж приблизно 50% як функція від значення еталонного антитіла/антитіла порівняння.

Поняття «антиген» позначає попередньо певний антиген, з яким зв'язується антитіло виборчим чином. Антиген-мішень може бути представлений поліпептидом, вуглеводом, нуклеїновою кислотою, ліпідом, гапеном або іншим, що зустрічається в природі або синтетичним сполуком. Переважно, антиген-мішень представлена поліпептидом.

У контексті даного винаходу «акцепторна каркасна ділянка людини» являє собою каркасну ділянку, що складається з амінокислотної послідовності каркасної ділянки VL або VH, отриманої з каркасної ділянки імуноглобуліну людини або консенсусної послідовності каркасної ділянки людини. Акцепторна каркасна ділянка людини, «отриманий з» каркасної ділянки імуноглобуліну людини або консенсусної послідовності каркасної ділянки людини може включати ту ж амінокислотну послідовність або може містити існуючі раніше зміни в амінокислотній послідовності. У випадку присутності існуючих раніше змін в амінокислотній послідовності, відзначається переважно не більш ніж 5, не більш ніж 4 або менш, або 3 або менш існуючих раніше змін в амінокислотній послідовності. У випадку присутності існуючих раніше змін в амінокислотній послідовності в VH, такі зміни переважно відзначаються тільки в трьох, двох або одному положенні 71H, 73H і 78H; наприклад, амінокислотні залишки в таких положеннях можуть бути представлені 71A, 73T і/або 78A. В одному варіанті втілення винаходу акцепторна каркасна ділянка людини VL по своїй послідовності ідентична послідовності каркасної ділянки VL імуноглобуліну людини або консенсусної послідовності каркасної ділянки людини.

«Консенсусна послідовність каркасної ділянки людини» являє собою каркасну ділянку, що містить найбільше амінокислотних залишків, що часто зустрічаються при виборі послідовностей каркасних ділянок VL або VH імуноглобуліну людини. Як правило, вибір послідовностей VL або VH імуноглобуліну людини здійснюється з підгрупи послідовностей варіабельних доменів. Звичайно підгрупа послідовностей представлена підгрупою згідно Kabat et al. В одному варіанті втілення винаходу для VL підгрупа представлена підгрупою капа I (відповідно Kabat et al). В одному варіанті втілення винаходу для VH підгрупа представлена підгрупою III (відповідно Kabat et al).

«Консенсусна послідовність підгрупи III VH» включає консенсусну послідовність, отриману з послідовностей амінокислот у підгрупі III варіабельного домену важкого ланцюга (відповідно Kabat et al). В одному варіанті втілення винаходу консенсусна амінокислотна послідовність підгрупи III VH включає, щонайменше, ділянку або повні наступні послідовності: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 49)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 50)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 51)-H3-WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 52).

«Консенсусна послідовність підгрупи I VL» включає консенсусну послідовність, отриману з послідовностей амінокислот у підгрупі капа I варіабельного домену легкого ланцюга (згідно Kabat et al). В одному варіанті втілення винаходу консенсусна амінокислотна послідовність підгрупи I VL включає, щонайменше, ділянку або повні наступні послідовності: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 45)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 46)-L2-GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 47)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 48).

«Немодифікована каркасна ділянка людини» являє собою каркасну ділянку, що має таку ж амінокислотну послідовність, що й акцепторна каркасна ділянка людини, наприклад, за винятком амінокислотних замінів (людських на тварин) в акцепторній каркасній ділянці людини.

«Змінена гіперваріабельна ділянка» у контексті даного винаходу являє собою гіперваріабельну ділянку, що складається з однієї або декількох (наприклад, однієї до приблизно 16) замінів амінокислот.

«Немодифікована гіперваріабельна ділянка» у контексті даного винаходу являє собою гіперваріабельну ділянку, що має таку ж саму амінокислотну послідовність, що й антитіло

тварини, з якого така ділянка була отримана, тобто, за винятком однієї або декількох замін амінокислот.

Антитіло, «яке єднає» антиген, що цікавить, наприклад, антиген-мішень пухлиноасоційованого поліпептиду, представлено антитілом, що зв'язує антиген з достатньою афінністю, і таке антитіло може використовуватися як терапевтичний агент у поразці клітини або тканини, що експресує антиген, без значної перехресної реакції з іншими білками. У таких варіантах втілення винаходу ступінь зв'язування антитіла з «нецільовим» білком буде становити менш ніж приблизно 10% від зв'язування антитіла з його білком-мішенню, як це визначено шляхом аналізу флуоресцентного сортування клітин (FACS) або радіоімунопреципітацією. Щодо зв'язування антитіла з молекулою-мішенню, термін «специфічне зв'язування» або «специфічно зв'язується з» або «специфічно відносно» окремого поліпептиду або антигенної детермінанти на окремому поліпептиді-мішені позначає зв'язування, що порівнянно різниться від неспецифічної взаємодії. Специфічне зв'язування може бути обмірювано, наприклад, шляхом визначення зв'язування молекули в порівнянні зі зв'язуванням контрольної молекули, що звичайно представлена молекулою з подібною структурою, але не активністю зв'язування. Наприклад, специфічне зв'язування може бути визначене шляхом конкурентної взаємодії з контрольною молекулою, схожою на мішень, наприклад, надлишковою кількістю неміченої мішені. У такому випадку специфічного зв'язування показано, що зв'язування міченої мішені із зондом конкурентним чином інгібується надлишком неміченої мішені. У контексті даного винаходу термін «специфічне зв'язування» або «специфічно зв'язується з» або «специфічно відносно» окремого поліпептиду або антигенної детермінанти окремого поліпептиду-мішені може виражатися, наприклад, молекулою зі значенням Kd для мішені приблизно, щонайменше,  $10^{-4}$  М, приблизно, щонайменше,  $10^{-5}$  М, приблизно, щонайменше,  $10^{-6}$  М, приблизно, щонайменше,  $10^{-7}$  М, приблизно, щонайменше,  $10^{-8}$  М, приблизно, щонайменше,  $10^{-9}$  М, приблизно, щонайменше,  $10^{-10}$  М, приблизно, щонайменше,  $10^{-11}$  М, приблизно, щонайменше,  $10^{-12}$  М або більше. В одному варіанті втілення винаходу термін «специфічне зв'язування» відноситься до зв'язування, коли молекула зв'язується з окремим поліпептидом або антигенною детермінантою окремого поліпептиду без істотного зв'язування з яким-небудь іншим поліпептидом або антигенною детермінантою поліпептиду.

Антитіло, що «інгібує ріст пухлинних клітин, що експресує поліпептид FcRH5» або «інгібуюче ріст» антитіло представлено антитілом, що приводить до порівнянного інгібування росту ракових клітин, що володіють експресією або гіперекспресією відповідного поліпептиду FcRH5. Поліпептид FcRH5 може бути представлений трансмембранним поліпептидом, що експресується на поверхні ракової клітини, або поліпептидом, що продукується і секритується раковою клітиною. Переважно інгібуюче ріст антитіло до FcRH5 інгібує ріст пухлинних клітин, що експресує FcRH5, більш ніж на 20%, переважно від приблизно 20% до приблизно 50%, і навіть більш переважно більш ніж на 50% (наприклад, від приблизно 50% до приблизно 100%) у порівнянні з відповідним контролем, що звичайно представлений пухлинними клітинами, не підданими впливу досліджуванним антитілом. В одному варіанті втілення винаходу інгібування росту може бути обмірюване при концентрації антитіла від приблизно 0,1 до 30 мкг/мл або від приблизно 0,5 нМ до 200 нМ у клітинній культурі, при цьому інгібування росту визначається через 1-10 днів після впливу антитіла на пухлинні клітини. Інгібування росту пухлинних клітин *in vivo* може бути визначено різними способами, наприклад, такими, які описані в експериментальних Прикладах нижче. Антитіло інгібує ріст в умовах *in vivo*, якщо введення антитіла до FcRH5 у концентрації приблизно 1 мкг/кг до приблизно 100 мкг/кг маси тіла приводить до зниження розміру пухлини або проліферації пухлинних клітин протягом періоду від приблизно 5 днів до 3 місяців з моменту першого введення антитіла, переважно протягом приблизно 5-30 днів.

Антитіло, «яке індукує апоптоз», представлено антитілом, що індукує програмувальну загибель клітин, як це визначено по зв'язуванню анексину V, фрагментації ДНК, зменшенню клітини, розтяганню ендоплазматичного ретикулума, фрагментації клітини й/або утворенню мембранних везикул (що мають назву апоптозними тельцями). Клітинам звичайно представлена клітиною, що надлишково експресує поліпептид FcRH5. Переважно клітина представлена пухлинною клітиною, наприклад, гематопоетичною клітиною, такою як В-клітина, Т-клітина, базофіл, еозинофіл, нейтрофіл, моноцит, тромбоцит або еритроцит. Для оцінки клітинних явищ, асоційованих з апоптозом, існує цілий ряд способів. Наприклад, транслокація фосфатиділсеріна (ФС) може бути обмірювана по зв'язуванню анексину; фрагментація ДНК може бути обмірювана по електрофоретичному розщепленню ДНК; ядерна/хроматинова конденсація разом із фрагментацією ДНК може бути оцінена шляхом будь-якого підвищення кількості гіподиплоїдних клітин. Переважно антитіло, яке індукує апоптоз, представлено

антитілом, що призводить до приблизно 50-кратної, переважно приблизно 50-кратної, але більш переважно 50-кратної індукції зв'язування анексина в порівнянні з непідданим впливу антитілом клітини в ході аналізу зв'язування анексина.

Антитіло, «яке індукує загибель клітини», представлено антитілом, що призводить до життєздатну клітину до нежиттєздатності. Клітина представлена клітиною, що експресує поліпептид FcRH5 і належить до типу клітин, що характеризуються специфічною експресією або гіперекспресією поліпептиду FcRH5. Клітина може бути представлена раковою або здоровою клітиною окремого типу клітин. Поліпептид FcRH5 може бути представлений трансмембранним поліпептидом, що експресує на поверхні ракової клітини, або поліпептидом, що продукує і що секретує раковою клітиною. Клітина може бути представлена раковою клітиною, наприклад, В-клітиною або Т- клітиною. Загибель клітини *in vitro* може бути визначена під час відсутності комплементу й імунних ефекторних клітин, що дозволить відрізнити загибель клітини, викликану антитіло-залежною клітинно-опосередкованою цитотоксичністю (АЗКЦ) або комплемент-залежною цитотоксичністю (КЗЦ). Таким чином, аналіз загибелі клітини може проводитися з використанням інактивованої нагріванням сироватки (тобто під час відсутності комплементу) і під час відсутності імунних ефекторних клітин. Для визначення здатності антитіла індукувати загибель клітини, втрата цілісності мембрани, установлювана по поглинанню пропідіума йодиду (ПІ), трипанового синього (див. Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)) або 7AAD, може оцінюватися в порівнянні з не підданими впливу клітинами. Переважно опосередковані загибель клітин антитіла представлені антитілами, що індукують захоплення ПІ в ході аналізу захоплення ПІ клітинами BT474.

«Ефекторні функції» антитіла відносяться до біологічної активності, властивої ділянці Fc (нативною послідовності ділянки Fc або варіантної амінокислотної послідовності ділянки Fc) антитіла, і варіюють для кожного ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають наступне: зв'язування C1q і комплемент-залежна цитотоксичність; зв'язування рецептора Fc; антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність (АЗКЦ); фагоцитоз; зниження експресії рецепторів клітинної поверхні (наприклад, рецептора В-клітини); активація В-клітини.

У контексті даного винаходу термін «ділянка Fc» відноситься до визначення С-термінального кінця важкого ланцюга імуноглобуліну, включаючи нативну послідовність ділянок Fc і варіантні ділянки Fc. Незважаючи на те, що границі ділянки Fc у важкому ланцюзі імуноглобуліну можуть варіювати, ділянка Fc важкого ланцюга IgG людини звичайно визначають від амінокислотного залишку в положенні Cys226, або від Pro230, до карбоксильного кінця. С-термінальний лізин (залишок 447 згідно системи нумерації EU) ділянки Fc може бути вилучений, наприклад, під час одержання або очищення антитіла, або в ході рекомбінації нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг антитіла. Відповідно до цього, композиція з інтактними антитілами може включати популяції антитіл з усіма вилученими залишками K447, популяції антитіл із присутністю залишків K447, і популяції антитіл із сумішшю антитіл з/без залишків K447.

«Функціональна ділянка Fc» несе «ефекторну функцію» нативної послідовності ділянки Fc. Типові «ефекторні функції» включають зв'язування C1q, зв'язування рецептора Fc, АЗКЦ, фагоцитоз, зниження експресії рецепторів клітинної поверхні (наприклад, рецептора В-клітин, BCR) і т.д. Такі ефекторні функції звичайно мають на увазі, щоб ділянка Fc була скомбінована з єднальним доменом (наприклад, варіабельним доменом антитіла) і мав можливість аналізуватися з використанням різних описаних аналізів, наприклад, представлених у визначеннях.

«Нативна послідовність ділянки Fc» включає амінокислотну послідовність, ідентичну амінокислотної послідовності ділянки Fc, що зустрічається в природі. Ділянки Fc з нативною послідовністю людини включають ділянку Fc з нативною послідовністю IgG1 людини (аллотипи А та інші аллотипи), ділянку Fc з нативною послідовністю IgG2 людини, ділянку Fc з нативною послідовністю IgG3 людини, ділянку Fc з нативною послідовністю IgG4 людини, а також всі варіанти, що зустрічаються в природі.

«Варіантна ділянка Fc» включає амінокислотну послідовність, що відрізняється від нативної послідовності ділянки Fc щонайменше модифікацією однієї амінокислоти, переважно однієї або декількох заміни амінокислот. Переважно варіантна Fc ділянка має, щонайменше, одну заміну амінокислоти в порівнянні з нативною послідовністю ділянки Fc або ділянки Fc вихідного поліпептиду, наприклад, варіантна ділянка Fc має від приблизно однієї до приблизно десяти амінокислотних заміни, і переважно від приблизно однієї до приблизно п'яти амінокислотних заміни у нативній послідовності ділянки Fc або ділянки Fc вихідного поліпептиду. Варіантна ділянка Fc буде переважно володіти, щонайменше, приблизно 80% гомологічністю щодо

ділянки Fc з нативною послідовністю й/або ділянки Fc вихідного поліпептиду, і переважно, щонайменше, приблизно 90% гомологічністю, але більш переважно, щонайменше, приблизно 95% гомологічністю.

«Антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність» або «АЗКЦ» відноситься до форми цитотоксичності, при якій секретований Ig, зв'язаний рецепторами Fc (FcRs), які присутні на певних цитотоксичних клітинах (наприклад, клітинах-природних кілерах (NK-клітинах), нейтрофілах і макрофагах), дозволяє таким цитотоксичним клітинам-ефекторам специфічно зв'язуватися з антиген клітиною-мішенню, яка несе з наступною загибеллю клітини-мішені за допомогою цитотоксинів. Антитіла «захоплюють» цитотоксичні клітини і є абсолютно необхідними для такої загибелі клітин. Первинні клітини для опосередкування АЗКЦ – NK-клітини – експресують тільки FcγRIII, у той час як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Експресія FcR на гематопоетичних клітинах узагальнена в Таблиці 3 на сторінці 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Для оцінки активності АЗКЦ молекули може проводитися аналіз АЗКЦ *in vitro*, наприклад, аналіз, описаний у патенті США No. 5500362 або 5821337. Корисні для таких аналізів ефекторні клітини включають мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і природні клітини-кілери (NK-клітини). З іншої сторони (або крім того), активність АЗКЦ зазначених молекул може бути оцінена *in vivo*, наприклад, з використанням тваринної моделі, описаної Clynes et al., (USA) 95:652-656 (1998).

Терміни «рецептор Fc» або «FcR» описують рецептор, що зв'язується з ділянкою Fc антитіла. Переважно, FcR представлений людським FcR з нативною послідовністю. Крім того, переважний FcR представлений рецептором, що зв'язується з антитілом до IgG (гамарецептором), і включає рецептори підкласів FcγRI, FcγRII і FcγRIII, включаючи алельні варіанти й інші сплайс-форми таких рецепторів. Рецептори FcγRII включають FcγRIIA («рецептор, що активує») і FcγRIIB («рецептор, що інгібує»), які мають амінокислотні послідовності, що відрізняються переважно по своєму цитоплазматичному домену. Цитоплазматичний домен рецептора, що активує, FcγRIIA містить імунорецепторний тірозиновий мотив, що активує (ITAM). Цитоплазматичний домен рецептора FcγRIIB, що інгібує містить імунорецепторний тірозиновий інгібуючий мотив (ITIM). (Див. M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR аналізуються в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-492 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); i de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Інші FcR, включаючи рецептори, які будуть ідентифіковані в майбутньому, також включені в термін «FcR» у контексті даного винаходу. Термін також включає неонатальний рецептор FcRn, відповідальний за перенос IgG від матері до плода (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) i Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

Зв'язування з людським FcRn *in vivo* і період напівжиття FcRn поліпептидів з високої афінністю в сироватці може бути проаналізовано, наприклад, з використанням трансгенних мишей або трансфікованих ліній клітин людини, що експресують людський FcRn, або з використанням приматів, яким були введені поліпептиди з варіантною ділянкою Fc. WO 2000/42072 (Presta) описує варіанти антитіла з поліпшеним або зниженим зв'язуванням з FcR. Див. також, наприклад, Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

«Ефекторні клітини» представлені лейкоцитами, що експресують один або декілька FcR і виконують ефекторні функції. Переважно, клітини експресують щонайменше, FcγRIII і виконують ефекторну функцію АЗКЦ. Приклади лейкоцитів людини, які опосередковують КЗЦ, включають мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК), природні клітини-кілери (NK-клітини), моноцити, цитотоксичні Т-клітини й нейтрофіли, при цьому перевага віддається МКПК і NK-клітинам. Ефекторні клітини можуть бути ізольовані з нативного джерела, наприклад, із крові.

«Комплемент-залежна цитотоксичність» або «КЗЦ» відноситься до лізису клітини-мішені в присутності комплекменту. Активація класичного шляху комплекменту ініціюється зв'язуванням першого компонента системи комплекменту (C1q) з антитілами (відповідного підкласу), пов'язаними з відповідним когнатним антигеном. Для оцінки активації комплекменту може виконуватися аналіз КЗЦ, наприклад, описаний в Gazzano-Santaro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163. Варіантні поліпептиди зі зміненими послідовностями амінокислот ділянки Fc (поліпептиди з варіантною ділянкою Fc) і підвищеною або зниженою здатністю зв'язуватися з C1q описані, наприклад, у патенті США No. 6194551 B1 i WO 1999/51642. Див. також, наприклад, Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Термін «антитіло, що включає ділянку Fc» відноситься до антитіла, що включає ділянку Fc. С-термінальний лізин (залишок 447 згідно системи нумерації EU) ділянки Fc може бути вилучений, наприклад, під час очищення антитіла, або в ході рекомбінації нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло. Відповідно до цього, композиція, що складається з антитіла з ділянкою Fc

даного винаходу може включати антитіло з K447, вилученими K447 або суміші антитіл з/без залишку K447.

«Позаклітинний домен» поліпептиду FcRH5 або «ВКД» відноситься до форми поліпептиду FcRH5, що практично не містить незв'язаних трансмембранних і цитоплазматичних доменів. Як правило, ВКД поліпептида FcRH5 буде мати менш ніж 1% таких трансмембранних і/або цитоплазматичних доменів і переважно буде мати менш 0,5% таких доменів. Варто мати на увазі, що будь-які трансмембранні домени, ідентифіковані для поліпептидів FcRH5 даного винаходу, визначені відповідно до критеріїв, які були встановлені в науці для визначення подібного домену гідрофобного типу. Точні границі трансмембранного домену можуть варіювати, але в більшості випадків вони становлять не більш ніж приблизно 5 амінокислот на будь-якому кінці домену. У деяких випадках позаклітинний домен поліпептиду FcRH5 може включати від приблизно 5 або менш амінокислот на кожному кінці границі трансмембранного домену/позаклітинного домену, як це визначено в Прикладах або способах, і такі поліпептиди з/без пов'язаного з ними сигнального пептиду, і кодуєчі їх нуклеїнові кислоти, передбачаються в даному винаході.

Приблизне розташування «сигнальних пептидів» описаного тут поліпептиду FcRH5 приводиться в даній заявці на винахід і/або супровідних фігурах. Однак слід зазначити, що С-термінальна границя сигнального пептиду може варіювати, найбільше ймовірно не більше ніж на 5 амінокислот з кожної сторони С-термінальної границі сигнального пептиду, як уже було визначено тут, при цьому С-термінальна границя сигнального пептиду може бути ідентифікована з дотриманням критеріїв, установлених у науці для ідентифікації подібного типу елемента амінокислотної послідовності (наприклад, Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) і von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Більше того, вважається також, що в деяких випадках розщеплення сигнальної послідовності поліпептиду, що секретується не цілком однорідне, що приводить до секреції більше одного виду. Такі зрілі поліпептиди, у яких сигнальний пептид розщеплюється в межах не більше 5 амінокислот з кожної сторони С-термінальної границі сигнального пептиду (відповідно до наведеного тут визначення), й кодуєчі їх поліпептиди описані в даному винаході.

Термін «поліпептидний варіант FcRH5» позначає поліпептид FcRH5, переважно активний поліпептид FcRH5, як це визначено в тексті даної заявки, що має щонайменше приблизно 80% ідентичність амінокислотної послідовності щодо поліпептиду FcRH5 повної довжини з нативною послідовністю; послідовність поліпептиду FcRH5 не включає сигнальний пептид (відповідно до представленого тут опису), позаклітинний домен поліпептиду FcRH5, включає /не включає сигнальний пептид або інший фрагмент послідовності поліпептиду FcRH5 повної довжини (відповідно до представленого тут опису) (наприклад, варіант, що кодує нуклеїновою кислотою, що представляє тільки ділянку повної послідовності, що кодує, поліпептиду FcRH5 повної довжини). Такі варіанти поліпептиду FcRH5 включають, наприклад, поліпептиди FcRH5, у яких додано або вилучено один або кілька амінокислотних залишків на N- або С-кінці нативної амінокислотної послідовності повної довжини. Як правило, варіант поліпептиду FcRH5 буде мати ідентичність амінокислотної послідовності, яка складається, щонайменше, 80%, або в інших випадках, щонайменше, приблизно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% у порівнянні з нативною послідовністю поліпептиду FcRH5 повної довжини (як це описано в тексті даної заявки), при цьому послідовність поліпептиду FcRH5 не буде включати сигнальний пептид (відповідно до представленого тут опису), позаклітинний домен поліпептиду FcRH5, включати або не включати сигнальний пептид (відповідно до представленого тут опису) або інший специфічним чином обумовлений фрагмент послідовності поліпептиду FcRH5 повної довжини (відповідно до представленого тут опису). Як правило, варіанти поліпептиду FcRH5 включають, щонайменше, 10 амінокислот, в інших випадках, щонайменше, приблизно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 амінокислот або більше. У деяких випадках, варіанти поліпептиду FcRH5 будуть мати не більш ніж одну заміну консервативної амінокислоти в порівнянні з нативною послідовністю поліпептиду FcRH5, в інших випадках не більш ніж 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 замін консервативних амінокислот у порівнянні з нативною послідовністю поліпептиду FcRH5.

«Процентний показник (%) ідентичності амінокислотної послідовності» відносно пептидної або поліпептидної послідовності, тобто певних тут послідовностей поліпептиду FcRH5, визначається як процентний показник залишків амінокислот у кандидатній послідовності, які ідентичні залишкам амінокислот у специфічній пептидній або поліпептидній послідовності, тобто

послідовності поліпептиду FcRH5, що визначається після вирівнювання послідовностей і введення пропусків, у випадку такої необхідності, для досягнення максимальної процентної ідентичності послідовності без обліку будь-яких замінів консервативних амінокислот як частина ідентичності послідовності. Вирівнювання для визначення процентного показника ідентичності амінокислотної послідовності може бути досягнуто різними шляхами, відомими науці, наприклад, з використанням представленого на ринку програмного забезпечення, такого як BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівець у даній області зможе визначити відповідні параметри для виміру вирівнювання, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині послідовностей, що зіставляються. З метою даного винаходу, значення % ідентичності амінокислотної послідовності одержують із використанням комп'ютерної програми для порівняння послідовностей ALIGN-2, при цьому повний вихідний код для програми ALIGN-2 приводиться в Таблиці 1 нижче. Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 була розроблена компанією Genentech, Inc., а вихідний код представлений у Таблиці 1 нижче; даний код був наданий разом з посібником користувача в Бюро реєстрації авторських прав США, Washington D.C., 20559, де була видана реєстрація авторського права США під №TXU510087. Програма ALIGN-2 доступна для широкої публіки й надається компанією Genentech, Inc., Південне Сан-Франциско, шт. Каліфорнія, або може бути скопійована з вихідного коду, представленого в Таблиці 1 нижче. Програма ALIGN-2 для свого використання повинна бути скопійована в операційній системі UNIX, переважно UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовності встановлюються програмою ALIGN-2 і не змінюються.

У випадках, коли програма ALIGN-2 використовується для порівняння послідовностей амінокислот, % ідентичності амінокислотної послідовності для окремої амінокислотної послідовності А щодо заданої амінокислотної послідовності В (або іншими словами: задана амінокислотна послідовність А, що включає певний % ідентичності в порівнянні із заданою амінокислотою послідовністю В) розраховується в такий спосіб:

в 100 разів менше  $X/Y$

де Х є числом амінокислотних залишків, зазначених як ідентичні відповідності, певні програмою зіставлення послідовностей А і В ALIGN-2; Y - загальне число амінокислотних залишків у послідовності В. Варто мати на увазі, що довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності В, і % ідентичності амінокислотних послідовностей А та В не буде дорівнює % ідентичності амінокислотної послідовності В у порівнянні з А.

Термін «варіант полінуклеотида FcRH5» або «варіант послідовності нуклеїнової кислоти FcRH5» позначає молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид FcRH5, переважно активний поліпептид FcRH5, як це визначено в даній заявці, і що має, щонайменше, приблизно 80% ідентичність послідовності нуклеїнової кислоти в порівнянні з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує нативну послідовність FcRH5 повної довжини (відповідно до представленого тут опису), при цьому послідовність поліпептиду FcRH5 повної довжини не включає сигнальний пептид (відповідно до представленого тут опису), позаклітинний домен поліпептиду FcRH5, включає /не включає сигнальний пептид або будь-який інший фрагмент послідовності поліпептиду FcRH5 повної довжини (відповідно до представленого тут опису) (наприклад, варіант, що кодує нуклеїновою кислотою, що представляє тільки ділянку повної послідовності, що кодує, поліпептиду FcRH5 повної довжини). Як правило, варіант полінуклеотида FcRH5 буде мати ідентичність послідовності нуклеїнової кислоти, що складає, щонайменше, 80%, або в інших випадках, щонайменше, приблизно 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% у порівнянні з нативною послідовністю нуклеїнових кислот, що кодують нативну поліпептидну послідовність FcRH5 повної довжини (як це описано в тексті даної заявки), при цьому нативна послідовність поліпептиду FcRH5 повної довжини не буде включати сигнальний пептид (відповідно до представленого тут опису), позаклітинний домен поліпептиду FcRH5, включати або не включати сигнальний пептид (відповідно до представленого тут опису) або інший специфічним чином обумовлений фрагмент послідовності поліпептиду FcRH5 повної довжини (відповідно до представленого тут опису). Варіанти не включають нативну нуклеотидну послідовність.

Як правило, варіанти полінуклеотидів FcRH5 включають, щонайменше, приблизно 5 нуклеотидів, в інших випадках, щонайменше, приблизно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590,

600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1110, 1120, 1130, 1140, 1150, 1160, 1170, 1180, 1190, 1200, 1210, 1220, 1230, 1240, 1250, 1260, 1270, 1280, 1290 або 1300 нуклеотидів, при цьому в даному контексті термін «приблизно» позначає еталонну нуклеотидну послідовність плюс-мінус 10% від довжини такої послідовності.

«Процентний показник (%) ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти» стосовно до послідовностей нуклеїнових кислот, що кодують FcRH5, визначається як процентний показник нуклеотидів у кандидатній послідовності, ідентичних нуклеотидам у послідовності нуклеїнових кислот, що кодує FcRH5, і такий процентний показник визначається після вирівнювання послідовностей і включення пропусків, у випадку такої необхідності, для досягнення максимального процентного показника ідентичності послідовностей. Вирівнювання для визначення процентного показника ідентичності послідовностей нуклеїнових кислот може бути досягнуто різними шляхами, відомими науці, наприклад, з використанням представленого на ринку програмного забезпечення, такого як BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). З метою даного винаходу, значення % ідентичності послідовності нуклеїнових кислот одержують із використанням комп'ютерної програми для порівняння послідовностей ALIGN-2, при цьому повний вихідний код для програми ALIGN-2 приводиться в Таблиці 1 нижче. Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 була розроблена компанією Genentech, Inc., а вихідний код представлений у Таблиці 1 нижче; даний код був наданий разом з посібником користувача в Бюро реєстрації авторських прав США, Washington D.C., 20559, де була видана реєстрація авторського права США під №TXU510087. Програма ALIGN-2 доступна для широкої публіки й надається компанією Genentech, Inc., Південне Сан-Франциско, шт. Каліфорнія, або може бути скопійована з вихідного коду, представленого в Таблиці 1 нижче. Програма ALIGN-2 для свого використання повинна бути скопійована в операційній системі UNIX, переважно UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовності встановлюються програмою ALIGN-2 і не змінюються.

У випадках, коли програма ALIGN-2 використовується для порівняння послідовностей нуклеїнових кислот, % ідентичності послідовності нуклеїнових кислот для окремої послідовності нуклеїнових кислот А щодо заданої послідовності нуклеїнових кислот В (або іншими словами: задана послідовність нуклеїнових кислот А, що включає певен % ідентичності в порівнянні із заданою послідовністю нуклеїнових кислот В) розраховується в такий спосіб:

в 100 разів менше  $W/Z$

де W є числом нуклеотидів, зазначених як ідентичні відповідності, певні програмою зіставлення послідовностей C і D ALIGN-2; Z - загальне число нуклеотидів у послідовності D. Варто мати на увазі, що довжина послідовності нуклеїнової кислоти C не дорівнює довжині послідовності нуклеїнової кислоти D, і % ідентичності послідовностей нуклеїнових кислот C і D не буде дорівнювати % ідентичності послідовності нуклеїнової кислоти D у порівнянні з C. Якщо не зазначене інше, всі значення % ідентичності зазначених тут послідовностей нуклеїнових кислот отримані відповідно до опису, наведеним у попередньому абзаці, з використанням комп'ютерної програми ALIGN-2.

В інших варіантах втілення винаходу варіанти полінуклеотидів FcRH5 представлені молекулами нуклеїнових кислот, що кодують поліпептид FcRH5, і такі молекули здатні гібридизуватися, переважно при суворих умовах гібридизації й промивання, у нуклеотидні послідовності, що кодують поліпептид FcRH5 повної довжини. Варіанти полінуклеотидів FcRH5 можуть кодуватися варіантом полінуклеотида FcRH5.

Термін «ділянка, що кодує, повної довжини» при використанні відносно нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид FcRH5, відноситься до послідовності нуклеотидів, що кодує поліпептид FcRH5 повної довжини (на прикладених фігурах вказується як ділянка між старт- і стоп-кодонами включно). Термін «ділянка, що кодує, повної довжини» при використанні відносно АЗКЦ депонованих нуклеїнових кислот відноситься до ділянки кДНК, що кодує поліпептид FcRH5, що вставлений у вектор, що спричиняється АЗКЦ (на прикладених фігурах вказується як ділянка між старт- і стоп-кодонами включно (старт- і стоп-кодони на фігурах зазначені жирним підкресленим шрифтом)).

При використанні для опису різних представлених тут поліпептидів, термін «ізолюваний» позначає поліпептид, що був ідентифікований і виділений і/або відновлений з компонента природного середовища. Забруднюючі (домішкові) компоненти в природному середовищі являють собою матеріали, які можуть перешкодити терапевтичному використанню поліпептиду, і такі матеріали можуть включати ферменти, гормони й інші білкові й небілкові розчинені речовини. У переважних варіантах втілення винаходу поліпептид будуть очищати (1) до

ступеня, достатнього для одержання, щонайменше, 15 залишків на N-кінці або внутрішній амінокислотній послідовності шляхом використання секвенатору з обертовою склянкою; або (2) до досягнення однорідності, обумовленої способом електрофореза в поліакриламідному гелі в умовах, що відновлюють і не відновлюють з використанням Кумасси синього або, переважно, сріблянки. Ізольований поліпептид включає поліпептид *in situ* у рекомбінантних клітинах, при цьому, по меншій мері, один компонент природного середовища поліпептиду FcRH5 буде відсутній. Як правило, ізольований поліпептид будуть одержувати, щонайменше, з одним етапом очищення.

«Ізольована» нуклеїнова кислота, що кодує поліпептид FcRH5, або інша нуклеїнова кислота, що кодує інший поліпептид, представлена молекулою нуклеїнової кислоти, що була ідентифікована й виділена з, щонайменше, однієї молекули-забруднювача нуклеїнової кислоти, з якої вона звичайно зв'язана в природному джерелі нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид. Молекула ізольованої нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, представлена в іншій формі або умовах, у порівнянні з формою й умовами, у яких вона зустрічається в природному середовищі. Таким чином, молекули ізольованої нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, відрізняються від молекул ізольованої нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид і перебуває в природних клітинах. Однак, молекула ізольованої нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, включає молекули ізольованої нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, які втримуються в клітинах, звичайно, що експресують поліпептид, при цьому, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти відрізняється від свого положення в хромосомі в порівнянні із природними клітинами.

Термін «контрольні послідовності» відноситься до ДНК послідовностей, необхідних для експресії функціонально зв'язаної послідовності, що кодує, в окремому організмі-хазяїні. Контрольні послідовності, що підходять для прокариот, включають, наприклад, промотор, у деяких випадках послідовності оператора, а також місце зв'язування рибосоми. Як відомо, еукаріотичні клітини використовують промотори, сигнали поліаденілірування й енхансери.

Нуклеїнова кислота «функціонально зв'язана» у тому випадку, якщо вона перебуває у функціональному взаємозв'язку з послідовністю іншої нуклеїнової кислоти. Наприклад, ДНК для передпослідовності або секреторної лідерної послідовності функціонально пов'язана із ДНК, що кодує поліпептид, у тому випадку, якщо така ДНК секретується як білок-попередник, що приймає участь у секреції поліпептиду; промотор або енхансер функціонально пов'язаний з послідовністю, що кодує, якщо він впливає на транскрипцію послідовності; центр зв'язування рибосом функціонально пов'язаний з послідовністю, що кодує, якщо він розташований таким чином, щоб полегшити трансляцію. Як правило, термін «функціонально зв'язаний» позначає, що взаємозалежні послідовності ДНК перебувають у безпосередній близькості й, у випадку секреторного лідера, перебувають поруч і у фазі зчитування. Однак необов'язково, щоб енхансери перебували поблизу друг від друга. Зв'язування супроводжується лігуванням у відповідних сайтах рестрикції. Якщо такі сайти відсутні, при дотриманні стандартних процедур використовуються синтезовані олігонуклеотидні адаптери або лінкери.

«Суворість» реакції гібридизації легко визначається фахівцем у даній області, і звичайно таке визначення складається в емпіричному обчисленні, залежно від довжини зонда, температури промивання й концентрації солі. У цілому, більш довгі зонди вимагають підвищених температур для належної гібридизації, у той час як більш короткі зонди вимагають більш низьких температур. Як правило, гібридизація залежить від здатності денатурованої ДНК піддаватися повторної гібридизації в присутності комплементарних тяжів у середовищі при температурі нижче температури плавлення. Чим вище ступінь необхідної гомологічності між зондом і піддається гібридизації послідовності, тим вище відносна температура, що може використовуватися. У результаті треба, що більше високі значення відносної температури будуть визначати більше жорсткі умови реакції, чим більше низькі значення температури. Додаткова інформація й пояснення строгості реакцій гібридизації приводиться в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

У контексті даного винаходу «суворі умови» або «умови підвищеної строгості» можуть визначатися в такий спосіб: (1) використання низького значення іонної сили й високої температури для промивання, наприклад, 0,015 М натрію хлориду/0,0015 М натрію цитрату/0,1% натрію додецил сульфату при 50 ЕК; (2) використання під час гібридизації денатуруючого агента, такого як формамід, наприклад, 50% (о/о) формаміду з 0,1% бичачим сироватковим альбуміном/0,1% Фіколл/0,1% полівінілпірролідона/50 мм буфера натрію фосфату при рН 6,5 з 750 мм натрію хлориду, 75 мм натрію цитрату при 42 ЕК; або (3) гібридизація протягом всієї ночі в розчині, що включає 50% формамід, 5×SSC (0,75 М NaCl, 0,075 М натрію цитрат), 50 мМ натрію фосфат (рН 6,8), 0,1% натрію пірофосфат, 5× розчин Денхардта, ДНК сперми лососевих, підданому впливу ультразвуком (50 мг/мл), 0,1% НДС і 10%



сульфату декстрана при 42 ЕК з 10-хвилинним промиванням при 42 ЕК в 0,2× SSC (натрію хлорид/натрію цитрат) з наступним 10-хвилинним промиванням при суворих умовах у присутності 0,1×SSC ЕДТА при 55 ЕК.

«Помірковано суворі умови» можуть включати умови, описані в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, і передбачати використання розчину для промивання й умов гібридизації (наприклад, температура, іонна сила й % НДС), що є менш суворими, ніж описані вище. Приклад помірковано суворих умов представлений інкубацією протягом ночі при 37 ЕК у розчині, що містить наступне: 20% формамід, 5×SSC (150 мм NaCl, 15 мм тринатрия цитрат), 50 мм натрію фосфат (pH 7,6), 5× розчин Денхардта, 10% декстрана сульфат і 20 мг/мл денатурованої ДНК сперми лососевих з наступним промиванням фільтрів в 1×SSC при приблизно 37-50 ЕК. Фахівець у даній області зможе коректувати температуру, іонну силу й т.д. відповідно до необхідності налаштування таких факторів, як довжина зонда й т.д.

При використанні в контексті даного винаходу, термін «мічений антигенною детермінантою» відноситься до химерного поліпептиду, що складається з поліпептиду FcRH5, або антитіла до FcRH5, злитому з « поліпептидом-тегом». Поліпептид-тег має досить залишків для утворення антигенної детермінанти антитіла, але такий поліпептид досить короткий, тому не робить впливу на активність поліпептиду, з яким він злитий. Крім того, поліпептид-тег переважно є досить унікальним, тому антитіло не бере участь у перехресній реакції з іншими антигенними детермінантами. Підходящі поліпептиди-теги, як правило, мають, щонайменше, шість амінокислотних залишків, але звичайно приблизно від 8 до 50 амінокислотних залишків (переважно приблизно від 10 до 20 амінокислотних залишків).

У контексті даного винаходу термін «активний» або «активність» відноситься до форми (-м) поліпептиду FcRH5, що зберігає біологічну й/або імунологічну активність нативного або зустрічається в природі FcRH5, при цьому «біологічна» активність відноситься до біологічної функції (інгібування або стимуляції), яка надається нативним або зустрічається в природі FcRH5, за винятком можливості індукувати вироблення антитіла до антигенного детермінанти, який володіє нативний або зустрічається в природі FcRH5; «імунологічна» активність відноситься до здатності індукувати вироблення антитіла до антигенної детермінанти, якою володіє нативний або зустрічається в природі FcRH5.

Термін «антагоніст» використовується в самому широкому своєму вмісті й включає будь-яку молекулу, що частково або повністю блокує, інгібує або нейтралізує біологічну активність нативного поліпептиду FcRH5. Подібним чином, термін «агоніст» використовується в самому широкому своєму вмісті й включає будь-яку молекулу, що імітує біологічну активність нативного поліпептиду FcRH5. Підходящі молекули агоністів або антагоністів специфічним чином включають агоністичні або антагоністичні антитіла або фрагменти антитіл, фрагменти або варіанти амінокислотної послідовності нативних поліпептидів FcRH5, пептиди, антизначенніві олігонуклеотиди, невеликі органічні молекули й т.д. Способи ідентифікації агоністів або антагоністів поліпептиду FcRH5 можуть включати контакт поліпептиду FcRH5 з кандидатною молекулою агоніста або антагоніста з наступним виміром обумовленої зміни в одній або декількох показниках біологічної активності, що звичайно властиво поліпептиду FcRH5.

Термін «очищений» позначає, що молекула присутня в зразку в концентрації, щонайменше, 95% по вазі, або, щонайменше, 98% по вазі зразка, у якому вона втримується.

«Ізольована (виділена)» молекула нуклеїнової кислоти являє собою молекулу нуклеїнової кислоти, що сепарована, щонайменше, з однієї іншої молекули нуклеїнової кислоти, з якої вона звичайно зв'язана, наприклад, у природному середовищі. Ізольована молекула нуклеїнової кислоти може додатково включати молекулу нуклеїнової кислоти, що втримується в клітинах, що експресує молекулу нуклеїнової кислоти, але така молекула нуклеїнової кислоти присутня поза хромосомами або в хромосомах, але їхнє розташування в хромосомах відрізняється від свого природного розташування.

У контексті даного винаходу термін «вектор» відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної переносити іншу нуклеїнову кислоту, з якої вона зв'язана. Один тип вектора представлений «плазмідною», тобто кільцевою двохланцюговою петлею ДНК, у яку можуть бути ліговані додаткові сегменти ДНК. Інший тип вектора представлений фаговим вектором. Ще один тип вектора представлений вірусним вектором, у якому додаткові сегменти ДНК можуть бути ліговані у вірусний геном. Певні вектори в клітині-хазяїні, в яку вони введені, здатні автономно реплікуватися (наприклад, вектори бактерій з бактеріальним походженням реплікації й епісомальні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомальні вектори ссавців) можуть бути убудовані в геном клітини-хазяїна шляхом введення в клітину-хазяїна, і такі вектори можуть реплікуватися разом з геномом хазяїна. Крім того, певні вектори здатні

регулювати експресію генів, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори зазначені в даній заявці як «рекомбінантні вектори експресії» (або просто «рекомбінантні вектори»). У цілому, вектори експресії для використання в процедурах рекомбінації ДНК часто представлені у формі плазмід. У контексті даного винаходу терміни «плазміда» і «вектор» можуть використовуватися взаємозамінним чином, оскільки плазміда є найбільше часто використовуваною формою вектора.

Терміни «полінуклеотид» і «нуклеїнова кислота» використовуються тут взаємозамінним чином і відносяться до полімерів нуклеотидів будь-якої довжини, і включають ДНК і РНК. Нуклеотиди можуть бути представлені дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифікованими нуклеотидами або основами й/або їхніми аналогами, або будь-яким субстратом, що може бути включеним у полімер за допомогою ДНК- або РНК-полімерази або в ході реакції синтезу. Полінуклеотид може складатися з модифікованих нуклеотидів, таких як метильовані нуклеотиди і їхні аналоги. У випадку наявності структурної модифікації нуклеотида, така модифікація може бути зроблена до або після складання полімеру. Послідовність нуклеотидів може бути перервана ненуклеотидними компонентами. Полінуклеотид може бути додатково модифікований після синтезу, наприклад, кон'югацією з міткою. Інші типи модифікації включають, наприклад, «кепи», заміни одного або декількох нуклеотидів, що зустрічаються в природі, відповідним аналогом, нуклеотидні модифікації, такі як, наприклад, позбавлені заряду зв'язку (наприклад, метилфосфонати, фосфотриєфіри, фосфоамідати, карбамати й т.д.) і зв'язку з певним зарядом (наприклад, фосфоротіоати, фосфородитіоати й т.д.), які включають бокові ланцюги, такі як, наприклад, ланцюги білків (наприклад, нуклеази, токсину, антитіла, сигнальні пептиди, полі-L-лізин і т.п.), інтеркаляторів (наприклад, акридин, псорален і т.п.), хелатних речовин (наприклад, метали, радіоактивні метали, бор, метали-окислювачі й т.п.), алкілюючих речовин, модифікованими зв'язками (наприклад, альфа-аномірні нуклеїнові кислоти й т.п.), а також немодифіковані форми полінуклеотида (-ів). Крім того, може бути заміщена будь-яка гідроксильна група, що звичайно є присутня у цукрах, наприклад, групами фосфоната, фосфату, з використанням захисту стандартними захисними групами або активованими для утворення додаткових зв'язків з додатковими нуклеотидами, або такі гідроксильні групи можуть бути кон'юговані із твердим або напівтвердим субстратом. Група ОН на 5'- і 3'-кінці може бути фосфорильована або заміщена амінами або органічними групами молекул з атомами вуглецю від 1 до 20. Інші гідроксили також можуть бути перетворені в стандартні захисні групи. Полінуклеотиди можуть також містити аналогічні й відомі науці форми рибози або дезоксирибози, включаючи, наприклад, 2'- О-метил-, 2'- О-алліл-, 2'-фтор- або 2'-азидорибозу, аналоги карбоциклічних сахарів, альфа-аномірні сахари, епімірні сахари, такі як арабіноза, ксилоза або ліксоза, піранозні сахари, фуранозні сахари, седогептулози, ациклічні аналоги й абазичні нуклеотидні аналоги, такі як метилприбозид. Одна або декілька фосфодієфірних зв'язків можуть бути заміщені альтернативними групами. Такі альтернативні групи включають, але не обмежуються, варіанти втілення винаходу, у яких фосфат заміщений P(O)S(«тіоат»), P(S)S(«дитіоат»), «(O)NR.суб.2 («амідат»), P(O)R, P(O)OR', CO або CH.суб.2 («формацетал»), у яких кожний R або R' представлений незалежним чином H або заміщений/не заміщений алкілом (1-20 C), і в деяких випадках містить ефір (-O-). Необов'язково, щоб всі зв'язки в полінуклеотиді були однакові. Представлений вище опис застосовний до всіх полінуклеотидів, включаючи РНК і ДНК.

У контексті даного винаходу «олігонуклеотид» відноситься до коротких, звичайно одноланцюгових, і звичайно синтезованих полінуклеотидам, які, як правило, але не обов'язково, мають у довжину менш ніж приблизно 200 нуклеотидів. Терміни «олігонуклеотид» і «полінуклеотид» не є взаємовиключними. Представлений вище опис полінуклеотидів так само й повністю застосовний до олігонуклеотидів.

Терміни «рак» і «раковий» відносяться або описують фізіологічний стан у ссавців, що звичайно характеризується неконтрольованим ростом клітин. Приклади раку включають, але не обмежуються, гематобластози або рак крові, наприклад, лімфому, лейкоз, мієломи або лімфоїдні злоякісні новоутворення, а також рак селезінки й рак лімфатичних вузлів, карциному, бластоми й саркому. Найбільш специфічні приклади раку включають В-клітинний рак, включаючи, наприклад, лімфоми високого, середнього й низького ступеня злоякісності (включаючи В-клітинні лімфоми, такі як, наприклад, В-клітинна лімфома лімфоїдної тканини слизових оболонок і неходжкинська лімфома (НХЛ), лімфома із клітин мантийної зони, лімфома Беркитта, дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лімфома маргінальної зони, дифузійна крупноклітинна лімфома, фолікулярна лімфома і лімфома Ходжкина, а також Т-клітинні лімфоми) і лейкози (включаючи вторинний лейкоз, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), такий як В-клітинний лейкоз (CD5+ В-лімфоцити), мієлолейкоз, такий як гострий мієлоїдний

лейкоз, хронічний мієлоїдний лейкоз, лімфоїдний лейкоз, такий як гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ) і мієлодисплазію), і інші гематологічні й/або В- або Т-клітинні види раку. Крім того, сюди також включають види раку інших гематопоетичних клітин, наприклад, поліморфноядерних лейкоцитів, таких як базофілів, еозинофілів, нейтрофілів і моноцитів, дендритних клітин, тромбоцитів, еритроцитів і NK-клітин. Також сюди включають наступні ракові порушення проліферації В-клітин: лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони. Походження В-клітинного раку включає наступне: В-клітинна лімфома маргінальної зони походить із В-клітин пам'яті, які перебувають у маргінальній зоні; фолікулярна лімфома і дифузійна В-крупноклітинна лімфома походять із центроцитів у світлій зоні зародкового центру; хронічний лімфоцитарний лейкоз і дрібноклітинний лімфоцитарний лейкоз походять із В 1-клітин (CD5+); лімфома із клітин мантийної зони походить із нативних В-клітин мантийної зони; лімфома Беркитта походить із центробластів у темній зоні зародкового центра. Тканіни, що включають зазначені тут гематопоетичні клітини, відносяться до «тканин гематопоетичних клітин» і включають тимус і кістковий мозок, а також тканини периферичних лімфатичних вузлів, слизову оболонку лімфоїдної тканини, наприклад, лімфоїдної тканини шлунка, мигдалин, пейєрові пляшки й апендікс, а також слизову оболонку інших лімфоїдних тканин, наприклад, слизову оболонку бронхів. Додаткові специфічні приклади таких видів раку включають плоскоклітинний рак, дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарциному легені, плоскоклітинну карциному легені, рак черевної порожнини, гепатоцелюлярний рак, рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, гліому, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак жовчного міхура, гепатому, рак молочної залози, колоректальний рак, рак товстого кишечника, карциному ендометрію або матки, карциному слинної залози, рак нирок, рак печінки, рак передміхурової залози, рак вульви, рак щитовидної залози, гепатокарциному, лейкоз і інші лімфопроліферативні порушення, а також різні типи рака голови й шиї.

Зазначений тут «В-клітинне злоякісне новоутворення» включає неходжкинську лімфому (НХЛ), включаючи низькодиференційовану/фолікулярну НХЛ, дрібноклітинну лімфоцитарну (МЛ) НХЛ, середньодиференційовану/фолікулярну НХЛ, середньодиференційовану дифузійну НХЛ, високодиференційовану лімфобластну НХЛ, високодиференційовану імунобластну НХЛ, високодиференційовану дрібноклітинну НХЛ із нерозщепленим ядром, НХЛ із масивною поразкою, лімфома із клітин мантийної зони, Снід-асоційована лімфома, макроглобулінемію Вальденстрема, неходжкинську лімфому (НХЛ), лімфоцитарну переважну лімфосаркому (ЛМЛС), дрібноклітинну лімфоцитарну лімфому (МЛЛ), хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), уповільнену НХЛ, включаючи рецидивуючу уповільнену НХЛ і стійку до ритуксимабу уповільнену НХЛ; лейкоз, який включає гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ), хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), волохато-клітинний лейкоз, хронічний мієлобластний лейкоз; лімфому клітин мантийної зони й інші гематобластози. Такі злоякісні новоутворення можуть бути піддані лікуванню антитілами, дія яких спрямована на поверхневі маркери В-клітин, такі як FcRH5. Такі захворювання піддаються лікуванню шляхом введення антитіла, дія якого спрямована на поверхневий маркер В-клітин, такий як FcRH5, і таке лікування включає введення некон'югованого («незв'язаного») антитіла або антитіла, кон'югованого із цитотоксичним агентом, як це описано в даній заявці. Подібні захворювання також можуть піддаватися лікуванню з використанням комбінованої терапії, включаючи антитіло до FcRH5 або кон'югат антитіла до FcRH 5-препарату в сполученні з іншим антитілом або кон'югатом антитіло-препарат, іншим цитотоксичним агентом, променевою терапією або іншим видом лікування, що застосовується одночасно або послідовно у вигляді серій. У стандартному способі лікування, що описаний у винаході, антитіло до FcRH5 уводиться в комбінації з антитілом до CD20, імунoglobulinом або фрагментом антитіла, що зв'язує CD20, послідовно або одночасно. Антитіло до CD20 може бути представлено незв'язаним антитілом або кон'югатом антитіло-препарат. У варіанті втілення винаходу, що передбачає використання комбінованої терапії, антитіло до FcRH5 представлено антитілом даного винаходу, і антитіло до CD20 представлено препаратом Рітуксан® (рітуксимаб).

У контексті даного винаходу термін «неходжкинська лімфома» або «НХЛ» відноситься до раку лімфатичної системи, за винятком лімфом Ходжкина. Лімфоми Ходжкина звичайно відрізняються від неходжкинських лімфом по присутності клітин Ріда-Штернберга при лімфомі Ходжкина й відсутності зазначених клітин при неходжкинських лімфом. Приклади неходжкинських лімфом, які охоплюються терміном у контексті даного винаходу, включають

будь-яку неходжкинську лімфому, яку встановлено фахівцем у даній області (наприклад, онкологом або патологом) відповідно до відомої в науці схеми класифікації, наприклад, переглянутої Європейсько-американська класифікації лімфом (REAL), яку описано в Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Див., зокрема, списки на Фіг. 11.57, 11.58 і 11.59. Більше специфічні приклади включають, але не обмежуються наступне: рецидивуюча або рефрактерна НХЛ, первинна низькодиференційована НХЛ, НХЛ стадії III/IV, НХЛ, стійка до хіміотерапії, лімфобластний лейкоз попередників В-клітин/або лімфома, дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, В-клітинний хронічний лімфоцитарний лейкоз і/або пролімфоцитарний лейкоз і/або дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, В-клітинна пролімфоцитарна лімфома, імунцитомат й/або лімфоплазмоцитарна лімфома, лімфоплазмоцитарна лімфома, В-клітинна лімфома маргінальної зони, лімфома маргінальної зони селезінки, екстранодальна лімфома MALT-типу маргінальної зони, нодальна лімфома маргінальної зони, волохато-клітинний лейкоз, плазмцитомат й/або мієлома плазмцитів, низькодиференційована/фолікулярна лімфома, середньодиференційована/фолікулярна НХЛ, лімфома із клітин мантийної зони, фолікулярний лімфома, середньодиференційована дифузійна НХЛ, дифузійна В-крупноклітинна лімфома, агресивний ступінь НХЛ (включаючи агресивну первинну НХЛ і агресивну рецидивуючу НХЛ), рецидивуюча або рефрактерна НХЛ, що виникла після трансплантації аутологічних стовбурних клітин, первинна В-крупноклітинна лімфома середостіння, первинна випотна лімфома, високодиференційована імунобластна НХЛ, високодиференційована лімфобластна НХЛ, високодиференційована дрібноклітинна НХЛ із нерозщепленим ядром, НХЛ із масивною поразкою, лімфома Беркитта, крупноклітинний гранулярний лімфоцитарний лейкоз клітин-попередників (периферичних клітин), грибоподібний мікоз і/або синдром Сезари, лімфоми шкіри, анапластична крупноклітинна лімфома, лімфангіома.

Порушення в плазмocyтах можуть призводити до неконтрольованого розподілу або розмноження клону плазмocyтів. Плазмocyти виникають із активованих В-лімфоцитів (тобто В-клітин). Кожна В-клітина виробляє унікальний рецептор, відомий як рецептор В-клітини, що перебуває на клітинній поверхні й специфічний щодо сторонньої речовини, тобто антигену. Коли рецептор В-клітини зв'язується зі своїм когнатним антигеном, клітина, що експресує рецептор, активується й повторно вступає в клітинний цикл, виробляючи багато клональних копій самої себе. Клоні визрівають у плазмocyти, які залишаються переважно в кістковому мозку й спеціалізуються на виробленні копій рецептора В-клітин, що вивільняються в кровоток у вигляді антитіл. При порушенні в плазмocyтах, плазмocyт або материнська В-клітина несуть ушкодження в геномі, що призводить до супресії або нечутливості до звичайних обмежень при розподілі клітини й/або активності. Дочірні плазмocyти, отримані з таких клітин, є злоякісними, тому що вони діляться неконтрольованим чином і/або виробляють надлишкову кількість того самого імунoglobulinу (антитіла). Найчастіше вироблюваний імунoglobulin неповний або має неправильну конформаційну структуру, що може привести до нагромадження білка (також відомого як моноклональний білок, М-білок, парапротейн або амілоїдний білок, залежно від окремого порушення) у сироватці, тканинах або органах (особливо в нирках), приводячи до дисфункції органа й/або його недостатності. Плазмocyтарні порушення включають моноклональні гамопатії невизначеної значимості (МГНО), множинну мієлому (ММ), макроглобулінемію, хворобу важких ланцюгів і системний амілоїдоз, викликаний легким ланцюгом (АЛ), і такі захворювання диференціюють на основі проліферації клону, ступеня участі кісткового мозку й типу М-білка, що експресується. Додаткові плазмocyтарні порушення представлені ізольованою плазмocyтотою, екстрамедулярною плазмocyтотою, множинними ізольованими плазмocyтотами, плазмocyтарним лейкозом, макроглобулінемією Вальденстрема, В-клітинними неходжкинськими лімфомами, В-клітинним хронічним лімфоцитарним лейкозом. Незважаючи на те, що нові імунотерапії з використанням, наприклад, рітуксимаба й алектумаба, поліпшили безрецидивну й загальну виживаність при деяких В-клітинних злоякісних новоутвореннях, було показано, що такі види терапій не ефективні в лікуванні плазмocyтарних порушень, частково через те, що антигени мішені CD20 і CD52 експресуються злоякісними клональними плазмocyтами в недостатній кількості. Таким чином, існує необхідність в ідентифікації й розробці поліпшеної терапії плазмocyтарних порушень. (Див. опубліковані заявки на патент США No. 20080166742 і 20080317745, кожна з яких включена сюди у всій своїй повноті за допомогою посилання).

Експресія FcRH5 (IRTA2) в В-клітинах, плазмocyтах і клітинах множинної мієломи (включаючи зразки клітин від пацієнтів із ММ) уже була доведена раніше (див. опубліковану заявку на патент США No. 20060251662, включену сюди у всій своїй повноті за допомогою посилання). Відповідно до цього, стосовно до схеми експресії FcRH5 у зразках множинної

мієломи, молекула являє собою чудову мішень для лікування пухлин у ссавців, включаючи плазмочитарні порушення, такі як описані тут порушення (тобто множинна мієлома), і захворювань, пов'язаних з виробленням антитіла, наприклад, алергії або аутоімунних захворювань.

«Розлад (порушення)» є будь-яким станом, якому піде на користь лікування речовиною/молекулою або способом винаходу. Цей термін включає хронічні й гострі розлади або захворювання, включаючи патологічні стани, які привертають виникнення в ссавця такого розладу. Необмежуючі приклади порушень, які можуть бути піддані лікуванню в контексті даного винаходу, включають ракові стани, такі як злоякісні й доброякісні пухлини, злоякісні лімфоїдні захворювання й стани без лейкозів, нейронні, гліальні, астроцитальні, гіпоталамічні й інші гландулярні, макрофагальні, епітеліальні, стромальні й бластоцельні порушення, а також запальні, імунологічні й інші порушення, пов'язані з ангіогенезом. Порушення також включають наступні ракові стани, такі як: порушення проліферації В-клітин/або В-клітинні пухлини, наприклад, лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони.

Терміни «порушення проліферації клітин» і «проліферативний розлад» відносяться до порушень, які пов'язані з певним ступенем патологічної проліферації клітин. В одному варіанті втілення винаходу порушення проліферації клітин представлено раком.

У контексті даного винаходу «пухлина» відноситься до всіх випадків росту й проліферації клітин новоутворення, злоякісного або доброякісного, а також всім предраківим і раковим клітинам або тканинам.

У контексті даного винаходу термін «аутоімунне захворювання» відноситься до захворювання або розладу, що виникли й що контролюються, щодо власних тканин, або органів організму, або до прояву такого захворювання, або розладу, або результуючого стану. При більшості таких аутоімунних і запальних розладів може існувати цілий ряд клінічних і лабораторних маркерів, включаючи, але не обмежуючись, гіпергаммаглобулінемію, високі рівні аутоантитіл, нагромадження комплексу антиген-антитіло в тканинах (для таких розладів ефективно лікування кортикостероїдами або імуносупресантами), а також агрегати лімфоїдних клітин в уражених тканинах. Не обмежуючись якою-небудь одною теорією відносно аутоімунного захворювання, опосередкованого В-клітинами, вважається, що В-клітини спричиняють свій патогенний ефект при аутоімунних захворюваннях у людини за допомогою множинних механізмів, включаючи вироблення аутоантитіла, утворення імунного комплексу, активацію дендритних і Т-клітин, синтез цитокінів, безпосереднє вивільнення хемокинів і забезпечення центру для ектопічного неолімфогенеза. Кожний з таких шляхів може в різному ступені брати участь у патології аутоімунних захворювань.

«Аутоімунне захворювання» може бути органоспецифічним захворюванням (тобто імунна відповідь специфічним чином спрямована проти системи органів, таких як ендокринна система, гематопоетична система, шкіра, серцево-легенева система, шлунково-кишковий тракт і печінка, нирки, щитовидна залоза, вуха, нервово-м'язова система, центральна нервова система й т.д.) або системним захворюванням, що вражає кілька систем органів (наприклад, системна червона волчанка (ВКВ), ревматоїдний артрит, поліміозит і т.п.). Такі переважні захворювання включають наступні: аутоімунні ревматичні захворювання (такі як, наприклад, ревматоїдний артрит, синдром Шегрена, склеродерма, волчанка, така як ВКВ і волчаночний нефрит, поліміозит/дерматоміозит, кріоглобулінемія, антифосфоліпідний синдром і псоріатичний артрит), аутоімунні шлунково-кишкові й печіночні розлади (такі як, наприклад, запальні захворювання кишечника (наприклад, виразковий коліт і хвороба Крона), аутоімунний гастрит і перниціозна анемія, аутоімунний гепатит, первинний біліарний цироз, первинний склерозуючий холангіт і глютеніозна хвороба), васкуліт (такі як, наприклад, ANCA-негативний васкуліт і ANCA-асоційований васкуліт, включаючи васкуліт Черджа-Стросс, синдром Вегенера й мікроскопічну ангіопатію), аутоімунні неврологічні розлади (такі як, наприклад, множинний склероз, синдром опсо-міоклонуса, міастенія гравіс, оптикомієліт Девика, хвороба Паркінсона, хвороба Альцгеймера й аутоімунні полінейропатії), порушення функції нирок (такі як, наприклад, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера й захворювання Бергера), аутоімунні дерматологічні порушення (такі як, наприклад, псоріаз, кропивниця, висипка, вульгарна пупирчатка, буллезний пемфігоїд і шкірна червона волчанка), гематологічні порушення (такі як, наприклад, тромбоцитопенічна пурпура, тромбоцитарна тромбоцитопенічна пурпура, посттрансфузійна пурпура й аутоімунна гемолітична анемія), атеросклероз, увеїт, аутоімунні захворювання слуху

(такі як, наприклад, захворювання внутрішнього вуха й втрата слуху), синдром Бехчета, синдром Рейно, трансплантація органа, аутоімунні ендокринні порушення (такі як, наприклад, викликані діабетом аутоімунні захворювання, такі як інсулінозалежний цукровий діабет (ІЗЦД), хвороба Аддісона й аутоімунне захворювання щитовидної залози (наприклад, базедова хвороба й тіреодит)). Найбільше переважно такі захворювання включають, наприклад, ревматоїдний артрит, виразковий коліт, ANCA-асоційований васкуліт, волчанку, множинний склероз, синдром Шегрена, базедову хворобу, ІЗЦД, перніціозну анемію, тіреодит і гломерулонефрит.

Специфічні приклади інших аутоімунних захворювань, які в деяких випадках охоплюють захворювання, представлені вище, включають, але не обмежуються, наступне: артрит (гострий і хронічний, ревматоїдний артрит, включаючи ювенільну форму ревматоїдного артриту й стадії, такі як ревматоїдний сінновіт, подагра й подагричний артрит, гострий імунологічний артрит, хронічний запальний артрит, дегенеративний артрит, коллаген-індукований артрит II типу, інфекційний артрит, хвороба Лайма, проліферативний артрит, псоріатичний артрит, хвороба Стілла, артрит хребта, остеоартрит, хронічний прогресуючий артрит, артрит, що деформує, хронічний домінуючий поліартрит, реактивний артрит, менопаузальний артрит, артрит зі зниженою кількістю естрогену, а також анкілозуючий спондиліт/ревматоїдний спондиліт), аутоімунне лімфопроліферативне захворювання, запальні гіперпроліферативні захворювання шкіри, псоріаз, такий як бляшечний псоріаз, каплевидний псоріаз, пустулезний псоріаз і псоріаз нігтів, атопія, включаючи атопічні захворювання, такі як сінна лихоманка й синдром Джобса, дерматит, включаючи контактний дерматит, хронічний контактний дерматит, ексфоліативний дерматит, алергійний дерматит, алергійний контактний дерматит, висипка, герпетичний дерматит, монетовидний дерматит, себорейний дерматит, неспецифічний дерматит, первинний іритативний дерматит і атопічний дерматит, х-зв'язаний гіпер-IgM синдром, алергійні внутрішні запальні захворювання, кропивниця, така як хронічна алергічна кропивниця й хронічна ідіопатична кропивниця, включаючи хронічну аутоімунну кропивницю, міозит, поліміозит/дерматомиозит, ювенільний дерматомиозит, токсичний епідермальний некроліз, склеродерма (включаючи системну склеродерму), склероз, такий як системний склероз, множинний склероз (МС), такий як спинооптичний МС, що первинно прогресує МС (ППМС) і рецидивуючий ремітуючий МС (РРМС), системний склероз, що прогресує, атеросклероз, артеріосклероз, множинний склероз, атаксичний склероз, оптичний нейромієліт (ОНМ), запальне захворювання кишечника (ЗЗК) (наприклад, хвороба Крона, опосередковувана імунною системою захворювання шлунково-кишкового тракту, запалення шлунково-кишкового тракту, коліт, такий як виразковий коліт, colitis ulcerosa, мікроскопічний коліт, коллагенозний коліт, поліпозний коліт, некротизуючий ентероколіт і трансмуральний коліт, і аутоімунне запальне захворювання кишечника), запалення кишечника, гангренозна піодермія, вузлувата еритема, первинний склерозуючий холангіт, респіраторний дистрес-синдром, включаючи респіраторний дистрес-синдром дорослих або гострий респіраторний дистрес-синдром (ARDS), менінгіт, запалення всієї або частини судинної оболонки ока, запалення райдужної оболонки ока, хоріоїдит, аутоімунний гематологічний розлад, хвороба трансплантат проти хазяїна, ангіоневротичний набряк, такий як спадкоємний ангіоневротичний набряк, ушкодження черепного нерва як при менінгіті, герпес вагітних, пемфігоїд вагітних, мошонкова сверблячка, аутоімунне передчасне порушення овуляції, раптова втрата слуху внаслідок аутоімунного стану, опосередковувані IgE захворювання, такі як анафілаксія, і алергійний і атопічний риніт, енцефаліт, такий як енцефаліт Расмуссена й лімбічний енцефаліт, і/або енцефаліт стовбура головного мозку, увеїт, такий як передній увеїт, гострий передній увеїт, гранульоматозний увеїт, негранульоматозний увеїт, факоантигенний увеїт, задній увеїт або аутоімунний увеїт, гломерулонефрит (ГН) з нефротичним синдромом і без нього, такий як гострий або хронічний гломерулонефрит, такий як первинний ГН, опосередковуваний імунною системою ГН, мембранозний ГН (мембранозна нефропатія), ідіопатичний мембранозний ГН або ідіопатична мембранозна нефропатія, мембранний або мембранозно-проліферативний ГН (МПГН), включаючи I тип і II тип, і швидко прогресуючий ГН, проліферативний нефрит, аутоімунна полігландулярна ендокринна недостатність, баланіт, включаючи обмежений плазмоклітинний баланіт, баланопостіт, кільцеподібна еритема, стійка дисхромічна еритема, мультиформна еритема, кільцеподібна гранульома, блискучий лишай, склеротичний і атрофічний лишай, простий хронічний лишай, спинулезний лишай, плоский лишай, ламеллярний іхтіоз, епідермолітичний гіперкератоз, попередраковий кератоз, гангренозна піодерма, алергійні стани й відповіді, харчові алергії, лікарські алергії, алергії на укуси комах, рідкі алергійні розлади, такі як мастоцитоз, алергічна реакція, екзема, включаючи алергічну або атопічну екзему, астеатотичну екзему, дисгідротичну екзему й везикулярну долонно-підшовну екзему, астму,

таку як *asthma bronchiale*, бронхіальна астма й аутоімунна астма, алергійна астма й дитяча астма, стани, у які залучена інфільтрація Т-клітин і хронічні запальні відповіді, імунні реакції проти чужорідних антигенів, таких як фетальні групи крові А-В-О у процесі вагітності, хронічне запальне захворювання легенів, порушення адгезії лейкоцитів, волчанку, включаючи

5 волчаночний нефрит, волчаночний церебрит, дитячу волчанку, позаниркову волчанку, екстраренальну волчанку, дискоїдну волчанку й дискоїдну червону волчанку, волчаночну алопецію, ВКВ, таку як шкірна ВКВ або підгостра шкірна ВКВ, неонатальний волчаночний синдром (НВС) і диссемінірована червона волчанка, юнацький цукровий діабет (I типу), включаючи дитячий ІЗЦД, цукровий діабет дорослих (діабет II типу), аутоімунний діабет,

10 ідіопатичний нецукровий діабет, діабетичну ретинопатію, діабетичну нефропатію, діабетичну коліт, діабетичну поразку великих артерій, імунну відповідь, асоційовану з гострою й уповільненою гіперчутливістю, що опосередкована цитокінами й Т-лімфоцитами, туберкульоз, саркоїдоз, гранульоматоз, у тому числі лімфоматоїдний гранульоматоз, агранулоцитоз, васкуліти (включаючи васкуліт, васкуліт великих судин, у тому числі ревматичну поліміалгію й гігантоклітинний артеріїт (Такаясу), васкуліт судин середнього калібру (у тому числі хвороба

15 Кавасаки й вузликовий поліартеріїт/вузликовий періартеріїт), імуноваскуліт, васкуліт у ЦНС, шкірний васкуліт, васкуліт при гіперчутливості, некротизуючий васкуліт, такий як системний некротизуючий васкуліт і асоційований з ANCA васкуліт, такий як васкуліт або синдром Черджа-Стросс (CSS) і асоційований з ANCA васкуліт судин малого калібру, гранульоматоз Вегенера й мікроскопічний поліартеріїт), скроневий артеріїт, апластичну анемію, аутоімунну апластичну анемію, Кумбс-позитивну анемію, анемію Діамонда-Блекфана, гемолітичну анемію або імунну гемолітичну анемію, у тому числі аутоімунну гемолітичну анемію (ІУГА), перніціозну анемію (анеміа перніціозна), хворобу Аддісона, дійсна еритроцитарна анемія або аплазія (PRCA), дефіцит фактору VIII, гемофілію А, аутоімунну(і) нейтропенію(і), цитопенії, такі як панцитопенія,

25 лейкопенія, захворювання, у які залучений діapedез лейкоцитів, запальні порушення в ЦНС, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, синдром множинної поразки органів, таких як вторинні синдроми при септицемії, травмі або геморагії, захворювання, опосередковувані комплексами антиген-антитіло, захворювання, пов'язане з антитілами проти клубочкової базальної мембрани, антифосфоліпідний синдром, моторний неврит, алергійний неврит,

30 хвороба/синдром Бехчета, синдром Кастельмана, синдром Гудпасчера, синдром Рейно, синдром Шегрена, синдром Стивенса-Джонсона, пемфігоїд, такий як буллезний пемфігоїд і шкірний пемфігоїд, пемфігус, у тому числі звичайний пемфігус, пемфігус шкіри, листоподібний пемфігус, пемфігоїд слизової оболонки і еритематозний пемфігоїд, уроджений буллезний епідермоліз, очне запалення, переважно алергійне очне запалення, таке як алергійний кон'юнктивіт, лінійний IgA дерматоз, запалення кон'юнктиви, викликане аутоімунним захворюванням, аутоімунні поліендокринопатії, хвороба або синдром Рейтера, теплове ушкодження внаслідок аутоімунного стану, прееклампсію, розлад, викликаний імунними

35 комплексами, такими як імунокомплексний нефрит, опосередковуваний антитілами нефрит, нейрозапальні розлади, поліневропатії, хронічну невропатію, таку як IgM-поліневропатії або IgM-опосередкована невропатія, тромбоцитопенію (наприклад, така як розвивається в пацієнтів з інфарктом міокарда), у тому числі тромботична тромбоцитопенічна пурпура (ТТП), посттрансфузійна пурпура (ПТП), індуковану гепаріном тромбоцитопенію й аутоімунну або імунноопосередковану тромбоцитопенію, у тому числі, наприклад, ідіопатичну тромбоцитопенічну пурпуру (ІТП), включаючи хронічну або гостру ІТП, склерит, такий як ідіопатичний кератосклерит, епісклерит, аутоімунне захворювання яєчок і яєчників, у тому числі аутоімунний орхит і оофорит, первинний гіпотиреоз, гіпаратиреоз, аутоімунні ендокринні захворювання, у тому числі тиреоїдит, такий як аутоімунний тиреоїдит, хвороба Хашимото, хронічний тиреоїдит (тиреоїдит Хашимото) або підгострий тиреоїдит, аутоімунне захворювання щитовидної залози, ідіопатичний гіпотиреоз, хвороба Грейвса, хвороба очей Грейвса

50 (офтальмопатія або викликана захворюванням щитовидної залози офтальмопатія), полігландулярні синдроми, такі як аутоімунні полігландулярні синдроми, наприклад, I типу (або полігландулярні ендокринопатичні синдроми), паранеопластичні синдроми, у тім числі неврологічні паранеопластичні синдроми, такі як міастенічний синдром Ламберта-Ітона або синдром Ітона-Ламберта, синдром «негнучкої людини» або «негнучкого суб'єкта», енцефаломієліт, такий як алергійний енцефаломієліт або енцефаломієліт *allergica* і експериментальний алергійний енцефаломієліт (ЕАЕ), міастенію гравіс, таку як асоційована з тімomoю міастенія гравіс, церебеллярну дегенерацію, нейроміотонію, опсиклонус або опсиклонус-міоклонус синдром (ОМС), і сенсорну невропатію, багатоопосередковану моторну невропатію, синдром Шихана, аутоімунний гепатит, хронічний гепатит, волчаночний гепатит,

60 гігантоклітинний гепатит, хронічний активний гепатит або аутоімунний хронічний активний

гепатит, пневмоніт, такий як лімфоїдний інтерстиціальний пневмоніт (ЛІПНУВ), облітеруючий бронхіоліт (не залежний від трансплантата) на противагу НСІП, синдром Гійена-Барре, хвороба Бергера ( Ig-нефропатія), ідіопатичну Ig-нефропатію, лінійний Ig-дерматоз, гострий лихоманковий нейтрофільний дерматоз, пвдрогівковий пустулезний дерматоз, минуций

5 акантолітичний дерматоз, цироз, такий як первинний білліарний цироз і пневмоцироз, синдром аутоімунної ентеропатії, целіацію або глютеїнову хвороба, спру-целіацію (глютеїнову ентеропатію), рефрактерний спру, ідіопатичний спру, кріоглобулінемію, таку як змішана кріоглобулінемія, бічний аміотрофічний склероз (АЛС; хвороба Лу Герінга), захворювання коронарних артерій, аутоімунне захворювання вуха, таке як аутоімунне захворювання

10 внутрішнього вуха (АІЗВУ), аутоімунну втрату слуху, поліхондрит, такий як рефрактерний або рецидивуючий, або поворотний поліхондрит, легенево-альвеолярний протеїноз, синдром Когана/несифілітичний інтерстиціальний кератит, параліч Белла, хвороба/синдром Свиту, аутоімунну розацею, біль, асоційований з лишаєм, що оперізує, амілоїдоз, незлоякісний лімфоцитоз, первинний лімфоцитоз, що включає моноклональний В- клітинний лімфоцитоз

15 (наприклад, доброякісну моноклональну гамопатію й моноклональну гамопатію неясного значення, МГНЗ), периферичну невропатію, паранеопластичний синдром, каналопатії, такі як епілепсія, мігрень, аритмія, м'язові розлади, глухота, сліпота, пароксизмальний параліч, і каналопатії ЦНС, аутизм, запальну міопатію, осередковий або сегментний, або осередковий сегментний гломерулосклероз (ОСГС), ендокринну офтальмопатію, увеоретиніт, хоріоретиніт,

20 аутоімунне гепатологічний розлад, фіброміалгію, множинну ендокринну недостатність, синдром Шмідта, запалення надниркових залоз, атрофію шлунка, пресенільну деменцію, демієлінізуючі захворювання, такі як аутоімунні демієлінізуючі захворювання й хронічна запальна демієлінізуюча поліневропатія, синдром Дресслера, осередкову алопецію, синдром CREST (кальциноз, синдром Рейно, порушення моторики стравоходу, склеродактилія й телеангіектазія), чоловіча й жіноча аутоімунна безплідність, наприклад, внаслідок наявності

25 антитіл до сперматозоїдів, змішане захворювання сполучної тканини, хвороба Чагаса, ревматичну лихоманку, звичний викидень, альвеоліт у сільськогосподарських робітників, поліморфну еритему, посткардіотомічний синдром, синдром Кушинга, легенеvu алергію птахоловів, алергійний гранульоматозний ангіїт, доброякісний лімфоцитарний ангіїт, синдром

30 Альпорта, альвеоліт, такий як алергійний і фіброзуючий альвеоліт, інтерстиціальне захворювання легені, трансфузійну реакцію, лепру, малярію, паразитарні захворювання, такі як лейшманіоз, кіпаносоміоз, шистосомоз, аскаридоз, аспергілез, синдром Самптера, синдром Каплана, денге, ендокардіт, ендоміокардіальний фіброз, дифузійний інтерстиціальний фіброз легенів, інтерстиціальний фіброз легенів, фіброзуючий медиастиніт, фіброз легенів,

35 ідіопатичний фіброз легенів, кістозний фіброз, ендокталіт, піднесену стійку еритему, гемолітичну хворобу немовлят, еозинофільний фасциїт, синдром Шультмана, синдром Фелті, філаріоз, циклїт, такий як хронічний циклїт, гетерохронічний циклїт, іридоциклїт (гострий або хронічний) або циклїт Фуксу, пурпура Геноха-Шенлейна, інфекцію вірусом імунодефіциту людини (ВІЧ), ТКІН, синдром набутого імундефіциту (СНІД), інфекцію еховірусом, сепсис

40 (синдром системної запальної відповіді (ССЗВ)), ендотоксемію, панкреатит, тіреотоксикоз, інфекцію парвовірусом, інфекцію вірусом краснухи, поствакцинальні синдроми, інфекцію вродженою краснухою, інфекцію вірусом Епштейна-Барра, інфекційний паротит, синдром Еванса, аутоімунну гонадну недостатність, хорею Сіденгама, постстрептококковий нефрит, облітеруючий тромбангіїт, тіреотоксикоз, сухотку спинного мозку, хоріоїдіт, гігантоклітинну

45 поліміалгію, хронічний пневмоніт з гіперчутливістю, кон'юнктивіт, такий як весняний катар, сухий кератокон'юнктивіт і епідемічний кератокон'юнктивіт, ідіопатичний нефритичний синдром, нефропатію з мінімальними змінами, доброякісне сімейне ушкодження й ушкодження при ішемії-реперфузії, реперфузію органів при трансплантації, аутоімунну реакцію в сітківці, запалення суглоба, бронхіт, хронічне обструктивне захворювання повітряних/шляхів/легенів,

50 силікоз, афти, афтозний стоматит, артеріосклеротичні розлади (церебрально-судинна недостатність), такі як артеріосклеротична енцефалопатія й артеріосклеротична ретинопатія, асперматогенез, аутоімунний гемоліз, хвороба Бека, кріоглобулінемію, контрактура Дююїтрена, факоанафілактичний ендокталіт, алергійний ентерит, вузлувата лепрозна еритема, ідіопатичний параліч лицьового нерва, синдром хронічної втоми, ревматичну лихоманку,

55 хворобу Хеммена-Річа, сенсоневральну втрату слуху, пароксизмальну гемоглобінурію, гіпогонадізм, регіонарний ілеїт, лейкопенію, інфекційний мононуклеоз, поперечний мієліт, первинну ідіопатичну мікседему, нефроз, симпатичну офтальмію, гранульоматозний орхіт, панкреатит, гострий полірадикуліт, гангренозну піодермію, тіреоїдіт Кервена, придбану атрофію селезінки, незлоякісну тімому, лімфофоллікулярний тиміт, витіліго,синдром токсичного шоку,

60 харчове отруєння, стани, що утягують інфільтрацію Т-клітин, дефект адгезії лейкоцитів, імунні



відповіді, асоційовані з гострою й уповільненою гіперчутливістю, опосередкованої цитокінами й Т-лімфоцитами, захворювання, що утягують діapedез лейкоцитів, синдром поліорганної поразки, що опосередковувати комплексами антиген-антитіло захворювання, захворювання, спрямовані проти базальної мембрани клубочків, аутоімунні поліендокринопатії, оофорит, первинну мікседему, аутоімунний атрофічний гастрит, симпатичну офтальмію, ревматичні захворювання, змішане захворювання сполучної тканини, нефротичний синдром, інсуліт, поліендокринну недостатність, аутоімунні полігландулярні синдроми, включаючи полігландулярний синдром I типу, ідіопатичний гіпопаратиреоз дорослих (ІГАД), кардіоміопатію, таку як кардіоміопатія з ділатациєю, здобутий буллезний епідермоліз (ПБЕ), гемохромацитоз, міокардит, нефротичний синдром, первинний склерозуючий холангіт, гнійний або негнійний синусит, гострий або хронічний синусит, синусит ґратчастої кістки, лобової кістки, верхньої щелепи або клиноподібної кістки, алергійний синусит, розлад, пов'язаний з еозинофілами, такий як еозінофілія, еозінофілія з інфільтрацією в легені, синдром еозінофілії-міалгії, синдром Леффлера, хронічну еозінофілну пневмонію, тропічну легенеvu еозінофілію, бронхолегочний аспергілез, аспергіллому або утримуючі еозінофіли гранульоми, анафілаксію, спонділоартропатії, серонегативний спонділоартрит, поліендокринне аутоімунне захворювання, склерозируючий холангіт, хронічний шкірно-слизовий кандидоз склери й епісклери, синдром Брутона, транзиторну гамаглобулінемію немовлят, синдром Віскотта-Олдрича, синдром атаксії-телеангіктазії, ангіектазію, аутоімунні порушення, асоційовані з коллагеновими захворюваннями, ревматизм, такий як хронічний артроревматизм, лімфаденіт, зниження відповіді кров'яного тиску, судинну дисфункцію, тихорецьке ушкодження, серцево-судинну ішемію, гіперальгезію, ниркову ішемію, церебральну ішемію й захворювання, що супроводжує васкуляризація, алергійні розлади, пов'язані з гіперчутливістю, гломерулонефрит, реперфузійне ушкодження, ішемічне реперфузійний розлад, реперфузійне ушкодження міокарда й інших тканин, лімфоматозний трахеобронхіт, запальні дерматози, дерматози з гострими запальними компонентами, поліорганну недостатність, бульбозні захворювання, нирковий кортикальний некроз, гострий гнійний менінгіт або інші запальні розлади центральної нервової системи, окулярні й орбітальні запальні розлади, синдроми, асоційовані із трансфузією гранулоцитів, індуковану цитокінами токсичність, нарколепсію, гостре важке запалення, хронічне тяжковиліковне запалення, пієліт, ендартеріальну гіперплазію, пептичну виразку, вальвуліт і ендометріоз. Такі захворювання піддаються лікуванню шляхом введення антитіла, що зв'язується з поверхневим маркером В-клітин, таким як FcRH5, і таке лікування включає введення некон'югованого («незв'язаного») антитіла або антитіла, кон'югованого із цитотоксичним агентом, як це описано в даній заявці. Подібні захворювання також можуть піддаватися лікуванню з використанням комбінованої терапії, включаючи антитіло до FcRH5 або кон'югат антитіла до FcRH 5-препарату в сполученні з іншим антитілом або кон'югатом антитіло-препарат, іншим цитотоксичним агентом, променевою терапією або іншим видом лікування, що застосовано одночасно або послідовно у вигляді серій.

«Лікування» або «ослаблення симптомів» відноситься до терапевтичного лікування й профілактичним або превентивним мірам, зокрема, до запобігання або вповільнення (зниження) окремого патологічного стану або порушення. Суб'єкти, що потребують у лікуванні, включають суб'єкти із уже наявним розладом, а також суб'єкти, схильні до наявності такого розладу, або суб'єкти, у яких такий розлад повинен бути відвернен. Суб'єкт або ссавець був підданий успішному «лікуванню» раку з експресією поліпептиду FcRH5, якщо, після одержання терапевтичної кількості антитіла до FcRH5 у відповідності зі способами даного винаходу, у пацієнта відзначається відмітне й/або вимірюване зниження або відсутність одного з наступних явищ: зниження кількості ракових клітин або відсутність ракових клітин; зниження розміру пухлини; інгібування (тобто вповільнення до деякої міри й, переважно, зупинка) інфільтрації ракових клітин у периферичні органи, включаючи поширення раку в м'які тканини й кістку; інгібування (тобто вповільнення до деякої міри й, переважно, зупинка) метастазів пухлини; інгібування, до деякої міри, росту пухлини; і/або ослаблення до деякої міри одного або декількох симптомів, асоційованих з окремим видом раку; зниження смертності й захворюваності, а також поліпшення якості життя. При запобіганні росту й/або загибелі існуючих ракових клітин з використанням антитіла до FcRH5, такі явища можуть бути цитостатичними й/або цитотоксичними. Зниження подібних ознак або симптомів також може відчуватися пацієнтом.

Зазначені вище параметри для оцінки успішного лікування й поліпшення стану захворювання легко вимірюються з використанням стандартних процедур, знайомих докторові. Для лікування раку може бути обмірювана ефективність, наприклад, шляхом оцінки часу до прогресування захворювання (ЧДП) і/або визначення клінічної відповіді (КВ). Метастази можуть бути визначені в ході тестів визначення стадійності захворювання й сцинтиграфії кістки й

дослідження кістки на вміст кальцію й інших ферментів для визначення поширення метастаз у кістці. Для аналізу метастаз у тазі й області лімфатичних вузлів може проводитися КТ. Для відстеження метастазів у легенях і печінки використовуються рентгенографія грудної клітини й вимір рівнів печіночних ферментів, відповідно. Інші стандартні способи моніторингу захворювання включають трансректальну ультрасонографію (TRUS) і трансректальну аспираційну біопсію (TRNB).

При раку сечового міхура, що є найбільш локалізованим раком, способи визначення прогресування захворювання включають цитологічний аналіз сечі шляхом цистоскопії, моніторинг наявності крові в сечі, візуалізацію уротеліального тракту ультразвуком або внутрішньовенну пієлограму, комп'ютерну томографію (КТ) і магнітно-резонансну томографію (МРТ). Наявність дистантних метастазів може бути оцінене з використанням КТ черевної порожнини, рентгенографії органів грудної клітини або радіонуклідної візуалізації кістяка.

«Хронічне» введення відноситься до введення агента (-ів) безперервним чином, на відміну від гострого режиму введення, для підтримки первинного терапевтичного ефекту (активності) протягом тривалого періоду часу. «Переривчасте» введення здійснюється тимчасовим чином з перервами, але найчастіше має принцип циклічності.

«Індивідуум» представлений хребетною твариною. У певних варіантах втілення винаходу хребетна тварина представлена ссавцем. Ссавці включають, але не обмежуються, сільськогосподарських тварин (наприклад, корів), використовуваних у спорті тварин, свійських тварин (таких як кішки, собаки й коні), приматів, мишей і пацюків. У певних варіантах втілення винаходу ссавець представлений людиною.

З метою лікування або зниження симптомів рака термін «ссавець» відноситься до будь-якої тварини, класифікованій як ссавець, включаючи людини, домашніх і сільськогосподарських тварин, тварин, що використовують у спорті й із зоопарку, наприклад, собак, кішок, рогату худобу, коней, овець, свиней, кіз, кроликів і т.п. Ссавці переважно представлені людиною.

Введення «у комбінації з» одним або декількома додатковими терапевтичними агентами включає одночасне (супутнє) і послідовне введення в будь-якому порядку.

У контексті даного винаходу «носії» включають фармацевтично прийнятні носії, допоміжні речовини або стабілізатори, що є нетоксичними для клітини або ссавця, які піддані впливу в зазначених дозах і концентраціях. Часто фізіологічно прийнятний носій представлений забуференим розчином на основі води. Приклади фізіологічно прийнятних носіїв включають наступні: буфери, такі як фосфатний, цитратний і інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту; низькомолекулярний поліпептид (менш ніж приблизно 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпірролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди й інші вуглеводи, включаючи глюкозу, маннозу або декстрини; хелатоутворюючі агенти, такі як ЕДТА; цукрові спирти, такі як маннітол або сорбітол; сольоутворюючі противоіони, такі як натрій; і/або неіонні сурфактанти, такі як ТВІН®, поліетіленгліколь (ПЕГ) і ПЛЮРОНИК®.

Під «твердою фазою» або «твердим субстратом» розуміють неводну матрицю, до якої може приєднатися або природи антитіло по даному винаході. Приклади твердих фаз, що використані у тексті даної заявки, включають фази, утворені повністю або частково зі скла (наприклад, скла з контрольованим розміром пор), полісахаридів (наприклад, агарози), поліакриламідів, полістирену, полівінілового спирту й силіконів. У певних варіантах втілення винаходу, залежно від контексту, тверда фаза може складатися з лунки планшета для аналізу, в інші - зі стовпчика для очищення (наприклад, стовпчика для афінної хроматографії). Цей термін також включає переривчасту тверду фазу дискретних часток, описану наприклад, у патенті США No. 4275149.

«Ліпосома» являє собою невеликий пухирець, що складається з різного типу ліпідів, фосфоліпідів і/або сурфактанта, і може використовуватися для доставки препарату (наприклад, антитіла до FcRH5) в організмі ссавця. Компоненти ліпосоми звичайно розміщуються у вигляді двох шарів, подібно розміщенню ліпідів у біологічній мембрані.

«Невелика молекула» або «невелика» органічна молекула визначається тут як молекула з молекулярною масою нижче приблизно 500 дальтон.

«Індивідуум», «суб'єкт» або «пацієнт» представлений хребетною твариною. У певних варіантах втілення винаходу хребетна тварина представлена ссавцем. Ссавці включають, але не обмежуються, сільськогосподарські тварини (наприклад, корови), тварин, що використовують у спорті, свійських тварин (таких як кішки, собаки й коні), приматів, мишей і пацюків. У певних варіантах втілення винаходу ссавець представлений людиною.

Термін «фармацевтична композиція» відноситься до композиції, форма якої передбачає наявність біологічної активності активної діючої речовини, і така композиція не містить яких-

небудь додаткових компонентів, що є неприпустимо токсичними для суб'єкта, якому вводять композицію. Така композиція може бути стерильною.

«Стерильна» композиція є асептичною, тобто не містить яких-небудь живих мікроорганізмів і їхніх спор.

5 «Ефективна кількість» антитіла, як це зазначено в даній заявці, є кількістю, ефективною для здійснення окремої поставленої мети. «Ефективна кількість» може бути визначена емпіричним шляхом і стандартним чином щодо окремої мети.

Термін «терапевтично ефективна кількість» відноситься до кількості антитіла або іншого препарату, ефективного в «лікуванні» захворювання або розладу в суб'єкта або ссавця. У випадку раку терапевтично ефективна кількість препарату може знизити кількість ракових клітин, знизити розмір пухлини, інгібувати (тобто сповільнювати до деякої міри й переважно зупиняти) інфільтрацію ракових клітин у периферичні органи, інгібувати (тобто сповільнювати до деякої міри й переважно зупиняти) метастази пухлини, інгібувати, до деякої міри, ріст пухлини, і/або до деякої міри знижувати один або кілька симптомів, асоційованих з раком. Див. 15 представлене тут визначення терміна «лікування». При запобіганні росту й/або загибелі існуючих ракових клітин з використанням препарату, такі явища можуть бути цитостатичними й/або цитотоксичними. «Профілактично ефективна кількість» відноситься до кількості, ефективною в певних дозах протягом певних періодів часу й необхідної для досягнення необхідного профілактичного результату. Звичайно, але не обов'язково, профілактично ефективна кількість буде менше терапевтично ефективною кількості, оскільки профілактична доза використовується в суб'єктів до або на ранніх стадіях захворювання.

«Кількість, інгібуюча ріст» відноситься до кількості антитіла до FcRH5, здатного інгібувати ріст клітини, особливо пухлини, наприклад, ракової клітини, в умовах *in vitro* або *in vivo*. «Кількість антитіла до FcRH5, інгібуюча ріст» з метою інгібування росту клітин новоутворення 25 може бути визначена емпіричним шляхом або стандартним чином.

«Цитотоксична кількість» антитіла до FcRH5 являє собою кількість, здатну викликати руйнування клітини, особливо пухлини, наприклад, ракової клітини, в умовах *in vitro* або *in vivo*. «Цитотоксичну кількість» антитіла до FcRH5 з метою інгібування росту клітин новоутворення може бути визначено емпіричним шляхом або стандартним чином.

30 «Клітина, що експресує FcRH5», являє собою клітину, що експресує ендogenous або трансфіційований поліпептид FcRH5 на поверхні клітини або в секретованій формі. «Рак з експресією FcRH5» являє собою рак із присутністю поліпептиду FcRH5 на клітинній поверхні або рак, що характеризується виробленням і секрецією поліпептиду FcRH5. У деяких випадках, при «раку з експресією FcRH5» відзначаються достатні рівні поліпептиду FcRH5 на поверхні 35 клітин, таким чином, антитіло до FcRH5 може зв'язуватися з FcRH5, маючи терапевтичний ефект щодо раку. В іншому варіанті втілення винаходу, при «раку з експресією FcRH5» відзначаються достатні рівні вироблення й секреції поліпептиду FcRH5, таким чином, антитіло до FcRH5 може зв'язуватися з FcRH5, маючи терапевтичний ефект щодо раку. Що стосується останнього, антагоніст може бути представлений антисенсним олігонуклеотидом, що знижує, 40 інгібує або запобігає виробленню й секрецію секретуємого поліпептиду FcRH5 пухлинними клітинами. Рак з «гіперекспресією» поліпептиду FcRH5 являє собою рак, що характеризується досить високими рівнями поліпептиду FcRH5 на поверхні клітин або виробленням і секрецією поліпептиду FcRH5 у порівнянні з нераковими клітинами тканини цього ж типу. Така гіперекспресія може бути викликана ампліфікацією гена або підвищенням транскрипції або 45 трансляції. Гіперекспресія поліпептиду FcRH5 може визначатися в аналізі ідентифікації або прогностичному аналізі шляхом оцінки підвищених рівнів білка FcRH5, присутнього на поверхні клітини, або, що секретується клітиною (наприклад, за допомогою імуногістохімічного аналізу з використанням антитіл до FcRH5, отриманих щодо ізолюваного поліпептиду FcRH5; такий поліпептид може бути отриманий з використанням способів рекомбінації ДНК із ізолюваної 50 нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид FcRH5; за допомогою FACS-аналізу й т.п.). З іншої сторони або, крім того, рівні нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид FcRH5, або рівень мРНК у клітині може бути обмірюваний, наприклад, за допомогою флуоресціюючої гібридизації *in situ* з використанням зонда на основі нуклеїнової кислоти, що відповідає нуклеїнової кислоти, що кодує FcRH5, або комплементу (FISH; див. WO98/45479, опублікований у жовтні 1998 р.), 55 саузерн-блоттингу, нозерн-блоттингу або в ході полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), наприклад, кількісної ПЛР у режимі реального часу (ПЛР-РЧ). Гіперекспресія поліпептиду FcRH5 також може бути визначена шляхом виміру антигену, що слущується в біологічній рідині, такий як сироватка, наприклад, з використанням аналізів на основі антитіл (див. також, наприклад, патент США No. 4933294, виданий 12 червня 1990 р.; WO91/05264, опублікований 60 18 квітня 1991 р.; патент США No. 5401638, виданий 28 березня 1995 р.; і Sias et al., J. Immunol.

Methods 132:73-80 (1990)). Крім зазначених вище аналізів, фахівцям в даній області доступні й інші аналізи *in vivo*. Наприклад, клітини в організмі пацієнта можуть бути піддані впливу антитіла, що у деяких випадках може бути мічено обумовленою міткою, наприклад, радіоактивним ізотопом, і зв'язування антитіла із клітинами пацієнта може бути оцінено, наприклад, шляхом зовнішнього сканування на предмет радіоактивності або аналізу матеріалу біопсії, узятим у пацієнта перед впливом антитіла.

У контексті даного винаходу термін «імуноадгезин» позначає схожі на антитіло молекули, які сполучають у собі специфічність зв'язування гетерологічного білка («адгезина») з ефекторними функціями константних доменів імуноглобуліну. У структурному аспекті імуноадгезини складаються зі злитої амінокислотної послідовності з необхідною специфічністю зв'язування, що відрізняється від властивості розпізнавання антигену, ділянки зв'язування антигену (тобто є «гетерологічною») і послідовності константного домену імуноглобуліну. Ділянка адгезину в молекулі імуноглобуліну звичайно являє собою прилягаючу амінокислотну послідовність, що складається, щонайменше, з ділянки зв'язування рецептора або ліганда. Послідовність константного домену імуноглобуліну в імуноадгезині може бути отримана з будь-якого імуноглобуліну, наприклад, підтипів IgG-1, IgG-2, IgG-3 або IgG-4, IgA (включаючи IgA-1 і IgA-2), IgE, IgD або IgM.

Термін «мітка» у контексті даного винаходу відноситься до обумовленого сполуки або композиції, що кон'югована прямим або непрямым чином з антитілом з утворенням «міченого» антитіла. Мітка може бути обумовленою сама по собі (наприклад, радіоізотопні мітки або флуоресцентні мітки) або, у випадку ферментативної мітки, може каталізувати хімічну зміну сполуки субстрату або композиції, яку можна визначити.

Термін «цитотоксичний агент» у контексті даного винаходу відноситься до речовини, що інгібує або запобігає функції клітин і/або викликає деструкцію клітин. Термін включає радіоактивні ізотопи (наприклад, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> і радіоактивні ізотопи Lu), препарати хіміотерапії, наприклад, метотрексат, адриаміцин, алкалоїди барвінку (вінкрістин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин С, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші вставні агенти, ферменти і їхні фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти, антибіотики й токсини, такі як невеликі молекули токсинів або ферментативно активні токсини бактерій, грибів, рослин або тварин, включаючи їхні фрагменти й/або варіанти, а також різні протипухлинні або протиракові препарати, представлені нижче. Інші цитотоксичні агенти описані нижче. Протипухлинний агент викликає деструкцію пухлинних клітин.

«Токсин» являє собою будь-яку речовину, здатну робити руйнуючий ефект на ріст або проліферацію клітини.

«Препарат хіміотерапії» являє собою хімічну сполуку, що використовують в лікуванні раку, поза залежністю від механізму дії. Приклади препаратів хіміотерапії включають хімічну сполуку, що використовують в лікуванні раку. Приклади препаратів хіміотерапії включають наступні: тіотепу й ЦИТОКСАН® циклофосфамід; алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азирідини, такі як бензодопа, карбоксон, метуредопа й уредопа; етіленіміни й метиламеламіни, включаючи алтретамін, триетіленмеламін, триетіленфосфорамід, триетіленіофосфорамід і триметилломеламін; ацетогеніни (особливо буллатацин і буллатацінон); каптотецин (включаючи синтетичний аналог топотекану); бріостатин; каллістатин; CC-1065 (включаючи синтетичні аналоги адозелесин, карцелесин і бізелесин); криптофіцини (зокрема, криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин; дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкреатистатин; саркодиктин; спонгістатин; азотисті іприти, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, мехлоретаміна оксид гідрохлорид, мелфалан, новембіксін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урамустин; нітризосечовина, наприклад, кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімустин; антибіотики, такі як ендійнові антибіотики (наприклад, каліхіміцин, зокрема, каліхіміцин гама II і каліхіміцин омега II (див., наприклад, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динеміцин, включаючи динеміцин А; біфосфонати, такі як клодронат; еспераміцин; а також неокарциностатина хромофор і родинні хромофори антибіотика ендійнового ряду хромопротеїну), аклаціномізини, актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карміноміцин, карцинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, АДРІАМІЦИН® доксорубіцин (включаючи морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, пірроліно-доксорубіцин і дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцелломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенолова кислота, ногаламіцин, олівоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин,

стрептозоцин, туберцидін, убенімекс, зіностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуринові аналоги, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідина, такі як анцитабін, азацитідин, 6-азаурідин, кармофур, цитарабін, дидезоксіурідин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксурідин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолон пропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; протівоадреналінові препарати, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; компенсатор фолієвої кислоти, такий як фролінова кислота; ацеглатон; алдофосфаміда глікозид; амінолевуленова кислота; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бізантрен; едатраксат; дефофамін; демеколхін; діазихон; елфорнітин; елліптинія ацетат; епотілон; етоглуцид; галію нітрат; гідроксисечовина; лентінан; лонідаїнін; майтансіноїди, такі як майтансин і анзатоміцини; мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітраерін; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; лозоксантрон; подофіллінова кислота; 2-етілгідразид; прокарбазин; PSK® полісахаридний комплекс (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; різоксин; сізофіран; спірогерманій; тенуазонова кислота; тріазихон; 2,2',2"-трихлоретіламін; трихотецени (особливо Т-2 токсин, верракурін А, рорідин А і ангвідін); уретан; віндесин; дакарбазин; манномустин; мітобронітол; мтолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид («Ара-С»); циклофосфамід; тіотепа; таксоїди, наприклад, ТАКСОЛ® паклітаксел (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), АБРАКСАН™ без хромофора, композиція з наночасток паклітаксела з доданим у ході рекомбінації альбуміном (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) і ТАКСОТЕР® доцетаксел (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; ГЕМЗАР® гемцитабін; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; платинум; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкрістин; НАВЕЛБІН® вінорелбін; новантрон; теніпозид; едатрексат; дауноміцин; аміноптерин; кселода; ібандронат; іринотекан (Camptosar, CPT-11) (включаючи режим лікування іринотеканом з 5-ФУ й лейковорином); інгібітор топоізомерази RFS 2000; дифторметиломітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноїва кислота; капецитабін; комбрестатин; БЕЛКАДЕ; Ревлімід® (леналідомід); лейковорин (LV); оксалиплатин, включаючи режим лікування оксалиплатином (ФОЛФОКС); інгібітори РКС-Альфа, Raf, H-Ras, EGFR (наприклад, ерлотиніб (Тарцева™)) і VEGF-A, що знижують проліферацію клітин, а також фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні кожного із зазначених сполук.

У дане визначення також включені наступні сполуки: антигормональні препарати, що регулюють або що інгібують дію гормону на пухлини, такі як антиестрогени й селективні модулятори рецепторів до естрогену (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (включаючи НОЛВАДЕКС® тамоксифен), ралоксифен, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, тріоксифен, кеоксифен, LY117018, онапрістон і ФАРЕСТОН тореміфен; інгібітори ароматази, що інгібують фермент ароматазу, регулюючи вироблення естрогена в надниркових залозах, такі як, наприклад, 4(5)-імідазоли, аміноглутетимід, МЕГАСЕ® мегестрола ацетат, АРОМАСИН® екземестан, форместанін, фадрозол, РІВІКОР® ворозол, ФЕМАРА® летрозол і АРИМІДЕКС® анастрозол; й антиандрогенні препарати, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід й гoserелін; а також троксацитабін (1,3-діоксолан, аналог цитозину); антисенсові олігонуклеотиди, зокрема, що інгібують експресію генів до шляху передачі сигналу, що задіяний в проліферації аберрантних клітин, такі як, наприклад, РКС-альфа, Raf й H-Ras; рибозими, такі як інгібітор експресії ФРЕС (наприклад, АНГІОЗИМ® рибозим) й інгібітор експресії HER2; вакцини, такі як вакцини генної терапії, наприклад, вакцина АЛЛОВЕКТИН®, вакцина ЛЕУВЕКТИН® й вакцина ВАКСИД®; ПРОЛЕЙКІН® rIL-2; ЛУРТОТЕКАН® інгібітор топоізомерази 1; АБАРЕЛІКС® gmRN; вінорелбін й еспераміцини (див. патент США No. 4675187), а також фармацевтично приємлемі солі, кислоти або похідні лубих з вказаних сполук.

Крім того, у визначення «хіміотерапевтичного препарату» включені терапевтичні антитіла, такі як алемтузумаб (Campath), бевацизумаб (АВАСТИН®, Genentech); цетуксимаб (ЕРБІТУКС®, Imclone); панітумумаб (БЕКТИБІКС®, Amgen), рітуксимаб (РІТУКСАН®, Genentech/Biogen Idec), пертузумаб (ОМНІТАРГ™, 2C4, Genentech), трастузумаб (ГЕРЦЕПТИН®, Genentech), тозітумомаб (БЕКСАР, Corixa) і кон'югат антитіло-препарат гемтузумаб озогаміцин (МИЛОТАРГ®, Wyeth).

«Препарат-інгібітор росту» у контексті даного винаходу відноситься до сполуки або композиції, що інгібує ріст клітини, зокрема що експресує FcRH5 ракової клітини, в умовах in vitro або in vivo. Таким чином, препарат-інгібітор росту може бути представлений препаратом, що істотно інгібує процентний показник, що експресує FcRH5 клітин в S фазі. Приклади препаратів-інгібіторів росту включають препарати, що блокують прогрес клітинного циклу (в інший момент, крім S фази), такі як препарати, що індують зупинку фаз G1 і M. Класичні блокатори M фази включають алкалоїди барвінку (вінкрістин і вінбластин), таксани й інгібітори

топоізомерази II, такі як доксорубіцин, епірубіцин, даунорубіцин, етопозид і блеоміцин. Препарати, що зупиняють G1, також зупиняють і фазу S, наприклад, ДНК-алкілюючі агенти, такі як тамоксифен, преднізон, дакарбазин, мехлоетамін, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил і ара-С. Додаткова інформація представлена в The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), зокрема, на стор. 13. Таксани (паклітаксел і доцетаксел) є протираковими препаратами, отриманими з тисового дерева. Доцетаксел (ТАКСОТЕР®, Rhone-Poulenc Rorer) отриманий з європейського тисового дерева і є напівсинтетичним аналогом паклітаксела (ТАКСОЛ®, Bristol-Myers Squibb). Паклітаксел і доцетаксел сприяють складанню мікротрубочок з димерів тубуліна й стабілізують мікротрубочки шляхом запобігання деполімеризації, що приводить до інгібування мітозу в клітинах.

«Доксорубіцин» є антибіотиком антрациклінового ряду. Повна хімічна назва доксорубіцина: (8S-цис)-10-[(3-аміно-2,3,6-тридезоксі- $\alpha$ -L-ліксо-гексапіранозил)оксид]-7,8,9,10-тетрагідро-6,8,11-тригідрокси-8-(гідроксиацетил)-1-метоксі-5,12-нафтацендіон.

Термін «цитокіни» є родовим терміном для білків, що вироблені одною популяцією клітин і діючих на інші клітини як міжклітинні медіатори. Приклади таких цитокінів включають лімфокіни, монокіни й традиційні поліпептидні гормони. Цитокіни, у свою чергу, включають гормон росту, наприклад, гормон росту людини, N-метіонил гормон росту людини, гормон росту великої рогатої худоби; паратіреоїдний гормон; тіроксин; інсулін; проінсулін; релаксин; прорелаксин; гормони-глікопротеїни, такі як фоллікулолестимулюючий гормон (ФСГ), тіреотропний гормон (ТТГ), лютеїнізуючий гормон (ЛГ); печіночний фактор росту; фактор росту фібробластів; пролактин; плацентарний лактоген; фактор некрозу пухлин-  $\alpha$ ; міллерів, що інгібують фактор; мишачий гонадотропин-асоційований пептид; інгібін; активін; фактор росту ендотелію судин; інтегрин; тромбопоетин (ТПО); фактор росту нервів, такий як ФРН-  $\alpha$ ; тромбоцитарний фактор росту; фактори росту, що трансформують (ТФР), такі як ТФР-  $\alpha$  і ТФР-  $\beta$ ; інсуліноподібний фактор росту I і II; еритропоетин (ЕПО); остеоіндуктивні фактори; інтерферони, такі як інтерферон -  $\alpha$ , - $\beta$  й - $\gamma$ ; колонієстимулюючі фактори (КСФ), такі як макрофагальний КСФ (М-КСФ); гранулоцитарно-макрофагальний КСФ (ГМ-КСФ); і гранулоцитарний КСФ (Г-КСФ); інтерлейкіни (ІЛ), такі як ІЛ-1, ІЛ-1 $\alpha$ , ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-7, ІЛ-8, ІЛ-9, ІЛ-11, ІЛ-12; фактор некрозу пухлини, такий як ФНО-  $\alpha$  або ФНО-  $\beta$ ; а також інші поліпептидні фактори, включаючи ІЛФ і ліганд набору (ЛН). У контексті даного винаходу термін «цитокін» включає білки із природних джерел або культури рекомбінантних клітин, а також біологічно активні еквіваленти природних послідовностей цитокінів.

Термін «листок-вкладиш» відноситься до інструкцій, які звичайно включені в представлені на ринку впакування терапевтичної продукції, і які містять інформацію про показання, застосування, дозу, шляхи введення, протипоказання і/або запобіжним заходам при використанні такої терапевтичної продукції.

Термін «внутрішньоклітинний метаболіт» відноситься до сполук, що утворились у результаті метаболічного процесу або реакції усередині клітини на кон'югат антитіло-препарат (КАП). Метаболічний процес або реакція може бути представлена процесом ферментації, наприклад, протеолітичним розщепленням пептидного лінкера КАП або гідролізом функціональної групи, такої як гідразон, ефір або амід. Внутрішньоклітинні метаболіти включають, але не обмежуються, антитіла й незв'язані препарати, піддані внутрішньоклітинному розщепленню після влучення в клітину, дифузії, захоплення або транспортування в клітину.

Термін «розщеплений усередині клітини» і «внутрішньоклітинне розщеплення» відноситься до метаболічного процесу або реакції усередині клітини на кон'югат антитіло-препарат (КАП), при яких розривається ковалентний взаємозв'язок, тобто лінкер, між молекулою препарату (D) і антитілом (АТ), що призводить до дисоціації незв'язаного препарату з антитіла усередині клітини. Таким чином, розщеплені молекули КАП є внутрішньоклітинними метаболітами.

Термін «біодоступність» відноситься до систематичної доступності (наприклад, концентрації в плазмі/крові) окремої кількості препарату, уведеного пацієнтові. Біодоступність є абсолютним терміном, що вказує на вимір часу (швидкості) і загальної кількості (ступеня) препарату, що потрапив у загальну систему кровообігу з уведеної лікарської форми.

Термін «цитотоксична активність» відноситься до загибелі клітин, цитостатичному або ефекту, що інгібує ріст КАП або внутрішньоклітинний метаболіт КАП. Цитотоксична активність може виражатися у вигляді значення IC<sub>50</sub>, що є концентрацією (молярної або масової) на одиницю об'єму, у якій виживає половина клітин.

Термін «алкіл» у контексті даного винаходу відноситься до насиченого лінійного або розгалуженого моновалентного вуглеводневого радикалові з 1-12 атомами вуглецю (C<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>), при цьому алкільний радикал у деяких випадках може мати один або декілька представлених

нижче заміщувачів. В іншому варіанті втілення винаходу алкільний радикал представлений радикалом з 1-8 атомами вуглецю ( $C_1-C_8$ ) або 1-6 атомами вуглецю ( $C_1-C_6$ ). Приклади алкільних груп включають, але не обмежуються, наступне: метил (Me,  $-CH_3$ ), етил (Et,  $-CH_2CH_3$ ), 1-пропіл (n-Pr, n-пропіл,  $-CH_2CH_2CH_3$ ), 2-пропіл (i-Pr, i-пропіл,  $-CH(CH_3)_2$ ), 1-бутил (n-Bu, n-бутил,  $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-метил-1-пропіл (i-Bu, i-бутил,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-бутил (s-Bu, s-бутил,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 2-метил-2-пропіл (t-Bu, t-бутил,  $-C(CH_3)_3$ ), 1-пентил (n-пентил,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-пентил ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$ ), 3-пентил ( $-CH(CH_2CH_3)_2$ ), 2-метил-2-бутил ( $-C(CH_3)_2CH_2CH_3$ ), 3-метил-2-бутил ( $-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$ ), 3-метил-1-бутил ( $-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-метил-1-бутил ( $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 1-гексил ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-гексил ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-гексил ( $-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$ ), 2-метил-2-пентил ( $-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-метил-2-пентил ( $-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 4-метил-2-пентил ( $-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$ ), 3-метил-3-пентил ( $-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$ ), 2-метил-3-пентил ( $-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$ ), 2,3-диметил-2-бутил ( $-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$ ), 3,3-диметил-2-бутил ( $-CH(CH_3)C(CH_3)_3$ ), 1-гептил, 1-октил й т.п.

Термін «алкеніл» відноситься до лінійного або розгалуженого моновалентного вуглеводневому радикалу з 2-8 атомами вуглецю ( $C_2-C_8$ ) і по меншому одним ненасиченим зв'язком, тобто вуглець-вуглець,  $sp^2$ -подвійний зв'язок, при цьому радикал алкеніл може в деяких випадках містити один або декілька представлених тут заміщувачів, й включає радикали, що мають «цис» і «транс» орієнтації, і, з іншого боку, «E» і «Z» орієнтації. Приклади включають, але не обмежуються, етіленіл або вініл ( $-CH=CH_2$ ), алліл ( $-CH_2CH=CH_2$ ) і т.п.

Термін «алкеніл» відноситься до лінійного або розгалуженого моновалентного вуглеводневого радикалу з 2-8 атомами вуглецю ( $C_2-C_8$ ) і по меншому одному ненасиченому зв'язку, тобто вуглець-вуглець,  $sp^2$ -подвійний зв'язок, при цьому радикал алкініл може в деяких випадках містити один або декілька представлених тут заміщувачів. Приклади включають, але не обмежуються, етиніл ( $-C\equiv CH$ ), пропініл (пропаргіл  $-CH_2C\equiv CH$ ) і т.п.

Термін «карбоцикл», «карбоцикліл», «карбоциклічне кільце» і «циклоалкіл» відноситься до моновалентному, неароматичному, насиченому або частково ненасиченому кільцю з 3-12 атомами вуглецю ( $C_3-C_{12}$ ) у вигляді моноциклічного кільця або 7-12 атомами вуглецю у вигляді двоциклічного кільця. Двоциклічні карбоцикли з 7-12 атомами можуть бути з'єднані, наприклад, у вигляді біцикло [4,5], [5,5], [5,6] або [6,6] системи, а двоциклічні карбоцикли з 9-10 атомами в кільці можуть бути представлені у вигляді біцикло [5,6] або [6,6] системи, або у вигляді з'єднаних систем, таких як біцикло[2.2.1]гептан, біцикло[2.2.2]октан і біцикло[3.2.2]нонан. Приклади моноциклічних карбоциклів включають, але не обмежуються, циклопропіл, циклобутил, циклопентил, 1-еніл, 2-еніл, 3-еніл, циклогексил, 1-еніл, 2-еніл, 3-еніл, циклогексадієніл, циклогептил, циклооктил, циклононіл, циклодецил, циклоундецил, циклододецил і т.п.

«Арил» означає моновалентний ароматичний вуглеводневий радикал з 6-20 атомами вуглецю ( $C_6-C_{20}$ ), отриманий шляхом видалення одного атома водню від окремого атома вуглецю у вихідній системі ароматичного кільця. Деякі арильні групи представляють у вигляді типових структур з позначенням «Аг». Арили включають двоциклічні радикали, що складаються з ароматичного кільця, злитого з насиченим, частково ненасиченим кільцем або ароматичним карбоциклічним кільцем. Типові арильні групи включають, але не обмежуються, радикали, отримані з бензолу (фенілу), заміщеного бензолу, нафталіну, антрацену, біфеніла, інденіла, інданіла, 1,2-дигідронафталіна, 1,2,3, 4-тетрагідронафтила й т.п. Арильні групи в деяких випадках можуть бути заміщені незалежним чином одним або декількома представленими тут заміщувачами.

Терміни «гетероцикл», «гетероцикліл» і «гетероциклічне кільце» у тексті даної заявки використовуються взаємозамінним чином і відносяться до насиченого або частково ненасиченому (тобто з наявністю одного або більше подвійних і/або потрійних зв'язків у кільці) карбоциклічному радикалові з 3-20 атомами в кільці, у якому щонайменше один атом кільця представлений гетероатомом (азоту, кисню, фосфору й сірки), а атоми, що залишилися, у кільці представлені С, при цьому один або кілька атомів у кільці в деяких випадках можуть бути заміщені незалежним чином одним або декількома представленими нижче заміщувачами. Гетероцикл може бути представлений моноциклом, що складається з 3-7-членного кільця (2-6 атомів вуглецю й 1-3 гетероатомів, які вибирають з N, O, P і S), або подвійним кільцем, що складається з 7-10-членного кільця (4-9 атомів вуглецю й 1-3 гетероатомів, які вибирають з N, O, P і S), наприклад: система з подвійного кільця [4,5], [5,5], [5,6] або [6,6]. Гетероцикли описані в Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularly Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 - наш час), зокрема, у Томх 13, 14, 16, 19 і 28;

і J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. «Гетероциклі» також включає радикали, при цьому такі гетероциклічні радикали злиті з насиченим, частково ненасиченим або ароматичним карбоциклічним або гетероциклічним кільцем. Приклади гетероциклічних кілець включають, але не обмежуються, наступні: пірролідініл, тетрагідрофураніл, дигідрофураніл, 5 тетрагідротієніл, тетрагідропіраніл, дигідропіраніл, тетрагідротіопіраніл, піперидіно, морфоліно, тіоморфоліно, тіоксаніл, піперазиніл, гомопіперазиніл, азетидініл, оксетаніл, тіетаніл, гомопіперидініл, оксепаніл, тіепаніл, оксазепиніл, діазепиніл, тіазепиніл, 2-пірролініл, 3-пірролілініл, індолініл, 2Н-піраніл, 4Н-піраніл, діоксаніл, 1,3-діоксоланіл, піразолініл, дітіаніл, дітіоланіл, дигідропіраніл, дигідротієніл, дигідрофураніл, піразолідинілімідазолініл, 10 імідазолідиніл, 3-азабіцикло[3.1.0]гексаніл, 3-азабіцикло[4.1.0]гептаніл, азабіцикло[2.2.2]гексаніл, 3Н-індоліл хінолізиніл й N-піриділсечовина. У даний винахід також включені спіро-молекули. Приклади гетероциклічної групи, у якій 2 атоми вуглецю в кільці заміщені атомами кисню (=O), представлені піримідинонілом і 1,1 діоксо-тіоморфолінілом. Представлені тут гетероциклічні групи в деяких випадках можуть бути заміщені незалежним 15 чином одним або декількома представленими тут заміщувачами.

Термін «гетероарил» відноситься до моновалентного ароматичного радикала 5-, 6- або 7-членного кільця, і включає злиті кільцеві системи (щонайменше, з одним ароматичним кільцем) з 5-20 атомів, що містять один або декілька гетероатомів, які вибираються незалежним чином з атомів азоту, кисню й сірки. Приклади гетероарильних груп представлені наступними: 20 (включаючи, наприклад, 2-гідроксипіридиніл), імідазоліл, імідазопіридиніл, піримідиніл (включаючи, наприклад, 4-гідроксипіримідиніл), піразоліл, тріазоліл, піразиніл, тетразоліл, фурил, тієніл, ізоксазоліл, тіазоліл, оксазоліл, ізотіазоліл, пірроліл, хінолініл, ізохінолініл, індоліл, бензімідазоліл, бензофураніл, циннолініл, індазоліл, індолізиніл, фталазиніл, піридазиніл, тріазиніл, ізоіндоліл, птеридиніл, пуриніл, оксдіазоліл, триазоліл, тіадіазоліл, 25 тіадіазоліл, фуразаніл, бензофуразоніл, бензотіофеніл, бензотіазоліл, бензоксазоліл, хіназолініл, хіноксалініл, нафтиридиніл й фуропіридиніл. Гетероарильні групи в деяких випадках можуть бути заміщені незалежним чином одним або декількома представленими тут заміщувачами.

Гетероциклічні або гетероарильні групи можуть бути зв'язані за допомогою вуглецю (вуглецевий зв'язок) або азоту (азотний зв'язок), де це можливо. Наприклад (не обмежуючись), гетероцикли або гетероарили з'єднані за допомогою вуглецю в положенні 2, 3, 4, 5 або 6 30 піридини, положенні 3, 4, 5 або 6 піридазина, положенні 2, 4, 5 або 6 піримідина, положенні 2, 3, 5 або 6 піразина, положенні 2, 3, 4 або 5 фурана, тетрагідрофурана, тіофурана, тіофена, піррола або тетрагідропіррола, положенні 2, 4 або 5 оксазола, імідазола або тіазола, положенні 35 3, 4 або 5 ізоксазола, піразола або ізотіазола, положенні 2 або 3 азіридіна, положенні 2, 3 або 4 азетідина, положенні 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 хіноліна або положенні 1, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 ізохіноліна.

Наприклад (не обмежуючись), гетероцикли або гетероарили зі зв'язком за допомогою азоту в положенні 1 азарідина, азатідина, піррола, пірролідина, 2-пірроліна, 3-пірроліна, імідазола, імідазолідина, 2-імідазоліна, 3-імідазоліна, піразола, піразоліна, 2-піразоліна, 3-піразоліна, 40 піперідина, піперазина, індола, індоліна, 1Н-індазола, в положенні 2 ізоіндола або ізоіндоліна, в положенні 4 морфоліна та в положенні 9 карбазола або ?-карболина.

«Алкілен» відноситься до насиченого, розгалуженого, прямого або цикличного вуглеводневого радикала з 1-18 атомів вуглецю, що має два моновалентних центри, отриманих шляхом видалення двох атомів водню від того самого або різних атомів вуглецю вихідного 45 алкана. Типові радикали алкілени включають, не обмежуючись, наступні: метілен (-CH<sub>2</sub>-) 1,2-етіл (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,3-пропіл (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-бутил (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) та т.п.

«C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкілен» є прямою, насиченою вуглеводневою групою по формулі -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>-. Приклади C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкілена включають метілен, етілен, пропілен, бутілен, пентілен, гексілен, гептілен, октілен, нонілен та декален.

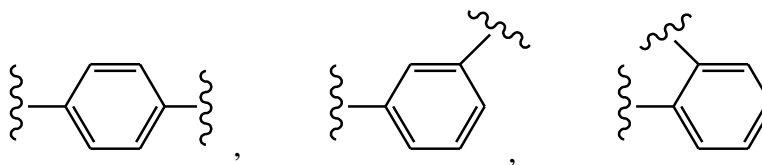
50 «Алкенілен» відноситься до насиченого, розгалуженого, прямого або цикличного вуглеводневого радикала з 2-18 атомами вуглецю, що має два моновалентних центри, отриманих шляхом видалення двох атомів водню від того самого або різних атомів вуглецю вихідного алкена. Типові радикали алкенілени включають, не обмежуючись, наступне: 1, 2-етілен (-CH=CH-).

55 «Алкинілен» відноситься до насиченого, розгалуженого, прямого або цикличного вуглеводневого радикала з 2-18 атомів вуглецю, що має два моновалентних центри, отриманих шляхом видалення двох атомів водню від того самого або різних атомів вуглецю вихідного алкіна. Типові радикали алкінілени включають, не обмежуючись, наступне: ацетилен (-C≡C-), пропаргіл (-CH<sub>2</sub>C≡C-) та 4-пентініл (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡C-).

60 «Арилен» є арильною групою, що має два ковалентні зв'язки, які можуть перебувати в орто,



мета або пара положеннях, як це показано на наступних фігурах:



при цьому фенільна група може бути не заміщена або заміщена аж до чотирма групами, включаючи, але не обмежуючись, наступне:  $-C_1-C_8$  алкіл,  $-O-(C_1-C_8)$  алкіл, -арил,  $-C(O)R'$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)OR'$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-C(O)NHR'$ ,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-NHC(O)R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-OH$ , -галоген,  $-N_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH(R')$ ,  $-N(R')_2$  та  $-CN$ ; при цьому кожний  $R'$  представлений незалежним чином  $H$ ,  $-C_1-C_8$  алкілом або арилом.

«Арилалкіл» відноситься до ацикличного алкільного радикала, у якому один з атомів водню, з'єднаний з атомом вуглецю, як правило,  $sp^3$ -атомом вуглецю, заміщений арильним радикалом. Типові арилалкільні групи включають, не обмежуючись, наступне: бензил, 2-фенілетан-1-іл, 2-фенілетен-1-іл, нафтилметил, 2-нафтілетан-1-іл, 2-нафтілетен-1-іл, нафтобензил, 2-нафтофенілетан-1-іл та т.п. Арилалкільна група складається з 6-20 атомів вуглецю, наприклад, молекули алкілу, включаючи алканільну, алкенільну або арилалкільну групи з 1-6 атомами вуглецю, і молекули арила з 5-14 атомами вуглецю.

«Гетероарилалкіл» відноситься до ацикличного алкільного радикала, у якому один з атомів водню, з'єднаний з атомом вуглецю, як правило,  $sp^3$ -атомом вуглецю, заміщений гетероарильним радикалом. Типові гетероарильні групи включають, але не обмежуються, 2-бензімідазолілфеніл, 2-фурилетіл і т.п. Гетероарилалкільна група складається з 6-20 атомів вуглецю, наприклад, молекули алкілу, включаючи алканільну, алкенільну або гетероарилалкільну групи з 1-6 атомами вуглецю, і молекули гетероарила з 5-14 атомами вуглецю й 1-3 гетероатомами (такі, що вибираються з  $N$ ,  $O$ ,  $P$  і  $S$ ). Молекула гетероарила гетероарильної групи може бути представлена моноциклом, що складається з 7-членного кільця (2-6 атомів вуглецю), або подвійним кільцем, що складається з 10-членного кільця (4-9 атомів вуглецю й 1-3 гетероатомів, що вибираються з  $N$ ,  $O$ ,  $P$  і  $S$ ), наприклад: система з подвійного кільця [4,5], [5,5], [5,6] або [6,6].

Термін «проліки» у контексті даної заявки на винахід відноситься до попередника або похідної форми фармацевтично активної речовини, що володіє меншою цитотоксичністю щодо клітин пухлини в порівнянні з вихідним препаратом і здатністю ферментативно активуватися або конвертуватися в більше активну форму вихідного препарату. Див., наприклад, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) і Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Проліки по даному винаході включають (але не обмежуються) наступні: фосфат-утримуючі проліки, тіофосфат-утримуючі проліки, проліки, що містять сульфати, проліки, що містять пептиди, проліки з модифікованими D-амінокислотами, глікозильовані проліки, проліки, що містять  $\beta$ -лактами, заміщені в деяких випадках проліки, що містять феноксиацетамід або заміщені в деяких випадках проліки, що містять фенілацетамід, 5-фторцитозин і інші 5-фторуридин проліки, які можуть бути конвертовані в більше активні цитотоксичні й незв'язані препарати. Приклади цитотоксичних препаратів, які можуть бути отримані у формі проліків для використання в даному винаході, включають, не обмежуючись, описані вище хіміотерапевтичні препарати.

Під «променевою терапією» мається на увазі використання спрямованих гама-променів або бета-променів для індукування достатнього ушкодження в клітині, що приводить до обмеження її нормального функціонування або знищенню клітини. Для визначення дози й тривалості лікування в науці відомий цілий ряд способів. Типове лікування приймається у вигляді однократного введення, а типові дози варіюють від 10 до 200 одиниць (Грей) у добу.

«Метаболіт» є продуктом, отриманим у результаті метаболізму в організмі специфічної сполуки або його солі. Метаболіти сполуки можуть бути ідентифіковані з використанням стандартних способів, відомих науці, а їхня активність може бути визначена з використанням описаних тут тестів. Такі продукти можуть бути отримані, наприклад, у результаті окислювання, відновлення, гідролізу, амідування, дезамідування, етерифікації, дезетерифікації, ферментативного розщеплення й т.п. введеної сполуки. Відповідно до цього, винахід включає метаболіти сполуки по винаходу, включаючи сполуки, отримані в ході процесу, що складається з контакту сполуки по винаходу зі ссавцем протягом періоду, достатнього для одержання продукту метаболізму.

«Ліпосома» являє собою невеликий пухирець, що складається з різного типу ліпідів, фосфоліпідів і/або сурфактанта, і може використовуватися для доставки препарату в організм ссавця. Компоненти ліпосоми звичайно розміщуються у вигляді двох шарів, подібно розміщенню ліпідів у біологічній мембрані.

«Лінкер» позначає хімічну молекулу, що складається з ковалентного зв'язку або ланцюга атомів, які ковалентним чином приєднують антитіло до молекули препарату. У різних варіантах втілення винаходу лінкери включають двовалентний радикал, наприклад, алкілдііл, арилен, гетероарилдііл, такі молекули, як  $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ , що повторюються одиниці алкілоксі (наприклад, поліетієноксі, ПЕГ, поліметилєноксі) і алкіламіно (наприклад, поліетіленаміно, Jeffamine™); а також двокислотні ефіри й амід, включаючи сукцинат, сукцинамід, дигліколат, малонат і капроамід.

Термін «хіральний» відноситься до молекул, що володіють властивістю ненакладання дзеркального партнера, у той час як термін «ахіральний» відноситься до молекул, що накладаються на свого дзеркального партнера.

Термін «стереоізомери» відноситься до сполук, що мають ідентичну хімічну будову, але, що відрізняється взаємним розташуванням атомів або груп у просторі.

«Діастереоізомер» відноситься до стереоізомера із двома або більше центрами хіральності, молекули якого не є дзеркальними відображеннями один для іншого. Діастереоізомери мають різні фізичні властивості, наприклад, температурами плавлення, кипіння, спектральними властивостями й реакційною здатністю. Суміші діастереоізомерів можуть бути розділені з використанням аналітичних процедур з високим роздільною здатністю, таких як електрофорез і хроматографія.

«Енантіомери» відносяться до двох стереоізомерів сполуки, що не є дзеркальним відображенням один одного.

Стереохімічні визначення й принципи, що тут використовуються представлені в S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; and Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Багато органічних сполук існує в оптично активних формах, тобто вони мають здатність обертати площину поляризованого світла. При описі оптично активної сполуки, приставки D і L або R і S, використовуються для позначення абсолютної конфігурації молекули відносно її хіального центру (-іv). Приставки d і l або (+) і (-) використовуються для позначення ознаки обертання в площині поляризованого світла сполукою, при цьому (-) або 1 позначає, що сполука є лівообертальною.

Сполука із приставкою (+) або d є правообертальною.

Для окремої хімічної структури такі стереоізомери ідентичні, за винятком того, що вони є дзеркальними відображеннями один одного. Специфічний стереоізомер також може відноситись до енантіоміру, і суміш таких ізомерів часто називають енантіомірною сумішшю. Суміш енантіомірів у співвідношенні 50:50 відноситься до рацематної суміші або рацемата, що може утворитися при відсутності стереоселекції або стереоспецифічності в хімічній реакції або процесі. Терміни «рацематна суміш» і «рацемат» відносяться до еквімолярної суміші двох видів енантіомірів, позбавлених оптичної активності.

Термін «таутомір» або «таутомірна форма» відноситься до структурних ізомерів з різними зарядами, які можуть переходити друг у друга за допомогою низькоенергетичного бар'єру. Наприклад, протонні таутоміри (також відомі як прототропні таутоміри) включають взаємопереходи за допомогою міграції протона, наприклад, кето-єнольні й іміно-єнамінні ізомеризації. Валентні таутоміри включають взаємопереходи за допомогою реорганізації деяких електронів, що беруть участь в утворенні зв'язку.

У контексті даного винаходу фраза «фармацевтично прийнятна сіль» відноситься до фармацевтично прийнятних органічних або неорганічних солей сполуки по винаходу. Типові солі включають, але не обмежуються, наступне: сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромід, йодід, нітрат, бісульфат, фосфат, кислий фосфат, ізонікотінат, лактат, саліцинат, кислий цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, бітартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентісинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, форміат, бензоат, глутамат, метасульфонат «мезілат», етансульфонат, бензенсульфонат, p-толуолсульфонат та памоат (тобто 1,1'-метілен-біс(2-гідрокси-3-нафтоат)). Фармацевтично прийнятна сіль може включати іншу молекулу, таку як ацетат-іон, сукцинат-іон або інший протиіон. Протиіон може бути представлений будь-яким органічним або неорганічним іоном, що стабілізує заряд вихідної сполуки. Крім того, фармацевтично прийнятна сіль може у своїй структурі мати більше одного зарядженого атома. У випадках, коли кілька заряджених атомів є частиною фармацевтично прийнятної солі, така сіль може мати декілька протиіонів. Таким чином, фармацевтично

прийнятна сіль може мати один або кілька заряджених атомів і/або один або декілька протиіонів.

Якщо сполука по винаходу є основою, фармацевтично прийнятна сіль може бути отримана будь-яким підходящим і представленим у науці способом, включаючи, наприклад, реакцію вільної основи з неорганічною кислотою, такою як хлороводнева кислота, бромоводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, метансульфонова кислота, фосфорна кислота й т.п., або з органічною кислотою, такою як оцтова кислота, трифтороцтова кислота, малеїнова кислота, бурштинова кислота, мигдальна кислота, фумарова кислота, маленова кислота, піруватна кислота, щавлева кислота, гліколева кислота, саліцилова кислота, піранозіильна кислота, така як глюкуронова кислота або галактуринова кислота, альфа-гідроксикислота, така як лимонна кислота або винна кислота, амінокислота, така як аспарагінова кислота або глутамінова кислота, ароматична кислота, така як бензойна кислота або корична кислота, сульфоронова кислота, така як р-толуолсульфонова кислота, етансульфонова кислота або т.п.

Якщо сполука по винаходу є кислотою, необхідна фармацевтично прийнятна сіль може бути отримана будь-яким підходящим способом, наприклад, реакцією вільної кислоти з органічною або неорганічною основою, такою як амін (первинний, вторинний або третинний), гідроксидом лужного металу або гідроксидом лужноземельного металу або т.п. Ілюстративні приклади підходящих солей включають, але не обмежуються, органічні солі, отримані з амінокислот, таких як гліцин і аргінін, амонію, первинних, вторинних і третинних амінів, і циклічних амінів, таких як піперидин, морфолін і піперазин, неорганічні солі, отримані з натрію, кальцію, калію, магнію, марганцю, заліза, міді, цинку, алюмінію й літію.

Фраза «фармацевтично прийнятний» указує, що речовина або композиція по своїм хімічним і/або токсичних властивостях повинна бути сумісною з іншими інгредієнтами, що складають композицію, і/або ссавцям, підданим лікуванню.

«Сольват» відноситься до асоціації або комплексу з однією або декількох молекул розчинника й сполука по винаходу. Приклади розчинників для утворення сольватів включають, але не обмежуються, воду, ізопропанол, етанол, метанол, ДМСО, етілацетат, оцтову кислоту й етаноламін. Термін «гідрат» відноситься до комплексу, якщо молекула розчинника представлена водою.

Термін «захисна група» відноситься до заміщувача, що звичайно використовується для блокування або захисту окремої функціональної здатності, при цьому в реакцію вступають інші функціональні групи сполук. Наприклад, «амінозахисна група» є заміщувачом, приєднаним до аміногрупи й, що блокує або захищає амінні властивості сполуки. Підходящі амінозахисні групи включають ацетил, трифторацетил, t-бутоксикарбоніл (BOC), бензилоксикарбоніл (CBZ) та 9-фторенілметиленоксикарбоніл (Fmoc). Подібним чином, «гідроксильна захисна група» відноситься до заміщувача гідроксильної групи, що блокує або захищає функціональну здатність гідроксиду. Підходящі захисні групи включають ацетил і силіл. «Карбоксильна захисна група» відноситься до заміщувача карбоксильної групи, що блокує або захищає функціональну здатність карбоксиду. Звичайно карбоксил-захисні групи, що використовують включають фенілсульфонілетил, ціаноетил, 2-(триметилсиліл)етил, 2-(триметилсиліл)етоксиметил, 2-(p-толуолсульфоніл)етил, 2-(p-нітрофенілсульфоніл)етил, 2-(дифенілфосфіно)-етил, нітроетил и т.п. Загальний опис захисних груп і їхнє використання представлено в T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991.

«Група, що заміщується» відноситься до функціональної групи, що може бути заміщена іншою функціональною групою. Певні групи, що заміщуються добре відомі науці і їхні приклади включають, не обмежуючись, наступні: галіди (наприклад, хлорид, бромід, йодід), метансульфоніл (мезил), p-толуолсульфоніл (тозил), трифторметилсульфоніл (трифлат) та трифторметилсульфонат.

Скорочення

ЛІНКЕРНІ КОМПОНЕНТИ:

MC = 6-малеїмідокапроїл

Val-Cit або «vc» = валін-цитрулін (типовий діпептид в лінкері, що розщеплюється протеазою)

Citrulline = 2-аміно-5-уреїдопентаноєва кислота

PAB = p-амінобензіооксикарбоніл (приклад «саможертвующего» лінкерного компоненту)

Me-Val-Cit = N-метил-валін-цитрулін (пептидний зв'язок лінкеру був модифікований для предотвращения його розщеплення катепсином B)

MC(PEG)6-OH = малеїмідокапроїл- поліетіленгліколь (може бути приєднаний до цистеїну в антибіотах).

## ЦИТОТОКСИЧНІ ПРЕПАРАТИ:

MMAE = монометилаурістатин Е (MW 718)

MMAF = варіант аурістатина Е (MMAE) з фенілаланіном на С-кінці препарату (MW 731.5)

5 MMAF-DMAEA = MMAF з DMAEA (диметиламіноетіламін) в амідному зв'язку з С-кінцевим фенілаланіном (MW 801.5)

MMAF-TEG = MMAF з тетраетіленгліколем, етерифікованим до фенілаланіну

MMAF-NtBu = N-t-бутил, приєднаний у вигляді амиду до С-кінця MMAF

DM1 = N(2')-деацетил-N(2')-(1-оксопропіл)-майтансин

DM3 = N(2')-деацетил-N2-(1-оксопентил)-майтансин

10 DM4 = N(2')-деацетил-N2-(1-оксопентил)-майтансин

Подальші скорочення представлені наступними: AE = аурістатин Е, Boc =

N-(t-бутоксикарбоніл), cit = цитрулін, dar = долапроін, DCC = 1,3-дициклогексикарбодіімід, DCM

= дихлорметан, DEA = диетиламін, DEAD = диетилазодикарбоксилат, DEPC =

диетилфосфонілцианідат, DIAD = диізопропілазодикарбоксилат, DIEA = N,N-диізопропіленамін,

15 dil = долаізолейцин, DMA = диметилацетамід, DMAP = 4-диметиламінопіридин, DME =

етиленгліколь-диметиловий ефір (або 1,2-диметоксетан), DMF = N,N-диметилформамід, DMSO

= диметилсульфоксид, doe = долафенін, dov = N,N-диметилвалін, DTNB = 5,5'-дитіобис(2-

нітробензойна кислота), DTPA = диетілентріамінпентаоцтова кислота, DTT = дитіотреїтол, EDCI

20 = 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етілкарбодііміда гідрохлорид, EEDQ = 2-етоксі-1-

етоксикарбонил-1,2-дигідрохінолін, ES-MS = мас-спектрометрія з електророзпиленням, EtOAc =

етилацетат, Fmoc = N-(9-фторенілметоксикарбоніл), gly = гліцин, HATU = O-(7-азабензотріазол-

1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилуронія гексафторфосфат, HOBt = 1-гідроксибензотріазол, ВЕЖХ =

25 високоефективна рідинна хроматографія, ile = ізолейцин, lys = лізин, MeCN (CH<sub>3</sub>CN) =

ацетонітрил, MeOH = метанол, Mtr = 4-анісильдіфенілметил (або 4-метокситриліл), nor = (1S,

25 2R)-(+)-норепедрін, ФСБ = фосфатно-сольовий буфер (pH 7,4), ПЕГ = поліетиленгліколь, Ph =

феніл, Pnp = p-нітрофеніл, MC = 6-малеїмідокпроїл, phe = L-фенілаланін, PyBop = бром-трис-

пірролідинофосфонія гексафторфосфат, SEC = ексклюзійна хроматографія, Su = сукцинімід,

TFA = трифтороцтова кислота, TLC = тонкошарова хроматографія, УФ = ультрафіолет та val =

валін.

30 «Незв'язана амінокислота цистеїн» відноситься до залишку цистеїнової кислоти, що була  
введена у вихідне антитіло в ході рекомбінації, має тілову функціональну групу (-SH) і не  
з'єднана внутрімолекулярним або міжмолекулярним дисульфідним містком.

Термін «значення реакційноздатності тіола» є кількісною характеристикою реакційної  
здатності незв'язаної амінокислоти цистеїн. Значення реакційноздатності тіола є процентним  
35 показником кількості незв'язаної амінокислоти цистеїн в антитілі з уведеним у ході рекомбінації  
цистеїном, що реагує з тіловим реагентом; таке значення перетвориться в максимальне  
значення, рівне 1. Наприклад, незв'язана амінокислота цистеїн в антитілі з введенням у ході  
рекомбінації цистеїном, що реагує з 100% виходом з тіловим реагентом, таким як реагент  
біотин-малеїмід, з утворенням міченого біотину антитіла, має значення реакційноздатності  
40 тіола 1,0. Інша амінокислота цистеїн, введена в ході рекомбінації в це ж саме або інше вихідне  
антитіло, що реагує з 80% виходом з тіловим реагентом, має значення реакційноздатності  
тіола 0,8. Інша амінокислота цистеїн, введена в ході рекомбінації в це ж саме або інше вихідне  
антитіло, що взагалі не вступає в реакцію з тіловим реагентом, має значення  
реакційноздатності тіола 0. Визначення значення реакційноздатності тіола окремого цистеїна  
45 може проводитися в ході ІФА, мас-спектроскопії, рідинній хроматографії, ауторадіографії або  
інших кількісних аналізів.

«Вихідне антитіло» є антитілом, що складається з амінокислотної послідовності, у якій один  
або кілька амінокислотних залишків заміщені одним або декількома залишками цистеїна.  
Вихідне антитіло може складатися з нативною послідовністю або послідовністю дикого типу.  
50 Вихідне антитіло може мати існуючі раніше модифікації амінокислотної послідовності (такі як  
вставки, делеції й/або заміни) відносно нативної, модифікованої форми або форми дикого типу  
антитіла. Вихідне антитіло може бути спрямоване щодо антигену-мішені, наприклад, біологічно  
важливого поліпептиду. Антитіла, спрямовані щодо неополіпептидних антигенів (таких як  
пухлиноасоційованих гліколіпідних антигенів, див. US 5091178) також ураховуються.

55

Таблиця 1

```

/*
*
* С-С підвищено з 12 до 15
* Z - середнє значення EQ
* В - середнє значення ND
* збіг з розривом представлене _M; стоп-стоп = 0; J (джокер) збіг = 0
*/
#define _M -8 /* значення збігу з розривом */
int _day[26][26] = {
/*   A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M,
_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

Таблиця 1 (продовження)

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>
#define MAXJMP 16 /* максимальний стрибок по діагоналі */
#define MAXGAP 24 /* е продовжувати накладати штраф на гепі задовже цього */
#define JMPS 1024 /* максимальний стрибок у шляху */
#define MX 4 /* зберегти, якщо є щонайменше одна основа MX-1 з моменту
останнього стрибка */
#define DMAT 3 /* значення співпадаючих основ */
#define DMIS 0 /* штраф для незбіжних основ */
#define DINS0 8 /* штраф за геп */
#define DINS1 1 /* штраф за основу */
#define PINS0 8 /* штраф за геп */
#define PINS1 4 /* штраф за залишок */
struct jmp {

```

```

short n[MAXJMP];          /* розмір стрибка (негативний для dely) */
unsigned short x[MAXJMP]; /* номер основи при стрибку в послідовності x */
};                          /* обмежує послідовність до 2^16 - 1 */

struct diag {
    int score;             /* бал при останньому стрибку */
    long offset;          /* зсув попереднього блоку */
    short ijmp;           /* індекс поточного стрибка */
    struct jmp jp;        /* список стрибків */
};

struct path {
    int spc;               /* кількість лідируючих пробілів */
    short n[JMPs];        /* список стрибка (гепів) */
    int x[JMPs];          /* розташування стрибка (останній елемент перед гепом) */
};

char *ofile;              /* ім'я вихідного файлу */
char *name[2];            /* назви послідовностей: getseqs() */
char *prog;               /* назва програми для повідомлень про помилки */
char *seq[2];             /* послідовності: getseqs() */
int dmax;                 /* краща діагональ: nw() */
int dmax0;                /* кінцева діагональ */
int dna;                  /* устанавлюється, якщо ДНК: основная */
int endgaps;              /* устанавлюється, якщо накладає штраф на закінчення гепів */
int gapx, gapy;           /* загальна кількість гепів у послідовності */
int len0, len1;           /* довжина послідовності */
int ngapx, ngapy;         /* загальний розмір гепів */
int smax;                 /* максимальний бал: nw() */
int *xbm;                 /* бітова матриця для порівняння */
long offset;              /* поточний зсув у файлі стрибка */
struct diag *dx;          /* утримання діагоналей */
struct path pp[2];        /* утримання шляху для послідовностей */
char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

**Таблиця 1 (продовження)**

```

/* Програма вирівнювання Нідлмана-Вунша
*
* використання: програмний файл 1 файл 2
* де файл 1 і файл 2 представляють послідовності двох ДНК або двох білків
* Послідовності можуть бути зазначені у верхньому або нижньому регістрі й можуть
містити двозначність
* Будь-які рядки, що починаються з «;», «>» або «<», ігноруються
* Максимальна довжина файлу 65535 (обмежена беззначним знаком «x» у структурі
стрибка)
* Послідовність із 1/3 або більше елементів ACGTU вважається ДНК
* Результат представлений у файлі «align.out»
*
* Програма може створити тимчасовий файл в /tmp для збереження інформації про
відстеження
* Оригінальна версія розроблена на BSD 4.3 з vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

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

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

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

```

```

endgaps = 0;          /* 1 для накладення штрафу на кінцеві гепи */
ofile = "align.out";  /* вихідний файл */

nw();                /* заповнення матриці, одержання можливих стрибків */
readjumps();         /* одержання фактичних стрибків */
print();             /* печатка статистики, вирівнювання */

cleanup(0);          /* від'єднати будь-які тимчасові файли */

```

### Таблиця 1 (продовження)

```

/* зробити вирівнювання, повернути найкраще значення: основна()
 * ДНК: значення по Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 значень
 * Якщо бали рівні, ми воліємо невідповідності будь-якому гепу, переважніше
 * новому гепу для розширення поточного гепа, і переважніше гепу в послідовності x
 * гепу в послідовності y.
 */

```

```

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

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
    }
}

```



```

}
else {
    coll[0] = 0;
    delx = -ins0;
    ndelx = 0;
}

```

Таблиця 1 (продовження)

...nw

```

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

    /* відновлення штрафу для делеції в послідовності x;
     * перевага нової делеції в порівнянні з поточною делецією
     * ігнорування MAXGAP у випадку зважених кінцевих гепів
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* відновлення штрафу для делеції в послідовності y;
     * перевага нової делеції в порівнянні з поточною делецією
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (coll[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (coll[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = coll[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* використання максимального балу; переважніше

```

делецією у  
 \* невідповідність у будь-якій делеції й делеції x у порівнянні з  
 \*/

...nw

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

### Таблиця 1 (продовження)

```
    else if (delx >= dely[yy]) {
        col1[yy] = delx;
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        col1[yy] = dely[yy];
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].ijmp++;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
    if (xx == len0 && yy < len1) {
        /* last col
        */
        if (endgaps)
            col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
        if (col1[yy] > smax) {
            smax = col1[yy];
            dmax = id;
        }
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
```

```

        dmax = id;
    }
    tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
    (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
    (void) free((char *)col1);
}

```

### Таблиця 1 (продовження)

```

/*
 *
 * print() - тільки видимі за межами цього модуля
 *
 * static:
 * getmat() - відстеження кращого шляху, лічильник невідповідностей: print()
 * pr_align() - печатка описаного вирівнювання в матриці p[]: print()
 * dumpblock() - роздрукування блоку рядків із числами, stars: pr_align()
 * nums() - виділення номера рядка: dumpblock()
 * putline() - виділення рядка (назва, [num], послідовність, [num]): dumpblock()
 * stars() - вставка лінії із зірочками: dumpblock()
 * stripname() - смужка будь-якого шляху й приставка з послідовності
 */

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* максимальний вихідний рядок */
#define P_SPC 3 /* відстань між назвою або номером і послідовністю */

extern _day[26][26];
int olen; /* установка довжини вихідного рядка */
FILE *fx; /* вихідний файл */

```

```

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

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

```

**Таблиця 1 (продовження)**

```

/*
 * відстеження кращого шляху, лічильник невідповідностей
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;     /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
    double   pct;
    register      n0, n1;
    register char *p0, *p1;
    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* гомологія pct:
     * при накладенні штрафу, основа є самою короткою послідовністю
     * також скидання зайвих показників і одержання більш короткого основного
     елемента
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

**Таблиця 1 (продовження)**

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);    ...getmat
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per
base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per
residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "":"s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "":"s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static      nm;          /* відповістей в основному елементі – для перевірки */
static      lmax;        /* довжина незаповнених імен файлів */
static      ij[2];       /* індекс стрибка для шляху */
static      nc[2];       /* число на початку поточного рядка */
static      ni[2];       /* поточний номер елемента – для утворення гепу */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr для поточного елемента */
static char *po[2];      /* ptr для наступної вихідної діаграми */
static char out[2][P_LINE]; /* вихідний рядок */
static char star[P_LINE]; /* установлюється stars() */
/*
* печать описанного выравнивания в структурном пути pp[]
*/
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;
    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

**pr\_align**

Таблиця 1 (продовження)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * чи є в нас більше цієї послідовності?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* ведучий пропуск */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* в гепі */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* використовуємо елемент послідовності
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * чи перебуваємо ми на наступному гепі цієї послідовності?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * необхідно об'єднати всі гепи
                 * у цьому положенні
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}
/*
 * роздруковка блоку рядків із числами, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr\_align

dumpblock

Таблиця 1 (продовження)

```

...dumpblock
(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}
/*
* виділення номера рядка: dumpblock()
*/
static
nums(ix)                                nums
{
    int    ix;    /* індекс у рядку послідовності [] */
    char    nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;
    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}
/*
* виділення рядка (назва, [num], послідовність, [num]): dumpblock()
*/
static
putline(ix)                                putline
{
    int    ix;

```

Таблиця 1 (продовження)

...putline

```

    int i;
    register char *px;

    for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
        (void) putc(*px, fx);
    for (; i < lmax+P_SPC; i++)
        (void) putc(' ', fx);

    /* відлік ведеться від 1:
     * ni[] є поточним елементом (від 1)
     * nc[] є числом на початку поточного рядка
     */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
        (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * уведення лінії зірочок (послідовність завжди в out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

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

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

```



**Таблиця 1 (продовження)**

/\*

\* смуга шляху або приставка з pn, повернення len: pr\_align()

**static**

stripname(pn)

**stripname****char** \*pn; /\* имя файла (можно пути) \*/

{

**register char** \*px, \*py;

py = 0;

**for** (px = pn; \*px; px++)**if** (\*px == '/')

py = px + 1;

**if** (py)

(void) strcpy(pn, py);

**return**(strlen(pn));

}

**Таблиця 1 (продовження)**

```

/*
 * cleanup() - очищення будь-якого тимчасового файлу
 * getseq() - зчитування в послідовності, ДНК, довжині, максимальній довжині
 * g_calloc() -i calloc() з перевіркою помилок
 * readjumps() - одержання гарних стрибків, при необхідності, з тимчасового файлу
 * writejumps() - запис заповненої матриці стрибків у тимчасовий файл: pw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* тимчасовий файл для стрибків */
FILE *fj;
int cleanup(); /* очищення тимчасового файлу */
long lseek();
/*
 * видалення будь-якого тимчасового файлу у випадку перевищення розміру
 */
cleanup(i)
    int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}
/*
 * зчитування в послідовності, ДНК, довжині, максимальній довжині
 * пропуск рядків, що починаються з «;», «<» або «>»
 * послідовність у верхньому або нижньому регістрі
 */
char *
getseq(file, len)
    char *file; /* имя файла */
    int *len; /* длина последовательности */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

Таблиця 1 (продовження)

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (tlen/3);
return(pseq+4);
}
char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* програма, що викликає стандартні */
int nx, sz;         /* номер і розмір елементів */
{
    char *px, *calloc();
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg,
nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * одержання кінцевих стрибків з dx[] або тимчасового файлу, установка pp[], скидання
dmax: main()
 */
readjumps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;
    if (fj) {
        (void) fclose(fj);

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

```

...getseq

g\_alloc

readjumps

Таблиця 1 (продовження)

```

...readjumps
    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset,
sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1 */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
        /* ігнорування MAXGAP при одержанні фінальних генів */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ігнорування MAXGAP при одержанні фінальних генів */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}
/* порядок стрибків у зворотному порядку */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

Таблиця 1 (продовження)

```

/*
запис заповненої структури стрибка в попередній (якщо є): nw()
*/
writejumps(ix)                                writejumps
int ix;
{
    char *mktemp();

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

```

### III. Композиції й способи винаходу

Винахід описує антитіла до FcRH5 або їхні функціональні фрагменти, а також спосіб їхнього використання в лікуванні гематобластозів.

В одному аспекті винахід описує антитіло, що зв'язується, переважно специфічно, з кожним з описаних вище або нижче поліпептидів. У деяких випадках антитіло представлене моноклональним антитілом, фрагментом антитіла, включаючи фрагменти Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> і Fv, діатілом, антитілом з одним доменом, химерним антитілом, гуманізованим антитілом, однокланцюговим антитілом або антитілом, що конкурентним чином інгібує зв'язування поліпептидного антитіла до FcRH5 з відповідною антигенною детермінантою. Антитіла даного винаходу можуть бути в деяких випадках представлені у вигляді кон'югатів із препаратами-інгібіторами росту або цитотоксичним агентом, наприклад, токсином, включаючи, наприклад, аурістатин, майтансиноід, похідну долостатина або каліхіміцина, антибіотик, радіоактивний ізотоп, нуклеолітичний фермент або т.п. Антитіла даного винаходу можуть у деяких випадках вироблятися в клітинах CHO або бактеріальних клітинах, і переважно індукувати загибель клітини, з якої вони зв'язуються. З метою визначення, антитіла даного винаходу можуть бути позначені, приєднані до твердого субстрату або т.п.

В одному аспекті винаходу описане гуманізоване антитіло до FcRH5, при цьому моновалентна афінність антитіла до FcRH5 (наприклад, афінність антитіла у вигляді фрагмента Fab до FcRH5) практично така ж, що й моновалентна афінність мишачого антитіла (наприклад, афінність мишачого антитіла у вигляді фрагмента Fab до FcRH5) або химерного антитіла (наприклад, афінність химерного антитіла у вигляді фрагмента Fab до FcRH5), і таке гуманізоване антитіло до FcRH5 складається істотно з послідовностей варіабельних доменів легкого ланцюга й важкого ланцюга, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 20).

В іншому аспекті винаходу описане гуманізоване антитіло до FcRH5, при цьому моновалентна афінність антитіла до FcRH5 (наприклад, афінність антитіла у вигляді фрагмента Fab до FcRH5) нижче, наприклад, щонайменше, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 або 60 разів, ніж моновалентна афінність мишачого антитіла (наприклад, афінність мишачого антитіла у вигляді фрагмента Fab до FcRH5) або химерного антитіла (наприклад, афінність химерного антитіла у вигляді фрагмента Fab до FcRH5), і таке гуманізоване антитіло до FcRH5 складається істотно з послідовностей варіабельних доменів легкого ланцюга й важкого ланцюга, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 20).

В іншому аспекті винаходу описане гуманізоване антитіло до FcRH5, при цьому моновалентна афінність антитіла до FcRH5 (наприклад, афінність антитіла у вигляді фрагмента Fab до FcRH5) вище, наприклад, щонайменше, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 разів, ніж моновалентна афінність мишачого антитіла (наприклад, афінність мишачого антитіла у вигляді фрагмента Fab до FcRH5) або химерного антитіла (наприклад, афінність химерного антитіла у вигляді фрагмента Fab до FcRH5), і таке гуманізоване антитіло до FcRH5 складається істотно з послідовностей варіабельних доменів легкого ланцюга й важкого ланцюга, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 20).

В одному аспекті винаходу описане гуманізоване антитіло до FcRH5, при цьому афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) практично така ж, що й афінність мишачого антитіла (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) або химерного антитіла (наприклад, афінність химерного антитіла у вигляді фрагмента Fab до FcRH5) у його двовалентній формі, і таке гуманізоване антитіло до FcRH5 складається істотно з послідовностей варіабельних доменів легкого ланцюга й важкого ланцюга, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 20).

В іншому аспекті винаходу описане гуманізоване антитіло до FcRH5, при цьому афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) нижче, наприклад, щонайменше, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 або 60 разів, ніж афінність мишачого антитіла (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) або химерного антитіла (наприклад, афінність химерного антитіла у вигляді фрагмента IgG до FcRH5), і таке гуманізоване антитіло до FcRH5 складається істотно з послідовностей варіабельних доменів легкого ланцюга й важкого ланцюга, як це зазначено на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 20).

В іншому аспекті винаходу описане гуманізоване антитіло до FcRH5, при цьому афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) вище, наприклад, щонайменше, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 разів, ніж афінність мишачого антитіла (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) або химерного антитіла (наприклад, афінність химерного антитіла у вигляді фрагмента IgG до FcRH5) у його двовалентній формі, і таке гуманізоване антитіло до FcRH5 складається істотно з послідовностей варіабельних доменів легкого ланцюга й важкого ланцюга, як це зазначено на фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і фігурі 10 (SEQ ID NO: 20).

В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить 0,4 nM. В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить  $0,4 \pm 0,04$  nM.

[illegible]

В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить 0,2 nM. В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить  $0.2 \pm 0.02$  nM.

[illegible]

[0002] В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить 0,5 нМ. В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить 0,5±0.1 нМ.

В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить 0,4 nM або більше. В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить 0,5 nM або більше. В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить 0,6 nM або більше. В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла до FcRH5 у його двовалентній формі (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить 0,7 nM або більше. В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване

антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла в його двовалентній формі до FcRH5 (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить від 0,3 нМ до 0,7 нМ. В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла в його двовалентній формі до FcRH5 (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить від 0,4 нМ до 0,6 нМ. В іншому своєму аспекті винахід описує гуманізоване антитіло до FcRH5, що відрізняється тим, що афінність антитіла в його двовалентній формі до FcRH5 (наприклад, афінність антитіла у вигляді IgG до FcRH5) становить від 0,5 нМ до 0,55 нМ.

В одному аспекті винаходу моновалентна афінність мишачого антитіла до FcRH5 практично така ж, що й афінність зв'язування фрагмента Fab, що складається з послідовностей варіабельного домену, представлених на Фігурі 9 (SEQ ID NO: 18) і Фігурі 10 (SEQ ID NO: 20).

Як це добре відомо в науці, афінність зв'язування ліганда зі своїм рецептором може визначатися з використанням кожного із цілого ряду аналізів і виражена з використанням цілого ряду кількісних значень. Відповідно до цього, в одному варіанті втілення винаходу афінність зв'язування виражається у вигляді значень Kd і відображає властиву антитілу афінність зв'язування (наприклад, зі зведеними до мінімуму ефектами авідності). Як правило й переважним чином, афінність зв'язування вимірюється *in vitro* з використанням асоційованих клітин або без них. Як це більш докладно описується нижче, кратна різниця в значенні афінності зв'язування може бути визначена кількісно у вигляді співвідношення значення моновалентної афінності зв'язування гуманізованого антитіла (наприклад, у формі Fab) і значення моновалентної афінності зв'язування еталонного антитіла/антитіла порівняння (наприклад, у формі Fab) (наприклад, мишаче антитіло, що має донорські послідовності гіперваріабельної ділянки), при цьому значення афінності зв'язування визначаються при однакових умовах аналізу. Таким чином, в одному варіанті втілення винаходу кратна різниця в значенні афінності зв'язування визначається як співвідношення значень Kd гуманізованого антитіла у формі Fab і згаданого еталонного антитіла/антитіла порівняння Fab. Наприклад, в одному варіанті втілення винаходу, якщо антитіло по винаходу (A) має значення афінності, що в "3 рази менше", ніж афінність еталонного антитіла (M), і якщо значення Kd для A становить 3x, значення Kd для M буде становити 1x, і співвідношення Kd для A до Kd для M буде становити 3:1. З іншого боку, в одному варіанті втілення винаходу якщо антитіло по винаходу (C) має значення афінності, що в "3 рази менше", ніж афінність еталонного антитіла (R), і якщо значення Kd для C становить 1x, значення Kd для R буде становити 3x, і співвідношення Kd для C до Kd для R буде становити 1:3. Для одержання значень афінності зв'язування може використовуватися цілий ряд аналізів, відомих науці, включаючи описані тут аналізи, наприклад, Біосоре, радіоімунаналіз (RIA) і ІФА.

В одному аспекті винаходу описане антитіло, що зв'язується з FcRH5, і таке антитіло включає:

(а) щонайменше, один, два, три, чотири, п'ять або шість ГБУ, вибраних з наступної групи:

(i) HVR-L1, що включає послідовність KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR-L2, що включає послідовність SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii) HVR-L3, що включає послідовність QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR-H1, що включає послідовність GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 69)

(v) HVR-H2, що включає послідовність ATISSGGSILTFYLDVSR (SEQ ID NO: 70); і

(vi) HVR-H3, що включає послідовність PIPDYALDY (SEQ ID NO: 71).

В одному варіанті втілення винаходу HVR-L1 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 26. В одному варіанті втілення винаходу HVR-L2 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 27. В одному варіанті втілення винаходу HVR-L3 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 28. В одному варіанті втілення винаходу HVR-H1 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 35. В одному варіанті втілення винаходу HVR-H2 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 36. В одному варіанті втілення винаходу HVR-H3 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 37. В одному варіанті втілення винаходу антитіло по винаходу, що складається з таких послідовностей (у зазначеній тут комбінації) представлено гуманізованим або людським антитілом.

В одному аспекті винаходу описане антитіло, що зв'язується з FcRH5, і таке антитіло включає:

(а) щонайменше, один, два, три, чотири, п'ять або шість ГБУ, вибраних з наступної групи:

(i) HVR-L1, що включає послідовність KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 26)

(ii) HVR-L2, що включає послідовність SASYRYT (SEQ ID NO: 27)

(iii) HVR-L3, що включає послідовність QQHFSSPRT (SEQ ID NO: 28)

(iv) HVR-H1, що включає послідовність GFTFSSYAVS (SEQ ID NO: 69)



(v) HVR-H2, що включає послідовність ATISSGGSLTFYLDVSR (SEQ ID NO: 70); і

(vi) HVR-H3, що включає послідовність PIPDYYALDY (SEQ ID NO: 71); і

(б) щонайменше, один варіант ГБУ, у якому послідовність такого варіанта ГБУ включає модифікацію, щонайменше, одного залишку послідовності SEQ ID NO: 26, 27, 28, 69, 70 або 71.

5 В одному варіанті втілення винаходу HVR-L1 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 26. В одному варіанті втілення винаходу HVR-L2 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 27. В одному варіанті втілення винаходу HVR-L3 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 28. В одному варіанті втілення винаходу HVR-H1 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 35. В одному варіанті втілення винаходу HVR-H2 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 36. В одному варіанті втілення винаходу HVR-H3 антитіла по винаходу включають послідовність SEQ ID NO: 37. В одному варіанті втілення винаходу антитіло по винаходу, що складається з таких послідовностей (у зазначеній тут комбінації), представлено гуманізованим або людським антитілом.

15 В одному аспекті винаходу описане антитіло, що складається з одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або шести ГБУ, при цьому кожний ГБУ істотно складається з послідовності, вибраної із групи послідовностей SEQ ID NO: 26, 27, 28, 35, 36 або 37, а SEQ ID NO: 26 відповідає HVR-L1, SEQ ID NO: 27 відповідає HVR-L2, SEQ ID NO: 28 відповідає HVR-L3, SEQ ID NO: 35 відповідає HVR-H1, SEQ ID NO: 36 відповідає HVR-H2, і SEQ ID NO: 37 відповідає HVR-H3. В одному варіанті втілення винаходу антитіло по винаходу складається з HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3, при цьому кожний такий ГБУ включає послідовність SEQ ID NO: 26, 27, 28, 35, 36 і 37.

Варіанти ГБУ в антитілі винаходу можуть мати модифікації одного або декількох залишків у ГБУ.

25 Терапевтичний агент для використання в суб'єкті-хазяїні переважним чином викликає невелику імунну відповідь щодо агента в зазначеному суб'єкті або не викликає імунну відповідь. В одному варіанті втілення винаходу описаний подібний агент. Наприклад, в одному варіанті втілення винаходу описане гуманізоване антитіло, що викликає й/або, як очікується, буде викликати відповідь до людського антимишачого антитіла (НАМА) при досить зниженій концентрації в порівнянні з антитілом, що складається з послідовності SEQ ID NO: 18 і 20, в організм-хазяїна. В іншому прикладі винахід описує гуманізоване антитіло, що викликає й/або, як очікується, що буде викликати мінімальну відповідь до людського антимишачого антитіла (НАМА) або не викликати таку відповідь. В одному прикладі антитіло по винаходу викликає відповідь до антимишачого антитіла, і така відповідь викликається при концентрації на рівні або менш клінічно припустимої концентрації.

35 Гуманізоване антитіло по винаходу може включати одну або декілька людських і/або людських консенсусних послідовностей гіперваріабельної ділянки (наприклад, каркасної ділянки) варіабельного домену важкого й/або легкого ланцюга. У деяких варіантах втілення винаходу в людській і/або людської консенсусної послідовності інших ділянок (не гіперваріабельних) є присутнім одна або кілька додаткових модифікацій. В одному варіанті втілення винаходу варіабельний домен важкого ланцюга антитіла по винаходу складається з консенсусної послідовності каркасної ділянки людини, при цьому в одному варіанті втілення винаходу така послідовність представлена консенсусною послідовністю каркасної ділянки III підгрупи. В одному варіанті втілення винаходу антитіло по винаходу складається з консенсусної послідовності каркасної ділянки III підгрупи з модифікованою, щонайменше, однією амінокислотою в одному положенні. В одному варіанті втілення винаходу варіабельний домен легкого ланцюга антитіла по винаходу складається з консенсусної послідовності каркасної ділянки людини, при цьому в одному варіанті втілення винаходу така послідовність представлена консенсусною послідовністю каркасної ділянки κI. В одному варіанті втілення винаходу антитіло по винаходу складається з варіантної консенсусної послідовності каркасної ділянки κI з модифікованою, щонайменше, однією амінокислотою в одному положенні.

Крім того, науці відомо, що положення амінокислоти/розмежування гіперваріабельної ділянки антитіла може варіювати залежно від контексту й різних відомих науці визначень (більш докладний опис представлений нижче). Деякі положення у варіабельному домені можуть бути 55 представлені гібридними гіперваріабельними положеннями, і такі положення включені в гіперваріабельну ділянку при тих самих критеріях; крім того, такі гібридні гіперваріабельні положення перебувають за межами гіперваріабельної ділянки при різних критеріях. Одне або кілька таких положень також можуть відзначатися в розширених гіперваріабельних ділянках (як це зазначено нижче). Винахід описує антитіла, що складаються з модифікацій у таких гібридних 60 гіперваріабельних положеннях. В одному варіанті втілення винаходу такі гіперваріабельні

положення включають одне або кілька положень 26-30, 33-35В, 47-49, 57-65, 93, 94 і 101-102 у варіабельному домені важкого ланцюга. В одному варіанті втілення винаходу такі гібридні гіперваріабельні положення включають одне або кілька положень 24-29, 35-36, 46-49, 56 і 97 у варіабельному домені легкого ланцюга. В одному варіанті втілення винаходу антитіло по

винаходу складається з варіанта консенсусної послідовності каркасної ділянки підгрупи з модифікованими одним або декількома гібридними гіперваріабельними положеннями.

В одному аспекті антитіло по винаходу складається з варіабельного домену важкого ланцюга, що включає варіантну консенсусну послідовність каркасної ділянки підгрупи III людини, модифіковану в одному або декількох положеннях 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 і

101.

В одному аспекті антитіло по винаходу складається з варіабельного домену легкого ланцюга, що включає варіантну консенсусну послідовність каркасної ділянки підгрупи I капа людини, модифіковану в одному або декількох положеннях 24, 27-29, 56 і 97.

В одному аспекті антитіло по винаходу складається з варіабельного домену важкого ланцюга, що включає варіантну консенсусну послідовність каркасної ділянки підгрупи III людини, модифіковану в положеннях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 або положеннях 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 і 101.

В одному аспекті антитіло по винаходу складається з варіабельного домену легкого ланцюга, що включає варіантну консенсусну послідовність каркасної ділянки підгрупи I капа людини, модифіковану в положенні 1, 2, 3, 4, 5 або у всіх положеннях 24, 27-29, 56 і 97.

Антитіло по винаходу може складатися з будь-яких підходящих консенсусних послідовностей каркасної ділянки легкого ланцюга людини, і таке антитіло має необхідні біологічні характеристики (наприклад, необхідною афінністю зв'язування). В одному варіанті втілення винаходу антитіло по винаходу складається, щонайменше, з ділянки (або повної) послідовності каркасної ділянки легкого капа-ланцюга людини. В одному варіанті втілення винаходу антитіло по винаходу складається, щонайменше, з ділянки (або повної) консенсусної послідовності каркасної ділянки підгрупи I капа-ланцюга людини.

В одному аспекті антитіло по винаходу складається з варіабельних доменів важкого й/або легкого ланцюга (послідовності їх каркасних ділянок), як це показано на Фігурах 9-11.

В одному аспекті антитіло по винаходу представлено гуманізованим антитілом до FcRH5, кон'югованим із цитотоксичним агентом. В одному аспекті антитіло по винаходу до FcRH5, кон'юговано із цитотоксичним агентом, інгібує прогресування пухлини в ксенотрансплантатах.

В одному аспекті втілення винаходу гуманізоване антитіло й химерне антитіло є моновалентними. В одному варіанті втілення винаходу гуманізоване антитіло й химерне антитіло включають одну ділянку Fab, приєднану до ділянки Fc. В одному варіанті втілення винаходу еталонне химерне антитіло складається з послідовностей варіабельного домену, відображених на Фігурі 2 (SEQ ID NO: 11) і Фігурі 4 (SEQ ID NO: 13), приєднаних до ділянки Fc людини. В одному варіанті втілення винаходу ділянка Fc людини представлена ділянкою IgG (наприклад, IgG1, 2, 3 або 4).

В одному аспекті винахід описує антитіло, що складається з варіабельного домену важкого ланцюга, що включає послідовність HVR1-HC, HVR2-HC і/або HVR3-HC, зазначену на Фігурах 9-11. В одному варіанті втілення винаходу варіабельний домен включає послідовність FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC і/або FR4-HC, зазначену на Фігурах 9-11. В одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з послідовності CH1 і Fc, як це зазначено на Фігурі 11. В одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з варіабельного домену важкого ланцюга, що включає послідовність HVR1-HC, HVR2-HC і/або HVR3-HC, зазначену на Фігурах 9-11, і послідовність FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC і/або FR4-HC, зазначену на Фігурах 10-11. В одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з варіабельного домену важкого ланцюга, що включає послідовність HVR1-HC, HVR2-HC і/або HVR3-HC, зазначену на Фігурах 10-11, і послідовність CH1 і/або Fc, зазначену на Фігурі 11. В одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з варіабельного домену важкого ланцюга, що включає послідовність HVR1-HC, HVR2-HC і/або HVR3-HC, зазначену на Фігурах 10-11, послідовність FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC і/або FR4-HC, зазначену на Фігурах 10-11, і послідовність CH1 і/або Fc, зазначену на Фігурі 11.

У ще одному аспекті винахід описує антитіло, що складається з варіабельного домену легкого ланцюга, що включає послідовність HVR1-LC, HVR2-LC і/або HVR3-LC, зазначену на Фігурах 9 і 11. В одному варіанті втілення винаходу варіабельний домен включає послідовність FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC і/або FR4-LC, зазначену на Фігурах 9 і 11. В одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з послідовності CL1, як це зазначено на Фігурі 11. В одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з варіабельного домену легкого ланцюга, що включає послідовність HVR1-LC, HVR2-LC і/або HVR3-LC, і послідовність FR1-LC, FR2-LC, FR3-

LC і/або FR4-LC, зазначену на Фігурах 9 і 11. В одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з варіабельного домену легкого ланцюга, що включає послідовність HVR1-LC, HVR2-LC і/або HVR3-LC, і послідовність CL1, зазначені на Фігурах 9 і 11. В одному варіанті втілення винаходу антитіло складається з варіабельного домену легкого ланцюга, що включає послідовність HVR1-LC, HVR2-LC і/або HVR3-LC, і послідовність FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC і/або FR4-LC, зазначені на Фігурах 9 і 11, і послідовність CL1, зазначену на Фігурі 11.

В одному аспекті антитіло по винаходу включає антитіла із включеним у ході рекомбінації цистеїном, у яких одна або більше амінокислот вихідного антитіла заміщені незв'язаною амінокислотою цистеїн, як це описано в WO2006/034488; US 2007/0092940 (включене сюди у всій своїй повноті за допомогою посилання). За допомогою рекомбінації може бути отримана будь-яка форма антитіла до FcRH5, тобто мутувана форма. Наприклад, фрагмент вихідного антитіла Fab може бути отриманий у ході рекомбінації із включеним у нього цистеїном (у даній заявці такий фрагмент вказується як "тіоFab"). Подібним чином, вихідне моноклональне антитіло може бути отримане в процесі рекомбінації з утворенням "ТіоМАТ". Слід зазначити, що одиночні крапкові мутації дозволяють включити в тіоFab цистеїн у ході рекомбінації, у той час як такі одиночні крапкові мутації дозволяють включити в ТіоМАТ два залишки цистеїна завдяки димерній структурі антитіла IgG. Антитіла до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном включають моноклональні антитіла, гуманізовані або химерні моноклональні антитіла й антигензв'язуючі фрагменти антитіл, поліпептиди злиття й аналоги, які переважним чином зв'язуються з поліпептидами FcRH5, що перебувають на клітинах. З іншого боку, антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном може включати цистеїн у зазначеному тут положенні антитіла або Fab, завдяки схемі послідовності й/або виборі антитіла без необхідності зміни вихідного антитіла, наприклад, з використанням схеми й вибору антитіла з бібліотеки фагових дисплеїв, або за допомогою структури послідовностей каркасних і константних ділянок легкого ланцюга й/або важкого ланцюга антитіла de novo. Антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном складається з однієї або більше незв'язаних амінокислот цистеїн зі значенням реакційної здатності тіолової групи в діапазоні від 0,6 до 1,0, від 0,7 до 1,0 або від 0,8 до 1,0. Незв'язана амінокислота цистеїн представлена залишком цистеїна, що був введений у вихідне антитіло в ході рекомбінації й не є частиною дисульфідного містка. Антитіла з введенням у ході рекомбінації цистеїном можуть використовуватися для приєднання цитотоксичних сполук і/або сполук, що використовували для візуалізації, у місці приєднаного в ході рекомбінації цистеїна за допомогою, наприклад, малеїмиду або галогенацетила. Нуклеофільна реакційна здатність функціональної тіолової групи залишку Цис відносно групи малеїмиду приблизно в 1000 разів вище в порівнянні з функціональністю будь-якої іншої амінокислоти в білку, наприклад, аміногрупи залишків лізіна або аміногрупи на N-кінці. Специфічна функціональність тіолової групи в реагентах йодоацетила й малеїміда може спричинитися реакцію з аміногрупами, однак для цього потрібно більше високе значення pH (>9,0) й більш тривалий час реакції (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

В одному аспекті винаходу антитіло до FcRH5 з введенням у ході рекомбінації цистеїном включає цистеїн у підходящому положенні, при цьому таке положення пронумероване в легкому ланцюзі згідно Kabat et al. (див. Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) і згідно системи нумерації EU у важкому ланцюзі (включаючи ділянку Fc) (див. Kabat et al. (1991) вище).

В одному аспекті винахід включає антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном, що включає одну або кілька незв'язаних амінокислот цистеїн, при цьому антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном зв'язується з поліпептидом FcRH5, і таке антитіло одержують за допомогою процесу, що складається із заміни одного або декількох амінокислотних залишків вихідного антитіла до FcRH5 цистеїном, при цьому вихідне антитіло включає, щонайменше, одну послідовність HVR, як це описано вище.

У певному аспекті винахід описує антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном, що складається з амінокислотної послідовності, що має, щонайменше, 80 % ідентичність, або, в інших випадках, щонайменше, приблизно 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність у порівнянні з послідовністю антитіла повної довжини із включеним у ході рекомбінації цистеїном, як це описано вище, або послідовністю антитіла із включеним у ході рекомбінації цистеїном без сигнального пептиду.

У ще одному аспекті винахід описує ізольоване антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном, що складає з амінокислотної послідовності, що кодується нуклеотидною послідовністю, що гібридизує у комплемент молекули ДНК, що кодує (а) антитіло із включеним у ході рекомбінації цистеїном і амінокислотною послідовністю повної довжини (як це описано в

даній заявці), (б) послідовність антитіла із включеним у ході рекомбінації цистеїном при відсутності сигнального пептиду (як це описано в даній заявці), (в) позаклітинний домен трансмембранного білка антитіла із включеним у ході рекомбінації цистеїном з/без сигнального пептиду (як це описано в даній заявці), (г) амінокислотну послідовність, що кодується будь-якою

5 послідовністю нуклеїнових кислот (як це описано в даній заявці), або (д) будь-який інший обумовлений специфічним чином фрагмент амінокислотної послідовності антитіла повної довжини із включеним у ході рекомбінації цистеїном (як це описано в даній заявці).

У специфічному аспекті винахід описує ізольоване антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном без N-термінальної сигнальної послідовності й/або без початкового метіоніну, і таке антитіло кодується нуклеотидною послідовністю, що кодує амінокислотну послідовність (як це описано в даній заявці). Крім того, також описані процеси одержання такого антитіла, і такі процеси містять у собі культивування клітини-хазяїна, що містить вектор, який, у свою чергу, складається з відповідної молекули амінокислоти, що кодує в підходящих для експресії такого антитіла із включеним у ході рекомбінації цистеїном умовах, а також для відновлення антитіла із включеним у ході рекомбінації цистеїном з культури клітин.

10 15

Інший аспект винаходу описує ізольоване антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном, і таке антитіло або не містить трансмембранний домен, або такий трансмембранний домен інактивований. Крім того, також описані процеси одержання такого антитіла, і такі процеси містять у собі культивування клітини-хазяїна, що містить вектор, що, у свою чергу, складається з відповідної молекули амінокислоти, що кодує в підходящих для експресії такого антитіла із включеним у ході рекомбінації цистеїном умовах, а також для відновлення антитіла із включеним у ході рекомбінації цистеїном з культури клітин.

20

В інших аспектах винахід описує ізольовані химерні антитіла до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном, і таке антитіло злите з гетерологічним (не FcRH5) поліпептидом. Приклади таких химерних молекул складаються з кожного з описаних вище антитіл із включеним у ході рекомбінації цистеїном, злитих з гетерологічним поліпептидом, наприклад, послідовністю антигенною детермінанти або ділянкою Fc імуноглобуліну.

25

Антитіло до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном може бути представлено моноклональним антитілом, фрагментом антитіла, химерним антитілом, гуманізованим антитілом, однокланцевим антитілом або антитілом, що конкурентним чином інгібує зв'язування поліпептидного антитіла до FcRH5 з відповідною антигенною детермінантою. Антитіла даного винаходу можуть бути в деяких випадках представлені у вигляді кон'югатів із препаратами-інгібіторами росту або цитотоксичним агентом, наприклад, токсином, включаючи, наприклад, аурістатин, майтансиноід, похідне долостатина або каліхіміцина, антибіотик, радіоактивний ізотоп, нуклеолітичний фермент або т.п. Антитіла даного винаходу можуть у деяких випадках вироблятися в клітинах CHO або бактеріальних клітинах, і переважно інгібують ріст або проліферацію або індують загибель клітини, з якої вони зв'язуються. З метою діагностики, антитіла даного винаходу можуть бути позначені, приєднані до твердого субстрату або т.п.

30 35 40

В інших аспектах даний винахід описує вектори, що складаються із ДНК, що кодує кожний з описаних тут антитіл до FcRH5 і антитіл до FcRH5 із включеним у ході рекомбінації цистеїном. Також описані клітини-хазяї, що включають такий вектор. Наприклад, клітини-хазяї можуть бути представлені клітинами яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітинами E. coli або дріжджовими клітинами. Процес одержання кожного з описаних тут поліпептидів також описаний і складається з культивування клітин-хазяїв в умовах, що підходять для експресії необхідного поліпептиду й відновлення необхідного поліпептиду з культури клітин.

45

Антитіла із включеним у ході рекомбінації цистеїном можуть використовуватися в лікуванні раку й включають антитіла, специфічні щодо клітинної поверхні й трансмембранних векторів, а також пухлиноасоційованих антигенів (ПАА). Такі антитіла можуть використовуватися як незв'язані антитіла (некон'югованих з молекулою препарату або міткою антитіл) або в якості кон'югатів антитіло-препарат (КАТ). Антитіла по винаходу із включеним у ході рекомбінації цистеїном можуть бути сайт-специфічними й можуть бути ефективно з'єднані з тіол-реактивним реагентом. Тіол-реактивний (тіоловий) реагент може бути представлений багатофункціональним агентом-лінкером, що захоплений реагентом-міткою, флуорофором або проміжною речовиною препарату-лінкера. Антитіло із включеним у ході рекомбінації цистеїном може бути позначено обумовленою міткою, що іммобілізоване на твердофазному носії, і/або кон'юговано з молекулою препарату. Реакційна здатність тіола може бути узагальнена для будь-якого антитіла, у якому заміна амінокислот реакційноздатною амінокислотою цистеїн може здійснюватися в межах наступних діапазонів легкого ланцюга: L10-L20, L105-L115, L109-L119, L116-L126, L122-L132, L163-L173, L200-L210; а також у межах наступних діапазонів важкого

50 55 60

ланцюга: H1-H10, H18-H28, H79-H89, H107-H117, H109-H119, H111-H121, а також у ділянці Fc у діапазонах H270-H280, H366-H376, H391-401, при цьому нумерація положень амінокислот починається з положення 1 по системі нумерації Kabat (Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) і триває послідовно, як це описано в WO2006034488; US 2007/0092940. Реакційна здатність тіла може бути узагальнена для певних доменів антитіла, наприклад, константного домену легкого ланцюга (CL) і константних доменів важкого ланцюга CH1, CH2 і CH3. Заміна цистеїном призводить до встановлення значення реакційної здатності тіла 0,6 і вище й може бути отримана для константних доменів важких ланцюгів  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  і  $\mu$  інтактних антитіл IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, відповідно, включаючи наступні підкласи IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA і IgA2. Подібні антитіла і їхнє використання описане в WO2006/034488; US 2007/0092940.

Антитіла по винаходу із включенням у ході рекомбінації цистеїном переважно зберігають антигензв'язуючу здатність їхнього дикого типу, прототипу вихідного антитіла. Таким чином, антитіла із включенням у ході рекомбінації цистеїном здатні зв'язуватися, переважно специфічним чином, з антигенами. Такі антигени включають, наприклад, пухлиноасоційовані антигени (ПАА), рецепторні білки клітинної поверхні й інші молекули клітинної поверхні, трансмембранні білки, сигнальні білки, регуляторні фактори клітинної виживаності, регуляторні фактори проліферації клітин, молекули, що впливають на (наприклад, молекули, які мають відомий або підозрюваний вплив на функціональність) розвиток або диференціацію тканин, лімфокіни, цитокіни, молекули, що приймають участь у регуляції клітинного циклу, молекули, що беруть участь в утворенні й розвитку судин, і молекули, що впливають (наприклад, молекули, які мають відомий або підозрюваний вплив на функціональність) на ангиогенез. Пухлиноасоційований антиген може бути представлений фактором кластера диференціювання (тобто білком CD, включаючи, але не обмежуючись, FcRH5). Антитіла по винаходу до FcRH5 із включенням у ході рекомбінації цистеїном переважно зберігають антигензв'язуючу здатність їхнього прототипу - вихідного антитіла до FcRH5. Таким чином, антитіла по винаходу до FcRH5 із включенням у ході рекомбінації цистеїном здатні зв'язуватися, переважно специфічним чином, з антигенами FcRH5, включаючи ізоформи FcRH5 людини бета й/або альфа, включаючи випадки експресії таких антигенів на поверхні клітин, включаючи, без обмеження, В-клітини.

В одному аспекті антитіла по винаходу можуть бути кон'юговані з будь-якою молекулою-міткою, що може бути ковалентним чином приєднана до антитіла за допомогою реакційноздатної молекули, активованої молекули або реакційноздатної тілової групи цистеїна (Singh et al (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL). Приєднана мітка може використовуватися для: (i) забезпечення обумовленого сигналу; (ii) взаємодії із другою міткою для модифікації обумовленого сигналу, що забезпечений першою або другою міткою, наприклад, для забезпечення FRET (резонансного переносу енергії флуоресценції); (iii) стабілізації взаємодій або підвищення афінності зв'язування з антигеном або лігандом; (iv) для впливу на рухливість, наприклад, рухливість при електрофорезі, або клітинну проникність, щодо показника заряду, гідрофобності, форми й інших фізичних параметрів; або (v) для забезпечення захоплення молекули, для модуляції афінності ліганда, зв'язування антитіла/антигену або комплексоутворення іонів.

Мічені антитіла із включенням у ході рекомбінації цистеїном можуть використовуватися в діагностичних аналізах, наприклад, для визначення експресії окремого антигену в специфічних клітинах, тканинах або сироватці. Для діагностичного застосування антитіло буде звичайно позначено за допомогою обумовленої молекули. Доступний цілий ряд влучний, які звичайно групуються по наступних категоріях:

Радіоізотопи (радіонукліди), такі як  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$  або  $^{213}\text{Bi}$ . Антитіла, мічені радіоізотопом, використовуються у візуалізаційних експериментах із захопленням мішені-рецептора. Антитіло може бути позначено за допомогою реагентів-лігандів, які зв'язують, утворюють хелатні або інші комплекси з радіоактивним металом, у яких реагент реагує з введеною в ході рекомбінації тіловою групою антитіла з використанням способів, описаних в *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Ліганди, що призводять до утворення хелатних комплексів, можуть утворювати комплекс із іоном металу, включаючи DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA і TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Радіонукліди можуть бути піддані впливу за допомогою комплексоутворення з кон'югатами антитіло-препарат по винаходу (Wu et al (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146).

Лінкерні реагенти, такі як DOTA-малеїмід (4-малеїмідобутирамідобензил-DOTA) можуть бути

отримані за допомогою реакції амінобензил-DOTA з 4-малеїмідомасляною кислотою (Fluka), що активована ізопропілхлорформіатом (Aldrich) при дотриманні процедури Axworthy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807). Реагенти на основі DOTA-малеїміда реагують із незв'язаними залишками цистеїна в антитілах з введенням у ході рекомбінації цистеїном і забезпечують комплексоутворення антитіла з металом (Lewis et al (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86). Лінкерні хелатоутворюючі реагенти для мічення, такі як DOTA-NHS 1,4,7,10-тетраазоциклододекан-1,4,7,10-тетраоцтова кислота моно (N-гідроксисукцинімідний ефір)) представлені на ринку (Macrocyclics, Dallas, TX). Візуалізація зв'язування з рецептором мічених радіонуклідами антитіл може забезпечувати маркер шляху активації шляхом визначення й кількісного аналізу прогресованого нагромадження антитіл у тканині пухлини (Albert et al (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210). Кон'юговані радіометали можуть залишатися усередині клітини після розпаду лізосом.

Комплекси металів з лігандами, що підходять для використання як мітки антитіл для візуалізаційних експериментів описані в наступних джерелах: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich et al (1983) J. Immunol. Methods 65:147-157; Meares et al (1984) Anal. Biochem. 142:68-78; Mirzadeh et al (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65; Meares et al (1990) J. Cancer 1990, Suppl. 10:21-26; Izard et al (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350; Nikula et al (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90; Camera et al (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62; Kukis et al (1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110; Verel et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Camera et al (1994) J. Nucl. Med. 21:640-646; Ruegg et al (1990) Cancer Res. 50:4221-4226; Verel et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Lee et al (2001) Cancer Res. 61:4474-4482; Mitchell, et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112; Kobayashi et al (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111; Miederer et al (2004) J. Nucl. Med. 45:129-137; DeNardo et al (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90; Blend et al (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363; Nikula et al (1999) J. Nucl. Med. 40:166-76; Kobayashi et al (1998) J. Nucl. Med. 39:829-36; Mardirosian et al (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli et al (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20.

Флуоресціюючі мітки, такі як рідкоземельні хелати (хелати європію), типи флуоресцеїна, включаючи FITC, 5-карбоксифлуоресцеїн, 6-карбоксифлуоресцеїн, типи родаміна, включаючи TAMRA, дансіл, ліссамін, ціаніни, фікоеритрини, тейхаський червоний і їхні аналоги. Флуоресціюючі мітки можуть бути кон'юговані з антитілами, використовуючи способи, описані, наприклад, в Current Protocols in Immunology (див. вище). Флуоресціюючі барвники й флуоресціюючі реагенти для мічення включають реагенти, представлені на ринку компаніями Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) і Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

Також описані або представлені різні мітки фермент-субстрат (US 4275149). Фермент звичайно каталізує хімічну зміну хромогенного субстрату, і така зміна може бути обмірювана за допомогою різних способів. Наприклад, фермент може каталізувати зміну фарбування субстрату, що може бути обмірюване шляхом спектрофотометрії. З іншого боку, фермент може змінювати флуоресценцію або хемілюмінесценцію субстрату. Способи кількісного визначення зміни флуоресценції описані вище. Хемілюмінесцентний субстрат переходить в електронно-збуджений стан у ході хімічної реакції й може випромінювати світло, що і підлягає виміру (за допомогою хемілюмінометра, наприклад), або бути донором енергії для флуоресціюючого акцептора. Приклади ферментних міток включають люциферази (наприклад, люциферазу світлячка й бактеріальну люциферазу; US 4737456), люциферін, 2,3-дигідрофалазіндіони, малатдегідрогеназу, уреазу, пероксидазу, наприклад, пероксидазу хрому (ПХ), лужну фосфатазу (ЛФ),  $\beta$ -галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, оксидази сахарів (наприклад, глюкооксидазу, галактооксидазу, глюкозо-6-фосфат дегідрогеназу), гетероциклічні оксидази (такі як уриказу й ксантіоксидазу), лактопероксидазу, мікропероксидазу й т.п. Способи кон'югації ферментів з антитілами описані в O'Sullivan et al (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166.

Приклади комбінацій фермент-субстрат включають, наприклад, наступні:

(i) Пероксидаза хрому (ПХ) з перекисом водню як субстрат, при цьому перекис водню окисляє попередній барвник (наприклад, ортофенілендіамін (ОФД) або 3,3',5,5'-тетраметилбензидіна гідрохлорид (ТМВ));

(ii) Лужна фосфатаза (ЛФ) з пари-нітрофенілфосфатом в якості хромогенного субстрата; і

(iii)  $\beta$ -D-галактозидаза ( $\beta$ -D-Gal) із хромогенним субстратом (наприклад, р-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактозидазою) або флуорогенним субстратом 4-метилумбелліферил- $\beta$ -D-галактозидазою.

Фахівцями в даній області відомий цілий ряд інших комбінацій фермент-субстрат. Для одержання загальної інформації див. US 4275149 і US 4318980.

Мітка може бути непрямым чином кон'югована з боковим ланцюгом амінокислот, активованою ланцюгом амінокислот, антитілом з введенням у ході рекомбінації цистеїном і т.п. Наприклад, антитіло може бути кон'юговано з біотином, і одна із трьох великих категорій міток, зазначених вище, може бути кон'югована з авідіном або стрептавідіном, або навпаки. Біотин зв'язується виборчим чином зі стрептавідіном, і, таким непрямым чином мітка може бути кон'югована з антитілом. З іншого боку, для досягнення непрямої кон'югації мітки з варіантом поліпептиду, такий варіант поліпептиду бере участь у кон'югації з невеликим гаптенем (наприклад, дигоксином), і одна з різних типів зазначених вище міток кон'югує з варіантом поліпептиду до гаптену (наприклад, антитілом до дигоксину). Таким чином, може бути досягнута непряма кон'югація мітки з варіантом поліпептиду (Hermanson, G. (1996) in *Bioconjugate Techniques* Academic Press, San Diego).

Антитіло по даному винаходу може бути проаналізоване з використанням будь-якого відомого способу аналізу, наприклад, ІФА, аналізу конкурентного зв'язування, прямого й непрямого сендвіч-аналізу, а також аналізу імунопреципітації (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158, CRC Press, Inc.).

Мітка для визначення може використовуватися для локалізації, візуалізації й кількісного визначення зв'язування або в ході аналізу ідентифікації. Мічені антитіла по винаходу можуть розпізнавати рецептори клітинної поверхні. Інше використання антитіл, мічених для можливого визначення, полягає в способі, заснованому на імунозахопленні ланцюжка гранул, що полягає в кон'югації гранули з міченим флуоресцентною міткою антитілом і визначенні сигналу флуоресценції при зв'язуванні з лігандом. Подібні способи визначення зв'язування використовують ефект поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для виміру й виявлення взаємодій антигену з антитілом.

Мітки для визначення, такі як флуоресцентні барвники й хемілюмінесцентні барвники (Briggs et al (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," *J. Chem. Soc., Perkin-Trans.* 1:1051-1058) забезпечують наявність обумовленого сигналу й звичайно застосовуються для мічення антитіл, що володіють переважно наступними властивостями: (i) мічене антитіло повинне відтворювати дуже сильний сигнал з дуже слабким фоном, таким чином, можуть бути визначені невеликі кількості антитіл у ході аналізів з/без використання клітин; і (ii) мічене антитіло повинне бути фотостійким, щоб була можливість відзначати, моніторити і записувати флуоресціюючий сигнал без істотного знебарвлення кольору. Для застосувань, що припускають зв'язування міченого антитіла з мембранами або поверхнями клітин, особливо живих клітин, мітки переважно (iii) повинні мати гарну розчинність у воді для досягнення ефективної концентрації кон'югата й чутливості визначення, і (iv) бути нетоксичними щодо живих клітин, щоб не руйнувати нормальні процеси метаболізму клітин або не викликати передчасну загибель клітин.

Безпосереднє кількісне визначення інтенсивності клітинної флуоресценції й реєстрація явищ флуоресценції міток, наприклад, зв'язування кон'югатів пептид-барвник на клітинній поверхні, може проводитися з використанням системи (FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.), що автоматично змішує й зчитує результати, проводить нерадіоактивні аналізи з живими клітинами або гранулами (Miraglia, "Homogeneous cell-and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *J. of Biomolecular Screening* 4:193-204). Використання мічених антитіл також включає аналізи зв'язування рецепторів клітинної поверхні, аналізи імунозахоплення, твердофазні імуноферментні аналізи із флуоресцентним посиленням (FLISA), аналізи розщеплення каспазою (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:618-23; US 6372907), апоптозу (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) *J. Immunol. Methods* 184:39-51) і цитотоксичності. Аналіз способом флуорометрії в мікрообсязі може використовуватися для ідентифікації зниженої або підвищеної експресії молекули, дія якої спрямована на поверхню клітини (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *Anal. Biochem.* 271:143-51).

Мічені антитіла по винаходу використовуються в якості візуалізаційних біомаркерів і зондів у ході різних способів і процедур біомедицини і молекулярної візуалізації, таких як: (i) МРТ (резонансна-магнітно-резонансна томографія); (ii) мікроКТ (комп'ютерна томографія); (iii) СПЕКТ (однофотонна емісійна комп'ютерна томографія); (iv) ПЕТ (позитрон-емісійна томографія) Chen et al (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49; (v) біолюмінесценція; (vi) флуоресценція; і (vii) ультразвук. Імуносцинтиграфія є процедурою візуалізації, у ході якої антитіла, мічені радіоактивною речовиною, вводяться тварині або пацієнтові-людині, після чого одержують

зображення ділянок організму, у яких локалізується таке антитіло (US 6528624). Візуалізаційні біомаркери можуть бути обмірювані об'єктивним чином і оцінені як індикатор нормальних біологічних процесів, патогенетичних процесів або фармакологічної відповіді на терапевтичне втручання. Біомаркери можуть бути декількох типів: тип 0 представлений маркерами природної динаміки захворювання, які корелюють у поздовжньому напрямку з відомими клінічними індексами, наприклад, оцінкою MPT синовіального запалення при ревматоїдному артриті; маркери I типу охоплюють ефект втручання відповідно до механізму дії, навіть якщо такий механізм дії й не взаємозалежний із клінічним результатом; маркери II типу функціонують у якості сурогатних кінцевих точок, при цьому зміна або надходження сигналу біомаркера дозволяє пророчити біологічну користь для "валідації" необхідної відповіді, наприклад, для виміру ерозії кістки при ревматоїдному артриті з використанням КТ. Таким чином, візуалізаційні біомаркери можуть надати фармакодинамічну (ФД) терапевтичну інформацію про наступне: (i) експресія окремого білка; (ii) зв'язування препарату з окремим білком-мішенню, тобто вибірковість; і (iii) дані кліренсу й фармакокінетичні дані по періоду напівжиття. Переваги використання візуалізаційних маркерів *in vivo* у порівнянні з лабораторними біомаркерами наступні: неінвазивне лікування, можливість кількісного визначення, оцінка всього організму, можливість введення й оцінки повторної дози, тобто використання декількох тимчасових точок, а також потенційно стерпні ефекти результатів доклінічних (невеликі тварини) досліджень у клінічні (людина) дослідження. У деяких випадках застосування біовізуалізації витісняє або зводить до мінімуму кількість експериментів над тваринами в ході доклінічних досліджень.

Способи мічення пептидів широко відомі. Див. Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer et al (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin and New York; and Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al (2004) *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis et al (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier et al (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237.

Пептиди й білки, мічені двома молекулами, тобто флуоресціюючим репортером і гасильником, у достатньому ступені піддаються аналізу FRET (резонансний перенос енергії флуоресценції). Групи репортера звичайно представлені флуоресцентними барвниками, які переходять під дією певної довжини хвилі світла в збуджений стан і переносять енергію групі-акцептору, або гасильнику, разом з відповідним стоксовим зсувом для емісії при максимальній яскравості. Флуоресцентні барвники включають молекули з підвищеним ступенем ароматизації, такі як флуоресцеїн і родамін, а також їхні похідні. Флуоресціюючий репортер може частково або істотно піддаватися "гасінню" з боку молекули-гасильника в інтактному пептиді. При розщепленні пептиду пептидазою або протеазою, може бути обмірюване обумовлене підвищення флуоресценції (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34).

Мічені антитіла по винаходу також можуть використовуватися як агент для афінного очищення. У ході цього процесу мічене антитіло іммобілізують на твердій фазі, наприклад, смолі Sephadex або фільтрувальному папері, з використанням добре відомих науці способів. Іммобілізоване антитіло вступає в контакт зі зразком, що містить антиген, який необхідно очистити, і потім основа промивається з використанням підходящого розчинника, що видалить практично весь матеріал зі зразка, за винятком антигену, що піддається очищенню, що виявляється пов'язаним з іммобілізованим варіантом пептиду. Нарешті, основа промивається іншим підходящим розчинником, наприклад, гліциновим буфером, pH 5,0, що приведе до розриву зв'язку між антигеном і варіантом пептиду.

Реагенти для мічення звичайно володіють реакційноздатними функціональними групами, що дозволяють їм реагувати (i) безпосередньо з тіловою групою цистеїна в антитілі з введенням у ході рекомбінації цистеїном для утворення міченого антитіла; (ii) з лінкерним реагентом для утворення проміжної речовини лінкер-мітка; або (iii) з лінкерним антитілом для утворення міченого антитіла. Реакційноздатні функціональні групи реагентів для мічення включають наступні: малеїмід, галогенацетил, йодоацетамід сукцинімідоловий ефір (наприклад, NHS, N-гідроксисукцинімід), ізотіоціанат, сульфоніл хлорид, 2,6-дихлортріазиніл, пентафторфеніловий ефір й фосфорамідит, однак можуть використовуватися й інші функціональні групи.



Типовою реакційноздатною функціональною групою є гідроксисукцинімідоловий ефір (NHS) заміщувача карбоксильної групи обумовленої мітки, наприклад, у біотині або флуоресцентному барвнику. Ефір NHS мітки може бути попередньо утворений, виділений, очищений і/або охарактеризований, або він може бути утворений *in situ* і вступати в реакцію з нуклеофільною групою антитіла. Як правило, карбоксильна форма мітки активується шляхом реакції з деякою комбінацією реагенту карбодііміда, наприклад, дициклогексилкарбодііміда, диізопропілкарбодііміда або реагентом уронію, наприклад, TSTU (O-(N-сукцинімідил)-N, N,N',N'-тетраметилуронію тетрафторборат, HBTU (O-бензотріазол-1-іл)-N, N,N',N'-тетраметилуронію гексафторфосфат) або HATU (O-(7-азабензотріазол-1-іл)-N, N,N',N'-тетраметилуронію гексафторфосфат), активатора, такого як 1-гідроксibenзотріазол (HOBt) та N-гідроксисукцинімідом для утворення ефіру NHS метки. У деяких випадках мітка й антитіло можуть бути з'єднані за допомогою *in situ* активації мітки й реакції з антитілом з утворенням кон'югата мітка-антитіло за один етап. Інші реагенти, що активують й зв'язують включають TBTU (2-(1H-бензотріазо-1-іл)-1,3,3-тетраметилуронію гексафторфосфат), TFFH (N, N",N",N'''-тетраметилуронію 2-фтор-гексафторфосфат), PyBOP (бензотріазол-1-іл-оксі-трис-пірролідінофосфонію гексафторфосфат, EEDQ (2-етоксі-1-етоксікарбоніл-1,2-дигідро-хінолін), DCC (дициклогексилкарбодіімід); DIPCDI (диізопропілкарбодіімід), MSNT (1-(месітілен-2-сульфоніл)-3-нітро-1H-1,2,4-тріазол й арилові сульфонілгаліди, наприклад, триізопропілбензенсульфоніл хлорид.

Альбумінзв'язуючі сполуки пептид-Fab відповідно до винаходу:

В одному аспекті антитіло по винаходу злито з альбумінзв'язуючим білком. Зв'язування білка в плазмі може служити ефективним засобом поліпшення фармакокінетичних властивостей молекул з коротким періодом життя. Альбумін перебуває в плазмі в найбільшій кількості щодо всіх інших білків плазми. Альбумінзв'язуючі пептиди (АЗП) сироватки можуть змінювати фармакодинаміку активних доменів злитих білків, включаючи зміну захопленням тканин, проникнення в тканини й дифузію. Такі фармакодинамічні параметри можуть бути піддані модуляції шляхом специфічного відбору підходящої послідовності альбумінзв'язуючого пептиду (US 20040001827). Цілий ряд альбумінзв'язуючих пептидів був ідентифікований способами скринінгу фагових дисплеїв (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Сполуки по винаходу включають послідовності АЗП, вивчені (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 у Таблицях III і IV, сторінка 35038; (ii) US 20040001827 в [0076] SEQ ID NO: 9-22; і (iii) WO 01/45746 на сторінках 12-13 (включено в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання). Альбумінзв'язуючі (АЗП)-Fabs отримані в ході рекомбінації шляхом злиття альбумінзв'язуючого пептиду із С-кінцем важкого ланцюга Fab у стехіометричному співвідношенні 1:1 (1АЗП/1 Fab). Було показано, що взаємозв'язок таких АЗП-Fab з альбуміном підвищує період напівжиття антитіла більш ніж в 25 разів у мишей і кроликів. Описані вище реакційноздатні залишки Цис можуть бути введені в такі АЗП-Fab і використовуватися для сайт-специфічної кон'югації із цитотоксичними препаратами з наступними *in vivo* дослідженнями на тваринах.

Типові послідовності антигензв'язуючого пептиду включають, але не обмежуються, амінокислотні послідовності, перераховані в SEQ ID NO: 53-57:

CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 53
QRLMEDICLPWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 54
QRLIEDICLPWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 55
RLIEDICLPWGCLWEDD	SEQ ID NO: 56
DICLPWGCLW	SEQ ID NO: 57

Кон'югати антитіло-препарат

В іншому аспекті винахід описує імунокон'югати, або кон'югати антитіло-препарат (КАП), що складаються з антитіла, кон'югованого із цитотоксичним агентом, таким як хіміотерапевтичний агент, препарат, агент-інгібітор росту, токсин (наприклад, ферментативно активний токсин бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, або їхні фрагменти) або радіоактивним ізотопом (тобто радіоімунокон'югат). В іншому аспекті винахід додатково описує способи використання імунокон'югатів. В одному аспекті імунокон'югат складається з кожного із зазначених вище антитіл до FcRH5, які ковалентним чином приєднуються до цитотоксичного агента або обумовленого агента.

В одному аспекті антитіло до FcRH5 зв'язується з тією же самою антигенною детермінантою на FcRH5, з якою зв'язується й інше антитіло до FcRH5.

В іншому аспекті антитіло до FcRH5 зв'язується з антигенною детермінантою FcRH5, що відрізняється від антигенної детермінанти, з якою зв'язується інше антитіло до FcRH5.

В одному аспекті антитіло по винаходу специфічно зв'язується з FcRH5 тварини одного виду й не зв'язується специфічним чином з FcRH5 тварини іншого виду. В одному варіанті втілення винаходу один вид тварини представлений людиною й/або приматом (наприклад, яванською макакою), а другий вид тварини представлений мишею й/або представником сімейства собачих.

5 В одному варіанті втілення винаходу один вид тварини представлений людиною. В одному варіанті втілення винаходу один вид тварини представлений приматом, наприклад, яванською макакою. В одному варіанті втілення винаходу інший вид тварини представлений сімейством мишачих, наприклад, мишею. В одному варіанті втілення винаходу другий вид тварини представлений представником сімейства собачих.

10 В одному аспекті винаходу описані композиції, що складаються з одного або декількох антитіл по винаходу й носія. В одному варіанті втілення винаходу носій фармацевтично прийнятний.

В одному аспекті винаходу описані нуклеїнові кислоти, що кодують антитіло до FcRH5.

15 В одному аспекті винаходу описані вектори, що складаються з нуклеїнових кислот по винаходу.

В одному аспекті винаходу описані клітини-хазяї, що складаються з нуклеїнових кислот або вектора по винаходу. Вектор може бути представлений будь-яким типом, наприклад, рекомбінантним вектором, таким як вектор експресії. Може використовуватися будь-яка клітина-хазяїн із цілого ряду представлених. В одному варіанті втілення винаходу клітина-хазяїн є прокаріотичною клітиною, наприклад, *E. coli*. В одному варіанті втілення винаходу клітина-хазяїн є еукаріотичною клітиною, наприклад, клітиною ссавця, такою як клітина яєчників китайського хом'ячка (CHO).

20 В одному аспекті винахід описує способи для одержання антитіл по винаходу. Наприклад, винахід описує спосіб одержання антитіла до FcRH5 (який, як це визначено в даній заявці, включає антитіло повної довжини або його фрагмент), і такий спосіб включає експресію в підходящій клітині-хазяїні рекомбінантного вектора винаходу, що кодує зазначене антитіло (або його фрагмент), і відновлення зазначеного антитіла.

25 В одному аспекті винахід описує готовий виріб, що складається з контейнера, що включає композицію, при цьому композиція складається з одного або декількох антитіл до FcRH5. В одному варіанті втілення винаходу композиція складається з нуклеїнової кислоти по винаходу. В одному варіанті втілення винаходу композиція, що складається з антитіла, додатково включає носій, що у деяких варіантах втілення винаходу є фармацевтично прийнятним. В одному варіанті втілення винаходу виріб по винаходу додатково включає інструкції із введення композиції (наприклад, антитіла) пацієнтові.

30 В одному аспекті винахід описує набір, що складається з одного контейнера з композицією, що включає одне або кілька антитіл до FcRH5, і іншого контейнера, що включає буфер. В одному варіанті втілення винаходу буфер фармацевтично прийнятний. В одному варіанті втілення винаходу композиція, що складається з антагоніста, додатково включає носій, що у деяких варіантах втілення винаходу є фармацевтично прийнятним. В одному варіанті втілення винаходу набір додатково включає інструкції із введення композиції (наприклад, антитіла) пацієнтові.

35 В одному аспекті винахід описує використання антитіла до FcRH5 у вигляді лікарської форми для терапевтичного й/або профілактичного використання для лікування захворювання, такого як рак, пухлина й/або порушення проліферації клітин. В одному варіанті втілення винаходу ракові захворювання, пухлини й/або порушення проліферації вибираються з наступного: лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і

40 лімфома із клітин мантийної зони.

В одному аспекті винахід описує використання нуклеїнової кислоти для одержання препарату для терапевтичного й/або профілактичного використання для лікування захворювання, такого як рак, пухлина й/або порушення проліферації клітин. В одному варіанті втілення винаходу ракові захворювання, пухлини й/або порушення проліферації вибираються з наступного: лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і

50 лімфома із клітин мантийної зони.

В одному аспекті винахід описує використання вектора експресії для одержання препарату

для терапевтичного й/або профілактичного використання для лікування захворювання, такого як рак, пухлина й/або порушення проліферації клітин. В одному варіанті втілення винаходу ракові захворювання, пухлини й/або порушення проліферації вибираються з наступного: лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони.

В одному аспекті винахід описує використання клітини-хазяїна по винаходу для одержання препарату для терапевтичного й/або профілактичного використання для лікування захворювання, такого як рак, пухлина й/або порушення проліферації клітин. В одному варіанті втілення винаходу ракові захворювання, пухлини й/або порушення проліферації вибираються з наступного: лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони.

В одному аспекті винахід описує використання готового виробу у вигляді лікарської форми для терапевтичного й/або профілактичного використання для лікування захворювання, такого як рак, пухлина й/або порушення проліферації клітин. В одному варіанті втілення винаходу ракові захворювання, пухлини й/або порушення проліферації вибираються з наступного: лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони.

В одному аспекті винахід описує використання набору у вигляді лікарської форми для терапевтичного й/або профілактичного використання для лікування захворювання, такого як рак, пухлина й/або порушення проліферації клітин. В одному варіанті втілення винаходу ракові захворювання, пухлини й/або порушення проліферації вибираються з наступного: лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони.

В одному аспекті винахід описує спосіб інгібування росту клітини, що експресує FcRH5, і зазначений спосіб містить у собі контакт згаданої клітини з антитілом по винаходу, що приводить до інгібування росту клітини, що зазначена. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

В одному аспекті винахід описує спосіб терапевтичного лікування ссавця, що має ракову пухлину, що складається із клітин, що експресують FcRH5, і зазначений спосіб складається із введення згаданому ссавцеві терапевтично ефективної кількості антитіла по винаходу, що дозволяє ефективно вилікувати зазначеного ссавця. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

В одному аспекті винахід описує спосіб лікування або запобігання порушення проліферації клітин, що викликається гіперекспресією FcRH5; зазначений спосіб полягає у введенні пацієнтові, що потребує у такому лікуванні, ефективної кількості антитіла по винаходу, що дозволяє ефективно вилікувати або запобігти згаданому порушенню клітинної проліферації. В одному варіанті втілення винаходу згадане порушення проліферації представлене раком. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

В одному аспекті винахід описує спосіб інгібування росту клітини, при цьому ріст такої клітини, щонайменше, залежить від ефекту FcRH5, що потенціює ріст; зазначений спосіб складається з контакту згаданої клітини з ефективною кількістю антитіла по винаходу, що приводить до інгібування росту згаданої клітини. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

В одному аспекті винахід описує спосіб терапевтичного лікування пухлини в ссавця, при цьому ріст такої пухлини, щонайменше, залежить від ефекту FcRH5, що потенціює ріст;

зазначений спосіб складається з контакту згаданої клітини з ефективною кількістю антитіла по винаходу, що приводить до ефективного лікування згаданої пухлини. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

В одному аспекті винахід описує спосіб лікування рака, що полягає у введенні пацієнтові фармацевтичної композиції, що включає описаний тут кон'югат, прийнятний розріджувач, носій або допоміжну речовину. В одному варіанті втілення винаходу ракові захворювання вибираються з наступного: лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони. В одному варіанті втілення винаходу пацієнтові вводять цитотоксичний агент у комбінації із сполукою-кон'югатом антитіло-препарат.

В одному аспекті винахід описує спосіб інгібування проліферації В-клітин, що полягає у впливі на клітину імунокон'югатом, що включає антитіло по винаходу, в умовах, що забезпечують зв'язування імунокон'югата з FcRH5. В одному варіанті втілення винаходу порушення проліферації В-клітин вибираються з наступного: лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони. В одному варіанті втілення винаходу В-клітина представлена ксенотрансплантатом. В одному варіанті втілення винаходу вплив здійснюється в умовах *in vitro*. В одному варіанті втілення винаходу вплив здійснюється в умовах *in vivo*.

В одному аспекті винахід описує спосіб визначення присутності FcRH5 у зразку, що підозрюється на вміст FcRH5; зазначений спосіб містить у собі вплив на згаданий зразок антитілом по винаходу з наступним визначенням зв'язування згаданого антитіла з FcRH5 у зразку, при цьому таке зв'язування антитіла з FcRH5 у зразку є доказом присутності білка в згаданому зразку. В одному варіанті втілення винаходу зразок представлений біологічним зразком. У додатковому варіанті втілення винаходу біологічний зразок містить В-клітини. В одному варіанті втілення винаходу біологічний зразок одержують у ссавця, у якого відзначається або який підозрюється на наявність порушення проліферації В-клітин, включаючи (але не обмежуючись) наступне: лімфома, неходжкинська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони.

В одному аспекті винахід описує спосіб діагностики порушення проліферації клітин, що викликається підвищенням кількості клітин, таких як В-клітини, що експресують FcRH5; спосіб полягає в контакті досліджуваних клітин у біологічному зразку з кожним із зазначених вище антитіл, визначенні рівня антитіла, пов'язаного з досліджуваними клітинами в зразку, шляхом визначення зв'язування антитіла з FcRH5, і порівнянні рівня пов'язаного із клітинами антитіла в контрольному зразку, при цьому рівень зв'язаного антитіла нормалізується щодо кількості клітин, що експресують FcRH5 у досліджуваних і контрольних зразках, і, крім того, більш високий рівень зв'язаного в досліджуваному зразку антитіла в порівнянні з контрольним зразком указує на присутність порушення клітинної проліферації, викликаного клітинами, що експресують FcRH5.

В одному аспекті винахід описує спосіб виявлення розчинного FcRH5 у крові або сироватці, і такий спосіб полягає в контакті досліджуваного зразка крові або сироватки ссавця, підозрюваного на наявність порушення В-клітинної проліферації, з антитілом до FcRH5 з наступним визначенням підвищення розчинного FcRH5 у досліджуваному зразку в порівнянні з контрольним зразком крові або сироватки здорового ссавця. В одному варіанті втілення винаходу використовується спосіб діагностики порушення проліферації В-клітин, що викликається підвищенням рівня розчинного FcRH5 у крові або сироватці ссавця.

В одному аспекті винахід описує спосіб зв'язування антитіла по винаходу із клітиною, що експресує FcRH5, і такий спосіб полягає в контакті згаданої клітини з антитілом по винаходу. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом. В одному варіанті втілення винаходу антитіло кон'юговано з агентом-інгібітором росту.

Способи винаходу можуть використовуватися для впливу на будь-який відповідний патологічний стан, наприклад, клітини й/або тканини, що експресують FcRH5. В одному варіанті

втілення винаходу клітина, що служить мішенню в способі винаходу, представлена гематопоетичною клітиною. Наприклад, гематопоетична клітина може бути представлена клітиною, що включена в наступну групу клітин: лімфоцити, лейкоцити, тромбоцити, еритроцити й клітини-природні кілери. В одному варіанті втілення винаходу клітина, що служить мішенню в способі винаходу, представлена В- або Т- клітиною. В одному варіанті втілення винаходу клітина, що служить мішенню в способі винаходу, представлена раковою клітиною. Наприклад, ракова клітина може вибиратися із групи, що включає клітини лімфоми, лейкозу або мієломи.

Способи даного винаходу можуть додатково включати інші етапи лікування. Наприклад, в одному варіанті втілення винаходу спосіб додатково включає етап, у ході якого клітина-мішень і/або тканина-мішень (наприклад, ракова клітина) піддається впливу лікуванню опроміненням або препаратом хіміотерапії.

Як уже було описано в даній заявці, експресія FcRH5 (або IRTA2) не підлягала регулюванню в клітинних лініях множинної мієломи й лімфоми Беркитта. Відповідно до цього, в одному варіанті втілення способів винаходу клітина, що служить мішенню (наприклад, ракова клітина), представлена клітиною, що експресує FcRH5, у порівнянні із клітиною, не що експресує FcRH5. У додатковому варіанті втілення винаходу клітина-мішень представлена раковою клітиною, у якій експресія FcRH5 підвищена в порівнянні зі здоровою нераковою клітиною тканини цього ж типу. В одному варіанті втілення винаходу спосіб по винаходу викликає загибель клітинки-мішені.

В інших аспектах даного винаходу описані вектори, що складаються із ДНК, що кодують кожне з описаних тут антитіл. Також описані клітини-хазяї, що включають такий вектор. Наприклад, клітини-хазяї можуть бути представлені клітинами яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітинами E. coli або дріжджовими клітинами. Процес одержання кожного з описаних тут антитіл також описаний і складається з культивування клітин-хазяїв в умовах, що підходять для експресії необхідного антитіла й відновлення необхідного антитіла з культури клітин.

У ще одному аспекті винахід описує композицію, що складається з антитіла до FcRH5, як це описано в даній заявці, у комбінації з носієм. У деяких випадках носій представлений фармацевтично прийнятним носієм.

Інший аспект даного винаходу спрямований на використання поліпептидного антитіла до FcRH5 (як це описано в даній заявці) для одержання препарату, що може використовуватися для лікування стану, що реагує на введення поліпептидного антитіла до FcRH5.

Інший аспект винаходу представляє композицію, що складається із суміші сполук антитіл-препаратів по Формулі I, при цьому середній показник навантаження препарату на антитіло становить від приблизно 2 до приблизно 5 або від приблизно 3 до приблизно 4.

Інший аспект винаходу описує фармацевтичну композицію, включаючи сполуки КАП по Формулі I, суміш сполук КАП по Формулі I, або його фармацевтично прийнятну сіль або сольват, а також фармацевтично прийнятний розчинник, носій або допоміжну речовину.

Інший аспект винаходу описує фармацевтичну комбінацію, що складається із сполуки КАП по Формулі I і іншої сполуки, що володіє протираковими властивостями або іншими терапевтичними ефектами.

Інший аспект винаходу описує спосіб загибелі або інгібування проліферації пухлинних клітин або ракових клітин, що полягало у підляганні клітин впливу кількістю кон'югата антитіло-препарат по Формулі I, або його фармацевтично прийнятної солі або сольвату, і такий вплив був ефективний для загибелі або проліферації ракових клітин або пухлинних клітин.

Інший аспект винаходу описує спосіб лікування рака, що полягає у введенні пацієнтові терапевтично ефективною кількістю фармацевтичної композиції, що складається з КАП по Формулі I.

Інший аспект винаходу описує вироби, тобто набори, що складаються з кон'югата антитіло-препарат, контейнера й листка-вкладиша або етикетки із вказівкою процедури лікування.

Аспект винаходу являє собою спосіб одержання кон'югата антитіло-препарат по Формулі I, що складається з наступних етапів: (а) реакція групи цистеїна антитіла з введенням у ході рекомбінації цистеїном з лінкерним реагентом з утворенням проміжної сполуки антитіло-лінкер АТ-Л; (б) реакція АТ-Л з активованою молекулою препарату D з утворенням кон'югата антитіло-препарат; в іншому випадку, аспект може включати інші етапи: (в) реакція нуклеофільної групи молекули препарату з лінкерним реагентом з утворенням проміжної сполуки препарат-лінкер П-Л; (г) реакція П-Л із групою цистеїна з введенням у ході рекомбінації цистеїном з утворенням кон'югата антитіло-препарат.

Аспект винаходу представляє аналіз визначення ракових клітин, що включає наступне: (а) вплив на клітини кон'югатом препарату й антитіла до FcRH5 з введенням у ході рекомбінації цистеїном; (б) визначення ступеня зв'язування кон'югата препарату й антитіла до FcRH5 з

введеним у ході рекомбінації цистеїном із клітинами.

#### А. Антитіла до FcRH5

В одному варіанті втілення винаходу описані антитіла до FcRH5, які можуть використовуватися як терапевтичні агенти. Типові антитіла включають поліклональні, моноклональні, гуманізовані, біспецифічні антитіла й антитіла-гетерокон'югати.

#### 1. Поліклональні антитіла

Поліклональні антитіла одержують переважним чином у тварин шляхом множинних підшкірних (п/ш) або інтраперітонеальних (і/п) ін'єкцій відповідного антигену й ад'юванта. Це може виявитися корисним для кон'югації відповідного антигену (особливо при використанні штучно отриманих білків) з білком, що є імуногенним для виду тварин, які повинні бути імунізовані. Наприклад, антиген може бути кон'югован з гемоціаніном фіссурелли (KLH), сироватковим альбуміном, бичачим тіроглобуліном або соєвим інгібітором трипсину з використанням біфункціонального або дериватизуючого агента, наприклад, малеїмідобензойлсульфосукцинімідного ефіру (кон'югація за допомогою залишків цистеїна), N-гідроксисукциніміда (за допомогою залишків лізіна), глутаральдегіда, бурштинового ангідриду,  $\text{SOCl}_2$  або  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , де R і  $\text{R}^1$  є різними алкільними групами.

Тварин імунізують проти антигену, імуногенних кон'югатів або їхніх похідних шляхом комбінації, наприклад, 100 мкг або 5 мкг білка або кон'югата (для кроликів і мишей, відповідно) з 3 об'ємами повного ад'юванта Фрейнда й внутрішкірного введення розчину в декількох місцях. Через один місяць у тварин підвищують кількість пептиду або кон'югата від 1/5 до 1/10 від початкової кількості в повному ад'ювантс Фрейнда шляхом підшкірного введення розчину в декількох місцях. Через 7-14 днів, у тварин відбирають кров, і сироватка аналізується на предмет титру антитіла. Концентрацію білка (або кон'югата) у тварин підвищують до досягнення плато значення титру. Кон'югати також можуть бути отримані з використанням рекомбінантної клітинної культури у вигляді білків злиття. Крім того, для посилення імунної відповіді, можуть використовуватися препарати, що викликають агрегацію, наприклад, алюм.

#### 2. Моноклональні антитіла

Моноклональні антитіла можуть бути отримані з використанням способу гібридоми, уперше описаного Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), або шляхом процедур рекомбінації ДНК (патент США No. 4816567).

У способі гібридоми виробляється імунізація миші або іншої підходящої тварини-хазяїна, такого як хом'як, з одержанням лімфоцитів, що продукують або здатних продукувати антитіла, які будуть специфічно зв'язуватися з білком, що використовують для імунізації. З іншого боку, лімфоцити також можуть бути імунізовані *in vitro*. Після імунізації лімфоцити ізолюють і потім зливають із клітинами мієломи з використанням підходящого агента злиття, такого як поліетіленгліколь, для утворення клітини гібридоми (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Отримані в такий спосіб клітини гібридоми висівають і культивують на підходящому живильному середовищі, що утримує одну або кілька речовин, що інгібують ріст або виживаність незлитих, вихідних клітин мієломи (також вказуються як партнери злиття). Наприклад, якщо вихідні клітини мієломи містять недостатню кількість ферменту гіпоксантина-гуанінфосфорибозилтрансферази (ГГФТ), живильне середовище для гібридом звичайно буде включати гіпоксантин, аміноптерин і тімідин (середовище HAT), які перешкоджають росту клітин з дефіцитом ГГФТ.

Кращий партнер злиття у вигляді мієломних клітин представлений клітинами, які ефективно зливаються, підтримують стабільне й високе вироблення антитіла вибраними клітинами, що виробляють антитіло, і чутливі до виборчого середовища щодо незлитих материнських клітин. Кращі клітинні лінії мієломи представлені лініями мієломи мишей, наприклад, отримані з пухлин мишей MOPC-21 і MPC-11, надані Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, США, і клітини SP-2 і похідних, наприклад, або X63-Ag8.653, що надані Американською колекцією типових культур, Manassas, Virginia, США. Клітинні лінії мієломи людини й гетеромієломи миші-людини також були описані для одержання людських моноклональних антитіл (Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Живильне середовище в якому культивують клітини мієломи, піддається аналізу на предмет вироблення моноклональних антитіл, спрямованих проти антигену. Переважно, специфічність зв'язування моноклональних антитіл, вироблених клітинами гібридами, може бути визначена шляхом імунопреципітації або аналізу зв'язування *in vitro*, наприклад, радіоімуноаналізом (RIA) або твердофазним імуноферментним аналізом (ІФА).

Афінність зв'язування моноклонального антитіла може бути визначена, наприклад, у ході

аналізу Скетчарда, описаного в Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Після ідентифікації клітин гібридами, що виробляють антитіла з необхідною специфічністю, афінністю й/або активністю, шляхом обмеження процедур розподілу й росту з використанням стандартних способів можуть бути субклоновані клони (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Підходящі для даної мети умови живильного середовища включають, наприклад, середовище D-MEM або RPMI 1640. Крім того, клітини гібридами можуть бути вирощені *in vivo* у вигляді асцитних пухлин у тварин, наприклад, шляхом інтраперітонеальної ін'єкції клітин миші.

Моноклональні антитіла, секретуючі субклонами, виділяють відповідним чином з живильного середовища асцитної рідини або сироватки з використанням стандартних процедур очищення імуноглобулінів, таких як, наприклад, афінна хроматографія (наприклад, з використанням білка А або білка G-сефарози), іонообмінна хроматографія, гідроксіапатитна хроматографія, гель-електрофорез, діаліз і т.д.

ДНК, що кодує моноклональні антитіла, може бути легко виділена й секвенована з використанням стандартних процедур (наприклад, шляхом використання олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі й легкі ланцюги мишачих антитіл). Клітини гібридами служать як переважне джерело таких ДНК. Після ізоляції ДНК може бути включена у вектори експресії, які потім трансфікують у клітини-хазяї, такі як клітини *E. Coli*, клітини лінії COS мавпи, клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO) або клітини мієломи, які в протилежному випадку не виробляють білок імуноглобуліну, для організації синтезу моноклональних антитіл у рекомбінантних клітинах-хазяях. Огляд статей про рекомбінантну експресію бактеріями ДНК, що кодують антитіло, представлений в Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) and Plickthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992).

У додатковому варіанті втілення винаходу моноклональні антитіла або фрагменти антитіл можуть бути виділені з фагових бібліотек антитіл з використанням способів, описаних в McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) описали виділення мишачих і людських антитіл, відповідно, з використанням фагових бібліотек. Наступні публікації описують одержання високоафінних (діапазон нМ) людських антитіл (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)) шляхом заміни в ланцюгах, а також комбінаторної інфекції й *in vivo* рекомбінації як стратегії для конструювання дуже великих фагових бібліотек (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Таким чином, ці способи є гідними альтернативами традиційним способам одержання моноклональних антитіл з гібридами для ізоляції моноклональних антитіл.

ДНК, що кодує антитіло, може бути модифікована для одержання химерного антитіла або поліпептиду злиття, наприклад, шляхом заміни послідовностей константного домену важкого ланцюга й легкого ланцюга людини ( $C_H$  і  $C_L$ ) гомологічними мишачими послідовностями (патент США No. 4816567; i Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), або шляхом злиття послідовності, що кодує імуноглобулін, з усією або частиною послідовності, що кодує, поліпептиду, що не є імуноглобуліном (гетерологічним поліпептидом). Послідовності поліпептидів, що не є імуноглобулінами, можуть бути заміщені константними доменами антитіла, або ж заміщені варіабельними доменами одного антигензв'язуючого сайту антитіла для створення химерного двовалентного антитіла, що складається з одного антигензв'язуючого сайту, що володіє специфічністю до антигену, і іншого антигензв'язуючого сайту, що володіє специфічністю до іншого антигену.

### 3. Людські й гуманізовані антитіла

Антитіла до FcRH5 можуть додатково складатися з гуманізованих або людських антитіл. Гуманізовані форми тварин (наприклад, мишачих) антитіл представлені химерними імуноглобулінами, ланцюгами імуноглобулінів або їх фрагментами (наприклад, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> або іншими антигензв'язуючими субпослідовностями антитіл), які містять мінімальну послідовність, отриману з імуноглобуліну тварин. Гуманізовані антитіла включають людські імуноглобуліни (антитіло-реципієнт), у яких залишки гіперваріабельних ділянок (CDR) реципієнта заміщені залишками CDR видів тварин (антитіла-донора), наприклад, миші, пацюка або кролика, що володіють необхідною специфічністю, афінністю й реакційною здатністю. У деяких випадках залишки каркасної ділянки (КД) Fv імуноглобуліну людини заміщаються відповідними залишками тварин. Гуманізовані антитіла також можуть складатися із залишків, які відсутні в антитілі-реципієнті або імпортованих послідовностях CDR або каркасної ділянки. У цілому, гуманізоване антитіло буде складатися практично повністю з, щонайменше одного, але звичайно двох варіабельних доменів, у яких всі або практично всі ділянки CDR відповідають імуноглобуліну тварин, і всі або практично всі КД відповідають послідовності імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло в деяких випадках також може складатися з, щонайменше,

ділянки константного домену імуноглобуліну (Fc), звичайно імуноглобуліну людини [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

Способи гуманізації тваринних антитіл широко відомі науці. Як правило, гуманізоване антитіло включає один або кілька амінокислотних залишків, введених у нього з іншого (тварини) джерела. Такі амінокислотні залишки тварин часто називають "імпортними" залишками, і звичайно їх одержують із "імпортованого" варіабельного домену. Гуманізація може істотно здійснюватися шляхом дотримання способу Вінтера й співробітників [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)], шляхом заміщення CDR або послідовностей CDR гризунів відповідними послідовностями антитіла людини. Відповідно до цього, такі "гуманізовані" антитіла представлені химерними антитілами (патент США No. 4816567), у яких менш ніж один інтактний варіабельний домен людини заміщений відповідною послідовністю видів тварин. На практиці, гуманізовані антитіла звичайно представлені людськими антитілами, у яких залишки CDR і, можливо, деякі залишки КД заміщені залишками з аналогічних ділянок антитіл гризунів.

Вибір варіабельних доменів легкого й важкого ланцюгів людини, які використовуються в одержанні гуманізованих антитіл, дуже важливий для зниження антигенності й НАМА-відповіді (людське антимишаче антитіло), якщо таке антитіло призначене для лікування людей. Зниження або елімінація НАМА-відповіді є істотним аспектом клінічної розробки підходящих терапевтичних препаратів. Див., наприклад, Khazzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller et al., Blood (1983), 62:988; Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann et al., Nature (1988), 332:323; Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495. Як уже було описано тут раніше, винахід представляє антитіла, які були гуманізовані таким чином, що НАМА-відповідь є зниженою або елімінованою. Варіанти таких антитіл надалі можуть бути отримані з використанням стандартних відомих науці способів, деякі з яких докладно описані нижче. Згідно з так названим принципом "найкращої відповідності", послідовність варіабельного домену в антитілі гризунів підлягає скринінгу щодо всієї бібліотеки відомих послідовностей варіабельного домену людини. Послідовність V-домену людини, що близька до такої послідовності гризунів, ідентифікується, і для гуманізованого антитіла вибирається каркасна ділянка (КД) у межах такої послідовності (Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Інший спосіб має на увазі використання окремої каркасної ділянки, отриманої з консенсусної послідовності всіх антитіл людини з окремої підгрупи важких і легких ланцюгів. Така каркасна ділянка може використовуватися для декількох різних гуманізованих антитіл (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)).

Наприклад, амінокислотна послідовність антитіла, як це описано в даній заявці, може служити в якості стартової (вихідної) послідовності для диверсифікованості каркасної ділянки й/або гіперваріабельних послідовностей. Вибрана послідовність каркасної ділянки, до якої приєднується початкова гіперваріабельна послідовність, що зазначена в даній заявці в якості акцепторної каркасної ділянки людини. Акцепторна каркасна ділянка людини може бути отримана з імуноглобуліну людини (його VL і/або VH ділянок), але, переважно, акцепторна каркасна ділянка людини може бути отримана з консенсусної послідовності каркасної ділянки людини, оскільки було доведено, що такі каркасні ділянки володіють мінімальною або навіть відсутньою імуногенністю для пацієнтів-людей.

У випадках, коли акцептор отриманий з імуноглобуліну людини, можливо вибрати послідовність каркасної ділянки людини на основі гомологічності його донорської послідовності каркасної ділянки шляхом вирівнювання донорської послідовності каркасної ділянки з різними послідовностями каркасної ділянки людини з колекції послідовностей каркасних ділянок людини; це допоможе вибрати найбільш гомологічну послідовність каркасної ділянки людини як акцептор.

В одному варіанті втілення винаходу описані тут консенсусні послідовності каркасних ділянок людини отримані з консенсусних послідовностей каркасних ділянок VH підгрупи III і/або капа VL підгрупи I.

У випадках, коли акцептор може мати послідовність, ідентичну вибраної послідовності каркасної ділянки людини, що отримана з імуноглобуліну людини або консенсусної послідовності каркасної ділянки людини, даний винахід передбачає, що акцепторна послідовність може складатися з існуючих раніше замін амінокислот щодо послідовності імуноглобуліну людини або консенсусної послідовності каркасної ділянки людини. Такі попередньо існуючі заміни переважно мінімальні, а різниця в порівнянні з послідовністю



імуноглобуліну людини або консенсусною послідовністю каркасної ділянки людини становить звичайно чотири, три, дві або одну амінокислоти.

Залишки гіперваріабельних ділянок антитіла тварини включені в акцепторні каркасні ділянки VL і/або VH людини. Наприклад, можна ввести залишки відповідно до залишків CDR по Kabat, залишки гіперваріабельної петлі по Chothia і залишки MAT, і/або контактуючі залишки. У деяких випадках залишки розширеної гіперваріабельної ділянки представлені наступними: 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3), 26-35B (H1), 50-65, 47-65 або 49-65 (H2) і 93-102, 94-102, або 95-102 (H3).

При "введенні" залишків гіперваріабельних ділянок (як це описано в даній заявці), варто мати на увазі, що таке введення може бути досягнуто різними шляхами, наприклад, нуклеїнова кислота, що кодує необхідну амінокислотну послідовність, може бути отримана шляхом мутації нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність варіабельного домену миші, таким чином, що залишки каркасної ділянки змінені на залишки акцепторної каркасної ділянки людини, або шляхом мутації нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність варіабельного домену людини, таким чином, що залишки гіперваріабельного домену змінені на залишки тварини, або шляхом синтезу нуклеїнової кислоти, що кодує необхідну послідовність, і т.п.

В описаних тут прикладах варіанти гіперваріабельної щепленої ділянки були отримані шляхом мутагенезу (по Кункелю) нуклеїнової кислоти, що кодує акцепторні послідовності людини, з використанням окремого олігонуклеотида для кожної гіперваріабельної ділянки (Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987)). Відповідні зміни в каркасну ділянку й/або гіперваріабельну ділянку можуть бути введені з використанням стандартних способів з метою корекції й повторного встановлення належних взаємодій між гіперваріабельною ділянкою й антигеном.

Фагміди (або вказаний тут також у деяких контекстах фаговий дисплей) можуть використовуватися в якості зручного й швидкого способу одержання й скринінгу багатьох різних потенційних варіантів антитіл у бібліотеці, що отримані шляхом рандомізації послідовності. Однак фахівцеві в даній області відомі й інші способи одержання й скринінгу змінених антитіл.

Було доведено, що фагміди є потужним інструментом для одержання й вибору нових білків, які зв'язуються з лігандом, наприклад, антигеном. Використання подібного способу фагмід дозволяє одержати більшу бібліотеку варіантів білків, які можуть бути швидко відсортовані на предмет тих послідовностей, які зв'язуються з молекулою-мішенню з високим ступенем афінності. Нуклеїнові кислоти, що кодує варіантні поліпептиди, звичайно злиті з послідовністю нуклеїнових кислот, що кодує білок вірусної оболонки, такий як ген III або ген VIII. Були розроблені моновалентні системи фагових дисплеїв, у яких послідовність нуклеїнових кислот, що кодує білок або поліпептид, злита з послідовністю нуклеїнових кислот, що кодує ділянку гена III. (Bass, S., *Proteins*, 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3:205 (1991)). У моновалентній системі фагових дисплеїв ген злиття експресується в малих кількостях, і дикий тип гена III також експресується, при цьому зберігається інфекційна здатність часток. Способи одержання пептидних бібліотек і скринінг таких бібліотек був описаний у багатьох патентах (наприклад, патенті США No. 5723286, патенті США No. 5432018, патенті США No. 5580717, патенті США No. 5427908 і патенті США No. 5498530).

Бібліотеки антитіл або антигензв'язуючих поліпептидів були отримані з використанням цілого ряду способів, включаючи зміну одного гена шляхом вставки випадкових послідовностей ДНК або шляхом клонування сімейства родинних генів. Способи відображення антитіла або антигензв'язуючих фрагментів з використанням фагмід були описані в патентах США No. 5750373, 5733743, 5837242, 5969108, 6172197, 5580717 і 5658727. Потім бібліотека піддається скринінгу на предмет експресії антитіл або антигензв'язуючих білків з необхідними характеристиками.

Способи заміни вибраної амінокислоти в матричній амінокислотній послідовності добре відомі в науці, і деякі з них описані в тексті даної заявки. Наприклад, залишки гіперваріабельної ділянки можуть бути замінені за допомогою способу Кункеля. Див, наприклад, Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987).

Послідовність олігонуклеотидів включає один або кілька необхідних наборів кодонів для тих залишків гіперваріабельної ділянки, які варто замінити. Кодон являє собою різні триплети нуклеотидів, що використовують для кодування необхідного варіанта амінокислот. Кодони можуть бути представлені з використанням символів для позначення окремих нуклеотидів або еквімоларних сумішей нуклеотидів, як це показано нижче відповідно до коду IUB.

КОДИ IUB

G Гуанін

A Аденін

Т Тимін  
 С Цитозін  
 R (A або G)  
 Y (C або T)  
 5 M (A або C)  
 K (G або T)  
 S (C або G)  
 W (A або T)  
 H (A або C або T)  
 10 B (C або G або T)  
 V (A або C або G)  
 D (A або G або T) H  
 N (A або C або G або T)

Наприклад, у кодоні DVK, D може бути представлений нуклеотидами A або G або T; V може бути представлений A або G або C; і K може бути представлений G або T. Такий кодон може становити 18 різних кодонів і може кодувати амінокислоти Ала, Трп, Тір, Ліз, Тре, Асн, Ліз, Сер, Арг, Глу, Глі й Цис.

Олігонуклеотиди або праймери можуть бути синтезовані з використанням стандартних способів. Олігонуклеотиди можуть бути синтезовані, наприклад, шляхом твердофазного синтезу, і такі олігонуклеотиди містять послідовності, що представляють собою всі можливі комбінації нуклеотидних триплетів (кодонів), які будуть кодувати необхідну групу амінокислот. Синтез олігонуклеотидів з вибраною нуклеотидною "дегенерацією" у певних положеннях добре відомий науці. Такий набір нуклеотидів з певним набором кодонів може бути синтезований з використанням представлених на ринку засобів для синтезу нуклеїнових кислот (наприклад, представлених компанією Applied Biosystems, Foster City, CA), або може бути наданий компаніями (наприклад, Life Technologies, Rockville, MD). Таким чином, набір синтезованих олігонуклеотидів, що мають окремий набір кодонів, буде включати, як правило, безліч олігонуклеотидів з різними послідовностями, а розходження між кодонами перебувають у межах загальної послідовності. Олігонуклеотиди, як це використовується відповідно до винаходу, мають послідовність, що дозволяє здійснювати гібридизацію нуклеїнових кислот шаблонного варіабельного домену, а також може включати сайти рестриктаз для проведення клонування.

В одному способі послідовності нуклеїнових кислот, що кодують варіанти амінокислот, можуть бути створені шляхом олігонуклеотид-опосередкованого мутагенезу. Такий спосіб добре відомий у науці, як це описано в Zoller et al. *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504(1987). Кількома словами його можна описати в такий спосіб: послідовності нуклеїнових кислот, що кодують варіантні амінокислоти, створюють шляхом гібридизації олігонуклеотида, що кодує, необхідний набір кодонів для матричної ДНК, при цьому така матрична ДНК є одноланцюговою і отриманою із плазмід. Після гібридизації, для синтезу повного другого комплементарного ланцюга матричної ДНК, що і буде убудована в олігонуклеотидний праймер і буде містити набір кодонів, використовується ДНК-полімераза.

Як правило, використовуються олігонуклеотиди довжиною, щонайменше, 25 нуклеотидів. Оптимальний олігонуклеотид буде мати довжину 12-15 нуклеотидів, які повністю комплементарні матричній послідовності (тобто кожною з її сторін, що кодують мутацію). Це забезпечує належну гібридизацію олігонуклеотида в молекулу одноланцюгової матричної ДНК. Олігонуклеотиди легко синтезуються з використанням відомих науці способів, наприклад, описаних в Crea et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

Матрична ДНК створюється за допомогою векторів, отриманих з M13 векторів бактеріофагів (на ринку представлені вектори M13mp18 і M13mp19), і векторів, які складаються з одноланцюгової фагової точки початку реплікації, як це описано в Viera et al., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Таким чином, ДНК, що повинна бути мутованою, може бути вставлена в один з таких векторів для одержання одноланцюгової матричної ДНК. Одержання одноланцюгової матричної ДНК описане в розділах 4.21-4.41 в Sambrook et al. (див. вище).

Для зміни нативної послідовності ДНК, олігонуклеотид піддається гібридизації в одноланцюгову матричну ДНК при відповідних умовах гібридизації. Потім додається ДНК-полімераза, звичайно Т7 ДНК-полімераза або фрагмент Кленова ДНК-полімерази I, для синтезу комплементарного ланцюга матричної ДНК із використанням олігонуклеотида в якості праймера для синтезу. Таким чином, утвориться гетеродуплексна молекула, у якій один ланцюг ДНК кодує мутовану форму гена 1, а інший ланцюг ДНК (оригінальна матриця) кодує нативну, незмінену послідовність гена 1. Така гетеродуплексна молекула потім переноситься в підходящу клітину-хазяїн, звичайно прокаріотичну, наприклад, *E. coli* JM101. Після культивування, клітини поміщають

у чашки з агарозою і піддають скринінгу з використанням радіоміченого фосфором-32 олігонуклеотидного праймера для виявлення бактеріальних колоній, що містять мутовану ДНК.

Описаний вище спосіб може бути модифікований таким чином, що створена гетеродуплексна молекула із двома плазмідними ланцюгами включає мутації. Модифікації можуть бути представлені наступними: одноланцюговий олігонуклеотид приєднується до одноланцюгової матриці, як це описано вище. Суміш трьох дезоксирибонуклеотидів (дезоксирибоаденозін (dATP), дезоксирибогуанозін (dGTP) і дезоксириботимідин (dTТ)) комбінується з модифікованим дезоксирибоцитозіном dCTP-(aS) (який може бути наданий компанією Amersham). Така суміш додається до матрично-олігонуклеотидного комплексу. Після додавання в суміш ДНК-полімерази, одержують ланцюг ДНК, ідентичний матриці, за винятком мutowаних основ. Крім того, така мutowана нова ДНК буде включати dCTP-(aS) замість dCTP, що служить для захисту ДНК від розщеплення рестрикційними ендонуклеазами. Після того, як матричний ланцюг двохланцюгового гетеродуплекса буде підданий дії відповідної рестриктази, матричний ланцюг може бути розщеплений за допомогою екзoIII-нуклеази або будь-якої іншої нуклеази після ділянки, що містить сайти для мутацій. Потім реакція припиняється з вивільненням молекули, що лише частково є одноланцюговою. Потім утвориться повний двохланцюговий гетеродуплекс ДНК із використанням ДНК-полімерази в присутності всіх чотирьох дезоксирибонуклеотидних трифосфатів, АТФ і ДНК-лігази. Така гомодуплексна молекула потім може бути перенесена в підходящу клітину-хазяїна.

Зазначена вище послідовність олігонуклеотида має достатню довжину для гібридизації в матричну нуклеїнову кислоту й може (але не обов'язково) містити сайти рестрикції. Матрична ДНК створюється за допомогою векторів, отриманих з M13 векторів бактеріофагів, або векторів, які складаються з одноланцюгової фагової точки початку реплікації, як це описано в Viera et al., Meth. Enzymol., 153:3 (1987). Таким чином, ДНК, що повинна бути мutowана, може бути вставлена в один з таких векторів для одержання одноланцюгової матричної ДНК. Одержання одноланцюгової матричної ДНК описане в розділах 4.21-4.41 в Sambrook et al. (див. вище).

Відповідно до іншого способу, зв'язування антигену може бути відновлене в ході гуманізації антитіл за допомогою відбору відновлених гіперваріабельних ділянок (див. заявку на патент США No. 11/061841, від 18 лютого 2005). Спосіб включає введення гіперваріабельних ділянок тварин в акцепторну каркасну ділянку й подальше введення однієї або декількох амінокислотних замін в один або кілька гіперваріабельних ділянок без модифікації послідовності акцепторної каркасної ділянки. З іншого боку, введення однієї або декількох амінокислотних замін може супроводжуватися модифікаціями в послідовності акцепторної каркасної ділянки.

Відповідно до іншого способу, бібліотека може бути отримана шляхом забезпечення олігонуклеотидів у спадному й висхідному напрямках, і кожний такий олігонуклеотид буде мати безліч варіантів з різними послідовностями, установлюваними наборами кодонів. Олігонуклеотиди в спадному й висхідному напрямках разом з варіабельним доменом послідовності матричної нуклеїнової кислоти можуть використовуватися в полімеразній ланцюгової реакції для одержання "бібліотеки" продуктів ПЦР. Продукти ПЦР можуть вказуватися в даній заявці як "касети нуклеїнових кислот", тому що вони можуть бути злиті з іншою спорідненою або неспорідненою послідовністю нуклеїнової кислоти, наприклад, білками вірусної оболонки й доменами димерізації, з використанням установлених процедур молекулярної біології.

Послідовність ПЦР праймерів включає один або кілька необхідних наборів кодонів для доступних для розчинника й надзвичайно варіюваних положень у гіперваріабельній ділянці. Як це вже було описано вище, кодон являє собою різні триплети нуклеотидів, використовуваних для кодування необхідного варіанта амінокислот.

Вибрані антитіла, що відповідають необхідним критеріям (установлюються в ході відповідних етапів скринінгу/селекції), можуть бути виділені й клоновані з використанням стандартних способів рекомбінації.

Крім того, важливим є той факт, що антитіла будуть гуманізовані зі збереженням високої афінності зв'язування з антигеном і іншими бажаними біологічними властивостями. Для досягнення такої мети й відповідно до одного аспекту винаходу, гуманізовані антитіла одержують у процесі аналізу вихідних послідовностей і різних концептуальних гуманізованих продуктів з використанням тривимірних моделей вихідних і гуманізованих послідовностей. Тривимірні моделі імуноглобулінів широко представлені й відомі фахівцям в даній області. Є комп'ютерні програми, які ілюструють і відображають можливі тривимірні конформації вибраних кандидатних послідовностей імуноглобулінів. Така конформация дозволяє зробити аналіз імовірної ролі залишків у функціонуванні кандидатної імуноглобулінової послідовності, тобто аналіз залишків, які впливають на здатність кандидатного імуноглобуліну зв'язувати антиген.

Таким чином, залишки КД може бути вибрані й скомбіновані з послідовностей реципієнта й імпортованих послідовностей для одержання необхідної характеристики антитіла, наприклад, підвищеної афінності до антигену-мішені. У цілому, залишки гіперваріабельної ділянки безпосередньо й більш істотно впливають на зв'язування антигену.

5 Передбачено різні форми гуманізованого антитіла до FcRH5. Наприклад, гуманізоване антитіло може бути представлено фрагментом антитіла, таким як Fab, що у деяких випадках кон'юговано з одним або декількома цитотоксичними агентами для одержання імунокон'югата. З іншого боку, гуманізоване антитіло може бути представлено інтактним антитілом, таким як інтактне антитіло до IgG1.

10 Як альтернатива гуманізації, можуть бути отримані людські антитіла. Наприклад, на сьогоднішній день можливе одержання трансгенних тварин (наприклад, мишей), які здатні (при імунізації) виробляти повний репертуар антитіл людини під час відсутності ендogenous вироблення імуноглобулінів. Наприклад, уже було описано, що гомозиготна делеція гена ділянки сполуки важкого ланцюга антитіла ( $J_H$ ) у химерних мишей і мутантних мишей зародкової лінії приводить до повного інгібування ендogenous вироблення антитіл. Перенос генетичної інформації імуноглобуліну зародкової лінії людини в таких мутантних мишей зародкової лінії приводить до вироблення людських антитіл при впливі антигеном. Див., наприклад, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993); патент США No. 5545806, 5569825, 5591669 (усі GenPharm); 5545807; і WO 97/17852.

20 З іншого боку, для вироблення людських антитіл і фрагментів антитіл *in vitro* від варіабельного домену (V) імуноглобуліну генного репертуару від імунізованих донорів, може використовуватися спосіб фагових дисплеїв (McCafferty et al., Nature 348:552-553 [1990]). Відповідно до цього способу гени V домену антитіла клонують усередині рамки зчитування більшого або меншого гена оболонкового білка нитковидного бактеріофага, такого як M13 fd, і відображаються у вигляді фрагментів функціонального антитіла на поверхні фагових часток. Беручи до уваги, що нитчаті частки містять копію одноланцюгової ДНК генома фага, вибір, заснований на функціональних властивостях антитіла, також приводить до відбору гена, що кодує антитіло, що володіє такими властивостями. Таким чином, фаг імітує деякі із властивостей В-клітини. Фаговий дисплей може використовуватися на цілому ряді форматів, проаналізованих, наприклад, в Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Для фагового дисплея може використовуватися кілька джерел сегментів V-гена. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) за принципом випадкового вибору була виділена різнотипна матриця антитіл до оксазолону з невеликої комбінаторної бібліотеки генів V, отриманих із селезінки імунізованих мишей. Можна створити репертуар генів V від імунізованих донорів-людей, а антитіла для різноманітної матриці антигенів (включаючи власні антигени) можуть бути істотно ізольовані з дотриманням способів, описаних в Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), або Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Див. також патенти США No. 5565332 і 5573905.

40 Як уже було зазначено вище, людські антитіла також можуть бути отримані за допомогою активованих *in vitro* В-клітин (див. патенти США No. 5567610 і 5229275).

#### 4. Фрагменти антитіл

У певних обставинах переважним є використанням фрагментів антитіл, а не повних антитіл. Більше менший розмір фрагмента забезпечує його швидке виведення, що може привести до підвищеного доступу до солідної пухлини.

45 Для одержання фрагментів антитіл були розроблені різні способи. Традиційно такі фрагменти одержували за допомогою протеолітичного розщеплення інтактних антитіл (див., наприклад, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); і Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однак зараз такі фрагменти можуть бути отримані безпосередньо шляхом рекомбінації клітин-хазяїв. Фрагменти антитіл Fab, Fv і ScFv також можуть експресуватися й секретуватися в *E. coli*, що дозволяє легко одержати більші кількості таких фрагментів. Фрагменти антитіла можуть бути виділені з бібліотек фагових дисплеїв антитіл, як це описано вище. З іншого боку, фрагменти Fab'-SH можуть бути відновлені безпосереднім чином з *E. coli* і з'єднані в ході хімічної реакції з утворенням фрагментів F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Відповідно до іншого способу, фрагменти F(ab')<sub>2</sub> можуть бути виділені безпосередньо з культури рекомбінантних клітин-хазяїв. Фрагменти Fab і F(ab')<sub>2</sub> з підвищеним часом напівжиття *in vivo* складаються із залишків антигенної детермінанти рецепторів, як це описано в патенті США No. 5869046. Фахівцям в даній області повинні бути відомі й інші способи одержання фрагментів антитіл. В інших варіантах втілення винаходу 60 вибране антитіло представлено одноланцюговим фрагментом Fv (scFv). Див. WO 93/16185;

патент США No. 5571894; і патент США No. 5587458. Fv і sFv є єдиними видами з інтактними комбінаційними сайтами, які не містять константних ділянок; таким чином, такі фрагменти підходять для зниженого неспецифічного зв'язування під час застосування *in vivo*. Білки злиття sFv можуть бути сконструйовані для злиття з еффекторним білком на аміно- або карбоксильному кінці sFv. Див. Antibody Engineering, ed. Borrebaeck вище. Фрагмент антитіла також може бути представлений "лінійним антитілом", наприклад, як це описано в патенті США 5641870. Такі фрагменти лінійного антитіла можуть бути моноспецифічними або біспецифічними.

#### 5. Біспецифічні антитіла

Біспецифічні антитіла є антитілами, що володіють специфічністю зв'язування з як мінімум двома антигенними детермінантами. Типові біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися із двома різними антигенними детермінантами білка FcRH5, як це описано в даній заявці. Інші такі антитіла можуть складатися з ділянки зв'язування FcRH5 і ділянки зв'язування іншого білка. З іншого боку, область FcRH5 може бути комбінована з областю зв'язування триггінної молекули на лейкоциті, такої як молекула рецептора Т-клітини (наприклад, CD3), або рецепторами Fc к IgG (FcγR), такими як FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) й FcγRIII (CD16), таким чином зосереджуються і локалізуються захисні клітинні механізми проти клітин, що експресують FcRH5. Біспецифічні антитіла також можуть використовуватися для локалізації цитотоксичних агентів у клітині, що експресує FcRH5. Такі антитіла володіють доменом зв'язування FcRH5 і доменом, що зв'язується із цитотоксичним агентом (наприклад, сапорином, анти-інтерфероном-α, алкалоїдом барвінка, ланцюгом А ріцина, метотрексатом або радіоактивним ізотопом гаптену). Біспецифічні антитіла можуть бути отримані у вигляді антитіл з повною довжиною або фрагментів антитіл (наприклад, F(ab')<sub>2</sub>: біспецифічні антитіла).

WO 96/16673 описує біспецифічне антитіло до ErbB2/FcγRIII, а патент США No. 5837234 описує біспецифічне антитіло ErbB2/FcγRI. Біспецифічне антитіло до ErbB2/Fcα представлено в WO98/02463. Патенти США No. 5821337 і 6407213 розглядають біспецифічні антитіла до ErbB2/CD3. Були описані додаткові біспецифічні антитіла, які зв'язуються з антигенною детермінантою на антигені CD3 і іншою антигенною детермінантою. Див., наприклад, патенти США No. 5078998 (антитіло до CD3/антигену пухлинних клітин); 5601819 (антитіло до CD3/МУЛ-2R; антитіло до CD3/CD28; антитіло до CD3/CD45); 6129914 (антитіло до CD3/злоякісному антигену В-клітин); 7112324 (антитіло до CD3/CD19); 6723538 (антитіло до CD3/CCR5); 7235641 (антитіло до CD3/ErCAM); 7262276 (антитіло до CD3/антигену пухлини яєчників); і 5731168 (антитіло до CD3/CD4IgG).

Способи одержання біспецифічних антитіл відомі науці. Традиційне одержання біспецифічних антитіл повної довжини ґрунтується на до-експресії двох пар важкого ланцюга-легкого ланцюга імуноглобуліну, при цьому два ланцюги мають різну специфічність (Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983)). Беручи до уваги випадковий розподіл важкого й легкого ланцюгів імуноглобуліну, такі гібридоми (квадроми) дозволяють одержати потенційну суміш із 10 різних молекул антитіл, з яких тільки одна має правильну біспецифічну структуру. Очищення правильної молекули, що звичайно виробляється шляхом афінної хроматографії, є досить трудомісткою процедурою, і вихід продукту дуже низький. Подібні процедури описані в WO 93/08829 і в Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991).

Відповідно до іншого підходу, варіабельні домени антитіла з необхідною специфічністю зв'язування (комбіновані сайти антитіло-антиген) зливають із послідовностями константного домену імуноглобуліну. Переважним чином, злиття відбувається в константному домені важкого ланцюга Ig, що включає, щонайменше, частину шарнірного, C<sub>H</sub>2 і C<sub>H</sub>3 ділянок. Переважно, що перша константна ділянка важкого ланцюга (C<sub>H</sub>1) складалась з ділянки зв'язування з легким ланцюгом, що є присутнім, щонайменше, в одному зі злитих білків. ДНК, що кодують злиття важкого ланцюга імуноглобуліну й, при необхідності, легкого ланцюга імуноглобуліну, вводять в окремі вектори експресії й ко-трансфікують у підходящу клітину-хазяїн. Це забезпечує більшу гнучкість у дотриманні взаємних пропорцій трьох поліпептидних фрагментів по винаходу з нерівними співвідношеннями трьох поліпептидних ланцюгів, що використовувалися у конструюванні, а також оптимальний вихід необхідного біспецифічного антитіла. Крім того, можливо вставити послідовність, що кодує, для двох або всіх трьох поліпептидів в один вектор експресії, при цьому експресія щонайменше, двох поліпептидних ланцюгів у рівних співвідношеннях характеризується високим виходом, або такі співвідношення не мають істотного впливу на вихід необхідної комбінації ланцюгів.

У переважному варіанті втілення винаходу з використанням такого підходу біспецифічні антитіла складаються з гібрида важкого ланцюга імуноглобуліну з одною специфічністю зв'язування в одному домені й гібрида пари важкий ланцюг - легкий ланцюг імуноглобуліну (що

забезпечує іншу специфічність зв'язування) в іншому домені. Було виявлено, що така асиметрична структура полегшує поділи необхідного біспецифічної сполуки з небажаними комбінаціями ланцюгів імуноглобулінів, тому що присутність легкого ланцюга імуноглобуліну тільки в одній половині біспецифічної молекули забезпечує легкий поділ. Такий підхід описаний в WO 94/04690. Додаткова інформація з одержання біспецифічних антитіл представлена, наприклад, в Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

Відповідно до іншого підходу, що описаний в патенті США No. 5731168, може бути сконструйована ділянка взаємодії між парою молекул антитіл для одержання максимально більшого числа гетеродимерів, відновлених з рекомбінантної клітинної культури. Переважна ділянка взаємодії складається, щонайменше, з домену C<sub>H</sub>3. У такому способі одна або кілька невеликих амінокислотних ланцюгів з ділянки взаємодії молекули першого антитіла заміщаються більшими бічними ланцюгами (наприклад, тірозином або триптофаном). У ділянці взаємодії молекули іншого антитіла створюються "порожнечі, що компенсують, » однакового або різного розмірів щодо великого бічного ланцюга (-ів) шляхом заміни великих бічних амінокислотних ланцюгів більш меншими ланцюгами (наприклад, аланіном або треоніном). Це забезпечує механізм підвищення виходу гетеродимера щодо інших небажаних кінцевих продуктів, таких як гомодимери. Біспецифічні антитіла, що одержували в такий спосіб, вказуються в тексті даної заявки як "антитіла з опуклостями".

Біспецифічні антитіла складаються із "гетерокон'югованих" антитіл або антитіл, приєднаних перехресними зв'язками. Наприклад, одне антитіло в гетерокон'югаті може бути з'єднане з авідіном, інше - з біотином. Такі антитіла були запропоновані, наприклад, для введення в імунну систему проти небажаних клітин (патент США No. 4676980) і для лікування ВІЛ-інфекції (WO 91/00360, WO 92/200373 і EP 03089). Гетерокон'югатні антитіла можуть бути отримані з використанням будь-якого підходящого способу утворення перехресних зв'язків. Науці відомі підходящі агенти для утворення перехресних зв'язків, і такі агенти описані також у патенті США No. 4676980 разом із цілим рядом способів утворення перехресних зв'язків.

Способи одержання біспецифічних антитіл із фрагментів антитіл також були описані в літературі. Наприклад, біспецифічні антитіла можуть бути отримані з утворенням хімічного зв'язку. Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) описують процедуру, у якій інтактні антитіла підлягають протеолітичному розщепленню для одержання фрагментів F(ab')<sub>2</sub>. Такі фрагменти відновлюють у присутності дитіолового комплексоутворювача (тобто натрію арсеніту) для стабілізації віцинальних дитіолів і запобігання утворення міжмолекулярних дисульфідних зв'язків. Отримані фрагменти Fab' потім перетворюють у похідні тіонітробензоата (TNB). Потім одна з похідних сполук Fab'-TNB переводять в Fab'-тіол шляхом відновлення з використанням меркаптоетіламіна, і потім змішують із еквімолярною кількістю іншого похідного Fab'-TNB з утворенням біспецифічного антитіла. Отримані біспецифічні антитіла можуть використовуватися як агенти для виборчої іммобілізації ферментів.

Недавній прогрес полегшив безпосереднє відновлення фрагментів Fab'-SH з *E. coli*, і такі фрагменти можуть бути з'єднані шляхом хімічної реакції з утворенням біспецифічних антитіл. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) описав одержання повністю гуманізованого біспецифічного антитіла F(ab')<sub>2</sub>. Кожний фрагмент Fab' був секретован окремим чином з *E. coli* й підданий контрольованій хімічній взаємодії в умовах *in vitro* з утворенням біспецифічного антитіла. Утворене в такий спосіб біспецифічне антитіло було здатно зв'язуватися із клітинами, що надлишково експресують рецептор ErbB2, і здоровими Т-клітинами людини, а також служив як тригер літичної активності людських цитотоксичних лімфоцитів щодо мішеней-пухлин молочної залози.

Також були описані різні способи одержання й ізоляції фрагментів біспецифічних антитіл безпосередньо з культури рекомбінантних клітин. Наприклад, біспецифічні антитіла були отримані з використанням лейцинових блискавок. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Пептиди лейцинової блискавки з білків Fos і Jun були з'єднані з ділянками Fab' двох різних антитіл шляхом злиття генів. Гомодимери антитіл були відновлені в області каркасної ділянки з утворенням мономерів і потім повторно окислені з утворенням гетеродимерів антитіл. Такий спосіб також може використовуватися для одержання гомодимерів антитіл. Спосіб "діатіла", описаний Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), надав альтернативний механізм одержання фрагментів біспецифічних антитіл. Фрагменти складаються з V<sub>H</sub>, приєданого до V<sub>L</sub> за допомогою лінкера, що є досить коротким, щоб забезпечити спарювання між двома доменами одного й того ж ланцюга. Відповідно до цього, домени V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub> одного фрагмента з'єднуються із комплементарними доменами V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub> іншого фрагмента, утворюючи тим самим дві антигензв'язуючі ділянки. Також повідомлялася й інша стратегія одержання фрагментів біспецифічних антитіл шляхом використання одноланцюгових

димерів Fv (sFv). Див. Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Винахід описує також антитіла з більш ніж двома валентностями. Наприклад, можуть бути отримані триспецифічні антитіла. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

#### 6. Антитіла-гетерокон'югати

Даний винахід також описує антитіла-гетерокон'югати. Антитіла-гетерокон'югати складаються із двох приєднаних ковалентним чином антитіл. Такі антитіла були запропоновані, наприклад, для введення в імунну систему проти небажаних клітин (патент США No. 4676980) і для лікування ВІЛ-інфекції (WO 91/00360, WO 92/200373 і EP 03089). Передбачається, що антитіла можуть бути отримані *in vitro* з використанням відомих в області хімічного синтезу білків способів, включаючи використання агентів, що утворюють перехресні зв'язки. Наприклад, імунотоксини можуть бути створені з використанням реакції обміну дисульфідів або шляхом утворення тіоефірного зв'язку. Приклади підходящих реагентів для даної мети включають імінотіолат і метил-4-меркаптобутиримідат, а також реагенти, описані, наприклад, у патенті США No. 4676980.

#### 7. Мультивалентні антитіла

Мультивалентне антитіло може бути інтерналізовано (і/або катаболізовано) клітиною, що експресує антиген, з яким зв'язується антитіло, швидше, ніж бівалентне антитіло. Антитіла даного винаходу можуть бути представлені мультивалентними антитілами (за винятком класу IgM) із трьома або більше антигензв'язуючими ділянками (наприклад, тетравалентні антитіла), які можуть бути з легкістю отримані шляхом використанням рекомбінантної експресії нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептидні ланцюги антитіла. Мультивалентне антитіло може складатися з домену димерізації й трьох або декількох антигензв'язуючих ділянок. Переважний домен димерізації складається з ділянки Fc або шарнірної ділянки. У такому випадку антитіло буде складатися з ділянки Fc і трьох або більше антигензв'язуючих ділянок на амінокінці щодо ділянки Fc. Переважно описане тут мультивалентне антитіло складається з від трьох до приблизно восьми, але переважно чотирьох, антигензв'язуючих ділянок. Мультивалентне антитіло складається із щонайменше одного поліпептидного ланцюга (і переважно двох поліпептидних ланцюгів), і такий поліпептидний ланцюг (ланцюга) складаються із двох або більше варіабельних доменів. Наприклад, поліпептидний ланцюг (-и) може складатися з VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-(X2)<sub>n</sub>-Fc, при цьому VD1 є першим варіабельним доменом, VD2 є другим варіабельним доменом, Fc є першим поліпептидним ланцюгом ділянки Fc, X1 і X2 представляють амінокислоту або поліпептид, і n становить 0 або 1. Наприклад, поліпептидний ланцюг (-и) буде складатися з: ланцюг VH-CH 1-гнучкий лінкер-VH-CH1-Fc ділянка; або ланцюг VH-CH1-VH-CH1-Fc ділянка. Описане тут мультивалентне антитіло переважним чином буде додатково складатися з, щонайменше, двох (але переважніше чотирьох) варіабельних доменів легкого ланцюга поліпептидів. Описане тут мультивалентне антитіло може складатися, наприклад, із приблизно від двох до приблизно восьми) варіабельних доменів легкого ланцюга поліпептидів. Варіабельні домени легкого ланцюга складаються з варіабельного домену легкого ланцюга й, у деяких випадках, можуть також включати домен CL.

#### 8. Інжиніринг ефекторної функції

У деяких випадках може бути необхідною модифікація антитіла по винаходу відносно його ефекторної функції, наприклад, для підвищення антиген-залежної клітинно-опосередкованої цитотоксичності (АЗКЦ) і/або комплемент-залежної цитотоксичності (КЗЦ) антитіла. Це може бути досягнуте шляхом введення однієї або декількох замін амінокислот у ділянку Fc антитіла. З іншої сторони або крім того, у ділянку Fc можуть бути введені залишки цистеїна, що приводить до утворення дисульфідних містків між ланцюгами в даній ділянці. Отримане в такий спосіб гомодимерне антитіло може мати підвищену здатність до інтерналізації й/або підвищеної здатності до комплемент-опосередкованої загибелі клітин і/або антитіл-залежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ). Див. Caron et al., J. Exp Med., 176:1191-1195 (1992) і Shopes, B., J. Immunol., 148:2918-2922 (1992). Гомодимірні антитіла з підвищеною протипухлинною активністю також можуть бути отримані з використанням гетеробіфункційних крос-лінкерів, як це описано Wolff et al., Cancer Research, 53:2560-2565 (1993). З іншого боку, антитіло може бути отримане в результаті рекомбінації з наявністю подвійних ділянок Fc, що пояснює підвищений лізис комплементу й властивості АЗКЦ. Див. Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989). Для підвищення часу напівжиття антитіла в сироватці, в антитіло може бути введена антигенна детермінанта для зв'язування з "рятивним" рецептором (зокрема, фрагмент антитіла), як це описано, наприклад, у патенті США No. 5739277. У контексті даного винаходу термін "антигенна детермінанта для зв'язування з "рятивним" рецептором" відноситься до антигенної детермінанти ділянки Fc молекули IgG (наприклад, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> або IgG<sub>4</sub>), що відповідає за підвищення періоду напівжиття в сироватці *in vivo* молекули IgG.

## 9. Імунокон'югати

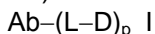
Винахід описує імунокон'югати (або кон'югати антитіло-препарат, або КАП (використовуються взаємозамінним чином)), що складаються з антитіла, кон'югованого із цитотоксичним агентом, таким як хіміотерапевтичний агент, препарат, агент-інгібітор росту, токсин (наприклад, ферментативно активний токсин бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, або їхні фрагменти) або радіоактивним ізотопом (тобто радіоімунокон'югат).

У певних варіантах втілення винаходу імунокон'югат складається з антитіла й хіміотерапевтичного агента або іншого токсину. Хіміотерапевтичні агенти, що використовують в одержанні таких імунокон'югатів, уже були описані вище. Ферментативно активні токсини і їхні фрагменти, які можуть використовуватися, включають А ланцюг дифтерійного токсину, що не зв'язується активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг А екзотоксина (*Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А рицина, ланцюг А абрина, ланцюг А модессина, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантина, білки *Phytolaca americana* proteins (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор з *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор з *Saraonaria officinalis*, гелонін, мітогеллін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трихотецени. Для одержання радіоімунокон'югованих антитіл є цілий ряд радіонуклідів. Приклади включають  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  і  $^{186}\text{Re}$ . Кон'югати антитіла й цитотоксичного агента одержують із використанням цілого ряду біфункційних білокзв'язуючих агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдітіол) пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункційні похідні імідоефірів (такі як диметиладіпімідата HCL), активні ефіри (такі як дисукцинімідила суберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидо сполуки (такі як біс (p-азидобензойл) гександіамін), похідні біс-діазонія (такі як біс-(p-діазоніябензойл)-етілендіамін), діізоціанати (такі як толуол 2,6-діізоціанат) й біс-активні сполуки фтора (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, імунотоксин ріцин може бути отриманий відповідно до опису, представленого в Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). Мічена вуглецем-14 1-ізоціанатобензил-3-метилдіетілен триамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є типовим хелатним агентом для кон'югації радіонукліда з антитілом. Див. WO94/11026.

Кон'югати антитіла й одного або декількох невеликих молекул токсинів, таких як калихіміцин, білки аурістатина, такі як монометилаурістатин (MMAE) (синтетичний аналог доластатина), майтансиноїди, такі як DM1, трихотен й CC1065, а також похідні таких токсинів, що володіють активністю токсину, також можуть використовуватися.

Типові імунокон'югати - кон'югати антитіло-препарат

Імунокон'югат (або "кон'югат антитіло-препарат" ("КАП")) по винаходу можуть бути представлені сполуками по Формулі I (див. нижче), при цьому антитіло кон'юговано (тобто зв'язане ковалентним зв'язком) з однією або декількома молекулами препарату (D) за допомогою лінкера (L) (у деяких випадках). КАП можуть включати кон'югати TioMAT-препарат ("КТП").



Відповідно до цього, антитіло може бути кон'юговано із препаратом безпосереднім чином або за допомогою лінкера. У Формулі I p є середнім числом молекул препарату на молекулу антитіла, і таке число може варіювати, наприклад, від приблизно 1 до приблизно 20 молекул препарату на антитіло, і в деяких варіантах втілення винаходу - від 1 до приблизно 8 молекул препарату на антитіло. Винахід включає композицію, що складається із суміші сполук антитіл-препаратів по Формулі I, при цьому середній показник навантаження препарату на антитіло становить від приблизно 2 до приблизно 5 або від приблизно 3 до приблизно 4.

а. Типові лінкери

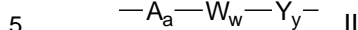
Лінкер може складатися з одного або декількох лінкерних компонентів. Типові лінкерні компоненти включають 6-малеїмідокапроїл ("MC"), малеїмідопропанойл ("ПР"), валін-цитруллін ("вал-цит" або "vc"), аланін-фенілаланін ("ала-фен"), p-амінобензилоксикарбонил ("PAB"), а також наступні лінкери, утворені в результаті кон'югації з лінкерними реагентами: N-сукцинімідил 4-(2-піридилтіо) пентаноат-утворюючий лінкер 4-меркаптопентаноївої кислоти ("SPP"), N-сукцинімідил 4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1 карбоксилатутворююча лінкерная молекула 4-((2,5-діоксопірролідин-1-іл)метил)циклогексанкарбонова кислота ("SMCC", також вказується тут як "MCC"), 2,5-діоксопірролідин-1-іл 4-(піридин-2-ілдисульфаніл) бутанутворююча лінкерная молекула 4-меркаптобутаноєвої кислоти ("SPDB"), N-сукцинімідил (4-йодо-ацетил) амінобензоат ("SIAB"), етіленоксі -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O- у вигляді однієї або декількох повторюваних одиниць ("EO" або "PEO"). Додаткові лінкерні компоненти також відомі науці, і деякі з них описані в даній заявці.

Лінкер може бути представлений "лінкером, що розщеплюється", що полегшує вивільнення препарату в клітині. Наприклад, можуть використовуватися кислотонестійкий лінкер (наприклад,



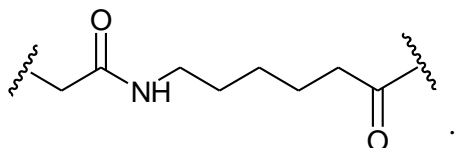
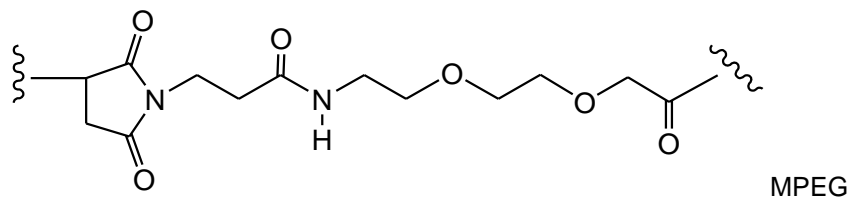
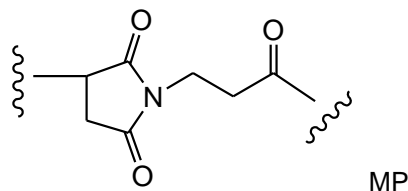
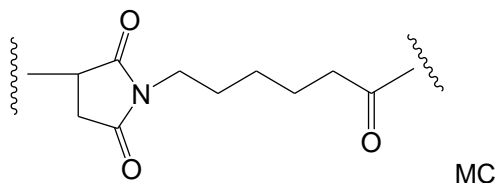
гідразон), протеазо-чутливий лінкер (наприклад, пептидазо-чутливий), фотонестійкий лінкер, диметильовий лінкер або утримуючий дисульфід лінкер (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); патент США No. 5208020).

У певних варіантах втілення винаходу лінкер представлений лінкером по Формулі II:



де A є розширювальною одиницею, і a є цілим числом від 0 до 1; W є одиницею амінокислоти, і w - цілим числом від 0 до 12; Y є спейсерною одиницею, і y - числом 0, 1 або 2; i AT, D і p визначаються відповідно до Формули I. Типові варіанти втілення винаходу з такими лінкерами описані в US 2005-0238649 A1 (включено в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання).

У деяких варіантах втілення винаходу лінкерний компонент може складатися з "розширювальної одиниці", що зв'язує антитіло з іншими компонентами лінкера або молекулою препарату. Типові розширювальні одиниці представлені нижче (хвиляста лінія вказує на ковалентний зв'язок з антитілом):



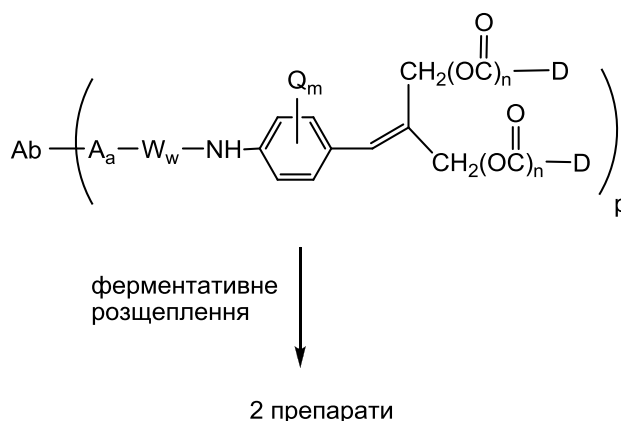
У деяких варіантах втілення винаходу лінкерний компонент може складатися з амінокислотної одиниці. В одному такому варіанті втілення винаходу амінокислотна одиниця дозволяє здійснювати розщеплення лінкера протеазою, полегшуючи, таким чином, вивільнення препарату з імунокон'югату під впливом внутрішньоклітинних протеаз, таких як лізосомальні ферменти. Див., наприклад, Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784. Типові амінокислотні одиниці включають, але не обмежуються, дипептид, трипептид, тетрапептид і пентапептид. Типові дипептиди включають наступні: валін-цитруллін (vc або вал-цит), аланін-фенілаланін (af або ала-фен); фенілаланін-лізін (fk або фен-ліз); або N-метил-валін-цитруллін (Me-вал-цит). Типові трипептиди включають наступні: гліцин-валін-цитруллін (глі-вал-цит) і гліцин-гліцин-гліцин (глі-глі-глі). Амінокислотна одиниця може складатися з амінокислотних залишків, які зустрічаються природно, а також рідкі амінокислоти й не представлені в природі аналогі амінокислот, такі як цитруллін. Амінокислотні одиниці можуть бути отримані й оптимізовані у своїй вибірковості на предмет ферментативного розщеплення окремим ферментом, наприклад, пухлиноасоційованою протеазою, катепсином B, C й D або плазміном.

У деяких варіантах втілення винаходу лінкерний компонент може складатися зі "спейсерною" одиницею, що зв'язує антитіло з молекулою препарату безпосередньо або за допомогою "розширювальної одиниці" і/або амінокислотної одиниці. Спейсерна одиниця може бути "що саможертвує" або "не саможертвує". "Та, що не саможертвує" спейсерна одиниця

являє собою одиницю, що повністю або частково залишається пов'язаною з молекулою препарату до моменту ферментативного (наприклад, протеолітичного) розщеплення КАП. Приклади "той, що не саможертвує" спейсерної одиниці включають, але не обмежуються, гліцинову спейсерну одиницю й гліцин-гліцинову спейсерну одиницю. Також розглядаються й інші комбінації пептидних спейсерів, сприйнятливих до специфічного ферментативного розщеплення послідовності. Наприклад, ферментативне розщеплення КАП, що містить гліцин-гліцинову спейсерну одиницю, за допомогою протеази пухлинної клітини приведе до вивільнення молекули гліцин-гліцин-препарат з КАП, що залишився. В одному подібному варіанті втілення винаходу молекула гліцин-гліцин-препарат потім піддається окремому етапу гідролізу в пухлинній клітині, що приводить до вивільнення спейсера гліцин-гліцин від молекули препарату.

Спейсерна одиниця "що саможертвує" являє собою одиницю, що дозволяє молекулі препарату вивільнитися без окремого етапу гідролізу. У певних варіантах втілення винаходу спейсерна одиниця лінкера складається з р-амінобензилової одиниці. В одному такому варіанті втілення винаходу до амінокислотної одиниці приєднаний р-амінобензиловий спирт за допомогою амідного зв'язку, а між бензиловим спиртом і цитотоксичним агентом утворюється карбамат, метилкарбамат або карбонат. Див., наприклад, Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103. В одному варіанті втілення винаходу спейсерна одиниця представлена р-амінобензілоксикарбонілом (PAB). У певних варіантах втілення винаходу ділянка фенілена р-амінобензилової одиниці заміщений  $Q_m$ , при цьому Q представлений  $-C_1-C_8$  алкілом,  $-O-(C_1-C_8$  алкілом), -галогеном, -нітро або -ціано; і m представлений цілим числом у межах 0-4. Приклади спейсерних одиниць, що само жертвують, додатково включають, але не обмежуються, ароматичні сполуки, які по своїй електронній структурі подібні р-амінобензиловому спирту (див, наприклад, US 2005/0256030 A1), такі як похідні 2-аміноімідазол-5-метанола (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), а також орто- або пара-амінобензилацетали. Можуть використовуватися спейсери, які при гідролізі амідного зв'язку утворюють кільце, серед них заміщені й незаміщені аміди 4-аміномасляної кислоти (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223); належним чином заміщені біциклічні системи [2.2.1] і [2.2.2] (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815); а також аміди 2-амінофенілпропіонової кислоти (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 5867). Елімінація препаратів, що містять аміни, заміщених у положенні а гліцину (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27, 1447), також являє приклад спейсерів, що саможертвують, що використовують для КАП.

В одному варіанті втілення винаходу спейсерна одиниця представлена розгалуженою одиницею біс(гідроксиметил)стірена (BHMS) (див. нижче), і може використовуватися для введення й вивільнення множинних препаратів.



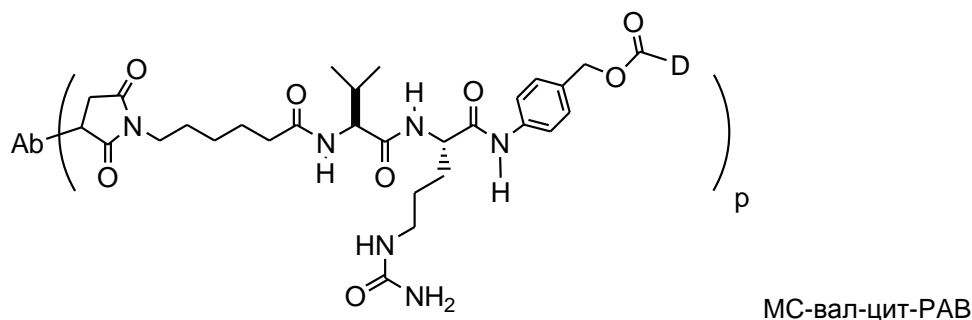
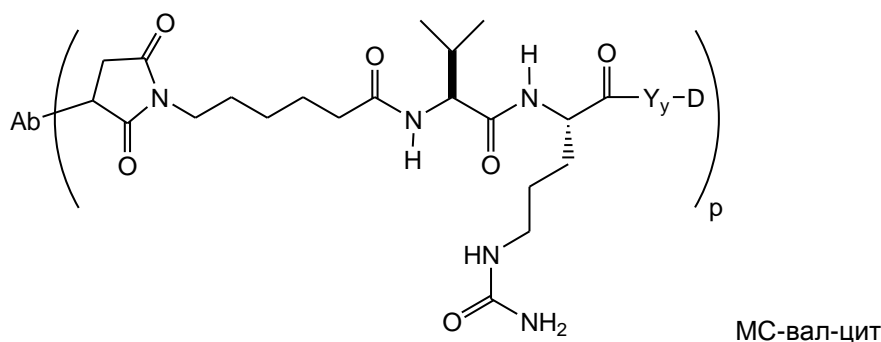
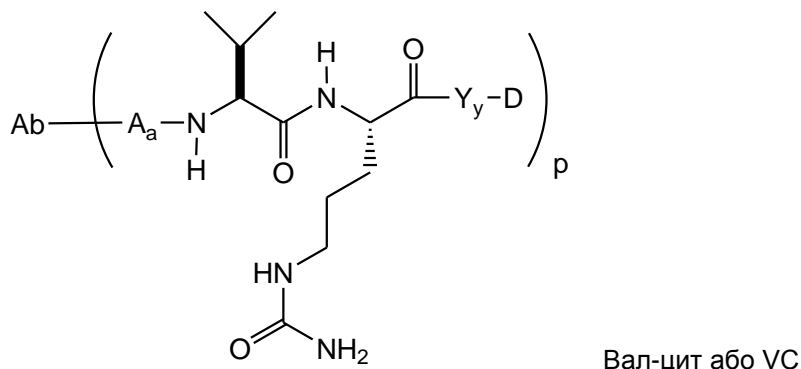
де Q є  $-C_1-C_8$  алкілом,  $-O-(C_1-C_8$  алкілом), -галогеном, -нітро або -ціано; m є цілим числом, що варіює від 0 до 4; n становить 0 або 1; і p варіює від 1 до приблизно 20.

В іншому варіанті втілення винаходу лінкер L може бути представлений лінкером розгалуженого типу для ковалентного приєднання більше однієї молекули препарату за допомогою розгалуженої, мультифункційної лінкерної молекули з антитілом (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Розгалужені лінкери можуть підвищувати молярне співвідношення препарату до антитіла, тобто навантаження, що є однією з характеристик активності КАП. Таким чином, у той час як антитіло з введенням у ході рекомбінації цистеїном може містити тільки одну

реакційноздатну тіоліву групу, за допомогою розгалуженого лінкера може бути приєднана безліч молекул препарату.

Типові лінкерні компоненти і їхні комбінації представлені нижче в контексті КАП по Формулі II:

5



10

Лінкерні компоненти, включаючи розширювач, спейсер і амінокислотні одиниці, можуть бути отримані в ході синтезу з використанням відомих науці способів, наприклад, описаних в US 2005-0238649 A1.

#### 15 б. Молекули типових препаратів

##### (1) Майтансин і майтансиноїди

У деяких варіантах втілення винаходу імунокон'югат складається з антитіла, кон'югованого однією або декількома молекулами майтансиноїдів. Майтансиноїди є інгібіторами мітозу й діють шляхом інгібування полімеризації тубуліна. Майтансин уперше був виділений з східноафриканського чагарнику *Maytenus serrata* (патент США No. 3896111). Згодом було виявлено, що певні мікроорганізми також виробляють майтансиноїди, наприклад, майтансинол і С-3 ефіри майтансинола (патент США No.4 151 042). Синтетичний майтансинол і його похідні й аналоги описані, наприклад, у наступних патентах США No: 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663; и 4371533.

Молекули препаратів-майтансиноїдов є ефективними молекулами препарату в кон'югатах антитіло-препарат по наступним причинам: (i) вони відносно доступні для одержання шляхом ферментації або хімічної модифікації або дериватизації продуктів ферментації; (ii) вони легко піддаються дериватизації з функціональними групами, що підходять для кон'югації за допомогою утворення дисульфідних і інших зв'язків з антитілами; (iii) вони стійкі в плазмі; і (iv)

30

вони є ефективними відносно цілого ряду пухлинних клітин.

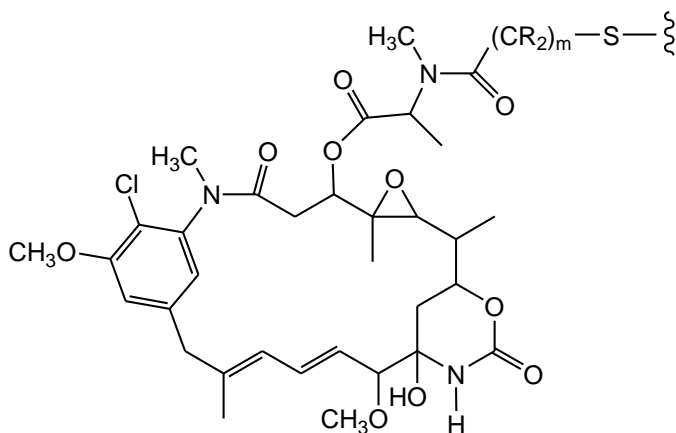
Підходящі для використання як молекули препаратів майтансиноїда сполуки майтансина широко відомі в науці й можуть бути виділені із природних джерел відповідно до відомих способів або отримані шляхом генної інженерії й способів ферментації (US 6790952; US 2005/0170475; Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973). Майтансинол і аналоги майтансинола також можуть бути отримані в ході синтезу з дотриманням відомих способів.

Типові молекули препарату майтансиноїда включають сполуки зі зміненим ароматичним кільцем, такі як: C-19-дехлор (патент США No. 4256746) (отриманий шляхом відновлення ансатоміцина P2 алюмогідридом літія); C-20-гідроксі (або C-20-деметил) +/- C-19-дехлор (патент США No. 4361650 і 4307016) (отриманий шляхом деметилування з використанням *Streptomyces* або *Actinomyces* або відщипленням хлору з використанням LAH); і C-20-деметоксі, C-20-ацилокі (- OCOR), +/- дехлор (патент США No. 4294757) (отриманий шляхом ацилювання з використанням ацилхлоридів), а також сполуки з модифікаціями в інших положеннях.

Типові молекули препарату майтансиноїда також включають сполуки з наступними модифікаціями: C-9-SH (патент США No. 4424219) (отриманий у ході реакції майтансинола з  $H_2S$  або  $P_2S_5$ ); C-14-алкоксиметил(деметоксі/ $CH_2$  OR)(US 4331598); C-14-гідроксиметил або ацилоксиметил ( $CH_2OH$  або  $CH_2OAc$ ) (патент США No. 4450254) (отриманий з *Nocardia*); C-15-гідроксі/ацилоксі (US 4364866) (отриманий у ході перетворення майтансинола *Streptomyces*); C-15-метоксі (патент США No. 4313946 і 4315929) (виділений з *Trewia nudiflora*); 18-N-деметил (патент США No. 4362663 і 4322348) (отриманий шляхом деметилування майтансинола *Streptomyces*); і 4,5-дезоксі (US 4371533) (отриманий шляхом відновлення майтансинола титання трихлоридом/LAH).

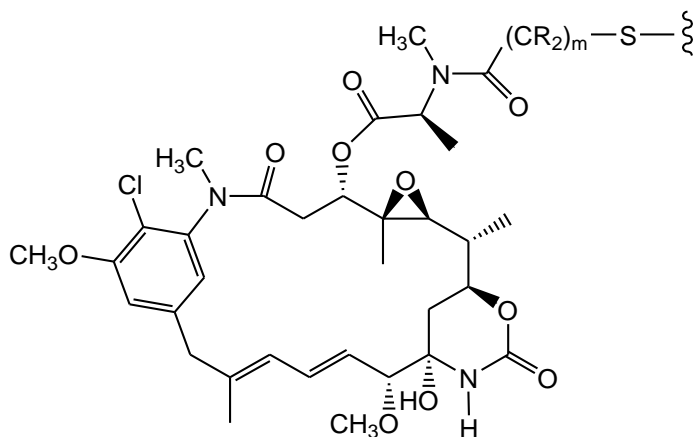
У сполуках майтансіна відомо багато положень, які можуть використовуватися для утворення зв'язку, залежно від типу зв'язку. Наприклад, для утворення ефірного зв'язку можуть використовуватися положення C-3 з гідроксильною групою, положення C-14 з гідроксиметилом, положення C-15 з гідроксильною групою й положення C-20 з гідроксильною групою (US 5208020; US RE39151; US 6913748; US 7368565; US 2006/0167245; US 2007/0037972).

Молекули препарату майтансиноїда можуть мати наступну структуру:



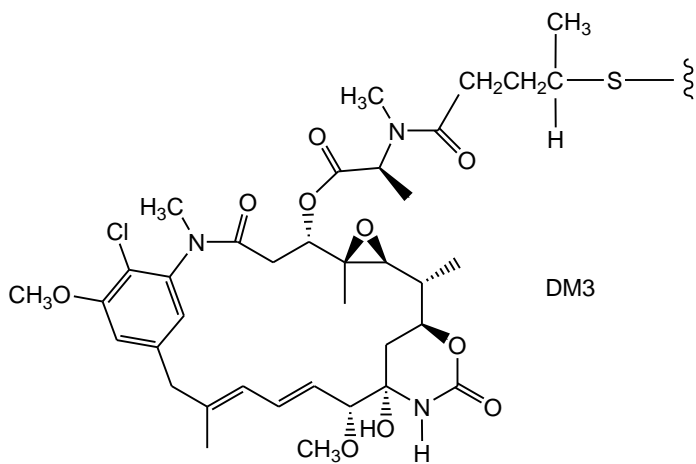
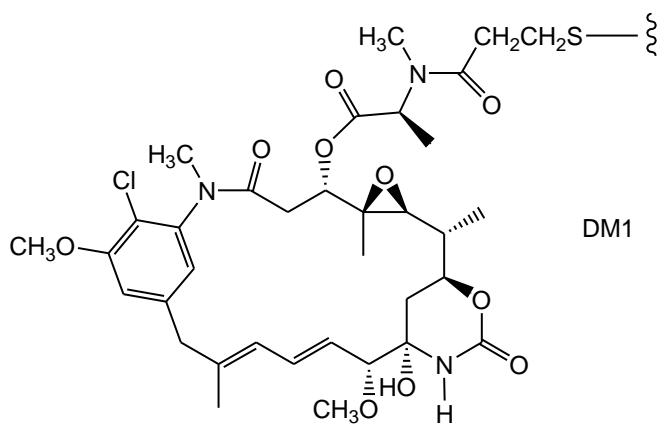
де хвилястою лінією зазначене ковалентне приєднання атома сірки молекули препарату майтансиноїда з лінкером KAT. R може бути представлений незалежним чином H або C<sub>1</sub>–C<sub>6</sub> алкілом. Ланцюг алкілена, що приєднує амідну групу до атома сірки, може бути представлений метанілом, етанілом або пропілом, тобто n становить 1, 2 або 3 (US 633410; US 5208020; US 7276497; Chari et al (1992) *Cancer Res.* 52:127-131; Liu et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:8618-8623).

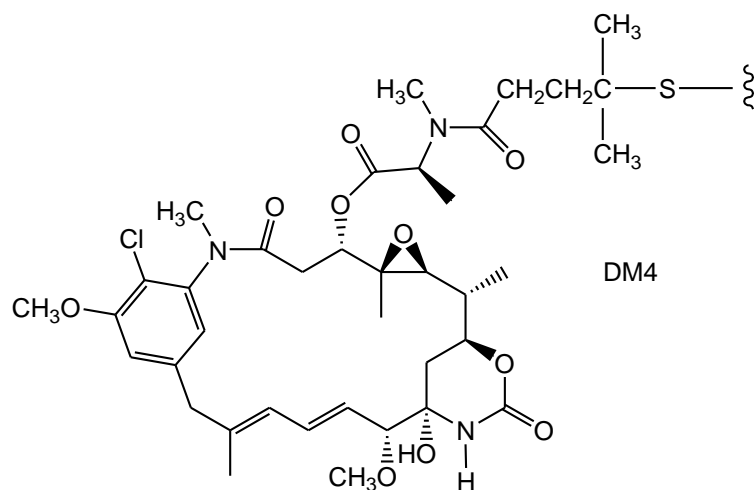
Всі стереоізомери молекули препарату майтансиноїда також включені як сполуки для даного винаходу, тобто включені будь-які комбінації конфігурацій R і S у положенні хиральних атомів вуглецю D. В одному варіанті втілення винаходу молекула препарату майтансиноїда буде мати наступну стереохімічну будову:



Типові варіанти втілення винаходу з використанням молекул препарату майтансиноїда включають DM1; DM3; і DM4 з наступною структурою:

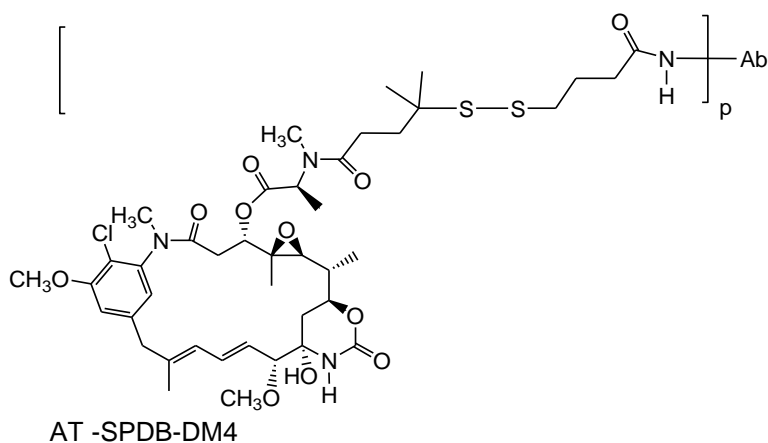
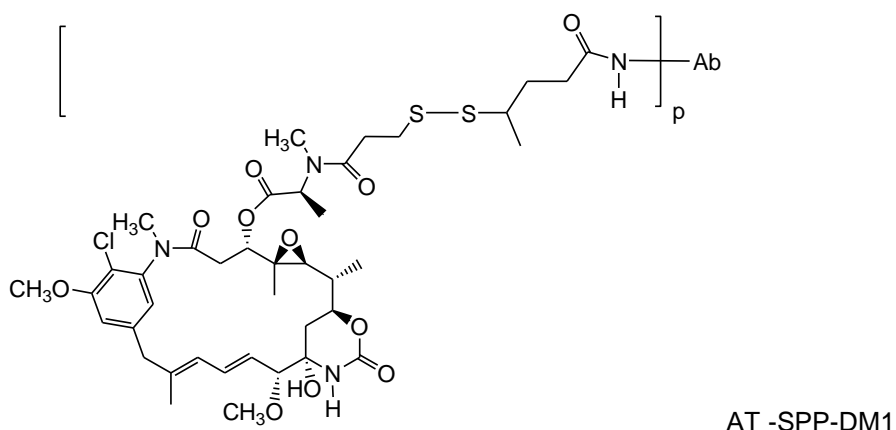
5

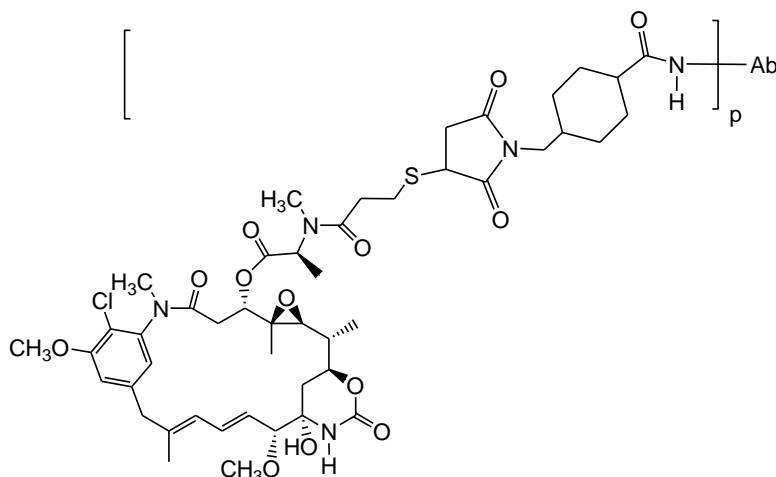




де хвилястою лінією зазначене ковалентне приєднання атома сірки молекули препарату мйтансиноїда з лінкером (L) кон'югата антитіло-препарат. (WO 2005/037992; US 2005/0276812 A1).

Інші типові кон'югати антитіла-мйтансиноїда мають наступну структуру позначення (де AT - антитіло, і р становить від 1 до приблизно 8):

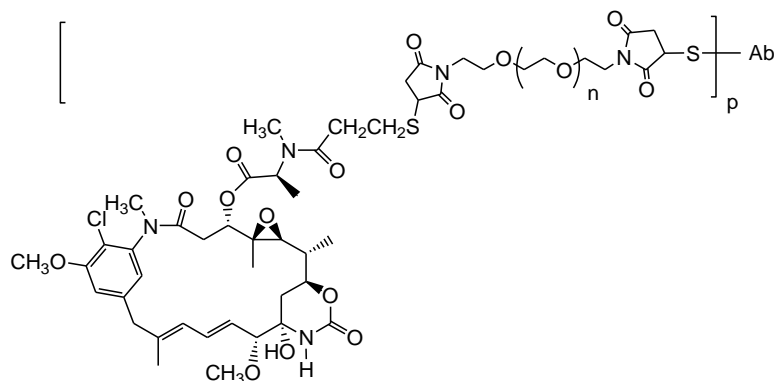




#### AT-SMCC-DM1

В одному варіанті втілення винаходу утворюється кон'югат антитіло-препарат, у якому DM4 приєднаний за допомогою лінкера SPDB до тілової групи антитіла (див. патент США No. 6913748 і 7276497 (включено в справжній документ у всій своїй повноті за допомогою посилання)).

Типові кон'югати антитіло-препарат, у яких DM1 приєднаний за допомогою лінкера BMPEO до тілової групи антитіла, мають наступну структуру й позначення:



де AT - антитіло, n дорівнює 0, 1 або 2; і p дорівнює 1, 2, 3 або 4.

Імунокон'югати, що містять майтансиноїди, способи їхнього одержання і їхнє терапевтичне використання, описані, наприклад, в Erickson, et al (2006) Cancer Res. 66(8):4426-4433; патенті США No. 5208020, 5416064, US 2005/0276812 A1, і Європейському патенті EP 0425235 B1 (включено в справжній документ у всій своїй повноті за допомогою посилання).

Кон'югати антитіло-майтансиноїд одержують шляхом хімічної реакції антитіла з молекулою майтансиноїда без істотного зменшення біологічної активності антитіла або молекули майтансиноїда. Див., наприклад, патент США No. 5208020 (включено в справжній документ у всій своїй повноті за допомогою посилання). Майтансиноїди можуть бути синтезовані з використанням відомих способів або виділені із природних джерел. Підходящі майтансиноїди описані, наприклад, у патенті США No. 5208020, а також в інших патентних і непатентних публікаціях, що відносяться до згаданих вище сполук, таким як майтансинол і аналоги майтансиноїда, модифіковані в частині ароматичного кільця або інших положень молекули майтансинола, такі як різні ефіри майтансинола.

Науці відома безліч груп сполучення для одержання кон'югатів антитіло-майтансиноїд, включаючи, наприклад, групи, описані в патенті США 5208020 або патенті EP 0 425 235 B1; Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992); і US 2005/016993 A1 (включено в справжній документ у всій своїй повноті за допомогою посилання). Кон'югати антитіло-майтансиноїд, що складаються з лінкерного компонента SMCC, можуть бути отримані відповідно до процедури, описаної в US 2005/0276812 A1, "Antibody-drug conjugates and Methods." Лінкер може складатися з дисульфідних груп, тіоефірних груп, кислотонестійких груп, фотонестійких груп або естеразонестійких груп, як це описано в зазначених вище патентах. Опис і приклади додаткових

лінкерів приводяться в тексті даної заявки.

Кон'югати антитіла й майтансиноїда одержують із використанням цілого ряду біфункційних білокзв'язуючих агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піриділдитіол) пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїдометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункційні похідні імідоефірів (такі як диметиладіпімідата HCL), активні ефіри (такі як дисукцинімідила суберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидо сполуки (такі як біс- (p-азидобензойл) гександіамін), похідні біс-діазонія (такі як біс- (p-діазоніабензойл)-етилєндіамін), діізоціанати (такі як толуол 2,6-діізоціанат) і біс-активні сполуки фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). У певних варіантах втілення винаходу сполучний агент представлений N-сукцинімідил-3-(2-піриділдітіо) пропіонатом (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) або N-сукцинімідил-4-(2-піриділдітіо)пентаноатом (SPP) для утворення дисульфідного зв'язку.

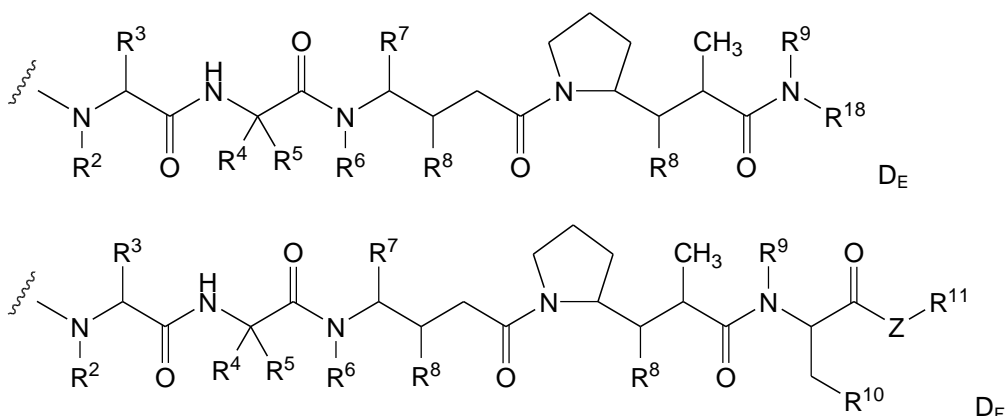
Лінкер може бути приєднаний до молекули майтансиноїда в різних положеннях, залежно від типу зв'язку. Наприклад, у ході реакції з гідроксильною групою з використанням стандартних способів зв'язування може бути утворений ефірний зв'язок. Реакція може відбутися в положенні C-3 з гідроксильною групою, положенні C-14, модифікованому гідроксиметилом, положенні C-15, модифікованому гідроксильною групою, і положенні C-20 з гідроксильною групою. В одному варіанті втілення винаходу зв'язок утворений у положенні C-3 майтансинола або аналогії майтансиноїда.

## (2) Аурістатини й доластатини

У деяких варіантах втілення винаходу імунокон'югат складається з антитіла, кон'югованого з доластатином або пептидним аналогом доластатина, або його похідним, наприклад, аурістатином (патент США No. 5635483; 5780588). Було показано, що доластатини й аурістатини впливають на динаміку мікротрубочок, гідроліз ГТФ, а також розподіл клітини і ядра (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584), і володіють протираковою (патент США No.5663149) і протигрибковою активністю (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Молекула препарату доластатин або аурістатин може бути приєднана до антитіла за допомогою N(аміно)-кінця або C(карбоксил)-кінця пептидної молекули препарату (WO 02/088172).

Типові варіанти втілення винаходу, що включають використання аурістатина, включають приєднані до N-кінця молекули монометилаурістатина DE і DF (US 2005/0238649, представлене в Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Том 45, Абзац № 623, 28 березня 2004 р., включено в справжній документ у всій своїй повноті за допомогою посилання).

Пептидна молекула препарату може бути вибрана з Формул D<sub>E</sub> і D<sub>F</sub> нижче:



де хвилястою лінією D<sub>E</sub> і D<sub>F</sub> зазначена ділянка ковалентного приєднання до антитіла або компонента антитіло-лінкер, і незалежним чином для кожного положення:

R<sup>2</sup> вибирається з H і C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкілу;

R<sup>3</sup> вибирається з H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкілу, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоциклу, арилу, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкіл-арила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкіл- (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоциклу), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероциклу й C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкіл-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероциклу);

R<sup>4</sup> вибирається з H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкілу, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоциклу, арилу, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкіл-арила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкіл- (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоциклу), C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероциклу й C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкіл-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероциклу);

R<sup>5</sup> вибирається з H і метила;

або R<sup>4</sup> і R<sup>5</sup> разом утворюють карбоциклічне кільце й мають формулу -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>-, у якій R<sup>a</sup> і R<sup>b</sup> вибираються незалежним чином з H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкілу й C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоциклу й n вибирається з 2, 3, 4, 5



i 6;

 $R^6$  вибирається з H і  $C_1$ - $C_8$  алкілу; $R^7$  вибирається з H,  $C_1$ - $C_8$  алкілу,  $C_3$ - $C_8$  карбоциклу, арилу,  $C_1$ - $C_8$  алкіл-арилу,  $C_1$ - $C_8$  алкіл- $(C_3$ - $C_8$  карбоциклу),  $C_3$ - $C_8$  гетероциклу й  $C_1$ - $C_8$  алкіл- $(C_3$ - $C_8$  гетероциклу);5 кожний  $R^8$  вибирається незалежним чином з H, OH,  $C_1$ - $C_8$  алкілу,  $C_3$ - $C_8$  карбоциклу й O- $(C_1$ - $C_8$  алкілу); $R^9$  вибирається з H і  $C_1$ - $C_8$  алкілу; $R^{10}$  вибирається з арилу або  $C_3$ - $C_8$  гетероциклу;Z представлений O, S, NH або  $NR^{12}$ , і  $R^{12}$  представлений  $C_1$ - $C_8$  алкілом;10  $R^{11}$  вибирається з H,  $C_1$ - $C_{20}$  алкілу, арилу,  $C_3$ - $C_8$  гетероциклу,  $-(R^{13}O)_m-R^{14}$  або  $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ;

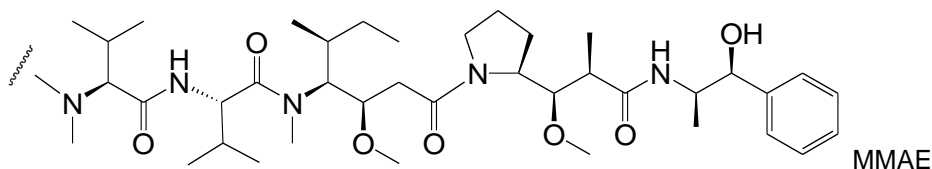
m є цілим числом і варіює від 1 до 1000;

 $R^{13}$  представлений  $C_2$ - $C_8$  алкілом; $R^{14}$  представлений H або  $C_1$ - $C_8$  алкілом;15 кожний  $R^{15}$  представлений незалежним чином H, COOH,  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ ,  $-(CH_2)_n-SO_3H$  або  $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$  алкілом;кожний  $R^{16}$  представлений незалежним чином H,  $C_1$ - $C_8$  алкілом або  $-(CH_2)_n-COOH$ ; $R^{18}$  вибирається з  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -арилу,  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ - $(C_3$ - $C_8$  гетероциклу) і  $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ - $(C_3$ - $C_8$  карбоциклу); i

20 n є цілим числом і варіює від 0 до 6.

В одному варіанті втілення винаходу  $R^3$ ,  $R^4$  і  $R^7$  представлені незалежним чином ізопропілом або вторинним бутилом, і  $R^5$  представлений -H або метилом. У типовому варіанті втілення винаходу  $R^3$  і  $R^4$  представлені ізопропілом,  $R^5$  представлений -H, і  $R^7$  представлений вторинним бутилом.25 У ще одному варіанті втілення винаходу  $R^2$  і  $R^6$  представлені метилом і  $R^9$  представлений -H.У ще одному варіанті втілення винаходу кожний  $R^8$  представлений  $-OCH_3$ .30 У типовому варіанті втілення винаходу  $R^3$  і  $R^4$  представлені ізопропілом,  $R^2$  і  $R^6$  представлені метилом,  $R^5$  представлений -H,  $R^7$  представлений вторинним бутилом, кожний  $R^8$  представлений  $-OCH_3$ , і  $R^9$  представлений -H.

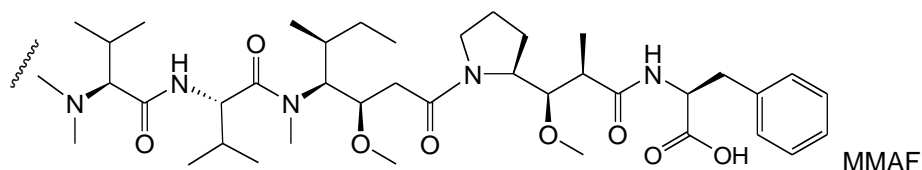
В одному варіанті втілення винаходу Z представлений -O- або -NH-.

В одному варіанті втілення винаходу  $R^{10}$  представлений арилом.У типовому варіанті втілення винаходу  $R^{10}$  представлений фенілом.35 У типовому варіанті втілення винаходу Z представлений -O-,  $R^{11}$  представлений -H, метилом або t-бутилом.В одному варіанті втілення винаходу, де Z представлений -NH,  $R^{11}$  представлений  $-CH(R^{15})_2$ ,  $R^{15}$  представлений  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ , і  $R^{16}$  представлений  $-C_1$ - $C_8$  алкілом або  $-(CH_2)_n-COOH$ .В іншому варіанті втілення винаходу, де Z представлений -NH,  $R^{11}$  представлений  $-CH(R^{15})_2$ , і  $R^{15}$  представлений  $-(CH_2)_n-SO_3H$ .40 Типовий варіант втілення винаходу, що передбачає використанням аурістатина по формулі  $D_E$ , представлений MMAE, при цьому хвиляста лінія вказує на ковалентний зв'язок між лінкером (L) і кон'югатом антитіло-препарат:

45

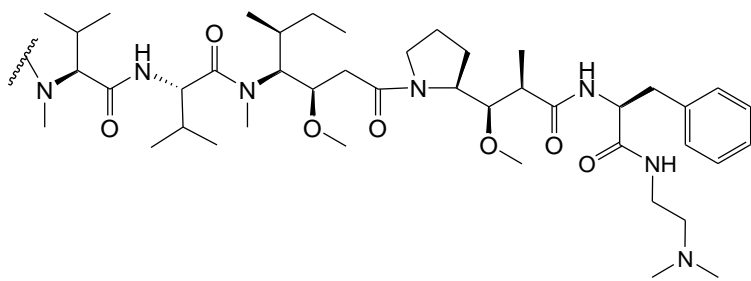
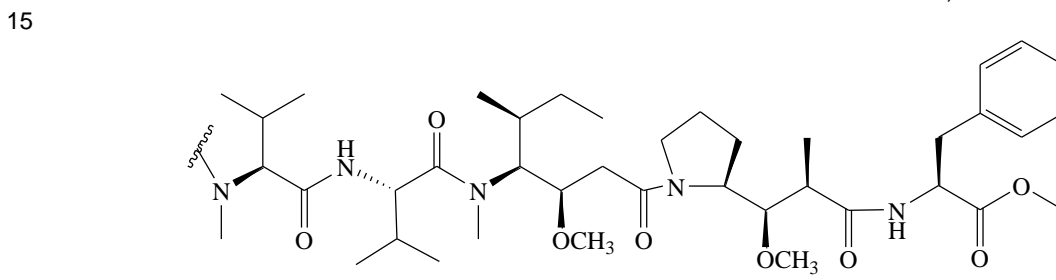
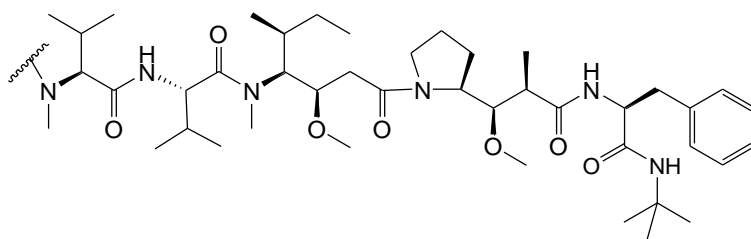
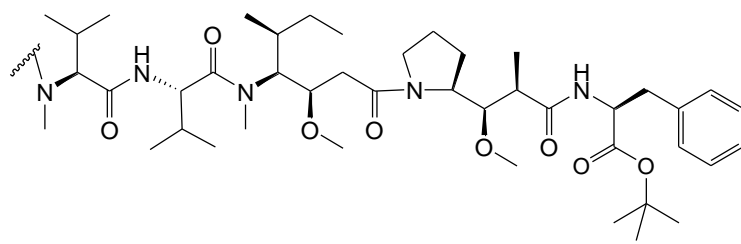
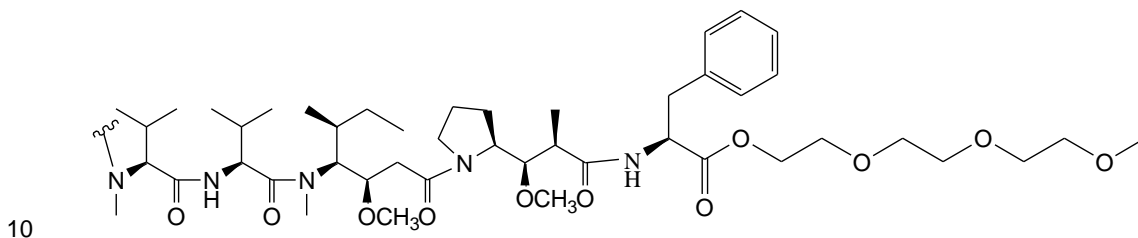
Типовий варіант втілення винаходу, що передбачає використання аурістатина по формулі  $D_F$ , представлений MMAF, при цьому хвиляста лінія вказує на ковалентний зв'язок між лінкером (L) і кон'югатом антитіло-препарат (див. US 2005/0238649 і Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124):

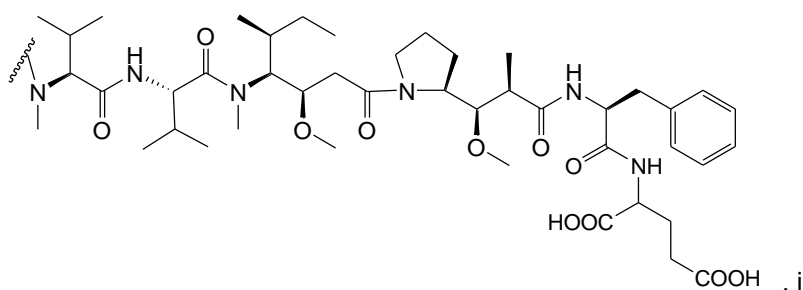
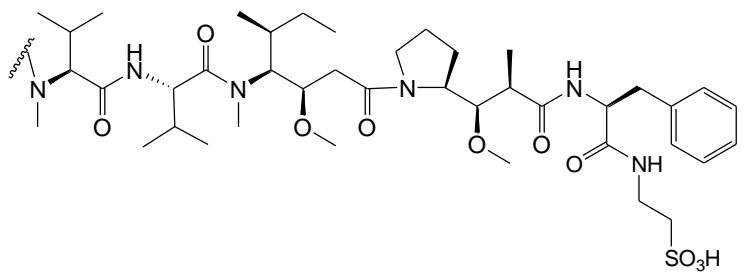
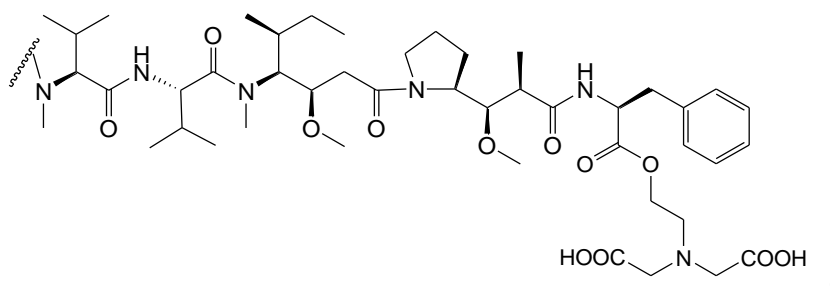
50



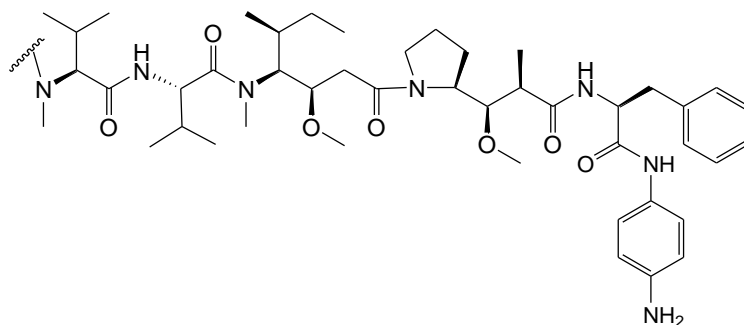
Інші типові варіанти втілення винаходу включають сполуки монометилваліна, які мають карбоксильні модифікації фенілаланіна на С-кінці пентапептидної молекули препарату аурістатин (WO 2007/008848), і сполуки монометилваліна, які мають модифікації бічного ланцюга фенілаланіна на С-кінці пентапептидної молекули препарату аурістатин (WO 2007/008603).

Інші молекули препаратів включають наступні похідні MMAF, при цьому хвиляста лінія вказує на ковалентний зв'язок між лінкером (L) і кон'югатом антитіло-препарат:



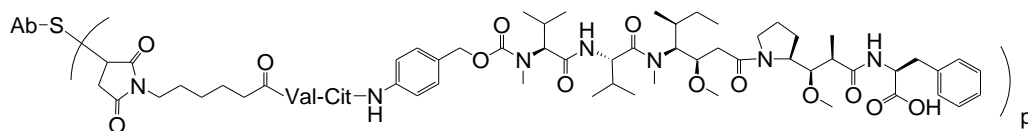


5

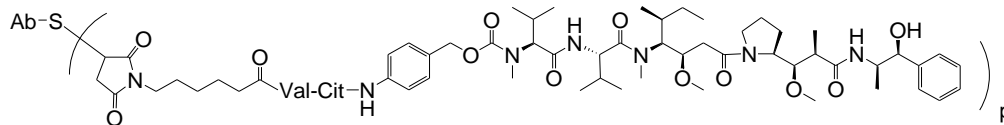


В одному аспекті винаходу, гідрофільні групи включають, але не обмежуються, ефіри триетіленгліколя (ТЕГ), як це показано вище, і такі групи можуть бути приєднані до молекули препарату в положенні R<sup>11</sup>. Не дотримуючись якої-небудь окремої теорії, гідрофільні групи допомагають в інтерналізації й відсутності агрегації молекули препарату.

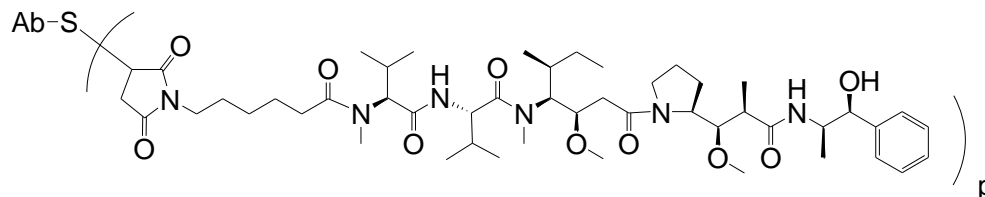
Типові варіанти втілення винаходу КАП по Формулі I, що містять аурістатин/доластатин або його похідне описані в US 2005-0238649 і Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124 (включено в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання). Типові варіанти втілення винаходу КАП по Формулі I, що містять аурістатин MMAE або MMAF і різні лінкерні компоненти, мають наступну структуру й позначення (при цьому "AT" позначає антитіло; р становить від 1 до приблизно 8; « Вал-Цит" або "vc" представляє дипептид валін-цитрулін; і "S" є атомом сірки). Слід зазначити, що в окремих структурних описах сірка приєднана до КАП, і такі антитіла вказуються як "AT-S" просто для вказівки зв'язку із сіркою, а не для вказівки того, що окремий атом сірки приєднаний з декількома молекулами лінкер-препарат. Дужка ліворуч на наступних структурах може бути також поставлена ліворуч від атома сірки, між AT і S, що буде рівнозначно опису КАП по винаходу, описаному в тексті даної заявки.



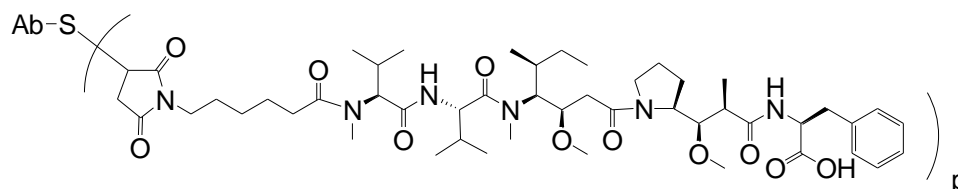
AT-MC-vc-PAB-MMAF



5 AT-MC-vc-PAB-MMAE



AT-MC-MMAE



10 AT-MC-MMAF

Типові варіанти втілення винаходу КАП по Формулі I, що складаються з MMAF і різні лінкерні компоненти, додатково включають AT-MC-PAB-MMAF й AT-PAB-MMAF. Цікаво, що імункон'югати, що складаються з MMAF, приєднаного до антитіла за допомогою лінкера, що не піддається протеолітичному розщепленню, мають активність, порівнянню з імункон'югатами, що складаються з MMAF, приєднаного до антитіла за допомогою протеолізу, що розщеплюється в ході, лінкера. Див. Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124. У таких випадках вважається, що вивільнення препарату здійснюється шляхом розпаду антитіла в клітині. Id.

Як правило, молекули препарату, засновані на пептиді, можуть бути отримані шляхом утворення пептидного зв'язку між двома або більше амінокислотами й/або пептидними фрагментами. Такі пептидні зв'язки можуть бути отримані, наприклад, відповідно до способу синтезу в рідкій фазі (див. E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), що добре відомий в області хімії пептидів. Молекули препарату аурістатин/доластатин можуть бути отримані з використанням способів, представлених у наступних джерелах: US 2005-0238649 A1; патент США No.5635483; патент США No.5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; i Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784.

Зокрема, молекули препарату аурістатин/доластатин по формулі D<sub>F</sub>, такі як MMAF і його похідні, можуть бути отримані з використанням способів, описаних в US 2005-0238649 A1 i Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124. Молекули препарату аурістатин/доластатин по формулі D<sub>F</sub>, такі як MMAF і його похідні, можуть бути отримані з використанням способів, описаних в Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784. Молекули препарат-лінкер MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF і MC-vc-PAB-MMAE можуть бути синтезовані з використанням стандартних способів, описаних, наприклад, в Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784, і публікації заявки на патент No. US 2005/0238649 A1, а потім кон'юговані з антитілом, що цікавить.

### (3) Калихіміцин

В інших варіантах втілення винаходу імункон'югат складається з антитіла, кон'югованого з однією або декількома молекулами калихіміцина. Сімейство антибіотиків калихіміцина здатно індукувати розрив двониткової ДНК у суб-пікомолярних концентраціях. Для одержання

кон'югатів із препаратами сімейства каліхіміцина див. патенти США No. 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296 (всі компанії American Cyanamid Company). Структурні аналоги каліхіміцина, які також можуть використовуватися, включають, але не обмежуються,  $\gamma_1^1$ ,  $\gamma_2^1$ ,  $\gamma_3^1$ , N-ацетил- $\gamma_1^1$ , PSAG і  $\theta_1^1$  (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993) і Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)). Інший протипухлинний препарат, з яким може бути кон'юговано антитіло, представлений QFA, що є антифолатом. Каліхіміцин і QFA мають внутрішньоклітинні ділянки дії й із працею перетинають плазматичну мембрану. Таким чином, клітинне захоплення таких агентів за допомогою антитіло-опосередкованої інтерналізації, значно підвищує їх цитотоксичний ефект.

в. Інші цитотоксичні агенти

Інші протипухлинні препарати, які можуть бути кон'юговані з антитілом, включають BCNU, стрептозоцин, вінкристин і 5-фторурацил, сімейство препаратів, відомих у цілому як комплекс LL-E33288, описаний у патентах США No. 5053394, 5770710, а також еспераміцини (патент США No. 5877296).

Ферментативно активні токсини і їхні фрагменти, які можуть використовуватися, включають А ланцюг дифтерійного токсину, активні фрагменти, що не зв'язуються дифтерійного токсину, ланцюг А екзотоксина (*Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг А ріцина, ланцюг А абрина, ланцюг А модессина, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантина, білки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор з *Momordica charantia*, курцин, кротин, інгібітор з *Sapaonaria officinalis*, гелонін, мітогеллін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трихотецени. Див., наприклад, WO 93/21232, опублікований 28 жовтня 1993 р.

Даний винахід додатково включає імунокон'югат, утворений між антитілом і сполукою з нуклеолітичною активністю (наприклад, рибонуклеазою або ДНК-ендонуклеазою, такою як дезоксирибонуклеазою, Днказою).

У певних варіантах втілення винаходу імунокон'югат може складатися з високорадіоактивного атома. Для одержання радіокон'югованих антитіл є цілий ряд радіоактивних ізотопів. Приклади включають  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  і радіоактивні ізотопи Lu. Якщо імунокон'югат використовується для визначення, він може складатися з радіоактивного атома для сцинтиграфічного аналізу, наприклад,  $tc^{99m}$  або  $I^{123}$ , або спин-мітки для ядерної магнітно-резонансної (ЯМР) візуалізації (також відомої як магнітно-резонансне томографування (МРТ)), такою як йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Радіо- або інші мітки можуть бути введені в імунокон'югат з використанням відомих способів. Наприклад, пептид може бути отриманий у ході біосинтезу, або він може бути синтезований шляхом хімічного синтезу амінокислот з використанням підходящих попередників амінокислот, що включають, наприклад, фтор-19 замість водню. Такі мітки як  $tc^{99m}$  або  $I^{123}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$  і  $In^{111}$  можуть бути приєднані за допомогою залишку цистеїна в пептиді. Ітрій-90 може бути приєднаний за допомогою залишку лізіна. Спосіб йодування IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) може використовуватися для введення йоду-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) описує докладно й інші способи.

У певних варіантах втілення винаходу імунокон'югат може складатися з антитіла, кон'югованого з ферментом, що активує проліки й перетворює такі проліки (наприклад, хіміотерапевтичний препарат пептидів, див. WO 81/01145) в активний препарат, наприклад, протираковий препарат. Такі імунокон'югати використовуються в антитіло-залежній терапії проліками, опосередковуваними ферментом ("ADEPT"). Ферменти, які можуть бути кон'юговані з антитілом, включають, але не обмежуються, наступні: лужна фосфатаза для конвертації фосфат-утримуючих проліків у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові; арилсульфатаза для конвертації проліків, що містять сульфати у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові; цитозиндезаміназа для конвертації нетоксичного 5-фторцитозина в протираковий препарат, 5-фторурацил; протеази, такі як протеаза серратії, термолізін, субтілізін, карбоксипептидази й катепсини (такі як катепсини В і L), для конвертації пептид-утримуючих проліків у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові; D-аланілкарбоксипептидази для конвертації проліків, що містять D-амінокислотні замішувачі; вуглеводи, що розщеплюють, ферменти, такі як  $\beta$ -галактозидаза й нейрамінідаза, для конвертації глікозилізованих проліків у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові;  $\beta$ -лактамаза для конвертації препаратів, що містять  $\alpha$ -лактами, у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові; і пеніциллінамідази, такі як пеніцилін V амідаза або пеніцилін G амідаза, для конвертації препаратів, що містять феноксиацетильні або фенілацетильні групи, приєднані до амінного азоту, відповідно, у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові. Ферменти можуть ковалентним чином приєднуватися до антитіл у ході

процедур рекомбінації ДНК, відомих науці. Див., наприклад, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984).

#### г. Введення препарату в носій

Введення препарату в носій здійснюється відповідно до  $p$ , середнього числа молекул препарату на антитіло в молекулі по Формулі I. Введення препарату може варіювати від 1 до 20 молекул препарату ( $D$ ) на антитіло. КАП по Формулі I включає колекції антитіл, кон'югованих із цілим діапазоном молекул препарату, від 1 до 20. Середнє число молекул препарату на антитіло в композиціях КАП після реакцій кон'югації може бути охарактеризоване шляхом стандартних способів, таких як мас-спектроскопія, ІФА й ВЕЖХ. Кількісний розподіл КАП у перерахуванні на  $p$  також може бути визначено. У деяких випадках поділ, очищення й характеристика гомогенного КАП, у якому  $p$  є певним значенням, від КАП з іншою кількістю введеного препарату, може бути здійснене за допомогою ВЕЖХ зі зверненими фазами або електрофорезом. Таким чином, фармацевтичні композиції кон'югатів антитіло-препарат по Формулі I можуть бути представлені гетерогенною сумішшю таких кон'югатів, у яких антитіла приєднані до 1, 2, 3, 4 або більше молекулам препарату.

Для деяких кон'югатів антитіло-препарат значення  $p$  може бути обмежено числом ділянок приєднання на антитілі. Наприклад, у випадку приєднання тіолової групи цистеїна, як у типових варіантах втілення винаходу, представлених вище, антитіло може мати тільки одну або декілька тіолових груп цистеїна, або може мати тільки одну або декілька досить реакційноздатних тіолових груп, до яких може бути приєднаний лінкер. У певних варіантах втілення винаходу більш висока кількість введеного препарату, наприклад,  $p > 5$ , може привести до агрегації, відсутності розчинності, токсичності або втраті здатності проникати в клітини для певних кон'югатів антитіло-препарат. У певних варіантах втілення винаходу кількість введеного препарату в КАП по винаходу варіює від 1 до приблизно 8; від приблизно 2 до приблизно 6; або від приблизно 3 до приблизно 5. Було показано, що для певних КАП оптимальне співвідношення молекул препарату на антитіло може становити менш 8, і може становити від приблизно 2 до приблизно 5. Див. US 2005-0238649 A1.

У певних варіантах втілення винаходу під час реакції кон'югації з антитілом кон'юговано менш теоретичної максимальної кількості молекул препарату. Антитіло може включати, наприклад, залишки лізіна, які не реагують із проміжною речовиною препарат-лінкер або лінкерним реагентом, як це обговорюється нижче. Як правило, антитіла не містять велику кількість незв'язаних і реакційного здатних тіолових груп цистеїна, які можуть бути пов'язані з молекулою препарату; навпаки, більшість тіолових груп залишків цистеїна в антитілах існує у вигляді дисульфідних зв'язків. У певних варіантах втілення винаходу антитіло може бути відновлене з використанням відбудовного агента, такого як дитіотреїтола (DTT) або трикарбонилетілфосфіна (TCEP), в умовах часткового або повного відновлення з одержанням реакційноздатних тіолових груп цистеїна. У певних варіантах втілення антитіло піддається денатурації в певних умовах для виявлення реакційноздатних нуклеофільних груп, наприклад, лізіна або цистеїна.

Навантаження КАП (співвідношення препарат/антитіло) може контролюватися різними шляхами, наприклад, наступними: (i) обмеження надлишку молярності проміжної речовини препарат-лінкер або лінкерного реагенту щодо антитіла; (ii) обмеження часу або температури реакції кон'югації; і (iii) часткові або обмежуючі відбудовні умови для модифікації тіолової групи цистеїна.

Варто розуміти, що у випадку реакції більше однієї нуклеофільної групи із проміжною речовиною препарат-лінкер або лінкерним реагентом, а потім із препаратом, кінцевий продукт являє собою суміш із сполук КАП, при цьому до антитіла приєднана одна або більше молекул препарату. Середня кількість молекул препарату на антитіло може бути розраховане із суміші шляхом подвійного аналізу ІФА антитіла, специфічного щодо антитіла й специфічного щодо препарату. Окремі молекули КАП можуть бути виявлені в суміші шляхом мас-спектроскопії й розділені ВЕЖХ, наприклад, у ході хроматографії з гідрофобними взаємодіями (див., наприклад, McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). У певних варіантах втілення винаходу однорідні КАП з однаковим значенням введеного препарату можуть бути виділені з кон'югаційної суміші шляхом електрофореза або хроматографії.

д. Певні способи одержання імунокон'югатів

КАП по Формулі I може бути отриманий декількома способами, що включають реакції органічної хімії, умови й реагенти, відомі фахівцям в даній області й включають наступне: (1) реакція нуклеофільної групи антитіла із двовалентним лінкерним реагентом з утворенням АТ-L за допомогою ковалентного зв'язку з наступною реакцією з молекулою препарату D; (2) реакція нуклеофільної групи молекули препарату із двовалентним лінкерним реагентом з утворенням D-L за допомогою ковалентного зв'язку з наступною реакцією з нуклеофільною групою антитіла. Типові способи одержання КАП по Формулі I по другому способі описані в US 2005-0238649 A1 (включено в справжній документ за допомогою посилання).

Нуклеофільні групи антитіл включають, але не обмежуються, наступні: (i) N-кінцеві аміні групи; (ii) аміні групи бічного ланцюга, наприклад, лізіна; (iii) тіолові групи бічного ланцюга, наприклад, цистеїна; і (iv) гідроксильні або аміногрупи сахарів, якщо антитіло глікозильовано. Аміно-, тіолові й гідроксильні групи є нуклеофільними й здатні реагувати з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами лінкерних молекул і лінкерних реагентів, і включають наступні: (i) активні ефіри, такі як ефіри NHS, ефіри HOBT, галогенформіати й галіди кислот; (ii) алкіл- і бензилгаліди, такі як галогенацетаміди; (iii) альдегіди, кетони, карбоксильні й малеїмідні групи. Певні антитіла мають відновлювані дисульфідні містки між ланцюгами, наприклад, між залишками цистеїна. Антитіла можуть стати здатними вступати в реакцію кон'югації з лінкерними реагентами шляхом впливу відновлювачем, таким як DTT (дитіотреїтол) або трикарбонілетілфосфін (TCEP), у результаті чого антитіло частково або повністю відновлюється. Таким чином, теоретично, кожний цистеїновий місток буде утворений між двома реакційноздатними тіоловими нуклеофільними групами. Додаткові нуклеофільні групи можуть бути введені в антитіла за допомогою модифікації залишків лізіна, наприклад, у ході реакції залишків лізіна з 2-імінотіолоном (реагентом Троту), що приводить до перетворення аміну в тіол. Реакційноздатні тіолові групи можуть бути введені в антитіло за допомогою введення одного, двох, трьох, чотирьох або більше залишків цистеїна (наприклад, шляхом одержання варіантів антитіл, що включають не нативні залишки амінокислоти цистеїн).

Кон'югати антитіло-препарат по винаходу також можуть бути отримані в ході реакції між електрофільною групою антитіла, наприклад, альдегідною або кетонною карбонільною групою, з нуклеофільною групою лінкерного реагенту або препарату. Підходящі нуклеофільні групи на лінкерному реагенті включають, але не обмежуються, гідразид, оксим, аміногрупу, гідразин, тіосемікарбазон, гідразина карбоксилат й арилгідразид. В одному варіанті втілення винаходу антитіло модифіковане введенням електрофільних молекул, здатних реагувати з нуклеофільними замісниками лінкерного реагенту або препарату. В іншому варіанті втілення винаходу сахара глікозильованих антитіл можуть бути окислені, наприклад, окислювачами періодатами, з утворенням альдегідних або кетонних груп, які можуть реагувати з амінною групою лінкерних реагентів або молекул препаратів. Одержувані в результаті імінні групи основ шиффа можуть утворювати стійкий зв'язок або можуть бути окислені, наприклад, реагентами борогідрида з утворенням стійких амінних зв'язків. В одному варіанті втілення винаходу реакція вуглеводної ділянки глікозильованного антитіла з галактозидазою або натрію мета-періодатом може привести до утворення карбонільної (альдегідної або кетонної) групи антитіла, що реагує з відповідними групами препарату (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В іншому варіанті втілення винаходу антитіла, що включають N-кінцеві залишки серина або треоніна, можуть реагувати з натрію мета-періодатом з утворенням альдегіду в місці першої амінокислоти (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Такий альдегід може реагувати з молекулою препарату або нуклеофільною групою лінкера.

Нуклеофільні групи на молекулі препарату включають, але не обмежуються, наступні: аміно-, тіолові й гідроксильні групи є нуклеофільними й здатні реагувати з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами лінкерних молекул і лінкерних реагентів, й включаючи наступні: (i) активні ефіри, такі як ефіри NHS, ефіри HOBT, галогенформіати й галіди кислот; (ii) алкіл- і бензилгаліди, такі як галогенацетаміди; (iii) альдегіди, кетони, карбоксильні й малеїмідні групи.

Сполуки по винаходу чітким чином охоплюють, але не обмежуються, КАП, отримані за допомогою наступних реагентів, що сприяють утворенню перехресного зв'язку: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC й сульфо-SMPB, й SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), які представлені на ринку (наприклад, компанією Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A; див. сторінки 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Імунокон'югати антитіла й цитотоксичного агента також можуть бути отримані з

використанням цілого ряду біфункційних білокзв'язуючих агентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіол) пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункційні похідні імідоефірів (такі як диметиладіпімідата HCL), активні ефіри (такі як дисукцинімідила суберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидо сполуки (такі як біс (p-азидобензойл) гександіамін), похідні біс-діазонія (такі як біс-(p-діазоніябензойл)-етілендіамін), діізоціанати (такі як толуол 2,6-діізоціанат) й біс-активні сполуки фтора (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, імунотоксин ріцин може бути отриманий відповідно до опису, представленого в Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). Мічена вуглецем-14 31-ізотіоціанатобензил-3-метилдіетілен триамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є типовим хелатним агентом для кон'югації радіонукліда з антитілом. Див. WO94/11026.

З іншого боку, також може бути отриманий білок злиття, що містить антитіло й цитотоксичний препарат, наприклад, шляхом способів рекомбінації або білкового синтезу. Рекомбінантна молекула ДНК може включати ділянки, що кодують антитіло й цитотоксичні ділянки кон'югата, приєднані один до одного або розділені ділянкою, що кодує лінкерний пептид, що не зменшує необхідних властивостей кон'югата.

У ще одному варіанті втілення винаходу антитіло може бути кон'юговано з "рецептором" (наприклад, стрептавідином) для використання в попередньому націлюванні на пухлину, при цьому кон'югат антитіло-рецептор вводиться пацієнтові з наступним видаленням незв'язаного кон'югата із кровоносної системи шляхом використання препарату для полегшення виведення, слідом за чим пацієнтові вводиться "ліганд" (наприклад, аввдин), що кон'югован з терапевтичним агентом (наприклад, радіонуклідом).

Типові імунокон'югати - кон'югати антитіло-препарат

а. Одержання антитіл до FcRH5 з введенням у ході рекомбінації цистеїном

ДНК, що кодує амінокислотну послідовність варіанта антитіл до FcRH5 з введенням у ході рекомбінації цистеїном і вихідні антитіла до FcRH5 по винаходу, одержують із використанням різних способів, які включають, але не обмежуються, наступні: виділення із природного джерела (у випадку варіантів амінокислотної послідовності, що зустрічаються в природі), сайт-специфічний (або опосередкований олігонуклеотидами) мутагенез ((Carter (1985) et al Nucleic Acids Res. 13:4431-4443; Ho et al (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; Kunkel et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488; Liu et al (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260)), ПЦР-мутагенез ((Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito et al (1991) Gene 102:67-70; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; and Vallette et al (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733)), і касетний мутагенез ((Wells et al (1985) Gene 34:315-323)) ранньої попередньо отриманої ДНК, що кодує поліпептид. Протоколи мутагенезу, набори й реагенти представлені на ринку, наприклад, набір для мультисайт-специфічного мутагенезу QuikChange® Multi Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Окремі мутації також одержують шляхом сайт-специфічного мутагенезу з використанням олігонуклеотидів і дволанцюгової плазмідної ДНК в якості матриці на основі ПЦР-мутагенезу (Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; Zoller et al (1983) Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500). Варіанти рекомбінантних антитіл можуть також бути отримані шляхом маніпуляції із фрагментом рестрикції або шляхом розширення й перекривання ділянки для ПЦР із використанням синтетичних олігонуклеотидів. Мутагенні праймери кодують заміну кодона цистеїна. Для одержання ДНК, що кодує такі мутантні антитіла з введенням цистеїном, можуть використовуватися стандартні способи мутагенезу (Sambrook et al Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; and Ausubel et al Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993).

Для вироблення людських антитіл до FcRH5 і фрагментів антитіл in vitro від варіабельного домену (V) імуноглобуліну генного репертуару від імунізованих донорів, може використовуватися спосіб фагових дисплеїв (McCafferty et al., Nature 348:552-553 [1990]). Відповідно до цього способу гени V домену антитіла клонують усередині рамки зчитування більшого або меншого гена оболонкового білка нитковидного бактеріофага, такого як M13 fd, і відображаються у вигляді фрагментів функціонального антитіла на поверхні фагових часток. Беручи до уваги, що нитчаті частки містять копію одноланцюгової ДНК генома фага, вибір, заснований на функціональних властивостях антитіла, також приводить до відбору гена, що кодує антитіло, що володіє такими властивостями. Таким чином, фаг імітує деякі властивості В-клітини (Johnson et al (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571; Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffith et al (1993) EMBO J. 12:725-734; US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275).

Антитіла до FcRH5 можуть бути синтезовані хімічно за допомогою відомих способів синтезів



олігопептидів або можуть бути отримані й очищені з використанням способу рекомбінації. Відповідна амінокислотна послідовність або її ділянка можуть бути отримані шляхом безпосереднього синтезу білка з використанням твердофазних способів (Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154). Синтез білка *in vitro* може здійснюватися з використанням автоматизованих способів або вручну. Автоматизований твердофазний синтез може супроводжуватися, наприклад, введенням t-BOC або Fmoc захисних амінокислот і використанням синтезатора пептидів Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) з дотриманням інструкцій виробника. Пізні ділянки антитіла до FcRH5 або поліпептиду FcRH5 можуть бути синтезовані хімічно окремо або в комбінації з використанням хімічних або ферментативних способів одержання необхідного антитіла до FcRH5 або поліпептиду FcRH5.

Для одержання фрагментів антитіл були розроблені різні способи. Традиційно ці фрагменти одержували за допомогою протеолітичного розщеплення інтактних антитіл (Morimoto et al (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; and Brennan et al (1985) Science, 229:81) або безпосереднім одержанням у рекомбінантних клітинах-хазях. Фрагменти антитіл до FcRH5 Fab, Fv і ScFv також можуть експресуватися й секретуватися в *E. coli*, що дозволяє легко одержати більші кількості таких фрагментів. Фрагменти антитіла можуть бути виділені з бібліотек фагових дисплеїв антитіл, як це описано в тексті даної заявки. З іншого боку, фрагменти Fab'-SH можуть бути відновлені безпосереднім чином з *E. coli* і з'єднані в ході хімічної реакції з утворенням фрагментів F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)), або виділені безпосередньо з культури рекомбінантних клітин. Антитіло до FcRH5 може бути представлено одноланцюговим фрагментом Fv (scFv) (WO 93/16185; US 5571894; US. 5587458). Фрагмент антитіла до FcRH5 може бути також представлений "лінійним антитілом" (US 5641870). Такі фрагменти лінійного антитіла можуть бути моноспецифічними або біспецифічними.

Представлений нижче опис відноситься переважним чином до одержання антитіл до FcRH5 шляхом культивування клітин, трансформованих або трансфікованих вектором, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло до FcRH5. ДНК, що кодує антитіло до FcRH5, може бути отримана з бібліотеки кДНК, отриманої із тканини, що, як вважається, містить мРНК антитіла до FcRH5 і експресує такі антитіла в обумовленій концентрації. Відповідно до цього, ДНК людських антитіл до FcRH5 або поліпептиду FcRH5 може бути зручним чином отримана з бібліотеки кДНК, отриманої із тканини людини. Ген, що кодує антитіло до FcRH5, може бути також отриманий з геномної бібліотеки або з використанням відомих процедур синтезу (наприклад, автоматичного синтезу нуклеїнової кислоти).

Схема, вибір і способи одержання по винаходу дозволяють одержати антитіла до FcRH5 з введенням у ході рекомбінації цистеїном, які вступають у реакцію з електрофільною функціональністю. Такі способи надає забезпечують утворення сполук-кон'югатів антитіла, таких як кон'югат антитіло-препарат (КАП), сполук із молекулами препаратів у суворо зазначених, виборчих місцях. Реакційноздатні залишки цистеїна на поверхні антитіла забезпечують специфічну кон'югацію молекули препарату за допомогою реакційноздатної тіолової групи, такої як малеїмід або галогенацетил. Нуклеофільна реакційна здатність функціональної тіолової групи залишку Цис щодо групи малеїміда приблизно в 1000 разів вище в порівнянні з функціональністю будь-якої іншої амінокислоти в білку, наприклад, аміногрупи залишків лізіна або аміногрупи на N-кінці. Специфічна функціональність тіолової групи в реагентах йодоацетила й малеїміда може спричинитися реакцію з аміногрупами, однак для цього потрібно більш високі значення pH (>9,0) і більш тривалий час реакції (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London). Кількість незв'язаного тіола в білку може бути оцінене з використанням стандартного аналізу Елмана. Імуноглобулін М являє приклад приєднаного дисульфідним зв'язком пентаміра, у той час як імуноглобулін G являє приклад білка із внутрішніми дисульфідними містками, що зв'язують один з одним субодиниці. У подібних білках відновлення дисульфідного зв'язку за допомогою реагенту, такого як дитіотреїтол (DTT) або селенол (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147-156), необхідно для одержання реакційноздатного незв'язаного тіола. Такий підхід може привести до втрати третинної структури антитіла й антигензв'язуючої специфічності.

Аналіз PHESELECTOR (фаговий ІФА для селекції реакційноздатного тіола) дозволяє визначити реакційноздатні тіолові групи в антитілах у ході фагового ІФА, що надає істотну допомогу при одержанні антитіл з введенням у ході рекомбінації цистеїном (Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41-52; WO 2006/034488; US 2007/0092940). Антитіло з введенням у ході рекомбінації цистеїном наноситься на поверхню лунок з наступною інкубацією з фаговими частками, додаванням другого антитіла, міченого HRP, і визначенням поглинання. Мутантні

білки, що відображені на фагі, можуть бути піддані скринінгу швидкими, робастним і високопродуктивним способом. Можуть бути отримані бібліотеки антитіл з введенням у ході рекомбінації цистеїном, які потім можуть бути піддані виборчому зв'язуванню з використанням того ж самого способу для виявлення підходящих реакційних центрів незв'язаного введенного

5 Цис із вибраних випадкових чином білково-фагових бібліотек антитіл або інших білків. Такий спосіб включає реакцію цистеїна мутантних білків, що відображені по фагу, з афінним реагентом або групою репортера, що представлена реакційноздатною тіловою групою.

Аналіз PHESELECTOR дозволяє проводити скринінг реакційноздатних тілових груп в антитілах. Типовою є ідентифікація варіанта A121C даним способом. Вся молекула Fab може

10 бути піддана ефективному пошуку для виявлення більшої кількості варіантів TioFab з реакційноздатними тіловими групами. Для виявлення й кількісного визначення доступу розчинника до амінокислотних залишків у поліпептиді був введений параметр часткового поверхневого доступу. Поверхневий доступ може бути виражений у вигляді площі поверхні ( $\text{\AA}^2$ ), що може контактувати з молекулою розчинника, наприклад, водою. Зайнятий водою простір

15 апроксимується як  $1,4 \text{ \AA}$  радіуси сфери. Програмне забезпечення перебуває у вільному доступі або підлягає ліцензуванню (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, Великобританія, Факс: (+44) 1925 603825, або по Інтернету [www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html](http://www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)), так само як і програми по кристалографії CCP4 Suite, що використовують алгоритми для розрахунку поверхневого доступу до кожної амінокислоти або білка з відомими й отриманими в

20 ході кристалографічної рентгенографії координатами ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763). Два типових модулі програмного забезпечення, які виконують обчислення поверхневого доступу, представлені "AREAIMOL" і "SURFACE" і засновані на алгоритмах B.Lee і F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379-400. AREAIMOL визначає поверхневий доступ до білка для розчинника як локус центра сферичного зонда (що представляє молекулу розчинника), тобто він перекочується уздовж ван-дер-ваальсових поверхонь білка. AREAIMOL розраховує поверхневу доступну площу для розчинника шляхом генерації поверхневих точок на розширеній сфері приблизно на один атом (на відстані від

25 центра атома, рівного сумі радіусів атомів і датчика) з елімінацією тих атомів, які перебувають в еквівалентному сфері положенні й пов'язані із сусідніми атомами. За допомогою програми AREAIMOL можна обчислити доступну для розчинника площу атомів у файлі з координатами PDB, підсумувати доступну площу по залишкам, по ланцюзі й для всієї молекули. Значення припустимих площ (або різниці площ) для окремих атомів можуть бути записані у вихідний псевдо-файл PDB. Програма AREAIMOL припускає значення окремого радіуса для кожного елемента й розпізнає тільки обмежену кількість різних елементів.

35 Програми AREAIMOL і SURFACE повідомляють абсолютні значення доступної поверхні, тобто значення, виражені в ангстремах (Å) у квадраті. Частковий поверхневий доступ розраховується щодо стандартного стану, релевантного для амінокислоти в поліпептиді. Стандартний стан представлений трипептидом Глі-X-Глі, де X - амінокислота, що цікавить, і такий стандартний стан повинний мати "розширену конформацію", тобто конформацію по типу

40 бета-ланцюгів. Розширена конформація максимізує доступ до X. Розрахована доступна площа ділиться на доступну площу в еталонному стані трипептида Глі-X-Глі, у результаті чого видається частка, що представляє собою частковий доступ. Процентний показник доступу представлений частковим доступом, помноженим на 100. Інший типовий алгоритм для розрахунку поверхневого доступу заснований на модулі SOLV програми xsaе (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel), що розраховує частковий доступ до амінокислотного залишку у водній сфері, ґрунтуючись на рентгенівських координатах поліпептиду. Частковий поверхневий доступ до кожної амінокислоти в антитілі може бути розрахований з використанням доступної інформації про структуру кристала (Eigenbrot et al. (1993) J Mol Biol. 229:969-995).

ДНК, що кодує антитіла з введенням у ході рекомбінації цистеїном, може бути легко виділена

50 й секвенована з використанням стандартних процедур (наприклад, шляхом використання олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі й легкі ланцюга мишачих антитіл). Клітини гібридами служать як джерело такого ДНК. Після ізоляції ДНК може бути включена у вектори експресії, які потім трансфікують у клітини-хазяї, такі як клітини E. Coli, клітини лінії COS мавпи, клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO) або інші

55 клітини ссавців, такі як клітини мієломи (US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310), які в протилежному випадку не виробляють білок імуноглобуліну, для організації синтезу моноклональних антитіл у рекомбінантних клітинах-хазяях.

Після розробки структури й вибору, антитіла з введенням у ході рекомбінації цистеїном, наприклад, TioFab, з введеними в ході рекомбінації й надзвичайно високо реакційноздатними

60 незв'язаними залишками Цис ("незв'язані амінокислоти цистеїн") можуть бути отримані шляхом:

(i) експресії в бактеріальній системі, наприклад, системі *E. coli* (Skerra et al (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262; Plickthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188) або системі культури клітин ссавців (WO 01/00245), наприклад, клітинах яєчника китайського хом'ячка (CHO); і (ii) очищення з використанням стандартних способів очищення білка (Lowman et al (1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988).

Введені в ході рекомбінації тіолові групи Цис реагують із електрофільними лінкерними реагентами й проміжними сполуками препарат-лінкер з утворенням кон'югатів препарату й антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном або інших мічених рекомбінантних антитіл з доданим цистеїном. Залишки Цис, присутні в рекомбінантних антитілах з доданим цистеїном, у вихідних антитілах, з'єднаних з утворенням внутрילанцюгових і міжланцюгових дисульфідних містків, не мають яких-небудь реакційноздатних тіолових груп (якщо вони не були піддані дії відновника) і не реагують із електрофільними лінкерними реагентами або проміжними сполуками препарат-лінкер. Залишок Цис, введений у ході рекомбінації, може залишатися неспареним і здатним реагувати, тобто кон'югувати, з електрофільним лінкерним реагентом або проміжними сполуками препарат-лінкер, таким як препарат-малеїмід. Типові проміжні сполуки препарат-лінкер включають наступні: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE й MC-vc-PAB-MMAF. Структурне положення введених залишків Цис важкого й легкого ланцюгів нумерується відповідно до послідовної системи нумерації. Така система послідовної нумерації корелює із системою нумерації по Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), починаючись із N-кінця, але відрізняється від схеми нумерації по Kabat (нижній ряд) по вставкам, що позначаються як а, b, c. З використанням системи нумерації по Kabat фактична лінійна послідовність амінокислот може містити менше або більше амінокислот, що відповідає вкороченню або вставці в КД або CDR варіабельного домену. Варіантні сайти важкого ланцюга з доданим цистеїном ідентифікують по послідовній нумерації й схемі нумерації Kabat.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло до FcRH5 з доданим у ході рекомбінації цистеїном одержують у ході процесу, що складається з наступних етапів:

(а) заміщення одного або декількох амінокислотних залишків вихідного антитіла до FcRH5 цистеїном; і

(б) визначення реакційноздатності тіола цистеїна, введеного в антитіло до FcRH5 у ході рекомбінації, шляхом реакції антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном з тіоловим реагентом.

Антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном можуть бути більше реакційноздатні, ніж вихідне антитіло, при реакції з тіоловим реагентом.

Незв'язані залишки амінокислоти цистеїн можуть розташовуватися в легких або важких ланцюгах, або в константних або варіабельних доменах. Фрагменти антитіла, наприклад, Fab, також можуть бути піддані рекомбінації шляхом заміни однієї або декількох амінокислот цистеїн з утворенням фрагментів антитіла з доданим цистеїном.

Інший варіант втілення винаходу описує спосіб одержання антитіла до FcRH5 з доданим у ході рекомбінації цистеїном, що складається з наступних етапів:

(а) введення однієї або декількох амінокислот цистеїн у вихідне антитіло до FcRH5 для одержання антитіла до FcRH5 з доданим у ході рекомбінації цистеїном; і

(б) визначення реакційної здатності тіолової групи антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном з використанням тіолового реагенту;

при цьому антитіло з доданим у ході рекомбінації цистеїном може бути більш реакційноздатним, чим вихідне антитіло при реакції з тіоловим реагентом.

Етап (а) способу одержання антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном може включати наступне:

(i) мутагенез послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло з доданим у ході рекомбінації цистеїном;

(ii) експресія антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном; і

(iii) виділення й очищення антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном.

Етап (б) способу одержання антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном може включати експресію антитіла з доданою у ході рекомбінації цистеїном вірусною часткою, що вибрана з ряду фагів або фагмід.

Етап (б) способу одержання антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном також може включати наступне:

(i) реакція антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном з афінним тіоловим реагентом з одержанням афінного міченого антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном; і

(ii) вимір афінності зв'язування міченого антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном

щодо специфічного носія.

Інший варіант втілення винаходу представлений способом скринінгу антитіл з доданим у ході рекомбінації цистеїном з високореакційноздатними неспареними амінокислотами цистеїн на предмет реакційної здатності тіолових груп, і такий спосіб складається з наступного:

5 (а) введення однієї або декількох амінокислот цистеїн у вихідне антитіло для одержання антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном; і

(б) реакція антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном з афінним тіоловим реагентом з одержанням афінного міченого антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном; і

10 (в) вимір афінності зв'язування міченого антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном щодо специфічного носія;

(г) визначення реакційної здатності тілової групи антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном з використанням тіолового реагенту.

Етап (а) способу скринінгу антитіл з доданим у ході рекомбінації цистеїном може включати наступне:

15 (i) мутагенез послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло з доданим у ході рекомбінації цистеїном;

(ii) експресія антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном; і

(iii) виділення й очищення антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном.

Етап (б) способу скринінгу антитіл з доданим у ході рекомбінації цистеїном може включати експресію антитіл з доданим у ході рекомбінації цистеїном вірусною часткою, вибраною з ряду фагів або фагмід.

Етап (б) способу скринінгу антитіл з доданим у ході рекомбінації цистеїном може також включати наступне:

25 (i) реакція антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном з афінним тіоловим реагентом з одержанням афінного міченого антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном; і

(ii) вимір афінності зв'язування міченого антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном щодо специфічного носія.

б. Варіанти антитіла класу IgG до FcRH5 з доданим у ході рекомбінації цистеїном

30 Цистеїн був доданий у положення 118 важкого ланцюга (нумерація EU) (еквівалентно положенню 118 важкого ланцюга, послідовна нумерація) химерних вихідних моноклональних антитіл до FcRH5 повної довжини або в положенні 205 легкого ланцюга (нумерація по Kabat) (еквівалентно положенню 209 легкого ланцюга, послідовна нумерація) химерних вихідних моноклональних антитіл до FcRH5 повної довжини за допомогою описаних тут способів введення цистеїна.

35 Антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном у положенні 118 важкого ланцюга (нумерація EU) характеризувалися наступним: (а) thio-hu10A8 v1-HC(A118C) з послідовністю важкого ланцюга (SEQ ID NO: 42) і послідовністю легкого ланцюга (SEQ ID NO: 41), Фігура 12.

40 Антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном у положенні 205 легкого ланцюга (нумерація по Kabat) характеризувалися наступним: (а) thio-hu10A8 v1-LC9(V205C) з послідовністю важкого ланцюга (SEQ ID NO: 44) і послідовністю легкого ланцюга (SEQ ID NO: 43), Фігура 13.

Такі моноклональні антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном експресувалися у клітинах CHO (яєчників китайського хом'ячка) шляхом тимчасової ферментації в середовищі, що містить 1 мМ цистеїна.

45 в. Мічені антитіла до FcRH5 з доданим у ході рекомбінації цистеїном

Антитіла по винаходу до FcRH5 з доданим у ході рекомбінації цистеїном можуть бути сайт-специфічними й можуть бути ефективно з'єднані з тіол-реактивним (тіоловим) реагентом. Тіоловий реагент може бути представлений багатофункціональним лінкерним реагентом, лізисним, тобто афінним, реагентом, реагентом для мічення (наприклад, реагентом біотин-лінкер), обумовленим міткою (наприклад, реагентом-флуорофором), твердофазним реагентом для іммобілізації (наприклад, СЕФАРОЗА™, полістиролом або склом) або проміжною речовиною препарат-лінкер. Одним із прикладів тіолового реагенту є N-етіл малеїмід (NEM). У типовому варіанті втілення винаходу реакція TioFab з біотин-лінкерним реагентом приводить до утворення біотинільованого TioFab, по присутності й реакційній здатності якого може бути обмірюваний і визначений залишок введеного в ході рекомбінації цистеїна. Реакція TioFab з багатофункціональним лінкерним реагентом надає TioFab функціональний лінкер, що надалі може реагувати з молекулою препарату або іншою міткою. Реакція TioFab із проміжною речовиною препарат-лінкер приводить до утворення кон'югата препарату й TioFab.

60 Описані тут типові способи можуть застосовуватися в цілому для ідентифікації й одержання антитіл, і, ще більше в цілому, для інших білків за допомогою застосування описаної тут схеми й

етапів.

Такий підхід може застосовуватися щодо кон'югації інших тіолових реакційноздатних сполук, у яких реакційна група представлена, наприклад, малеїмідом, йодацетамідом, піридил дисульфідом або іншим тіоловим активним партнером для кон'югації (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). Активний тіоловий реагент може бути представлений молекулою препарату, флуорофором, таким як флуоресціюючий барвник (наприклад, флуоресцеїн або родамін), хелатним агентом для візуалізації або радіотерапевтичним металом, пептиділовим або іншим тегом або препаратом, що модифікує кліренс, таким як різні ізомери поліетіленгліколя, пептидом, що зв'язується із третім компонентом, або іншим вуглеводом або ліпофільною речовиною.

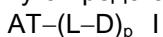
г. Застосування антитіл до FcRH5 з доданням у ході рекомбінації цистеїном

Антитіла до FcRH5 з доданням у ході рекомбінації цистеїном і їх кон'югати можуть використовуватися в якості терапевтичних і/або діагностичних агентів. Даний винахід додатково описує способи запобігання, введення, лікування або поліпшення одного або декількох симптомів, асоційованих з В-клітинним порушенням. Зокрема, даний винахід описує способи запобігання, введення, лікування або поліпшення одного або декількох симптомів, зв'язаних з наступними порушеннями проліферації клітин: лімфома, неходжкінська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони. Крім того, даний винахід також описує способи діагностики розладу, обумовленого FcRH5, або схильності до виникнення такого розладу, а також способи ідентифікації антитіл і антигензв'язуючих фрагментів антитіл, які переважним чином зв'язуються з поліпептидами FcRH5 В-клітин.

Інший варіант втілення винаходу спрямований на використання антитіла до FcRH5 з доданням у ході рекомбінації цистеїном для одержання препарату, що підходить для лікування стану, відповідального за В-клітинний розлад.

д. Рекомбінантні кон'югати антитіло-препарат до (кон'югати тіо-антитіло-препарат)

Інший аспект винаходу представлений кон'югатом антитіло-препарат, що складається з антитіла до FcRH5 з доданням у ході рекомбінації цистеїном (АТ) і молекули препарату аурістатин (D), при цьому антитіло з доданням у ході рекомбінації цистеїном приєднане через одну або кілька незв'язаних амінокислот цистеїн за допомогою лінкерної молекули (L) до D; сполука представлена наступною Формулою I:



де p становить 1, 2, 3 або 4; при цьому антитіло з доданням у ході рекомбінації цистеїном одержують у ході процесу, що включає заміну одного або декількох залишків амінокислот вихідного антитіла до FcRH5 одним або декількома незв'язаними залишками амінокислоти цистеїн.

Інший аспект винаходу представляє композицію, що складається із суміші сполук антитіл-препаратів по Формулі I, при цьому середній показник навантаження препарату на антитіло становить від приблизно 2 до приблизно 5 або від приблизно 3 до приблизно 4.

Потенційні переваги кон'югатів препарату й антитіла до FcRH5 з доданням у ході рекомбінації цистеїном включають підвищену безпеку (більше значення терапевтичного індексу), поліпшені ФК параметри, збереження міжланцюгових дисульфідних містків в антитілі, що дозволить стабілізувати кон'югат і зберегти його конформацію для активного зв'язування, установлені сайти для кон'югації із препаратом, а також одержання кон'югатів препарату й антитіла з доданням у ході рекомбінації цистеїном у результаті кон'югації антитіл з доданням у ході рекомбінації цистеїном з реагентами препарат-лінкер, що призводить до утворення більш однорідного продукту.

Лінкери

«Лінкер», «лінкерна одиниця» або «лінкерна сполука» позначає хімічну молекулу, що складається з ковалентного зв'язку або ланцюга атомів, які ковалентним чином приєднують антитіло до молекули препарату. У різних варіантах втілення винаходу лінкер позначається L. «Лінкер» (L) є біфункціональною або багатофункціональною молекулою, що може використовуватися для сполуки однієї або декількох молекул препарату (D) з одиницею антитіла (АТ) з утворенням кон'югатів антитіло-препарат (КАП) по Формулі I. Кон'югати антитіло-препарат (КАП) можуть бути отримані з використанням лінкера, що володіє функціональною

реакційною здатністю щодо зв'язування препарату з антитілом. Тіолова група цистеїна в антитілі з доданим у ході рекомбінації цистеїном (АТ) може утворювати зв'язок з електрофільною функціональною групою лінкерного реагенту, молекулою препарату або проміжною речовиною препарат-лінкер.

В одному аспекті винаходу лінкер складається з реакційного центра, що містить електрофільну групу, що є реакційноздатною відносно нуклеофільного цистеїна, присутнього в антитілі. Тіолова група цистеїна антитіла реагує з електрофільною групою лінкера й утворює ковалентний зв'язок з лінкером. Такі електрофільні групи включають, але не обмежуються, групи maleimida й галогенацетаміда.

Лінкери включають двовалентний радикал, наприклад, алкілділ, арилен, гетероаридієн, такі молекули, як  $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ , одиниці алкілокси, що повторюються (наприклад, поліетіленоксі, ПЕГ, поліметіленоксі) і алкіламіно (наприклад, поліетіленаміно, Jeffamine™); а також двоокислотні ефіри й аміді, включаючи сукцинат, сукцинамід, дигліколат, малонат і капроамід.

Антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном реагують із лінкерними реагентами або проміжними речовинами препарат-лінкер, з електрофільними функціональними групами, такими як maleimid або  $\alpha$ -галогенкарбонил відповідно до способу кон'югації, що представлений на сторінці 766 Klusman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773.

Лінкер може складатися з одного або декількох лінкерних компонентів. Типові лінкерні компоненти включають 6-maleimido-caproil ("MC"), maleimido-propyl ("MP"), valin-citruillin («вал-цит» або "vc"), alanin-phenylalanin ("ала-фен" або "af"), p-aminobenzoyloxycarbonyl ("PAB"), N-succinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoate ("SPP"), N-succinimidyl 4-(N-maleimido-methyl) cyclohexan-1-carboxylate ("SMCC"), N-succinimidyl 4-(iodo-acetyl) aminobenzoate ("SIAB"), etilenoksi  $-CH_2CH_2O-$  у якості однієї або декількох повторюваних одиниць ("EO" або "PEO"). Додаткові лінкерні компоненти також відомі науці, і деякі з них описані в даній заявці.

В одному варіанті втілення винаходу лінкер L у КАП має наступну формулу:



де:

-A- є розширювальною одиницею (розширювачом), що ковалентним чином приєднується до тіолової групи цистеїна антитіла (АТ);

a становить 0 або 1;

кожний -W- представлений незалежним чином амінокислотою одиницею;

w представлений незалежним чином цілим числом і варіює від 0 до 12;

-Y- є спейсерною одиницею, що ковалентним чином приєднується до молекули препарату; і у становить 0, 1 або 2.

Розширювач

Розширювач (-A-), у випадку його присутності, здатний зв'язувати одиницю антитіла з одиницею амінокислоти (-W-). Щодо цього антитіло (АТ) містить функціональну групу, що може утворювати зв'язок з функціональною групою розширювача. Такі групи, які можуть бути присутніми в антитілі (природно або введені шляхом хімічних маніпуляцій) включають, але не обмежуються, сульфгідрил (-SH), аміно-, гідроксильну, карбоксильну або аномірну гідроксильну групи вуглецю, а також карбоксил. В одному аспекті функціональні групи антитіла представлені сульфгідрилом або аміногрупою. Сульфгідрильні групи можуть бути отримані шляхом відновлення внутрішньомолекулярного дисульфідного зв'язку антитіла. З іншого боку, сульфгідрильні групи можуть бути утворені в ході реакції аміногрупи лізіна антитіла з 2-імінотіолоном (реагентом Троту) або іншим реагентом, що приводить до утворення сульфгідрила. В одному варіанті втілення винаходу антитіло (АТ) містить незв'язану тіолову групу цистеїна, що може утворювати зв'язок з функціональною групою розширювача. Типові розширювачі для кон'югатів по Формулі I позначені Формулами II і III, де Ab-, -W-, -Y-, -D-, w і у відповідають представленим вище позначенням, R<sup>17</sup> є двовалентним радикалом, вибраним з наступної групи:  $(CH_2)_r$ ,  $C_3-C_8$  карбоцикліл,  $O-(CH_2)_r$ , арилен,  $(CH_2)_r$ -арилен,  $-(CH_2)_r$ ,  $(CH_2)_r$ -( $C_3-C_8$  карбоцикліл),  $(C_3-C_8$  карбоцикліл)- $(CH_2)_r$ ,  $C_3-C_8$  гетероцикліл,  $(CH_2)_r$ -( $C_3-C_8$  гетероцикліл),  $-(C_3-C_8$  гетероцикліл)- $(CH_2)_r$ ,  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ ,  $-(CH_2CH_2O)_r$ ,  $-(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ ,  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ ,  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_rCH_2-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ ,  $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_rCH_2-$  і  $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ ; R<sup>b</sup> представлений H,  $C_1-C_6$  алкілом, фенілом або бензілом; і r представлено цілим числом, що варіює від 1 до 10.

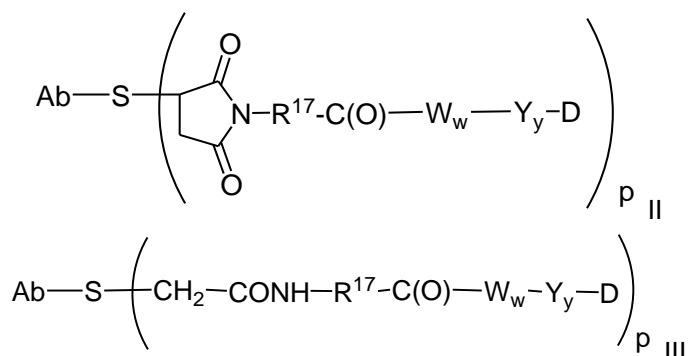
Арилени включають двовалентні радикали ароматичного вуглеводню з 6-20 атомів вуглецю, отриманих шляхом видалення атомів водню із системи ароматичного кільця. Типові групи ариленів включають, але не обмежуються, радикали, отримані з бензолу, заміщеного бензолу, нафталіну, антрацену, біфеніла й т.п.

Гетероциклічні групи включають систему кільця, у якому один або кілька атомів у кільці представлений гетероатомом, наприклад, атомом азоту, кисню або сірки. Гетероциклічні радикали складаються з 1 до 20 атомів вуглецю й 1 до 3 гетероатомів, які вибирають з N, O, P і S. Гетероцикл може бути представлений моноциклом, що складається з 7-членного кільця (2-6 атомів вуглецю й 1-3 гетероатомів, які вибирають з N, O, P і S), або подвійним кільцем, що складається з 10-членного кільця (4-9 атомів вуглецю й 1-3 гетероатомів, які вибирають з N, O, P і S), наприклад: система з подвійного кільця [4,5], [5,5], [5,6] або [6,6]. Гетероцикли описані в Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularly Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 - наш час), зокрема, у Томах 13, 14, 16, 19 і 28; і J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

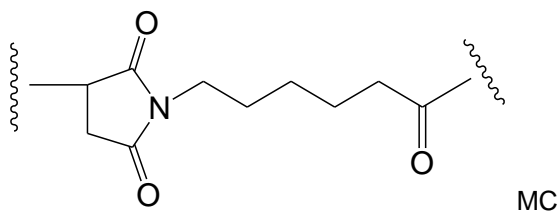
Приклади гетероциклів включають, не обмежуючись, наступні: піридил, дигідропіридил, тетрагідропіридил (піперидил), тiazоліл, тетрагідротіофеніл, окиснений сіркою тетрагідротіофеніл, піримідиніл, фураніл, тієніл, пірроліл, піразоліл, імідазоліл, тетразоліл, бензофураніл, тіанафтеленіл, індоліл, індоленіл, хинолініл, ізохінолініл, бензімідазоліл, піперидиніл, 4-піперидоніл, пірролідиніл, 2-пірролідоніл, пірролініл, тетрагідрофураніл, біс-тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, біс-тетрагідропіраніл, тетрагідрохінолініл, тетрагідроізохінолініл, декагідрохінолініл, октагідроізохінолініл, азоцініл, триазиніл, 6H-1,2,5-тіодіазиніл, 2H, 6H-1,5,2-дитіазиніл, тієніл, тіантреніл, піраніл, ізобензофураніл, хроменіл, ксантеніл, феноксатиніл, 2H-пірроліл, ізотіазоліл, ізоксазоліл, піразиніл, піридазиніл, індолізиніл, ізоіндоліл, 3H-індоліл, 1H-індазоліл, пуриніл, 4H-хінолізиніл, фталазиніл, нафтирідиніл, хіноксалініл, хіназолініл, циннолініл, птеридиніл, 4Ah-карбазоліл, карбазоліл, β-карболініл, фенантридиніл, акридиніл, піримідиніл, фенантролініл, феназиніл, фенотіазиніл, фуразаніл, феноксазил, ізохроманіл, хроманіл, імідазолідиніл, імідазолініл, піразолідиніл, піразолініл, піперазиніл, індолініл, изонидолініл, хінуклідиніл, морфолініл, оксазолідиніл, бензотріазоліл, бензізооксазоліл, оксііндоліл, бензоксазолініл й ізатіоінл.

Карбоциклічні групи включають насичене або ненасичене кільце з 3-7 атомів вуглецю у вигляді моноцикла або 7-12 атомів вуглецю у вигляді подвійного циклу. Моноциклічні карбоцикли мають 6-членне кільце, але найчастіше 6-членне кільце. Двоциклічні карбоцикли мають 12-членне кільце, тобто становлять систему з подвійних кілець [4,5], [5,5], [5,6] або [6,6], або 10-членне кільце у вигляді системи з подвійних кілець [5,6] або [6,6]. Приклади моноциклічних карбоциклів включають циклопропіл, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-єніл, 1-циклопент-2-єніл, 1-циклопент-3-єніл, циклогексил, 1-циклогекс-1-єніл, 1-циклогекс-2-єніл, 1-циклогекс-3-єніл, циклогептил й циклооктил.

Із всіх типових варіантів втілення винаходу КАП по Формулі I, такі сполуки мають Формулу II-VI, і варто розуміти, що навіть при відсутності чіткої вказівки, до антитіла приєднане від 1 до 4 молекул препарату (p=1-4), залежно від числа доданих залишків цистеїна.

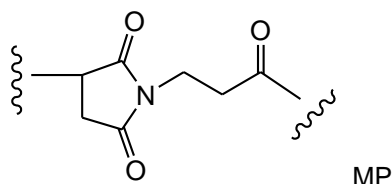


Ілюстративний розширювач по Формулі II отриманий з малеїмідо-капроїла (MC), де R<sup>17</sup> представлений -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:



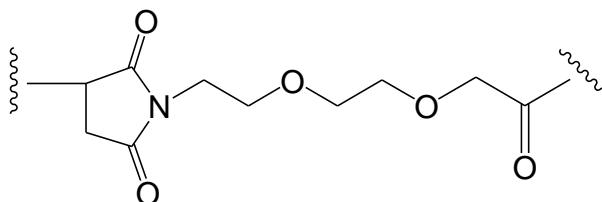
Ілюстративний розширювач по Формулі II отриманий з малеїмідо-пропаноїла (MP), де  $R^{17}$  представлений  $-(CH_2)_2-$ :

5



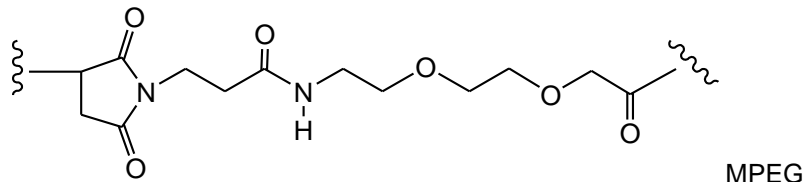
Інший ілюстративний розширювач має структуру по Формулі II, де  $R^{17}$  представлений  $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$  і  $r$  представлений 2:

10

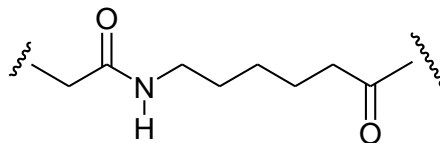


Інший ілюстративний розширювач має структуру по Формулі II, де  $R^{17}$  представлений  $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ , при цьому  $R^b$  представлений H і кожний  $r$  представлений 2:

15



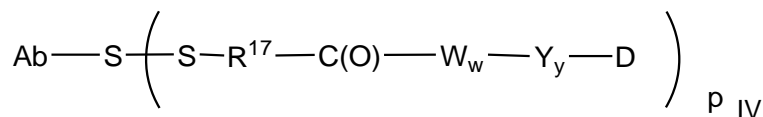
Ілюстративний розширювач має структуру по Формулі III, де  $R^{17}$  представлений  $-(CH_2)_5-$ :



20

В іншому варіанті втілення винаходу розширювач приєднаний до антитіла до FcRH5 з доданим у ході рекомбінації цистеїном за допомогою дисульфідного зв'язку між атомом сірки введеного цистеїна й атомом сірки одиниці розширювача. Репрезентативна одиниця розширювача по даному варіанті втілення винаходу має структуру по Формулі IV, де  $R^{17}$ , Ab-, -W-, -Y-, -D, w і y мають зазначені вище значення.

25

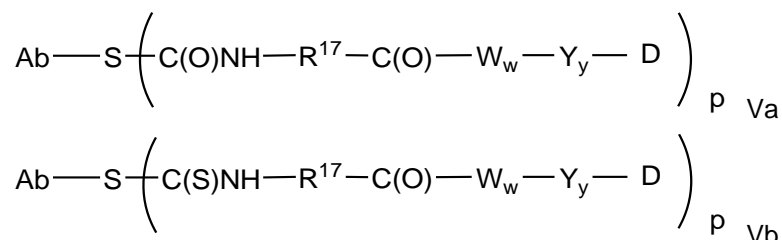


30

У ще одному варіанті втілення винаходу реакційна група розширювача складається з тіолової реакційноздатної функціональної групи, що може утворювати зв'язок з незв'язаною тіоловою групою цистеїна в антитілі. Приклади тіолових реакційноздатних функціональних груп



- включають, але не обмежуються, малеїмід,  $\alpha$ -галогенацетил, активовані ефіри, такі як ефіри сукциніміда, 4-нітрофенілові ефіри, пентафторфенілові ефіри, тетрафторфенілові ефіри, ангідриди, хлорангідриди, сульфонилхлориди, ізоціанати й ізотіоціанати. Репрезентативні одиниці розширювача по даному варіанті втілення винаходу мають структуру по Формулах Va і Vb, де R<sup>17</sup>, Ab-, -W-, -Y-, -D, w і у мають зазначені вище значення.

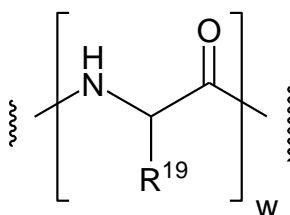


- В іншому варіанті втілення винаходу лінкер може бути представлений лінкером розгалуженого типу для ковалентного приєднання більше однієї молекули препарату за допомогою розгалуженої, мультифункціональної лінкерної молекули з антитілом (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990). Розгалужені лінкери можуть підвищувати молярне співвідношення препарату до антитіла, тобто навантаження, що є однією з характеристик активності КАП. Таким чином, у той час як антитіло з введеним у ході рекомбінації цистеїном може містити тільки одну реакційноздатну тіолову групу, за допомогою розгалуженого лінкера може бути приєднана безліч молекул препарату.

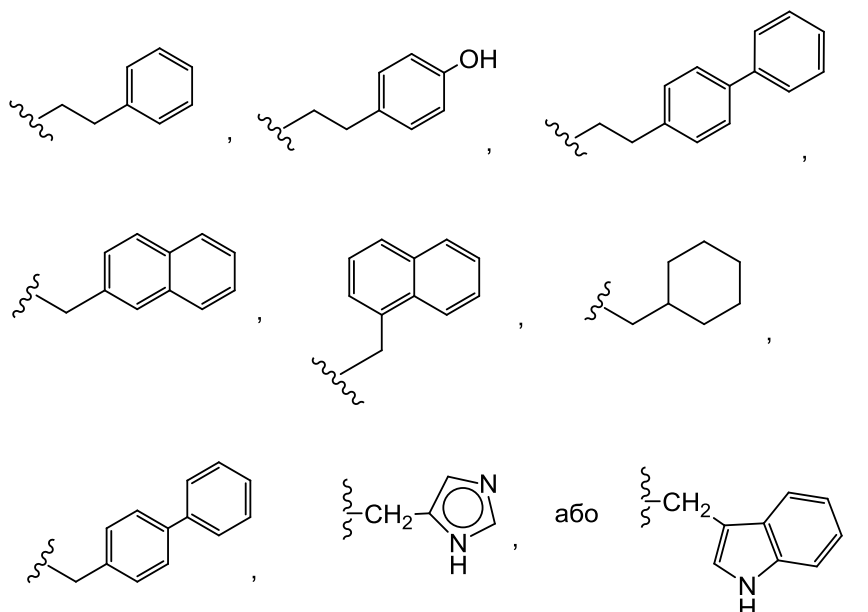
Амінокислотна одиниця

- Лінкер може складатися із залишків амінокислот. Амінокислотна одиниця (-W<sub>w</sub>-), якщо є присутньою, з'єднує антитіло (АТ) з молекулою препарату (D) кон'югата препарату й антитіла з доданням у ході рекомбінації цистеїном (КАП).

- W<sub>w</sub>- є дипептидною, трипептидною, тетрапептидною, пентапептидною, гексапептидною, гептапептидною, октапептидною, нонапептидною, декапептидною, ундекапептидною або додекапептидною одиницею. Амінокислотні залишки, які містять амінокислотну одиницю, включають амінокислоти, що зустрічаються в природі, а також рідкі амінокислоти й не амінокислотні аналоги, що зустрічаються в природі, наприклад, цитрулін. Кожна одиниця -W- незалежним чином має формулу, зазначену нижче у квадратних дужках, при цьому w є цілим числом, що варіює від 0 до 12:



- де R<sup>19</sup> представлений воднем, метилом, ізопропилом, ізобутилом, вторинним бутилом, бензилом, p-гідроксibenзілом, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-піридилметил-, 3-піридилметил-, 4-піридилметил-, фенілом, циклогексиллом,



При цьому  $R^{19}$  не є воднем, а атом вуглецю, до якого приєднується  $R^{19}$ , є хиральним. Кожний атом вуглецю, до якого приєднується  $R^{19}$ , є присутнім незалежним чином у конфігурації (S) або (R), або рацематної суміші. Таким чином, амінокислотні одиниці можуть не містити енантіомірів, бути рацематними або діастереоізомерними.

Типові амінокислотні одиниці  $-W_w-$  включають дипептид, трипептид, тетрапептид або пентапептид. Типові дипептиди представлені наступними: валін-цитрулін (vc або вал-цит), аланін-фенілаланін (af або ала-фен). Типові трипептиди включають наступні: гліцин-валін-цитрулін (глі-вал-цит) і гліцин-гліцин-гліцин (глі-глі-глі). Амінокислотні залишки, які містять амінокислотний компонент лінкера, включають амінокислоти, що зустрічаються в природі, а також рідкі амінокислоти й не амінокислотні аналоги, що зустрічаються в природі, наприклад, цитрулін.

Амінокислотна одиниця може піддаватися ферментативному розщепленню одним або декількома ферментами, включаючи пухлиноасоційовану протеазу, зі звільненням молекули препарату (-D), що в одному варіанті втілення винаходу протонувана *in vivo* при вивільненні препарату (D). Амінокислотні лінкерні компоненти можуть бути отримані й оптимізовані у своїй вибірковості на предмет ферментативного розщеплення окремим ферментом, наприклад, пухлиноасоційованою протеазою, катепсином B, C и D або плазміном.

Спейсерна одиниця

Спейсерна одиниця  $(-Y_y-)$ , якщо є присутньою ( $y=1$  або  $2$ ), з'єднує амінокислотну одиницю  $(-W_w-)$  з молекулою препарату (D), якщо є присутньою амінокислотна одиниця ( $w=1-12$ ). В інших випадках, спейсерна одиниця з'єднує розширювач з молекулою препарату під час відсутності амінокислотної одиниці. Спейсерна одиниця також з'єднує молекулу препарату з антитілом у випадку відсутності амінокислотної одиниці й розширювача ( $w, y=0$ ). Спейсерні одиниці бувають двох різних видів: що саможертвують або, що несаможертвують. Спейсерна одиниця, що несаможертвує, представлена одиницею, що частково або повністю залишається пов'язаною з молекулою препарату після розщеплення, зокрема, ферментативної, амінокислотної одиниці кон'югата антитіло-препарат або лінкера препарату. Коли КАП-утримуюча гліцин-гліцинова спейсерна одиниця або гліцинова спейсерна одиниця піддається ферментативному розщепленню пухлиноасоційованою протеазою, протеазою ракових клітин або протеазою лімфоцитів, від  $AT-A_a-W_w-$  відщеплюється молекула гліцин-гліцин-препарату або гліцин-препарат. В одному варіанті втілення винаходу в клітині-мішені відбувається незалежна реакція гідролізу, що розщеплює зв'язок молекули гліцин-препарат і вивільняє препарат.

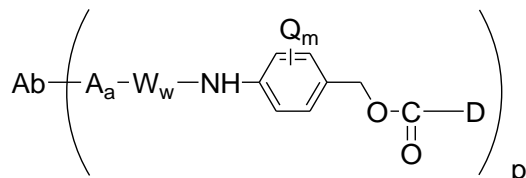
В іншому варіанті втілення винаходу  $-Y_y-$  представлений амінобензилкарбоміолом (PAB), у якому ділянка фенілена *p*-амінобензилової одиниці заміщена  $Q_m$ , при цьому Q представлений -  $C_1-C_8$  алкілом, -O-( $C_1-C_8$  алкілом), -галогеном, - нітро або -ціано; і *m* представлений цілим числом у межах 0-4.

Типові варіанти втілення винаходу спейсерної одиниці, що не саможертвує  $(-Y-)$  представлені наступними: - Глі-Глі-; -Глі-; - Ала-Фен-; - Вал-Цит-.

В одному варіанті втілення винаходу молекула препарату-лінкера або КАП підібрані таким

чином, що спейсерна одиниця відсутня ( $y=0$ ), або представлена фармацевтично прийнятною сіллю або його сольватом.

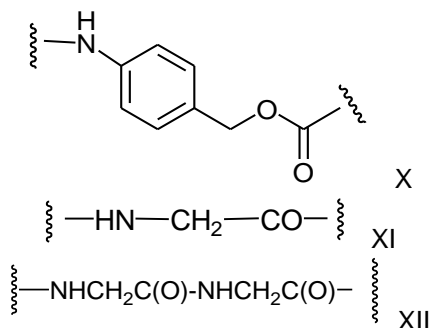
З іншого боку, спейсерна одиниця, що саможертвує, що втримується в КАП може вивільняти -D. В одному варіанті втілення винаходу -Y- представлений групою PAB, що приєднується до -W<sub>w</sub>- за допомогою атома азоту аміногрупи PAB, і безпосередньо приєднується до -D за допомогою групи карбонату, карбамата або іншої групи, при цьому КАП має наступну типову структуру:



де Q представлений -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкілом, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкілом), -галогеном, -нітро або -ціано; m є цілим числом, що варіює від 0 до 4; i p варіює від 1 до 4.

Інші приклади спейсерних одиниць, що само жертвують, включають, але не обмежуються, ароматичні сполуки, які по своїй електронній структурі подібні p-амінобензиловому спирту (див, наприклад, US 2005/0256030 A1), такі як похідні 5-метанолу (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), гетероциклічні аналоги PAB (US 2005/0256030), бета-глюкуронід (WO 2007/011968), а також орто- або пара-амінобензилацетали. Можуть використовуватися спейсери, які при гідролізі амідного зв'язку утворюють кільце, серед них заміщені й незаміщені амідні 4-аміномасляної кислоти (Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2: 223), належним чином заміщені біциклічні системи [2.2.1] і [2.2.2] (Storm, et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94:5815), а також амідні 2-амінофенілпропіонової кислоти (Amsberry, et al., J. Org. Chem., 1990, 55:5867). Елімінація аміноутримуючих препаратів, заміщених у положенні гліцину (Kingsbury, et al., J. Med. Chem., 1984, 27:1447), також являє приклад спейсерів, що само жертвують, що використовують для КАП.

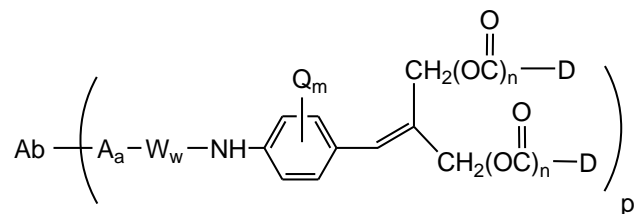
Типові спейсерні одиниці (-Y<sub>y</sub>-) представлені Формулами X-XII:



#### Розгалужені лінкери

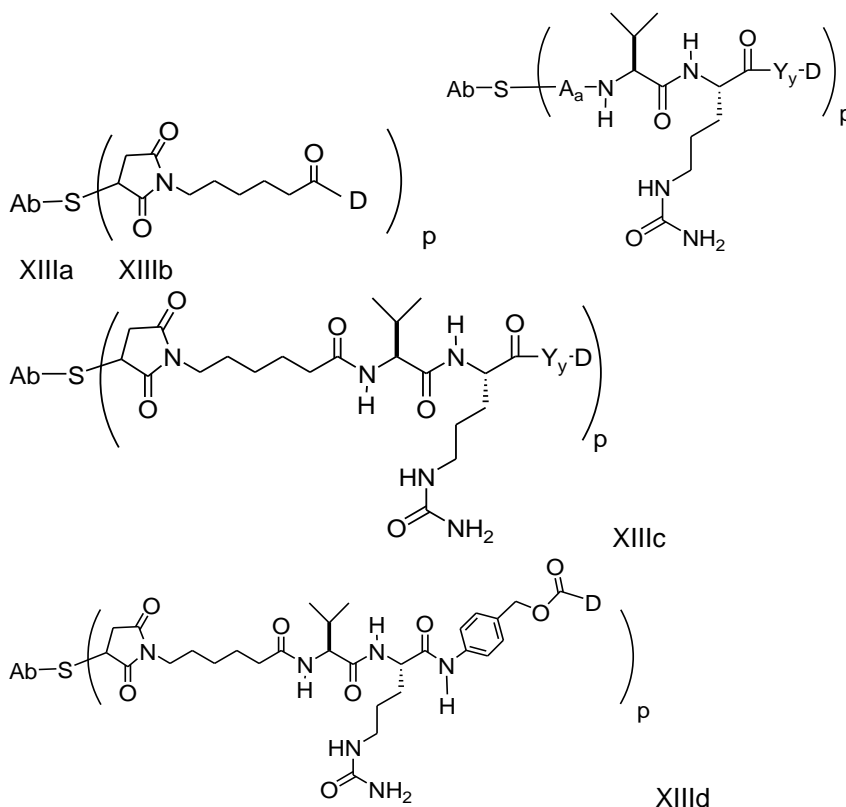
В іншому варіанті втілення винаходу лінкер L може бути представлений лінкером розгалуженого типу для ковалентного приєднання більше однієї молекули препарату за допомогою розгалуженої, мультифункціональної лінкерної молекули з антитілом (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Розгалужені лінкери можуть підвищувати молярне співвідношення препарату до антитіла, тобто навантаження, що є однією з характеристик активності КАП. Таким чином, у той час як антитіло з введеним у ході рекомбінації цистеїном може містити тільки одну реакційноздатну тіолову групу, за допомогою розгалуженого лінкера може бути приєднано безліч молекул препарату. Типові варіанти втілення винаходу передбачають використання розгалужених лінкерів, які включають 2,6-біс(гідроксиметил)-p-крезол й 2,4,6-трис(гідроксиметил)-фенол (WO 2004/01993; Szalai et al (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689; Shamis et al (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731; Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499).

В одному варіанті втілення винаходу спейсерна одиниця представлена розгалуженою одиницею біс(гідроксиметил)стирена (BHMS) і може використовуватися для введення й вивільнення множинних препаратів; структура такого спейсера наступна:

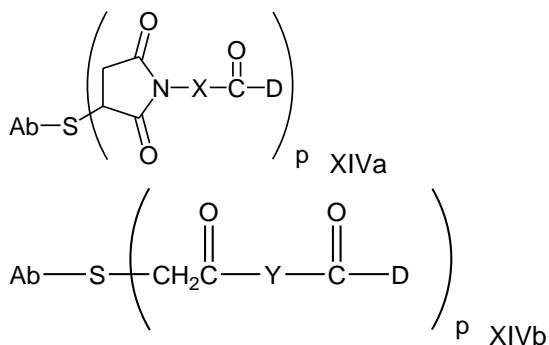


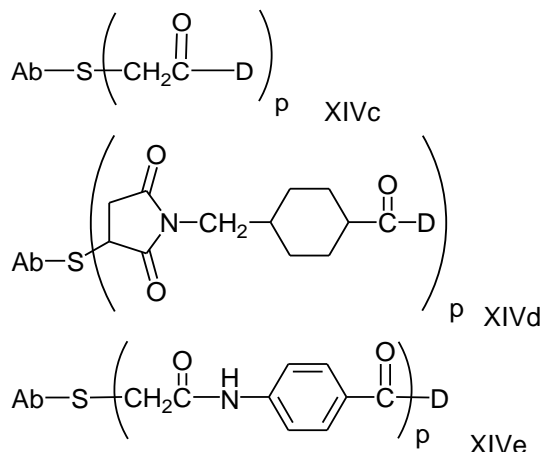
Спейсер складається з дендриміра 2- (4-амінобензиліден)пропан-1,3-діола (WO 2004/043493; de Groot et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494), де Q представлений -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкілом, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкілом), -галогеном, -нітро або -ціано; m є цілим числом, що варіює від 0 до 4; n дорівнює 0 або 1; і p варіює від 1 до 4.

Типові варіанти втілення винаходу описують сполуки-кон'югати антитіло-препарат по Формулі I, включаючи XIIIa (MC), XIIIb (вал-цит), XIIIc (MC-вал-цит) і XIId (Вал-цит-PAB):

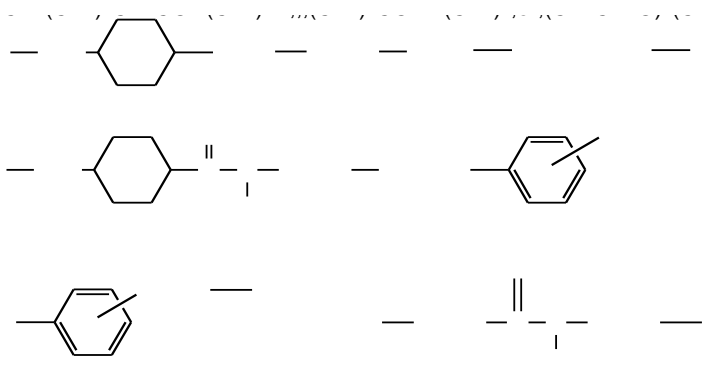


Інші типові варіанти втілення винаходу описують сполуки-кон'югати антитіло-препарат по Формулі I, включаючи XIVa-e:



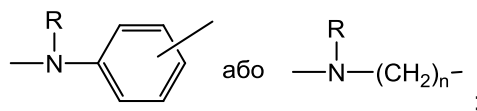


5 де X представлений наступним:



Y представлений наступним:

10



i R представлений незалежним чином H або C<sub>1</sub>–C<sub>6</sub> алкілом; n становить від 1 до 12.

15

В іншому варіанті втілення винаходу лінкер включає реакційноздатну функціональну групу, що містить нуклеофільну групу, що зв'язується з електрофільною групою антитіла. Електрофільні групи антитіла включають, але не обмежуються, альдегідні й кетонів карбонільні групи. Гетероатом нуклеофільної групи лінкера може реагувати з електрофільною групою антитіла з утворенням ковалентного зв'язку з антитілом. Підходящі нуклеофільні групи лінкера включають, але не обмежуються, гідразид, оксим, аміногрупу, гідразин, тіосемікарбазон, гідразина карбоксилат і арилгідразид. Електрофільна група антитіла забезпечує підходяще місце зв'язування з лінкером.

20

Як правило, лінкери пептидного типу можуть бути отримані шляхом утворення пептидного зв'язку між двома або більше амінокислотами й/або пептидними фрагментами. Такі пептидні зв'язки можуть бути отримані, наприклад, відповідно до способу синтезу в рідкій фазі (E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), що добре відома в області хімії пептидів. Проміжні речовини лінкера можуть бути зібрані в ході будь-якої комбінації або послідовності реакцій, включаючи спейсер, розширювач і амінокислотні одиниці. Спейсер, розширювач і амінокислотні одиниці можуть включати реакційноздатні функціональні групи, що є електрофільними, нуклеофільними або вільними радикалами. Реакційноздатні функціональні групи включають, але не обмежуються, карбоксили, гідроксили, пара-нітрофенілкарбонат, ізотіоціанат, а також групи, що заміщують О-мезил, О-тозил, -Cl, -Br, -I або малеїмід.

30

Наприклад, заряджена група, що заміщує, така як сульфат (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) або амоній, може підвищити розчинність реагенту у воді й полегшити реакцію зв'язування лінкерного реагенту з антитілом або молекулою препарату, або полегшити реакцію зв'язування AT-L (проміжна

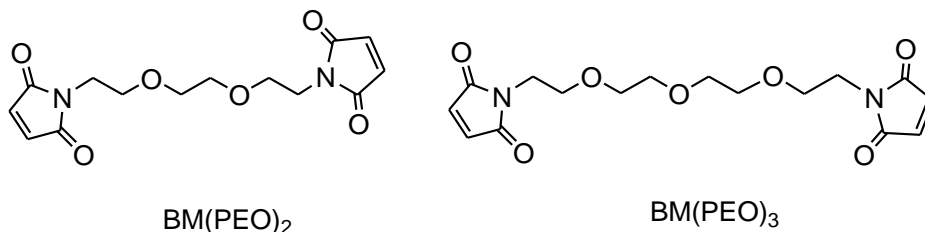
35

речовина антитіло-лінкер) з D, або D-L (проміжна речовина препарат-лінкер) з АТ, залежно від способу синтезу, що використовується для одержання КАП.

Лінкерні реагенти

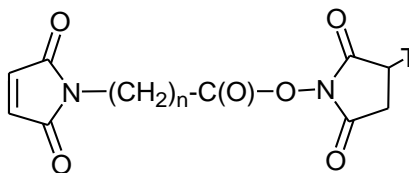
Кон'югати антитіла й аурістатина одержують із використанням цілого ряду біфункційних лінкерних реагентів, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіол) пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїдометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоефірів (такі як диметиладипимидат HCL), активні ефіри (такі як дисукцинімідила суберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидо сполуки (такі як біис (p-азидобензойл) гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(p-діазоніабензойл)-етілендіамін), диізоціанати (такі як толуол 2,6-диізоціанат) й біс-активні сполуки фтора (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол).

Кон'югати антитіло-препарат також можуть бути отримані з використанням наступних лінкерних реагентів: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC і сульфо-SMPB, SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), а також включаючи біс-малеїмідні реагенти: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-біс-малеїмідодидиетилєнглїколь (BM(PEO)<sub>2</sub>) і 1,11-біс-малеїмідотриетилєнглїколь (BM(PEO)<sub>3</sub>), які представлені на ринку компанією Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL і іншими постачальниками. Біс-малеїмідні реагенти дозволяють тіоловій групі цистеїна в антитілі з доданням у ході рекомбінації цистеїном приєднуватися до молекули препарату, що контактує з тіоловою групою, мітці або проміжній речовині лінкера послідовним або конкурентним чином. Інші функціональні групи, крім малеїміда, що володіють реакційною здатністю відносно тілової групи антитіла з доданням у ході рекомбінації цистеїном, молекули препарату, мітки або проміжної речовини лінкера, включають йодацетамід, бромацетамід, вінілпіридин, дисульфід, піридилдисульфід, ізоціанат і ізотіоціанат.

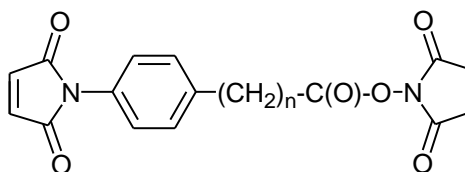


Підходящі лінкерні реагенти також можуть бути отримані з комерційних джерел, наприклад, від компанії Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), або синтезовані відповідно до процедур, що описані в Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; і WO 04/032828.

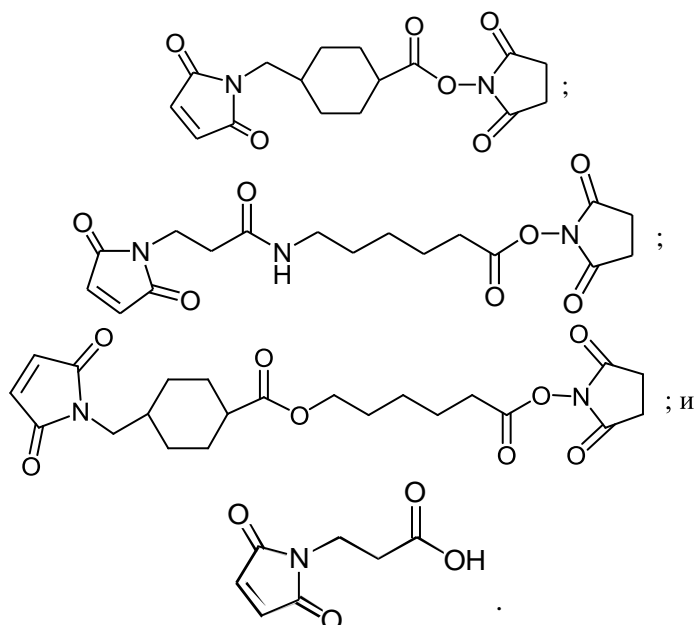
Розширювачи по Формулі (IIIa) можуть бути введені в лінкер у ході реакції наступних лінкерних реагентів з N-кінцевою амінокислотою:



де n є цілим числом, що варіює від 1 до 10 і T представлений -H або -SO<sub>3</sub>Na;

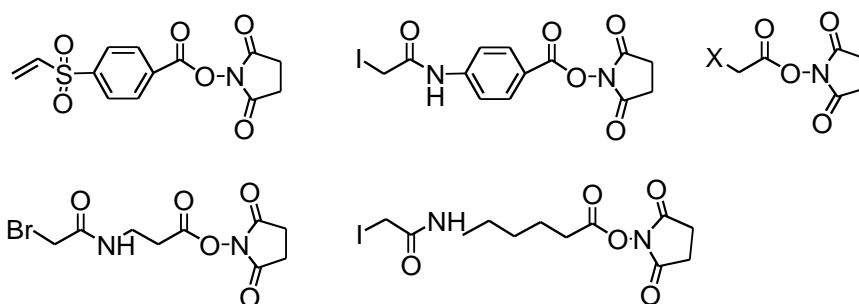


де n є цілим числом і варіює від 0 до 3;



5

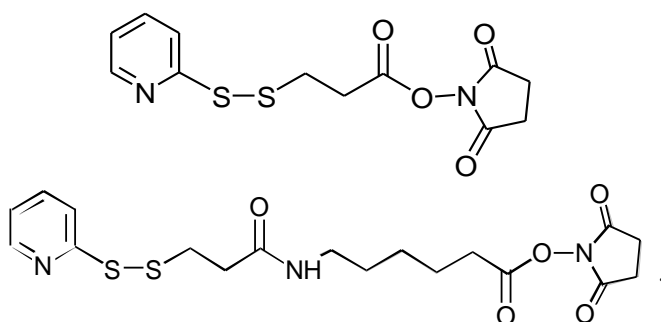
Розширювачі можуть бути введені в лінкер у ході реакції наступних біфункційних реагентів з N-кінцевою амінокислотою:



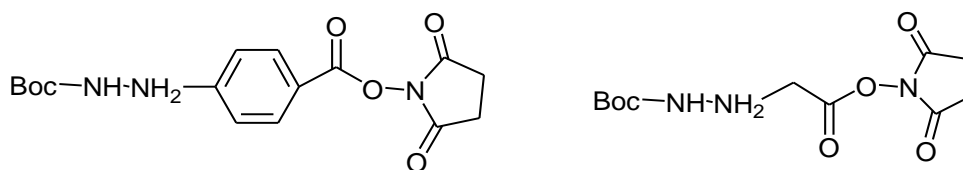
10

де X представлений Br або I.

Розширювачі по формулі також можуть бути введені в лінкер у ході реакції наступних біфункційних реагентів з N-кінцевою амінокислотою:

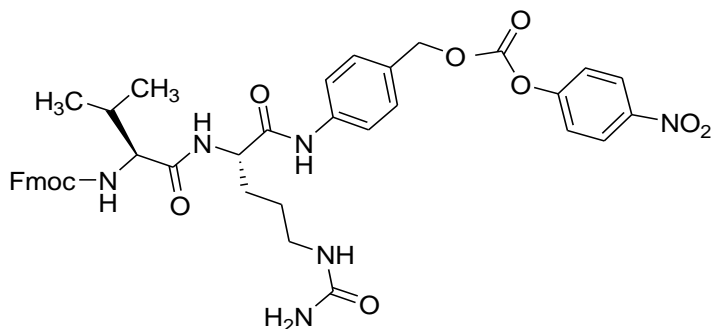


15

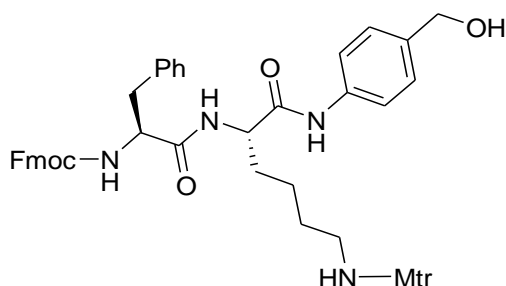


20

Типовий дипептидний лінкерний реагент валін-цитрулін (вал-цит або vc), що включає розширювач малеїмід і саможертвує спейсер пара-амінобензилкарбамоїл (PAB), має наступну структуру:



Типовий дипептидний лінкерний реагент фенол-лізін (Mtr, моно-4-метокситритіл), що включає розширювач малеїмід і саможертвує спейсер PAB, може бути отриманий згідно Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60, і має наступну структуру:



Одержання кон'югатів препарату й антитіла до FcRH5с доданим у ході рекомбінації цистеїном

КАП по Формулі I може бути отриманий декількома способами, що включають реакції органічної хімії, умови й реагенти, відомі фахівцям в даній області й які включають наступне: (1) реакція групи цистеїна антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном з лінкерним реагентом з утворенням проміжної сполуки антитіло-лінкер AT-L за допомогою ковалентного зв'язку з наступною реакцією з активованою молекулою препарату D; (2) реакція нуклеофільної групи молекули препарату з лінкерним реагентом з утворенням проміжної речовини препарат-лінкер D-L за допомогою ковалентного зв'язку з наступною реакцією із групою цистеїна антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном. Способи кон'югації (1) і (2) можуть використовуватися з різними антитілами з доданим у ході рекомбінації цистеїном, молекулами препаратів і лінкерами для одержання кон'югатів антитіло-препарат по Формулі I.

Тіолові й гідроксильні групи є нуклеофільними й здатні реагувати з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами лінкерних реагентів і проміжних сполук препарат-лінкер, включаючи наступні речовини: (i) активні ефіри, такі як ефіри NHS, ефіри HOBT, галогенформіати й галіди кислот; (ii) алкіл- і бензилгаліди, такі як галогенацетаміди; (iii) альдегіди, кетони, карбоксильні й малеїмідні групи. Нуклеофільні групи молекули препарату включають, але не обмежуються, наступні: аміни, тіол, гідроксил, гідразид, оксим, гідразин, тіосемікарбазин, гідразина карбоксилат і арилгідразид, і такі групи здатні вступати в реакцію з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами лінкерних молекул і лінкерних реагентів.

Антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном можуть стати реакційноздатними для кон'югації з лінкерними реагентами під впливом відновлювачей, таких як DTT (реагент Келланда, дитіотреїтол) або TCEP (трис (2-карбоксіетіл)фосфін гідрохлорид; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), з наступним повторним окислюванням для поновлення усередині- і міжланцюгових дисульфідних зв'язків (Приклад 5). Наприклад, моноклональні антитіла повної довжини з доданим у ході рекомбінації цистеїном (TioMAT), що експресуються в клітинах CHO, відновлюють із використанням приблизно 50-кратного молярного перевищення TCEP протягом 3 годин при температурі 37 °C для відновлення дисульфідних зв'язків у цистеїнових аддуктах, які можуть утворитися між нововведеними цистеїновими залишками й цистеїном, що присутній у середовищі культивування. Відновлене TioMAT розводять і завантажують у стовпчик HiTrap S у присутності 10 mM натрію ацетату, pH 5, і елюють у присутності ФСБ, що містить 0,3M натрії хлориду.



Дисульфідні зв'язки між цистеїновими залишками, що є присутні у вихідному МАТ, були відновлені з використанням розведеного водного сульфату міді  $\text{CuSO}_4$  (200 нМ) при кімнатній температурі протягом ночі. З іншого боку, дегідроаскорбінова кислота (DHAA) є ефективним окислювачем для відновлення внутрішньоланцюгових дисульфідних груп антитіла з доданим у

5 ході рекомбінації цистеїном після відбудовного відщиплення аддуктів цистеїна. Можуть використовуватися й інші окислювачі, тобто речовини, що окисляють, і умови окислювання, відомі науці. Також ефективне окислювання повітрям навколишнього середовища. Такий м'який етап із частковим повторним окислюванням приводить до утворення внутрішньоланцюгових дисульфідних зв'язків ефективним чином з високим ступенем відповідності, і дозволяє зберегти

10 тіолові групи нововведених залишків цистеїна. Проміжна речовина препарат-лінкер, наприклад, MC-vc-PAV-MMAE, у кількості, що перевищує приблизно в 10 разів, була додана, перемішана й відставлена приблизно на 1 годину при кімнатній температурі для здійснення ефективної кон'югації й утворення кон'югата антитіла до FcRH 5-препарат. Кон'югаційна суміш була піддана гель-фільтрації й завантажена й елюювана через стовпчик HiTrap S для видалення

15 надлишкової кількості проміжної речовини препарат-лінкер і інших домішок.

Загальний процес для одержання антитіла з доданим у ході рекомбінації цистеїном з наступною експресією культурою клітин для кон'югації представлений наступним. При вмісті в культурі клітин цистеїна, між нововведеним цистеїном і цистеїном середовища можуть утворюватися дисульфідні аддукти. Такі дисульфідні аддукти, позначаються як кружок на

20 типовому позначенні TioMAT, повинні бути піддані відновленню для одержання антитіл з доданим у ході рекомбінації цистеїном, що володіє реакційною здатністю для кон'югації. Цистеїнові аддукти, приблизно разом з різними міжланцюговими дисульфідними зв'язками, піддаються відбудовному розщепленню з одержанням відновленої форми антитіла з використанням таких відновлювачей, як TCEP. Межланцюгові дисульфідні зв'язки між

25 спареними цистеїновими залишками реформують в умовах часткового окислювання із сульфатом міді, DHAA, або під впливом кисню повітря навколишнього середовища. Нововведені, додані в ході рекомбінації й неспарені залишки цистеїна залишаються доступними для реакції з лінкерними реагентами або проміжними речовинами препарат-лінкер для утворення кон'югатів антитіла по винаходу. TioMAT, що експресується в лініях клітин ссавців,

30 мають зовнішньо кон'юговані аддукти Цис із доданим у ході рекомбінації Цис за допомогою утворення зв'язку -S-S-. Отже, очищені TioMAT піддаються відновленню й процедурі повторного окислювання для одержання реакційноздатних TioMAT. Такі TioMAT використовуються для кон'югації з малеїмідом, що містить цитотоксичні препарати, флуорофори й інші мітки.

#### 10. Імуноліпосоми

35 Описані тут антитіла до FcRH5 також можуть бути представлені у вигляді імуноліпосом. "Ліпосома" являє собою невеликий пухирець, що складається з різного типу ліпідів, фосфоліпідів і/або сурфактанта, і може використовуватися для доставки препарату в організмі ссавця. Компоненти ліпосоми звичайно розміщуються у вигляді двох шарів, подібно розміщенню ліпідів у біологічній мембрані. Ліпосоми, що містять антитіла по винаходу,

40 одержують із використанням способів, відомих науці й описаних, наприклад, в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); і патентах США No. 4485045 і 4544545; і WO97/38731, опублікованого 23 жовтня 1997 р. Ліпосоми зі збільшеним часом циркулювання описані в патенті США No. 5013556.

Окремі підходящі ліпосоми можуть бути отримані шляхом обернено-фазового випарювання

45 ліпідної композиції, що включає фосфатиділхолін, холестерин і ПЕГ-похідне фосфатидилетаноламіна (ПЕГ-ФЕ). Ліпосоми екструдуються через фільтри з певним розміром пор з одержанням ліпосом необхідного діаметра. Fab' фрагменти антитіла по даному винаході можуть бути кон'юговані з ліпосомами, як це описано Martin et al., J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982), за допомогою реакції обміну за участю дисульфіду. У ліпосомі в деяких випадках може

50 втримуватися хіміотерапевтичний препарат. Див. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

#### Б. Певні способи одержання антитіл

##### 1. Скринінг антитіл до FcRH5 з необхідними властивостями

Вище були описані способи одержання антитіл, що зв'язуються з поліпептидами FcRH5.

55 Надалі це дозволить вибрати антитіла з певними біологічними характеристиками.

Вплив на інгібування росту антитілом до FcRH5 по винаходу може бути оцінене з використанням відомих науці способів, наприклад, з використанням клітин, що експресують поліпептид FcRH5 ендогенним чином або з наступною трансфекцією геном FcRH5. Наприклад, підходящі лінії пухлинних клітин і клітини, трансфіковані FcRH5, можуть бути піддані впливу

60 моноклональним антитілом до FcRH5 у різних концентраціях протягом декількох днів

(наприклад, 2,7 днів) з наступним фарбуванням кристалічним фіолетовим або МТТ або аналізом з використанням іншого колориметричного аналізу. Інший спосіб виміру проліферації буде складатися з порівняння захоплення  $^3\text{H}$  тимідину клітинами, підданими й не підданими впливу антитіла до FcRH5. Після обробки, клітини були зібрані, і за допомогою сцинтилятора була підрахована кількість радіоактивного елемента, введеного в ДНК. Відповідний позитивний контроль має на увазі вплив на вибрану лінію клітин антитілом, що інгібує ріст, що, як відомо, повинне активувати ріст таких клітин. Інгібування росту пухлинних клітин *in vivo* може бути визначено різними відомими науці способами. Пухлинна клітина може надлишково експресувати поліпептид FcRH5. Антитіло до FcRH5 буде інгібувати *in vitro* або *in vivo* клітинну проліферацію пухлинної клітини, що експресує FcRH5, приблизно на 25-100 % у порівнянні з не підданою впливу пухлинною клітиною, найбільш переважно, приблизно на 30-100 %, і навіть більш переважно приблизно на 50-100 % або 70-100 % в одному варіанті втілення винаходу при концентрації антитіла від приблизно 0,5 до 30 мкг/мл. Інгібування росту може бути обмірюване при концентрації антитіла від приблизно 0,5 до 30 мкг/мл або від приблизно 0,5 нМ до 200 нМ у клітинній культурі, при цьому інгібування росту визначається через 1-10 днів після впливу антитілом на пухлинні клітини. Антитіло інгібує ріст в умовах *in vivo*, якщо введення антитіла до FcRH5 у концентрації приблизно 1 мкг/кг до приблизно 100 мг/кг маси тіла приводить до зниження розміру пухлини або проліферації пухлинних клітин протягом періоду від приблизно 5 днів до 3 місяців з моменту першого введення антитіла, переважно протягом приблизно 5-30 днів.

Для вибору антитіла до FcRH5, що індукує загибель клітини, для порівняння з контролем може оцінюватися втрата цілісності мембрани, про що свідчить, наприклад, поглинання пропідіума йодиду (ПІ), трипанового синього або 7AAD. Аналіз поглинання ПІ може проводитися під час відсутності комплементу й імунних ефекторних клітин. Пухлинні клітини, що експресують поліпептид FcRH5, інкубують у середовищі без домішок або середовищі, що містить підходящу кількість антитіла до FcRH5 (тобто приблизно 10 мкг/мл). Клітини інкубують протягом періоду 3 днів. Після кожної обробки, клітини промивають, потім відбирають аліквоти в пробірки 35 мм 12 × 75 із пробками (1 мл у кожну пробірку, 3 пробірки на кожну групу обробки) для видалення згустків клітин. Потім у пробірки вносять ПІ (10 мкг/мл). Зразки можуть бути піддані аналізу з використанням проточного цитометра FACSCAN® і програмного забезпечення FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Антитіла до FcRH5, які індукують загибель клітин зі статистично значимим показником, як це визначається по поглинанню ПІ, можуть бути відібрані як антитіла до FcRH5, які індукують загибель клітин.

Для скринінгу антитіл, що зв'язуються з антигенною детермінантою поліпептиду FcRH5, пов'язаного з антитілом, що цікавить, може проводитися стандартний аналіз перехресного конкурентного зв'язування, описаний в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Такий аналіз може використовуватися для визначення зв'язування досліджуваного антитіла з одного й того ж сайту або антигенної детермінанти, що й для антитіла до FcRH5. З іншої сторони або крім того, картографування антигенних детермінант може проводитися з використанням відомих науці способів. Наприклад, послідовність антитіла може бути піддана мутації, наприклад, скануючому аланіном мутагенезу, для виявлення контактуючих залишків. Мутантне антитіло первісно підлягає тестуванню на предмет зв'язування з поліклональним антитілом для забезпечення належної складчастості. В іншому способі в аналізі конкурентного зв'язування з досліджуваними антитілами або досліджуваним антитілом і антитілом з відомою антигенною детермінантою можуть використовуватися FcRH5, що відповідають різним ділянкам поліпептиду FcRH5.

## 2. Способи скринінгу в окремих бібліотеках

Антитіла до FcRH5 можуть бути отримані з використанням комбінаторних бібліотек для скринінгу антитіл з необхідною активністю. Наприклад, у науці відомий цілий ряд способів для одержання бібліотек фагових дисплеїв і скринінгу таких бібліотек на предмет антитіл, що володіють необхідними характеристиками зв'язування. Такі способи описані в цілому в Hoogenboom et al. (2001) in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), у певних варіантах втілення винаходу, а також в Lee et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093.

У принципі, клони синтетичних антитіл вибираються шляхом скринінгу фагових бібліотек, що містять фаг, що відображає різні фрагменти варіабельної ділянки антитіла (Fv), злитого з білковою оболонкою фага. Такі фагові бібліотеки піддаються тестуванню з використанням афінної хроматографії щодо необхідного антитіла. Клоні, що експресують фрагменти Fv, здатні зв'язуватися з необхідним антигеном і адсорбуватися на антигені, внаслідок чого вони можуть бути сепаровані від неєднальних клонів у бібліотеці. Потім єднальні клони елюють від антигену,

і такі клони можуть бути надалі збагачені додатковими циклами абсорбції на антигені/елювання. Будь-яке антитіло до FcRH5 по винаходу може бути отримане шляхом розробки підходящої процедури скринінгу антигену для вибору фагового клону, що цікавить з наступним конструюванням клону антитіла до FcRH5 повної довжини з використанням

послідовностей Fv із фагового клону, що цікавить й підходящих послідовностей константної ділянки (Fc), описаних в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

У певних варіантах втілення винаходу антигензв'язуючий домен антитіла утвориться із двох варіабельних (V) ділянок із приблизно 110 амінокислот, кожна з яких отримана з легкого (VL) і важкого (VH) ланцюгів; обидві такі ділянки разом утворюють три гіперваріабельні петлі (HVR) або гіперваріабельні ділянки (CDR). Варіабельні домени на фазі можуть відображатися функціональним чином у вигляді одноланцюгових фрагментів Fv (scFv), у яких VH і VL з'єднані ковалентним чином за допомогою короткого, гнучкого пептиду, або у вигляді фрагментів Fab, кожний з яких злитий з константним доменом і взаємодіє нековалентним чином, як це описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). У контексті даного винаходу фагові клони, що кодують scFv, і фагові клони, що кодують Fab, збірним чином позначають як "фагові клони Fv" або "Fv клони".

Репертуар генів VH і VL може бути клонований окремим чином у ході полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і рекомбінований випадковим чином у фагових бібліотеках, які потім піддаються пошуку на предмет наявності антигензв'язуючих клонів, як це описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Бібліотеки з імунізованих джерел забезпечують високоафінні антитіла до імуногенів без необхідності в конструкції гібридом. З іншого боку, нативний репертуар може бути клонований для забезпечення одного джерела людських антитіл до широкого ряду власних і інших антигенів без якої-небудь імунізації, як це описано в Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Нарешті, нативні бібліотеки також можуть бути отримані штучним чином шляхом клонування непереставлених сегментів гена V зі стовбурних клітин, а також з використанням праймерів ПЛР, що містять випадкову послідовність для кодування високоваріабельних ділянок CDR3 і забезпечення перестановки *in vitro*, як це описано в Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

[0003] У певних варіантах втілення винаходу для відображення фрагментів антитіл шляхом злиття з невеликим білком оболонки pIII використовується нитчатий бактеріофаг. Фрагменти антитіла можуть бути відображені у вигляді одноланцюгових фрагментів Fv, у яких домени VH і VL з'єднані в той самий поліпептидний ланцюг гнучким поліпептидним спейсером, наприклад, як це описано в Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), або у вигляді фрагментів Fab, у яких один ланцюг злитий з pIII, а інший ланцюг секретований в періплазму бактеріальної клітини-хазяїна, у якій відбувається складання оболонкового Fab-білка, структура якого відображається на поверхні фага заміщенням одного з оболонкових білків дикого типу, наприклад, як це описано в Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

У цілому, нуклеїнові кислоти, що кодують фрагменти гена антитіла, одержують із імунних клітин людини або тварин. Якщо бібліотека оцінюється щодо клонів антитіл до FcRH5, суб'єкт імунізується FcRH5 для одержання відповіді у вигляді утворення антитіл, потім відновлюють клітини селезінки й/або циркулюючі В-клітини й інші лімфоцити периферичної крові (ЛПК) для побудови бібліотеки. У переважному варіанті втілення винаходу бібліотека фрагментів генів людського антитіла оцінюється щодо клонів антитіла до FcRH5, і таку бібліотеку одержують шляхом генерації вироблення антитіла до FcRH5 у трансгенних мишей, що несуть функціональну генетичну інформацію про людський імуноглобулін (при недостатньому ендогенному виробленні функціональних антитіл), тобто імунізація FcRH5 приводить до підвищення вироблення В-клітинами людських антитіл до FcRH5. Одержання трансгенних мишей, що виробляють людське антитіло, описано нижче.

Додаткове збагачення популяцій реактивних клітин антитілом до FcRH5 може бути здійснене шляхом використання підходящої процедури скринінгу для ізоляції В-клітин, що експресують антитіло до FcRH5, специфічним чином зв'язуючогося з мембраною, наприклад, шляхом поділу клітин з використанням афінної хроматографії або абсорбції клітин міченого флуорохромом FcRH5 шляхом аналізу флуоресцентного сортування клітин (FACS).

З іншого боку, використання клітин селезінки й/або В-клітин, або інших ЛПК від неімунізованого донора забезпечує краще відтворення можливого репертуару антитіл, а також дозволяє здійснити конструювання бібліотеки антитіла з використанням будь-якого виду тварини (людини або тварини), для яких FcRH5 не є антигеном. Для бібліотек, що передбачають конструювання гена антитіла в умовах *in vitro*, стовбурні клітини відбирають у суб'єкта з метою забезпечення наявності нуклеїнових кислот, що кодують незмінні сегменти

генів антитіл. Імунні клітини, що цікавлять, можуть бути отримані в цілому ряду видів тварин, наприклад, людини, миші, пацюка, зайцеобразних, вовчих, собачих, котячих, свиней, великої рогатої худоби, коней і птахів.

Нуклеїнові кислоти, що кодують варіабельні сегменти гена антитіла (включаючи сегменти VH і VL), відновлюють із клітин, що цікавлять, і піддають ампліфікації. У випадку змінених генних бібліотек VH і VL, необхідна ДНК може бути отримана шляхом ізоляції геномної ДНК або мРНК із лімфоцитів з наступною полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) із праймерами, що відповідають 5'- і 3'-кінцям змінених генів VH і VL, як це описано в Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), таким чином, для експресії одержують різні репертуари гена V. Гени V можуть бути ампліфіковані із кДНК і геномною ДНК зі зворотними праймерами на 5'-кінці екзона, що кодує зрілий V-домен, і прямими праймерами в межах J-сегмента, як це описано в Orlandi et al. (1989) і в Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989). Однак, для ампліфікації із кДНК, зворотні праймери також можуть бути засновані на лідерному екзоні, як це описано в Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), а прямі праймери - на константній ділянці, як це описано в Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Для максимального збільшення комплементарності, праймери можуть бути піддані дегенерації, як це описано в Orlandi et al. (1989) або Sastry et al. (1989). У певних варіантах втілення винаходу розмаїтість бібліотеки підвищується максимальним чином шляхом використання праймерів ПЛР, спрямованих на кожне сімейство V-гену, для ампліфікації всіх доступних розміщень VH і VL, присутніх у зразку нуклеїнової кислоти імунної клітини, наприклад, як це описано в способі Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), або як це описано в способі Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Для клонування ампліфікованої ДНК у вектори експресії, у праймер ПЛР можуть бути введені рідкі сайти рестрикції в якості тега на одному кінці, як це описано в Orlandi et al. (1989), або шляхом подальшої ампліфікації ПЛР із утримуючих тег праймером, як це описано в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

Репертуар синтетичним чином змінених V генів може бути отриманий *in vitro* із сегментів V гена. Більша частина сегментів VH-гена людини була клонована, секвенована (повідомлено в Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), і картографована (повідомлено в Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); такі клоновані сегменти (включаючи всі основні конформації петлі H1 і H2) можуть використовуватися для генерації різних репертуарів гена VH із праймерами ПЛР, що кодують петлі H3 різні послідовності й довжини, як це описано в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Репертуари VH також можуть бути отримані з усією розмаїтістю послідовності, сфокусованої в довгій петлі H3 однакової довжини, як це описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Сегменти Vk і VL людини були клоновані й секвеновані (повідомлено в Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)), і можуть використовуватися для одержання репертуарів синтетичним чином отриманої легкої петлі. Репертуари синтетичним чином отриманого V гена, засновані на діапазоні скручування VH і VL, і довжині L3 і H3, будуть кодувати антитіла зі значною структурною розмаїтістю. Після ампліфікації V гена, що кодує ДНК, сегменти V гена зародкового центра можуть бути модифіковані *in vitro* відповідно до способів, описаних в Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Репертуари фрагментів антитіла можуть бути сконструйовані шляхом комбінування репертуарів гена VH і VL разом різними способами. Кожний репертуар може бути створений у різних векторах, і вектори можуть бути рекомбіновані *in vitro*, наприклад, як це описано в Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993), або *in vivo* з використанням комбінаторної інфекції, наприклад, системи loxP, описаної в Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). *In vivo* рекомбінаційний підхід має на увазі використання двохланцюгових фрагментів Fab для подолання ліміту по розмірі бібліотеки, обумовленого ефективністю трансформації *E. coli*. Нативні репертуари VH і VL клонують окремим чином: один в одну фагмиду, інший - в інший фаговий вектор. Потім дві бібліотеки комбінують із використанням фагової інфекції утримуючих фагмиду бактерій, таким чином, кожна клітина містить різну комбінацію, а розмір бібліотеки обмежений тільки числом присутніх клітин (приблизно  $10^{12}$  клонів). Обидва вектори містять *in vivo* рекомбінаційні сигнали, таким чином, гени VH і VL рекомбінують в один реплікон і спільно включають у фагові виріони. Такі великі бібліотеки забезпечують велику кількість різних антитіл з гарним показником афінності ( $K_d^{-1}$  приблизно  $10^{-8}$  M).

З іншого боку, репертуари можуть бути клоновані послідовно в той самий вектор, наприклад, як це описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), або зібрані разом у ході ПЛР і потім клоновані, наприклад, як це описано в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Складання в ході ПЛР також можуть використовуватися для сполуки ДНК VH і VL із ДНК, що кодує спейсер (гнучкий пептид) з утворенням репертуарів одноланцюгових Fv (scFv). У ще

одному способі "складання в ході ПЛР у клітині" використовується для сполуки генів VH і VL у лімфоцитах шляхом ПЛР із наступним клонуванням репертуарів з'єднаних генів, як це описано в Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Антитіла, отримані за допомогою нативних бібліотек (природних або синтетичних) можуть мати помірну афінність ( $K_d^{-1}$  приблизно від  $10^6$  до  $10^7$   $M^{-1}$ ), але афінна зрілість також може бути симітована *in vitro* шляхом конструювання й повторного відбору із вторинних бібліотек, як це описано в Winter et al. (1994). Наприклад, може бути введена мутація у випадковому порядку *in vitro* шляхом використання схильної до помилок полімерази (повідомленої в Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)) у способі Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) або способу Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992). Крім того, афінна зрілість може бути досягнута шляхом випадкової мутації одного або декількох CDR, наприклад, з використанням ПЛР із праймерами, що несуть випадкову послідовність, що охоплює CDR, що цікавить, в вибраних окремих клонах Fv і скринінгом клонів з високою афінністю. В WO 9607754 (опубліковано 14 березня 1996 р.) приводиться опис способу індукції мутагенезу в гіперваріабельній ділянці легкого ланцюга імуноглобуліну для створення бібліотеки генів легкого ланцюга. Інший ефективний спосіб складається в рекомбінації доменів VH або VL, вибраних за допомогою фагового дисплея, з репертуарами варіантів, що зустрічаються в природі, V доменів, отриманих в імунізованих донорів, з наступним скринінгом на предмет високої афінності при кількаразовій перестановки ланцюга, як це описано в Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Такий спосіб дозволяє одержати антитіла й фрагменти антитіл з афінністю приблизно  $10^{-9}$  M або менш.

Скринінг бібліотек може супроводжуватися різними відомими науці способами. Наприклад, для покриття лунок абсорбційних планшетів може використовуватися FcRH5, що експресується на клітинах-хазяях, фіксованих на адсорбційних планшетах або використовуваних у сортуванні клітин, або кон'югованих з біотином для захоплення покритих стрептавідином гранул, або може використовуватися будь-який інший спосіб з використанням бібліотек фагових дисплеїв.

Зразки фагових дисплеїв контактують із іммобілізованим FcRH5 в умовах, що підходять для зв'язування, щонайменше, частині фагових часток з адсорбентом. Як правило, умови, включаючи pH, йонну силу, температуру й т.п., вибирають для імітації фізіологічних умов. Фаги, пов'язані із твердою фазою, промивають і потім елюють кислотою, наприклад, як це описано в Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), або лугом, наприклад, як це описано в Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), або шляхом конкуренції з антигеном FcRH5, наприклад, у ході процедури, подібної до конкурентного зв'язування антигену, описаному в Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Фаги можуть бути 1000-кратно збагачені в ході одного циклу відбору. Крім того, збагачені фаги можуть рости в культурі бактерій і бути піддані подальшій селекції.

Ефективність селекції залежить від багатьох факторів, включаючи кінетику дисоціації під час промивання, а також можливості множинних фрагментів антитіл на одному фазі одночасно взаємодіяти з антигеном. Антитіла зі швидкою кінетикою дисоціації (і слабкої афінності зв'язування) можуть бути утримані при використанні короткого промивання, мультівалентного фагового дисплея й високої щільності покриття антигеном твердої поверхні. Більша щільність не тільки стабілізує фаг за допомогою мультівалентних взаємодій, але також сприяє повторному утворенню структури диссоційованого фага. Селекція антитіл з повільною кінетикою дисоціації (і гарною афінністю зв'язування) може підтримуватися шляхом використання тривалого промивання й моновалентного фагового дисплея, як це описано в Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990) і в WO 92/09690, а також невеликою щільністю покриття антигену, як це описано в Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

Можлива селекція між фаговими антитілами з різною афінністю відносно FcRH5, навіть якщо така афінність відрізняється незначно. Однак цілком імовірно, що випадкова мутація вибраного антитіла (наприклад, як це практикується в декількох способах по дозріванню афінності) може дати початок багатьом мутантам, здебільшого щодо зв'язування з антигеном, і лише декілька з таких мутантів будуть мати більш високу афінність. При обмеженій кількості FcRH5 можна виключити рідкі фаги з високою афінністю. Для збереження всіх мутантів з високою афінністю, фаги можуть бути інкубовані з надлишковою кількістю біотинільованого FcRH5 при концентрації FcRH5 з більш низьким показником молярності, чим установлена константа молярної афінності для FcRH5. Фаги з високою афінністю зв'язування потім можуть бути захоплені парамагнітними гранулами, покритими стрептавідином. Подібне "рівноважне захоплення" дозволяє вибрати антитіла відповідно до їх афінності зв'язування із чутливістю, що дозволяє ізолювати мутантні клони з афінністю, що перевищує низьку афінність фагів, усього лише в 2 рази. Умови, що використовують при промиванні фагів, пов'язаних із твердою

поверхнею, також можуть бути змінені для введення розходжень на основі кінетики дисоціації.

Клони антитіл до FcRH5 можуть вибиратися на основі їхньої активності. У певних варіантах втілення винахід описує антитіла до FcRH5, які зв'язуються з живими клітинами, які в природних умовах експресують FcRH5. В одному варіанті втілення винахід описує антитіла до FcRH5, які блокують зв'язування між лігандом FcRH5 і FcRH5, але не блокують зв'язування між лігандом FcRH5 і іншим білком. Клони Fv, що відповідають таким антитілам до FcRH5, можуть бути вибрані шляхом (1) виділення клонів антитіл до FcRH5 з фагової бібліотеки, як це описано вище, і, у деяких випадках, ампліфікації виділеної популяції фагових клонів шляхом вирощування популяції в підходящій бактеріальній клітині-хазяїні; (2) селекції FcRH5 і іншого білка щодо активності, що блокує й не активності, що блокує, відповідно (при необхідності); (3) поглинання фагових клонів антитіл до FcRH5 іммобілізованим FcRH5; (4) використання надлишкової кількості іншого білка для елюювання будь-яких небажаних клонів, що розпізнають FcRH5-єднальні детермінанти, що перекриваються або загальні для детермінант зв'язування іншого білка; і (5) елюювання клонів, які залишаються адсорбованими після етапу (4). У деяких випадках клони з необхідними властивостями блокування/відсутності блокування можуть бути надалі збагачені шляхом повтору процедур селекції, описаних тут, один або більше разів.

ДНК, що кодує моноклональні антитіла, отримані з гібридами, або клони Fv фагового дисплея по винаходу, може бути легко ізолювана й секвенована з використанням стандартних процедур (наприклад, шляхом використання олігонуклеотидних праймерів, призначених для специфічної ампліфікації ділянок, що кодують, важкого й легкого ланцюгів з матричної ДНК гібридами або фага). Після ізоляції ДНК може бути включена у вектори експресії, які потім трансфікують у клітини-хазяї, такі як клітини *E. Coli*, клітини лінії COS мавпи, клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO) або клітини мієломи, які в протилежному випадку не виробляють білок імуноглобуліну, для організації синтезу моноклональних антитіл у рекомбінантних клітинах-хазяях. Огляд статей про рекомбінантну експресію бактеріями ДНК, що кодує антитіло, представлений в Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) і Pluckthun, Immunol. Revs., 130: 151 (1992).

ДНК, що кодує клони Fv по винаходу, може бути скомбінована з відомими послідовностями ДНК, що кодують константні ділянки важкого ланцюга й/або легкого ланцюга (наприклад, що відповідають послідовності ДНК можуть бути отримані з Kabat et al. (див. вище) з утворенням клонів, що кодують часткові або повні важкі й/або легкі ланцюги). Варто мати на увазі, що для даної мети можуть використовуватися константні ділянки будь-якого ізотипа, включаючи константні ділянки IgG, IgM, IgA, IgD і IgE, і такі константні ділянки можуть бути отримані від будь-якого виду тварини або людини. Клон Fv, отриманий із ДНК варіабельного домену однієї тварини (наприклад, людини) і потім злитий із ДНК константної ділянки тварини іншого виду, для утворення послідовності, що кодує (-ій) "гібридної", важкого ланцюга повної довжини й/або легкого ланцюга, включений у визначення "химерного" і "гібридного" антитіла в контексті даного винаходу. У певних варіантах втілення винаходу клон Fv, отриманий із ДНК варіабельної ділянки людини, злитий із ДНК константної ділянки людини з утворенням послідовності, що кодує (-ій) для важких й/або легких ланцюгів людини часткової або повної довжини.

ДНК, що кодує антитіло до FcRH5 і отриманого з гібридами, також може бути модифікована, наприклад, шляхом заміни послідовності, що кодує, константних доменів важкого й легкого ланцюга людини гомологічними мишачими послідовностями, отриманими із клону гібридами (наприклад, як це описано в способі Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). ДНК, що кодує антитіло або фрагмент, отримані із клону Fv або гібридами, може бути надалі модифікована шляхом ковалентного приєднання до послідовності всієї або, що кодує імуноглобулін, частини послідовності, що кодує, поліпептиду, що не є імуноглобуліном. Таким чином, одержують "химерні" або "гібридні" антитіла, що володіють специфічністю зв'язування антитіл по винаходу, отриманих із клону Fv або гібридами.

В. Антитіло-залежна терапії проліками, опосередкована ферментом (ADEPT)

Антитіла по даному винаході також можуть використовуватися в ADEPT шляхом кон'югації антитіла із ферментом, що активує проліки, що приводить до перетворення проліків (наприклад, хіміотерапевтична речовина пептидів, див. WO81/01145) в активний протираковий препарат. Див. наприклад, WO 88/07378 і патент США No. 4975278.

Ферментний компонент імунокон'югата, що може використовуватися для ADEPT, включає будь-який фермент, що здатний активувати проліки таким чином, щоб перетворювати його в більш активну цитотоксичну форму.

Ферменти, які можуть використовуватися в способі даного винаходу, включають, але не обмежуються, наступні: лужна фосфатаза для конвертації фосфат-утримуючих проліків у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові; арилсульфатаза для конвертації проліків, що

містять сульфати у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові; цитозиндезаміназа для конвертації нетоксичного 5-фторцитозина в протираковий препарат, 5-фторурацил; протеази, такі як протеаза серратії, термолізін, субтилізін, карбоксипептидази й катепсини (такі як катепсини B і L), для конвертації пептид-утримуючих проліків у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові; D-аланілкарбоксипептидази для конвертації проліків, що містять D-амінокислотні замішувачі; вуглеводи, що розщеплюють, ферменти, такі як  $\beta$ -галактозидаза й нейрамінідаза, для конвертації глікозильованих проліків у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові;  $\beta$ -лактамаза для конвертації препаратів, що містять  $\alpha$ -лактами, у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові; і пеніциллінамідази, такі як пеніцилін V амідаса або пеніцилін G амідаса, для конвертації препаратів, що містять феноксіацетильні або фенілацетильні групи, приєднані до амінного азоту, відповідно, у лікарські речовини, не пов'язані з білками крові. З іншого боку, антитіла з ферментативною активністю, також відомі в науці як "абзими", також можуть використовуватися для конвертації проліків в активні лікарські речовини, не пов'язані з білками крові (див., наприклад, Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Кон'югати антитіло-абзим можуть бути отримані відповідно до представленого тут опису для поставки абзима до популяції пухлинних клітин.

Ферменти по даному винаході можуть бути ковалентно пов'язані з антитілами до FcRH5 з використанням відомих науці способів, наприклад, з використанням описаних вище гетеробіфункційних реагентів, що забезпечують перехресне зв'язування. З іншого боку, білки злиття, що включають як мінімум антигензв'язуючу ділянку антитіла по винаходу, зв'язану як мінімум з функціонально активною ділянкою ферменту, можуть бути отримані з використанням способів рекомбінантної ДНК, добре відомих науці (див., наприклад, Neuberger et al., Nature, 312:604-608 (1984)).

#### Г. Антитіла до FcRH5

Крім описаних тут антитіл до FcRH5, також передбачається одержання й використання варіантів антитіл до FcRH5. Варіанти антитіл до FcRH5 можуть бути отримані шляхом введення відповідних змін у нуклеотиди що кодує ДНК і/або шляхом синтезу необхідного антитіла або поліпептиду. Фахівцеві в даній області буде зрозуміло, що зміни в амінокислотах можуть привести до змін у пост-трансляційних процесах антитіла до FcRH5, таких як зміна кількості або положення ділянок глікозилювання або зміна характеристик зв'язування з мембраною.

Описані тут варіанти антитіл до FcRH5 можуть бути отримані, наприклад, з використанням будь-якого способу й вказівок для мутацій консервативних і неконсервативних амінокислот, описаних, наприклад, у патенті США No. 5364934. Варіації можуть полягати в заміні, делеції або вставці одного або декількох кодонів, що кодують антитіло або поліпептид, що приводить до зміни амінокислотної послідовності в порівнянні з нативною послідовністю антитіла або поліпептиду. У деяких випадках варіація представлена заміщенням щонайменше однієї амінокислоти іншою амінокислотою в одному або декількох доменах антитіла до FcRH5. Вказівки з визначення амінокислотного залишку, що може бути вставлений, заміщений або вилучений без негативного впливу на необхідну активність, можуть бути отримані шляхом порівняння послідовності антитіла до FcRH5 з послідовністю відомих гомологічних білкових молекул і відомості до мінімуму кількості змін в амінокислотній послідовності в ділянках з високим ступенем гомологічності. Заміни амінокислот можуть бути результатом заміщення однієї амінокислоти іншою амінокислотою з подібними структурними й/або хімічними властивостями, наприклад, заміщення лейцину серином, тобто заміщення консервативною амінокислотою. Вставки або делеції можуть виконуватися в межах від приблизно 1 до 5 амінокислот. Припустима зміна може бути визначена по систематичному введенню вставок, делеції або заміні амінокислот у послідовності й тестуванню одержуваних варіантів на предмет активності, що проявляється зрілою нативною послідовністю або послідовністю з повною довжиною.

Винахід описує й фрагменти антитіла до FcRH5. Такі фрагменти можуть бути усічені на N-кінці або C-кінці, або можуть не включати внутрішні залишки, наприклад, при порівнянні з нативним антитілом повної довжини або білком. Певні фрагменти не містять залишки амінокислот, що не грають важливу роль у необхідній біологічній активності антитіла до FcRH5.

Фрагменти антитіла до FcRH5 можуть бути отримані з використанням кожного із цілого ряду наявних способів. Необхідні пептидні фрагменти можуть бути синтезовані хімічним шляхом. Альтернативний спосіб включає одержання фрагментів поліпептиду або антитіла в ході ферментативного розщеплення, наприклад, шляхом обробки білка ферментом, що, як відомо, розщеплює білки в ділянках, певних окремими амінокислотними залишками, або шляхом розщеплення ДНК підходящими рестриктазами й виділення необхідного фрагмента. Ще один підходящий спосіб включає ізоляцію й ампліфікацію фрагмента ДНК, що кодує необхідне

антитіло або фрагмент поліпептиду, у ході полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Олігонуклеотиди, що визначають необхідні кінці фрагмента ДНК, використовують на праймерах 5' і 3' у ході ПЛР. Переважним чином, фрагменти антитіла до FcRH5 володіють, щонайменше, одною біологічною й/або імунологічною активністю нативного й описаного тут антитіла до FcRH5.

В окремих варіантах втілення винаходу заміни консервативних амінокислот представлені в Таблиці 8 під заголовком "Кращі заміни". Якщо такі заміни приводять до зміни біологічної активності, чим більше істотні зміни, зазначені в Таблиці 8 як "Типові заміни", або відповідно до описаного нижче класами амінокислот, такі заміни вводяться, а продукти піддаються скринінгу.

Таблиця 8

Оригінальний залишок	Типові заміни	Кращі заміни
Ала (A)	Вал; Лей; Іле	Вал
Арг (R)	Ліз; Глн; Асн	Ліз
Асн (N)	Глн; Гіс; Ліз; Арг	Глн
Асп (D)	Глу	Глу
Цис (C)	Сер	Сер
Глн (Q)	Асн	Асн
Глу (E)	Асп	Асп
Глі (G)	Про; Ала	Ала
Гіс (H)	Асн; Глн; Лиз; Арг	Арг
Іле (I)	Лей; Вал; Мет; Ала; Фен; норлейцин	Лей
Лей (L)	норлейцин; Іле; Вал; Мет; Ала; Фен	Іле
Ліз (K)	Арг; Глн; Асн	Арг
Мет (M)	Лей; Фен; Іле	Лей
Фен (F)	Лей; Вал; Іле; Ала; Тір	Лей
Про (P)	Ала	Ала
Сер (S)	Тре	Тре
Тре (T)	Сер	Сер
Трп (W)	Тір; Фен	Тір
Тір (Y)	Трп; Фен; Тре; Сер	Фен
Вал (V)	Іле; Лей; Мет; Фен Ала; норлейцин	Лей

Істотні зміни у функції або імунологічній ефективності антитіла до FcRH5 супроводжуються



виборчими замінами, які істотно різняться за своїм впливом на збереження (а) структури поліпептидного кістяка в області заміщення, наприклад, у вигляді складчастої або спіральної конформації; (б) заряду або гідрофобності молекули в зазначеному місці; або (в) загального бічного ланцюга. Залишки, що зустрічаються в природі, діляться на наступні групи на основі загальних властивостей бічного ланцюга:

- (1) гідрофобні: норлейцин, МЕТ, Ала, Вал, Лей, Іле;
- (2) нейтральні гідрофільні: Цис, Сер, Тре;
- (3) кислі: Асп, Глу;
- (4) основні: Асн, Глн, Гіс, Ліз, Арг;
- (5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: Глі, Про; і
- (6) ароматичні: Трп, Тір, Фен.

Заміни неконсервативних амінокислот будуть включати заміну члена одного з таких класів членом з іншого класу. Такі заміщені залишки також можуть бути введені в місця знаходження консервативних амінокислот або, переважно, у місця знаходження, що залишилися, неконсервативних амінокислот.

Варіації можуть бути отримані з використанням відомих науці способів, таких як сайт-специфічний (або опосередкований олігонуклеотидами) мутагенез, скануючий аланіном мутагенез і ПЦР-мутагенез. Сайт-специфічний мутагенез [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], касетний мутагенез [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], рестрикційний виборчий мутагенез [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] або інші відомі способи можуть використовуватися на клонованій ДНК для одержання варіанта ДНК антитіла до FcRH5.

Скануючий амінокислотний аналіз також може проводитися для виявлення однієї або декількох амінокислот безперервної послідовності. Сканування переважно здійснюється по відносно невеликих, нейтральних амінокислотах. Такі амінокислоти включають аланін, гліцин, серин і цистеїн. Аланін звичайно є переважною амінокислотою, що піддається скануванню, серед даної групи, оскільки він елімінує бічний ланцюг після бета-атома вуглецю й з меншою ймовірністю впливає на конформацію основного ланцюга варіанта [Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. Крім того, аланін воліється тому, що є найбільш зустрічаємою амінокислотою. Крім того, він часто зустрічається в занурених і відкритих положеннях [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Якщо заміщення аланіна не привело до одержання адекватної кількості варіанта, може використовуватися ізомер амінокислоти.

Будь-який залишок цистеїна, не задіяний у підтримці належної конформації антитіла до FcRH5, також може бути заміщений, звичайно серином, для поліпшення стійкості до окислювання молекули й запобігання аберрантного утворення перехресних зв'язків. З іншого боку, в антитілі до FcRH5 можуть бути додані цистеїнові зв'язки для поліпшення стійкості антитіла (зокрема, якщо антитіло представлене фрагментом антитіла, таким як фрагмент Fv).

Зокрема, переважний тип варіанта із заміщенням має на увазі заміщення одного або більше залишків гіперваріабельної ділянки вихідного антитіла (наприклад, гуманізованого або людського антитіла). Як правило, одержуваний варіант (-ти), вибраний для подальшої розробки, буде мати поліпшені біологічні властивості щодо вихідного антитіла, з якого він був отриманий. Зручний спосіб одержання таких заміщених варіантів включає застосування способу афінної зрілості з використанням фагових дисплеїв. Кількома словами це можна описати в такий спосіб: кілька сайтів гіперваріабельної ділянки (наприклад, 6-7 сайтів) піддаються мутації для одержання всіх можливих замін амінокислот у кожному сайті. Варіанти антитіла, отримані таким чином, відображаються моновалентно зі структур нитковидних фагів як злиття продукту гена III M13, з'єднаного з кожною часткою. Потім варіанти фагових дисплеїв піддаються скринінгу на предмет своєї біологічної активності (наприклад, афінності зв'язування), як це описано в тексті даної заявки. З метою ідентифікації кандидатних сайтів гіперваріабельної ділянки для модифікації, може бути проведений скануючий аланіном мутагенез для ідентифікації залишків гіперваріабельної ділянки, які істотно сприяють зв'язуванню з антигеном. З іншої сторони або крім того, переважним може служити аналіз кристалічної структури комплексу антиген-антитіло для ідентифікації точок контакту між антитілом і поліпептидом FcRH5. Такі контактні залишки й сусідні залишки є кандидатами на заміщення відповідно до способів, що тут використовуються. Як тільки такі варіанти будуть отримані, панель варіантів піддається скринінгу відповідно до представленого тут опису, і антитіла з переважаючими властивостями за результатами одного або декількох релевантних аналізів можуть бути відібрані для подальшої розробки.

Молекули нуклеїнової кислоти, що кодують варіанти амінокислотної послідовності антитіла до FcRH5, одержують із використанням цілого ряду відомих у науці способів. Такі способи

включають, але не обмежуються, наступні: виділення із природного джерела (у випадку варіантних послідовностей амінокислот, що зустрічаються в природі) або одержання шляхом сайт-специфічного (або опосередкованого олігонуклеотидами) мутагенезу, ПЦР-мутагенезу й касетного мутагенезу отриманих раніше варіантної або неваріантної версії антитіла до FcRH5.

#### 5 Д. Модифікації антитіл до FcRH5

Ковалентні модифікації антитіла до FcRH5 включені в область застосування даного винаходу. Один з типів ковалентної модифікації включає реакцію певних амінокислотних залишків антитіла до FcRH5 з органічною речовиною, що використана для одержання похідних сполук і здатним реагувати з вибраними бічними ланцюгами або залишками на N- або C-кінці антитіла до FcRH5. Дериватизація з використанням біфункційних агентів може використовуватися, наприклад, для утворення перехресних зв'язків антитіла до FcRH5 з нерозчинною у воді опорною матрицею або поверхнею для використання в способі очищення антитіла до FcRH5 і навпаки. Що використовують звичайно речовини для утворення перехресних зв'язків включають, наприклад, 1, 1-біс(діазаацетил)-2-фенілетан, глутаральдегід, N-гідроксисукцинімідні ефіри, наприклад, ефіри з 4-азидосаліциловою кислотою, гомобіфункційні імідоефіри, включаючи ефіри дисукцинімідила, такі як 3,3'-дитіобіс(сукцинімідилпропіонат), біфункційні малеїміди, такі як біс-N-малеїмідо-1,8-октан, і сполуки, такі як метил-3-[(p-азидофеніл)дитіо]пропіоїмідат.

Інші модифікації включають дезамідування залишків глутамініл і аспарагініл у відповідні залишки глутаміл і аспартил, гідроксилювання проліна й лізіна, фосфорилювання гідроксильних груп залишків серила або треоніла, метилювання  $\alpha$ -аміногруп бічних ланцюгів лізіна, аргініну й гістидина (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), ацетилювання N-кінцевого аміну й амідкування кожної C-кінцевої карбоксильної групи.

Інший тип ковалентної модифікації антитіла до FcRH5, передбачений даним винаходом, складається зі зміни нативної схеми глікозилювання антитіла або поліпептиду. "Зміна нативної схеми глікозилювання антитіла" у контексті даного винаходу має на увазі видалення однієї або декількох молекул вуглеводів, що є присутні у нативній послідовності антитіла до FcRH5 (шляхом видалення присутньої ділянки глікозилювання або видалення глікозилювання в ході хімічних і/або ферментативних реакцій), і/або додавання однієї або декількох ділянок глікозилювання, які відсутні в нативній послідовності антитіла до FcRH5. Крім того, фраза має на увазі якісні зміни в глікозилюванні нативних білків, включаючи зміну в природі й співвідношеннях різних присутніх молекул вуглеводів.

Глікозилювання антитіл і інших поліпептидів звичайно представлене N- глікозилюванням або O-глікозилюванням. N-глікозилювання відноситься до приєднання молекули вуглеводу до бічного ланцюга по залишку аспарагіна. Трипептидні послідовності аспарагін-X-серін і аспарагін-X-треонін, де X представлений амінокислотою, за винятком проліна, є послідовностями розпізнавання для ферментативного приєднання молекули вуглеводу до аспарагіну бічного ланцюга. Таким чином, присутність однієї з таких трьох трипептидних послідовностей створює потенційну ділянку глікозилювання. O-глікозилювання відноситься до приєднання одного із сахарів N-ацетилгалактозаміна, галактози або ксилози до гідроксиамінокислоти, найбільше часто представленої серином або треоніном, однак можуть використовуватися 5-гідроксіпролін або 5-гідроксилізін.

Додавання ділянок глікозилювання до антитіла до FcRH5 зручним чином супроводжується зміною амінокислотної послідовності таким чином, що вона включає одну або декілька представлених вище трипептидних послідовностей (для ділянок N-глікозилювання). Зміна також може бути здійснена шляхом додавання або заміщення одного або декількох залишків серина або треоніна в послідовності оригінального антитіла до FcRH5 (для ділянок O-глікозилювання). Амінокислотна послідовність антитіла до FcRH5 у деяких випадках може бути змінена за допомогою змін на рівні ДНК, зокрема, введенням мутацій у ДНК, що кодує антитіло до FcRH5, у визначені раніше основи з утворенням кодонів, що трансклюють необхідні амінокислоти.

Інший спосіб підвищення кількості молекул вуглеводів в антитілі до FcRH5 являє собою хімічне або ферментативне приєднання глікозидів до поліпептиду. Ці способи описані в науці, наприклад, в WO 87/05330, опублікованому 11 вересня 1987 р., а також в Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

Видалення молекул вуглеводів, що є присутні в антитілі до FcRH5, може супроводжуватися хімічною або ферментативною реакцією або мутаційною заміною кодонів, що кодують амінокислотні залишки, що служать як мішені для глікозилювання. Способи хімічного деглікозилювання відомі науці й описані, наприклад, Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) і Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Ферментативне розщеплення молекул

вуглеводів, приєднаних до поліпептидів, може досягатися шляхом використання різних ендо- і екzogлікозидаз, як це описано Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Інший тип ковалентної модифікації антитіла до FcRH5 полягає у зв'язуванні антитіла з одним із цілого ряду небілкових полімерів, наприклад, поліетіленгліколем (ПЕГ), поліпропіленгліколем або поліоксіалкіленами, відповідно до опису, представленою в патентах США No. 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 або 4179337. Антитіло також може бути укладене в мікрокапсули, наприклад, шляхом коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, за допомогою гідроксиметилцелюлози, мікрокапсули з желатину й мікрокапсули з поліметилметакрилату, відповідно, представлених у вигляді колоїдних систем доставки препарату (наприклад, у ліпосомах, білкових мікросферах, мікроемulsіях, нано-частках і нано-капсулах) або у вигляді макроемulsіс. Такі способи описані в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Антитіло до FcRH5 по даному винаходу також може бути модифіковане шляхом утворення химерних молекул, що складаються з антитіла до FcRH5, злитого з іншим, гетерологічним поліпептидом або послідовністю амінокислот.

В одному варіанті втілення винаходу така химерна молекула складається з антитіла до FcRH5, злитого з поліпептидом-тегом, що забезпечує антигенну детермінанту, з якої виборчим чином зв'язується антитіло до тегу. Така антигенна детермінанта-тег звичайно розташовується на аміно- або карбоксильному кінці антитіла до FcRH5. Присутність подібних форм антигенна детермінанта-тег антитіла до FcRH5 може бути визначена з використанням антитіла до поліпептиду-тегу. Крім того, наявність антигенної детермінанти-тега дозволяє робити легке очищення антитіла до FcRH5 з використанням афінних способів очищення, антитіла до тегу або афінної матриці іншого типу, що зв'язується з антигенною детермінантою-тегом. У науці відомі різні поліпептиди-теги і їхні відповідні антитіла. Приклади включають теги поліігістидина (поліігіс) або поліігістидин-гліцину (поліігіс-глі); поліпептидний тег flu HA і антитіло до нього 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; тег с-мус і антитіла 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 і 9E10 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; а також тег глікопротеїна D (gD) вірусу простого герпеса й антитіла до нього [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Інші поліпептиди-теги включають Flag-пептид [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; антигенну детермінанту пептиду KT3 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; антигенну детермінанту пептиду  $\alpha$ -тубуліна [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; пептидний тег гена T7 білка 10 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

В альтернативному варіанті втілення винаходу химерна молекула може складатися з антитіла до FcRH5, злитого з імуноглобуліном або окремою ділянкою імуноглобуліну. Для двовалентної форми химерної молекули (також, що позначена, як "імунoadгезин"), таке злиття може бути виконане з ділянкою Fc молекули IgG. Злиття Ig переважним чином включає заміну розчинної форми (трансмембранний домен вилучений або інактивованій) антитіла до FcRH5 у місці щонайменше однієї варіабельної ділянки в молекулі Ig. В окремому кращому варіанті, втілення винаходу імуноглобулін злиття складається з каркасної ділянки, CH<sub>2</sub> і CH<sub>3</sub>, або каркасної ділянки, ділянок CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub> і CH<sub>3</sub> молекули IgG1. Інформація з одержання імуноглобулінів для злиття представлена також у патенті США 5428130 від 27 червня 1995 р.

#### Е. Одержання антитіл до FcRH5

Представлений нижче опис відноситься переважним чином до одержання антитіл до FcRH5 шляхом культивування клітин, трансформованих або трансфікованих вектором, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло до FcRH5. Передбачається, що для одержання антитіл до FcRH5 можуть використовуватися альтернативні способи, відомі в науці. Наприклад, амінокислотна послідовність, що відповідає або її ділянка можуть бути отримані шляхом безпосереднього синтезу білка з використанням твердофазних способів (див., наприклад, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154). Синтез білка in vitro може здійснюватися з використанням автоматизованих способів або вручну. Автоматизований синтез може супроводжуватися, наприклад, використанням пептидного синтезатора Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) з дотриманням інструкції виробника. Різні ділянки антитіла до FcRH5 можуть бути синтезовані хімічно по-окреміості або в комбінації з використанням хімічних або ферментативних способів одержання необхідного антитіла до FcRH5.

#### 1. Виділення ДНК, що кодує антитіло до FcRH5

ДНК, що кодує антитіла до FcRH5, може бути отримана з бібліотеки кДНК, отриманої із тканини, що, як вважається, містить мРНК антитіла до FcRH5 і експресує такі антитіла в обумовленій концентрації. Відповідно до цього, ДНК людських антитіл до FcRH5 може бути

зручним чином отримана з бібліотеки кДНК, отриманої із тканини людини. Ген, що кодує антитіло до FcRH5, може бути також отриманий з геномної бібліотеки або з використанням відомих процедур синтезу (наприклад, автоматичного синтезу нуклеїнової кислоти).

Бібліотеки можуть бути піддані скринінгу із зондами (такими як олігонуклеотиди з, щонайменше, приблизно 20-80 основами), розробленими для ідентифікації гена, що цікавить, або білка, що кодується ДНК. Скринінг кДНК або геномної бібліотеки з вибраним зондом може проводитися з використанням стандартних процедур, наприклад, таких, як це описано в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Альтернативним способом для виділення гена, що кодує антитіло до FcRH5, є використання ПЛР [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Способи скринінгу бібліотеки кДНК добре відомі науці. Послідовності олігонуклеотидів, вибрані як зонди, повинні мати достатню довжину й бути досить однозначними для відомості до мінімуму хибнопозитивних результатів. Олігонуклеотид підлягає переважно міченню, щоб його можна було визначити при гібридизації в ДНК у підданій скринінгу бібліотеці. Способи мічення добре відомі в науці й включають використання таких радіоіоток, як мічений  $^{32}\text{P}$  АТФ, біотинілювання або мічення ферменту. Умови гібридизації, включаючи помірковано суворі й дуже суворі умови, описані в Sambrook et al., (див. вище).

Послідовності, ідентифіковані в ході таких способів скринінгу бібліотек, можуть бути зіставлені й вирівняні щодо інших відомих послідовностей, розміщених і доступних у таких базах даних для суспільного доступу, як GenBank, або інших приватних базах даних послідовностей. Ідентичність послідовностей (на рівні амінокислот або нуклеотидів) у межах певних ділянок молекули або уздовж всієї довжини послідовності може бути визначена з використанням відомих науці способів і способів, описаних у даній заявці.

Нуклеїнова кислота, що містить послідовність, що кодує білок, може бути отримана шляхом скринінгу вибраної кДНК або геномних бібліотек з використанням прогнозованої амінокислотної послідовності, описаної тут уперше, і, при необхідності, з використанням стандартних процедур розширення праймера, як це описано в Sambrook et al. (див. вище), для визначення попередників і проміжних продуктів процесінгу мРНК, що могла бути також обернено транскрибована в кДНК.

## 2. Селекція й трансформація клітин-хазяїв

Клітини-хазяї трансфікують або трансформують описаними тут векторами експресії або клонування для одержання антитіл до FcRH5, і культивують у підходящому живильному середовищі модифікованому відповідним чином для індукування промоторів, селекції трансформантів або ампліфікації генів, що кодують необхідні послідовності. Умови середовища, такі як саме середовище, її температура, рН і т.п. можуть бути вибрані фахівцем у даній області без невиправданих експериментів. У цілому, принципи, протоколи й практичні способи для максимального підвищення продуктивності клітинних культур описані в *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) і Sambrook et al. (див. вище).

Способи трансфікування еукаріотичних клітин і трансформації прокаріотичних клітин, які мають на увазі введення ДНК у хазяїна для можливості реплікації такий ДНК у вигляді екстрахромосомального або хромосомального інтеграта, відомі фахівцям у даній області й включають, наприклад,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaPO}_4$ , ліпосомально-опосередкована, поліетіленгліколь/ДМСО й електропорація. Залежно від використовуваної клітини-хазяїна, трансформація виконується з використанням стандартних способів, застосованих до такої клітини. Вплив кальцію хлоридом припускає використання кальцію хлориду, як це описано в Sambrook et al. (див. вище); для прокаріотів звичайно використовується електропорація. Інфекція *Agrobacterium tumefaciens* використовується для трансформації певних клітин рослин, як це описано в Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) і WO 89/05859, опублікованого 29 червня 1989 р. Для клітин ссавців без такої клітинної стінки може застосовуватися спосіб преципітації кальцію фосфату по Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Загальні аспекти трансфекції клітин-хазяїв ссавців були описані в патенті США No. 4399216. Трансформації в клітини дріжджів звичайно здійснюються у відповідності зі способом Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130:946 (1977) і Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Однак можуть використовуватися й інші способи впровадження ДНК у клітини, наприклад, мікроін'єкції в ядро, електропорація, злиття протоплазми бактерій з інтактними клітинами, або використання полікатіонів, наприклад, полібрена, поліміотина. Інформація про різні способи трансформації клітин ссавців представлена в Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) і Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988).

Підходящі клітини-хазяї для клонування або експресії ДНК у векторах включають прокаріотів, дріжджі або клітини вищих еукаріотів.

## а. Прокаріотичні клітини-хазяї

[0004] Підходящі прокаріоти включають, але не обмежуються, архебактерії й еубактерії, такі як грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, *Enterobacteriaceae*, такі як *E. coli*. Представлено різні штами *E. coli*, такі як штам *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31 446); штам *E. coli* X1776 (ATCC 31 537); штам *E. coli* W3110 (ATCC 27 325) і K5 772 (ATCC 53 635). Інші підходящі прокаріотичні клітини-хазяї включають *Enterobacteriaceae*, такі як *Escherichia*, наприклад, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, наприклад, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, наприклад, *Serratia marcescens*, і *Shigella*, а також *Bacilli* такі як *B. subtilis* і *B. licheniformis* (наприклад, *B. licheniformis* 41P, описаний в DD 266 710, опублікованому 12 квітня 1989 р.), *Pseudomonas*, такі як *P. aeruginosa*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, *Paracoccus* і *Streptomyces*. Такі приклади є ілюстративними, не обмежувачими. Штам W3110 є одним з переважних хазяїв або вихідним хазяїном, оскільки він є штамом-хазяїном, що використовують найбільше часто у ферментації продукції рекомбінації ДНК. Як правило, клітина-хазяїн секретує мінімальні кількості протеолітичних ферментів. Наприклад, штам W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC No. 27 325) може бути модифікований для прояву генетичної мутації в генах, що кодують білки ендегенним чином у хазяїні, наприклад, *E. coli* W3110 штам 1A2, що має повний генотип *tonA*; *E. coli* W3110 штам 9E4, що має повний генотип *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 штам 27C7 (ATCC 55 244), що має повний генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan<sup>r</sup>*; *E. coli* W3110 штам 37D6, що має повний генотип *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>*; *E. coli* W3110 штам 40B4, що є штамом 37D6 з нестійкою до канаміцину мутацією-делецією *degP*; *E. coli* W3110 штам 33D3 з генотипом W3110  $\Delta$ *hfuA* ( $\Delta$ *tonA*) *ptr3 lac lq lacL8  $\Delta$ ompT $\Delta$ (nmpc-ferE) degP41 kan<sup>R</sup>* (патент США No. 5639635) і *E. coli* штам з мутантною периплазматичною протеазой, описаною в патенті США No. 4946783 від 7 серпня 1990 р. Інші штами і їхні похідні, такі як *E. coli* 294 (ATCC 31 446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31 537) і *E. coli* RV308 (ATCC 31 608), також можуть використовуватися. Такі приклади є ілюстративними, а не обмежувачими. Способи одержання похідних кожного із зазначених вище видів бактерій з певним генотипом відомі науці й описані, наприклад, в Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990). У цілому необхідно вибрати відповідний вид бактерій з обліком реплікуємості реплікона в клітинах бактерій. Наприклад, види *E. coli*, *Serratia* або *Salmonella* можуть використовуватися як хазяїн при використанні широко відомих плазмід pBR322, pBR325, pACYC177 або pKN410 для поставки реплікона. Як правило, клітина-хазяїн повинна секретувати мінімальні кількості протеолітичних ферментів, а в культуру клітин можуть бути за бажанням введені додаткові інгібітори протеази. З іншого боку, підходять способи клонування *in vitro*, наприклад, ПЛР або інші полімеразні реакції нуклеїнових кислот.

У бактеріях можуть бути отримані антитіла повної довжини, фрагменти антитіл і білки злиття антитіл, зокрема, при відсутності необхідності в гликозилуванні й ефекторній функції Fc, наприклад, коли терапевтичне антитіло кон'юговано із цитотоксичним агентом (наприклад, токсином), і сам по собі імунокон'югат виявляється ефективним у деструкції пухлинної клітини. Антитіла повної довжини мають більше тривалий період напівжиття в кровотоці. Вироблення в *E. coli* є більше швидким і економічним способом. Інформація про експресію фрагментів антитіла й поліпептидів у бактеріях представлена, наприклад, у патентах США No. 5648237 (Carter et. al.), 5789199 (Joly et al.), і 5840523 (Simmons et al.), які описують область ініціації трансляції (OIT) і сигнальні послідовності для оптимізації експресії й секреції (патенти включені в даний документ за допомогою посилання). Після експресії, антитіло ізолюють із клітинної суспензії *E. coli* у розчинну фракцію, воно може бути очищене з використанням, наприклад, стовпчика з А або G білком, залежно від ізотипа. Остаточне очищення може проводитися подібно процесу очищення антитіла, що експресує, наприклад, у клітинах CHO.

## б. Еукаріотичні клітини-хазяї

Крім прокаріот, такі еукаріотичні мікроорганізми, як гіфоміцети або дріжджі, підходять для клонування або експресії векторів, що кодують антитіло до FcRH5. *Saccharomyces cerevisiae* є найбільше часто використовуваним нижчим еукаріотичним мікроорганізмом. Інші мікроорганізми включають *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139 383, опублікований 2 травня 1985 р.); клітини-хазяї *Kluyveromyces hosts* (патент США No. 4943529; Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)), такі як, наприклад, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12 424), *K. bulgaricus* (ATCC 16 045), *K. wickerhamii* (ATCC 24 178), *K. waltii* (ATCC 56 500), *K. drosophilum* (ATCC 36 906; Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* і *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); Schwanniomycetes, такі як Schwanniomycetes occidentalis (EP 394 538, опублікований 31 жовтня 1990 р.); і гіфоміцети, такі як, наприклад, Neurospora, Penicillium, Tolypocladium (WO 91/00357, опублікований 10 січня 1991 р.), і Aspergillus, такі як A. nidulans (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) і A. niger (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Метилотрофні дріжджі також підходять для використання й включають, але не обмежуються, дріжджі, здатні рости на метанолі і що є представниками наступних родів: Hansenula, Candida, Klöeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis і Rhodotorula. Список специфічних видів, типових для даного класу дріжджів, представлений в С. Anthony, The Biochemistry of Methylophs, 269 (1982).

Підходящі клітини-хазяї для експресії глікозильованого антитіла до FcRH5, одержують із багатоклітинних організмів. Приклади клітин безхребетних включають клітини комах, таких як Drosophila S2 і Spodoptera Sf9, а також клітини рослин, таких як культура клітин бавовни, кукурудзи, картоплі, соєвих бобів, петунії, томатів і тютюну. Були ідентифіковані численні штами бакуловіруса, його варіанти й відповідні підходящі клітини-хазяї комах, такі як Spodoptera frugiperda (гусениця), Aedes aegypti (комар), Aedes albopictus (комар), Drosophila melanogaster (плодова мушка) і Bombyx mori. Загальнодоступний цілий ряд вірусних штамів для трансфекції, наприклад, варіант L-1 Autographa californica NPV і штам Bm-5 Bombyx mori NPV, і такі віруси можуть використовуватися в даному винаході, зокрема, для трансфекції клітин Spodoptera frugiperda.

Однак інтерес до клітин хребетних зростає, і використання клітин хребетних у культурі (культурі тканини) стає звичайною процедурою. Приклади підходящих ліній клітин-хазяїв ссавців представлена наступними: лінія CV1 нирки мавпи, трансформована SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); лінія ембріональної нирки людини (293 клітин субклоновані для росту в суспензійній культурі, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); нирки дитинчати хом'яка (BHK, ATCC CCL 10); клітини яєчників китайського хом'ячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клітини Сертолі миші (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клітини нирки мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); клітини цервикальної карциноми людини (HELA, ATCC CCL 2); клітини нирки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки пацюків Буффало (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клітини легкого людини (W138, ATCC CCL 75); клітини печінки людини (Hep G2, HB 8065); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клітини MRC 5; клітини FS4; і клітини лінії гепатоми людини (Hep G2).

Клітини-хазяї трансформують описаними тут векторами експресії або клонування для одержання антитіл до FcRH5, і культивують у підходящому живильному середовищі модифікованому відповідним чином для індукування промоторів, селекції трансформантів або ампліфікації генів, що кодують необхідні послідовності.

### 3. Селекція й використання вектора, що реплікує

Для рекомбінантного одержання антитіла по винаходу, нуклеїнову кислоту (наприклад, кДНК або геномну ДНК), що кодує антитіло, виділяють і вставляють у вектор що реплікують для подальшого клонування (ампліфікації ДНК) або експресії. ДНК, що кодує антитіла, може бути легко виділена й секвенована з використанням стандартних процедур (наприклад, шляхом використання олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі й легкі ланцюга антитіл). Представлено цілий ряд векторів. Вибір вектора залежить, зокрема, від використовуваної клітини-хазяїна. Як правило, кращим є використання клітин прокаріотів або еукаріотів (звичайно ссавців).

Вектор може бути представлений, наприклад, у формі плазміди, косміди, вірусної частки або фага. Підходяща послідовність нуклеїнових кислот може бути вставлена у вектор у ході різних процедур. У цілому, ДНК вбудовують у відповідний сайт (-ти) рестриктази з використанням відомих науці способів. Компоненти вектора звичайно включають, але не обмежуються, одну або кілька сигнальних послідовностей, точку початку реплікації, один або більше маркерних генів, енхансер, промотор і послідовність припинення транскрипції. Конструювання підходящих векторів, що складаються з одного або декількох таких компонентів передбачає використання стандартних процедур лігування, які відомі фахівцям в даній області.

FcRH5 може бути отриманий рекомбінантним чином не тільки в такій формі, але також і у вигляді білка злиття з гетерологічним поліпептидом, що може бути представлений сигнальною послідовністю або іншим поліпептидом, що має специфічну ділянку рестрикції на N-кінці зрілого білка або поліпептиду. У цілому, сигнальна послідовність може бути компонентом вектора або частиною ДНК, що кодує антитіло до FcRH5, що вбудовують у вектор. Сигнальна послідовність

може бути представлена сигнальною послідовністю прокаріотів, що вибрано, наприклад, із групи, що включає лужну фосфатазу, пеніциліназу, *lrr* або лідерну послідовність термостабільного ентеротоксина II. Для секреції в дріжджах сигнальна послідовність може бути представлена, наприклад, лідерною послідовністю інвертази дріжджів, лідерною послідовністю фактора альфа (включаючи лідерні послідовності  $\alpha$ -фактора *Saccharomyces* і *Kluuyveromyces*, остання з яких описана в патенті США No. 5010182), або лідерною послідовністю лужної фосфатази, лідерною послідовністю глюкоамілази *C. albicans* (EP 362179, опублікований 4 квітня 1990 р.), або сигнальною послідовністю, описаної в WO 90/13646, опублікованому 15 листопада 1990 р. При експресії в клітинах ссавців, сигнальні послідовності ссавців можуть використовуватися для безпосередньої секреції білка, наприклад, сигнальні послідовності із секретуючих поліпептидів того самого або родинних видів; також можуть використовуватися секреторні лідерні послідовності вірусів.

а. Прокаріотичні клітини-хазяї

Полінуклеотидні послідовності, що кодують поліпептидні компоненти антитіла по винаходу, можуть бути отримані з використанням стандартних способів рекомбінації. Необхідні полінуклеотидні послідовності можуть бути виділені й секвеновані із клітин, що виробляють антитіло, таких як клітини гібридоми. З іншого боку, полінуклеотиди можуть бути синтезовані з використанням синтезатора нуклеотидів або ПЛР. Після одержання, послідовності, що кодують поліпептиди, вбудовують у вектор рекомбінації, здатний до реплікації й експресії гетерологічних полінуклеотидів у клітинах прокаріотів. Для використання з метою даного винаходу представлений цілий ряд векторів, відомих науці. Вибір підходящого вектора буде залежати переважно від розміру нуклеїнових кислот, які необхідно вмонтувати у вектор, і окремої клітини-хазяїна, що буде трансформована вектором. Кожний вектор складається з різних компонентів, залежно від його функції (ампліфікація або експресія гетерологічного полінуклеотида, або обидві функції) і сумісності з окремою клітиною-хазяїном, у якій він буде розташовуватися.

У цілому, у таких клітинах-хазяях використовують плазмідні вектори, що складаються з реплікона й контрольних послідовностей, і які отримані від видів, сумісних із клітиною-хазяїном. Вектори експресії й клонування складаються з послідовності нуклеїнової кислоти, що дозволяє клітині реплікуватися в однію або декількома вибраними клітинами-хазяїв, а також маркерної послідовності, здатної забезпечити фенотипічну селекцію в трансформованих клітинах. Такі послідовності присутні в цілому ряді бактерій, дріжджів і вірусів. Точка початку реплікації, отримана із плазмиди pBR322 і утримуючий гени, що кодують стійкість до ампіциліну (Amp) і тетрацикліну (Tet), що забезпечує легку ідентифікацію трансформованих клітин, підходить для більшості грамнегативних бактерій; точка початку реплікації, отримана із плазмиди 2  $\mu$ , підходить для дріжджів, а точка початку реплікації, отримана з різних вірусів (SV40, вірус полііоми, аденовірус, вірус бичачої папіломи або вірус папіломи великої рогатої худоби), підходить для векторів клонування в клітинах ссавців. pBR322, її похідні або інші плазмиди мікроорганізмів або бактеріофагів також можуть складатися або бути модифікованими для включення промоторів, які можуть використовуватися мікроорганізмом для експресії ендогенних білків. Приклади похідних pBR322, використовуваних для експресії в окремих антитілах, описані докладно в Carter et al., патенті США No. 5648237.

Крім того, фагові вектори, що містять реплікон і контрольну послідовність, які сумісні з мікроорганізмом-хазяїном, можуть використовуватися у якості трансформуючих векторів в таких хазяях. Наприклад, такий бактеріофаг, як  $\lambda$ GEM.TM.-11, може використовуватися в одержанні рекомбінантного вектора, що може застосовуватися для трансформації сприйнятливих клітин-хазяїв, таких як *E. coli* LE392.

Вектор експресії по винаходу може складатися із двох або більше пар промотор-цистрон, кожна з яких кодує компоненти поліпептиду. Промотор являє собою нетрансльовану регуляторну послідовність, розташовану вище (5') стосовно цистрону й що модулює експресію. Прокаріотичні промотори звичайно ділять на два класи: що індують й конститутивні. Промотор, що індує, являє собою промотор, що ініціює підвищені рівні транскрипції цистрона під контролем промотору у відповідь на зміни умов культури, наприклад, присутність або відсутність живильних речовин або зміна температури.

Добре відомо велику кількість промоторів, розпізнаваних цілим рядом потенційних клітин-хазяїв. Вибраний промотор може функціонально зв'язуватися із цистроном ДНК, що кодує легкий або важкий ланцюг, шляхом видалення промотору з вихідної ДНК за допомогою розщеплення рестриктазою і введенням ізольованої послідовності промотору у вектор по винаходу. Для безпосередньої ампліфікації й/або експресії певних генів можуть використовуватися нативна послідовність промотору й багато гетерологічних промоторів. У деяких варіантах втілення винаходу використовуються гетерологічні промотори, оскільки вони

звичайно забезпечують більшу транскрипцію й більше високий вихід окремого гена, що експресують в порівнянні з поліпептидним промотором з нативною послідовністю.

Добре відомі промотори, розпізнавані цілим рядом потенційних клітин-хазяїв. Промотори, що підходять для використання в прокариотичних клітинах-хазяях, включають промотор PhoA, системи промоторів  $\beta$ -галактамази й лактози [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], лужної фосфатази, систему промотору триптофану (trp) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776] і гібридні промотори, такі як промотор tac [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)] або промотор trc. Промотори для використання в бактеріальних системах, також будуть складатися з послідовності Shine-Dalgarno (S.D.), що функціонально пов'язана із ДНК, що кодує антитіло до FcRH5. Однак підходять і інші промотори, що володіють функціональністю в клітинах бактерій (наприклад, інші відомі промотори фагів або бактерій). Їх нуклеотидні послідовності були опубліковані, що дозволяє фахівцям в даній області функціонально лігировати їх із цистроном, що кодує певні легкі й важкі ланцюги (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) з використанням лінкерів або адаптерів для забезпечення будь-яких необхідних сайтів рестрикції.

В одному аспекті винаходу кожний цистрон у рекомбінантному векторі складається з компонента сигнальної послідовності, що направляє транслокацію поліпептидів, що експресують уздовж мембрани. У цілому, сигнальна послідовність може бути компонентом вектора або частиною ДНК окремого поліпептиду, що вбудовують у вектор. Сигнальна послідовність, вибрана з метою даного винаходу, повинна бути представлена послідовністю, що розпізнається й піддається процесінгу (тобто розщеплюється сигнальною пептидазою) у клітині-хазяїні. Для прокариотичних клітин-хазяїв, які не розпізнають і не піддають процесінгу сигнальну послідовність, нативну в порівнянні з гетерологічними поліпептидами, сигнальну послідовність заміняють вибраною прокариотичною сигнальною послідовністю, наприклад, із групи, що включає лужну фосфатазу, пеніцилліназу, lpp або лідерні послідовності термостійкого ентеротоксина II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA і MBP. В одному варіанті втілення винаходу сигнальні послідовності, що використовують в обох цистронах системи експресії, представлені сигнальними послідовностями STII або їхніми варіантами.

В іншому аспекті винаходу одержання імуноглобулінів по винаходу може здійснюватися в цитоплазмі клітин-хазяїв, і, отже, не вимагає присутності сигнальних послідовностей для секреції в кожному цистроні. Щодо цього в цитоплазмі експресуються важкі й легкі ланцюга імуноглобулінів, які потім скручуються й збираються з утворенням функціональних імуноглобулінів. Певні клітини-хазяї (наприклад, штами *E. coli* trxB<sup>-</sup>) характеризуються певними умовами цитоплазми, які сприятливі для утворення дисульфідного зв'язку, що забезпечує належне скручування й складання білкових субодиниць, що експресуються. Proba and Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Даний винахід описує систему експресії, у якій кількісне співвідношення компонентів поліпептидів, що експресуються, може бути модульоване для максимального підвищення виходу секретуємих і зібраних належним чином антитіл по винаходу. Така модуляція супроводжується, щонайменше, частково, одночасною модуляцією сили трансляції компонентів поліпептиду.

Один зі способів для модулювання сили трансляції описаний в Simmons et al. і патенті США No. 5840523. Він припускає використання варіантів області ініціації трансляції (OIT) у цистроні. Для окремої OIT може бути створена серія послідовностей амінокислот або нуклеїнових кислот з діапазоном значень сили трансляції, що є зручним для корекції такого фактора щодо бажаного рівня експресії окремого ланцюга. Варіанти OIT можуть бути створені з використанням стандартних процедур мутагенезу, які приводять до змін у кодоні з наступною зміною в амінокислотній послідовності, однак переважніше вводити в нуклеотидну послідовність "зміни, що мовчать". Зміни в OIT можуть включати, наприклад, зміни в кількості або відстані між послідовностями Шайн-Далгарно (Shine-Dalgarno) поряд зі змінами в сигнальній послідовності. Один зі способів для одержання мутантної сигнальної послідовності складається в генерації "банку кодонів" на початку послідовності, що кодує, що не змінює амінокислотну послідовність сигнальної послідовності (тобто зміни є "мовчазними"). Це може супроводжуватися змінами в позиції третього нуклеотида в кожному кодоні; крім того, деякі амінокислоти, такі як лейцин, серин і аргінін, мають декілька перших і других позицій, що може ускладнити генерацію банку. Такий спосіб мутагенезу докладно описаний в Yansura et al. (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

Переважно, що набір векторів одержують у певному діапазоні значень сили OIT для кожного цистрона. Таке обмеження забезпечує порівняння рівнів експресії кожного ланцюга, а також вихід необхідного антитіла при різних комбінаціях значень сили OIT. Значення сили OIT можуть



бути визначені шляхом кількісного аналізу рівня експресії гена-репортера, як це докладно описано в Simmons et al. і патенті США No. 5840523. Ґрунтуючись на порівнянні значення сили трансляції, для комбінації у векторі експресії по винаходу використовують необхідні окремі ОІТ.

#### б. Еукаріотичні клітини-хазяї

5 Компоненти вектора звичайно включають, але не обмежуються, одну або кілька сигнальних послідовностей, точку початку реплікації, один або більше маркерних генів, енхансер, промотор і послідовність припинення транскрипції.

#### (1) Компонент сигнальна послідовність

10 Вектор для використання в еукаріотичних клітинах-хазяях може також складатися із сигнальної послідовності або іншого поліпептиду, що має специфічну ділянку рестрикції на N-кінці окремого зрілого білка або поліпептиду. Вибрана переважним чином гетерологічна сигнальна послідовність являє собою послідовність, що розпізнається й піддається процесінгу (тобто розщеплюється сигнальною пептидазою) клітиною-хазяїном. При експресії в клітині ссавця представлені сигнальні послідовності ссавця й секреторні лідерні послідовності вірусу, 15 наприклад, сигнальна послідовність gD вірусу простого герпеса.

ДНК для такої ділянки попередника лігується в рамці зчитування до ДНК, що кодує антитіло.

#### (2) Точка початку реплікації

20 Як правило, компонент точки початку реплікації для векторів експресії в ссавців не є необхідним. Наприклад, точка початку реплікації походження SV40 може звичайно використовуватися тільки тому, що вона містить ранній промотор.

#### (3) Компонент, що селектує ген

25 Вектори експресії й клонування будуть здебільшого складатися із гена, що селектує, також позначуваного як маркер, що селектує. Звичайні гени, що селектують кодують білки, які (а) надають стійкість до антибіотиків або інших токсинів, наприклад, ампіциліну, неоміцину, метотрексату або тетрацикліну; (б) спричиняють дефіцит ауксотрофних штамів; або (в) поставляють критично важливі живильні речовини, які недоступні в складному середовищі, наприклад, ген, що кодує D-аланінрацемазу для Bacilli.

30 В одному прикладі схеми селекції використовується препарат, що перешкоджає росту клітини-хазяїна. Клітини, що піддаються успішній трансформації за допомогою гетерологічного гена, виробляють білок, що надає стійкість до препарату, що дозволяє клітинам вижити. Приклади такої домінантної селекції мають на увазі використання препаратів неоміцин, мікофенолова кислота й гігromіцин.

35 Приклад підходящого маркера, що селектує, для клітин ссавців представлений маркером, що дозволяє ідентифікувати клітини, здатні захоплювати нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло до FcRH5, наприклад, дигідрофолатредуктаза або тимідинкіназа, металлотіонеїн-I і -II, переважно гени металлотіонеїна тварин, аденозіндезаміна, орнітиндекарбоксилаза й т.д. Підходяща клітина-хазяїн при використанні дигідрофолатредуктази дикого типу представлена лінією клітин CHO з недостатньою кількістю дигідрофолатредуктази (наприклад, ATCC CRL-40 9096), отриманої і розмноженої відповідно до опису, представленим в Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Наприклад, клітини, трансформовані селектуємим геном дигідрофолатредуктази, уперше були виявлені шляхом культивування всіх трансформантів у живильному середовищі утримуючої метотрексат (Mtx), конкурентний антагоніст дигідрофолатредуктази. З іншого боку, клітини-хазяї (зокрема, хазяї дикого типу, що містять 45 ендogenous дигідрофолатредуктазу), трансформовані або ко-трансформовані послідовностями ДНК, що кодують антитіло, білок дигідрофолатредуктази дикого типу й інший селектуємий маркер, такий як аміноглікозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можуть піддаватися селекції по клітинному росту в середовищі, що містить агент, що селектує, такий як аміноглікозидний антибіотик, наприклад, канаміцин, неоміцин або G418. Див. патент США No. 4965199.

50 Підходящий ген, що селектує, для використання в дріжджів представлений геном trp1, присутнім у плазміді дріжджів YRp7 [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. Ген trp1 забезпечує маркер, що селектує, для мутантного штаму дріжджів з недостатньою здатністю росту в присутності триптофану, наприклад, ATCC No. 44076 або PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

#### (4) Компонент промотор

55 Вектори експресії й клонування звичайно можуть складатися із промотору, що функціонально пов'язаний з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло до FcRH5 для безпосереднього синтезу мРНК. Добре відомі промотори, що розпізнаються цілим рядом потенційних клітин-хазяїв.

60 Фактично, всі гени еукаріотів мають збагачену АТ-ділянку, що розташована приблизно на

25-30 основ вище від сайту ініціації транскрипції. Інша послідовність перебуває на відстані від 70 до 80 основ вище від початку сайту ініціації транскрипції багатьох генів і представлена ділянкою CNCAAT, де N може бути представлений будь-яким нуклеотидом. На 3'-кінці більшості генів еукаріот перебуває послідовність AATAAA, що може служити сигналом для додавання полі-А-хвоста до 3'-кінця послідовності, що кодує. Всі ці послідовності вставлені відповідним чином у вектори експресії еукаріотів.

Приклади підходящих послідовностей промотору для використання в дріжджових клітинах-хозяїнах включають промотори для 3-фосфогліцераткінази [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] або інші гліколітичні ферменти [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], такі як енолаза, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, гексокіназа, піруватдекарбоксилаза, фосфофруктокіназа, глюкозо-6-фосфатізомераза, 3-фосфогліцератмутаза, піруваткіназа, тріосефосфатізомераза, фосфоглюкозоізомераза й глюкокіназа.

Інші промотори дріжджів, що є індукованими промоторами й мають додаткову перевагу в транскрипції, контрольовану умовами росту, представлені ділянками промотору для алкогольдегідрогенази 2, ізоцитохрома C, кислої фосфатази, деструктивних ферментів, пов'язаних з метаболізмом азоту, металлоіонеїнів, гліцеральдегіда-3-фосфатдегідрогенази, і ферментів, відповідальних за утилізацію мальтози й галактози. Підходящі вектори й промотори для використання при експресії дріжджів докладно описані в EP 73 657.

Транскрипція антитіла до FcRH5 з використанням векторів у клітинах-хозяїна ссавців контролюється, наприклад, промоторами, отриманими з геномів вірусів, таких як вірус поліоми, вірус віспи курей (UK 2211504, опублікований 5 липня 1989 р.), аденовірус (такий як аденовірус 2), вірус папіломи великої рогатої худоби, вірус саркоми птахів, цитомегаловірус, ретровірус, вірус гепатиту В и вірус мавп 40 (SV40), гетерологічними промоторами ссавців, наприклад, актинового промотору або імуноглобулінового промотору, а також промоторами теплового шоку, за умови, що такі промотори сумісні із системами клітин-хозяїв.

[0005] Ранні й пізні промотори вірусу SV40 одержують у вигляді рестрикційного фрагмента SV40, що також містить точку початку реплікації вірусу SV40. Безпосередньо ранній промотор цитомегаловірусу людини одержують із використанням рестрикційного фрагмента HindIII E. Система для експресії ДНК у клітинах ссавців з використанням вірусу папіломи великої рогатої худоби як вектор описаний у патенті США No. 4419446. Модифікація такої системи описана в патенті США No. 4601978. Інформація про експресію кДНК β-інтерферону людини в клітинах миші при контролі промотором тимідинкіназою з вірусу простого герпеса представлена також в Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982). З іншого боку, як промотор може використовуватися довгий кінцевий повтор вірусу саркоми Рауса.

#### (5) Компонент енхансер

Транскрипція ДНК, що кодує антитіло до FcRH5 у вищих еукаріот, може бути збільшена шляхом включення послідовності енхансера у вектор. Енхансери є цис-активними елементами ДНК, звичайно від приблизно 10 до 300 пар основ, які діють на промотор для посилення його транскрипції. У цей час відомо багато послідовностей енхансерів з генів ссавців (глобін, еластаза, альбумін, α-фетопротейн і інсулін). Як правило, використовується енхансер з вірусу еукаріотичної клітини. Приклади включають енхансер SV40 наприкінці точки початку реплікації (100-270 пара азотистих основ), енхансер раннього промотору цитомегаловірусу, енхансер поліоми наприкінці точки початку реплікації, а також енхансери аденовірусу. Відомості про енхансери для активації промоторів еукаріотів також представлені в Yaniv, Nature 297:17-18 (1982). Енхансер може бути зрощений з вектором у положенні 5' або 3' послідовності, що кодує антитіло до FcRH5, але переважно розташовується на 5'-кінці промотору.

#### (6) Компонент термінації транскрипції

Вектори експресії, що використовували в еукаріотичних клітинах-хозяїнах (дріжджів, грибів, комах, рослин, тварин, людину або утримуючі ядра клітинах інших багатоклітинних організмів), будуть також містити послідовності, необхідні для термінації транскрипції й стабілізації мРНК. Такі послідовності звичайно представлені у вигляді нетрансльованих ділянок на 5'- і, у деяких випадках, 3'-кінці ДНК або кДНК еукаріотів або вірусів. Такі ділянки містять сегменти нуклеотидів, транскрибовані у вигляді поліаденільованих фрагментів у ділянку мРНК, що кодує антитіло до FcRH5. Одним з підходящих компонентів термінації транскрипції служить ділянка поліаденільовання гормону росту великої рогатої худоби. Див. WO94/11026 і представлений тут опис вектора експресії.

Додаткові способи, вектори й клітини-хозяї, що підходять для адаптації до синтезу антитіла до FcRH5 у культурі рекомбінантних клітин ссавців описані, в Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117060; і EP 117058.

#### 4. Культивування клітин-хазяїв

Клітини-хазяї, що використовують для одержання антитіла до FcRH5 по даному винаході, можуть бути культивовані на різних середовищах.

##### а. Прокаріотичні клітини-хазяї

Прокаріотичні клітини, що використовували для одержання поліпептидів по винаходу, вирощують на середовищах, відомих у науці й підходящих для культивування вибраних клітин-хазяїв. Приклади підходящого середовища включають бульйон Лурія (БЛ) плюс необхідні живильні добавки. У деяких варіантах втілення винаходу середовище також містить селекційний агент, що вибирають на основі конструкції вектора експресії, для виборчого росту прокаріотичних клітин, що містять вектор експресії. Наприклад, у середовище для росту клітин, що експресує ген стійкості до ампіциліну, додають ампіцилін.

Також можуть бути внесені будь-які необхідні додаткові компоненти, крім вуглецю, азоту й неорганічного фосфату, у відповідних концентраціях, які можуть вводитися як поодиночі, так і в суміші з іншою добавкою або середовищем, наприклад, складним джерелом азоту. У деяких випадках живильне середовище може містити одну або декілька відновлювачей, які вибирають із групи, що включає глутатіон, цистеїн, цистамін, тіогліколат, дитіоеритроїтол і дитіотреїтол.

Прокаріотичні клітини-хазяї культивують при підходящій температурі. Наприклад, для росту *E. coli* краща температура варіює від приблизно 20°C до приблизно 39°C, зокрема, від приблизно 25°C до приблизно 37°C, і навіть більш специфічно, при приблизно 30°C. рН середовища може мати будь-яке значення, що варіює від приблизно 5 до приблизно 9, у залежності, переважно, від клітини-хазяїна. Для *E. coli* значення рН варіює переважно від приблизно 6,8 до приблизно 7,4, зокрема, приблизно 7,0.

При використанні у векторі експресії промотору, що індують, експресія білка індукує при умовах, що підходять для активації промотору. В одному аспекті винаходу для контролю транскрипції поліпептидів використовуються промотори PhoA. Відповідно до цього, трансформовані клітини-хазяї культивують у фосфат-обмеженому середовищі для індукції. Переважно, що фосфат-обмежене середовище представлене середовищем C.R.A.P (див., наприклад, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Може використовуватися цілий ряд інших індукторів відповідно до використовуваної моделі вектора, як це відомо науці.

В одному варіанті втілення винаходу поліпептиди, що експресують по даному винаході секретуються й відновлюються з періплазми клітини-хазяїна. Відновлення білка звичайно має на увазі руйнування мікроорганізму, як правило, за допомогою осмотичного шоку, ультразвуку або лізису. Після руйнування клітин, клітинні залишки або цілі клітини можуть бути вилучені шляхом центрифугування або фільтрації. Білки надалі можуть бути очищені, наприклад, у ході афінної хроматографії зі смолами. З іншого боку, білки можуть бути транспортовані в живильне середовище й з виділені з нього. Клітини можуть бути виділені з культури, і супернатант культури може бути підданий фільтрації й концентрації для подальшого очищення отриманих білків. Поліпептиди, що експресувалися можуть бути надалі виділені й ідентифіковані з використанням відомих способів, таких як електрофорез у поліакриламідному гелі (PAGE) і вестерн-блоттінг.

В одному аспекті винаходу вироблення, антитіла виробляються у великій кількості в ході процесу ферментації. Для одержання рекомбінантних білків представлені різні процедури ферментації, що підживляє в промислових масштабах. Потужність такої ферментації в промисловому масштабі становить, щонайменше, 1000 літрів, переважно від приблизно 10000 до 100 000 літрів. Такі ферментатори містять мішалки для розподілу кисню й живильних речовин, зокрема, глюкози (переважне джерело вуглецю/енергії). Ферментація в більш низьких масштабах відноситься звичайно до ферментації у ферментаторі об'ємною потужністю не більш ніж приблизно 100 літрів, що може варіювати від приблизно 1 літра до приблизно 100 літрів.

У ході процесу ферментації індукція експресії білка звичайно ініціюється після росту клітин у відповідних умовах до необхідної щільності клітин, наприклад, клітин OD<sub>550</sub> до кількості приблизно 180-220, і на даній стадії клітини перебувають у ранній фазі стаціонарного росту. Може використовуватися цілий ряд інших індукторів відповідно до використовуваної моделі вектора, як це відомо науці й описано вище. Перед індукцією, клітини можуть рости протягом більш коротких періодів. Звичайно клітини індують протягом приблизно 12-50 годин, але можуть використовуватися й більше короткі або більш довгі періоди індукції.

Для підвищення вироблення й кількості поліпептидів по винаходу, різні умови ферментації можуть бути модифіковані. Наприклад, для поліпшення належного складання й скручування поліпептидів антитіла, що секретують, для ко-трансформації прокаріотичних клітин-хазяїв можуть використовуватися додаткові вектори, що надлишково експресують білки теплового шоку, такі як білки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD i/або DsbG) або FkpA (пептидилпроліл цис,

транс-ізомеразу з активністю шаперона). Було показано, що білки теплового шоку полегшують належне скручування й розчинність гетерологічних білків, що вироблені у бактеріальних клітинах-хазяях. Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou et al., патент США No. 6083715; Georgiou et al., патент США No. 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Для відомості до мінімуму протеолізу гетерологічних білків, що експресують (особливо білків, що володіють протеолітичною чутливістю), у даному винаході можуть використовуватися певні штами хазяїв з недостатнім вмістом протеолітичних ферментів. Наприклад, клітини-хазяї можуть бути модифіковані з утворенням генної мутації (-й) у генах, що кодують відомі бактеріальні протеази, такі як протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI і їхні комбінації. Деякі штами *E. coli*, що не містять протеази, отримані й описані, наприклад, в Joly et al. (1998) (див. вище); Georgiou et al., патенти США No. 5264365; Georgiou et al., патенти США No. 5508192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

В одному варіанті втілення винаходу штами *E. coli* з недостатнім вмістом протеолітичних ферментів і трансформовані плазмідами, що надлишково експресують один або кілька білків теплового шоку, використовуються як клітини-хазяї у системі експресії по винаходу.

#### б. Еукаріотичні клітини-хазяї

Для культивування клітин-хазяїв підходять представлені на ринку середовища, такі як Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) і Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma). Крім того, як живильне середовище для клітин-хазяїв може використовуватися будь-яке середовище, описане в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США No. 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; або 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; або патенті США Re. 30985. У кожному з таких середовищ можуть бути додані, при необхідності, гормони й/або інші фактори росту (такі як інсулін, трансферрін або епідермальний фактор росту), солі (такі як натрію хлорид, кальцій, магній і фосфат), буфери (такі як HEPES), нуклеотиди (такі як аденозін і тимідин), антибіотики (такі як ГЕНТАМІЦИН™), мікроелементи (певні як неорганічні сполуки, звичайно присутні в кінцевих концентраціях у мікромолярному діапазоні) і глюкоза або еквівалентне джерело енергії. Також можуть бути внесені будь-які інші необхідні добавки у відповідних концентраціях, які повинні бути відомі фахівцеві в даній області. Умови культури, такі як температура, pH і т.п., такі ж, як і умови, що використовували для клітини-хазяїна, вибраної для експресії, і повинні бути очевидні для фахівця в даній області.

#### 5. Визначення ампліфікації/експресії гена

Ампліфікація й/або експресія гена може бути визначена в зразку безпосереднім чином, наприклад, шляхом використання стандартного саузерн-блоттинга, нозерн-блоттинга для кількісного визначення транскрипції мРНК [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], дот-блоттинга (аналізу ДНК), або шляхом *in situ* гібридизації з використанням міченого відповідним чином зонда, ґрунтуючись на представлених послідовностях. З іншого боку, можуть використовуватися антитіла, які розпізнають специфічні дуплекси, включаючи дуплекси ДНК, дуплекси РНК, а також гібридні дуплекси ДНК-РНК або дуплекси ДНК-білок. У свою чергу, антитіла можуть бути позначені, а аналіз може проводитися при зв'язуванні дуплекса з поверховістю, таким чином після утворення дуплекса на поверхні може бути визначена присутність антитіла, пов'язаного з дуплексом.

З іншого боку, експресія гена може бути обмірювана в ході імунологічних способів, таких як імуногістохімічне фарбування клітин або тканин і аналіз клітинної культури або рідин організму для безпосереднього кількісного визначення експресії генного продукту. Антитіла, які можуть використовуватися для імуногістохімічного фарбування й/або аналізу зразків рідин, можуть бути моноклональними або поліклональними й отриманими в будь-якої тварини. Відповідно до цього, можуть бути представлені антитіла до поліпептиду FcRH5 з нативною послідовністю й синтетичним пептидом на основі описаних тут послідовностей ДНК або до екзогенної послідовності, злитої із ДНК FcRH5 і що кодує специфічну антигенну детермінанту для антитіла.

#### 6. Очищення антитіл до FcRH5

Форми антитіла до FcRH5 можуть бути відновлені з живильного середовища або лізатів клітин-хазяїв. У випадку зв'язування з мембраною, антитіло може бути отримане з використанням підходящого розчину детергенту (наприклад, Трітон-Х 100) або шляхом ферментативного розщеплення. Клітини, задіяні в експресії антитіла до FcRH5, можуть бути зруйновані шляхом різних хімічних і фізичних способів, таких як цикли заморожування-відтавання, вплив ультразвуком, механічне руйнування або використання препаратів для лізису клітин.

У деяких випадках необхідне очищення антитіла до FcRH5 від рекомбінантних білків або поліпептидів клітини. Типові підходящі процедури очищення представлені наступними: фракціонування на іонообмінному стовпчику; преципітація в етанолі; ВЕЖХ зі зверненими фазами; хроматографія на кремнієвому стовпчику або катіон-обмінній смолі, такий як DEAE; хроматофокусування; електрофорез у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфата натрію; преципітація в присутності сульфату амонію; гель-фільтрація з використанням, наприклад, Sephadex G-75; стовпчика Sepharose з білком А для видалення домішок, таких як IgG; стовпчика з хелатоутворенням з використанням металів для зв'язування форм тегів антигенної детермінанти антитіла до FcRH5. Можуть використовуватися різні способи очищення білка, і такі способи відомі науці й описані, наприклад, в Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). Вибрані етапи очищення будуть залежати, наприклад, від природи процесу одержання антитіла, зокрема, одержання антитіла до FcRH5.

При використанні рекомбінантних способів, антитіло може бути отримане усередині клітини, периплазматичному просторі або безпосередньо в середовищі. Якщо антитіло одержують усередині клітини, у якості першого етапу віддаляються частки розпаду клітин-хазяїв або лізованих фрагментів, наприклад, шляхом центрифугування або ультрафільтрації. Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992) описали процедуру ізоляції антитіл, секретованих у периплазматичний простір *E. coli*. Вона полягає в наступному: клітинна суспензія піддається відтаванню в присутності ацетату натрію (рН 3,5), EDTA й фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ) протягом приблизно 30 хвилин. Залишки клітин можуть бути вилучені центрифугуванням. При секреції антитіла в середовище роблять концентрацію супернатанта з таких систем експресії з використанням представленого на ринку концентраційного фільтра для білків, наприклад, одиниці ультрафільтрації Amicon або Millipore Pellicon. У кожній з наступних етапів для інгібування протеолізу може бути включений інгібітор протеази, наприклад, ФМСФ, а для запобігання росту випадкових мінорних компонентів можуть використовуватися антибіотики.

Композиції антитіла, отримані із клітин, можуть бути очищені з використанням, наприклад, хроматографії з гідроксипатитом, гель-електрофореза, діалізу й афінної хроматографії, причому афінна хроматографія є переважним способом очищення. Придатність білка А в якості афінного ліганда залежить від видів і ізотипа будь-якого домену Fc імуноглобуліну, що присутній в антитілі. Білок А може використовуватися для очищення антитіл, заснованих на важких ланцюгах  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  або  $\gamma 4$  людини (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13 (1983)). Білок G рекомендується для всіх мишачих ізотипів і для  $\gamma 3$  людини (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Матриця, до якої приєднується афінний ліганд, у більшості випадків представлена агарозою, однак є й інші матриці. Механічно стабільні матриці, такі як скло з контрольованим розміром пор або полістирендивінілбензол, дозволяють прискорити швидкості потоку й скоротити час процесінгу в порівнянні з використанням агарози. Якщо антитіло включає домен  $CH_3$ , для очищення можна використовувати смолу Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Також представлені інші способи очищення білка, такі як фракціонування на іонообмінному стовпчику, осадження в етанолі, звернено-фазова ВЕЖХ, хроматографія на кремнієвому стовпчику, хроматографія на гепарині, хроматографія на сефарозі або аніон- або катіон-обмінній смолі (наприклад, стовпчик з поліаспарагіновою кислотою), хроматофокусування, електрофорез у поліакриламідному гелі й осадження в присутності сульфату амонію, залежно від відновлюваного антитіла.

Після будь-якого попереднього очищення, суміш, що включає антитіло, що цікавить, і забруднюючі речовини, може бути піддана хроматографії, що припускає гідрофобну взаємодію при низькому значенні рН, з використанням буфера елювання при рН 2,5-4,5 і низьких концентраціях солі (наприклад, 0-0,25 M).

#### Ж. Фармацевтичні композиції

Кон'югати антитіло-препарат (КАП) по винаходу можуть бути введені будь-яким шляхом, що підходить для лікування окремого стану. Як правило, КАП будуть вводитися парентерально, тобто шляхом інфузії, підшкірно, внутрішньом'язово, внутрішньовенно, внутрішньочеревно й епідурально.

Для лікування раку в одному варіанті втілення винаходу кон'югат антитіло-препарат вводять шляхом внутрішньовенної інфузії. Доза, що вводиться за допомогою інфузії, перебуває в діапазоні від приблизно 1 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 10 000 мкг/м<sup>2</sup> на дозу, звичайно одна доза в тиждень при загальній кількості однієї, двох, трьох або чотирьох доз. З іншого боку, діапазон доз становить від приблизно 1 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 1000 мкг/м<sup>2</sup>, від приблизно 1 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 800 мкг/м<sup>2</sup>, від приблизно 1 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 600 мкг/м<sup>2</sup>, від приблизно 1 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 400 мкг/м<sup>2</sup>, від приблизно 10 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 500 мкг/м<sup>2</sup>, від приблизно 10 мкг/м<sup>2</sup>

до приблизно 300 мкг/м<sup>2</sup>, від приблизно 10 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 200 мкг/м<sup>2</sup>, і від приблизно 1 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 200 мкг/м<sup>2</sup>. Доза може вводиться один раз у день, один раз у тиждень, кілька разів у тиждень, але не менш ніж один раз у день, кілька доз на місяць, але не менш ніж одна доза в день, кілька разів на місяць, але не менш ніж один раз у тиждень, кілька разів на місяць або переривчасто для ослаблення або зниження симптомів захворювання. Введення може тривати протягом кожного з описаних інтервалів до моменту ремісії пухлини або симптомів лімфоми або лейкозу, підданих лікуванню. Введення може тривати після ремісії або ослаблення симптомів, при цьому така ремісія або ослаблення зберігаються при такому продовженому введенні.

Винахід також представляє спосіб полегшення аутоімунного захворювання, що складається у введенні пацієнтові, що страждає від аутоімунного захворювання, терапевтично ефективної кількості кон'югата препарат-гуманізоване антитіло 10A8 по кожному з описаних вище варіантів втілення винаходу. У переважних варіантах втілення винаходу антитіло вводиться внутрішньо або підшкірно. Кон'югат антитіло-препарат уводиться внутрішньо в дозі в діапазоні від приблизно 1 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 100 мкг/м<sup>2</sup> на дозу, а в специфічному варіанті втілення винаходу доза становить від приблизно 1 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 500 мкг/м<sup>2</sup>. Доза може вводиться один раз у день, один раз у тиждень, кілька разів у тиждень, але не менш ніж один раз у день, кілька доз на місяць, але не менш ніж одна доза в день, кілька разів на місяць, але не менш ніж один раз у тиждень, кілька разів на місяць або переривчасто для ослаблення або зниження симптомів захворювання. Введення може тривати протягом кожного з описаних інтервалів до моменту видужання або ослаблення симптомів підданого лікуванню аутоімунного захворювання. Введення може тривати після видужання або ослаблення симптомів, при цьому таке видужання або ослаблення зберігаються при такому продовженому введенні.

Винахід також описує спосіб лікування В-клітинного порушення, що складається у введенні пацієнтові, що страждає від В-клітинного порушення, такого як порушення проліферації В-клітин (включаючи, не обмежуючись, лімфому і лейкоз) або аутоімунне захворювання, терапевтично ефективної кількості гуманізованого антитіла 10A8 по кожному з описаних тут варіантів втілення винаходу, при цьому таке антитіло не кон'юговано із цитотоксичною молекулою або обумовленою молекулою. Як правило, антитіло буде вводиться в дозі від приблизно 1 мкг/м<sup>2</sup> до приблизно 1000 мкг/м<sup>2</sup>.

В одному аспекті винахід додатково описує фармацевтичні композиції, що складаються щонайменше з одного антитіла до FcRH5 по винаходу й/або, щонайменше одного імунокон'югата антитіла й/або щонайменше одного кон'югата препарат-антитіло до FcRH5 по винаходу. У деяких варіантах втілення винаходу фармацевтична композиція складається з (1) антитіла по винаходу й/або його імунокон'югата, і (2) фармацевтично прийнятного носія. У деяких варіантах втілення винаходу фармацевтична композиція складається з (1) антитіла по винаходу й/або його імунокон'югата, і (2) щонайменше, одного терапевтичного агента. Додаткові терапевтичні агенти включають, але не обмежуються, терапевтичні агенти, представлені нижче. Як правило, КАП будуть вводиться парентерально, тобто шляхом інфузії, підшкірно, внутрішньом'язово, внутрішньо, внутрішкірно, інтратекально й епідурально.

Терапевтичні композиції (наприклад, що складаються з антитіла до FcRH5 або імунокон'югата FcRH5), що використані відповідно до даного винаходу, одержують для зберігання шляхом змішування активної діючої речовини (наприклад, антитіла або імунокон'югата), що має необхідний ступінь чистоти, з фармацевтично прийнятними носіями, допоміжними речовинами або стабілізаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) у формі ліофілізованих композицій або водяних розчинів. Прийнятні носії, допоміжні речовини або стабілізатори представлені нетоксичними для реципієнта при використовуваних дозах і концентраціях і включають наступні: буфери, такі як ацетат, Трис, фосфатні, цитратні й буфери інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту й метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензил амонію хлорид; гексаметонія хлорид; бензалконія хлорид, бензетонія хлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; м-крезол); поліпептид з низькою молекулярною вагою (менш 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпірролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глютамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди й інші вуглеводи, включаючи глюкозу, маннозу або декстрини; хелатні речовини, такі як ЕДТА; тоніфікатори, такі як трегалоза і натрію хлорид; сахари, такі як сахароза, маннітол, трегалоза або сорбітол; сурфактанти, такі як полісорбат; солеутворюючі противоіони, такі як натрій; комплекси з металом (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіонні сурфактанти, такі як ТВІН®, ПЛУРОНИКС® або поліетіленгліколь (ПЕГ).

У деяких випадках композиція кращим чином складається з фармацевтично прийнятної солі, переважно натрію хлориду, що перебуває переважно у фізіологічних концентраціях. У деяких випадках композиції по винаходу можуть складатися з фармацевтично прийнятного консерванту. У деяких варіантах втілення винаходу концентрація консерванту варіює від 0,1 до 2,0 %, як правило, в/в. Підходящі консерванти представлені консервантами, добре відомими у фармації. Переважними консервантами є бензиловий спирт, фенол, m-крезол, метілпарабен і пропілпарабен. У деяких випадках композиції по винаходу можуть включати фармацевтично прийнятний сурфактант у концентрації від 0,005 до 0,02 %.

Фармацевтичні композиції, що використовують для *in vivo* введення, звичайно стерильні. Це супроводжується фільтрацією через стерильні фільтраційні мембрани.

Композиції винаходу також можуть містити більше однієї активної діючої речовини, якщо це необхідно для окремого показання, підданого лікуванню, наприклад, такі речовини можуть мати комплементарну активність, не роблячи негативного впливу один на одного. Наприклад, крім антитіла до FcRH5, може бути необхідним включення в одну композицію додаткового антитіла, наприклад, іншого антитіла до FcRH5, що зв'язується з іншою антигенною детермінантою на поліпептиді FcRH5, або антитіла до такої ж самої мішені, наприклад, фактора росту, що впливає на ріст окремого типу рака. З іншої сторони або крім того, композиція може додатково включати хімотерапевтичний агент, цитотоксичний агент, цитокін, препарат-інгібітор росту, противогормональний препарат і/або кардіопротектор. Такі молекули представлені зручним чином у комбінації й кількостях, ефективних для окремої мети.

Активна діюча речовина також може бути укладене в мікрокапсули, наприклад, шляхом коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, за допомогою гідроксиметилцеллюлози; мікрокапсули з желатину й мікрокапсули з поліметилметакрилату, відповідно, представлені у вигляді колоїдних систем доставки препарату (наприклад, у ліпосомах, білкових мікросферах, мікроемульсіях, нано-частках і нано-капсулах) або у вигляді макроемульсій. Такі способи описані в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можуть бути представлені й препарати з уповільненим вивільненням. Підходящі приклади препаратів з уповільненим вивільненням включають напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло, при цьому матриці представлені у формі твердих часток, тобто плівок або мікрокапсул. Приклади матриць із уповільненим вивільненням включають поліефіри, гідрогелі (наприклад, полі (2-гідроксietілметакрилат) або полівініловий спирт)), поліактиди (патент США No. 3773919), сополімери L-глутамінової кислоти й  $\gamma$ -етіл-L-глутамата, що не піддається руйнуванню етіленвінілацетат, що піддається руйнуванню сополімер молочної кислоти й гліколевої кислоти, такий як LUPRON DEPOT™ (мікросфери для ін'єкцій, що включають сополімер молочної кислоти й гліколевої кислоти, а також лейпроліда ацетат), і полі-D-(-)-3-гідроксимасляну кислоту. У той час як полімери, такі як етіленвінілацетат і сополімер молочної кислоти й гліколевої кислоти дозволяють вивільнятися молекулам протягом більше 100 днів, певні гідрогелі забезпечують вивільнення більш коротких періодів часу. При знаходженні інкапсульованих імуноглобулінів в організмі протягом тривалого часу, вони можуть денатурувати або утворювати агрегати в результаті впливу вологи при 37 °C, що приводить до втрати біологічної активності й можливих змін в імуногенності. Можуть бути розроблені раціональні стратегії для стабілізації залежно від механізму, що використовується. Наприклад, у випадку виявлення, що механізм агрегації представлений утворенням S-S зв'язку між молекулами за допомогою тіо-дисульфідної взаємодії, стабілізація може бути досягнута шляхом модифікації сульфгідрильних залишків, ліофілізації з розчинів кислот, контролю вмісту вологи, шляхом використання підходящих допоміжних речовин, а також розробки специфічних композицій, що містять полімерні матриці.

Антитіло може бути розроблено таким чином, щоб мати підходящу форму для доставки в клітину-/тканину-мішень. Наприклад, антитіла можуть бути представлені у вигляді імуноліпосом. "Ліпосома" являє собою невеликий пухирець, що складається з різного типу ліпідів, фосфоліпідів і/або сурфактанту, і може використовуватися для доставки препарату в організмі ссавця. Компоненти ліпосоми звичайно розміщуються у вигляді двох шарів, подібно розміщенню ліпідів у біологічній мембрані. Ліпосоми, що містять антитіла по винаходу, одержують із використанням способів, відомих науці й описаних, наприклад, в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); і патентах США No. 4485045 і 4544545; і WO97/38731, опублікованого 23 жовтня 1997 р. Ліпосоми зі збільшеним часом циркулювання описані в патенті США No. 5013556.

Окремі підходящі ліпосоми можуть бути отримані шляхом обернено-фазового випарювання ліпідної композиції, що включає фосфатидилхолін, холестерин і ПЕГ-похідне фосфатидилетаноламіна (ПЕГ-ФЕ). Ліпосоми екструдуються через фільтри з певним розміром

пор з одержанням ліпосом необхідного діаметра. Fab' фрагменти антитіла по даному винаході можуть бути кон'юговані з ліпосомами, як це описано Martin et al., J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982), за допомогою реакції обміну за участю дисульфіду. У ліпосомі в деяких випадках може втримуватися хіміотерапевтичний препарат. Див. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

Композиції, що використовують для *in vivo* введення, повинні бути стерильні. Це супроводжується фільтрацією через стерильні фільтраційні мембрани.

### 3. Лікування з використанням антитіл до FcRH5

Для визначення експресії FcRH5 при раку є цілий ряд різних способів аналізу. В одному варіанті втілення винаходу гіперекспресія FcRH5 може аналізуватися з використанням імуногістохімії (ІГХ). Занурені в парафін фрагменти тканини, отримані в ході біопсії пухлини, можуть бути піддані ІГХ аналізу з використанням наступних критеріїв інтенсивності фарбування білка FcRH5:

Бал 0 - фарбування відсутнє, або фарбування мембрани відзначається в менш ніж 10 % клітин пухлини.

Бал 1+ - слабке/ледь помітне фарбування мембрани визначається для більш ніж 10 % клітин пухлини. Мембрана клітин пофарбована тільки частково.

Бал 2+ - слабке/помірне фарбування мембрани визначається для більш ніж 10 % клітин пухлини.

Бал 3+ - помірне/сильне фарбування мембрани визначається для більш ніж 10 % клітин пухлини.

Пухлини з балом експресії поліпептиду FcRH5 0 або 1+ можуть характеризуватися як ті, що не експресують FcRH5 у надлишковій кількості, у той час як пухлини з балом 2+ або 3+ можуть характеризуватися як ті, що експресують FcRH5 у надлишковій кількості.

З іншої сторони або крім того, на фіксовані у формаліні й занурені у парафін зразки пухлинної тканини можуть проводитися FISH-аналізи, такі як INFORM® (наданий Ventana, Arizona) або PATHVISION® (Vysis, Illinois), для визначення ступеня (при можливості) гіперекспресії FcRH5 у пухлині.

Гіперекспресія або ампліфікація FcRH5 може бути оцінена з використанням аналізу визначення *in vivo*, наприклад, шляхом введення молекули (такої як антитіло), що зв'язується з молекулою, яку необхідно визначити, і утворюючої тег з обумовленою міткою (наприклад, радіоактивним ізотопом або флуоресцентною міткою) із цією другою молекулою, потім пацієнт піддається зовнішньому скануванню для локалізації мітки.

Як це описано вище, антитіла до FcRH5 по винаходу мають цілий ряд різних не терапевтичних застосувань. Антитіла до FcRH5 по даному винаході можуть використовуватися для визначення стадії рака при експресії поліпептиду FcRH5 (наприклад, у ході рентгенографії). Антитіла також можуть використовуватися для очищення або імунопреципітації поліпептиду FcRH5 із клітин, для виявлення й кількісного визначення поліпептиду FcRH5 *in vitro*, наприклад, у ході ІФА, вестерн-блоттинга, для загибелі й елімінації клітин, що експресують FcRH5, з популяції змішаних клітин як етап очищення інших клітин.

У цей час, залежно від стадії раку, лікування раку припускає використання однієї або комбінації наступних терапій: хірургічне лікування для видалення ракової тканини, променева терапія й хіміотерапія. Терапія з використанням антитіла до FcRH5 може бути особливо підходящою в пацієнтів літнього віку, які погано переносять токсичність і побічні ефекти хіміотерапії, а також при метастатичному захворюванні, коли користь від променевої терапії обмежена. Націлені на пухлину антитіла до FcRH5 по винаходу можуть використовуватися для зниження симптомів рака при експресії FcRH5 після первинної діагностики захворювання або під час рецидиву. У терапевтичних цілях антитіло до FcRH5 може використовуватися в якості монотерапії або комбінованої терапії з, наприклад, гормонами, інгібіторами ангіогенеза або радіоміченими сполуками, або разом з хірургічним втручанням, кріотерапією й/або променевою терапією. Лікування антитілом до FcRH5 може проводитися в комбінації з іншими формами стандартної терапії послідовно, до або після використання стандартної терапії. У лікуванні раку, зокрема, пацієнтів з великим ступенем ризику, використовуються такі препарати хіміотерапії, як ТАКСОТЕР® (доцетаксел), ТАКСОЛ® (паклітаксел), естрамустин і мітоксантрон. У даному способі по винаходу для лікування або полегшення симптомів рака пацієнтові, що страждає раком, може вводитися антитіло до FcRH5 у сполученні з попередньою терапією одним або декількома хіміотерапевтичними препаратами. Зокрема, передбачається комбінована терапія паклітакселем або його модифікованими похідними (див., наприклад, EP0600517). Антитіло до FcRH5 буде вводиться разом з терапевтично ефективною дозою хіміотерапевтичного препарату. В іншому варіанті втілення винаходу антитіло до FcRH5 вводять у сполученні з



хіміотерапією для посилення активності й ефективності хіміотерапевтичного препарату, наприклад, паклітакселю. Physicians' Desk Reference (PDR) описує дози таких препаратів, які використовувалися в лікуванні різних видів рака. Режим прийому дози й дози представлених вище хіміотерапевтичних препаратів, які є терапевтично ефективними, будуть залежати від окремого виду раку, що піддається лікуванню, ступеню прогресування захворювання й інших факторів, відомих докторові в даній області, які він зможе визначити.

В одному окремому варіанті втілення винаходу пацієнтові вводиться кон'югат, що складається з антитіла до FcRH5, кон'югованого із цитотоксичним агентом. Переважним чином, імунокон'югат, пов'язаний з білком FcRH5, інтерналізований клітиною, що приводить до підвищення терапевтичної ефективності імунокон'югата щодо загибелі ракової клітини, з якої він зв'язується. У переважному варіанті втілення винаходу цитотоксичний агент вражає або взаємодіє з нуклеїновою кислотою в раковій клітині. Приклади таких цитотоксичних агентів представлені вище й включають майтансиноїди, каліхіміцини, рибонуклази й ДНК-ендонуклеази.

Терапевтичні агенти по даному винаході (наприклад, антитіла до FcRH5 або кон'югати таких антитіл з токсинами) вводять пацієнтові-людині відповідно до відомих способів, такими як внутрішньовенне введення, наприклад, болюсна або тривала інфузія протягом певного періоду часу, внутрішньозовнішнє, інтраперитонеальне, інтрацереброспинальне, підшкірне, внутрісуглобне, інтрасиновіальне, інтратекальне, пероральне, місцеве або інгаляція. Внутрішньовенне або підшкірне введення терапевтичного агента є кращим.

З метою лікування може використовуватися й стратегія *ex vivo*. Стратегії *ex vivo* передбачають використання трансфікованих клітин або клітин, підданих трансдукції, отриманих у суб'єкта, що містить полінуклеотид, що кодує антагоніст FcRH5. Трансфіковані клітини або клітини, піддані трансдукції, потім вводять назад суб'єктові. Клітини можуть бути представлені будь-якими клітинами із широкого діапазону типів, включаючи, не обмежуючись, гематопоетичні клітини (наприклад, клітини кісткового мозку, макрофаги, моноцити, дендритні клітини, Т-клітини або В-клітини), фібробласти, епітеліальні клітини, ендотеліальні клітини, кератиноцити або м'язові клітини.

Наприклад, якщо антагоніст FcRH5 представлений антитілом або імунокон'югатом, антагоніст вводять будь-яким зручним способом, включаючи парентеральний, підшкірний, інтраперитонеальний, інтрапальмонарний і інтраназальний, і, якщо це необхідно для місцевого імуносупресуючого лікування, введення усередину поразки. Парентеральні інфузії включають внутрішньозовнішнє, внутрішньовенне, інтраартеріальне, інтраперитонеальне або підшкірне введення. Крім того, антагоністи вводять шляхом пульсуючої інфузійної терапії, зокрема, зі зниженням доз антитіла. Доза приймається переважним чином у вигляді ін'єкцій, найбільше переважно у вигляді внутрішньовенних або підшкірних ін'єкцій, частково залежно від короточасного або хронічного введення.

В іншому прикладі сполуки-антагоніст FcRH5 вводять місцево, наприклад, шляхом прямих ін'єкцій, якщо це дозволяє стан розладу або розташування пухлини, при цьому такі ін'єкції можуть періодично повторюватися. Антагоніст FcRH5 може також доставлятися суб'єктові систематично або безпосередньо в пухлинні клітини, наприклад, у пухлину або ложе пухлини після хірургічного висічення пухлини для запобігання або зниження локального рецидиву або метастазів.

Введення терапевтичних агентів у комбінації звичайно проводиться протягом певного періоду часу (звичайно хвилин, годин, днів або тижнів, залежно від вибраної комбінації). Комбінована терапія призначена для введення таких терапевтичних агентів послідовним чином, при цьому кожний терапевтичний агент вводять у різний час, і введення таких терапевтичних агентів, або, щонайменше, двох терапевтичних агентів, роблять одночасно.

Терапевтичний агент може бути уведений тим самим шляхом або різними шляхами. Наприклад, антитіло до FcRH5 або імунокон'югат з комбінації можуть бути введені шляхом внутрішньовенної ін'єкції, у той час як хіміотерапевтичний препарат з комбінації може бути уведений перорально. З іншого боку, наприклад, обидва терапевтичних агента можуть бути введені перорально, або обидва терапевтичних агента можуть бути введені шляхом внутрішньовенної ін'єкції, залежно від окремого терапевтичного агента. Послідовність, у ході якої вводять терапевтичні агенти, також відрізняється залежно від окремих агентів.

Залежно від типу й ступеня важкості захворювання, початкова кандидатна доза для введення пацієнтові кожного терапевтичного агента становить від приблизно 1 мг/кг до 100 мг/кг, при цьому агенти можуть вводитися в ході однієї або окремих процедур введення, або шляхом безперервної інфузії. Звичайна добова доза може варіювати від приблизно 1 мг/кг до приблизно 100 мг/кг або більше, залежно від зазначених вище факторів. Для повторних введень

протягом декількох днів або більше, залежно від стану, лікування триває доти, поки рак не буде вилікуваний, що вимірюється з використанням описаних вище способів. Однак можуть використовуватися й інші режими прийому доз.

Даний винахід передбачає введення антитіла до FcRH5 у ході генної терапії. Див., наприклад, WO96/07321, опублікований 14 березня 1996 р. і, що описує використання генної терапії для генерації внутрішньоклітинних антитіл.

Інші режими лікування можуть бути скомбіновані із введенням антитіла до FcRH5. Комбіноване введення включає введення з використанням окремих композицій або однієї фармацевтичної композиції, а також послідовне введення в будь-якому порядку, при цьому вказується період часу, протягом якого обидва (або всі) активні діючі речовини проявляють свою біологічну активність. Така комбінована терапія переважно приводить до синергічного терапевтичного ефекту.

Також може бути необхідним комбінація введення антитіла до FcRH5 або антитіл із введенням антитіла, спрямованого проти іншого пухлинного антигену, асоційованого з окремим видом раку.

В іншому варіанті втілення винаходу способи лікування по даному винаході включають комбіноване введення антитіла до FcRH5 (або антитіл), і одного або декількох препаратів хіміотерапії або препаратів-інгібіторів росту, включаючи со-введення коктейлів різних препаратів хіміотерапії, або інших цитотоксичних агентів, або інших терапевтичних агентів, які також інгібують ріст пухлини. Препарати хіміотерапії включають наступні: естрамустина фосфат, преднімустин, цисплатин, 5-фторурацил, мелфалан, циклофосфамід, гідроксісечовина й таксани гідроксимочевини (такі як паклітаксел і доцетаксел) і/або антибіотики антрациклінового ряду. Графіки одержання й режиму прийому доз таких хіміотерапевтичних препаратів можуть використовуватися відповідно до інструкцій виробника або як це визначено емпіричним чином фахівцем у даній області. Одержання й графіки прийому доз для подібної хіміотерапії також описані в Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). Антитіло може бути скомбіноване з антигормональними сполуками, наприклад, антиестрогенною сполукою, такою як тамоксифен, антипрогестеронною сполукою, такою як онапристон (див. EP 616 812), або антиандрогенною сполукою, такою як флутамід, у дозах, установлених для таких сполук. Якщо ракове захворювання, що підлягає лікуванню, представлене андроген-незалежним раком, пацієнта попередньо може бути піддають антиандрогенній терапії, а потім, після того, як рак перейшов в андроген-незалежну форму, пацієнтові може вводитися антитіло до FcRH5 (і в деяких випадках інші описані тут агенти).

Іноді може бути переважним спільне введення пацієнтові кардіопротектора (для запобігання або зниження дисфункції міокарда, викликану терапією) або одного або декількох цитокінів. Крім зазначених вище режимів лікування пацієнта також можуть піддати хірургічному видаленню ракових клітин і/або променевої терапії (наприклад, зовнішнім опроміненням або терапією з використанням радіоактивно міченого агента, наприклад, антитіла) до, одночасно або після лікування антитілом. Підходящі дози для кожного з агентів, що спільно вводяться, представлені дозами, використовуваними в цей час, і такі дози можуть бути знижені через комбіновану дію (синергії) агента й антитіла до FcRH5.

Композиція антитіла по винаходу буде розроблена, дозована й введена відповідно до належної клінічної практики. Фактори, які необхідно враховувати в даному контексті, включають окреме й піддане лікуванню порушення, окремий й підданий лікуванню ссавець, клінічний стан окремого пацієнта, причину порушення, місце введення агента, спосіб введення, графік введення й інші фактори, відомі фахівцям в даній області. Антитіло необов'язково, але в деяких випадках може містити один або більше агентів, використовуваних у цей час для профілактики або лікування окремого порушення. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіл по винаходу, присутніх у композиції, типу розладу, що піддається лікуванню, і інших зазначених вище факторів. Такі агенти звичайно застосовують у таких же самих дозах і вводять таким же самим шляхом, які зазначені вище, або від приблизно 1 до 99 % від використовуваних тут значень дози.

Для профілактики або лікування захворювання доза й шлях введення будуть вибиратися доктором на основі відомих критеріїв. Відповідна доза антитіла буде залежати від типу захворювання, що піддається лікуванню, як це визначено вище, важкості й перебігу захворювання, незалежно від того, вводиться антитіло з метою профілактики або лікування, проведеної раніше терапії, історії хвороби пацієнта й відповіді на введення антитіла, а також на розсуд лікаря. Антитіло вводять відповідним чином пацієнтові в один час або у вигляді серії процедур. Переважним чином, антитіло вводять шляхом внутрішньовенної інфузії або підшкірними ін'єкціями. Залежно від типу й ступеня важкості захворювання, початкова

кандидатна доза антитіла для введення пацієнтові може становити від приблизно 1 мкг/кг до 50 мкг/кг маси тіла (наприклад, від приблизно 0,1 до 15 мкг/кг маси тіла/доза), при цьому антитіло може вводитися в ході однієї або окремих процедур введення, або шляхом безперервної інфузії. Режим прийому доз може включати введення початкової навантажувальної дози антитіла до FcRH5, що становить приблизно 4 мкг/кг, потім щотижневі введення підтримуючої дози в розмірі приблизно 2 мкг/кг. Однак можуть використовуватися й інші режими прийому доз. Звичайна добова доза може варіювати від приблизно 1 мкг/кг до 100 мкг/кг або більше, залежно від зазначених вище факторів. Для повторного введення протягом декількох днів або більше, залежно від стану, лікування продовжують проводити до досягнення необхідної супресії або зниження симптомів захворювання. Прогрес такого лікування може бути легко підданий моніторингу з використанням стандартних способів і аналізів, і заснований на критеріях, відомих лікарю або іншим фахівцям у даній області.

Крім введення білка антитіла пацієнтові, даний винахід передбачає введення антитіла в ході генної терапії. Таке введення нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло, виражається як "введення терапевтично ефективної кількості антитіла". Див., наприклад, WO96/07321, опублікований 14 березня 1996 р. і, що описує використання генної терапії для генерації внутрішньоклітинних антитіл.

Крім того, існує два основних підходи в одержанні нуклеїнової кислоти (що містить у деяких випадках вектор) у клітини пацієнта: *in vivo* і *ex vivo*. Для способу *in vivo* нуклеїнова кислота вводиться безпосередньо пацієнтові, звичайно в місці організму, де необхідна дія антитіла. Для способу *ex vivo* клітини пацієнта ізолюють, у них вводять нуклеїнову кислоту, і модифіковані клітини вводять пацієнтові безпосереднім чином або, наприклад, в інкапсульованому виді з поровими мембранами, які потім імплантують пацієнтові (див., наприклад, патенти США No. 4892538 і 5283187). Існує цілий ряд способів для введення нуклеїнових кислот у життєздатні клітини. Способи різняться залежно від переносу нуклеїнової кислоти в культивуючі клітини *in vitro*, або *in vivo* у клітини передбачуваного хазяїна. Способи, що підходять для переносу нуклеїнової кислоти в клітини ссавців *in vitro*, включають використання ліпосом, електропорацію, мікроін'єкцію, злиття клітин, використання DEAE-декстрана, преципітації кальцію фосфату й т.д. Вектор, що звичайно використовують для *ex vivo* поставки гена представлений вектором ретровіруса.

У цей час надають перевагу способам переносу нуклеїнової кислоти *in vivo*, 0 що включають трансфекцію векторами вірусів (таких як аденовірусу, вірусу простого герпеса I, аденоасоційованого вірусу) і використання ліпідних систем (таких ліпідів для ліпід-опосередкованого трансферу гена, як, наприклад, DOTMA, DOPE і DC-Chol). Огляд відомих у цей час протоколів маркірування генів і генної терапії представлений в Anderson et al., Science 256:808-813 (1992). Див. також WO 93/25673 і наведені тут посилання.

Антитіла до FcRH5 по винаходу можуть бути представлені в різних формах, зазначених тут під загальною назвою "антитіло". Таким чином, антитіла включають антитіла повної довжини або інтактні антитіла, фрагменти антитіл, антитіло з нативною послідовністю або амінокислотні варіанти, гуманізовані, химерні антитіла або антитіла злиття, імунокон'югати і їхні функціональні фрагменти. В антитілах злиття послідовність амінокислот злита з послідовністю гетерологічного поліпептиду. Антитіла можуть бути модифіковані в ділянці Fc для забезпечення необхідних ефекторних функцій. Як уже більш докладно вказувалося в даній главі, у відповідних ділянках Fc антитіло, зв'язане на поверхні клітин, може індукувати цитотоксичність, наприклад, за допомогою антитіло-залежної клітинної цитотоксичності (АЗКЦ) або шляхом залучення комплементу в комплемент-залежної цитотоксичності, або за допомогою якого-небудь іншого механізму. З іншого боку, якщо необхідно елімінувати або знизити ефекторну функцію для відомості до мінімуму побічних ефектів або ускладнень лікування, можуть використовуватися інші певні фрагменти Fc.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло конкурує за зв'язування або зв'язується значним чином з однією й тією же антигенною детермінантою, що й антитіла по винаходу. Антитіла, що володіють біологічними характеристиками даних антитіл до FcRH5 по винаходу, також розглядаються, зокрема, включаючи поразку пухлини *in vivo* і інгібування проліферації будь-яких клітин, або цитотоксичні характеристики.

Способи одержання представлених вище антитіл докладно описані в даній заявці.

Представлені антитіла до FcRH5 використовуються в лікуванні раку з експресією FcRH5 або ослабленні одного або декількох симптомів рака в ссавців. Такі ракові захворювання включають, але не обмежуються, гематобластози або рак крові, наприклад, лімфома, лейкоз, міеломи або лімфоїдні злоякісні новоутворення, а також рак селезінки й рак лімфатичних вузлів. Найбільш специфічні приклади раку, що викликається В-клітинами, включають В-клітинний рак,

включаючи, наприклад, лімфоми високого, середнього й низького ступеня злоякісності (включаючи В-клітинні лімфоми, такі як, наприклад, В-клітинна лімфома лімфоїдної тканини слизових оболонок і неходжкинська лімфома (НХЛ), лімфома із клітин мантийної зони, лімфома Беркитта, дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лімфома маргінальної зони, дифузійна  
 5 крупноклітинна лімфома, фолікулярний лімфома і лімфома Ходжкина, а також Т-клітинні лімфоми) і лейкози (включаючи вторинний лейкоз, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), такий як В-клітинний лейкоз (CD5+В-лімфоцити), мієлолейкоз, такий як гострий мієлоїдний лейкоз, хронічний мієлоїдний лейкоз, лімфоїдний лейкоз, такий як гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ) і мієлодисплазію), і інші гематологічні й/або В- або Т-клітинні види раку. Ракові  
 10 захворювання також включають метастатичні ракові захворювання всіх перерахованих вище захворювань. Антитіло здатне зв'язуватися щонайменше, із частиною ракових клітин, що експресує поліпептид FcRH5 у ссавців. У переважному варіанті втілення винаходу антитіло ефективно в знищенні або загибелі пухлинних клітин, що експресують FcRH5, або інгібує ріст  
 15 таких пухлинних клітин в умовах *in vitro* або *in vivo* при зв'язуванні з поліпептидом FcRH5 на поверхні клітини. Таке антитіло включає незв'язане антитіло до FcRH5 (не кон'юговане з жодним агентом). Незв'язані антитіла, що володіють цитотоксичними або, що інгібують ріст клітин властивостями, можуть бути надалі з'єднані із цитотоксичним агентом для додавання їм  
 20 більшої сили в руйнуванні пухлинних клітин. Антитілу до FcRH5 можуть бути додані цитотоксичні властивості, наприклад, шляхом кон'югації антитіла із цитотоксичним агентом, з утворенням імунокон'югата, як це описано в тексті даної заявки. Цитотоксичний агент або препарат-інгібітор росту представлений переважно невеликою молекулою. Кращим є використання токсинів, таких як каліхіміцин або майтансиноїд і їхні аналоги або похідні.

Винахід описує композицію, що складається з антитіла до FcRH5 по винаходу й носія. Для лікування раку композиції можуть бути введені пацієнтові, що потребує в такому лікуванні, при  
 25 цьому композиція може складатися з одного або декількох антитіл до FcRH5, присутніх у вигляді імунокон'югата або незв'язаного антитіла. У додатковому варіанті втілення винаходу композиція може складатися з таких антитіл у комбінації з іншими терапевтичними агентами, такими як цитотоксичні агенти або препарати-інгібітори росту, включаючи препарати хіміотерапії. Винахід також описує композиції, що складаються з антитіла до FcRH5 по винаходу  
 30 й носія. В одному варіанті втілення винаходу представлена терапевтична композиція, що складається з фармацевтично прийнятного носія.

Інший аспект винаходу являє собою ізольовану нуклеїнову кислоту, що кодує антитіла до FcRH5. Аспект охоплює нуклеїнові кислоти, що кодують Н і L ланцюги й особливо залишки гіперваріабельних ділянок ланцюга, що кодують нативні послідовності антитіла, а також  
 35 варіанти, модифікації й гуманізовані версії антитіла.

Винахід також описує способи, що використовують для лікування раку з експресією поліпептиду FcRH5 або ослаблення одного або декількох симптомів рака в ссавця, і такий спосіб складається із введення терапевтично ефективної кількості антитіла до FcRH5 ссавця. Терапевтичні композиції антитіла можуть вводитися короткочасно (гостро) або хронічно, або  
 40 переривчастим чином відповідно до вказівки доктора. Крім того, представлені способи інгібування росту й загибелі клітин, що експресують поліпептид FcRH5.

Винахід також описує набори й готові вироби, що складаються як мінімум з одного антитіла до FcRH5. Набори, що містять антитіла до FcRH5, використовуються, наприклад, в аналізах загибелі клітин, що експресують FcRH5, для очищення або імунопреципітації поліпептиду FcRH5 із клітин. Наприклад, для ізоляції й очищення FcRH5 набір може складатися з антитіла до FcRH5, з'єданого із гранулами (наприклад, гранулами сепарозу). Можуть бути  
 45 представлені набори, що містять антитіла для ідентифікації й кількісного визначення FcRH5 *in vitro*, наприклад, у ході ІФА або вестерн-блоттинга. Таке антитіло для визначення може містити мітку, наприклад, що флуоресцює або радіомітку.

50 **И. Лікування з використанням кон'югатів антитіло-препарат**

Передбачається, що кон'югати антитіло-препарат (КАП) даного винаходу можуть використовуватися для лікування різних захворювань або порушень, наприклад, що характеризуються гіперекспресією пухлинного антигену. Типові стани або стан гіперпроліферації включають злоякісні або доброякісні пухлини, лейкози й лімфоїдні злоякісні  
 55 новоутворення. Інші включають нейронні, гліальні, астроцитарні, гіпоталамічні, гландулярні, макрофагальні, епітеліальні, стромальні, бластоцельні, запальні, ангіогенні й імунологічні, включаючи аутоімунні, розлади.

Сполуки КАП, які ідентифіковані у тваринних моделях і клітинних аналізах, можуть бути додатково тестовані на пухлинах вищих приматів і в ході клінічних досліджень на людині.  
 60 Клінічні дослідження на людині можуть бути розроблені для дослідження ефективності

моноклонального антитіла до FcRH5 або імунокон'югата по винаходу в пацієнтів, що мають порушення проліферації В-клітин, які вибирають з наступних: лімфома, неходжкінська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони. Клінічне дослідження може бути розроблене для оцінки ефективності КАП у сполученнях з відомими терапевтичними режимами, наприклад, променевий і/або радіотерапією, що припускають застосування відомих хіміотерапевтичних і/або цитотоксичних агентів.

Як правило, захворювання або порушення, що підлягають лікуванню, представлено лімфопроліферативним захворюванням, таким як проліферативне захворювання В-клітин/або В-клітинним раком. Приклади ракових захворювань, що піддаються лікуванню в контексті даного винаходу, включають, але не обмежуються, наступні: лімфома, неходжкінська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони.

Рак може включати клітини, що експресують FcRH5, таким чином КАП даного винаходу здатний зв'язуватися з раковими клітинами. Для визначення експресії FcRH5 при раку є цілий ряд різних діагностичних/прогностичних аналізів. В одному варіанті втілення винаходу FcRH5 може аналізуватися з використанням імуногістохімії (ІГХ). ІГХ аналізу можуть бути піддані зразки тканини зі шкірної біопсії, занурені в парафін, з наступним фарбуванням з дотриманням критеріїв щодо інтенсивності фарбування білка FcRH5 у частині досліджуваних клітин пухлини.

З метою профілактики або лікування захворювання відповідна доза КАП буде залежати від типу захворювання, що піддається лікуванню, як це визначено вище, тяжкості й перебігу захворювання, незалежно від того, вводиться антитіло з метою профілактики або лікування, проведеної раніше терапії, історії хвороби пацієнта й відповіді на введення антитіла, а також на розсуд лікаря. Молекулу вводять відповідним чином пацієнтові в один час або у вигляді серії процедур. Залежно від типу й ступеня важкості захворювання, початкова кандидатна доза молекули для введення пацієнтові становить від приблизно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (тобто 0,1-20 мг/кг) молекули, при цьому агенти можуть вводитися в ході однієї або окремих процедур введення, або шляхом безперервної інфузії. Звичайна добова доза може варіювати від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, залежно від зазначених вище факторів. Типова доза КАП, що вводять пацієнтові, представлена діапазоном від приблизно 0,1 до приблизно 10 мг/кг ваги пацієнта.

Для повторного введення протягом декількох днів або більше, залежно від стану, лікування продовжують проводити до досягнення необхідної супресії або зниження симптомів захворювання. Типовий режим прийому доз може включати введення початкової навантажувальної дози, що становить приблизно 4 мг/кг, потім щотижневі введення підтримуючої дози антитіла до ErbB2 у розмірі приблизно 2 мг/кг. Однак можуть використовуватися й інші режими прийому доз. Прогрес у такій терапії може бути з легкістю піддадуть моніторингу з використанням стандартних способів і аналізів.

#### К. Комбінована терапія

Кон'югат антитіло-препарат (КАП) по винаходу може бути комбінований у фармацевтичну композицію або прийматися у вигляді комбінованої терапії з іншою сполукою, що володіє протираковими властивостями. Друга сполука фармацевтичної композиції або режиму прийому переважним чином має комплементарну активність до КАП комбінації, таким чином, вони не роблять один на одного небажаного впливу.

Друга сполука може бути представлена хіміотерапевтичним агентом, цитотоксичним агентом, цитокіном, препаратом-інгібітором росту, противогормональним препаратом і/або кардіопротектором. Такі молекули представлені зручним чином у комбінації й кількостях, ефективних для окремої мети. Фармацевтична композиція, що містить КАП по винаходу, також може містити терапевтично ефективну кількість хіміотерапевтичного препарату, такого як інгібітор утворення тубуліна, інгібітор топоізомерази агент для зв'язування ДНК.

В одному аспекті винаходу перша сполука представлена КАП до FcRH5 по винаходу, і друга сполука представлено антитілом до CD20 (незв'язаним антитілом або КАП). В одному варіанті втілення винаходу друга сполука представлена антитілом до CD20 рітуксимабом (Рітуксан®) або 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Інші антитіла, які можуть використовуватися для комбінованої імунотерапії з КАП до FcRH5, включають, не обмежуючись, антитіло до VEGF (наприклад, Авастин®).

Інші режими лікування можуть бути скомбіновані із введенням протиракового препарату, ідентифікованого відповідно до даного винаходу, включаючи, не обмежуючись, променеву терапію й/або трансплантати кісткового мозку й периферичної крові, і/або цитотоксичний агент, препарат хіміотерапії або препарат-інгібітор росту. В одному з таких варіантів втілення

винаходу хіміотерапевтичний агент представлений агентом або комбінацією агентів, таких як, наприклад, циклофосфамід, гідроксідаунорубіцин, адриаміцин, доксорубіцин, вінкрістин (Онковін™), преднізолон, CHOP, CVP або COP, або імунотерапевтичним препаратом, таким як антитіло до CD20 (наприклад, Рітуксан®) або антитіло до VEGF (наприклад, Авастин®).

Комбінована терапія може вводитися одночасним або послідовним чином. При послідовному введенні, комбінація може вводитися за два й більше введення. Комбіноване введення включає со-введення з використанням окремих композицій або однієї фармацевтичної композиції, а також послідовне введення в будь-якому порядку, при цьому вказується період часу, протягом якого обидва (або всі) активні діючі речовини проявляють свою біологічну активність.

В одному варіанті втілення винаходу лікування КАП припускає комбіноване введення описаного тут протиракового препарату й одного або більше хіміотерапевтичних агентів або препаратів-інгібіторів росту, включаючи со-введення коктейлів різних хіміотерапевтичних препаратів. Хіміотерапевтичні препарати включають таксани (такі як паклітаксел і доцетаксел) і/або антибіотики антрациклінового ряду. Графіки одержання й режиму прийому доз таких хіміотерапевтичних препаратів можуть використовуватися відповідно до інструкцій виробника або як це визначено емпіричним чином фахівцем у даній області. Одержання й графіки прийому доз для подібної хіміотерапії також описані в Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Підходящі дози для кожного з агентів, що спільно вводяться, представлені дозами, що використовують в цей час, і такі дози можуть бути знижені через комбіновану дію (синергії) нового препарату й інших хіміотерапевтичних препаратів або видів лікування.

Комбінована терапія може приводитися до виникнення "синергії" і мати "синергічний" ефект, тобто ефект, що досягається при спільному використанні активних діючих речовин, що сумарно більше ефектів, що викликані застосуванням сполук по-окремі. Синергічний ефект може бути досягнутий у випадку, якщо активні діючі речовини: (1) перебувають в одній композиції й вводяться або доставляються одночасно в комбінованій одиниці дози композиції; (2) поставляються по черзі або паралельно у вигляді окремих композицій; або (3) включені в окремий режим лікування. При використанні терапії, що чергується, ефект синергії може бути досягнутий, якщо сполуки вводяться або доставляються послідовно, наприклад, у ході різних ін'єкцій у різних шприцах. У цілому, під час терапії, що чергується, ефективна доза кожного активного діючої речовини вводиться послідовно, тобто серійно, у той час як у ході комбінованої терапії ефективні дози двох або більше активних діючих речовин вводяться разом.

Комбінована терапія по винаходу може додатково складатися з одного або декількох хіміотерапевтичних препаратів. Комбіноване введення включає со-введення або конкурентне введення з використанням окремих композицій або однієї фармацевтичної композиції, а також послідовне введення в будь-якому порядку, при цьому вказується період часу, протягом якого обидва (або усі) активні діючі речовини проявляють свою біологічну активність.

Хіміотерапевтичний препарат, при його введенні, звичайно вводиться у відомих дозах, або така доза може в деяких випадках знижуватися через комбіновану дію препаратів або негативних побічних ефектів, викликаних введенням антиметаболітного хіміотерапевтичного препарату. Графіки одержання й режиму прийому доз таких хіміотерапевтичних препаратів можуть використовуватися відповідно до інструкцій виробника або як це визначено емпіричним чином фахівцем у даній області.

Можуть бути скомбіновані різні хіміотерапевтичні препарати відповідно до представленого тут опису.

У деяких варіантах втілення винаходу хіміотерапевтичні препарати для комбінування вибирають із групи, що включає імунomodulators (IM) (включаючи талідомід і Ревлімід® (леналідомід)), протеосомальні інгібітори (такі як Велкаде® (бортезоміб) і PS342), токсод бори (включаючи доцетаксел і паклітаксел), токсод барвінку (такі як вінорелбін або вінбластин), сполуки платини (такі як карбоплатин або цисплатин), інгібітор ароматази (такий як анастрозол або екземестан), антиестрогенний препарат (наприклад, фулвестрант або тамоксіфен), етопозид, тіотепа, циклофосфамід, пеметрексед, метотрексат, ліпосомальний доксорубіцин, пегільований ліпосомальний доксорубіцин, капецитабін, гемцитабін, мелталін, доксорубіцин, вінкрістин, інгібітор COX-2 (наприклад, целекоксиб) або стероїд (наприклад, дексаметазон і преднізон). У деяких варіантах втілення винаходу (наприклад, варіантах втілення, що

передбачають лікування множинної мієломи), комбіновані дексаметазон і леналідомід, або дексаметазон, або бортезоміб, або вінкрістин, доксорубіцин і дексаметазон, або талідомід і дексаметазон, або ліпосомальний доксорубіцин, вінкрістин і дексаметазон, або леналідомід і дексаметазон, або бортезоміб і дексаметазон, або бортезоміб, доксорубіцин і дексаметазон.

5 У деяких варіантах втілення винаходу хіміотерапевтичні препарати для комбінування вибирають із групи, що включає Ревлімід® (леналідомід), протеосомальні інгібітори (такі як Велкаде® (бортезоміб) і PS342), токсод бори (включаючи доцетаксел і паклітаксел), токсод барвінку (такі як вінорелбін або вінбластин), сполуки платини (такі як карбоплатин або цисплатин), інгібітор ароматази (такі як анастрозол або екземестан), антиестрогенний препарат  
10 (наприклад, фулвестрант або тамоксифен), етопозид, тіотепа, циклофосфамід, пеметрексед, метотрексат, ліпосомальний доксорубіцин, пегільований ліпосомальний доксорубіцин, капецитабін, гемцитабін, мелталін, доксорубіцин, вінкрістин, інгібітор COX-2 (наприклад, целекоксиб) або стероїд (наприклад, дексаметазон і преднізон).

У деяких варіантах втілення винаходу (наприклад, варіантах втілення для лікування  
15 множинної мієломи) комбінуються дексаметазон і леналідомід, або дексаметазон і бортезоміб.

В одному варіанті втілення винаходу комбінована терапія складається з антитіла або імункон'югата й більш ніж одного хіміотерапевтичного препарату. Наприклад, антитіло або імункон'югат можуть бути скомбіновані з наступними препаратами: (i) вінкрістин, доксорубіцин (у ліпосомальних і неліпосомальних композиціях) і дексаметазон; (ii) талідомід і дексаметазон;  
20 (iii) Велкаде® (бортезоміб), доксорубіцин і дексаметазон; (iv) Велкаде® (бортезоміб), талідомід і дексаметазон; (v) мелфалан і преднізон; (vi) мелфалан, преднізон і талідомід; (vii) мелфалан, преднізон і Велкаде® (бортезоміб); (viii) вінкрістин, доксорубіцин і дексаметазон; або (ix) талідомід і дексаметазон.

В одному варіанті втілення винаходу комбінована терапія складається з описаного тут антитіла або імункон'югата й одного або декількох наступних препаратів: (i) Велкаде® (бортезоміб), (ii) дексаметазон, (iii) Ревлімід® (леналідомід). В іншому варіанті втілення винаходу комбінована терапія складається з антитіла або імункон'югата й наступних препаратів: дексаметазон і Ревлімід® (леналідомід) або Велкаде® (бортезоміб) і дексаметазон.  
25 В одному варіанті втілення винаходу комбінована терапія складається з антитіла або імункон'югата й кожного з наступних препаратів: Велкаде® (бортезоміб), дексаметазон і Ревлімід® (леналідомід).

Л. Готові вироби й набори

Інший варіант втілення винаходу представлений готовим виробом, що містить матеріали, що використовують в лікуванні, профілактиці й/або діагностиці раку з експресією FcRH5.  
35 Готовий виріб складається з контейнера й етикетки або вкладиша на контейнері або вкладеного в контейнер. Підходящі контейнери включають, наприклад, флакони, ампули, шприци й т.д. Контейнери можуть бути виконані із цілого ряду матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнери містять композицію, що ефективна для лікування, профілактики й/або діагностики раку й може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може бути представлений  
40 мішком з розчином для внутрішньовенного введення або ампулою з мембраною, що проколюється голкою шприца для внутрішньокірних ін'єкцій). Щонайменше, одна активна діюча речовина в композиції представлено антитілом до FcRH5. Етикетка або пакувальний вкладиш указує, що композиція повинна застосовуватися для лікування раку. Етикетка або пакувальний вкладиш також буде містити інструкції із введення композиції антитіла пацієнтові, що страждає  
45 раком. Крім того, готовий виріб може додатково складатися із другого контейнера, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWF1), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера й розчин декстрази. Додатково готовий виріб може включати й інші матеріали, необхідні з комерційної точки зору й точки зору користувача, включаючи інші буфери, розчинники, фільтри, голки й шприци.

Також представлені набори для використання в різних цілях, наприклад, для аналізу загибелі клітин, що експресує FcRH5, для очищення або імунореципітації поліпептиду FcRH5 із клітин. Для ізоляції й очищення FcRH5 набір може складатися з антитіла до FcRH5, з'єданого із гранулами (наприклад, гранулами сефарози). Можуть бути представлені набори, що містять антитіла для ідентифікації й кількісного визначення поліпептиду FcRH5 in vitro, наприклад, у ході ІФА або вестерн-блоттинга. Як і готовий виріб, набір складається з контейнера й етикетки або  
55 вкладиша на контейнері або вкладеного в контейнер. Контейнер містить композицію, що включає, щонайменше, одне антитіло до FcRH5. Можуть бути включені додаткові контейнери, що містять, наприклад, розчинники й буфери, контрольні антитіла. На етикетці або вкладиші може бути опис композиції, а також інструкції з використання in vitro або для аналізів.

60 М. Застосування поліпептидів FcRH5

Винахід описує способи скринінгу сполук для виявлення сполук, здатних імітувати поліпептид FcRH5 (агоністів) або запобігти ефекту поліпептиду FcRH5 (антагоністів). Скринінг-аналізи на виявлення кандидатних антагоністів-препаратів розроблені для ідентифікації сполук, які зв'язуються або утворюють комплекс із поліпептидами FcRH5, що кодуються

представленими тут генами, або іншим способом взаємодіють із поліпептидами, що кодуються й іншими клітинними білками, включаючи, наприклад, інгібування експресії поліпептиду FcRH5 у клітинах. Такі скринінг-аналізи будуть включати аналізи для високорезультативного скринінгу хімічних бібліотек, що робить такі аналізи специфічним чином підходящими для ідентифікації невеликих молекул кандидатних препаратів.

Аналізи можуть проводитися в різних форматах, включаючи аналізи зв'язування білок-білок, біохімічні скринінг-аналізи, імуноаналізи й клітинні аналізи, які досить добре описані в науці. Всі аналізи антагоністів схожі в тому, що для них необхідний контакт кандидатного препарату з поліпептидом FcRH5, що кодується нуклеїнової кислотою в умовах і протягом часу, достатніх для взаємодії таких двох компонентів.

У ході аналізу зв'язування, взаємодія представлена зв'язуванням, і комплекс, що утвориться, може бути ізольований з реакційної суміші. В окремому варіанті втілення винаходу поліпептид FcRH5, що кодується зазначеним тут геном, або кандидатний препарат іммобілізують на твердій фазі, наприклад, на пластині мікротитратора, з утворенням ковалентних і нековалентних зв'язків. Утворення нековалентного зв'язку звичайно супроводжується покриттям твердої поверхні розчином поліпептиду FcRH5 і висушуванням. З іншого боку, іммобілізоване антитіло, наприклад, моноклональне антитіло, специфічне щодо поліпептиду FcRH5, яких необхідно іммобілізувати, може використовуватися для приєднання до твердої поверхні. Аналіз виконують шляхом додавання неіммобілізованого компонента, що може бути позначений обумовленою міткою, до іммобілізованого компонента, наприклад, покритої поверхні, що містить фіксований компонент. По закінченні реакції компоненти, що не прореагували видаляють, наприклад, шляхом змиву, і визначають комплекси, зафіксовані на твердій поверхні. Якщо первісно неіммобілізований компонент містить обумовлену мітку, визначення такої мітки, іммобілізований на поверхні, указує на утворення комплексу. Якщо первісно неіммобілізований компонент не містить обумовлену мітку, комплексоутворення може бути визначено, наприклад, шляхом використання міченого антитіла, що специфічно зв'язується з іммобілізованим комплексом.

Якщо кандидатна сполука взаємодіє, але не зв'язується з окремим поліпептидом FcRH5, що кодується представленим тут геном, така взаємодія з поліпептидом може бути проаналізована з використанням способів для ідентифікації взаємодій білок-білок. Такі аналізи включають традиційні підходи, такі як, наприклад, перехресне зв'язування, со-імунопреципітація й со-очистка за допомогою градієнтів або хроматографічних колонок. Крім того, взаємодії білок-білок можуть підлягати моніторингу з використанням генної системи дріжджів, описаної Fields і співробітниками (Fields and Song, *Nature* (London), 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) as disclosed by Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Більша частина активаторів транскрипції, таких як GAL4 дріжджів, складається із двох фізично дискретних модулярних доменів, один із яких діє в якості ДНК-єднального домену, а другий функціонує в якості домену-активатора транскрипції. Система експресії дріжджів із представленої вище публікації (що звичайно вказана, як "двохгібридна система") володіє в цьому випадку перевагою, включаючи використання двох гібридних білків, один із яких злитий з ДНК-єднальним доменом GAL4, злитий в іншій із доменом, що активує. Експресія гена-репортера GAL1-lacZ під контролем GAL4-активованого промотора залежить від повторного відновлення активності GAL4 за допомогою взаємодії білок-білок. Колонії, що містять взаємодіючі поліпептиди, визначають із використанням хромогенного субстрату для  $\beta$ -галактозидази. Повний набір (MATCHMAKER™) для ідентифікації взаємодій білок-білок між двома специфічними білками з використанням двохгібридного способу, представлений на ринку компанією Clontech. Така система також може бути розширена для картографування білкових доменів, задіяних у специфічних взаємодіях білків, а також для визначення точного положення амінокислотних залишків, що грають критичну роль для таких взаємодій.

Сполуки, які заважають взаємодії гена, що кодує поліпептид FcRH5, і інших інтра- або екстрацелюлярних компонентів, можуть бути тестовані в такий спосіб: звичайно реакційну суміш готують зі вмістом продукту гена й інтра- або екстрацелюлярним компонентом в умовах протягом періоду часу, які забезпечують взаємодію двох продуктів. Для випробування здатності кандидатної сполуки інгібувати зв'язування, реакцію проводять у відсутності й присутності тестуємої сполуки. Крім того, у третю реакційну суміш може бути додане плацебо, і така суміш буде служити як позитивний контроль. Зв'язування (утворення комплексу) між



тестовою сполукою і інтра- або екстрацелюлярним компонентом, що є присутнім у суміші, контролюють відповідно до представленого вище способу. Утворення комплексу в контрольній суміші, але не в реакційній суміші, що містить сполуки, які тестують, указує на те, що сполука, яку тестують перешкоджає взаємодії сполуки, що тестують або реакційного партнера.

Для аналізу антагоністів, у клітину разом із сполукою, що піддається скринінгу на предмет специфічної активності, може бути доданий поліпептид FcRH5, і здатність такої сполуки інгібувати активність у присутності поліпептиду FcRH5 указує на те, що сполука є антагоністом поліпептиду FcRH5. З іншого боку, антагоністи можуть бути визначені шляхом комбінування поліпептиду FcRH5 і потенційного антагоніста з мембранними поліпептидними рецепторами FcRH5 або рекомбінантними рецепторами у відповідних умовах для проведення аналізу конкурентного інгібування. Поліпептид FcRH5 може бути міченим, наприклад, радіоактивною міткою, тому кількість молекул поліпептиду FcRH5, пов'язаних з рецептором, може бути визначене для встановлення ефективності потенційного антагоніста. Ген, що кодує рецептор, може бути ідентифікований з використанням різних відомих фахівцями в даній області способів, наприклад, пеннінгом ліганда й сортуванням FACS. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991). Якщо поліаденільовану РНК одержують із клітини, чутливої до поліпептиду FcRH5, може використовуватися експресійний вектор, і бібліотека кДНК, створена з такою РНК, розділена на пули й використовується для трансфікування клітин COS або інших клітин, які не чутливі до поліпептиду FcRH5. Трансфіковані клітини, вирощені на предметних стеклах, піддаються впливу міченим поліпептидом FcRH5. Поліпептид FcRH5 може бути позначений з використанням цілого ряду способів, включаючи йодування або включення ділянки розпізнавання для сайт-специфічної протеїнази. Після фіксації й інкубації предметні стекла піддають ауторадіографічному аналізу. Позитивні пули ідентифікують, потім одержують субпули, які повторно трансфікують з використанням інтерактивного процесу субоб'єднання й повторного скринінгу, одержуючи, у підсумку, один клон, що кодує передбачуваний рецептор.

Як альтернативний підхід для ідентифікації рецептора, мічений поліпептид FcRH5 може бути з'єднаний із клітинною мембраною за допомогою фотоафінності або екстрактів при експресії молекули рецептора. Речовину для перехресного зв'язування розкладають із використанням електрофореза в поліакриламідному гелі й наносять на плівку для рентгенографії. Утримуючий рецептор мічений комплекс може бути відділений, розщеплений на пептидні фрагменти й підданий білковому мікросеквенуванню. Амінокислотна послідовність, отримана в результаті мікросеквенування, буде використовуватися для розробки набору дегенераційних олігонуклеотидних зондів для скринінгу бібліотеки кДНК із метою ідентифікації гена, що кодує передбачуваний рецептор.

У ході іншого аналізу антагоністів клітини ссавців або мембрани, що експресують рецептор, підлягають інкубації з міченим поліпептидом FcRH5 у присутності кандидатної сполуки. Потім проводять зміну здатності сполуки підвищувати або блокувати таку взаємодію.

Більше специфічні приклади потенційних антагоністів включають олігонуклеотид, що зв'язується зі злитими імунoglobулінами з поліпептидом FcRH5, і, зокрема, з антитілами, включаючи, без обмежень, полі- і моноклональні антитіла й фрагменти антитіл, одноланцюгові антитіла, антиідіотипічні антитіла й химерні або гуманізовані версії таких антитіл або фрагментів, а також людські антитіла й фрагменти антитіл. З іншого боку, потенційний антагоніст може бути представлений родинним білком, наприклад, мутованою формою поліпептиду FcRH5, що розпізнає рецептор, але не робить якого-небудь ефекту, інгібуя дію поліпептиду FcRH5 конкурентним чином.

Антитіла, що специфічно зв'язуються з поліпептидом FcRH5, а також інші молекули, ідентифіковані в ході аналізів скринінгу, описаних у тексті даної заявки, можуть уводитися для лікування різних порушень, включаючи рак, у формі фармацевтичних композицій.

Якщо поліпептид FcRH5 є внутрішньоклітинним, і в якості інгібіторів використовуються цілі антитіла, кращим є використання інтерналізуючих антитіл. Однак можуть також використовуватися ліпофекції або ліпосоми для доставки антитіла або фрагмента антитіла в клітини. Якщо використовуються фрагменти антитіла, кращим буде використання найменшого фрагмента антитіла, що специфічно зв'язується з доменом зв'язування білка-мішені. Наприклад, ґрунтуючись на послідовностях варіабельної ділянки антитіла, пептидні молекули можуть бути розроблені таким чином, щоб зберігати можливість зв'язуватися з послідовністю білка-мішені. Такі пептиди можуть бути синтезовані хімічно й/або отримані в ході процедури рекомбінації ДНК. Див., наприклад, Marasco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993).

Композиції винаходу також можуть містити більше однієї активної діючої речовини, якщо це необхідно для окремого показання, підданого лікуванню, наприклад, такі речовини можуть мати

комплементарну активність, не роблячи негативного впливу один на одного. З іншої сторони або крім того, композиція буде складатися з агента, що підсилює функцію композиції, наприклад, цитотоксичного агента, цитокіна, препарату хіміотерапії або препарату-інгібітору росту. Такі молекули представлені зручним чином у комбінації й кількостях, ефективних для окремої мети.

#### Н. Похідні антитіл

Антитіла по даному винаході можуть бути додатково модифіковані для включення додаткових небілкових молекул, відомих науці й представлених на ринку. Молекули, що підходять для дериватизації антитіла, представлені переважним чином водорозчинними полімерами. Необмежуючі приклади водорозчинних полімерів включають наступні: поліетіленгліколь (ПЕГ), сополімери етіленгліколя/пропіленгліколя, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпірролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-тріоксан, сополімер етілена/ангідриди малеїнової кислоти, поліамінокислоти (гомополімери або випадкові сополімери), а також декстран або полі (n-вінілпірролідон)поліетіленгліколь, гомополімери поліпропіленгліколя, сополімери поліпропіленоксида/етіленоксида, поліоксигетильовані поліолі (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт і їхні суміші. Пропіональдегід поліетіленгліколя може бути переважним у виробництві завдяки його стійкості у воді. Полімер може мати будь-яку молекулярну масу й може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість полімерів, приєднаних до антитіла, може варіювати, і у випадку приєднання більш ніж одного полімеру, такі полімери можуть бути представлені однією або різними молекулами. У цілому, кількість і/або тип полімерів, що використовують для дериватизації, може бути визначене на основі (не обмежуючись) окремих властивостей або функцій антитіла, підданого поліпшенню, при цьому похідне антитіло буде використовуватися в лікуванні за певних умов і т.д.

#### О. Спосіб скринінгу

Ще один варіант втілення даного винаходу представляє спосіб визначення присутності поліпептиду FcRH5 у зразку, що підозрюється на вміст поліпептиду FcRH5, і такий спосіб складається у впливі на зразок кон'югатом антитіло-препарат, що зв'язується з поліпептидом FcRH5, з наступним визначенням зв'язування кон'югата антитіло-препарат з поліпептидом FcRH5 у зразку, при цьому присутність такого зв'язування є доказом наявності поліпептиду FcRH5 у зразку. У деяких випадках зразок може містити клітини (які можуть бути представлені раковими клітинами), підозрюваними або, що експресують поліпептид FcRH5. Використовуваний у даному способі кон'югат антитіло-препарат може в деяких випадках бути позначений обумовленою міткою, приєднаний до твердого субстрату й т.п.

Інший варіант втілення даного винаходу представляє спосіб діагностики наявності пухлини в ссавця, і такий спосіб складається в (а) контакті досліджуваного зразка, що містить пухлинні клітини, отримані в ссавця, з кон'югатом антитіло-препарат, що зв'язується з поліпептидом FcRH5; і (б) визначенні утворення комплексу між кон'югатом антитіло-препарат і поліпептидом FcRH5 у досліджуваному зразку, при цьому утворення такого комплексу є доказом присутності пухлини в ссавця. У деяких випадках кон'югат антитіло-препарат позначають обумовленою міткою, приєднують до твердого субстрату або т.п., і/або досліджуваний зразок пухлинних клітин одержують із індивідуума, підозрюваного на наявність ракової пухлини.

#### IV. Додаткові способи використання антитіл до FcRH5 і імунокон'югатів

##### A. Діагностичні способи й способи визначення

В одному аспекті винаходу антитіла до FcRH5 і імунокон'югати по винаходу використовують для визначення наявності FcRH5 у біологічному зразку. У контексті даного винаходу термін "визначення" охоплює якісне або кількісне визначення. У певних варіантах втілення винаходу біологічний зразок складається із клітини або тканини. У певних варіантах втілення винаходу такі тканини включають здорові й/або ракові тканини, що експресують велику кількість FcRH5 у порівнянні з іншими тканинами, наприклад, В-клітинами й/або тканинами, що містять В-клітини.

В одному аспекті винахід описує спосіб визначення наявності FcRH5 у біологічному зразку. У певних варіантах втілення винаходу спосіб складається в контакті біологічного зразка з антитілом до FcRH5 в умовах, що допускають зв'язування антитіла до FcRH5 з FcRH5, і визначенні утворення комплексу між антитілом до FcRH5 і FcRH5.

В одному аспекті винахід описує спосіб діагностики розладу, пов'язаного з підвищеною експресією FcRH5. У певних варіантах втілення винаходу спосіб складається в контакті досліджуваної клітини з антитілом до FcRH5, визначенні рівня експресії (якісним або кількісним чином) FcRH5 досліджуваною клітиною шляхом визначення зв'язування антитіла до FcRH5 з FcRH5, а також порівнянні рівня експресії FcRH5 досліджуваної клітини з рівнем експресії FcRH5 контрольної клітини (наприклад, здоровою клітиною з такої ж самої тканини, що й досліджувана клітина, або клітиною, що експресує FcRH5 на рівні, порівнянному з рівнем

експресії в здоровій клітині), при цьому більше високий рівень експресії FcRH5 досліджуваної клітини в порівнянні з контрольною клітиною вказує на наявність розладу, асоційованого з підвищеною експресією FcRH5. У певних варіантах втілення винаходу досліджувану клітину одержують від індивідуума, що підозрюється на наявність розладу, асоційованого з підвищеною експресією FcRH5. У певних варіантах втілення винаходу розлад представлений порушенням клітинної проліферації, таким як рак або пухлина.

Типові порушення проліферації клітин, які можуть бути діагностовані з використанням антитіла по винаходу, включають (але не обмежуючись) наступні: лімфома, неходжкінська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони.

У певних варіантах втілення винаходу спосіб діагностики або визначення складається у визначенні зв'язування антитіла до FcRH5 з FcRH5, що експресує на поверхні клітини або мембрані, отриманої із клітини, що експресує FcRH5 на своїй поверхні. У певних варіантах втілення винаходу спосіб складається в контакті клітини з антитілом до FcRH5 в умовах, що допускають зв'язування антитіла до FcRH5 з FcRH5, і визначенні утворення комплексу між антитілом до FcRH5 і FcRH5 на клітинній поверхні. Типовий аналіз для визначення зв'язування антитіла до FcRH5 з FcRH5, що експресує на клітинній поверхні, є FACS-аналіз.

Для визначення зв'язування антитіл до FcRH5 з FcRH5 можуть використовуватися й інші способи. Такі способи включають, не обмежуючись, аналізи зв'язування антигену, добре відомі науці й, що включають вестерн-блоттінг, радіоімуноаналіз, ІФА (імуноферментний аналіз), сендвіч-аналіз, аналізи імунопреципітації, імуноаналіз із використанням флуоресценції, імуноаналіз білка А або імуногістохімічні (ІГХ) аналізи.

У певних варіантах втілення винаходу антитіла до FcRH5 підлягають міченню. Мітки включають, але не обмежуються, мітки або молекули, які визначаються безпосереднім чином (такі як флуоресціюючі мітки, хромофорні, електронно-щільні, хемілюмінесцентні й радіоактивні мітки), а також молекули, такі як ферменти або ліганди, які визначаються непрямим чином, наприклад, за допомогою ферментативної реакції або молекулярної взаємодії. Типові мітки включають, не обмежуючись, наступні: радіоізотопи  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  і  $^{131}\text{I}$ , флуорофори, такі як хелати рідкоземельних елементів або флуоресціюючі мітки і їхні похідні, родамін і його похідні, дансил, умбелліферон, люциферази, наприклад, люциферазу світлячка й бактеріальну люциферазу (патент США No. 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофалазиндіони, пероксидазу редьки (HRP), лужну фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, сахаридоксидази, наприклад, глюкооксидазу, галактозооксидазу й глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, гетероциклічні оксидази, такі як уриказа й ксантинооксидаза, з'єднані з ферментом, що містить пероксид водню, що окисляє попередник барвника, такий як HRP, лактопероксидазу або мікропероксидазу, біотин/авідин, сплин-мітки, мітки бактеріофагами, стійкі вільні радикали й т.п.

У певних варіантах втілення винаходу антитіла до FcRH5 іммобілізовані на нерозчинній матриці. Іммобілізація спричиняє поділ антитіла до FcRH5 і будь-якого FcRH5, що залишається незв'язаним у розчині. Це звичайно супроводжується інсолубізацією антитіла до FcRH5 перед проведенням процедури аналізу шляхом абсорбції водонерозчинною матрицею або поверхнею (Bennich et al., патент США No. 3720760), або шляхом ковалентного зв'язування (наприклад, з використанням перехресного зв'язування із глутаральдегідом), або шляхом інсолубізації антитіла до FcRH5 після утворення комплексу між антитілом до FcRH5 і FcRH5, наприклад, у ході імунопреципітації.

Кожне із представлених вище варіантів втілення винаходу для діагностики або визначення може використовуватися разом з імунокон'югатом по винаходу замість або на додаток до антитіла до FcRH5.

#### Б. Способи лікування

Антитіло або імунокон'югат по винаходу може використовуватися, наприклад, у способах лікування *in vitro*, *ex vivo* і *in vivo*. В одному аспекті винахід описує способи інгібування росту або проліферації клітин *in vivo* або *in vitro*, і такий спосіб полягає у впливі на клітину антитілом до FcRH5 або імунокон'югатом в умовах, що забезпечують зв'язування імунокон'югата з FcRH5. "Інгібування росту або проліферації клітин" позначає зниження росту або проліферації клітини щонайменше на 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або 100 %, і включає індукування загибелі клітини. У певних варіантах втілення винаходу клітина представлена пухлинною клітиною. У певних варіантах втілення винаходу клітина представлена В-клітиною. У певних варіантах втілення винаходу клітина представлена ксенотрансплантатом, наприклад, як це пояснено в даній заявці.

В одному аспекті винаходу використовується антитіло або імунокон'югат для лікування або профілактики В-клітинного проліферативного порушення. У певних варіантах втілення винаходу порушення проліферації клітини пов'язане з підвищеною експресією й/або активністю FcRH5. Наприклад, у певних варіантах втілення винаходу порушення проліферації В-клітин пов'язане з підвищеною експресією FcRH5 на поверхні В-клітини. У певних варіантах втілення винаходу порушення проліферації В-клітин представлено пухлиною або раком. Приклади порушення проліферації В-клітин, що піддаються лікуванню антитілами або імунокон'югатами по винаходу, включають, але не обмежуються, наступне: лімфома, неходжкінська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони.

В одному аспекті винаходу представлені способи лікування порушення проліферації В-клітин, що складаються із введення індивідуумові ефективної кількості антитіла до FcRH5 або імунокон'югата. У певних варіантах втілення винаходу спосіб лікування порушення проліферації В-клітин складається у введенні індивідуумові ефективної кількості фармацевтичної композиції, що складається з антитіла до FcRH5 або імунокон'югата антитіла до FcRH5, і, у деяких випадках, щонайменше одного терапевтичного агента, такого як, наприклад, представлено нижче. У певних варіантах втілення винаходу спосіб лікування порушення проліферації клітин складається у введенні індивідуумові ефективної кількості фармацевтичної композиції, що складається з 1) імунокон'югата антитіла до FcRH5 і цитотоксичного агента; і, у деяких випадках, 2) щонайменше одного терапевтичного агента, такого як, наприклад, представлено нижче.

В одному аспекті винаходу, щонайменше, деякі антитіла або імунокон'югати по винаходу можуть зв'язуватися з FcRH5 видів організмів, за винятком людини. Відповідно до цього, антитіла або імунокон'югати по винаходу можуть використовуватися для зв'язування з FcRH5, наприклад, у культурі клітин, що містить FcRH5, людини або інших ссавців, що містять FcRH5, з якими антитіло або імунокон'югат по винаходу реагує перехресним чином (наприклад, шимпанзе, павіана, мармозетки, яванського макаки й макаки-резуса, свині або миші). В одному варіанті втілення винаходу антитіло до FcRH5 або імунокон'югат може використовуватися для поразки FcRH5 на В-клітинах шляхом контакту антитіла або імунокон'югата з FcRH5 для утворення антитіла або комплексу імунокон'югат-антиген, таким чином, кон'югований цитотоксин імунокон'югата надходить у клітину. В одному варіанті втілення винаходу FcRH5 представлений FcRH5 людини.

В одному варіанті втілення винаходу антитіло до FcRH5 або імунокон'югат може використовуватися в способі зв'язування FcRH5 в індивідуума, що страждає від розладу, що викликається підвищеною експресією й/або активністю FcRH5, і такий спосіб складається у введенні індивідууму антитіла або імунокон'югата для зв'язування FcRH5 в організмі індивідуума. В одному варіанті втілення винаходу антитіло або імунокон'югат інтерналізований в В-клітину, що експресує FcRH5. В одному варіанті втілення винаходу FcRH5 представлений FcRH5 людини, а індивідуум представлений людиною. З іншого боку, індивідуум може бути представлений ссавцем, що експресує FcRH5, з яким зв'язується антитіло до FcRH5. Крім того, індивідуум може бути представлений ссавцем, якому був уведений FcRH5 (наприклад, шляхом введення FcRH5 або експресії трансгена, що кодує FcRH5).

Антитіло до FcRH5 або імунокон'югат може бути уведений людині в терапевтичних цілях. Крім того, антитіло до FcRH5 або імунокон'югат може бути уведений ссавцеві, за винятком людини, у якого відзначається експресія FcRH5, з яким реагує антитіло перехресним чином (наприклад, приматові, свині, пацюкові або миші), у ветеринарних цілях або при використанні як тваринна модель захворювання людини. Такі тваринні моделі можуть використовуватися для оцінки терапевтичної ефективності антитіла або імунокон'югатів по винаходу (наприклад, для тестування доз і тривалості курсів введення).

Антитіла або імунокон'югати по винаходу можуть використовуватися поодиночі або в комбінації з іншими композиціями в ході лікування. Наприклад, антитіло або імунокон'югат по винаходу може бути уведений разом з, щонайменше, одним додатковим терапевтичним агентом і/або ад'ювантом. У певних варіантах втілення винаходу додатковий терапевтичний агент представлений цитотоксичним агентом, препаратом хіміотерапії або препаратом-інгібітором росту. В одному з таких варіантів втілення винаходу препарат хіміотерапії представлений препаратом або комбінацією препаратів, таких як, наприклад, циклофосфамід, гідроксидоаунорубін, адриаміцин, доксорубіцин, вінкрістин (Онковін™), преднізолон, CHOP, CVP або COP, або імунотерапевтичними препаратами, такими як антитіло до CD20 (наприклад,

Рітуксан®) або антитіло до VEGF (наприклад, Авастін®); така комбінована терапія може використовуватися в лікуванні раку й/або В-клітинних порушень, таких як порушення проліферації В-клітин, включаючи наступні: лімфома, неходжкінська лімфома (НХЛ), агресивна форма НХЛ, рецидивуюча агресивна форма НХЛ, рецидивуюча уповільнена НХЛ, рефрактерна НХЛ, рефрактерна уповільнена НХЛ, хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ), дрібноклітинна лімфоцитарна лімфома, лейкоз, волохато-клітинний лейкоз (ВКЛ), гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і лімфома із клітин мантийної зони.

Зазначені вище комбіновані терапії включають комбіноване введення (з використанням двох або більше терапевтичних агентів, включених в одну або окремі композиції) і роздільне введення, при цьому введення антитіла або імунокон'югата по винаходу може проводитися до, одночасно й/або після введення додаткового терапевтичного агента й/або ад'юванта. Антитіла або імунокон'югати по винаходу також можуть використовуватися в комбінації із променевою терапією.

Антитіло або імунокон'югат по винаходу (і будь-який додатковий терапевтичний агент або ад'ювант) може бути уведений будь-яким підходящим способом, включаючи парентеральне, підшкірне, інтраперітонеальні, внутрілегеневе й інтраназальне, а також, при необхідності місцевого лікування, введення усередину поразки. Парентеральні інфузії включають внутрім'язове, внутрішньовенне, інтраартеріальне, інтраперітонеальне або підшкірне введення. Крім того, антитіло або імунокон'югат вводять шляхом пульсуючої інфузійної терапії, зокрема, зі зниженням доз антитіла або імунокон'югата. Доза може вводитися будь-яким підходящим способом, наприклад, у вигляді ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, у залежності, частково, від того, чи є введення короточасним або хронічним.

Терапевтичні агенти, що використані у винаході (наприклад, антитіла або імунокон'югати по винаходу) будуть розроблені, дозовані й введені відповідно до належної клінічної практики. Фактори, які необхідно враховувати в даному контексті, включають окреме й піддане лікуванню порушення, окремий й підданий лікуванню ссавець, клінічний стан окремого пацієнта, причину порушення, місце введення агента, спосіб введення, графік введення й інші фактори, відомі фахівцям в даній області. Антитіло або імунокон'югат необов'язково, але в деяких випадках може містити один або більше агентів, що використані у цей час для профілактики або лікування окремого порушення. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості антитіла або імунокон'югата, присутніх у композиції, типу розладу, що піддається лікуванню й інших зазначених вище факторів. Звичайно використовуються ті самі дози й ті самі шляхи введення, що описані в даній заявці, або від приблизно 1 до 99 % дози, описаної в даній заявці, або будь-які інші дози й будь-які інші шляхи введення, які були емпірично/клінічно визначені як підходящі.

Для профілактики або лікування захворювання відповідна доза антитіла або імунокон'югата по винаходу (при використанні в якості монотерапії або в комбінації з одним або декількома іншими додатковими терапевтичними агентами, такими як препарати хіміотерапії) буде залежати від типу захворювання, що піддається лікуванню, типу антитіла або імунокон'югата, тяжкості й перебігу захворювання, незалежно від того, чи вводять антитіло або імунокон'югат у профілактичних або терапевтичних цілях, використовуюваної раніше терапії, історії хвороби пацієнта й відповіді на антитіло або імунокон'югат, а також на розсуд лікаря. Антитіло або імунокон'югат вводять відповідним чином пацієнтові в один час або у вигляді серії процедур. Залежно від типу й ступеня важкості захворювання, початкова кандидатна доза антитіла або імунокон'югата для введення пацієнтові становить від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг, при цьому агенти можуть вводитися в ході однієї або окремих процедур введення, або шляхом безперервної інфузії. Звичайна добова доза може варіювати від приблизно 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, залежно від зазначених вище факторів. Для повторного введення протягом декількох днів або більше, залежно від стану, лікування продовжують проводити до досягнення необхідної супресії або зниження симптомів захворювання. Одноразова типова доза антитіла або імунокон'югата буде перебувати в діапазоні від приблизно 0,05 мг/кг до приблизно 10 мг/кг. Таким чином, пацієнтові може бути введена одна або більше доз у розмірі приблизно 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг або 10 мг/кг (або будь-які їхні комбінації) антитіла або імунокон'югата. Такі дози можуть вводитися переривчасто, наприклад, щотижня або кожні три тижні (наприклад, пацієнт приймає від приблизно двох до приблизно двадцяти, або, наприклад, приблизно шість доз антитіла або імунокон'югата). Спочатку приймається початкова й більш висока навантажувальна доза, потім одна або декілька більш низьких доз. Типовий режим прийому доз може включати введення початкової навантажувальної дози, що становить приблизно 4 мг/кг, потім щотижневі введення підтримуючої дози антитіла в розмірі приблизно 2 мг/кг. Однак можуть використовуватися й інші режими прийому доз. Прогрес у такій терапії може бути з

легкістю підданий моніторингу з використанням стандартних способів і аналізів.

#### В. Аналізи активності

Антитіла до FcRH5 або імунокон'югати по винаходу можуть характеризуватися по своїм фізичним/хімічним властивостям і/або біологічної активності з використанням різних і відомих у науці аналізів.

##### 1. Аналізи активності

В одному аспекті винаходу представлені аналізи для ідентифікації антитіл до FcRH5 або імунокон'югатів, що володіють біологічною активністю. Біологічна активність може включати, наприклад, здатність інгібувати ріст або проліферацію клітин (наприклад, активність в "загибелі клітин"), або здатність індукувати загибель клітин, включаючи програмувальну загибель клітин (апоптоз). Також описані антитіла або імунокон'югати, що володіють такою біологічною активністю *in vivo* і/або *in vitro*.

У певних варіантах втілення винаходу антитіло до FcRH5 або імунокон'югат досліджується на предмет своєї здатності інгібувати ріст або проліферацію клітин *in vitro*. Аналізи інгібування росту або проліферації клітин добре відомі в науці. Певні аналізи клітинної проліферації, прикладами яких є описані тут аналізи "загибелі клітин", вимірюють життєздатність клітин. Один такий аналіз представлений аналізом життєздатності клітин з використанням люмінесценції CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, представленим на ринку компанією Promega (Madison, WI). Такий аналіз визначає кількість життєздатних клітин у культурі на основі кількісного визначення присутнього АТФ, що є індикатором метаболічно активних клітин. Див. Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, патент США No. 6602677. Аналіз може проводитися з використанням планшета з 96 або 384 лунками, що дозволяє надалі проводити автоматизований скринінг із високою продуктивністю (АСВП). Див. Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. Процедура аналізу має на увазі додавання одного реагенту (реагенту CellTiter-Glo®) безпосередньо до культивуючих клітин. Це приводить до лізису клітин і генерації люмінесцентного сигналу в ході реакції з люциферазою. Люмінесцентний сигнал пропорційний кількості присутнього АТФ, що, у свою чергу, прямо пропорційно кількості життєздатних клітин, що є присутні у культурі. Дані можуть бути записані з використанням люмінометра або ПЗС-камери для формування відеосигналів. Потужність люмінесценції виражається у вигляді відносних світлових одиниць (ВСО).

Інший аналіз проліферації клітин представлений "МТТ"-аналізом, тобто колориметричним аналізом, що вимірює окислювання 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміда у формазан редуктазою мітохондрій. Подібно аналізу CellTiter-Glo™, даний аналіз визначає кількість метаболічно активних клітин, що є присутні у культурі клітин. Див., наприклад, Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, і Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882.

В одному аспекті винаходу антитіло до FcRH5 тестують на предмет його здатності індукувати загибель клітини *in vitro*. Аналізи індукції загибелі клітин добре відомі в науці. У деяких варіантах втілення винаходу такі аналізи вимірюють, наприклад, втрату цілісності мембрани по захопленню пропідіума йодиду (ПЙ), трипанового синього або (див. Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11) 7AAD. У типовому аналізі захоплення ПЙ клітини культивують у модифікованому по способі Дульбеко середовищу Голка (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) з додаванням 10 % термоінактивованої ФБС (Hyclone) і 2 мМ L-глутаміна. Таким чином, аналіз проводять під час відсутності комплементу й імунних ефекторних клітин. Клітини висівають із щільністю  $3 \times 10^6$  на чашку в чашки 100×20 мм, і залишають на ніч. Потім середовище видаляють і заміняють свіжим середовищем або середовищем, що містить різні концентрації антитіла або імунокон'югата. Клітини інкубують протягом періоду 3 днів. Після обробки, моношари промивають у ФББ і роз'єднують у ході трипсінізації. Потім клітини центрифугують при 1200 об/хв протягом 5 хвилин при 4 °C, осад ресуспендують в 3 мл охолодженого  $\text{Ca}^{2+}$ -еднального буфера (10 мМ Hepes, pH 7,4, 140 мМ NaCl, 2,5 мМ  $\text{CaCl}_2$ ) і відміряють аліквоти в 35 мм пробірки із пробкою 12×75 мм (1 мл/пробірка, 3 пробірки для кожної групи обробки) для видалення аглютинованих клітин. Потім у пробірки вносять ПЙ (10 мкг/мл). Зразки можуть бути піддані аналізу з використанням проточного цитометру FACSCAN® і програмного забезпечення FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Потім визначають антитіла або імунокон'югати, що індукують статистично значиму загибель клітин, що ідентифікують по захопленню ПЙ.

В одному аспекті винаходу антитіло до FcRH5 або імунокон'югат тестують на предмет його здатності індукувати апоптоз (програмувальну загибель клітини) *in vitro*. Типовий аналіз антитіл або імунокон'югатів, що індукують апоптоз, представлений аналізом зв'язування аннексина. У типовому аналізі зв'язування аннексина клітини культивують і висівають на чашки відповідно до представленого вище опису. Потім середовище видаляють і заміняють свіжим середовищем

або середовищем, що містить від 0,001 до 10 мкг/мл антитіла або імунокон'югата. Після триденного періоду інкубації, моношари промивають у ФСБ і роз'єднують у ході трипсинізації. Потім клітини центрифугують, ресуспендують в охолоджену  $\text{Ca}^{2+}$ -свободному буфері й відбирають аліквоти відповідно до представленого вище опису. Потім у пробірки вносять мічений аннексин (наприклад, аннексин V-FITC (1 мкг/мл)). Зразки можуть бути піддані аналізу з використанням проточного цитометра FACSCAN® і програмного забезпечення FACSCONVERT® CellQuest (BD Biosciences). Після цього визначають антитіла або імунокон'югати, що індують статистично значиме зв'язування з аннексином у порівнянні з контролем. Інший типовий аналіз антитіл або імунокон'югатів, що індують апоптоз, є колориметричним ІФА гістонів ДНК для визначення міжнуклеосомного розпаду геномної ДНК. Такий аналіз може проводитися з використанням, наприклад набору Cell Death Detection ELISA (Roche, Palo Alto, CA).

Клітини для використання в кожному із представлених вище *in vitro* аналізів, включають клітини або лінії клітин, які природно експресують FcRH5 або які були отримані шляхом біосинтезу для експресії FcRH5. Такі клітини включають пухлинні клітини, що надлишково експресують FcRH5 у порівнянні зі здоровими клітинами, що виникли з однієї й тієї ж тканини. Такі клітини також включають клітинні лінії (включаючи лінії пухлинних клітин), що експресують FcRH5, і клітинні лінії, які не експресують FcRH5 природно, але які були трансфіковані нуклеїновою кислотою, що кодує FcRH5.

В одному аспекті винаходу антитіло до FcRH5 або імунокон'югат досліджується на предмет своєї здатності інгібувати ріст або проліферацію клітин *in vivo*. У певних варіантах втілення винаходу антитіло до FcRH5 або імунокон'югат досліджується на предмет своєї здатності інгібувати ріст пухлини *in vivo*. Для таких досліджень можуть використовуватися системи моделі *in vivo*, наприклад, моделі ксенотрансплантатів. У типовій системі ксенотрансплантата пухлинні клітини людини вводять підходящій тварині з ослабленим імунітетом, наприклад, мишам лінії SCID. Антитіло або імунокон'югат по винаходу вводять тварині. Визначають здатність антитіла або імунокон'югата інгібувати або знижувати ріст пухлини. У певних варіантах втілення винаходу в зазначеній вище системі ксенотрансплантата пухлинні клітини людини представлені пухлинними клітинами, отриманими в пацієнта-людини. Такі клітини, що використовують для одержання моделей ксенотрансплантатів, включають лінії клітин лейкозу й лімфоми людини, які включають, не обмежуючись, клітини BJAB-luc (лінія клітин лімфоми Беркитта з негативним показником вірусу Епштейна-Барра, трансфікованих геном-репортером люциферази), клітини Ramos (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), клітини SuDHL-4 (DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495), клітини DoHH2 (див. Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 5:221-224 (1991), і Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 8:1385-1391 (1994)), клітини Granta-519 (див. Jadayel, D.M. et al., Leukemia 11(1):64-72 (1997)). У певних варіантах втілення винаходу пухлинні клітини людини вводять підходящій тварині з ослабленим імунітетом шляхом підшкірної ін'єкції або трансплантацією в підходящому місці, наприклад, в жирову подушку молочної залози.

## 2. Аналізи зв'язування й інші аналізи

В одному аспекті винаходу антитіло до FcRH5 тестують на предмет його активності зв'язувати антиген. Наприклад, у певних варіантах втілення винаходу антитіло до FcRH5 тестують на предмет його здатності зв'язувати FcRH5, що експресується на поверхні клітин. Для цього може використовуватися аналіз FACS.

В одному аспекті винаходу для ідентифікації моноклонального антитіла, що конкурує з мишачим антитілом 10A8 (mu10A8 і/або гуманізоване антитіло 10A8v1 (hu10A8v1)) за зв'язування з FcRH5, можуть використовуватися аналізи конкурентного зв'язування. У певних варіантах втілення винаходу таке конкуруюче антитіло зв'язується з однією й тією же антигенною детермінантою (наприклад, лінійною або конформаційною антигенною детермінантою), з якою зв'язується мишаче антитіло 10A8 (mu10A8) і/або гуманізоване антитіло 10A8 v1 (hu10A8 v1). Типові аналізи конкурентного зв'язування включають, але не обмежуються, стандартні аналізи, представлені в Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Докладний опис стандартних способів картографування антигенної детермінанти, з якою зв'язується антитіло, представлено в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Вважається, що два антитіла зв'язуються з однією й тією же антигенною детермінантою, якщо кожне антитіло блокує зв'язування іншого антитіла на 50 % або більше.

У типовому аналізі конкурентного зв'язування іммобілізований FcRH5 інкубують у розчині, що складається з одного міченого антитіла, що зв'язується з FcRH5 (наприклад, мишачого антитіла 10A8 (mu10A8), химерного антитіла 10A8 (ch10A8) і/або гуманізованого антитіла 10A8

v1 (hu10A8 v1)), і другого неміченого антитіла, що піддається тестуванню на предмет його здатності конкурувати з першим антитілом за зв'язування з FcRH5. Друге антитіло може бути представлене в супернатанті гібридоми. Як контроль іммобілізований FcRH5 інкубують у розчині, що містить перше мічене антитіло, але не утримує друге немічене антитіло. Після інкубації в умовах, що допускають зв'язування першого антитіла з FcRH5, надлишкову кількість незв'язаного антитіла видаляють і вимірюють кількість мітки, пов'язаної з іммобілізованим FcRH5. Якщо кількість мітки, пов'язаної з іммобілізованим FcRH5, істотно знижено в досліджуваному зразку в порівнянні з контрольним зразком, це вказує на те, що друге антитіло конкурує з першим антитілом за зв'язування з FcRH5. У певних варіантах втілення винаходу іммобілізований FcRH5 є присутнім на поверхні клітини або препараті мембрани, що отриман із клітини, що експресує на своїй поверхні FcRH5.

В одному аспекті винаходу очищені антитіла до FcRH5 можуть бути додатково охарактеризовані серією аналізів, включаючи, але не обмежуючись, N-термінальне секвенування, аналіз амінокислот, ексклюзійну вискозную рідинну хроматографію без денатурації (BEHX), мас-спектрометрію, іонообмінну хроматографію й розщеплення папаїном.

В одному варіанті втілення винаходу представлено змінене антитіло, що зберегло деякі ефекторні функції, що робить його бажаним кандидатом для більшості видів застосувань, у яких період напівжиття антитіла *in vivo* є важливим, а окремі ефекторні функції (такі як K3Ц і A3КЦ) не є необхідними або є шкідливими. У певних варіантах втілення винаходу для забезпечення схоронності тільки необхідних властивостей вимірюється активність Fc антитіла. Для підтвердження зменшення/зниження активності K3Ц і/або A3КЦ можуть проводитися *in vitro* і/або *in vivo* аналізи цитотоксичності. Наприклад, для забезпечення того, що в антитіла відсутня здатність зв'язувати FcγR (і, отже, відсутня активність A3КЦ), але збережена здатність зв'язувати FcRn, можуть проводитися аналізи зв'язування рецептора Fc (FcR). Первинні клітини для опосередкування A3КЦ, NK-клітини, що експресують тільки FcγRIII, у той час як моноцити експресують FcγRI, FcγRII і FcγRIII. Експресія FcR на гематопоетичних клітинах узагальнена в Таблиці 3 на сторінці 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Приклад *in vitro* аналізу для оцінки активності A3КЦ молекули, що цікавить, описаний у патенті США No. 5500362 або 5821337. Корисні для таких аналізів ефекторні клітини включають моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і природні клітини-кілери (NK-клітини). З іншої сторони (або крім того), активність A3КЦ зазначених молекул може бути оцінена *in vivo*, наприклад, з використанням тваринної моделі, описаної Clynes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998). Для підтвердження того, що антитіло не здатне зв'язуватися з C1q і в нього відсутня активність K3Ц, також можуть проводитися аналізи зв'язування C1q. Для оцінки активації комплементу може виконуватися аналіз K3Ц, наприклад, описаний в Gazzano-Santaro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163. Шляхом використання відомих у науці способів може проводитися визначення зв'язування FcRn, а також кліренсу/періоду напівжиття *in vivo*.

Представлені нижче приклади приводяться тільки в ілюстративних цілях і не призначені для обмеження області застосування даного винаходу жодним чином.

Всі наведені в даній заявці посилання на патенти й літературні джерела включені в текст даної заявки у всій своїй повноті за допомогою посилання.

#### ПРИКЛАДИ

Представлені на ринку реагенти, зазначені в прикладах, використовували відповідно до інструкцій виробника, якщо не зазначене інше. Антитіла, що використовують в прикладах, є представленими на ринку антитілами або описаними тут антитілами. Джерела клітин, що зазначені у наступних прикладах і по всьому тексту даної заявки, ідентифіковані по облікових номерах і представлені в Американській колекції типових культур, Manassas, VA.

#### ПРИКЛАД 1: Одержання антитіл, що зв'язуються з FcRH5

Даний приклад ілюструє одержання моноклональних антитіл, які специфічним чином зв'язуються з FcRH5.

Способи одержання моноклональних антитіл відомі науці й описані, наприклад, в Goding (див. вище). Імуногени, які можуть використовуватися, включають очищений FcRH5, білки злиття, що містять FcRH5, і клітини, що експресують рекомбінантний FcRH5 на своїй поверхні. Вибір імуногена може проводитися фахівцем у даній області без невиправданих експериментів.

Мишей, наприклад, лінії Balb/c, імунізують імуногеном FcRH5, що емульгований у повному ад'юванті Фрейнда, і такий імуноген вводять підшкірно або інтраперітонеально в кількості від 1 до 100 мкг. Крім того, імуноген емульгують в ад'юванті MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) і вводять у подушечки стоп задніх лап тварин. Потім імунізованих мишей додатково стимулюють через 10-12 днів імуногеном, емульгованим в вибраному ад'юванте. Протягом декількох наступних тижнів миші можуть бути стимульовані



додатковими ін'єкціями. Періодично в мишей можуть відбиратися зразки сироватки, одержувані шляхом відбору зразків крові в позадуочномковій області, і такі зразки можуть бути тестовані в ході ІФА для визначення антитіл до FcRH5.

Після виявлення підходящого титру антитіла, твариною, "позитивним" на антитіла, може бути введена остання внутрішньовенна ін'єкція імуногена. Через три-чотири дні, тварин умирують і роблять забір клітин селезінки. Клітини селезінки піддають злиттю (з використанням 35 % поліетіленгліколя) з вибраною лінією клітин мієломи миші, такою як P3 × 63AgU.1 (ATCC No. CRL 1597). У результаті злиття одержують клітини гібридоми, які потім наносять на культуральний планшет з 96 лунками, що містять середовище HAT (гіпоксантин, аміноптерин і тимідин) для інгібування проліферації клітин, що не злилися, гібридів мієломи й гібридів клітин селезінки.

Клітини гібридоми піддають скринінгу в ході ІФА на предмет реакційноздатності відносно імуногена. Визначення "позитивних" клітин гібридоми, що секретують необхідні моноклональні антитіла до імуногену, перебуває в межах можливостей фахівця в даній області.

Позитивні клітини гібридоми можуть бути введені інтраперітонеально ізогенним мишам лінії Balb/c для вироблення асцитів, що містять моноклональні антитіла до імуногену.

З іншого боку, клітини гібридоми можуть бути вирощені в культурі тканини з використанням колб або роллер-флаконів. Очищення моноклональних антитіл, вироблених в асцитах, може супроводжуватися використанням осадження в амонію сульфаті з наступним проведенням гель-хроматографії. З іншого боку, може використовуватися афінна хроматографія на основі зв'язування антитіла з білком А або білком G.

Описані тут антитіла, спрямовані проти поліпептиду FcRH5, можуть бути з успіхом отримані при використанні таких способів. Зокрема, функціональні моноклональні антитіла до білка FcRH5, здатні розпізнавати й зв'язуватися з білком FcRH5 (як це обмірювано з використанням стандартного ІФА, аналізу сортування FACS і/або імуногістохімічного аналізу), можуть бути з успіхом отримані у відповідності зі способами, описаними в PRO820 (DNA56041), PRO52387 (DNA257845).

Крім одержання моноклональних антитіл, спрямованих проти поліпептиду FcRH5, як це описано в даній заявці, більша частина моноклональних антитіл може бути з успіхом кон'югована із клітинним токсином для використання в регуляції клітинного токсину в клітині (або тканині), що експресує поліпептид FcRH5 (in vitro і in vivo). Наприклад, дериватизовані токсином (наприклад, DM1) моноклональні антитіла до поліпептидів FcRH5 можуть бути з успіхом отримані відповідно до опису, представленим в PRO820 (DNA56041), PRO52387 (DNA257845).

А. Одержання стійких ліній клітин FcRH5/IRTA2 (PRO820, PRO52387)

Для одержання клітинних ліній для скринінгу антитіл до FcRH5, були отримані лінії клітин фібробластів миші SVT2, які стабільно експресують утримуючі й не утримуючі тег FcRH5/IRTA2. кДНК FcRH5/IRTA2 була піддана ампліфікації в ході ПЛР із використанням бібліотеки клітин селезінки й клонування з використанням TA (Invitrogen) в pCR4. Для одержання системи експресії без тега, відкриті рамки зчитування (OPC) були клоновані у вектор експресії ссавців pCMV.PD.nbe шляхом використання ПЛР для додавання сайтів рестрикції, розщеплення продукту ПЛР і лігвання у вектор. N-термінальні й утримуючі тег вектори експресії були отримані шляхом ампліфікації OPC FcRH5/IRTA2 без сигнальної послідовності й лігвання продукту ПЛР у вектор pMSCVneo (Clontech), що містить тег gD і сигнальну послідовність (M G G T A A R L G A V I L F V V I V G H G V R G K Y A L A D A S L K M A D P N R F R G K D L P V L D Q L L) (SEQ ID NO: 1). Для кожного FcRH5/IRTA2 були визначені дві стійкі лінії клітин для використання в скринінгу моноклональних антитіл на предмет специфічної реакційної здатності FACS і перехресної реакційної здатності між FcRH/IRTA. Вектори експресії з тегом gD і без тега були трансфіковані в SVT2 (ріст клітин у середовищі DMEM+10 % ФБС + 2mM L-глутаміна з високим вмістом глюкози) з використанням стандартного протоколу Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Carlsbad, Ca). Трансфектанти з тегом gD були піддані селекції в 0,5 мг/мл генецитіна (Invitrogen; Carlsbad, Ca) протягом одного тижня, а потім окремі клітини були піддані сортуванню FACS зі специфічним моноклональним антитілом з тегом gD (gD:952, Genentech; South San Francisco) для одержання найбільшого клону, що експресує. Трансфектанти без тега були піддані селекції в 0,5 мкг/мл пуроміцина (Calbiochem; La Jolla, Ca) до моменту виникнення видимих колоній. РНК із кожної колонії було ізольовано з використанням стандартного протоколу Trizol® (Invitrogen; Carlsbad, Ca) і аналізу TaqMan® (ABI; Foster City, Ca) для визначення найбільшого клону, експресували.

Б. Одержання моноклональних антитіл до FcRH5/IRTA2 (PRO820, PRO52387)

Були отримані мишачі моноклональні антитіла, здатні зв'язуватися з людським FcRH5.

Білок для імунізації мишей був отриманий шляхом тимчасової трансфекції векторів, що експресують позаклітинні домени (ECD) з тегом His FcRH5/IRTA2 у клітини CHO. Білок був очищений із супернатанта трансфікованих клітин на нікелевому стовпчику, а ідентичність білка була підтверджена з використанням N-кінцевого секвенування.

Десять мишей лінії Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) були гіперімунізовані з використанням білка з тегом полігістідина (HIS6 (SEQ ID NO:68)) у присутності ад'юванта Рибі (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO). В-клітини мишей мали високі титри антитіл до імуногену, що було визначено в ході прямого ІФА, і характеризувалися специфічним зв'язуванням з фібробластами миші SVT2, що стабільно експресують FcRH (визначалися FACS); такі клітини були злиті із клітинами міеломи миші (X63.Ag8.653; American Type Culture Collection, Rockville, MD) з використанням модифікованого протоколу, аналогічного описаному раніше протоколу (Kohler and Milstein, 1975; Hongo et al., 1995). Через 10-12 днів був зібраний супернатант, що був підданий скринінгу на предмет вироблення антитіла й зв'язування, що було визначено прямим ІФА й FACS. Позитивні клони, що характеризуються найвищими показниками зв'язування після другого циклу субклонування при обмеженому розділенні, були збагачені й культивовані для подальшої характеристики, включаючи FcRH1, -2, -3, -4 і -5 специфічність і перехресну реакційноздатність. Супернатант, зібраний з кожної лінії клітин гібридами, був очищений шляхом афінної хроматографії (Pharmacia fast protein liquid chromatography [FPLC]; Pharmacia, Uppsala, Sweden) з використанням модифікованого протоколу, описаного раніше (Hongo et al., 1995). Очищені препарати антитіл були піддані стерильній фільтрації (розмір пор 0,2 мкм; Nalgene, Rochester NY) і зберігалися при температурі 4°C у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (ФСБ).

Моноклональні антитіла до PRO52837 (FcRH5c/IRTA2c), здатні розпізнавати й зв'язувати білок FcRH5 (як це обмірювано стандартним ІФА, аналізом сортування FACS і/або імуногістохімічним аналізом), були з успіхом отримані й позначені в такий спосіб:

антитіло до FcRH5-9E2 (зазначене в тексті даної заявки як 9E2 або 9E2.1.1) (ATCC No. PTA-7207, розміщено 9 листопада 2005 р.),

антитіло до FcRH5-1H4 (зазначене в тексті даної заявки як 1H4 або 1H4.1.1) (ATCC No. PTA-7208, розміщено 9 листопада 2005 р.),

антитіло до FcRH5-13G9 (зазначеного в тексті даної заявки як 13G9 або 13G9.1.1) (описано в попередній заявці на патент США No. 61/211695 від 1 квітня 2009 р. і 61/166 214 від 2 квітня 2009 р.),

антитіло до FcRH5-4D10 (зазначеного в тексті даної заявки як 4D10 або 4D10.1.1) (ATCC No. PTA-7210, розміщено 9 листопада 2005 р.),

антитіло до FcRH5-6H1 (зазначеного в тексті даної заявки як 6H1 або 6H1.1.1) (ATCC No. PTA-7211, розміщено 9 листопада 2005 р.),

антитіло до FcRH5-8H6 (зазначеного в тексті даної заявки як 8H6 або 8H6.1.1) (ATCC No. PTA-7212, розміщено 9 листопада 2005 р.),

антитіло до FcRH5-7D11 (зазначеного в тексті даної заявки як 7D11 або 7D11.1.1) (описано в тексті даної заявки),

антитіло до FcRH5-10A8 (зазначеного в тексті даної заявки як 10A8 або 10A8.1.1) (описано в тексті даної заявки).

#### 1. Визначення афінності (аналіз Biacore)

Афінність IgG відносно зв'язування FcRH була розрахована на основі значень констант асоціації й дисоціації, обмірюваних з використанням системи поверхневого плазмонного резонансу Biacore 2000 (Biacore, Inc.). Для ковалентного зв'язування антитіл до IgG миші (BR-1008-338) був активований чип-біосенсор з використанням N-етіл-N'-(3-диметиламінопропил)-карбодііміда гідрохлориду (EDC) і N-гідрокісукциніміда (NHS) відповідно до інструкцій виробника (Biacore, Inc.). Для кожного циклу кінетичного аналізу на чип наносилося 5 мкл 100 нМ IgG, потім вводилися дворазові серійні розведення різних FcRH при швидкості потоку 20 мкл/хв протягом 150 секунд. Дисоціація антигену відслідковувалася протягом 180 секунд перед регенерацією. Рівноважні константи дисоціації при температурі 25 °C були розраховані шляхом апроксимації даних з моделлю зв'язування Ленгмюра 1:1. Рухливий буфер був представлений ФСБ із 0,05 % твіну-20. Результати наведені в Таблиці 9 нижче. Всі антитіла зв'язували антиген з достатнім ступенем афінності для використання в терапевтичних цілях.

Таблиця 9

Мишаче антитіло	Афінність до антигену людини (Biacore)	Перехресна реакційноздатність Супо (FACS) у стабільних трансфікованих клітинах
1H4	6 нМ	X*
4D10	3 нМ	
6H1	< 0,1 нМ	X
7D11	6 нМ	X*
8H6	20 нМ	X (ИГХ)
9E2	0.2 нМ	
10A8	Н/Д	X
10F5	Н/Д	X
13G9	19 нМ	X

\*Дуже незначна при концентрації, що насичує

Г. Одержання й секвенування химерних антитіл до FcRH5 людини

1. Химерне антитіло 7D11 (ch7D11) до FcRH5 людини

5 Для одержання химерного 7D11 IgG1, вся РНК була виділена із клітин гібридами 7D11 з використанням міні-набору Qiagen RNeasy Mini Kit (номер по каталозі 74104) і пропонуваного протоколу виробника. Шляхом використання N-кінцевих амінокислотних послідовностей для легких і важких ланцюгів моноклонального антитіла 7D11, були отримані праймери ПЛР, специфічні для кожного ланцюга. Зворотні праймери для ОТ-ПЛР були розроблені для

10 відповідності каркасній ділянці 4 сімейства генів, що відповідає N-кінцевий послідовності. Також були розроблені праймери для додавання необхідних сайтів рестрикції для клонування. Для легкого ланцюга такі праймери були представлені EcoRV на N-кінці й KpnI на 3'-кінці каркасної ділянки 4. Для важкого ланцюга сайти, що додали, були представлені BsiWI на N-кінці й ApaI, розташованим декілька нижче сполуки VH-CH1. Послідовності праймерів були наступними:

15 7D11LCF.EcoRV (прямий праймер легкого ланцюга 7D11):  
5'- GATCGATATCYTGCTACMCARTGTCCAGC-3" (SEQ ID NO: 2)  
(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)  
C7F7LCR.KpnI (зворотний праймер легкого ланцюга 7D11):  
5'- TTDDAKYTCCAGCTTGGTACC-3" (SEQ ID NO: 3)

20 (B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)  
1D1(IIID-2)HCF.BsiWI (прямий праймер важкого ланцюга 7D11):  
5'- GATCGACGTACGCTGARGTGTCARYTGGTGGARTCTGG-3" (SEQ ID NO: 4)  
(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)  
C7F7HCR.ApaI (зворотний праймер важкого ланцюга 7D11):

25 5'- ACAGTGGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT-3" (SEQ ID NO: 5)  
(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

Реакції ОТ-ПЛР для легкого й важкого ланцюгів проводилися з використанням набору Qiagen One-step RT-PCR kit (номер по каталозі 210210) і пропонуваніх реакційних сумішей і умов. Вектори pRK для експресії IgG у клітинах ссавців уже були описані раніше (Gorman et al., DNA Prot Eng Tech 2:3-10 (1990). Вектори були модифіковані із включенням певних ділянок розпізнавання ендонуклеазною рестриктазою для полегшення клонування й експресії (Shields et al., J Biol Chem 2000; 276: 6591-6604). Ампліфікований VL був клонований у вектор експресії pRK клітини ссавця (pRK.LPG3.HumanKarra), що містить константний домен капа-ланцюга людини. Ампліфікований VH був введений у вектор експресії pRK клітини ссавця

35 (pRK.LPG4.HumanHC), що кодує константний домен IgG1 людини повної довжини.

Послідовність ДНК була отримана для всієї ділянки, що кодує, результуючих легкого (Фігура 1) і важкого (Фігура 3) ланцюгів химерного мишино-людського антитіла до FcRH5 людини (ch7D11). Кодуємий поліпептид для мишино-людських химерних легких і важких ланцюгів, що кодуються ДНК, представлений на Фігурах 2 і 4, відповідно. Після секвенування ДНК була

40 проаналізована експресія плазмід.

Плазміди були тимчасово трансфіковані в 293 клітини (лінія клітин ембріональної нирки людини, трансформованих аденовірусом) (Graham et al., J. Gen. Virol., 36: 59-74 (1977)). Зокрема, 293 клітини були розділені за день до трансфекції й висіяні на середовищі, що містить

сироватку. Наступного дня була додана двохланцюгова ДНК, отримана у вигляді преципітату кальцію фосфату, з наступним додаванням pAdVantage™ DNA (Promega, Madison, WI); потім клітини інкубували протягом ночі при температурі 37 °C. Клітини були культивовані в середовищі, що не містить сироватку, і зібрані через 4 дні. Білки антитіла були очищені від супернатанта трансфікованих клітин на колонку з білком А; потім буфер був замінений на 10

мМ натрію сукцинат, 140 мМ NaCl, pH 6,0, і концентрований з використанням Centricon-10 (Amicon). Ідентичність білків була підтверджена шляхом N-кінцевого секвенування. Концентрації білка визначалися шляхом кількісного аналізу амінокислот. Антитіла тестувалися на предмет зв'язування з людським FcRH5 у ході FACS з використанням клітин SVT2, як це описано нижче.

2. Химерне антитіло 10A8 (ch10A8) до FcRH5 людини

Антитіло 10A8 було отримано у вигляді члена панелі антитіл до FcRH5 гібридами. Мишачі/людські химери таких антитіл були отримані з використанням ОТ-ПЛР, як це описано вище, для ампліфікації варіабельних доменів легкого й важкого ланцюгів гібридами з використанням всієї мРНК як субстрат. Варіабельні домени легкого ланцюга були клоновані у вектор pRK.LPG3.HumanKappa, що містить константний капа-домен людини, у той час як варіабельні домени важкого ланцюга були клоновані у вектор pRK.LPG4.HumanHC, що кодує константні домени IgG1 людини повної довжини. Послідовність ДНК була отримана для всієї ділянки, що кодує, результуючих легкі (Фігура 5) і важкі (Фігура 7) ланцюги химерного мишино-людського антитіла до FcRH5 людини (ch10A8), що дозволило ідентифікувати каркасну ділянку й ділянки CDR варіабельних доменів. Поліпептид, що кодується для мишино-людських химерних легких і важких ланцюгів 10A8, що кодуються ДНК, представлений на Фігурах 6 і 8, відповідно.

Послідовності праймерів, що використовують для ОТ-ПЛР клонування 10A8, представлені наступними:

10A8LCF.EcoRV (прямий праймер легкого ланцюга 10A8):

5'- GATCGATATCGTGATGACCCARTCTCAY AA-3" (SEQ ID NO: 6)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

10A8LCR.KpnI (зворотний праймер легкого ланцюга 10A8):

5'- TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC-3" (SEQ ID NO: 7)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

10A8HCF.BsiWI (прямий праймер важкого ланцюга 10A8):

5'- GATCGACGTACGCTGARGTGTCARYTG GTGGARTCTGG-3" (SEQ ID NO: 8)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

10A8HCR (зворотний праймер важкого ланцюга 10A8):

5'-CTGGWCAGGGMTCCAGAGTTCCA-3" (SEQ ID NO: 9)

(B=G/T/C, K=G/T, Y=C/T, M=A/C, R=A/G, D=G/A/T. S=G/C, H=A/T/C)

3. Химерне антитіло 13G9 (ch13G9) до FcRH5 людини

Антитіло 13G9 було отримано у вигляді члена панелі антитіл до FcRH5 гібридами. Мишачі/людські химери таких антитіл були отримані з використанням ОТ-ПЛР для ампліфікації варіабельних доменів легкого й важкого ланцюгів гібридами з використанням всієї мРНК в якості субстрата. Варіабельні домени легкого ланцюга були клоновані у вектор pRK.LPG3.HumanKappa, що містить константний капа-домен людини, у той час як варіабельні домени важкого ланцюга були клоновані у вектор pRK.LPG4.HumanHC, що кодує константні домени IgG1 людини повної довжини. Секвенування ДНК дозволило ідентифікувати каркасні ділянки й ділянки CDR варіабельних доменів. Химерні й гуманізовані версії 13G9 описані в попередніх заявках на патент США No. 61/211695 від 1 квітня 2009 р. і 61/166214 від 2 квітня 2009 р. (включені в справжній документ у всій своїй повноті за допомогою посилання).

Г. Одержання гуманізованого антитіла 10A8 до FcRH5 людини

Номера залишків приводяться згідно Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Використовуються однобуквені позначення амінокислот. Дегенерація ДНК представлена з використанням коду IUB (N=A/C/G/T, D=A/G/T, V=A/C/G, B=C/G/T, H=A/C/T, K=G/T, M=A/C, R=A/G, S=G/C, W=A/T, Y=C/T).

1. Гуманізоване антитіло до FcRH5

Були отримані різні гуманізовані антитіла до FcRH5. Домени VL і VH з мишачого антитіла до FcRH5 (10A8) були вирівняні відносно консенсусних доменів VL капа I (huKI) і консенсусного домену VH підгрупи III (huIII) людини. Вирівнювання варіабельного домену легкого ланцюга мишачого антитіла 10A8 з консенсусною послідовністю капа I людини представлено на Фігурі 9. Гіперваріабельні ділянки з мишачого антитіла до 10A8 (mu10A8) були убудовані в акцепторну каркасну ділянку консенсусної послідовності людини для одержання прямого HVR-трансплантата MA10A8 (що позначають в тексті даної заявки як "10A 8-трансплантат" або

"гуманізоване" антитіло з 10A8-трансплантатом, або "трансплантат hu10A8"). CDR 10A8 були отримані з використанням вектора експресії ссавців, що містить сигнальну послідовність ссавців, консенсусну послідовність варіабельного домену V капа І людини й константну послідовність капа І людини. З МАТ донора в плазмиду-акцептор не було трансфіковано жодного залишку миші. CDR були трансфіковані з використанням простих олігонуклеотидів, що кодують кожний CDR, а також одноланцюгової ДНК плазмиди-акцептора з дотриманням протоколу мутагенезу по Kunkle. Щеплені залишки й варіабельний домен (SEQ ID NO: 19) легкого ланцюга (hu10A8 v1) отриманої версії 10a8 людини представлені на Фігурі 9.

Подібним чином, CDR варіабельного домену важкого ланцюга мишачого антитіла 10A8 (mu10A8) були убудовані у вектор, що містить сигнальну послідовність ссавця, консенсусну послідовність підгрупи III важкого ланцюга людини й послідовності, що кодують константні домени IgG1 людини повної довжини. З донора в плазмиду-акцептор не було трансфіковано жодного залишку миші. Вирівнювання варіабельного домену важкого ланцюга мишачого антитіла 10A8, щеплених залишків підгрупи III варіабельного домену людини, і варіабельний домен (SEQ ID NO: 21) важкого ланцюга результуючого антитіла 10A8 людини версії 1 (hu10A8 v1) представлені на Фігурі 10.

Для початкових досліджень химерні й гуманізовані версії 1 (hu10A8 v1) були тимчасово експресовані з використанням 293 клітин з лінії клітин ембріональної нирки людини, трансформованих аденовірусом (Graham et al., 1977). Для кожного варіанта до 0,9 мл середовища DMEM, що містить 0,1 мл FuGene, було додано 10 мкг плазмід легкого й важкого ланцюга (див. опис вище). Такої суміші було досить для додавання до одного флакона T250 з 75 % конфлюентом 293 клітин з 24 мл середовища, і флакони були інкубовані протягом ночі при температурі 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub>. Наступного дня клітини були промиті ФСБ, і середовище було замінено середовищем, що не утримує сироватки, але з доданням інсуліну і следовими елементами. Через 5 днів була зібрана кондиціонуюче середовище, а антитіла були очищені шляхом афінної хроматографії на сефарозі з білком А.

Значення відносної афінності зв'язування гуманізованої версії 1 (hu10A8 v1) і химери були обмірювані з використанням FACS і аналізу Скетчарда (див. нижче). Оскільки афінність гуманізованої версії 1 виявилася еквівалентною химері, яких-небудь інших версій для підвищення афінності не було отримано, і подальші дослідження ґрунтуються на даній версії і її кон'югованих похідних (див. нижче).

## 2. Одержання IgG

Плазмиди були тимчасово трансфіковані в 293 клітини (лінія клітин ембріональної нирки людини, трансформованих аденовірусом) (Graham et al., J. Gen. Virol., 36: 59-74 (1977)). Зокрема, 293 клітини були розділені за день до трансфекції й висіяні на середовищі, що містить сироватку. Наступного дня була додана двохланцюгова ДНК, отримана у вигляді преципітату кальцію фосфату, з наступним додаванням ДНК pAdVantage™ (Promega, Madison, WI); потім клітини інкубували протягом ночі при температурі 37 °C. Клітини були культивовані в середовищі, що не містить сироватку, і зібрані через 4 дні. Білки антитіла були очищені від супернатанта трансфікованих клітин на колонку з білком А; потім буфер був змінений на 10 мМ натрію сукцинат, 140 мМ NaCl, pH 6,0, і концентрований з використанням Centricon-10 (Amicon). Ідентичність білків була підтверджена шляхом N-кінцевого секвенування. Концентрації білка визначалися шляхом кількісного аналізу амінокислот. Антитіла тестувалися на предмет зв'язування з людським FcRH5 у ході FACS з використанням клітин SVT2, як це описано нижче.

## 3. Аналіз зв'язування (FACS-Аналіз)

Для визначення перехресної реакційноздатності антитіл до FcRH5, зв'язування варіантів IgG із клітинами SVT2, що експресують FcRH1-6 людини, було проаналізовано з використанням FACS-аналізу.

Приблизно 10<sup>6</sup> клітин SVT2, що стабільно експресують huFcRH1-6 з тегом gD, в 100 мкл були інкубовані з 1,0 мкг мишачого або химерного АТ [мишаче антитіло з тегом gD (позитивний контроль), мишаче антитіло до FcRH5 (1H4) ("mu1H4"), мишаче антитіло до FcRH5 (4D10) ("mu4D10"), мишаче антитіло до FcRH5 (6H1) ("mu6H1"), мишаче антитіло до FcRH5 (7D11) ("mu7D11"), химерне антитіло до FcRH5 (7D11) ("ch7D11"), мишаче антитіло до FcRH5 (8H6) ("mu8H6"), мишаче антитіло до FcRH5 (9E2) ("mu9E2") або мишаче антитіло до FcRH5 (13G9) ("mu13G9")]. Інкубація клітин SVT2, що стабільно експресує порожній вектор, проводилася з використанням тих же самих антитіл, що й для негативного контролю. Кон'юговане ФЕ щуряче антитіло до MuIgG<sub>1</sub>, щуряче антитіло до MuIgG<sub>2a+b</sub>, або мишаче антитіло до HuIgG використовувалося в якості другого детекторного антитіла. Результати приводяться на Фігурі 14. Всі досліджувані антитіла специфічно зв'язуються з FcRH5, за винятком мишачого антитіла до FcRH5 (6H1), що зв'язується перехресним чином з FcRH1. Мишаче антитіло до FcRH5 (8H6)

є слабким, але специфічним відносно FcRH5, що було визначено в ході аналізу FACS.

Для подальшого визначення перехресної реакційноздатності антитіл до FcRH5, зв'язування супернатантів варіантів IgG із клітинами SVT2, що експресують FcRH1-6 людини, було проаналізовано з використанням FACS-аналізу.

5 Приблизно  $10^6$  клітин SVT2, що стабільно експресують huFcRH1-6 з тегом gD, були інкубовані в 1,0 мкг очищеного антитіла Ms з тегом gD або 100 мкл (концентрація невідома) супернатанта мишачого АТ гібридами (мишаче антитіло до FcRH5 (10A8) ("mu10A8"), мишаче антитіло до FcRH5 (10F5) ("mu10F5")). Інкубація клітин SVT2, що стабільно експресують порожній вектор, проводилася з використанням тих же самих антитіл, що й для негативного контролю. Кон'юговане з ФЕ щуряче антитіло до MslgG<sub>1</sub> використовувалося в якості другого детекторного антитіла. Результати приводяться на Фігурі 15. Антитіла mu10A8 і mu10F5 специфічно зв'язували FcRH5.

15 Для подальшого визначення зв'язування мишачих антитіл до FcRH5, з використанням FACS-аналізу було визначено зв'язування варіантів IgG із клітинами Раджі, що експресують FcRH5 людини, і клітинами 293Т, що експресують FcRH5 яванського макака.

20 Приблизно  $10^6$  клітин Раджі, стабільно трансфікованих FcRH5 людини, і клітини 293Т, тимчасово трансфіковані супо FcRH5 з тегом gD, були інкубовані в 0,1 мкг біотинільованному контролі (ізотип миші), біотинільованного мишачого антитіла з тегом gD, біотинільованного mu6H1, біотинільованного mu13G9 або біотинільованного mu7D11 в 100 мкл буфера FACS (ФСБ, 0,5 % БСА, 0,05 % натрію азиду). Кон'югований з ФЕ стрептавідин використовувався в якості другого обумовленого реагенту. Результати представлені на Фігурах 16 і 17.

25 Для додаткового FACS-аналізу антитіл до FcRH5 1,0 мкг, 0,1 мкг або 0,01 мкг антитіла було титровано на мільйон клітин BJAB, що стабільно експресують huFcRH5, і клітин SVT2, що стабільно експресують супоFcRH5. Приблизно  $10^6$  клітин в 100 мкл було інкубовано з різними кількостями (1,0 мкг, 0,1 мкг або 0,01 мкг) мишачого АТ mu1H4, mu6H1, mu7D11, mu9E2, mu10A8, mu10F5 або mu13G9 на мільйон клітин BJAB, що стабільно експресують huFcRH5, і клітин SVT2, що стабільно експресують супоFcRH5. Інкубація з 1,0 мкг/ $10^6$  клітин підходящого контролю (IgG, ізотип миші) використовувалася як негативний контроль. Кон'юговане з ФЕ щуряче антитіло до MslgG<sub>1</sub> або щуряче антитіло до MulgG<sub>2a+b</sub> використовувалося в якості другого детекторного антитіла. Результати представлені на Фігурах 18 і 19. mu1H4, mu6H1, mu7D11, mu9E2, mu10A8, mu10F5 або mu13G9 реагують перехресним чином з FcRH5 яванського макаки (як це визначено FACS-аналізом), і можуть використовуватися в доклінічних дослідженнях безпеки, що оцінюють залежну від мішені токсичність.

35 Для FACS-аналізу кон'югати препарат-антитіло до FcRH5 (див. Приклад 2), КАП FcRH5, були додані в концентраціях, що збільшуються (0,1, 1,0 і 10 мкг/мол) до 106 клітин OPM2, трансфікованим і що стабільно експресує FcRH5 людини, або клітинам SVT2, трансфікованим і що стабільно експресує FcRH5 яванського макаки, у реакційному об'ємі 100 мкл. Потім зразки інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі в буфері FACS (ФСБ, 0,5 % БСА, 0,1 % натрію азид) для інгібування інтерналізації. Після промивання, клітини були ресуспендовані в буфері FACS і інкубовані протягом 30 хвилин при кімнатній температурі з 20 мкл мишачого антитіла до IgG людини, кон'югованого з фікоеритрином (мишаче АТ до IgG людини-ФЕ), у якості другого обумовленого антитіла в реакційному об'ємі 100 мкл. Після промивання, клітини були фіксовані в 200 мкл 2 % параформальдегіда/ФСБ, після чого був проведений аналіз способом потокової цитометрії. Така ж процедура використовувалася для 45 HulgG, але тільки при більш високій концентрації (10 мкг/мл). HulgG використовувалося в якості ізотипового контролю для встановлення початкового значення PMT для лінії клітин. Потокова цитометрія була проведена з використанням BD FACSCalibur®, і для кожного зразка було записано геометричне середнє значення інтенсивності флуоресценції. Записані дані були проаналізовані з використанням програмного забезпечення FlowJo v8.4.5 (див. Фігури 20-25). 50 Thio-hu10A8-NC(A118C) і thio-hu10A8-LC(V205C) зв'язувалися однаковим чином при різних концентраціях некон'югованого антитіла із клітинами OPM2, що стабільно експресують huFcRH5, і клітинами SVT2, що стабільно експресують FcRH5 яванського макаки (визначено FACS-аналізом). Thio-ch10A8-NC(A118C)-MC-vc-PAB-MMAE, thio-hu10A8-NC(A118C)-MC-vc-PAB-MMAE, thio-hu10A8-LC(V205C)-MC-vc-PAB-MMAE, ch10A8-SPDB-DM4 й hu10A8-SPDB-DM4 55 зв'язувалися однаковим чином при різних концентраціях КАП із клітинами OPM2, що стабільно експресують huFcRH5 (визначено FACS-аналізом).

#### 4. Визначення афінності (аналіз Скетчарда)

60 Для додаткового визначення зв'язування мишачих антитіл до FcRH5 і клонів IgG, був проведений аналіз зв'язування по Скетчарду йодованих варіантів IgG із клітинами OPM2, що експресують huFcRH5, і клітинами SVT2, що експресують FcRH5 яванського макаки.

Для аналізу Скетчарда 0,5 нМ мишачого антитіла до FcRH5 або клону IgG, мічених I<sup>125</sup>, було зіставлено відносно неміченого мишачого антитіла до FcRH5 або клону IgG, відповідно, у концентрації від 50 до 0,02 нМ (12-етапне серійне розведення 1:2) у присутності трансфікованої лінії клітин OPM2, що стабільно експресує FcRH5 людини, і трансфікованої лінії клітин SVT2, що стабільно експресує FcRH5 яванського макаки. Після 4-годинної інкубації при температурі 4 °С, клітини були промиті, і кількість конгломератів клітин було підраховано з використанням лічильника гама-часток (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Waltham, MA). Всі дії проводилися в трьох повторностях, а підрахунок проводився протягом 10 хвилин. Для розрахунку Kd використовувався середній показник числа імпульсів у хвилину й програма New Ligand (Genentech, South San Francisco, CA). Результати представлені в Таблиці 10 ("ms" відноситься до мишачого антитіла).

Таблиця 10

Визначення афінності з використанням аналізу по Скетчарду

Клітинна лінія	PUR/Партія	АТ	Kd (нМ)	Середньоквадратична помилка
BJAB.huFcRH5	50095-16	ms10A8	0,44	0,046
SVT2.cyFcRH5	50095-16	ms10A8	2,74	0,530
OPM2.huFcRH5	PUR 15312	ch10A8	0,52	0,036
SVT2.cyFcRH5	PUR 15312	ch10A8	0,98	0,022
OPM2.huFcRH5	PUR 16560	thio-ch10A8.HC	0,85	0,050
SVT2.cyFcRH5	PUR 16560	thio-ch10A8.HC	1,57	0,000
OPM2.huFcRH5	CA51434-50	hu10A8 v1	1,44	0,150
SVT2.cyFcRH5	CA51434-50	hu10A8 v1	3,04	1,340
OPM2.huFcRH5	PUR 17978	thio.hu10A8.HC	1,77	0,240
OPM2.huFcRH5	PUR 17979	thio.hu10A8.LC	1,21	0,142
SVT2.cyFcRH5	PUR 17978	thio.hu10A8.HC	3,12	0,139
SVT2.cyFcRH5	PUR 17979	thio.hu10A8.LC	2,63	1032,300
BJAB.huFcRH5	50095-53	ms6H1	0.19	0.007
SVT2.cyFcRH5	50095-93	ms6H1	0.38	0.027

## ПРИКЛАД 2: Одержання кон'югатів антитіла до FcRH5-препарат (КАП)

Препарати, що використовують для одержання кон'югатів антитіла-препарат (КАП) до FcRH5 людини, включають мایتансиноїд DM1 і DM4 і похідне доластатина 10 (мометилауристатин Е (ММАЕ)). (Див. US20050276812 від 31 травня 2005 р. і US20050238649 від 5 листопада 2004 р. (включені в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання)). DM1, DM4 і ММАЕ є інгібіторами мітозу, які, щонайменше, в 100 разів більше токсичні, ніж мітотичні інгібітори алкалоїду барвінку, що використовують в хіміотерапевтичному лікуванні НХЛ (Doronina et al., Bioconjug. Chem., 17:114-123 (2006); Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778-784 (2003); Erickson et al., Cancer Res., 66: 4426-4433 (2006)). Лінкери, що використовують для одержання КАП, представлені SMCC для DM1, SPDB для DM4 і MC для ММАЕ або MC-vc-PAB для ММАЕ. Для DM1 і DM4, антитіла були з'єднані з DM1 і DM4 за допомогою е-аміногрупи лізіна з використанням стійкого тіоефірного лінкера SMCC (що позначають після кон'югації як MCC). З іншого боку, для DM4 антитіла були з'єднані з DM4 за допомогою е-аміногрупи лізіна з використанням лінкера SPDB. DM1, приєднаний за допомогою лінкера SMCC, стійкий до розщеплення в умовах, що відновлюють. Крім того, КАП SMCC-DM1 і SPDB-DM4 індукують клітинну токсичність, якщо КАП інтерналізован і спрямований на лізосому, що викликає вивільнення сполуки лізин-N<sup>e</sup>-DM1, що є ефективним антимітотичним агентом усередині клітини, і при вивільненні із клітини сполуки лізин-N<sup>e</sup>-DM1 не є токсичним (Erickson et al., Cancer Res., 66: 4426-4433 (2006)). Для ММАЕ, антитіла були з'єднані з ММАЕ за допомогою цистеїна з використанням малеїмідокапроїл-валін-цитруллін (vc)-p-амінобензилілоксікарбоніла (MC-vc-PAB). Лінкер MC-vc-PAB розщеплюється міжклітинними протеазами, такими як катепсин В, і при такому розщепленні вивільняє незв'язаний препарат (Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778-784 (2003)), у той час як лінкер MC стійкий до розщеплення міжклітинними протеазами.

Кон'югати антитіла-препарат (КАП) до FcRH5 людини з використанням SMCC-DM1 були отримані в ході процедури, подібної до процедури, що описана в заявці на патент США No. 11/141344 від 31 травня 2005 р. (включено в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання). Буфер для очищених антитіл до FcRH5 людини був замінений розчином, що

містить 50 мМ калію фосфату й 2 мМ ЕДТА, рН 7,0. SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) був розчинений у диметилацетаміді (DMA) і доданий до розчину з антитілом для одержання кінцевого молярного співвідношення SMCC/АТ 10:1. Реакція тривала протягом трьох годин при кімнатній температурі й перемішуванні. Модифіковане SMCC антитіло було згодом очищене на стовпчику, що знесолений GE Healthcare HiTra (G-25), урівноваженою з використанням 35 мМ натрію цитрату з 150 мМ NaCl і 2 мМ ЕДТА, рН 6,0. DM1, розчинений в DMA, був доданий до суміші SMCC-антитіло з одержанням молярного співвідношення DM1:антитіло, рівного 10:1. Реакція тривала протягом 4-20 годин при кімнатній температурі й перемішуванні. Розчин з модифікованим DM1 антитілом був підданий діалізації з 20 об'ємами ФСБ для видалення непрореагуваного DM1, стерильної фільтрації, і зберігався при температурі 4 °С. Як правило, у ході такого процесу досягається вихід антитіла 40-60 %. Як правило, мономерність препарату становить >95 %, як це оцінено гель-фільтрацією й способом розсіювання лазерного випромінювання. Оскільки максимум абсорбції DM1 становить при 252 нМ, кількість препарату, пов'язаного з антитілом, може бути визначене шляхом диференціальних вимірів абсорбції при 252 і 280 нМ. Як правило, співвідношення препарат:антитіло складало 3:4.

Для одержання кон'югата антитіло до FcRH5 людини-препарат SPDB DM4 з 3-4 препаратами/АТ, антитіло спершу було модифіковано SPDB[ефір 4-(2-піридилдитіо) масляної кислоти й N-гідроксисукциніміда] для одержання дитіопіридилових груп. До антитіла був доданий SPDB в 6-кратному молярному надлишку, і реакція проводилася протягом 90 хвилин при кімнатній температурі. Реакція проводилася в 50 мМ калію фосфату, рН 7 з 50 мМ NaCl, 2 мМ ЕДТА при концентрації антитіла 5-10 мкг/мл. Після реакції з SPDB був доданий етанол у кінцевій концентрації 5 % в/в, а також утримуючий тіол препарат DM4, молярна концентрація якого була в 1,7 разів більше, ніж SPDB. Інкубація проводилася при кімнатній температурі протягом 16 годин. Кон'югат очищається в ході діалізації, гель-фільтрації або катіон-обмінної хроматографії.

Кон'югати антитіло-препарат (КАП) до FcRH5 людини з використанням лінкера препарату MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE були отримані в ході процедури, подібної до процедури, описаної в заявці на патент США No. 10/983340 від 05.11.2004 (включено в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання). Очищене антитіло до FcRH5 було розчинено в 500 мМ натрію бората й 500 мМ натрію хлориду при рН 8,0, і надалі піддано впливу надлишком 100 мМ дитіотреїтола (DTT). Після інкубації при температурі 37 °С протягом приблизно 30 хвилин, буфер був замінений шляхом елюювання через смолу Sephadex G25 і елююван із ФСБ і 1 мМ DTPA. Значення тіол/АТ було перевірено шляхом визначення зниженої концентрації антитіла в ході поглинання розчину при 280 нМ і концентрації тіола в ході реакції з DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) і визначення поглинання при 412 нМ. Відновлене антитіло, розчинене у ФСБ, було охолоджено на льоді. Лінкер препарату MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE в DMSO був розчинений в ацетонітрилі й воді, і потім доданий до охолодженого й відновленого антитіла у ФСБ. Після годинної інкубації для зупинки реакції й обмеження будь-яких непрореагованих тіолових груп антитіл, була додана надлишкова кількість maleimide. Реакційна суміш була концентрована шляхом ультрацентрифугування, і кон'югат антитіло-препарат був очищений і знесолений шляхом елюювання через смолу G25 у ФСБ, відфільтрований через фільтри 0,2 мкм у стерильних умовах і заморожений для зберігання.

ПРИКЛАД 3: Одержання антитіл до FcRH5 з введенням у ході рекомбінації цистеїном

Одержання антитіл до FcRH5 з доданим у ході рекомбінації цистеїном було здійснено відповідно до представленого тут опису. Залишки цистеїна можуть бути додані в легкий ланцюг, важкий ланцюг або ділянку Fc антитіла для можливості кон'югації з різними препаратами. У препараті антитіла до FcRH5 з доданим у ході рекомбінації цистеїном (10A8), ДНК, що кодує легкий ланцюг, була піддана мутації для заміни цистеїна на валін у положенні 205 по Kabat, як це показано на Фігурі 13. ДНК, що кодує важкий ланцюг, була піддана мутації для заміни цистеїна на аланін у положенні 118 по EU у важкому ланцюзі (послідовне положення 118, номер для Kabat 114), як це показано на Фігурі 12. Ділянка Fc антитіл до FcRH5 може бути підданий мутації для заміни цистеїна серіном у положенні 400 по EU у ділянці Fc важкого ланцюга (послідовне положення 400, номер для Kabat 396).

ПРИКЛАД 4: Аналіз загибелі пухлинних клітин in vivo з використанням кон'югатів мишачого антитіла до FcRH5 - препарату

А. Ксенотрансплантати

Для дослідження ефективності різних антитіл до FcRH5, мишачі антитіла були кон'юговані з DM1, після чого був проаналізований ефект кон'югованого варіанта на пухлині в мишей.

Зокрема, була проаналізована здатність антитіл викликати регресію пухлин у клітинах VJAB з люциферазою (лінія клітин лімфоми Беркитта, стабільно трансфікованих FcRH5 людини).



Після трансфекції pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 у клітини BJAB з люциферазою і пуроміцином (Calbiochem, San Diego, CA), клітини, що вижили, були піддані аутоклонуванню з використанням FACS для експресії середнього масштабу з антитілами до FcRH5 (7D11). Після аутоклонування, лінія клітин BJAB з люциферазою, що експресує FcRH5 (експресія близько нагадує експресію плазмацитами, як це визначено FACS-аналізом), була вибрана в ході FACS-аналізу з використанням антитіл до FcRH5 (7D11). Як негативний контроль клітини BJAB з люциферазою були трансфіковані порожнім вектором pRK.CMV.PD.nbe.

Для аналізу ефективності мишачих антитіл, самки мишей CB17 ICR SCID (вік 6-8 тижнів, отримані від Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) були інокульовані підшкірно з використанням  $2 \times 10^7$  BJAB-FcRH5 клітин за допомогою ін'єкції в бічну поверхню миші CB17 ICR SCID, при цьому ксенотрансплантаційним пухлинам дали зрости до приблизно 128 мм<sup>3</sup> у середньому. День 0 відноситься до дня, коли розмір пухлин становив приблизно 100-250 мм<sup>3</sup>, і коли була введена перша/або єдина доза, якщо не зазначене інше. Об'єм пухлини розраховувався на основі двох розмірів, обмірюваних за допомогою штангенциркуля, і виражався в мм<sup>3</sup> відповідно до формули:  $V = 0,5a \times b^2$ , де  $a$  і  $b$  є більшим і меншим діаметрами пухлини, відповідно. Дані, зібрані для кожної експериментальної групи, були виражені у вигляді середнього + СО. Групи з 8 мишей були піддані лікуванню із щотижневим введенням внутрішньовенної (в/в) дози 400 мкг антитіла-препарату/м<sup>2</sup> миші (що відповідає ~8-10 мг КАП/кг миші) з КАП до FcRH5 або контрольного кон'югатами антитіло-препарат на день 0 і день 7. Пухлини вимірювали два рази в тиждень у ході всього експерименту. Маса тіла мишей вимірюлася один раз у тиждень протягом усього експерименту. Перед тим, як розмір пухлини досяг 2000 мм<sup>3</sup>, або коли пухлини мали ознаки загрозової виразки, миші були піддані евтаназії. Всі протоколи для тварин були затверджені Інституціональним комітетом по утриманню й використанню тварин (IACUC).

Лінкери, що використовують між антитілом і токсином, були представлені тіоефірним кросслінкером SMCC для DM1. Додаткові лінкери можуть включати дисульфідний лінкер SPP або тіоефірний кросслінкер SMCC для DM1 або MC, або MC-валін-цитруллін(vс)-PAB, або (валін-цитруллін (vс)) дипептидний лінкерний реагент), що має малеїмідний компонент і пара-амінобензилкарбамоїл (PAB) компонент, що саможертвує, для монометилаурістатина E (MMAE) або монометилаурістана F (MMAF). Токсини, що використовують, були представлені DM1. Додаткові токсини можуть включати MMAE або MMAF. Антитіла для даного експерименту включали mu7D11, описане в Chang et al. PCT/US2004/043514 (WO 2005/063299) (включено в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання), а також описане тут антитіло до FcRH5 (див. Приклад 1У, таке як mu7D11, mu6H1, mu10A8, mu13G9, and mu9E2).

Негативний контроль включав кон'югати, засновані на антитілі gr-120 (SMCC-DM1).

#### Б. Результати

##### 1. Ксенотрансплантати BJAB-FcRH5

На 48 день використання кон'югатів антитіл до FcRH5 mu7D11, mu6H1, mu10A8, mu13G9 і mu9E2 і препаратів у зазначених дозах, відзначалося інгібування росту пухлини в мишей SCID з пухлинами BJAB-FcRH5 у порівнянні з негативним контролем gr-120 SMCC-DM1. КАП вводився у двох дозах (як це зазначено нижче в Таблиці 11) на день 0 і день 7 для всіх КАП і контролю. Зокрема, усі КАП до FcRH5 значно інгібували ріст пухлини (Фігура 26).

Крім того, у цьому ж самому дослідженні в кожній групі прийому дози була визначена процентна зміна маси тіла протягом перших 17 днів. Результати (Фігура 27) показали, що введення таких КАП з мишачим антитілом до FcRH5 не призводило до істотного зниження маси тіла або втрати маси тіла протягом даного періоду часу.

Більше того, у Таблиці 11 показана кількість мишей із загальної кількості всіх досліджуваних мишей з досягненням часткової регресії (ЧР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав нижче 50 % від об'єму пухлини, обмірюваного на день 0), повної ремісії (ПР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав до 0 мм<sup>3</sup>) (Н/П = не застосовно); (ДО= кількість спостережуваних пухлин на момент закінчення дослідження).

Таблиця 11

Введені антитіла (лікування)	КО	ЧР	ПР	Доза препарату - DM1 (мкг/м <sup>2</sup> )	Доза АТ (мг/кг)	Співвідношення препарату (Препарат/АТ)
Mu-anti-gp120	8/8	0	0	--	10,8	--
Mu-anti-gp120-mcc-dm1	8/8	0	0	400	8,4	3,2
Mu-anti-FcRH5 (7D11)	8/8	0	0	--	10,8	--
Mu-anti-FcRH5 (7D11)-mcc-dm1	8/8	0	0	400	9	3
Mu-anti-FcRH5 (6H1)-mcc-dm1	6/8	1	2	400	10,8	2,5
Mu-anti-FcRH5 (10A8)-mcc-dm1	7/8	3	1	400	10	2,7
Mu-anti-FcRH5 (13G9)-mcc-dm1	7/8	0	1	400	8,4	3,2
Mu-anti-FcRH5 (9E2)-mcc-dm1	8/8	2	0	400	10,4	2,6

ПРИКЛАД 5: Аналіз інгібування росту пухлини *in vivo* кон'югатами ТіоМАТ до FcRH5 - препарат

#### 5 А. Ксенотрансплантати

Для дослідження ефективності кон'югатів ТіоМАТ hu10A8 - препаратів з кон'югатами MC-vc-PAB-MMAE і hu10A8 -препарат з SPDB-DM4, був проаналізований вплив кон'югатів ТіоМАТ 10A 8-препарат і кон'югатів 10A 8-препарат на пухлини в мишей.

10 Зокрема, була проаналізована здатність антитіл викликати регресію пухлин у клітинах OPM2 (лінія клітин множинної мієломи, стабільно трансфікованих FcRH5 людини).

15 Після трансфекції лінеаризованим pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 у клітини OPM2 і селекції з використанням пуроміцина (Calbiochem, San Diego, CA), клітини, що вижили, були сепаровані на клітини, що експресують FcRH5 і мічені біотином (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) FcRH5.7D11, і мікрогранули MACS з антитілом до біотину з використанням стовпчика MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Експресія FcRH5 після сепарації була підтверджена FACS-аналізом з використанням антитіл до FcRH5 (10A8) і лінії клітин OPM2, що трансфіковані порожнім вектором pRK.CMV.PD.nbe (негативний контроль).

20 Для аналізу ефективності кон'югатів ТіоМАТ hu10A 8-препарат з кон'югатами MC-vc-PAB-MMAE і hu10A 8-препарат з SPDB-DM4, самки мишей CB17 ICR SCID (вік 6-8 тижнів, отримані від Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) були інокульовані підшкірно з використанням  $2 \times 10^7$  OPM2-FcRH5 клітин за допомогою ін'єкції в бічну поверхню миші CB17 ICR SCID, при цьому ксенотрансплантаційним пухлинам дали вирости до приблизно 180 мм<sup>3</sup> у середньому. День 0 відноситься до дня, коли розмір пухлин становив приблизно 100-250 мм<sup>3</sup>, і коли була введена перша й/або єдина доза, якщо не зазначене інше. Об'єм пухлини розраховувався на основі двох розмірів, обмірюваних за допомогою штангенциркуля, і виражався в мм<sup>3</sup> відповідно до формули:  $V = 0,5a \times b^2$ , де  $a$  і  $b$  є більшим і меншим діаметрами пухлини, відповідно. Дані, зібрані для кожної експериментальної групи, були виражені у вигляді середнього + СО. Групи з 8 мишей були піддані введенню однократної внутрішньовенної (в/в) дози 2, 4 або 8 мг КАП/кг із використанням КАП до FcRH5 або контрольних кон'югатів антитіло-препарат. Пухлини вимірювали два рази на тиждень у ході всього експерименту. Маса тіла мишей вимірюлася один раз у тиждень протягом усього експерименту. Перед тим, як розмір пухлини досяг 3000 мм<sup>3</sup>, або коли пухлини мали ознаки загрозливої виразки, миші були піддані евтаназії. Всі протоколи для тварин були затверджені Інституціональним комітетом по утриманню й використанню тварин (IACUC).

35 Негативний контроль включав кон'югати, засновані на антитілі до HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (SPDB-DM4 and MC-vc-PAB-MMAE).

#### Б. Результати

##### 1. Ксенотрансплантати OPM2-FcRH5

40 Протягом 35-денного періоду використовувалися кон'югати антитіло-препарат і дози, як це представлено в Таблиці 12: hu10A8, кон'юговане з SPDB-DM4 (Hu-anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4), і hu10A8 ТіоМАТ, кон'юговане з MC-vc-PAB-MMAE ("thio-HC-hu-anti-FcRH5(10A8)-vc-E"), що характеризувалися інгібуванням росту пухлини в мишей SCID з пухлинами OPM2-FcRH5 у порівнянні з негативним контролем, тобто гуманізованим антитілом до HER2, кон'югованим з SPDB-DM4 (Hu-anti-HER2 (4D5)-SPDB-DM4), і гуманізованим тіомоноклональним антитілом до HER2 (4D5), кон'югованим з MC-vc-PAB-MMAE ("thio-hu-anti-HER2 (4D5)-vc-E"). КАП водився в однократній дозі (як це зазначено нижче в Таблиці 12) на день 0 для всіх КАП і контролю.

Зокрема, усі КАП до FcRH5 і гуманізовані КАП TіoMAT до FcRH5 значно інгібували ріст пухлини (Фігура 28). Кон'югати з основою на антитілі до HER2, використовувалися як негативний контроль ("Thіo-hu-anti-Her2 (4D5)-vc-E" і "Anti-Her2 (4D5)-spdb-dm4").

Крім того, у цьому ж самому дослідженні в кожній групі прийому дози була визначено  
5 процентна зміна маси тіла протягом перших 14 днів. Результати (Фігура 29) показали, що введення таких гуманізованих антитіл до FcRH5 і КАП з гуманізованим TіoMAT до FcRH5 не призводило до істотного зниження маси тіла або втрати маси тіла протягом даного періоду часу.

Більше того, у Таблиці 12 показана кількість мишей із загальної кількості всіх досліджуваних  
10 мишей з досягненням часткової регресії (ЧР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав нижче 50 % від об'єму пухлини, обмірюваного на день 0), повної ремісії (ПР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав до 0 мм<sup>3</sup>) (Н/П = не застосовно); (ДО = кількість спостережуваних пухлин на момент закінчення дослідження).

Таблиця 12

Введені антитіла (лікування)	КО	ЧР	ПР	Доза препарату - DM4 або MMAE (мкг/м <sup>2</sup> )	Доза АТ (мг/кг)	Співвідношення препарату (Препарат/АТ)
Носій*	8/8	0	0	н/п	--	н/п
Thіo-hu-anti-Her2 (4D5)-vc-E	8/8	0	0	227	8	1,9
Anti-Her2 (4D5)-spdb-dm4	8/8	0	0	196	4	3,02
Thіo-HC(A118C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E	7/8	2	1	112	4	1,94
Thіo-HC(A118C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E	8/8	6	1	224	8	1,94
Thіo-LC(L205C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E	8/8	4	0	109	4	1,89
Thіo-LC(L205C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-vc-E	8/8	3	1	218	8	1,89
Hu-anti-FcRH5-10A8-spdb-DM4	8/8	2	1	98	2	3,13
Hu-anti-FcRH5-10A8-spdb-DM4	2/8	2	6	196	4	3,13

\*Носій = 20 мМ гістидіна ацетату, рН 5,5, 240 мМ сахарози, 0,02 % ПС20

15

ПРИКЛАД 6: Аналіз інгібування росту пухлини in vivo кон'югатами гуманізованого антитіла до FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантати

Для дослідження ефективності кон'югатів hu10A 8-препарат з SPDB-DM4 ("hu-Anti-FcRH5  
20 (10A8)-SPDB-DM4") у різних дозах, були проаналізовані ефекти кон'югованого антитіла на пухлині в мишей.

Зокрема, була проаналізована здатність антитіл викликати регресію пухлин у клітинах OPM2 (лінія клітин множинної мієломи, стабільно трансфікованих FcRH5 людини).

Після трансфекції лінеаризованим pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 у клітини OPM2 і селекції з  
25 використанням пуроміцину (Calbiochem, San Diego, CA), клітини, що вижили, були сепаровані на клітини, що експресують FcRH5 і мічені біотином (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) FcRH5.7D11, і мікрогранули MACS з антитілом до біотину з використанням стовпчика MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Експресія FcRH5 після сепарації була підтверджена FACS-аналізом з  
30 використанням антитіл до FcRH5 (10A8) і лінії клітин OPM2, трансфікованих порожнім вектором pRK.CMV.PD.nbe (негативний контроль).

Для аналізу ефективності кон'югатів hu10A 8-препарат з SPDB-DM4, самки мишей CB17 ICR SCID (вік 6-8 тижнів, отримані від Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) були інокульовані підшкірно з використанням 2×10<sup>7</sup> OPM2-FcRH5 клітин за допомогою ін'єкції в бічну поверхню  
35 миші CB17 ICR SCID, при цьому ксенотрансплантаційним пухлинам дали вирости до приблизно 180 мм<sup>3</sup> у середньому. День 0 відноситься до дня, коли розмір пухлин становив приблизно 100-250 мм<sup>3</sup>, і коли була введена перша й/або єдина доза, якщо не зазначене інше. Об'єм пухлини розраховувався на основі двох розмірів, обмірюваних за допомогою штангенциркуля, і

виражався в мм<sup>3</sup> відповідно до формули:  $V=0,5a \times b^2$ , де а і b є більшим і меншим діаметрами пухлини, відповідно. Дані, зібрані для кожної експериментальної групи, були виражені у вигляді середнього + СО. Групи з 9 мишей були піддані введенню однократної внутрішньовенної (в/в) дози, що варіює від 0,5 до 12 мг КАП/кг із використанням КАП до FcRH5 або контрольного кон'югатів антитіло-препарат. Пухлини вимірювали два рази в тиждень у ході всього експерименту. Маса тіла мишей вимірюлася один раз у тиждень протягом усього експерименту. Перед тим, як розмір пухлини досяг 3000 мм<sup>3</sup>, або коли пухлини мали ознаки загрозливої виразки, миші були піддані евтаназії. Всі протоколи для тварин були затверджені Інституціональним комітетом по утриманню й використанню тварин (IACUC).

Негативний контроль включав кон'югати, засновані на антитілі до HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб)) (SPDB-DM4).

#### Б. Результати

##### 1. Ксенотрансплантати OPM2-FcRH5

У ході 50-денного періоду використовувалися кон'югати антитіло-препарат і дози, як це представлено в Таблиці 13: гуманізоване антитіло до FcRH5 (10A8) (hu10A8), Кон'юговане з SPDB-DM4 ("hu-anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4"), інгібувало ріст пухлини в мишей SCID з пухлинами OPM2-FcRH5 у порівнянні з негативним контролем, тобто гуманізованим антитілом до HER2, кон'югованим з SPDB-DM4 ("hu-anti-HER2 (4D5)-SPDB-DM4"). КАП вводився в однократній дозі (як це зазначено нижче в Таблиці 13) на день 0 для всіх КАП і контролю. Зокрема, доза 8 мг/кг і 12 мг/кг КАП гуманізованого антитіла до FcRH5 значно інгібувала ріст пухлини (Фігура 30a).

Крім того, у цьому ж самому дослідженні в кожній групі прийому дози була визначена процентна зміна маси тіла протягом перших 14 днів. Результати (Фігура 30b) показали, що введення таких гуманізованих антитіл до FcRH5 і КАП з гуманізованим ТіоМАТ до FcRH5 не призводило до істотного зниження маси тіла або втрати маси тіла протягом даного періоду часу.

Більше того, у Таблиці 13 показана кількість мишей із загальної кількості всіх досліджуваних мишей з досягненням часткової регресії (ЧР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав нижче 50 % від об'єму пухлини, обмірюваного на день 0), повної ремісії (ПР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав до 0 мм<sup>3</sup>) (Н/П = не застосовно); (ДО = кількість спостережуваних пухлин на момент закінчення дослідження).

Таблиця 13

Введені антитіла (лікування)	КО	ЧР	ПР	Доза препарату - DM4 (мкг/м <sup>2</sup> )	Доза АТ (мг/кг)	Співвідношення препарату (Препарат/АТ)
Носій*	9/9	0	0	н/п	н/п	н/п
Hu-Anti-Her2-SPDB DM4	9/9	0	0	587	12	3,02
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	30	0.5	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	60	1	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	0	0	119	2	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	9/9	2	1	238	4	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	1/8	1	8	477	8	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	0/9	4	9	715	12	3,8

\*Носій = 20 мМ гістидина ацетату, рН 5,5, 240 мМ сахарози, 0,02 % ПС20

ПРИКЛАД 7: Аналіз зниження проліферації клітин in vitro з використанням кон'югатів ТіоМАТ до FcRH 5-антитіло

З використанням аналізу проліферації клітин і трансфікованої лінії клітин OPM2, що стабільно експресує FcRH5 людини (OPM2.CMV.PD.FcRH5.SP.2), була обмірювана in vitro здатність кон'югатів антитіл hu10A8 і hu10A8 thioMAb (HC(A118C) із препаратом (включаючи hu anti-FcRH5 (10A8)-незв'язане, thio-HC(A118C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-незв'язане, hu anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4, thio-HC(A118C)-hu-anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE)). Аналіз життєздатності клітин з використанням властивості люмінесценції CellTiter-Glo® представлений на ринку (Promega Corp., Madison, WI) і є однорідним способом аналізу, заснованим на рекомбінантній експресії люциферази жесткокрилих (US 5583024; US 5674713; US 5700670).

Такий аналіз проліферації клітин визначає кількість життєздатних клітин у культурі на основі кількісного визначення присутнього АТФ, що є індикатором метаболічно активних клітин (Crouch et al., J. Immunol. Metho., 160: 81-88 (1993); US 6602677). Аналіз CellTiter-Glo® проводився з використанням 96 лунок, забезпечуючи можливість проведення автоматизованого високопродуктивного скринінгу (HTS) (Cree et al., AntiCancer Drugs, 6:398-404 (1995)). Процедура однорідного аналізу включає додавання одного реагенту (реагенту CellTiter-Glo®) безпосередньо в клітини, що культивуються в середовищі з доданою сироваткою.

Однорідний формат "додавання-змішування-вимір" призводить до лізису клітин і одержанню люмінесцентного сигналу, пропорційного кількості присутнього АТФ. Субстрат (люциферин жука) піддається окисному декарбоксилюванню рекомбінантною люциферазою світлячка із супутнім переходом АТФ в АМФ і генерацією фотонів. Життєздатні клітини виражаються у відносних одиницях люмінесценції (БОЛ). Дані можуть бути записані з використанням люмінометра або ПЗС-камери для формування відеосигналів. Протягом часу вимірюється вихідна потужність люмінесценції, виражена у вигляді БОЛ. % БОЛ є нормалізованим процентним показником БОЛ у порівнянні з контролем "кон'югата без препарату". З іншого боку, фотони в ході люмінесценції можуть бути підраховані сцинтилятором у присутності сцинтилянта. Одиниці світла можуть бути представлені у вигляді числа імпульсів у секунду.

Ефективність кон'югатів гуманізованого антитіла-препарат була обмірювана в ході аналізу проліферації клітин з дотриманням протоколу, адаптованого з аналізу життєздатності клітин з використанням властивості люмінесценції CellTiter-Glo® (Promega Corp. Technical bulletin TB288; Mendoza et al., Cancer Res., 62: 5485-5488 (2002)):

1. Аліквота 50 мкл культури клітин, що містить приблизно 75 000 клітин OPM2.CMV.PD.FcRH5.SP.2 у середовищі була поміщена в кожну лунку 96-ямкового матового планшета.

2. hu10A8 або thio-HC(A118C)-hu-anti-FcRH5 (10A8) або КАП (50 мкл) були додані в трикратних повторностях в експериментальні лунки для одержання кінцевої концентрації 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 14, 4,6 або 1,5 нг/мл, при цьому в лунки з контролем "кон'югата без препарату" було додане тільки середовище; інкубація проводилася протягом 3 днів.

3. Температура лунок була врівноважена до кімнатної температури протягом приблизно 30 хвилин.

4. Був доданий реагент CellTiter-Glo (100 мкл).

5. Вміст був перемішаний протягом 2 хвилин з використанням орбітальної мішалки для індукування лізису клітин.

6. Планшет був інкубован при кімнатній температурі протягом 10 хвилин для стабілізації люмінесцентного сигналу.

7. Люмінесценція була записана й зазначена на графіках у вигляді %БОЛ (відносні одиниці люмінесценції).

8. Як контроль ця ж лінія клітин паралельно аналізувалася з нерелевантними неєднальними антитілами hu-anti-Her2.4D5 або КАП (включаючи hu-anti-Her2.4D5-незв'язане, hu-anti-Her2.4D5.HC.A118 C-незв'язане hu anti-Her2.4D5-SPDB-DM4, hu anti-Her2.4D5.HC.A118C-MC-vc-PAB-MMAE).

Носій: клітини OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP.2, вирощені в RPMI1640/20 %ФБС/2 мм глутаміна/1,0 мкг/мл пуроміцина.

Ефективність кон'югатів мишачих антитіл і препарату представлена на Фігурах 31 і 32. Результати такого аналізу зазначені в мг/мл у вигляді IC50. IC50 є концентрацією антитіла або КАП, що необхідний для 50 % інгібування росту клітин. Некон'юговані hu10A8 і thio-hu anti-FcRH5 (10A8)-HC(A118C) не інгібували ріст клітин OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP.2 in vitro зі значенням IC50 10 мг/мл (верхня межа титрації концентрації в ході аналізу). Hu anti-FcRH5(10A8)-SPDB-DM4 і thio-hu anti-FcRH5(10A8)-HC(A118C)-MC-vc-PAB-MMAE приводили до інгібування росту клітин OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP.2 зі значенням IC50 0,03 і 0,04 мг/мл, відповідно. Крім того, hu anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4 викликає повне інгібування росту клітин OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP.2 при більше високих концентраціях. З контрольних антитіл і КАП, тільки hu anti-Her2.4D5-SPDB DM4 інгібувало ріст клітин OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP.2 зі значенням IC50 1,8 мг/мл. Оскільки SPDB DM4 є лінкером-препаратом, що розщеплюється, таке інгібування росту є, цілком ймовірно, "фоновою" активністю препарату.

ПРИКЛАД 8: Аналіз інгібування росту пухлини in vivo кон'югатами гуманізованого антитіла до FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантати

Для дослідження ефективності кон'югата гуманізованого антитіла (10A8)-препарату (hu Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE) у комбінації з Велкаде® (бортезомібом), були проаналізовані

ефекти кон'югованого антитіла у вигляді монотерапії або в сполученні з Велкаде® на пухлині (ксенотрансплантат множинної мієломи OPM2-FcRH5) у мишей.

Зокрема, була проаналізована здатність антитіла й Велкаде® викликати регресію пухлин у клітинах OPM2 (лінія клітин множинної мієломи, стабільно трансфікованих FcRH5 людини). Після трансфекції лінеаризованим pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 у клітини OPM2 і селекції з використанням пуроміцина (Calbiochem, San Diego, CA), клітини, що вижили, були сепаровані на клітини, що експресують FcRH5 і мічені біотином (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) FcRH5.7D11, і мікрогранули MACS з антитілом до біотину з використанням стовпчика MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Експресія FcRH5 після сепарації була підтверджена FACS-аналізом з використанням антитіл до FcRH5 (10A8) і лінії клітин OPM2, трансфікованих порожнім вектором pRK.CMV.PD.nbe (негативний контроль).

Для аналізу ефективності кон'югатів hu anti-FcRH5 10A8 з MC-vc-PAB-MMAE у вигляді монотерапії й у комбінації з Велкаде®, самки мишей CB17 ICR SCID (вік 6-8 тижнів, отримані від Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) були інокульовані підшкірно з використанням  $2 \times 10^7$  OPM2-FcRH5 клітин за допомогою ін'єкції в бічну поверхню миші CB17 ICR SCID, при цьому ксенотрансплантаційним пухлинам дали вирости до приблизно  $331 \text{ мм}^3$  у середньому. День 0 відноситься до дня, коли розмір пухлин становив приблизно  $172\text{-}511 \text{ мм}^3$ , і коли була введена перша й/або єдина доза, якщо не зазначене інше. Об'єм пухлини розраховувався на основі двох розмірів, обмірюваних за допомогою штангенциркуля, і виражався в  $\text{мм}^3$  відповідно до формули:  $V=0,5a \times b^2$ , де a і b є більшим і меншим діаметрами пухлини, відповідно. Дані, зібрані для кожної експериментальної групи, були виражені у вигляді середнього + СО. Миші були рандомізовані в дев'ять груп по 9 мишей у кожній, після чого мишам була введена доза. Група 1 одержала однократне внутрішньовенне (в/в) введення буфера гістидіна на день 0 плюс в/в введення 0,9 % натрію хлориду (фізіологічного розчину) два рази в тиждень протягом двох тижнів на дні 0, 3, 7 і 10 разом з контролем носія. Група 2 одержала однократне в/в введення 10 мг/кг hu anti-Her2 трастузумаб-MC-vc-PAB-MMAE, CNJ 1135, на день 0 у якості контрольного кон'югата. Група 3 одержувала в/в введення 1 мг/кг Велкаде® два рази в тиждень протягом двох тижнів на дні 0, 3, 7 і 10. Групи 4-5 одержали однократне в/в введення 4 або 10 мг/кг thio hu anti-FcRH5(10A8)-MC-vc-PAB-MMAE, CNJ 1465, відповідно, на день 0. Групи 6-7 одержали однократне в/в введення 4 або 10 мг/кг hu anti-FcRH5(10A8)-MC-vc-PAB-MMAE, CNJ 1575, відповідно, на день 0. Група 8 одержала однократне в/в введення 4 мг/кг hu anti-FcRH5(10A8)-MC-vc-PAB-MMAE, CNJ 1575, на день 0 плюс в/в ін'єкції 1 мг/кг Велкаде® два рази в тиждень протягом двох тижнів на дні 0, 3, 7 і 10. Пухлини вимірювали два рази в тиждень у ході всього експерименту. Маса тіла мишей вимірюлася два рази в тиждень протягом перших трьох тижнів. Перед тим, як розмір пухлини досяг  $3000 \text{ мм}^3$ , або коли пухлини мали ознаки загрозливої виразки, миші були піддані евтаназії. Всі протоколи для тварин були затверджені Інституціональним комітетом по утриманню й використанню тварин (IACUC).

Негативний контроль включав кон'югати, засновані на антитілі до HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (MC-vc-PAB-MMAE).

#### Б. Результати

##### 1. Ксенотрансплантати OPM2-FcRH5

У ході 45-денного періоду використовувалися кон'югати препарату у вигляді монотерапії або в комбінації з Велкаде®: hu10A8 кон'юговане з -MC-vc-PAB-MMAE (hu anti-FcRH5(10A8)-MC-vc-PAB-MMAE і комбіноване з Велкаде® інгібувало ріст пухлини в мишей SCID з пухлинами OPM2-FcRH5 у порівнянні з негативним контролем, гуманізованим антитілом до Her2, кон'югованим з -MC-vc-PAB-MMAE (Hu anti-Her2 трастузумаб-MC-vc-PAB-MMAE) (Фігура 39). КАП вводилися у вигляді однократної дози на день 0 для всіх кон'югатів препарату й контролю. Препарат Велкаде® вводився два рази в тиждень протягом двох тижнів на дні 0, 3, 7 і 10. Крім того, 4 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE у комбінації з 1 мг/кг препарату Велкаде® значно інгібував ріст пухлини в порівнянні із групами монотерапії з Thio Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE у дозі 4 і 10 мг/кг, Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE у дозі 4 і 10 мг/кг, і Велкаде® у дозі 1 мг/кг (Фігура 39).

Крім того, у цьому ж самому дослідженні в кожній групі прийому дози була визначено процентна зміна маси тіла протягом перших 24 днів (Фігура 40). Результати показали, що введення Велкаде® викликало істотне зниження маси тіла або втрату маси тіла в ході лікування, але після припинення введення доз вага була відновлена.

Більше того, у Таблиці 14 показана кількість мишей із загальної кількості всіх досліджуваних мишей з досягненням часткової регресії (ЧР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав нижче 50 % від об'єму пухлини, обмірюваного на день 0), повної ремісії (ПР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав до  $0 \text{ мм}^3$ ) (Н/П = не застосовно); (ДО = кількість

спостережуваних пухлин на момент закінчення дослідження).

Таблиця 14

Введені антитіла (лікування)	КО	ЧР	ПР	Доза препара- ту ММАЕ (мкг/м <sup>2</sup> )	Доза АТ (мг/кг)	Співвідношення препарату (Препарат/АТ)
Носій*	9/9	0	0	Н/П	Н/П	Н/П
Hu anti-Her2 Трастузумаб-МС-vc-PAB-MMAE	9/9	0	0	432	10	2,9
Велкаде®	9/9	0	0	Н/П	1	Н/П
Thio Hu anti-FcRH5 10A8 HC-МС-vc-PAB-MMAE	9/9	0	0	112	4	1,94
Thio Hu anti-FcRH5 10A8 HC-МС-vc-PAB-MMAE	9/9	3	0	280	10	1,94
Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-PAB-MMAE	9/9	0	0	198	4	3,44
Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-PAB-MMAE	9/9	6	0	496	10	3,44
Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-PAB-MMAE (4 mg/kg) + Велкаде® (1 мг/кг)	7/8	6	3	496	4/1	3,44/ Н/П

\*Носій = 20 мМ гістидина ацетату, рН 5,5, 240 мМ сахарози, 0,02 % ПС20

ПРИКЛАД 9: Аналіз інгібування росту пухлини in vivo кон'югатами гуманізованого антитіла до FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантати

Для дослідження ефективності кон'югата гуманізованого антитіла (10A8)-препарату (hu Hu Anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4) у комбінації з Велкаде®, були проаналізовані ефекти кон'югованого антитіла у вигляді монотерапії або в сполученні з Велкаде® на пухлині (ксенотрансплантат множинної мієломи OPM2-FcRH5) у мишей.

Зокрема, була проаналізована здатність антитіла й Велкаде® викликати регресію пухлин у клітинах OPM2 (лінія клітин множинної мієломи, стабільно трансфікованих FcRH5 людини). Після трансфекції лінеаризованим pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 у клітини OPM2 і селекції з використанням пуроміцина (Calbiochem, San Diego, CA), клітини, що вижили були сепаровані на клітини, що експресують FcRH5 і мічені біотином (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) FcRH5.7D11, і мікрогранули MACS з антитілом до біотину з використанням стовпчика MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Експресія FcRH5 після сепарації була підтверджена FACS-аналізом з використанням антитіл до FcRH5 (10A8) і лінії клітин OPM2, трансфікованих порожнім вектором pRK.CMV.PD.nbe (негативний контроль).

Для аналізу ефективності кон'югатів hu anti-FcRH5 10A8 з –SPDB-DM4 у вигляді монотерапії й у комбінації з Велкаде®, самки мишей CB17 ICR SCID (вік 6-8 тижнів, отримані від Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) були інокульовані підшкірно з використанням  $2 \times 10^7$  OPM2-FcRH5 клітин за допомогою ін'єкції в бічну поверхню миші CB17 ICR SCID, при цьому ксенотрансплантаційним пухлинам дали вирости до приблизно 306 мм<sup>3</sup> у середньому. День 0 відноситься до дня, коли розмір пухлин становив приблизно 197-499 мм<sup>3</sup>, і коли була введена перша й/або єдина доза, якщо не зазначене інше. Об'єм пухлини розраховувався на основі двох розмірів, обмірюваних за допомогою штангенциркуля, і виражався в мм<sup>3</sup> відповідно до формули:  $V=0,5a \times b^2$ , де а і b є більшим і меншим діаметрами пухлини, відповідно. Дані, зібрані для кожної експериментальної групи, були виражені у вигляді середнього + СО. Миші були рандомізовані в шість груп по 9 мишей у кожній, після чого мишам була введена доза. Група 1 одержувала в/в введення 1 мг/кг Велкаде® два рази в тиждень протягом двох тижнів на дні 0, 3, 7 і 10. Група 2 одержала однократне внутрішньовенне (в/в) введення буфера гістидина на день 0 плюс в/в введення 0,9 % натрію хлориду (фізіологічного розчину) два рази в тиждень протягом двох тижнів на дні 0, 3, 7 і 10 разом з контролем носія. Група 3 одержала однократне в/в введення 4 мг/кг Hu anti-Her2 трастузумаб-SPDB-DM4, CNJ 1433, на день 0 у якості контрольного кон'югата. Група 4 одержала однократне в/в введення 4 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8

SPDB-DM4, CNJ 1503, на день 0. Група 5 одержала однократне в/в введення 4 мг/кг Hu anti-Her2 трастузумаб-SPDB-DM4, CNJ 1433, на день 0 плюс в/в ін'єкції 1 мг/кг Велкаде® два рази в тиждень протягом двох тижнів на дні 0, 3, 7 і 10. Група 6 одержала однократне в/в введення 4 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8 SPDB-DM4, CNJ 1503, на день 0 плюс в/в ін'єкції 1 мг/кг Велкаде® два рази в тиждень протягом двох тижнів на дні 0, 3, 7 і 10. Пухлини вимірювали два рази в тиждень у ході всього експерименту. Маса тіла мишей вимірялася два рази в тиждень протягом перших трьох тижнів. Перед тим, як розмір пухлини досяг 3000 мм<sup>3</sup>, або коли пухлини мали ознаки загрозливої виразки, миші були піддані евтаназії. Всі протоколи для тварин були затверджені Інституціональним комітетом по утриманню й використанню тварин (IACUC).

Негативний контроль включав кон'югати, засновані на антитілі до HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (SPDB-DM4).

#### Б. Результати

##### 1. Ксенотрансплантати OPM2-FcRH5

У ході 37-денного періоду використовувалися кон'югати антитіло-препарат і дози, як це представлено в Таблиці 13: гуманізоване антитіло до FcRH5 (10A8) (hu10A8), кон'юговане з -SPDB-DM4 (Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4) у комбінації з Велкаде®, інгібувало ріст пухлини в мишей SCID з пухлинами OPM2-FcRH5 у порівнянні з негативним контролем, тобто гуманізованим антитілом до HER2, кон'югованим з -SPDB-DM4 (Hu anti-Her2 трастузумаб-SPDB-DM4) (Фігура 41). КАП вводилися у вигляді однократної дози на день 0 для всіх кон'югатів препарату й контролю. Препарат Велкаде® вводився два рази в тиждень протягом двох тижнів на дні 0, 3, 7 і 10. Крім того, 4 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4 у комбінації з 1 мг/кг Велкаде® значно інгібували ріст пухлини в порівнянні із групами монотерапії, що приймають Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4 у дозі 4 мг/кг і Велкаде® у дозі 1 мг/кг, а також групою комбінованої терапії, що приймає Hu anti-Her2 трастузумаб-SPDB-DM4 плюс Велкаде® у дозі 1 мг/кг. (Фігура 41).

Крім того, у цьому ж самому дослідженні в кожній групі прийому дози була визначено процентна зміна маси тіла протягом перших 21 дня (Фігура 42). Результати показали, що введення таких КАП з гуманізованим антитілом до FcRH5 і Велкаде® не приводило до істотного зниження маси тіла або втрати маси тіла протягом даного періоду часу.

Більше того, у Таблиці 15 показана кількість мишей із загальної кількості всіх досліджуваних мишей з досягненням часткової регресії (ЧР, коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав нижче 50 % від об'єму пухлини, обмірюваного на день 0), повної ремісії (ПР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав до 0 мм<sup>3</sup>) (Н/П = не застосовно); (ДО = кількість спостережуваних пухлин на момент закінчення дослідження).

Таблиця 15

Введені антитіла (лікування)	КО	ЧР	ПР	Доза препарату DM4 (мкг/м <sup>2</sup> )	Доза АТ (мг/кг)	Співвідношення препарату (Препарат/АТ)
Велкаде®	8/8	0	0	Н/П	Н/П	Н/П
Носій*	9/9	0	0	Н/П	Н/П	Н/П
Hu anti-Her2 Трастузумаб-SPDB-DM4	8/8	0	0	195	4	3,02
Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4, 4 mg/kg	9/9	1	0	238	4	3,8
Hu anti-Her2 Трастузумаб-SPDB-DM4 + Велкаде®	8/8	0	0	195/Н/П	4/1	3,02/Н/П
Hu anti-FcRH5 10A8-SPDB-DM4 06 + Велкаде®	1/9	1	8	238/Н/П	4/1	3,8/Н/П

\*Носій = 20 мМ гістидина ацетату, рН 5,5, 240 мМ сахарози, 0,02 % ПС20

ПРИКЛАД 10: Аналіз інгібування росту пухлини in vivo кон'югатами гуманізованого антитіла до FcRH5 - препарат

#### А. Ксенотрансплантати

Для дослідження ефективності кон'югата гуманізованого антитіла (10A8)-препарату (Hu Anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАЕ) у комбінації із препаратами Ревлімід® і Ревлімід® плюс дексаметазон, були проаналізовані ефекти кон'югованого антитіла у вигляді монотерапії або в



сполученні із препаратами Ревлімід® і Ревлімід® плюс дексаметазон на пухлині (ксенотрансплантат множинної мієломи OPM2-FcRH5) у мишей.

Зокрема, була проаналізована здатність антитіла й препаратів Ревлімід® і Ревлімід® плюс дексаметазон викликати регресію пухлин у клітинах OPM2 (лінія клітин множинної мієломи, стабільно трансфікованих FcRH5 людини). Після трансфекції лінеаризованим pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5 у клітини OPM2 і селекції з використанням пуроміцина (Calbiochem, San Diego, CA), клітини, що вижили були сепаровані на клітини, що експресують FcRH5 і мічені біотином (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) FcRH5.7D11, і мікрогранули MACS з антитілом до біотину з використанням стовпчика MACS LS (Miltenyi Biotec, Auburn, Ca). Експресія FcRH5 після сепарації була підтверджена FACS-аналізом з використанням антитіл до FcRH5 (10A8) і лінії клітин OPM2, трансфікованих порожнім вектором pRK.CMV.PD.nbe (негативний контроль).

Для аналізу ефективності кон'югатів hu anti-FcRH5 10A8 з -МС-vc-РАВ-ММАН у вигляді монотерапії й у комбінації із препаратами Ревлімід® і Ревлімід® плюс дексаметазон, самки мишей CB17 ICR SCID (вік 6-8 тижнів, отримані від Charles Rivers Laboratories, Hollister, CA) були інокульовані підшкірно з використанням  $2 \times 10^7$  OPM2-FcRH5 клітин за допомогою ін'єкції в бічну поверхню миші CB17 ICR SCID, при цьому ксенотрансплантаційним пухлинам дали вирости до приблизно  $446 \text{ мм}^3$  у середньому. День 0 відноситься до дня, коли розмір пухлин становив приблизно  $263\text{-}630 \text{ мм}^3$ , і коли була введена перша/або єдина доза, якщо не зазначене інше. Об'єм пухлини розраховувався на основі двох розмірів, обмірюваних за допомогою штангенциркуля, і виражався в  $\text{мм}^3$  відповідно до формули:  $V=0,5a \times b^2$ , де a і b є більшим і меншим діаметрами пухлини, відповідно. Дані, зібрані для кожної експериментальної групи, були виражені у вигляді середнього + СО. Миші були рандомізовані в дев'ять груп по 8 мишей у кожній, після чого мишам була введена доза. Група 1 одержувала щодня інтраперітонеальні (і/п) ін'єкції суміші ДМСО й буфера МСТ на дні 0-13 в якості контрольного носія. Група 2 одержала однократне в/в введення 6 мг/кг Hu anti-Her2 трастузумаб-МС-vc-РАВ-ММАН, CNJ 1135, на день 0 у якості контрольного кон'югата. Група 3 одержала однократне в/в введення 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАН, CNJ 1672, на день 0. Група 4 одержувала щоденні і/п ін'єкції 50 мг/кг препарату Ревлімід® на дні 0-13. Група 5 приймала щодня пероральну (п/о) дозу 3 мг/кг дексаметазона протягом 4 днів, потім було 3 дні перерви, у ході 2 циклів на дні 0-3 і 7-10. Група 6 одержувала щодня і/п ін'єкції 50 мг/кг препарату Ревлімід® на дні 0-13 плюс щоденну п/о дозу 3 мг/кг дексаметазона протягом 4 днів, потім було 3 дні перерви, у ході 2 циклів на дні 0-3 і 7-10. Група 7 одержувала однократну в/в ін'єкцію 6 мг/кг Hu anti-Her2 трастузумаб-МС-vc-РАВ-ММАН, CNJ 1135, на день 0 плюс одержувала щодня і/п ін'єкції 50 мг/кг препарату Ревлімід® на дні 0-13 плюс щоденну п/о дозу 3 мг/кг дексаметазона протягом 4 днів, потім було 3 дні перерви, у ході 2 циклів на дні 0-3 і 7-10. Група 8 одержувала однократну в/в ін'єкцію 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАН, CNJ 1672, на день 0 плюс одержувала щодня і/п ін'єкції 50 мг/кг препарату Ревлімід® на дні 0-13 плюс щоденну п/о дозу 3 мг/кг дексаметазона протягом 4 днів, потім було 3 дні перерви, у ході 2 циклів на дні 0-3 і 7-10. Група 9 одержала однократне в/в введення 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАН, CNJ 1672, на день 0 плюс одержувала щодня і/п ін'єкції 50 мг/кг препарату Ревлімід® на дні 0-13. Пухлини вимірювали два рази в тиждень у ході всього експерименту. Маса тіла мишей вимірюлася два рази в тиждень протягом усього експерименту. Якщо в мишей відзначалася втрата маси тіла більш ніж на 15 % у порівнянні з масою тіла на день 0, миші піддавалися щоденному зважуванню доти, поки вага не була відновлена або доти, поки втрата маси тіла не перевищувала 20 %. Після того, як втрата маси тіла мишей досягала більше 20 % у порівнянні з їхньою масою тіла на день 0, до досягнення об'єму пухлини  $3000 \text{ мм}^3$ , або пухлина мала ознаки небезпечної виразки, миші піддавалися евтаназії. Всі протоколи для тварин були затверджені Інституціональним комітетом по утриманню й використанню тварин (IACUC).

Негативний контроль включав кон'югати, засновані на антитілі до HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (МС-vc-РАВ-ММАН).

#### Б. Результати

##### 1. Ксенотрансплантати OPM2-FcRH5

У ході 38-денного періоду використовувалися кон'югати антитіла й препаратів Ревлімід® і Ревлімід® плюс дексаметазон: гуманізоване антитіло до FcRH5 (10A8), кон'юговане з -МС-vc-РАВ-ММАН (Hu anti-FcRH5 10A8-МС-vc-РАВ-ММАН) у комбінації із препаратами Ревлімід® і Ревлімід® плюс дексаметазон інгібувало ріст пухлини в мишей SCID з пухлинами OPM2-FcRH5 у порівнянні з негативним контролем, тобто гуманізованим антитілом до HER2, кон'югованим з -МС-vc-РАВ-ММАН (Hu anti-Her2 трастузумаб-МС-vc-РАВ-ММАН). (Фігура 43). КАП вводилися у вигляді однократної дози на день 0 для всіх кон'югатів препарату й контролю. Ревлімід® вводився у вигляді щоденних і/п ін'єкцій у дозі 50 мг/кг препарату Ревлімід® на дні 0-13.

Дексаметазон приймався щодня перорально (п/о) протягом 4 днів, потім було 3 дні перерви, у ході 2 циклів на дні 0-3 і 7-10. Крім того, 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE у комбінації з 50 мг/кг препарату Ревлімід® і 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE у комбінації з 50 мг/кг препарату Ревлімід® плюс 3 мг/кг дексаметазона істотно інгібував ріст пухлини в порівнянні із групами прийому монотерапії, що приймають 6 мг/кг Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE, 50 мг/кг препарату Ревлімід® (леналідомід) і 3 мг/кг дексаметазона. (Фігура 43).

Крім того, у цьому ж самому дослідженні в кожній групі прийому дози було визначено процентну зміну маси тіла протягом перших 17 днів (Фігура 44). Результати показують, що введення препаратів дексаметазон і Ревлімід® викликало значне зниження маси тіла або втрати ваги.

Більше того, у Таблиці 16 показана кількість мишей із загальної кількості всіх досліджуваних мишей з досягненням часткової регресії (ЧР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав нижче 50 % від об'єму пухлини, обмірюваного на день 0), повної ремісії (ПР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав до 0 мм<sup>3</sup>) (Н/П = не застосовно); (ДО = кількість спостережуваних пухлин на момент закінчення дослідження).

Таблиця 16

Введені антитіла (лікування)	КО	ЧР	ПР	Доза препарату MMAE (мкг/м <sup>2</sup> )	Доза АТ (мг/кг)	Співвідношення препарату (Препарат/АТ)
Носій (DMCO + буфер MCT)	7/7	0	0	Н/П	Н/П	Н/П
Hu anti-Her2 Трастузумаб-MC-vc-PAB-MMAE (однократно в/в)	8/8	0	0	259	6	2,9
Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE (однократно в/в)	7/7	2	0	294	6	3,4
Ревлімід (ip qdX13)	4/4	0	0	Н/П	50	Н/П
Дексаметазон (po qdX4 протягом 3 циклів при графіку 4/3/4/3/4)	5/5	0	0	Н/П	3	Н/П
Ревлімід + Дексаметазон	5/5	3	0	Н/П	50/3	Н/П
Hu anti-Her2 Трастузумаб-MC-vc-PAB-MMAE + Ревлімід, + Дексаметазон	6/6	4	0	259	6/50/3	108
Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE + Ревлімід + Дексаметазон	4/4	8	0	294	6/50/3	3,4
Hu anti-FcRH5 10A8-MC-vc-PAB-MMAE + Ревлімід	4/4	8	0	294	6/50	3,4

Викладений вище текст заявки на винахід вважається достатнім для практичного використання винаходу фахівцем у даній області. Даний винахід не обмежується у своїй області застосування представленими прикладами, оскільки представлені варіанти втілення винаходу є одиночними ілюстраціями окремих аспектів винаходу, і будь-які інші варіанти втілення винаходу, що є функціонально еквівалентними, перебувають у межах області застосування винаходу. Представлений тут матеріал не є визнанням того, що представлений письмовий опис не забезпечує практичного застосування будь-якого аспекту винаходу, включаючи найкращий спосіб, а також такий матеріал не повинен розглядатися як обмеження області застосування формул винаходу представленими тут описами. Навпаки, різні модифікації винаходу, крім представлених і описаних у тексті даної заявки, будуть очевидні фахівцеві в даній області, виходячи із представленого вище опису, і будуть включені в область застосування заявленої формули винаходу.

Приклад 11: Одержання й характеристика біспецифічних антитіл до FcRH5

Розробка й одержання біспецифічних антитіл до CD3/FcRH5

Розробка біспецифічного антитіла до FcRH5, зокрема, антитіла з опукlostями CD3/FcRH5, описана нижче.

Раніше були описані різні інші біспецифічні антитіла з опукlostями. Див., наприклад, патенти США No. 5731168 і 7183076; Ridgway et al., Prot. Eng. 9:617-621 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997); Merchant et al., Nat. Biotechnol. 16:677-681 (1998). У певних варіантах втілення винаходу взаємозв'язок C<sub>H</sub>3 між гуманізованим химерним антитілом до CD3/CD4-IgG, що описано раніше Chamow et al. J. Immunol. 153:4268 (1994), була розроблена для

максимального процентного підвищення гетеромультимерів, які можна відновити з ліній клітин ссавців, котрансфікованих векторами експресії. У контексті даного винаходу термін "гетеромультимер" відноситься до молекули, наприклад, біспецифічному антитілу, що складається з, щонайменше, одного поліпептиду й другого поліпептиду, при цьому другий

5 поліпептид відрізняється по своїй амінокислотній послідовності від першого поліпептиду, щонайменше, одним амінокислотним залишком.

Як це описано в документах, наведених в абзаці вище, стратегія використання утворення гетеродимера заснована на введенні однієї або декількох "протуберантних" мутацій у перший поліпептид, наприклад, домен  $C_{H3}$  Н ланцюга антитіла, і також введення однієї або декількох

10 "порожнинних" мутацій у друге антитіло, наприклад, домен  $C_{H3}$  Н ланцюга другого антитіла. "Протуберантна" мутація дозволила замінити невелику амінокислоту більшою амінокислотою, і "порожнинна мутація" замінила більшу амінокислоту меншою амінокислотою. Далі, крім порожнинних мутацій, на поверхню взаємодії двох поліпептидів, наприклад, двох доменів  $C_{H3}$ , були введені незв'язані тіол-утримуючі залишки, що, як було доведено, підвищить утворення

15 гетеромультимерів. Були описані різні типові порожнинні мутації й впровадження незв'язаних тіол-утримуючих залишків у поліпептид. Див., наприклад, патенти США No. 5731168 і 7183076; Ridgway et al., Prot. Eng. 9:617-621 (1996); Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997); Merchant et al., Nat. Biotechn. 16:677-681 (1998).

Для одержання біспецифічного антитіла до CD3/FcRH5 проводяться наступні етапи. Конструюють плазмиди для експресії E. coli, що кодують гуманізовані варіанти легкої (L) і важкої (H) ланцюгів моноклонального мишачого антитіла до CD3 UCHT1 (патенти США No. 5821337 і 6407213; Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217 [1992] і Rodrigues et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:45 [1992]). Науці відомо багато підходящих плазмід для експресії E. coli, включаючи pAK19. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992). Мутації, що дозволяють утворити в домені  $C_{H3}$  ланцюга

25 Н гуманізованого антитіла до CD3 горбок або порожнину (як це описано вище), здійснюються, наприклад, сайт-специфічним мутагенезом. Науці відомі різні способи сайт-специфічного мутагенезу. Див, наприклад, Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382 (1987). Крім того, розроблені плазмиди E. coli для експресії, що кодують легкі й важкі ланцюги гуманізованого антитіла до FcRH5 (такі легкі й важкі ланцюги гуманізованого антитіла до FcRH5 описані в даній заявці на винахід). Мутації, у ході яких в  $C_{H3}$  домені Н ланцюга гуманізованого антитіла до FcRH5 утвориться відповідна порожнина (якщо домен  $C_{H3}$  антитіла до CD3 має протуберантну мутацію) або відповідний горбок (якщо домен  $C_{H3}$  антитіла до CD3 має порожнинну мутацію), здійснюються з використанням, наприклад, сайт-специфічного мутагенезу.

Біспецифічні антитіла до CD3/FcRH5 одержують шляхом трансформації описаних вище плазмід експресії E. coli у відповідний штам E. coli, наприклад, 33B6, з використанням відомих науці способів. Див, наприклад, Rodrigues et al., Cancer Res. 55:63-70 (1995). Антитіло секретується трансформованим штамом E. coli, вирощеним в 10 л ферментаторі, як це було описано раніше. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992). Антитіла очищають і аналізують із використанням відомих науці способів. Див., наприклад, Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26-35

35 (1997).

Аналіз зв'язування клітин: для оцінки здатності біспецифічних антитіл до CD3/FcRH5 зв'язуватися з Т-клітинами й В-клітинами, білі кров'яні клітини периферичної крові людини виділяють із цільної крові здорових донорів з використанням градієнта Фіколла у відповідності зі стандартними й відовими науці процедурами. Приблизно 1 мільйон клітин інкубують з

45 біспецифічним антитілом до CD3/FcRH5 на льоді в буфері, що містить 0,5 BCA й 2 мМ EDTA у ФСБ. Потім клітини промивають і фарбують фрагментом антитіла кози (Fab)<sup>2</sup> до IgG людини, кон'югованими із флуоресцеїна ізотіоціонатом, разом з антитілами до CD8-APC, CD138-PE і CD38-PerCP-Cy5 з дотриманням протоколу виробника (BD Biosciences, San Diego, CA). Активність зв'язування оцінювали з використанням FACS-аналізу й проточного цитометра FACSCalibur<sup>TM</sup> (BD Biosciences, San Diego, CA), і такий аналіз проводився з використанням програмного забезпечення Flowjo (Tree Star, Ashland, OR).

Аналіз загибелі клітин in vitro: клітини множинної мієломи EJM-FcRH5.LSP.2 (клітини EJM, DSMZ ACC-560, стабільно трансфіковані FcRH5 людини) використовувалися як клітини-мішені і підлягали спільному культивуванню з білими кров'яними клітинами периферичної крові людини або CD8+Т-клітинами. При використанні CD8+Т-клітин, такі клітини очищають від МКПК людини шляхом негативного сортування з використанням набору для виділення CD8+Т-клітин (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) і 96-луночного круглодонного планшета. 20 000 EJM-FcRH5.LSP.2 клітин додають у кожну лунку при співвідношенні мішень: ефекторні клітини = 1:10, з/без біспецифічного антитіла до CD3/FcRH5. Через приблизно 19 годин, клітини офарблюють

60 міченим антитілом CD38-FITC і CD138-PE відповідно до протоколу виробника (BD Biosciences,

San Diego, CA) і змішують із мікросферами Fluoresbrite® Calibration Grade 6.0 Micron YG (Polysciences, Inc., Warrington, PA). FACS-аналіз проводився шляхом установки дискримінаційного вікна вперед/убік від напрямку розсіювання й фарбування CD38-CD138. Мертві клітини виключають із використанням фарбування пропідініум йодидом з дотриманням стандартних процедур. Специфічна активність біспецифічного антитіла до CD3/FcRH5 щодо клітин розраховується у відповідності з наступним рівнянням: % специфічної загибелі =  $(1 - \text{кількість живих клітин EJM-FcRH5.LSP.2 із впливом} / \text{кількість живих клітин EJM-FcRH5.LSP.2 в ефекторі й EJM-FcRH5.LSP.2 без біспецифічного антитіла до CD3/FcRH5}) \times 100$ .

Ефективність *in vivo*: клітини множинної мієломи EJM-FcRH5.LSP.2 змішують із моноклеарними клітинами периферичної крові й вводять підшкірно із правої сторони в області грудей самкам мишей NOD.CD17-Prkdc<sup>scid</sup>/J (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA). Інокульованих мишей потім розділяють випадковим чином у групи контролю й лікування. Групам контролю вводять носій або контрольне біспецифічне антитіло до CD3/Her2. Групам лікування вводять біспецифічне антитіло до CD3/FcRH5. Біспецифічні антитіла вводять у діапазоні дози від 0,01 до 10 мг/кг. Контроль або лікування вводять внутрішньо протягом 1-2 годин після інокуляції й повторюють щодня протягом наступних 5 днів. Пухлину вимірюють у двох розмірах (довжина й ширина) з використанням штангенциркуля два рази на тиждень. Миші підлягають клінічному моніторингу два рази на тиждень. По закінченні експерименту, розмір пухлини в групі контролю зіставлявся з розміром пухлини в групі лікування біспецифічним антитілом до CD3/FcRH5 для оцінки ефективності лікування біспецифічним антитілом до CD3/FcRH5.

ПРИКЛАД 12: Аналіз інгібування росту пухлини *in vivo* кон'югатами гуманізованого антитіла до FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантати

Для дослідження ефективності кон'югатів hu10A 8-препарат з MC-vc-PAB-MMAE ("hu-Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE") у різних дозах, були проаналізовані ефекти кон'югованого антитіла на пухлині в мишей.

Зокрема, була проаналізована здатність антитіл викликати регресію пухлин у клітинах EJM (лінія клітин множинної мієломи, стабільно трансфікованих FcRH5 людини).

Клітини EJM (ACC-560) є представленими на ринку клітинами лінії множинної мієломи людини, представленими компанією DSMZ (Німеччина). Оскільки клітини EJM не експресують ендогенно FcRH5, такі клітини були стабільно трансфіковані FcRH5 людини, що привело до виникнення лінії клітин EJM.CMV.PD.FcRH5.LSP.2.

Для аналізу ефективності кон'югатів hu10A 8-препарат з MC-vc-PAB-MMAE, самки мишей CB17 ICR SCID (вік 6-8 тижнів, отримані від Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) були інокульовані підшкірно з використанням  $2 \times 10^7$  EJM2-FcRH5.LSP.2 клітин за допомогою ін'єкції в бічну поверхню миші CB17 ICR SCID, при цьому ксенотрансплантаційним пухлинам дали вирости до приблизно 134 мм<sup>3</sup> у середньому. День 0 відноситься до дня, коли розмір пухлин становив приблизно 100-250 мм<sup>3</sup>, і коли була введена перша/або єдина доза, якщо не зазначене інше. Об'єм пухлини розраховувався на основі двох розмірів, обмірюваних за допомогою штангенциркуля, і виражався в мм<sup>3</sup> відповідно до формули:  $V = 0,5a \times b^2$ , де  $a$  і  $b$  є більшим і меншим діаметрами пухлини, відповідно. Дані, зібрані для кожної експериментальної групи, були виражені у вигляді середнього + СО. Групи з 8 мишей були піддані введенню однократної внутрішньовенної (в/в) дози, що варіює від 1 до 8 мг КАП/кг із використанням КАП до FcRH5 або контрольних кон'югатів антитіло-препарат. Пухлини вимірювали два рази на тиждень у ході всього експерименту. Маса тіла мишей вимірюлася один раз на тиждень протягом 2 тижнів. Перед тим, як розмір пухлини досяг 3000 мм<sup>3</sup>, або коли пухлини мали ознаки загрозливої виразки, миші були піддані евтаназії. Всі протоколи для тварин були затверджені Інституціональним комітетом по утриманню й використанню тварин (IACUC).

Негативний контроль включав кон'югати, засновані на антитілі до HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (MC-vc-PAB-MMAE).

Б. Результати

1. Ксенотрансплантати EJM-FcRH5.LSP.2

У ході 80-денного періоду використовувалися кон'югати антитіло-препарат і дози, як це представлено в Таблиці 17: гуманізоване антитіло до FcRH5 (10A8) (hu10A8), кон'юговане з MC-vc-PAB-MMAE ("hu-anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE"), інгібувало ріст пухлини в мишей SCID з пухлинами EJM-FcRH5.LSP.2 у порівнянні з негативним контролем, тобто гуманізованим антитілом до HER2, кон'югованим з MC-vc-PAB-MMAE ("Hu-anti-HER2 (4D5)-MC-vc-PAB-MMAE"). КАП вводилися у вигляді однократної дози на день 0 для всіх КАП і контролю. Зокрема, всі рівні доз гуманізованих КАП до FcRH5 значно інгібували ріст пухлини (Фігура 45).

Крім того, у цьому ж самому дослідженні в кожній групі прийому дози було визначено процентну зміну маси тіла протягом перших 7 днів. Результати (Фігура 46) показали, що введення таких КАП з гуманізованим антитілом до FcRH5 не приводило до істотного зниження маси тіла або втрати маси тіла протягом даного періоду часу.

- 5 Більше того, у Таблиці 17 показана кількість мишей із загальної кількості всіх досліджуваних мишей з досягненням часткової регресії (ЧР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав нижче 50 % від об'єму пухлини, обмірюваного на день 0), повної ремісії (ПР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав до 0 мм<sup>3</sup>) (Н/П = не застосовно); (ДО = кількість спостережуваних пухлин на момент закінчення дослідження).

10

Таблиця 17

Введені антитіла (лікування)	КО	ЧР	ПР	Доза препарату - DM1 (мкг/м <sup>2</sup> )	Доза АТ (мг/кг)	Співвідношення препарату (Препарат/АТ)
Носій*	8/8	0	0	Н/П	Н/П	Н/П
Hu-Anti-Her2-MC-vc-PAB-MMAE	8/8	0	0	346	8	2,9
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	4/6	1	2	49	1	3,4
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	3/5	2	3	98	2	3,4
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	8/8	7	1	196	4	3,4
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-MC-vc-PAB-MMAE	1/5	2	6	392	8	3,4

\*Носій = 20 мМ гістидина ацетату, рН 5,5, 240 мМ сахарози, 0,02 % ПС20

ПРИКЛАД 13: Аналіз інгібування росту пухлини in vivo кон'югатами гуманізованого антитіла до FcRH5 - препарат

А. Ксенотрансплантати

- 15 Для дослідження ефективності кон'югатів hu10A 8-препарат з SPDB-DM4 ("hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4") у різних дозах, були проаналізовані ефекти кон'югованого антитіла на пухлині в мишей.

Зокрема, була проаналізована здатність антитіл викликати регресію пухлин у клітинах EJM (лінія клітин множинної мієломи, стабільно трансфікованих FcRH5 людини).

- 20 Клітини EJM (ACC-560) є представленими на ринку клітинами лінії множинної мієломи людини, представленими компанією DSMZ (Німеччина). Оскільки клітини EJM не експресують ендогенно FcRH5, такі клітини були стабільно трансфіковані FcRH5 людини, що привело до виникнення лінії клітин EJM.CMV.PD.FcRH5.LSP.2.

- 25 Для аналізу ефективності кон'югатів hu10A 8-препарат з SPDB-DM4, самки мишей CB17 ICR SCID (вік 6-8 тижнів, отримані від Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) були інокульовані підшкірно з використанням  $2 \times 10^7$  EJM2-FcRH5.LSP.2 клітин за допомогою ін'єкції в бічну поверхню миші CB17 ICR SCID, при цьому ксенотрансплантаційним пухлинам дали вирости до приблизно 134 мм<sup>3</sup> у середньому. День 0 відноситься до дня, коли розмір пухлин становив приблизно 100-250 мм<sup>3</sup>, і коли була введена перша/або єдина доза, якщо не зазначене інше.

- 30 Об'єм пухлини розраховувався на основі двох розмірів, обмірюваних за допомогою штангенциркуля, і виражався в мм<sup>3</sup> відповідно до формули:  $V = 0,5a \times b^2$ , де a і b є більшим і меншим діаметрами пухлини, відповідно. Дані, зібрані для кожної експериментальної групи, були виражені у вигляді середнього + СО. Групи з 8 мишей були піддані введенню однократної внутрішньовенної (в/в) дози, що варіює від 2 до 8 мг КАП/кг із використанням КАП до FcRH5 або контролю кон'югатів антитіло-препарат. Пухлини вимірювали два рази в тиждень у ході всього експерименту. Маса тіла мишей вимірюлася один раз у тиждень протягом 2 тижнів. Перед тим, як розмір пухлини досяг 3000 мм<sup>3</sup>, або коли пухлини мали ознаки загрозливої виразки, миші були піддані евтаназії. Всі протоколи для тварин були затверджені Інституціональним комітетом по утриманню й використанню тварин (IACUC).

- 40 Негативний контроль включав кон'югати, засновані на антитілі до HER2 (ГЕРЦЕПТИН®) (трастузумаб) (SPDB-DM4).

Б. Результати

## 1. Ксенотрансплантати EJM-FcRH5.LSP.2

У ході 24-денного періоду використовувалися кон'югати антитіло-препарат і дози, як це представлено в Таблиці 18: гуманізоване антитіло до FcRH5 (10A8) (hu10A8), кон'юговане з SPDB-DM4 ("hu-anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4"), інгібувало ріст пухлини в мишей SCID з пухлинами EJM-FcRH5.LSP.2 у порівнянні з негативним контролем, тобто гуманізованим антитілом до HER2, кон'югованим з SPDB-DM4 ("Hu-anti-HER2 (4D5)-SPDB-DM4"). КАП вводилися у вигляді однократної дози на день 0 для всіх КАП і контролю. Зокрема, доза 8 мг/кг гуманізованого КАП до FcRH5 значно інгібували ріст пухлини (Фігура 47).

Крім того, у цьому ж самому дослідженні в кожній групі прийому дози була визначено процентна зміна маси тіла протягом перших 7 днів. Результати (Фігура 48) показали, що введення таких КАП з гуманізованим антитілом до FcRH5 не приводило до істотного зниження маси тіла або втрати маси тіла протягом даного періоду часу.

Більше того, у Таблиці 18 показана кількість мишей із загальної кількості всіх досліджуваних мишей з досягненням часткової регресії (ЧР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав нижче 50 % від об'єму пухлини, обмірюваного на день 0), повної ремісії (ПР; коли об'єм пухлини в будь-який час після введення падав до 0 мм<sup>3</sup>) (Н/П = не застосовно); (ДО = кількість спостережуваних пухлин на момент закінчення дослідження).

Таблиця 18

Введені антитіла (лікування)	КО	ЧР	ПР	Доза препарату - DM1 (мкг/м <sup>2</sup> )	Доза АТ (мг/кг)	Співвідношення препарату (Препарат/АТ)
Носій*	8/8	0	0	н/п	н/п	н/п
Hu-Anti-Her2-SPDB-DM4	8/8	0	0	391	8	3,02
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	8/8	0	0	119	2	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	7/8	0	1	238	4	3,8
Hu-Anti-FcRH5 (10A8)-SPDB-DM4	8/8	2	0	476	8	3,8

\*Носій = 20 мМ гістидіна ацетату, pH 5,5, 240 мМ сахарози, 0,02 % ПС20

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ДЖЕНЕНТЕК, ІНК.

<120> АНТИТІЛА ДО FcRH5, ЇХ ІМУНОКОН'ЮГАТИ І СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> GNE-0350

<140> PCT/US2010/029516

<141> 2010-03-31

<150> 61/266,972

<151> 2009-12-04

<150> 61/166,217

<151> 2009-04-02

<150> 61/211,695

<151> 2009-04-01

<160> 71

<170> Патентна версія 3.5

<210> 1

<211> 53

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтезований тег gD та сигнальна послідовність

<400> 1

Met Gly Gly Thr Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val  
1 5 10 15

Ile Val Gly His Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ala Leu Ala Asp Ala Ser  
20 25 30

Leu Lys Met Ala Asp Pro Asn Arg Phe Arg Gly Lys Asp Leu Pro Val  
35 40 45

Leu Asp Gln Leu Leu  
50

<210> 2

<211> 30

<212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотидний праймер

<400> 2  
 gatcgatatc ytgctsacmc artgtccagc 30

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотидний праймер

<400> 3  
 tttdakytcc agcttggtac c 21

<210> 4  
 <211> 37  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотидний праймер

<400> 4  
 gatcgacgta cgctgargtg carytggtgg artctgg 37

<210> 5  
 <211> 43  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотидний праймер

<400> 5  
 acagtgggcc ctggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt 43

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>



<223> опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотидний праймер	
<400> 6	
gatcgatatc gtgatgaccc artctcayaa	30
<210> 7	
<211> 21	
<212> ДНК	
<213> штучна послідовність	
<220>	
<223> опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотидний праймер	
<400> 7	
tttdakytcc agcttggtac c	21
<210> 8	
<211> 37	
<212> ДНК	
<213> штучна послідовність	
<220>	
<223> опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотидний праймер	
<400> 8	
gatcgacgta cgctgargtg carytggtgg artctgg	37
<210> 9	
<211> 23	
<212> ДНК	
<213> штучна послідовність	
<220>	
<223> опис штучної послідовності: синтетичний олігонуклеотидний праймер	
<400> 9	
ctggwcaggg mtccagagtt cca	23
<210> 10	
<211> 917	
<212> ДНК	
<213> штучна послідовність	
<220>	
<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний легкий ланцюг химерного антитіла FcRH5 людини (ch7D11)	

<400> 10  
 cactcccagc tccaactgca cctcggttct atcgattgaa ttccaccatg ggatggcat 60  
 gtatcatcct tttttagta gcaactgcaa ctggagtaca ttcagataac ctgctgacac 120  
 aatctccagc catcctgtct gtgagtcag gagaaagagt cagtttctcc tgcaggtcca 180  
 gtcagagcat tggcacaaac atacactggt atcagcaaag aacaaatggt tctccaaggc 240  
 ttctcataaa gtttgcttct gagtctctct ctgggatccc ttccagggtt agtggcagtg 300  
 gatcagggac agattttact cttagcatca atagtgtgga gtctgaagat tttgagatt 360  
 actactgtca acaaagtaat agctggccac tcacgttcgg tgctggtacc aaggtggaga 420  
 tcaaacgaac tgggctgca ccatctgtct tcattctccc gccatctgat gagcagttga 480  
 aatctggaac tgcttctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaag 540  
 tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc 600  
 aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcacct gacgtgagc aaagcagact 660  
 acgagaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca 720  
 caaagagctt caacagggga gagtgttaag ctggccgcc atggcccaac ttgtttattg 780  
 cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcacacaaa ttccacaaat aaagcatttt 840  
 ttctactgca ttctagtgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 900  
 tcgggaatta atcggc 917

<210> 11

<211> 214

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: Синтетичний легкий ланцюг химерного антитіла до FcRH5 людини (ch7D11)

<400> 11

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Lys Phe Ala Ser Glu Ser Leu Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 12

<211> 1484

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Опис штучної послідовності: Синтетичний важкий ланцюг химерного антитіла до FcRH5 людини (ch7D11)

&lt;400&gt; 12

tcggttctat cgattgaatt ccacatggg atggtcatgt atcatcctt ttctagtagc	60
aactgcaact ggagcgtacg ctgaagtgca gttggtggag tctgggggag gcttagtgca	120
gcctggaggg tccctgaaac tctcctgtgc agcctctgga ttcacttca gtagctatgg	180
catgtcttgg gttgccaga ctccagacaa gaggctggag ttggtcgcaa ccattactag	240
aaatggtggt accacctatt atctagacag tgtgaagggc cgattcacca tctccagaga	300
caatgccaag aacaccctgt acctgcaaat gagcagtctg aagtctgagg acacagccat	360
gtattactgt gcaagaggtc ctatctacta tgattacggc tatgctatgg actactgggg	420
tcaaggaacc acagtcacag tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccct	480
ggcacctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga	540
ctactcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca	600
cacttcccg gctgtctac agtctcagg actctactcc ctccagcagc tggtagctgt	660
gccctctagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa	720
caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgccacc	780
gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa	840
ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca	900
cgaagacctt gaggtaagt tcaactggtg cgtggacggc gtggagggtgc ataagccaa	960
gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg gtggtcagcg tctcaccgt	1020
cctgcaccag gactggtga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct	1080
cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt	1140
gtacaccctg ccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct	1200
ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga	1260
gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag	1320
caagctcacc gtggacaaga gcagggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat	1380

gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaattg 1440

agtgcgacgg ccctagagtc gacctgcaga agcttgcccg ccat 1484

<210> 13

<211> 452

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний важкий ланцюг химерного антитіла до FcRH5 людини (ch7D11)

<400> 13

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Arg Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
325 325 330

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
435 440 445

Ser Pro Gly Lys  
450

<210> 14  
<211> 800  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний легкий ланцюг химерного антитіла до FcRH5 людини (ch10A8)

<400> 14

acctcggttc	tatcgattga	attccacat	gggatggtca	tgtatcatcc	tttttctagt	60
agcaactgca	actggagtag	attcagatat	cgtagtgacc	cagtctcata	aattcatgtc	120
cacatcagta	agagacaggg	tcagcatcac	ctgcaaggcc	agtcaggatg	tgagtactgc	180
tgtagcctgg	tatcaacaga	aaccaggaca	atctcctaaa	ctactgattt	attcggcac	240
ctaccggtac	actggagtcc	ctgacgctt	cactggcagt	ggatctggga	cggatttcac	300
tttcaccatc	agcagtgtgc	aggctgaaga	cctggcagtt	tattactgtc	agcaacattt	360
tagtagtcct	cggacgttcg	gtggaggtac	caaggtggag	atcaaacgaa	ctgtggctgc	420

accatctgtc ttcatcttc cgccatctga tgagcagttg aaatctgaa ctgcttctgt 480  
 tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa 540  
 cggcctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac 600  
 ctacagcctc agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta 660  
 cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg 720  
 agagtgttaa gcttgccgc catggcccaa ctgtttatt gcagcttata atggttaca 780  
 ataaagcaat agcatcaca 800

<210> 15

<211> 214

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний легкий ланцюг химерного антитіла до FeRH5 людини (ch10A8)

<400> 15

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg  
 1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110



Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 16

<211> 1499

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний важкий ланцюг химерного антитіла до FcRH5 людини (ch10A8)

<400> 16

cacctcggtt	ctatcgattg	aattccacca	tgggatggtc	atgtatcatc	cttttctag	60
tagcaactgc	aactggagcg	tacgtgaag	tgcaattggt	ggagtctggg	ggaggcttag	120
tgaagcctgg	agggtcctg	aaaatctcct	gtcagcctc	tggattcact	ttcagtagct	180
atgccgtgtc	ttgggttcgc	cagactccgg	agaagaggct	ggagtgggtc	gctaccatta	240
gcagtgggtg	tagttgacc	ttctatttag	acagtgtgag	gggtcgattc	accatctcca	300
gagacaatgc	caagaacacc	ctgtacctgc	aaatgagcag	tctgaggtct	gaagacacgg	360

ccatgtatta	ctgtgcaagg	cccatccgg	attactatgc	tttgactac	tgggtcaag	420
gaacctcagt	caccgtctcc	tcagcctcca	ccaagggccc	atcggtcttc	cccctggcac	480
cctctccaa	gagcacctct	gggggcacag	cggccctggg	ctgcctggtc	aaggactact	540
tccccgaacc	ggtgacggtg	tcgtggaact	caggcgcctt	gaccagcggc	gtgcacacct	600
tcccggtgt	cctacagtcc	tcaggactct	actccctcag	cagcgtggtg	actgtgccct	660
ctagcagctt	gggcacccag	acctacatct	gcaacgtgaa	tcacaagccc	agcaacacca	720
aggtggacaa	gaaagttgag	cccaaactt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	780
cagcacctga	accctggggg	gaccgtcagt	cttctcttc	ccccaaaac	ccaaggacac	840
cctcatgatc	tcccggaacc	ctgaggtcac	atcggtggtg	gtggacgtga	gccacgaaga	900
ccctgaggtc	aagttaact	gttacgtgga	cggcgtggag	gtgcataatg	ccaagacaaa	960
gccgcgggag	gagcagtaca	acagcacgta	ccgggtgggc	agcgtctca	ccgtctgca	1020
ccagactgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaaggtc	tccaacaag	ccctcccagc	1080
ccccatcgag	aaaaccatct	caaagccaa	agggcagccc	cgagaaccac	aggtgtacac	1140
cctgccccca	tcccggaag	agatgacaa	gaaccaggtc	agcctgacct	gcctggtaaa	1200
aggcttctat	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	aatgggcagc	cgagaacaaa	1260
ctacaagacc	acgcctcccg	tgctggactc	cgacggctcc	ttctctctct	acagcaagct	1320
caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	tcattgctccg	tgatgcatga	1380
ggctctgcac	aaccactaca	cgcagaagag	cctctccctg	tctccgggta	aatgagtgcg	1440
acggccctag	agtcgacctg	cagaagcttg	gccgccatgg	cccaacttgt	ttattgcag	1499

<210> 17

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний важкий ланцюг химерного антитіла до FcRH5 людини (ch10A8)

<400> 17

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
           20                          25                          30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
           35                          40                          45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val  
           50                          55                          60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                          70                          75                          80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
                           85                          90                          95

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
           100                          105                          110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
           115                          120                          125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
           130                          135                          140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145                          150                          155                          160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
                           165                          170                          175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
           180                          185                          190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
           195                          200                          205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
           210                          215                          220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys

<210> 18

<211> 108

<212> білок

<213> Mus musculus

<220>

<223> Варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого антітіла (mu10A8)

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg  
 1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 19

<211> 108

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: варіабельний домен легкого ланцюга гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 19

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 20

<211> 119

<212> білок

<213> Mus musculus

<220>

<223> Опис штучної послідовності: варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого антитіла (mu10A8)

<400> 20

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val  
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 21

<211> 119

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val  
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 22

<211> 23

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний легкий ланцюг химерного антитіла до (hu10A8.v1) людини

<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 23

<211> 15

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний легкий ланцюг химерного антитіла до (hu10A8.v1) людини

<400> 23

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 24

<211> 32

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний легкий ланцюг химерного антитіла до (hu10A8.v1) людини



<400> 24

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 25

<211> 11

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний FR4-LC легкий ланцюг  
гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 25

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala  
1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 27

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr  
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>и

<223> опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 28

Gln Gln His Phe Ser Ser Pro Arg Thr

1

5

<210> 29

<211> 106

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетична послідовність CL1-LC гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 29

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1

5

10

15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

20

25

30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35

40

45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50

55

60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65

70

75

80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85

90

95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

<210> 30

<211> 108

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний варіабельний домен легкого ланцюга гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 30

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 31

<211> 25

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетична послідовність FR1-HC важкого ланцюга гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 31

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25

<210> 32  
 <211> 13  
 <212> білок  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> опис штучної послідовності: синтетична послідовність FR2-НС важкого ланцюга гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 32  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 32  
 <212> білок  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> опис штучної послідовності: синтетична послідовність FR3-НС важкого ланцюга гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 33  
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 1 5 10 15

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 34  
 <211> 11  
 <212> білок  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> опис штучної послідовності: синтетична послідовність FR4-НС важкого ланцюга гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 34  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 13  
 <212> білок  
 <213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 35

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Val Ser  
1 5 10

<210> 36

<211> 16

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 36

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val  
1 5 10 15

<210> 37

<211> 12

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 37

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 38

<211> 108

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: послідовність CH1-НС гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 100 105

<210> 39

<211> 222

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетична послідовність Fc-НС гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 39

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
210 215 220

<210> 40

<211> 119

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: варіабельний домен важкого ланцюга гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 40

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val  
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 41  
<211> 214  
<212> білок  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> опис штучної послідовності: синтетична послідовність ThioMab-hu10A8.v1-  
HC(A118C)-легкого ланцюга

<400> 41  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80



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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 42

<211> 449

<212> блок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетична послідовність ThioMab-hu10A8.v1-  
HC(A118C)-важкого ланцюга

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20	25	30
Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val		
50	55	60
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
145	150	155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		

225                      230                      235                      240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
                                  245                      250                      255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
                                  260                      265                      270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
                                  275                      280                      285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
                                  290                      295                      300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305                      310                      315                      320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
                                  325                      325                      330  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
                                  340                      345                      350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
                                  355                      360                      365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
                                  370                      375                      380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385                      390                      395                      400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
                                  405                      410                      415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
                                  420                      425                      430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435

440

445

Lys

<210> 43

<211> 214

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетична послідовність ThioMab-hu10A8.v1-LC(V205C)-легкого ланцюга

<400> 43

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 44

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетична послідовність ThioMab-hu10A8.v1-LC(V205C)-важкого ланцюга

<400> 44

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val  
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

	85	90	95
Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
	115	120	125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
	130	135	140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
	145	150	155
			160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
	165	170	175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
	180	185	190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
	195	200	205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
	210	215	220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
	225	230	235
			240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	260	265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			

290                      295                      300  
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305                      310                      315                      320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325                      325                      330  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340                      345                      350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355                      360                      365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370                      375                      380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385                      390                      395                      400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405                      410                      415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420                      425                      430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435                      440                      445

Lys

<210> 45  
 <211> 23  
 <212> білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 45  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                      5                      10                      15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 46  
<211> 15  
<212> білок  
<213> Homo sapiens

<400> 46  
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 47  
<211> 32  
<212> білок  
<213> Homo sapiens

<400> 47  
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 48  
<211> 11  
<212> білок  
<213> Homo sapiens

<400> 48  
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
1 5 10

<210> 49  
<211> 25  
<212> білок  
<213> Homo sapiens

<400> 49  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25



<210> 50  
 <211> 13  
 <212> білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 50  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 1 5 10

<210> 51  
 <211> 30  
 <212> білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 51  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 52  
 <211> 11  
 <212> білок  
 <213> Homo sapiens

<400> 52  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 53  
 <211> 30  
 <212> білок  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> опис штучної послідовності:

<400> 53  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu Asp  
 1 5 10 15

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe  
 20 25 30

<210> 54

<211> 20

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний альбумінзв'язуючий пептид

<400> 54

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe

20

<210> 55

<211> 20

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний альбумінзв'язуючий пептид

<400> 55

Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe

20

<210> 56

<211> 18

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний альбумінзв'язуючий пептид

<400> 56

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu

1 5 10 15

Asp Asp

<210> 57

<211> 11

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний альбумінзв'язуючий пептид

<400> 57

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1 5 10

<210> 58

<211> 684

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 58

gatgtgctcc	ttggagctgg	tgtgcagtg	cctgactgta	agatcaagtc	caaacctgtt	60
ttggaattga	ggaaacttct	ctttgatct	cagcccttgg	tgtccaggt	cttcagctc	120
tgtgggtgat	attactggtc	ctggctcctg	tcagtgga	gtttcaagg	acaccaggc	180
ccattatttt	cctccagcct	ccatggacca	cagtctcca	aggagagaga	gtgacctca	240
cttgcaaggg	attcgcttc	tactcaccac	agaaaacaaa	atggtacat	cggtacctg	300
ggaaagaat	actaagagaa	acccagaca	atatcctga	ggttcaggaa	tctggagagt	360
acagatgcc	ggcccagggc	tcccctctca	gtagccctgt	gcactggat	ttttctcag	420
agatgggatt	tcctcatgct	gcccaggcta	atgtgaact	cctgggctca	agtgatctgc	480
tcacctaggc	ctctcaaagc	gctgggatta	cagcttcgct	gatcctgcaa	gtccacttt	540
ctgtgtttga	aggagactct	gtggttctga	ggtgccgggc	aaaggcggaa	gtaacactga	600
ataatactat	ttacaagaat	gataatgtcc	tggcattcct	taataaaga	actgacttcc	660
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaa				684

<210> 59

<211> 124

<212> білок

<213> Homo sapiens

<400> 59

Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln

1 5 10 15

Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr  
20 25 30

Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Gly Phe Arg  
35 40 45

Phe Tyr Ser Pro Gln Lys Thr Lys Trp Tyr His Arg Tyr Leu Gly Lys  
50 55 60

Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu Glu Val Gln Glu Ser  
65 70 75 80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val  
85 90 95

His Leu Asp Phe Ser Ser Glu Met Gly Phe Pro His Ala Ala Gln Ala  
100 105 110

Asn Val Glu Leu Leu Gly Ser Ser Asp Leu Leu Thr  
115 120

<210> 60

<211> 5392

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 60

aattcactaa tgcattctgc tcttttgag agcacagctt ctcagatgtg ctcttggag	60
ctggtgtgca gtgtcctgac tgtaagatca agtccaaacc tgttttggaa ttgaggaaac	120
ttctcttttg atctcagccc ttggtgtgcc aggtcttcat gctgctgtgg gtgatattac	180
tggtcctggc tctgtcagt ggacagtttg caaggacacc caggccatt atttctctcc	240
agcctccatg gaccacagtc ttccaaggag agagagtgac cctcactgc aagggatttc	300
gcttctactc accacagaaa acaaatggt accatcggta cctcgggaaa gaaatactaa	360
gagaaacccc agacaatatc cttgaggttc aggaatctgg agagtacaga tgccaggccc	420
agggtctccc tctcagtagc cctgtgcact tggatttttc ttcagcttcg ctgatcctgc	480

aagctccact	ttctgtgtt	gaaggagact	ctgtggttct	gaggtgccgg	gcaaaggcgg	540
aagtaacact	gaataaact	atttacaaga	atgataatgt	cctggcattc	cttaataaaa	600
gaactgactt	ccatattcct	catgcatgtc	tcaaggacaa	tggtgcatat	cgctgtactg	660
gatataagga	aagttgtgc	cctgtttctt	ccaatacagt	caaaatccaa	gtccaagagc	720
catttacacg	tccagtgtg	agagccagct	ccttccagcc	catcagcggg	aacccagtga	780
ccctgacctg	tgagaccag	ctctcttag	agaggtcaga	tgtcccgtc	cgttccgct	840
tcttcagaga	tgaccagacc	ctgggattag	gctggagtct	ctccccgaat	ttccagatta	900
ctgccatgtg	gagtaaat	tcagggttct	actggtgtaa	ggcagcaaca	atgcctcaca	960
gcgtcatatc	tgacagccg	agatcctgga	tacaggtgca	gatccctgca	tctcatcctg	1020
tcctcactct	cagccctgaa	aaggctctga	attttgagg	aaccaagggtg	acatttact	1080
gtgaaaccca	ggaagattct	ctgcgcactt	tgtacaggtt	ttatcatgag	ggtgtcccc	1140
tgaggacaaa	gtcagtcgc	tgtgaaagg	gagcatccat	cagcttctca	ctgactacag	1200
agaattcagg	gaactactac	tgacacagctg	acaatggcct	tggcgccaag	cccagtaagg	1260
ctgtgagcct	ctcagtcact	gttcccgtgt	ctcatcctgt	cctcaacctc	agctctcctg	1320
aggacctgat	ttttgaggga	gccaaaggta	catttactg	tgaagcccag	agaggttcac	1380
tccccatcct	gtaccagttt	catcatgagg	atgtgccct	ggagcgtagg	tcggccaact	1440
ctgcaggagg	agtgcccatc	agcttctctc	tgactgcaga	gcattcagg	aactactact	1500
gcacagctga	caatggcttt	ggccccagc	gcagtaaggc	ggtgagcctc	tccatcactg	1560
tccctgtgtc	tcatcctgtc	ctcacctca	gctctgtga	ggccctgact	tttgaaggag	1620
ccactgtgac	acttactgt	gaagtccaga	gaggttcccc	acaaatccta	taccagtttt	1680
atcatgagga	catgcccctg	tgagcagct	caacaccctc	tgtgggaaga	gtgtccttca	1740
gcttctctct	gactgaagga	cattcaggga	attactactg	cacagctgac	aatggctttg	1800
gtccccagcg	cagtgaagtg	gtgagccttt	ttgtactgt	tccagtgtct	cgtcccatcc	1860
tcacctcag	ggttcccagg	gccaggctg	tggtggggga	cctgctggag	cttactgtg	1920
aggccccgag	aggctctccc	ccaatcctgt	actggtttta	tcatgaggat	gtcaccctgg	1980
ggagcagctc	agccccctct	ggaggagaag	cttcttcaa	cctctctctg	actgcagaac	2040

attctggaaa ctactcatgt gaggccaaca atggcctagt ggcccagcac agtgacacaa	2100
tatcactcag tgttatagtt ccagtatctc gtcccatcct caccttcagg gctcccaggg	2160
cccaggctgt ggtggggggac ctgctggagc ttactgtga ggccctgaga ggctcctccc	2220
caatcctgta ctggttttat catgaagatg tcacctggg taagatctca gcccctctg	2280
gaggaggggc ctcttcaac ctctctga ctacagaaca ttctggaatc tactcctgtg	2340
aggcagacaa tggtcggag gcccagcgca gtgagatggt gacactgaaa gttgcagttc	2400
cgggtgtctg cccggctctc accctcaggg ctccgggac ccatgctgcg gtgggggacc	2460
tgtgagagct tactgtgag gccctgagag gctctccct gatcctgtac cggtttttc	2520
atgaggatgt caccctagga aataggctgt cccctctgg aggagcgtcc ttaaactct	2580
ctctgactgc agagcactct ggaaactact cctgtgaggc cgacaatggc ctcgggggccc	2640
agcgcagtga gacagtgaca cttatatca cagggtctgac cgcgaacaga agtggccctt	2700
ttgccacagg agtcgccgg ggctgtctca gcatagcagg cctgtctgcg ggggcactgc	2760
tgtctactg ctggctctg agaaaagcag ggagaaagcc tgcctctgac cccgccagga	2820
gccctccaga ctcgactcc caagagccca cctatcaca tgtaccagcc tgggaagagc	2880
tgcaaccagt gtacactaat gcaaatccta gaggagaaaa tgtggtttac tcagaagtac	2940
ggatcatcca agagaaaaag aaacatgcag tggcctctga cccaggcat ctcaggaaca	3000
agggttcccc tatcatctac tctgaagtta aggtggcgtc aaccccggtt tccggatccc	3060
tgttcttggc ttctcagct cctcacagat gagtccacac gtctctcaa ctgctgtttc	3120
agcctctgca ccccaaagt cccctgggg gagaagcagc attgaagtgg gaagatttag	3180
gtgccccag accatatcta ctggcctttg ttacatgt cctattctc agtctgacca	3240
gaatgcaggg ccctgtgga ctgtcacctg ttccaggt aaagccctga ctggcaggtt	3300
ttttaatcca gtggcaaggt gctccactc caggggccag cacatctct ggattcctta	3360
gtgggttca gctgtgattg ctgttctgag tactgtctc atcacacccc cacagagggg	3420
gtcttaccac acaaaggag agtgggcctt caggagatgc cgggctggcc taacagctca	3480
gggtctccta aactccgaca cagagttcct gcttgggtg gatgcatttc tcaattgtca	3540
tcagcctggt ggggctactg cagtgtgtg ccaaatggga cagcacacag cctgtgcaca	3600

tgggacatgt	gatgggtctc	cccacggggg	ctgcatttca	cactcctcca	cctgtctcaa	3660
actctaaggt	cggcacttga	caccaaggta	acttctctcc	tgctcatgtg	tcagtgtcta	3720
cctgccaag	taagtggctt	tcatacacca	agtccaagt	tcttccatc	ctaacagaag	3780
taaccagca	agtcaaggcc	aggaggacca	ggggtgcaga	cagaacacat	actggaacac	3840
aggaggtgct	caattactat	ttgactgact	gactgaatga	atgaatgaat	gaggaagaaa	3900
actgtgggta	atcaaactgg	cataaaatcc	agtgcactcc	ctaggaaatc	cgggaggtat	3960
tctggcttcc	ctaagaaaca	acggaagaga	aggagcttgg	atgaggaaac	tggtcagcaa	4020
gaggaagggc	ttctcacact	ttcatgtgct	tgtggatcac	ctgaggatcc	tgtgaaaata	4080
cagatactga	ttcagtgggt	ctgtgtagag	cctgagactg	ccattctaac	atgttccag	4140
gggatgctga	tgctgtggc	cctgggactg	cactgcatgc	atgtgaagcc	ctataggctt	4200
cagcagaggc	ccatggagag	ggaatgtgtg	gctctggctg	cccaggggcc	aactcggttc	4260
acacggatcg	tgctgtctcc	tggccagcct	ttggccacag	caccaccagc	tgctgttct	4320
gagagagctt	cttctctgtg	acatgttggc	ttcatcagc	cacctggga	agcggaaagt	4380
agctgccact	atctttgtt	ccccacctca	ggcctcacac	tttccatga	aaagggtgaa	4440
tgtatataac	ctgagccctc	tccattcaga	gttgttctcc	catctctgag	caatgggatg	4500
ttctgttccg	cttttatgat	atccatcaca	tcttatcttg	atctttgctc	ccagtggatt	4560
gtacagtgat	gacttttaag	ccccacggcc	ctgaaataaa	atccttccaa	gggcattgga	4620
agctctctcc	acctgaacca	tggcttttca	tgcttccaag	tgtaggggcc	ttgccagat	4680
agacagggct	gactctgctg	ccccaacctt	tcaaggagga	aaccagacac	ctgagacagg	4740
agcctgtatg	cagcccatgt	cagccttgca	gaggacaagg	ctggaggcat	ttgtcatcac	4800
tacagatatg	caactaaaat	agacgtggag	caagagaaat	gcattccac	cgaggccgct	4860
tttttaggcc	tagttgaaag	tcaagaagga	cagcagcaag	cataggctca	ggattaaaga	4920
aaaaaatctg	ctcacagttt	gttctggagg	tcacatcacc	aacaaagctc	acgccctatg	4980
cagttctgag	aaggtggagg	caccaggctc	aaaagaggaa	atttagaatt	tctcattggg	5040
agagtaaggt	accccatcc	cagaatgata	actgcacagt	ggcagaacaa	actccaccct	5100
aatgtgggtg	gaccccatcc	agtctgttga	aggcctgagt	gtaacaaaag	ggcttattct	5160

tctcaagta agggggaact cctgcttgg gctgggacat aagttttct gcttcagac 5220  
 gcaaactgaa aaatggctct tcttgggtct tgagcttgct ggcatatgga ctgaaagaaa 5280  
 ctatgctatt ggatctcctg gatctccagc ttgctgactg cagatcttga gatatgtcag 5340  
 cctctacagt cacaagagct aattcattct aataaaccaa tctttctgta aa 5392

<210> 61

<211> 977

<212> Блок

<213> Homo sapiens

<400> 61

Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln  
 1 5 10 15

Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr  
 20 25 30

Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Gly Phe Arg  
 35 40 45

Phe Tyr Ser Pro Gln Lys Thr Lys Trp Tyr His Arg Tyr Leu Gly Lys  
 50 55 60

Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu Glu Val Gln Glu Ser  
 65 70 75 80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val  
 85 90 95

His Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser  
 100 105 110

Val Phe Glu Gly Asp Ser Val Val Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu  
 115 120 125

Val Thr Leu Asn Asn Thr Ile Tyr Lys Asn Asp Asn Val Leu Ala Phe  
 130 135 140

Leu Asn Lys Arg Thr Asp Phe His Ile Pro His Ala Cys Leu Lys Asp



145	150	155	160
Asn Gly Ala Tyr Arg Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Ser Cys Cys Pro Val			
	165	170	175
Ser Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Pro Phe Thr Arg Pro			
	180	185	190
Val Leu Arg Ala Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Asn Pro Val Thr			
	195	200	205
Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu			
	210	215	220
Arg Phe Arg Phe Phe Arg Asp Asp Gln Thr Leu Gly Leu Gly Trp Ser			
	225	230	240
Leu Ser Pro Asn Phe Gln Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser Gly			
	245	250	255
Phe Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Pro His Ser Val Ile Ser Asp			
	260	265	270
Ser Pro Arg Ser Trp Ile Gln Val Gln Ile Pro Ala Ser His Pro Val			
	275	280	285
Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val			
	290	295	300
Thr Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Arg			
	305	310	320
Phe Tyr His Glu Gly Val Pro Leu Arg His Lys Ser Val Arg Cys Glu			
	325	330	335
Arg Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu Asn Ser Gly Asn			
	340	345	350
Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Lys Pro Ser Lys Ala			

355	360	365
Val Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Asn Leu		
370	375	380
Ser Ser Pro Glu Asp Leu Ile Phe Glu Gly Ala Lys Val Thr Leu His		
385	390	395 400
Cys Glu Ala Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ile Leu Tyr Gln Phe His His		
405	410	415
Glu Asp Ala Ala Leu Glu Arg Arg Ser Ala Asn Ser Ala Gly Gly Val		
420	425	430
Ala Ile Ser Phe Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys		
435	440	445
Thr Ala Asp Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Lys Ala Val Ser Leu		
450	455	460
Ser Ile Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala		
465	470	475 480
Glu Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val		
485	490	495
Gln Arg Gly Ser Pro Gln Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Met		
500	505	510
Pro Leu Trp Ser Ser Ser Thr Pro Ser Val Gly Arg Val Ser Phe Ser		
515	520	525
Phe Ser Leu Thr Glu Gly His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp		
530	535	540
Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Val Val Ser Leu Phe Val Thr		
545	550	555 560
Val Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu Arg Val Pro Arg Ala Gln		

565	570	575
Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Pro Arg Gly		
580	585	590
Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly		
595	600	605
Ser Ser Ser Ala Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu		
610	615	620
Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu		
625	630	640
Val Ala Gln His Ser Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val		
645	650	655
Ser Arg Pro Ile Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val		
660	665	670
Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro		
675	680	685
Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser		
690	695	700
Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu		
705	710	720
His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Pro Glu Ala Gln		
725	730	735
Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser Arg Pro		
740	745	750
Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Gly Thr His Ala Ala Val Gly Asp Leu		
755	760	765
Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Leu Ile Leu Tyr		

770	775	780	
Arg Phe Phe His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Arg Ser Ser Pro Ser			
785	790	795	800
Gly Gly Ala Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn			
	805	810	815
Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr			
	820	825	830
Val Thr Leu Tyr Ile Thr Gly Leu Thr Ala Asn Arg Ser Gly Pro Phe			
	835	840	845
Ala Thr Gly Val Ala Gly Gly Leu Leu Ser Ile Ala Gly Leu Ala Ala			
	850	855	860
Gly Ala Leu Leu Leu Tyr Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Lys			
865	870	875	880
Pro Ala Ser Asp Pro Ala Arg Ser Pro Pro Asp Ser Asp Ser Gln Glu			
	885	890	895
Pro Thr Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr			
	900	905	910
Thr Asn Ala Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg			
	915	920	925
Ile Ile Gln Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asp Pro Arg His			
	930	935	940
Leu Arg Asn Lys Gly Ser Pro Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala			
945	950	955	960
Ser Thr Pro Val Ser Gly Ser Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His			
	965	970	975
Arg			

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 2934

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; макака яванський

&lt;400&gt; 62

atgctgctgt gggtgatact actggctctg gctcctgtca gtggacagtt tgtaaggaca	60
tacaagtcca ttattttcct ccagcctcca tggaccacag tcttccgagg agagagagtg	120
aatctgactt gcaagggatt tggtttctac tcatcacaaa aaacaaaatg gtactatcgg	180
caccttggga aagaaatc gagagaaacc caaaaaata cccttgaggt tcaggaatct	240
ggagagtaca gatgccaggc ccagggtcc cctctcagta gccctgtgtc cttggacttt	300
tcttcagctt cgctgatcct gcaagctcca cttctgtgt ttgaaggaga ctctgtggtt	360
ctgaggtgcc gggcaaaggc ggaagtaaca ctgaagacta ctatttaca gaatgaaat	420
gtcctggcat ttcttaataa atcaactgac ttccatattt ctcagtcaag tctcaaggac	480
aatggtgcat atcgctgtac tggatataag gaaactgtt gccctgttcc ttccaacaca	540
gtcaaaatcc aagccaaga gtcatttaca cgtccagtgt tgagagtcag ctcttccag	600
cccatcagcg ggagcccagt gaccctgacc tgtgagaccc agctctctct agagaggtca	660
gatgtcccgc tccagttctg cttcttcaga aatgaccaga tgctgggac aggctgcagc	720
ctctccccga agttccggat tactgccatg tggagtaaag attcaggatc ctactggtgt	780
aaggcagcaa caatgtgtta tgacaccaca tctaacagct tgagatcctg gatacaggtg	840
ctgatccccg catctcatcc tgtcctcact ctgagccctg aaaaggctct gaattttgag	900
ggaaccaagg tgaaacttca ctgtgaaacc caggaagatt ctctgcgcac ttgtacaag	960
ttttatcatg acggtgttcc cctgaggtac aagtcagtcc gctgtgaaaa gggagcatcc	1020
atcagcttct cactgactac agagcattca gggaaactact actgcacagc tgacaatggc	1080
catggtgcca agcccagtga ggctgtaagc ctgtcagtea ctgtccctgt gtctcgcct	1140
gtcctcacc tcagctctgc agaggacctg atttctgagg gagccaagtt gacacttcac	1200
tgtgaagccc agagagggtc actccccatc gtgtaccagt ttcatcatga gaatgcctcc	1260

ctggggaata	ggtcggccca	ctctgcagga	ggagtggcca	tcagctctc	tctgactgca	1320
gaccattcgg	ggaactacta	ctgcacagct	aacaatggct	ttggcccca	gcgcagtgag	1380
gcagtgagcc	tctccatcac	tgtaccctg	tctcgtctg	tctcacct	cagctctgct	1440
gaggccctga	ctttgaagg	agccacgggtg	acactttact	gtgaggcca	gagagggtcc	1500
ccacgaatcc	tataccagtt	ttatcatgag	gacgtgcccc	tggggagcaa	ctcaacccc	1560
tctgtgggaa	aagtgtcctt	cagcttctct	ctgactgcag	cacattcagg	gaattactac	1620
tgacagctg	acaacggctt	tggtcccccag	cgagtgagg	cggtgagcct	ctttgtcact	1680
gttcagtg	ctgccccat	cctcacctc	agggttccca	gggcccaggc	tgtgtgggg	1740
gacctctgg	agcttcgtg	tgaggccctg	agaggctctc	ccccgatcat	gtactggtt	1800
tatcatgagg	atgtcacct	ggggagcagc	tcagtccct	ctggaggaga	agcctcttc	1860
aacctctctc	tgactgcaga	acattctgga	aactactcat	gtgaggccaa	caatggcctg	1920
gtggcccagc	acagtatac	aatatcactc	agtgttatag	ttccagtgtc	tcgtccatc	1980
ctcacctca	gagctcccag	ggcccaggct	gtagtggggg	acctgctgga	gttccactgt	2040
gaggccctga	gaggctcctc	cccaatcctg	tactggttt	atcatgaaga	gtcacccctg	2100
ggtgaagatc	cagccccctc	tggaggagga	gcctacttca	acctctctct	gactacagaa	2160
cattctgga	tctactcctg	tgaggcggac	aatggtctgg	aggcccagcg	cagtgagatg	2220
gtgacctga	aagttgcagt	tccggtgtct	cgccccgtcc	tcacctcag	ggctcccagg	2280
ggccagggtg	cggtggggga	cctgctggag	cttactgtg	aggccctgag	aggctctccc	2340
ctgatctgt	accagtttta	tcatgaggat	gtcacctag	gaaatagctc	agccctctct	2400
ggaggagcgt	tctcaacct	ctctctgact	gcagaacact	ctggaaacta	ctcctgtgag	2460
gccgacaatg	gtctgggggc	ccagcgcagt	gagacagtga	cactttatct	cacagggtg	2520
accgagaaca	gaagtggccc	tgttgccacg	ggtgtcaccg	gggtgtctgt	cagcctagca	2580
ggccttgctg	ctgtggcact	gctgctctac	tgctggctct	caagaaaagc	agggagagag	2640
cctgcctctg	acctctgcag	gagcccttca	gacttgagct	cccaggagcc	cacctaccac	2700
aatgtaccag	cctgggaaga	gctgcaacca	gtgtacagta	atgtgaatcc	tagaggagaa	2760
aatgtggttt	actcagaagt	acggatcatc	cgagagaaaa	agaaacatgc	agtgcctct	2820

aaccccaggc atctcaggaa caaggttcc tgtatcatct actctgaagt gaaggtggca 2880

tcaaccccag cctccagatg cctgttcttg gcttcctcag ctcctcacag atga 2934

<210> 63

<211> 977

<212> білок

<213> макака яванський

<400> 63

Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln

1 5 10 15

Phe Val Arg Thr Tyr Lys Ser Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr

20 25 30

Thr Val Phe Arg Gly Glu Arg Val Asn Leu Thr Cys Lys Gly Phe Gly

35 40 45

Phe Tyr Ser Ser Gln Lys Thr Lys Trp Tyr Tyr Arg His Leu Gly Lys

50 55 60

Glu Ile Ser Arg Glu Thr Gln Lys Asn Thr Leu Glu Val Gln Glu Ser

65 70 75 80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val

85 90 95

Ser Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser

100 105 110

Val Phe Glu Gly Asp Ser Val Val Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu

115 120 125

Val Thr Leu Lys Thr Thr Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Val Leu Ala Phe

130 135 140

Leu Asn Lys Ser Thr Asp Phe His Ile Ser His Ala Ser Leu Lys Asp

145 150 155 160

Asn Gly Ala Tyr Arg Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Thr Cys Cys Leu Val

165	170	175
Ser Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Ser Phe Thr Arg Pro		
180	185	190
Val Leu Arg Val Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Ser Pro Val Thr		
195	200	205
Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu		
210	215	220
Gln Phe Cys Phe Phe Arg Asn Asp Gln Met Leu Gly Ser Gly Cys Ser		
225	230	235 240
Leu Ser Pro Lys Phe Arg Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser Gly		
245	250	255
Ser Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Cys Tyr Asp Thr Thr Ser Asn		
260	265	270
Ser Leu Arg Ser Trp Ile Gln Val Leu Ile Pro Ala Ser His Pro Val		
275	280	285
Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val		
290	295	300
Lys Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Lys		
305	310	315 320
Phe Tyr His Asp Gly Val Pro Leu Arg Tyr Lys Ser Val Arg Cys Glu		
325	330	335
Lys Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Asn		
340	345	350
Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly His Gly Ala Lys Pro Ser Glu Ala		
355	360	365
Val Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu		



370	375	380	
Ser Ser Ala Glu Asp	Leu Ile Ser Glu Gly	Ala Lys Leu Thr	Leu His
385	390	395	400
Cys Glu Ala Gln Arg	Gly Ser Leu Pro Ile	Val Tyr Gln Phe	His His
	405	410	415
Glu Asn Ala Ser Leu	Gly Asn Arg Ser Ala	His Ser Ala Gly	Gly Val
	420	425	430
Ala Ile Ser Phe Ser	Leu Thr Ala Asp His	Ser Gly Asn Tyr	Tyr Cys
	435	440	445
Thr Ala Asn Asn Gly	Phe Gly Pro Gln Arg	Ser Glu Ala Val	Ser Leu
	450	455	460
Ser Ile Thr Val Pro	Val Ser Arg Pro Val	Leu Thr Leu Ser	Ser Ala
465	470	475	480
Glu Ala Leu Thr Phe	Glu Gly Ala Thr Val	Thr Leu Tyr Cys	Glu Val
	485	490	495
Gln Arg Gly Ser Pro	Arg Ile Leu Tyr Gln	Phe Tyr His Glu	Asp Val
	500	505	510
Pro Leu Gly Ser Asn	Ser Thr Pro Ser Val	Gly Lys Val Ser	Phe Ser
	515	520	525
Phe Ser Leu Thr Ala	Ala His Ser Gly Asn	Tyr Tyr Cys Thr	Ala Asp
	530	535	540
Asn Gly Phe Gly Pro	Gln Arg Ser Glu Ala	Val Ser Leu Phe	Val Thr
545	550	555	560
Val Pro Val Ser Arg	Pro Ile Leu Thr Leu	Arg Val Pro Arg	Ala Gln
	565	570	575
Ala Val Val Gly Asp	Leu Leu Glu Leu	Arg Cys Glu Ala	Leu Arg Gly

580                      585                      590  
 Ser Pro Pro Ile Met Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly  
           595                      600                      605  
 Ser Ser Ser Val Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu  
           610                      615                      620  
 Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu  
           625                      630                      635                      640  
 Val Ala Gln His Ser Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val  
                                 645                      650                      655  
 Ser Arg Pro Ile Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val  
                                 660                      665                      670  
 Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro  
                                 675                      680                      685  
 Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser  
                                 690                      695                      700  
 Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Tyr Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu  
           705                      710                      715                      720  
 His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Glu Ala Gln  
                                 725                      730                      735  
 Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser Arg Pro  
                                 740                      745                      750  
 Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ala Gln Val Ala Val Gly Asp Leu  
                                 755                      760                      765  
 Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Leu Ile Leu Tyr  
                                 770                      775                      780  
 Gln Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Ser Ser Ala Leu Ser

785 790 795 800

Gly Gly Ala Phe Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn  
805 810 815

Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr  
820 825 830

Val Thr Leu Tyr Leu Thr Gly Leu Thr Glu Asn Arg Ser Gly Pro Val  
835 840 845

Ala Thr Gly Val Thr Gly Gly Leu Leu Ser Leu Ala Gly Leu Ala Ala  
850 855 860

Val Ala Leu Leu Leu Tyr Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Glu  
865 870 875 880

Pro Ala Ser Asp Pro Cys Arg Ser Pro Ser Asp Leu Asp Ser Gln Glu  
885 890 895

Pro Thr Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr  
900 905 910

Ser Asn Val Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg  
915 920 925

Ile Ile Arg Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asn Pro Arg His  
930 935 940

Leu Arg Asn Lys Gly Ser Cys Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala  
945 950 955 960

Ser Thr Pro Ala Ser Arg Cys Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His  
965 970 975

Arg

<210> 64

<211> 108

<212> білок

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 65

<211> 119

<212> білок

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (101)..(101)

<223> будь-яка амінокислота

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (103)..(103)

<223> будь-яка амінокислота

<400> 65

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Arg Xaa Gly Xaa Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 67

<211> 449

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний повнорозмірний важкий ланцюг гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

<400> 67

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val  
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 325 330

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
435 440 445

Lys

<210> 68

<211> 6

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний 6xHis тег

<400> 68

His His His His His His

1

5

<210> 69

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 69

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Val Ser

1

5

10

<210> 70

<211> 17

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 70

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Leu Thr Phe Tyr Leu Asp Ser Val Arg

1

5

10

15

<210> 71

<211> 10

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетический пептид

<400> 71

Pro Ile Pro Asp Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr

<210> 66

<211> 214

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> опис штучної послідовності: синтетичний повнорозмірний легкий ланцюг



гуманізованого антитіла (hu10A8.v1)

&lt;400&gt; 66

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

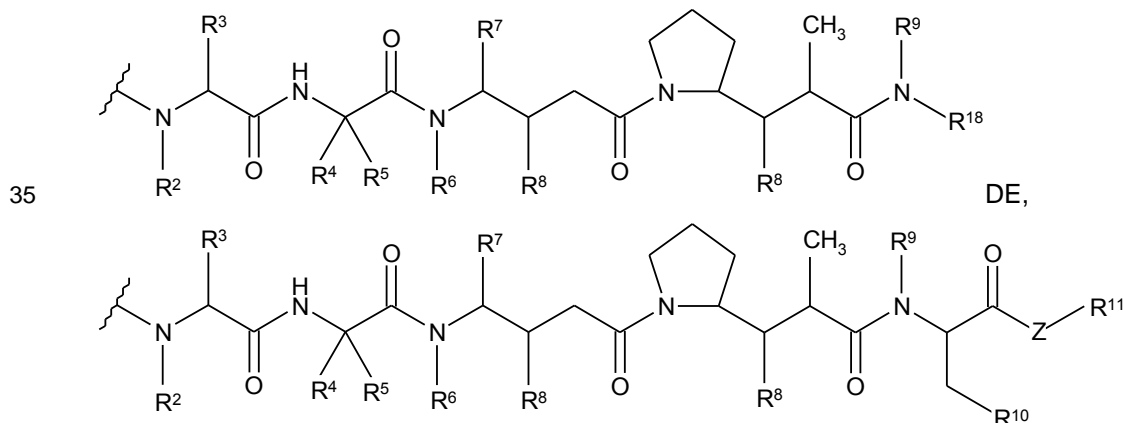
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене моноклональне антитіло до FcRH5, що містить:
  - (a) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить:
    - (i) HVR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO:26;
    - (ii) HVR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO:27; і
    - (iii) HVR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO:28; і
  - (b) варіабельний домен важкого ланцюга, який містить:
    - (i) HVR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO:35;
    - (ii) HVR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO:36; і
    - (iii) HVR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO:37.
2. Антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний із фрагментів Fab, Fab'-SH, Fv, scFv або (Fab')<sub>2</sub>.
3. Антитіло за будь-яким з пп. 1-2, яке **відрізняється** тим, що антитіло являє собою гуманізоване антитіло.
4. Антитіло за будь-яким з пп. 1-2, яке **відрізняється** тим, що антитіло являє собою химерне антитіло.
5. Антитіло за будь-яким з пп. 1-4 яке **відрізняється** тим, що антитіло містить послідовність каркасної ділянки, і щонайменше частина послідовності каркасної ділянки являє собою консенсусну послідовність каркасної ділянки людини.
6. Антитіло за будь-яким з пп. 1-5, яке **відрізняється** тим, що антитіло містить к консенсусну послідовність каркасної ділянки підгрупи I людини.
7. Антитіло за будь-яким з пп. 1-6, яке **відрізняється** тим, що антитіло містить консенсусну послідовність каркасної ділянки підгрупи III важкого ланцюга людини.
8. Антитіло за будь-яким з пп. 1-7, яке **відрізняється** тим, що варіабельний домен важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:40.
9. Антитіло за будь-яким з пп. 1-8, яке **відрізняється** тим, що варіабельний домен легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:30.
10. Антитіло за будь-яким з пп. 1-9, яке **відрізняється** тим, що антитіло містить одну ділянку Fab, приєднану до ділянки Fc.
11. Антитіло за будь-яким з пп. 1-10, яке **відрізняється** тим, що антитіло містить CH1, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38, і/або Fc, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:39.
12. Антитіло за будь-яким з пп. 1-11, яке **відрізняється** тим, що антитіло містить CH1, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:29.
13. Виділене моноклональне антитіло до FcRH5, отримане способом, який включає:
  - (a) культивування клітини, що експресує антитіло, що складається з варіабельного домену важкого ланцюга і варіабельного домену легкого ланцюга за будь-яким із пп. 1-12; і
  - (b) виділення антитіла із вказаної культивованої клітини.
14. Антитіло за будь-яким з пп. 1-13, яке **відрізняється** тим, що містить один або більше вільних залишків цистеїну.
15. Антитіло за п. 14, яке **відрізняється** тим, що один або більше вільних залишків цистеїну мають значення реакційної здатності тіолової групи в діапазоні від 0,6 до 1,0.
16. Антитіло за будь-яким з пп. 14-15, яке **відрізняється** тим, що один або більше вільних залишків цистеїну знаходяться в легкому ланцюзі.
17. Антитіло за будь-яким з пп. 14-16, яке **відрізняється** тим, що послідовність важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:42.
18. Антитіло за будь-яким з пп. 14-16, яке **відрізняється** тим, що послідовність важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:44.
19. Антитіло за будь-яким з пп. 14-18, яке **відрізняється** тим, що послідовність легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:41.
20. Антитіло за будь-яким з пп. 14-18, яке **відрізняється** тим, що послідовність легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:43.
21. Антитіло за будь-яким з пп. 14-16, яке **відрізняється** тим, що вільний залишок цистеїну знаходиться в положенні 205, 114 і/або 400 легкого ланцюга згідно з нумерацією за Kabat.
22. Виділене антитіло, яке зв'язується з тим самим епітопом, що й антитіло за будь-яким з пп. 1-21.
23. Антитіло за будь-яким з пп. 1-22, яке **відрізняється** тим, що антитіло є моновалентним й містить ділянку Fc.
24. Антитіло за будь-яким з пп. 1-23, яке **відрізняється** тим, що антитіло є біспецифічним.

25. Антитіло за п. 24, яке специфічно зв'язується з CD3.  
 26. Полінуклеотид, що кодує антитіло за будь-яким з пп. 1-25.  
 27. Вектор, що містить полінуклеотид за п. 26.  
 28. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 27.  
 5 29. Імунокон'югат, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-25, ковалентно приєднане до цитотоксичного засобу.  
 30. Імунокон'югат за п. 29, який **відрізняється** тим, що цитотоксичний засіб вибраний з токсину, хіміотерапевтичного засобу, молекули препарату, антибіотику, радіоактивного ізотопу і нуклеази.  
 10 31. Імунокон'югат, що містить антитіло за будь-яким з пп. 1-25, ковалентно приєднане до захоплюваної мітки, мітки, що визначається, або твердого субстрату.  
 32. Імунокон'югат за п. 31, який **відрізняється** тим, що антитіло ковалентно приєднане до захоплюваної біотинової мітки.  
 33. Імунокон'югат за п. 31, який **відрізняється** тим, що антитіло ковалентно приєднане до мітки, що визначається, - флуоресцентного барвника.  
 15 34. Імунокон'югат за п. 33, який **відрізняється** тим, що флуоресцентний барвник вибраний з барвників флуоресцюючого типу, родамінового типу, дансилу, лісаміну, ціаніну, фікоеритрину, тейксомового червоного і їх аналогів.  
 35. Імунокон'югат за п. 31, який **відрізняється** тим, що антитіло ковалентно приєднане до радіонуклідної мітки, що визначається, яку вибирають з  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{133}\text{Xe}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$  і  $^{213}\text{Bi}$ .  
 20 36. Імунокон'югат, що має формулу  $\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$ , де:  
 (a) Ab є антитілом за будь-яким з пп. 1-25;  
 (b) L є лінкером;  
 25 (c) D є молекулою препарату;  
 (d) p – від 1 до 8.  
 37. Імунокон'югат за п. 36, який **відрізняється** тим, що L містить лінкер, вибраний з 6-малеїмідокпропілу (MC), малеїмідопропанолу (MP), валін-цитруліну (val-cit), аланін-фенілаланіну (ala-phe), p-амінобензилоксикарбонілу (PAB), N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноату (SPP), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (SMCC), ефіру 4-(2-піридилтіо)масляної кислоти й N-гідроксисукциніміду (SPDB), й N-сукцинімідил(4-йодоацетил)амінобензоату(SIAB).  
 30 38. Імунокон'югат за будь-яким з пп. 36-37, який **відрізняється** тим, що D являє собою ауристин або долостатин, і D являє собою лікарську сполуку формули DE або DF:

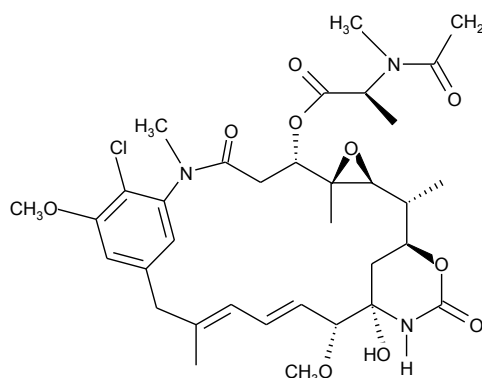
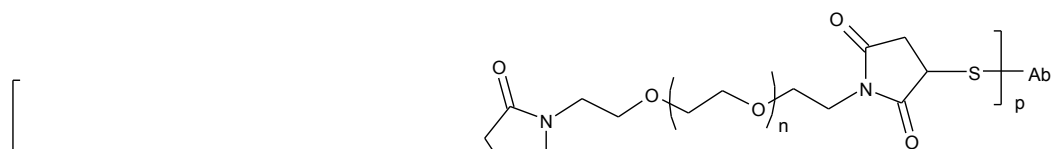
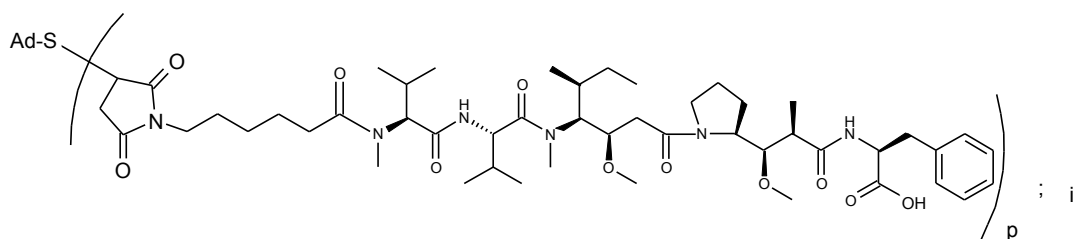
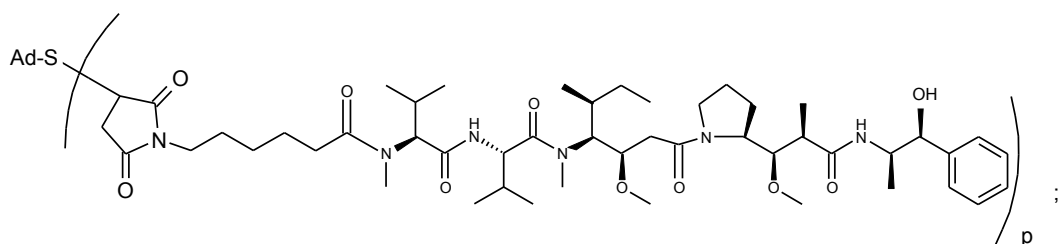
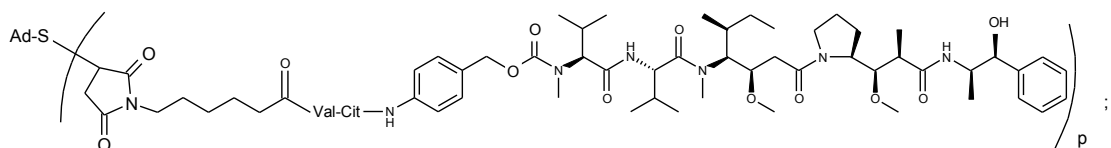
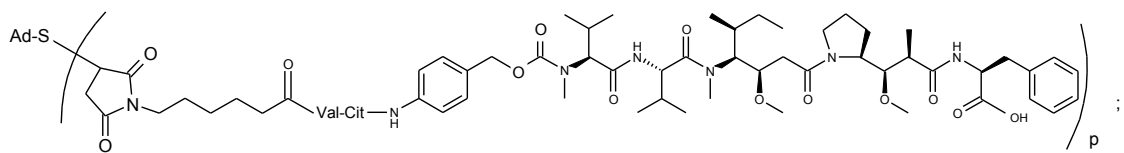


- DF,  
 де  $\text{R}^2$  і  $\text{R}^6$  являють собою метил,  $\text{R}^3$  і  $\text{R}^4$  являють собою ізопропіл,  $\text{R}^7$  являє собою вторинний бутіл, кожен  $\text{R}^8$  незалежно вибраний з  $\text{CH}_3$ ,  $\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $\text{OH}$  і  $\text{H}$ ,  $\text{R}^9$  являє собою  $\text{H}$ ,  $\text{R}^{10}$  являє собою арил, Z являє собою  $-\text{O}-$  або  $-\text{NH}-$ ,  $\text{R}^{11}$  являє собою  $\text{H}$ ,  $\text{C}_1-\text{C}_8$ алкіл або  $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $\text{R}^{18}$  являє собою  $-\text{C}(\text{R}^8)_2-\text{C}(\text{R}^8)_2$ -арил.  
 40 39. Імунокон'югат за будь-яким з пп. 36-37, який **відрізняється** тим, що D вибраний з MMAE або MMAF.  
 40. Імунокон'югат за будь-яким з пп. 36-37, який **відрізняється** тим, що імунокон'югат представлений формулою  $\text{Ab}-(\text{L}-\text{MMAE})_p$ , де p варіює від 2 до 5.  
 45 41. Імунокон'югат за будь-яким з пп. 36-37, який **відрізняється** тим, що імунокон'югат представлений формулою  $\text{Ab}-(\text{L}-\text{MMAF})_p$ , де p варіює від 2 до 5.  
 42. Імунокон'югат за будь-яким з пп. 36-41, який **відрізняється** тим, що L містить val-cit, MC,

PAB і/або MC-PAB.

43. Імунокон'югат за п. 36, який **відрізняється** тим, що D являє собою майтансиноїд, вибраний з DM1, DM3 і DM4.

44. Імунокон'югат за будь-яким з пп. 36-37, який **відрізняється** тим, що імунокон'югат вибраний з наступних структур:



де Val являє собою валін, а Cit являє собою цитрулін.

45. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за будь-яким з пп. 1-25 або імунокон'югат за будь-яким з пп. 36-44 і фармацевтично прийнятний носій.

46. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-25 або імунокон'югата за будь-яким з пп. 36-44 для одержання лікарського засобу для інгібування росту клітини, що експресує FcRH5.

47. Застосування за п. 46, яке **відрізняється** тим, що зазначене антитіло кон'юговане із

цитотоксичним засобом.

48. Застосування за будь-яким з пп. 46-47, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб додатково містить ефективну кількість іншого терапевтичного засобу.

5 49. Застосування антитіла за будь-яким з пп. 1-25 або імунокон'югата за будь-яким з пп. 36-44 для одержання лікарського засобу для лікування проліферативного розладу.

50. Застосування за п. 49, яке **відрізняється** тим, що вказаний проліферативний розлад являє собою злоякісне новоутворення.

10 51. Застосування за п. 50, яке **відрізняється** тим, що вказане злоякісне новоутворення вибране з лімфоми, неходжкінської лімфоми (НХЛ), агресивної форми НХЛ, рецидивуючої агресивної форми НХЛ, рецидивуючої уповільненої НХЛ, рефрактерної НХЛ, рефрактерної уповільненої НХЛ, хронічного лімфоцитарного лейкозу (ХЛЛ), дрібноклітинної лімфоцитарної лімфоми, лейкозу, волохато-клітинного лейкозу (ВКЛ), гострого лімфоцитарного лейкозу (ГЛЛ) і лімфоми з клітин мантийної зони.

15 52. Застосування за будь-яким з пп. 49-51, яке **відрізняється** тим, що зазначене антитіло кон'юговане із цитотоксичним засобом.

53. Застосування за будь-яким з пп. 49-52, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб додатково містить ефективну кількість іншого терапевтичного засобу.

20 54. Застосування за п. 53, яке **відрізняється** тим, що терапевтичний засіб вибраний із групи, що включає: антитіло, хіміотерапевтичний засіб, цитотоксичний засіб, антиангіогенний препарат, імуносупресант, проліки, цитокін, антагоніст цитокінів, цитотоксичну радіотерапію, кортикостероїд, протиблювотний препарат, антиканцероматозну вакцину, анальгетик або препарат - інгібітор росту.

25 55. Застосування за п. 54, яке **відрізняється** тим, що терапевтичний агент вибраний із групи, яка включає: велкаде, ревлімід, тамоксифен, летрозол, екземестан, анастрозол, іринотекан, цетуксимаб, фулвестрант, вінорелбін, ерлотиніб, бевацизумаб, вінкрестин, іматиніб, сорафеніб, лапатиніб або трастузумаб, цисплатин, гемцитабін, метотрексат, вінбластин, карбоплатин, паклітаксел, пеметрексед, 5-фторурацил, доксорубіцин, бортезоміб, леналідомід, мелфалін, преднізон, дексаметазон або доцетаксел.

30 56. Спосіб *in vitro* визначення присутності білка FcRH5 у біологічному зразку, що підозрюється на вміст білка FcRH5, що складається з *in vitro* впливу на вказаний зразок антитілом за будь-яким з пп. 1-25, і визначення зв'язування згаданого антитіла з білком FcRH5 у представленому зразку, при цьому зв'язування антитіла з білком FcRH5 у представленому зразку є індикатором присутності білка в заданому зразку.

35 57. Спосіб одержання сполуки кон'югата антитіло-препарат, що містить антитіло до FcRH5 (Ab) за будь-яким з пп. 1-25 і молекулу препарату ауристатин або майтансиноїд (D), де антитіло приєднують через одну або більше введених у ході рекомбінації амінокислот цистеїну за допомогою лінкерної молекули (L) до D; сполука представлена Формулою I:

$Ab-(L-D)_p$  (I),

де  $p$  дорівнює 1, 2, 3 або 4; спосіб містить наступні етапи:

40 (a) реакцію доданої в ході рекомбінації групи цистеїну антитіла з лінкерним реагентом з утворенням проміжної речовини антитіло-лінкер Ab-L; і

(b) реакцію Ab-L з активованою молекулою препарату D з утворенням кон'югата антитіло-препарат; або містить наступні етапи:

45 (a) реакцію нуклеофільної групи молекули препарату з лінкерним реагентом з утворенням проміжної речовини препарат-лінкер D-L; і

(b) реакцію D-L з доданою в ході рекомбінації групою цистеїну антитіла з утворенням кон'югата антитіло-препарат.

58. Імунокон'югат, який має формулу  $Ab-(L-D)_p$ , де:

(a) Ab є антитілом, яке являє собою виділене моноклональне антитіло до FcRH5, що містить:

50 i) варіабельний домен легкого ланцюга, який містить:

a) HVR-L1, що містить послідовність SEQ ID NO:26;

b) HVR-L2, що містить послідовність SEQ ID NO:27; і

c) HVR-L3, що містить послідовність SEQ ID NO:28; і

ii) варіабельний домен важкого ланцюга, який містить:

55 a) HVR-H1, що містить послідовність SEQ ID NO:35;

b) HVR-H2, що містить послідовність SEQ ID NO:36; і

c) HVR-H3, що містить послідовність SEQ ID NO:37;

(b) L - лінкер, що являє собою MC-VC-PAB;

(c) D - молекула препарату, що являє собою MMAE; та

60 (d)  $p$  = від 1 до 8.



Фігура 5

## ЛЕГКИЙ ЛАНЦЮГ ХИМЕРНОГО АНТИТИЛА ДО FCRH5 ЛЮДИНИ (МAB10A8)

ACCTCGGTTCATCGATTGAATCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAAC  
 TGGAGTACATTTCAGATATCGTGATGACCCAGTCTCATAAATTCATGTCCACATCAGTAAGAGACAGGGGTCAG  
 CATCACCCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAACTCTCC  
 TAAACTACTGATTTATTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGG  
 GACGGATTTCATTTTCACCATCAGCAGTGTGCGAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCCAGCAACATTT  
 TAGTAACTCCTCGGACGTTCCGTTGGAGGTACCAAGGTGGAGATCAACGAACTGTGGCTGCACCATCTCTCTT  
 CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTA  
 TCCCAGAGAGGCCAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCCAC  
 AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAA  
 ACACAAAGTCTACGCTTGGCAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG  
 AGAGTGTAAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTATTGCACTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAG  
 CATCACAA (SEQ ID NO:14)

Фігура 6

## ЛЕГКИЙ ЛАНЦЮГ ХИМЕРНОГО АНТИТИЛА ДО FCRH5 ЛЮДИНИ (МAB10A8)

DIYMTQSHKFMSTSVDRVSI TCRASQDVSTAVAWVQKPGQSKLLIYSASYRYTGVPRFTGSGSGTDFP  
 FTISSVQAECLATYYCQHFSSPRIFGGGTEVEIKRTVAAPSVLFPSPDQQLSSTASVCLLNNEYPREA  
 EWQKVDNALQSGNSQPSVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTESENRGEC  
 (SEQ ID NO:15)

Фігура 7

## ВАЖКИЙ ЛАНЦЮГ ХИМЕРНОГО АНТИТИЛА ДО FCRH5 ЛЮДИНИ (МAB10A8)

CACCTCGGTTCATCGATTGAATCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGTAGCAACTGCA  
 ACTGGAGCGTACGCTGAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAA  
 AATCTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACATTCAGTAGCTATGCCGTGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGGAGA  
 AGAGGCTGGAGTGGGTCCTTACCATAGCAGTGGTGGTACTTTGACCTTCTATTTAGACAGTGTGACGGGT  
 CGATTCAACATCTCCAGAGACAAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAAGA  
 CACCGCCATGTATTACTGTGCAAGGCCCATTCGGATTACTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT  
 CAGTCAACGCTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCCTCTCTCAAGAGCACC  
 TCTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAA  
 CTCAAGCGGCCCTGACAGCGCGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTTCAGGACTCTACTCCCTCA  
 GCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATTCACAAAGCCC  
 AGCAACACCAAGCTGACAAAGAAAGTTGAGCCCAAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACACCTGCC  
 AGCAGCTGAACCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCTCCCGCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTC  
 CGGACCCCTGAGGTTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT  
 ACTGTGACCGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCAGTACCGG  
 GTGGTCAAGGCTCTCACCCTCTGCACAGGACTGGCTGAATGCCAAGGAGTACAAGTGCAGGCTCTCCAA  
 CAAAGCCCTCCAGCCCTCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCTCGAGAACACAGGTGT  
 ACACCTTGGCCCAATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCTTGGTCAAGGCTTCT  
 TATCCAGGACATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCCAGCCTCC  
 CGTCTGGACTCCGACGGCTCTCTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG  
 GGAACCTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCTACACGAGAAAGACCTCTCCCTG  
 TCTCCCGGTAAATGAGTGGACCGCCCTAGAGTGCAGCTGCAGAGCTTGGCCGCATGGCCCAACTTGT  
 TATTGCAG (SEQ ID NO:16)

Фігура 8

## ВАЖКИЙ ЛАНЦЮГ ХИМЕРНОГО АНТИТИЛА ДО FCRH5 ЛЮДИНИ (МAB10A8)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLISCAASGFTFSSYAVSWRQTPKRLKLEWVATISGGSLTFYLDIVRGRTIS  
 EDNAKNTLYLQMSSLRSEDFTAMYYCARPIPDYYALDYWGQCTSVTVSSASTKGPSVPEPLAPSSKSTSGGTA  
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTFV  
 DKKVEPKSCKRHTCTCPKCPAPELLEGPSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHEDPEVKFHWYVDGV  
 FVNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTFLHODWLNKEYVKCKVSKALPAPIEKTLSKAGGQPREPOVYTLPP  
 SRREMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQGGHVES  
 CSMVHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO:17)

Фігура 9

Лескі ланцюги  
Мишине антитіло 10A8 = SEQ ID No:18  
гуманізоване антитіло 10A8v1 = SEQ ID No:19

Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Мишине антитіло 10A8	D	I	V	M	I	Q	S	H	K	F	M	S	T	S	V	R	D	R	V	S	I	T	C	K	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P
гуманізоване антитіло 10A8v1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P
Loop K1	D	I	Q	M	I	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	S	I	S	N	Y	I	A	W	Y	Q	Q	K	P
Kabat	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Мишине антитіло 10A8	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	I	D	F	T	F	T	I	S	S	V	Q	A
гуманізоване антитіло 10A8v1	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	I	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Loop K2	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	I	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Kabat	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108												
Мишине антитіло 10A8	E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	Q	H	F	S	S	P	R	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R												
гуманізоване антитіло 10A8v1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	H	F	S	S	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	L	I	K	R												
Loop K3	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	T	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	F	I	K	R												

Фігура 10 Важкі ланцюги (Мишине антитіло 10A8 = SEQ ID No:20, гуманізоване антитіло 10A8v1 = SEQ ID No:21)

Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Мишине антитіло 10A8	E	V	Q	I	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	V	S	W	V	R	Q	
гуманізоване антитіло 10A8v1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	V	S	W	V	R	Q	
Loop H1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	
Kabat	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	
Мишине антитіло 10A8	P	E	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	S	G	G	S	L	T	F	Y	L	D	S	V	R	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	I	L	Y
гуманізоване антитіло 10A8v1	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T	I	S	S	G	G	S	L	T	F	Y	L	D	S	V	R	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y
Loop H2	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	
Kabat	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	R	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113				
Мишине антитіло 10A8	L	Q	M	S	S	L	R	S	E	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	P	I	P	O	Y	Y	A	L	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	
гуманізоване антитіло 10A8v1	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	P	I	P	O	Y	Y	A	L	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
Loop H3	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	R	X	G	X	G	G	S	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	



Фір. 11

hu 10A8 легкий ланцюг

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (SEQ ID NO:22)  
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:23)  
 FR3-LC: GVPSPRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:24)  
 FR4-LC: FGQGTKEIKR (SEQ ID NO:25)  
 HVR1-LC: KASQDVSTAVA (SEQ ID NO:26)  
 HVR2-LC: SASYRYT (SEQ ID NO:27)  
 HVR3-LC: QQHFSSPRT (SEQ ID NO:28)

CL: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY  
 SLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:29)

## LC-варіабельний домен:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP  
 RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHFSSPRTFGQGTKEIKR (SEQ ID NO:30)

LC-варіабельний домен + CL1 + Fc (SEQ ID NO: 66)

hu 10A8 важкий ланцюг

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:31)  
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:32)  
 FR3-HC: RGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:33)  
 FR4-HC: WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:34)  
 HVR1-HC: AASGFTFSSYAVS (SEQ ID NO:35)  
 HVR2-HC: ATISSGGSLTFYLDV (SEQ ID NO:36)  
 HVR3-H3: ARPDPDYALDY (SEQ ID NO:37)

CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:38)

Fc: CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD  
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:39)

## HC-варіабельний домен:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFY  
 LDSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPIPDYALDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:40)

HC-варіабельний домен + CH1 + Fc (SEQ ID NO: 67)

## Фігура 12

Важкий ланцюг tioMAT A118C huMA10A8 к FcRH5 з введенням Під  
 час рекомбінації цистеїном

## A. Послідовність легкого ланцюга

Tio-huMA10A8-HC-A118C

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP  
 RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHFSSPRTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPP  
 SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSITLT  
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41)

## B. Послідовність важкого ланцюга

Tio-huMA10A8 HC-A118C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSLTFYLD  
 SVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPIPDYALDYWGQGTLLTVSSCGT  
 KGPSPVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY  
 SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPS  
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC  
 SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:42)

Фігура 13

Важкий ланцюг тіоМАТ V205C huMA10A8 к FcRH5 з введеним під час рекомбінації цистеїном

А. Послідовність легкого ланцюга  
Thio-huMA10A8-LC-V205C

DIQCTQSPSSLSASVGDVWTITCKASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYTGVPSP  
RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHPSPRTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVYLNNFYPPFAKYQWVQVNALQSGNSQESYTRQDSKQSTYSLSTLT  
LSKADYFEKRVYACFVTHQGLSSPCTKRTFQEC (SEQ ID NO:43)

В. Послідовність важкого ланцюга  
Thio-huMA10A8-LC-V205C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWVRQAPGKGLEWVATISSGQSLTFY  
LDSVGRFTISRDNSEKNTLYLQMNSLRLEDTAIVYCARPIPDYALDYWGQGTLTVSSA  
STKGPEVFTPLAPSEETSGCTAALQCLVKDYFPEPVTCFSKGLTSGVHTFPFAVLOSSG  
LYSLGSSVTVFSSCLGTQTYICNVNHKPSNTKYDKLVKPKSCDKLHGTQTPCPAPELLOGP  
FYPYFPPKPRQTKLISRTPEVTCVTVVHSDPEVKENNYLGVENNAKTHPRPQYNS  
FYPYFVLTIDHODLNCKEYKCKVINKALPAPTEKTSKAKQQRPEQVYTPPPSRREM  
TKQVRLTCLVFGCTPREDIAVENHNGQPEELUKTTPFVLDPEPSSEFTYSKLTVQLSRNG  
QGVFPGQSVIRALNNHYTKSLSLSPGK (SEQ ID NO:44)

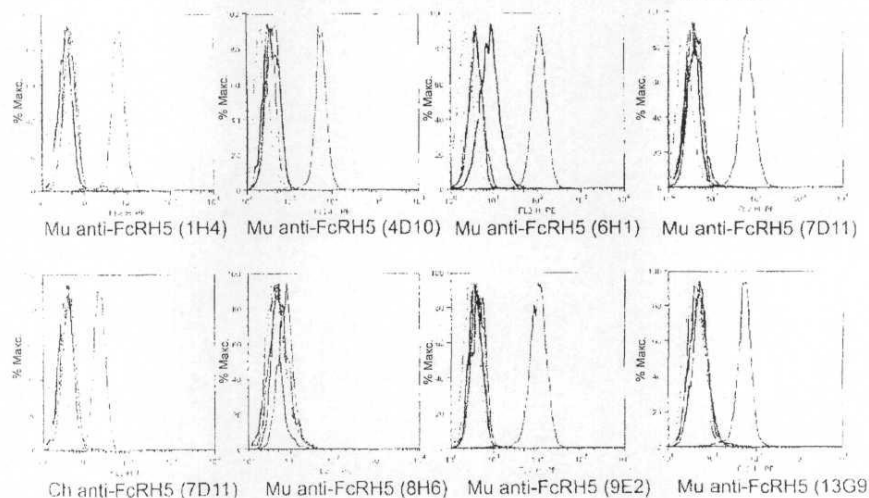
Фігура 14

100205 FcRH Перехресна реакційнодатність антитіл к FcRH5

Клітини SVT2.MSCV.gD.huFcRH1-6 х АТ Му и Ч FcRH5

Визначено з використанням щурячих антитіл до muIgG1 або muIgG2a+b,  
або кон'югату мишиного антитіла до антитіла людини с ФЕ

SVT2 MSCV gD FcRH1  
SVT2 MSCV gD FcRH2  
SVT2 MSCV gD FcRH3  
SVT2 MSCV gD FcRH4  
SVT2 MSCV gD FcRH5  
SVT2 MSCV gD FcRH6  
SVT2 MSCV

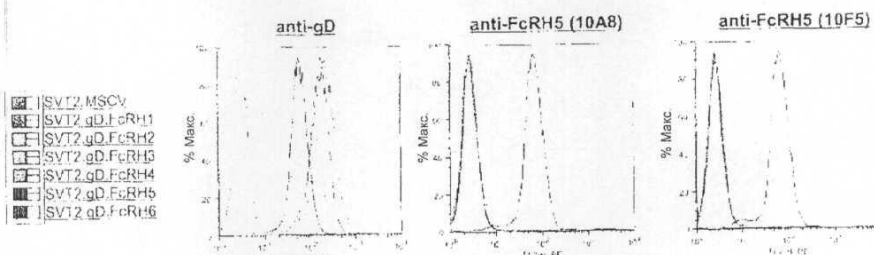


Фігура 15

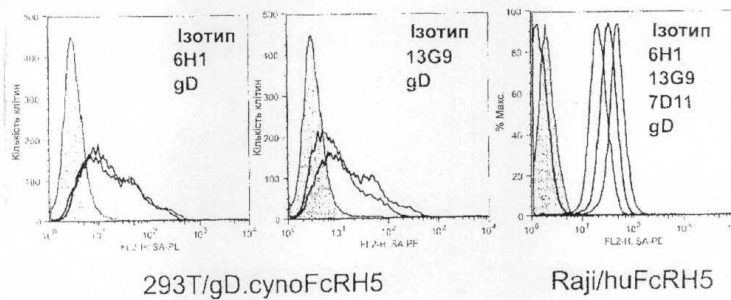
100205 FcRH Перехресна реакційнодатність антитіл до FcRH5

Клітини SVT2.MSCV.gD.huFcRH1-6 х супернатанти АТ Му FcRH5

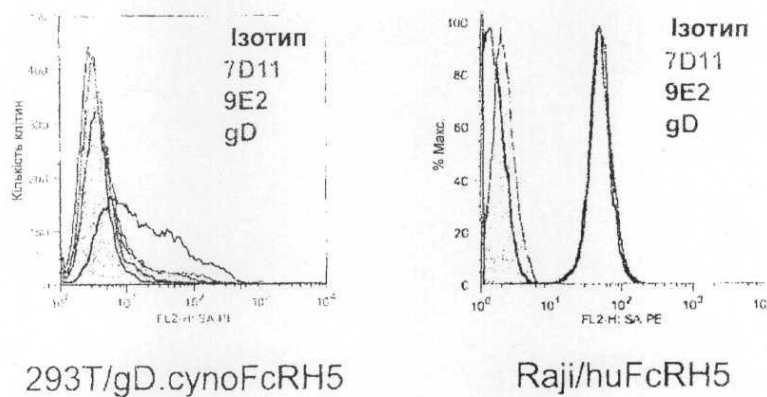
Визначено з використанням кон'югату щурячих антитіл до muIgG1 с ФЕ



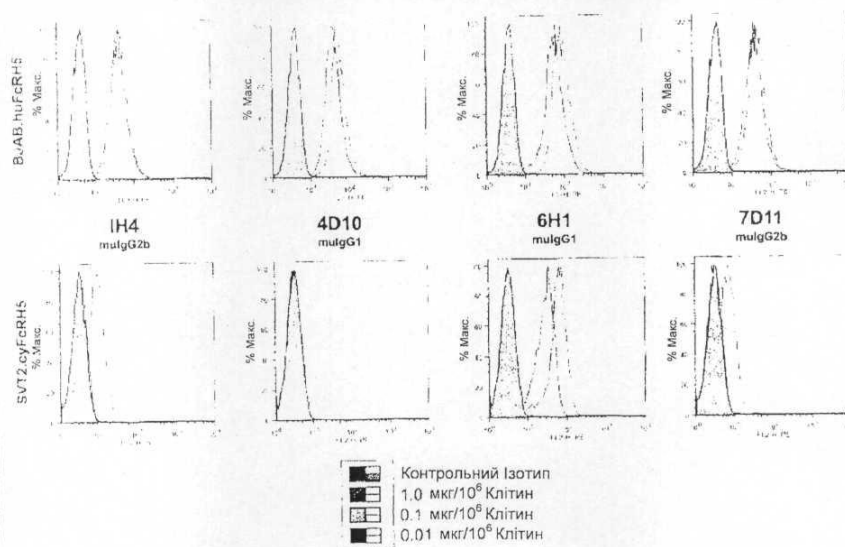
Фігура 16-Мишине антитіло 6H1 та 13G9 реагують перехресним чином з cynoFcRH5



Фігура 17

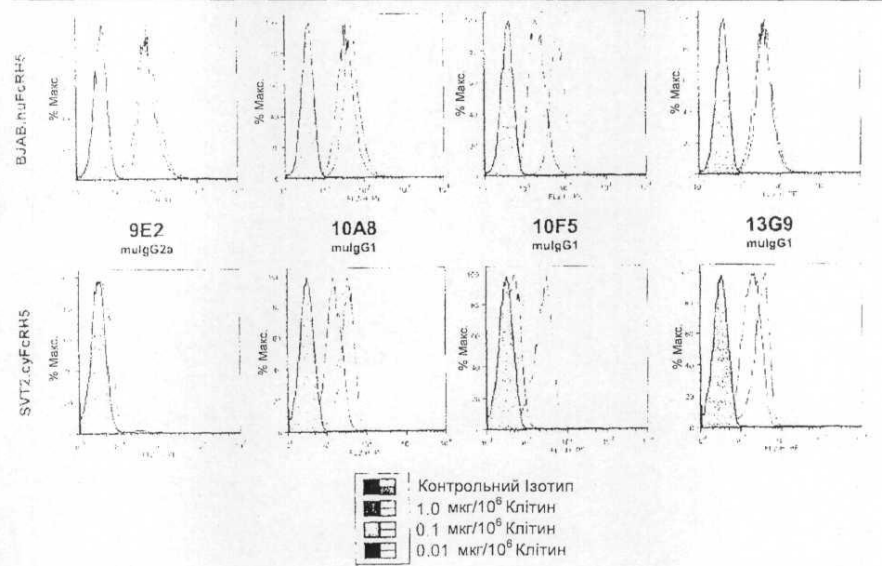


Фігура 18 012207 Титрація антитіл до FcRH5  
BJAB.FcRH5.D10 & SVT2.cynoFcRH5.SP x всі мишині АТ к FcRH5 виявлені за допомогою шурячого антитіла до mslgG1 або кон'югату mslgG2s+b с ФЕ

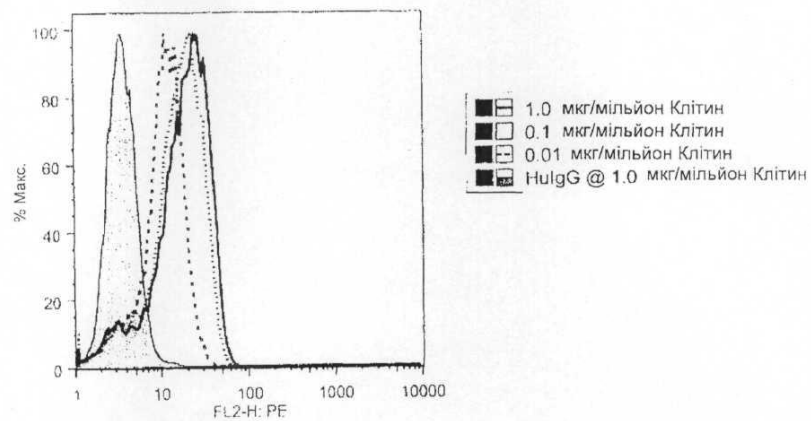


### Фігура 19 012207 Титрація антитіл до FcRH5

BJAB.FcRH5.D10 & SVT2.cyFcRH5.SP x всі мишині АТ к FcRH5 виявлені за допомогою щурячого антитіла до mIgG1 або кон'югату mIgG2s+b с ФЕ



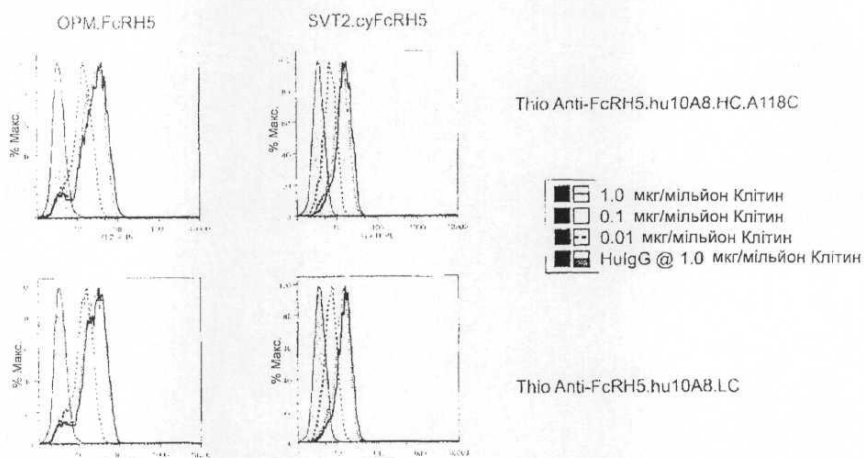
### OPM2.FcRH5 x Thio Anti-FcRH5.ch10A8.HC.A118C.MC vs PAB MMAE Фігура 20



Фігура 2 є графіком аналізу FACS, який показує зв'язування кон'югату препарату з OPM2.FcRH5 x Thio Anti-FcRH5.ch10A8.HC.A118C.MC vs PAB MMAE (КАП) згідно винаходу з FcRH5, що експресує на поверхні трансфонованих клітин OPM2. Визначення проводилось з щурячими антитілами до кон'югату mIgG1-ФЕ

OPM2.FcRH5 & SVT2.cyFcRH5 x Thio Anti-FcRH5.hu10A8.HC.A118C  
OPM2.FcRH5 & SVT2.cyFcRH5 x Thio Anti-FcRH5.hu10A8.LC.V205C

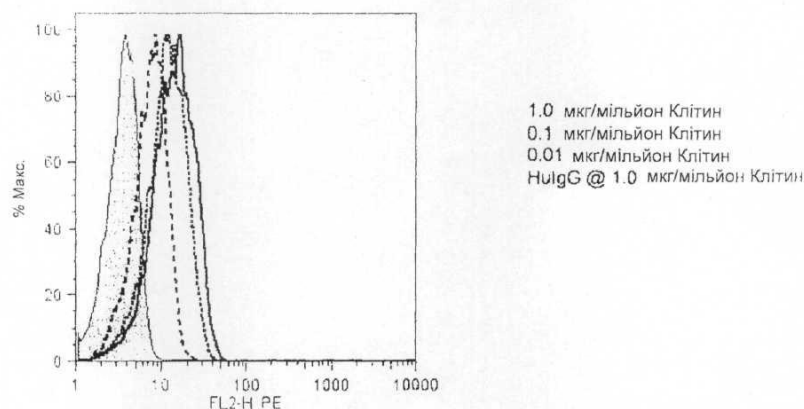
Фігура 21



Фігура 7 є графіками аналізу FACS, які показують зв'язування нез'язаного тіо-гуманізованого антитіла до FcRH5 10A8.HC.A118C та тіо-гуманізованого антитіла до FcRH5 10A8.LC.V205C з клітинами OPM2, трансфікованими huFcRH5, та клітинами SVT2, трансфікованими cyFcRH5

OPM2.FcRH5 x Thio Hu Anti-FcRH5.10A8.HC.A118C.MC vs PAB MMAE

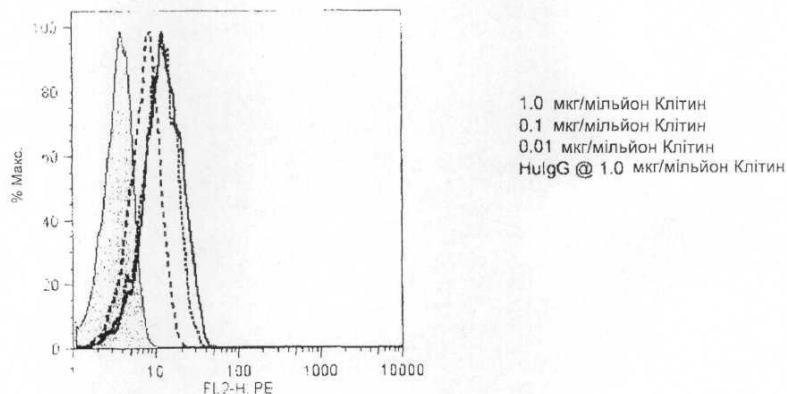
Фігура 22



Фігура 7 є графіком аналізу FACS, який показує зв'язування Thio Hu Anti-FcRH5.10A8.HC.A118C.MC vs PAB MMAE (КАП) згідно винаходу з FcRH5, що експресує на поверхні трансфікованих FcRH5 клітин OPM2. Визначення проводилось з шурячими антитілами до кон'югату IgG-ФЗ людини.

OPM2.FcRH5 x Thio Hu Anti-FcRH5.10A8.LC.V205C.MC vs PAB MMAE

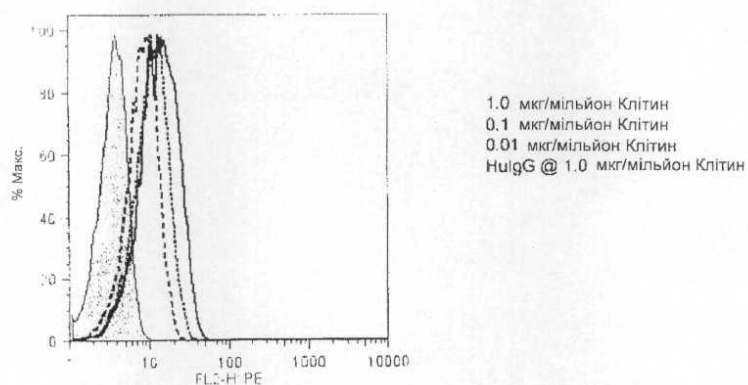
Фігура 23



Фігура 23 є графіком аналізу FACS, який показує зв'язування Thio Hu Anti-FcRH5.10A8.LC.V205C.MC vs PAB MMAE (КАП) згідно винаходу з FcRH5, що експресує на поверхні трансфектованих FcRH5 клітин OPM2. Визначення проводилось з щурячими антитілами до кон'югату IgG-ФЕ людини.

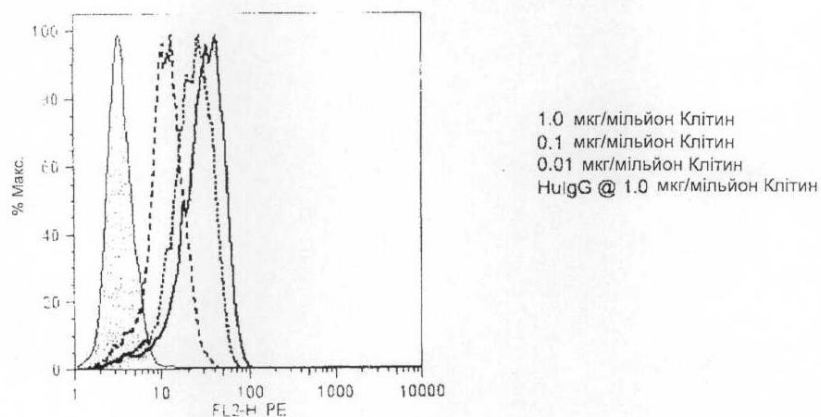
OPM2.FcRH5 x Ch Anti-FcRH5.10A8.SPDB DM4

Фігура 24



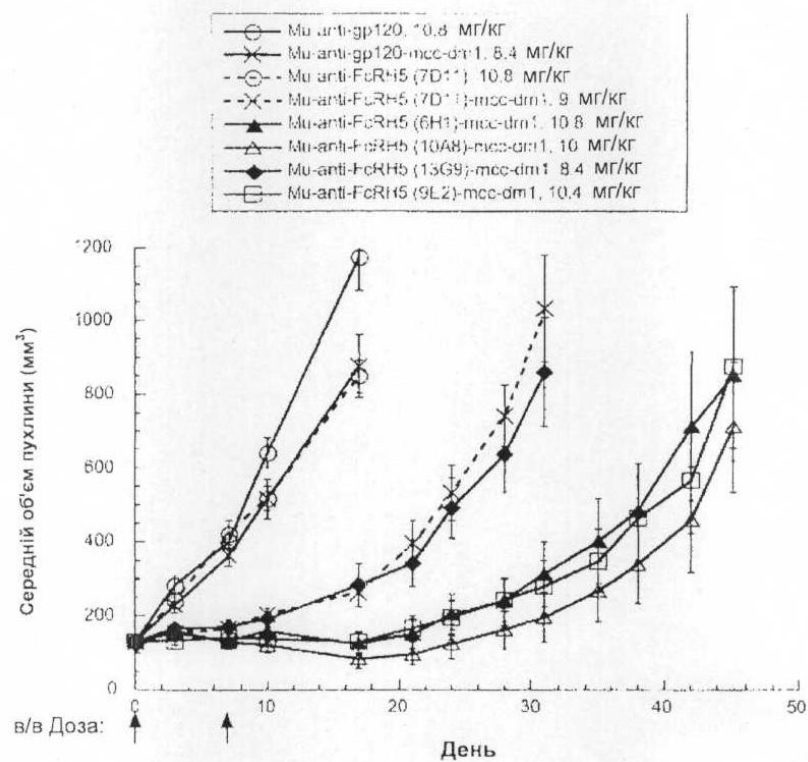
Фігура 24 є графіком аналізу FACS, що показує зв'язування Ch Anti-FcRH5.10A8.SPDB DM4 (КАП) згідно винаходу з FcRH5, що експресує на поверхні трансфектованих FcRH5 клітин OPM2. Визначення проводилось з щурячими антитілами до кон'югату IgG-ФЕ людини.

OPM2.FcRH5 x Hu Anti-FcRH5.10A8.SPDB DM4  
Фігура 25

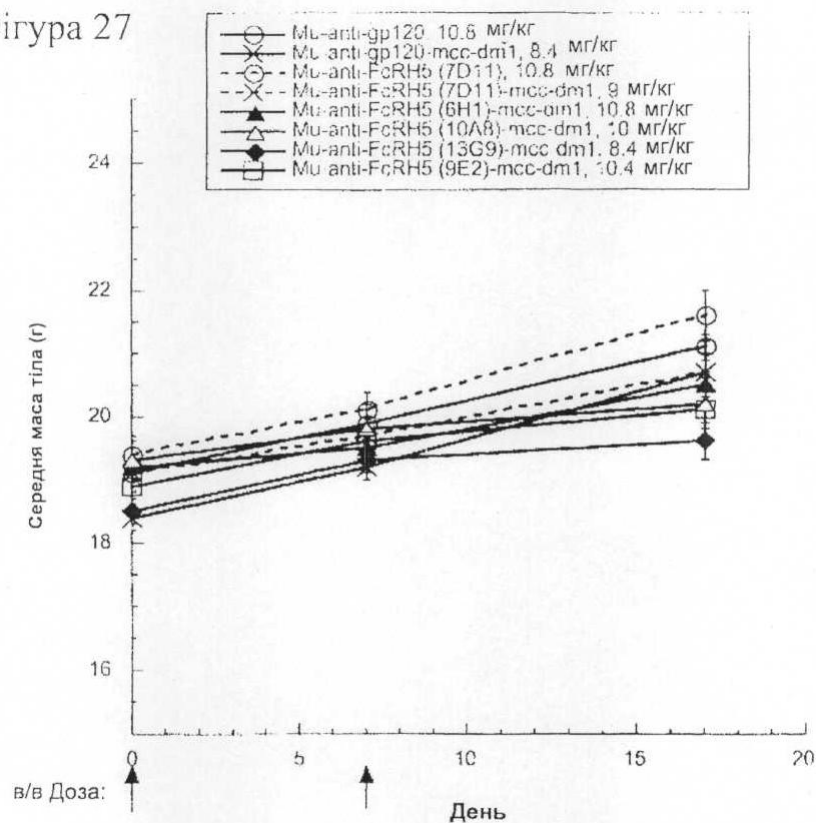


Фігура 25 є графіком аналізу FACS, що показує зв'язування Hu Anti-FcRH5.10A8.SPDB DM4 (КАП) згідно винаходу з FcRH5, що експресує на поверхні трансфектованих FcRH5 клітин OPM2. Визначення проводилось з щурячими антитілами до кон'югату IgG-ФЕ людини.

Фігура 26

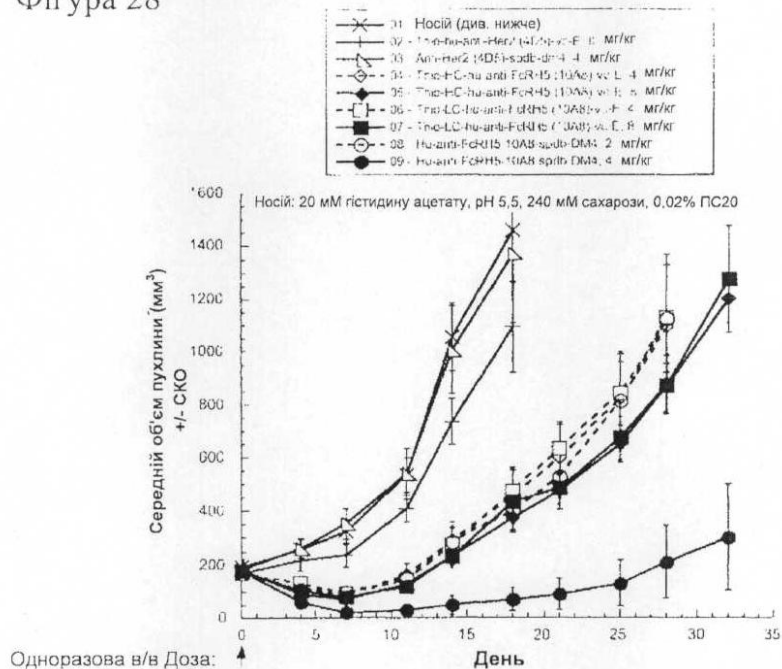


Фігура 27



Thio-IC-anti-FcRH5 (10A8)-MCvcPAB-MMAE, thio-LC-anti-FcRH5 (10A8)-MCvcPAB-MMAE и anti-FcRH5 (10A8)-spdb-dm4 в порівнянні з ксенотрансплантатом множинної мієломи OPM2-FcRH5 у мишей CB17 Scid  
Протокол №08-1184

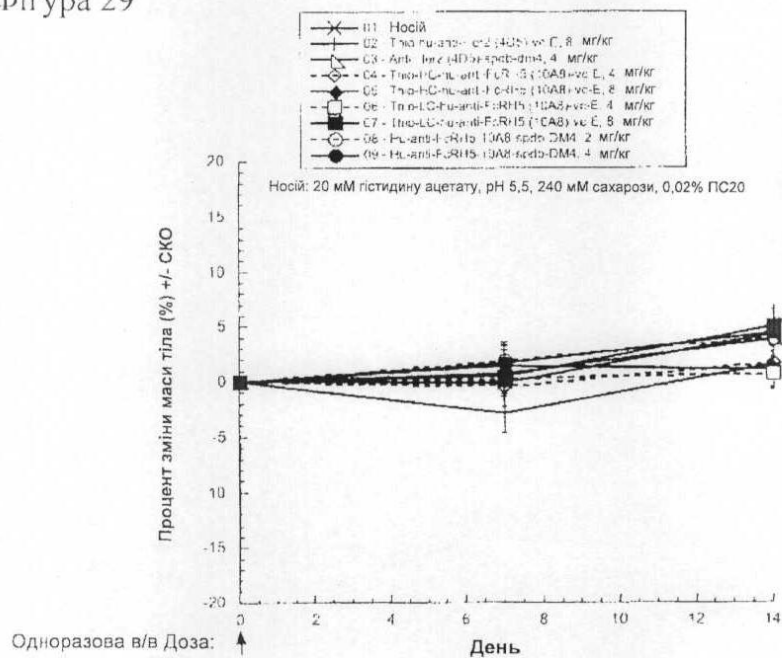
Фігура 28





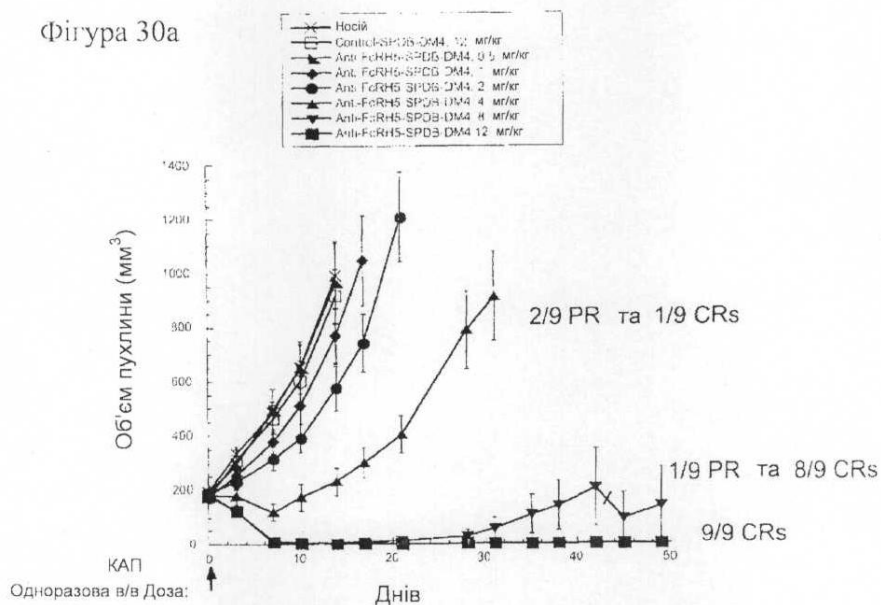
Thio-HC-anti-FcRH5 (10A8)-MCvcPAB-MMAE, thio-LC-anti-FcRH5 (10A8)-MCvcPAB-MMAE та anti-FcRH5 (10A8)-spdb-dm4 в порівнянні з ксенотрансплантатом множинної мієломи OPM2-FcRH5 у мишей CB17 Scid  
Протокол №08-1184

Фігура 29



Антитіла FcRH5-SPDB-DM4 в моделі OPM2-FcRH5

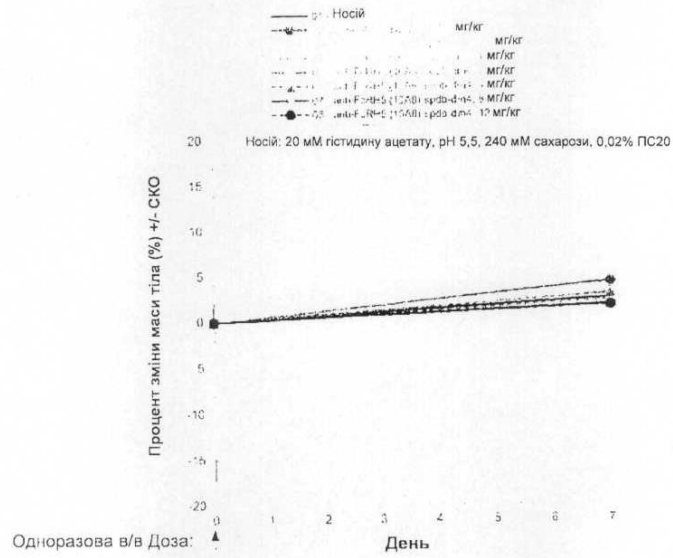
Фігура 30а



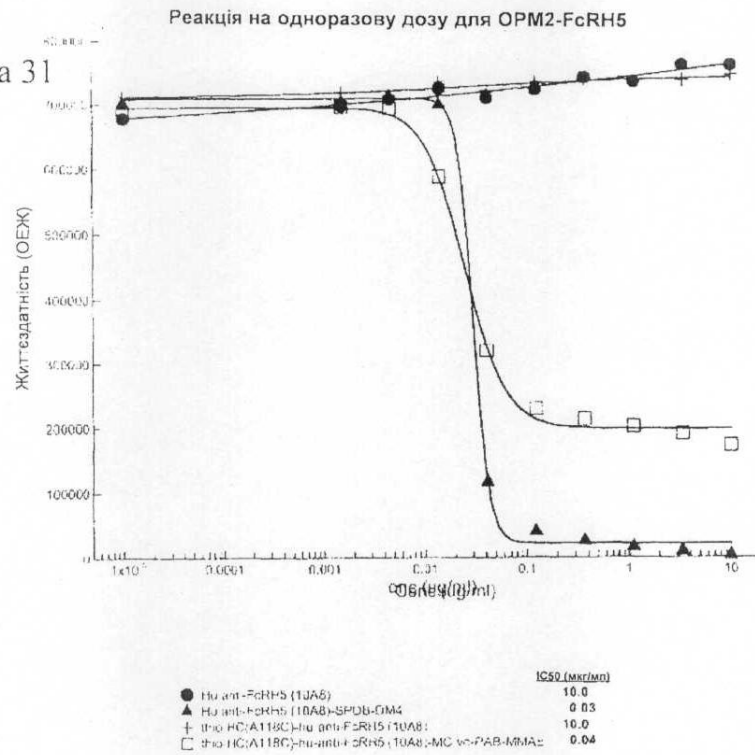
# Антигіла FcRH5-SPDB-DM4 в моделі OPM-2-FcRH5

Дослідження варіювання дози антигіла FcRH5 (10A8)-spdb-dm4 в порівнянні з ксенотрансплантатом мийної міслом OPM2-FcRH5 у мишей CB17 Scid  
Протокол №08-1184 D

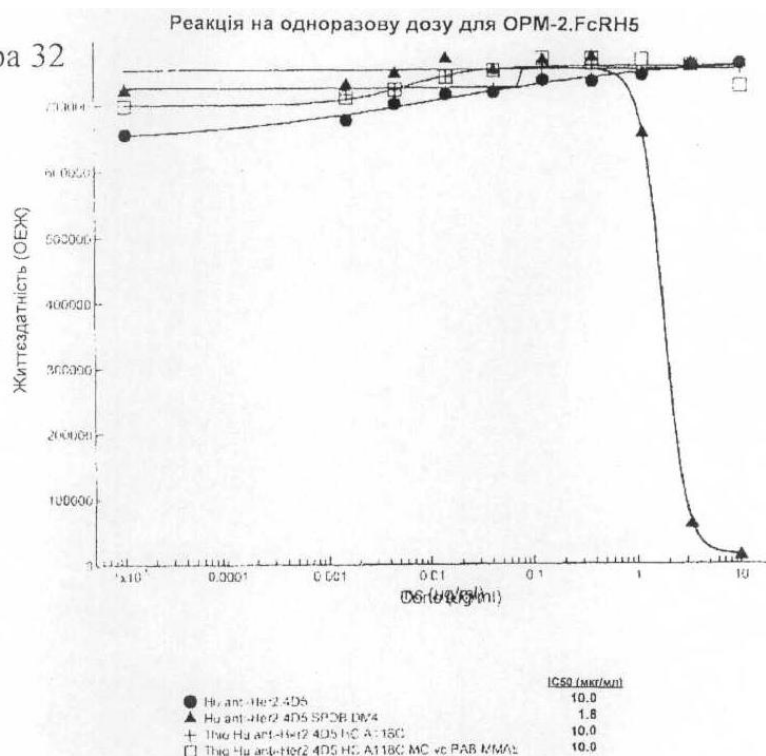
Фігура 30b



Фігура 31



Фігура 32



GATGTGCTCCTTGGAGCTGGTGTGCAGTGTCTGACTGTAAGATCAAGTCCAAACCTGTTTT  
 GGAATTGAGGAACTTCTCTTTTGATCTCAGCCCTTGGTGGTCCAGGTCTTCATGCTCTGTGG  
 GTGATATTACTGGTCTGGCTCCTGTGAGTGGACAGTTTGCAAGGACACCCAGGCCATTAT  
 TTTCTCCAAGCTCCATGGACCACAGTCTTCCAAGGAGAGAGAGTGACCCTCACTTGCAAAG  
 GATTTGCGTTCTACTCACCACAGAAAAAATAATGGTACCATCGGTACCTTGGGAAAGAAAT  
 ACTAAGAGAAACCCAGACAATATCCTTGAGGTTCAAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAG  
 GCCCAGGGCTCCCTCTCAGTAGCCCTGTGCACCTTGGATTCTTTCAGAGATGGGATTTCTC  
 CATGCTGCCCAGGCTAATGTTGAACTCCTGGGCTCAAGTGATCTGCTCACCTAGGCCCTCA  
 AAGCGCTGGGATTACAGCTTCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTCTGTGTTTGAAGGAGACT  
 CTGTGGTTCTGAGGTGCCGGGCAAGGCGGAAGTAACACTGAATAATACTATTTACAAGAA  
 TGATAATGTCCTGGCATTCTTAATAAAAGAACTGACTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAA

Фігура 33

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHRYLGKE  
 ILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSPVHLDFSSEMGFPHAAQANVELLGSSDLLT

Фігура 34

AATTCTACTAATGCATTCTGCTCTTTTTGAGAGCACAGCTTCTCAGATGTGCTCCTTGGAGCTG  
 GTGTGCAGTGTCTGACTGTAAGATCAAGTCCAAACCTGTTTTGGAAATTGAGGAAACTTCTC  
 TTTTGATCTCAGCCCTTGGTGGTCCAGGTCTCTCATGCTGCTGTGGGTGATATTACTGGTCTG  
 GCTCTGTGTCAGTGGACAGTTTGCAAGGACACCCAGGCCCATATTTTTCTCCAGCCTCCATG  
 GACCACAGTCTTCCAAGGAGAGAGAGTGAACCTCACTTGCAAGGGATTTCGCTTCTACTCAC  
 CACAGAAAACAAAATGGTACCATCGGTACCTCGGGAAAGAAATACTAAGAGAAAACCCAG  
 ACAATATCCTTGAGGTTCAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAGGCCAGGGCTCCCTCTC  
 AGTAGCCCTGTGCACTTGGATTTTCTTCAAGCTTCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTG  
 TTTGAAGGAGACTCTGTGGTTCTGAGGTGCCGGGCAAAGGCGGAAGTAACACTGAATAATA  
 CTATTTACAAGAATGATAATGTCTGCTGGCATTCTTAATAAAAAGAACTGACTTCCATATTCCTC  
 ATGCATGTCTCAAGGACAATGGTGCATATCGCTGTACTGGATATAAGGAAAGTTGTTGCCCT  
 GTTTCTTCCAATACAGTCAAAATCCAAGTCCAAGAGCCATTTACACGTCCAGTGTCTGAGAGC  
 CAGCTCCTTCCAGCCCATCAGCGGGAAACCCAGTGACCTGACCTGTGAGACCCAGCTCTCTC  
 TAGAGAGGTGAGATGTCCCGCTCCGGTTCGGCTTCTTCAAGAGTGACCAGACCCTGGGATTA  
 GGCTGGAGTCTCTCCCCGAATTTCCAGATTACTGCCATGTGGAGTAAAGATTAGGGTTCTA  
 CTGGTGTAAAGCAGCAACAATGCCTCACAGCGTCATATCTGACAGCCCGAGATCCTGGATA  
 CAGGTGCAGATCCCTGCATCTCATCTGTCTCACTCTCAAGCCCTGAAAAGGCTCTGAATTTT  
 GAGGGAAACCAAGGTGACACTTCACTGTGAAACCCAGGAAGATTCTCTGCGCACTTTGTACA  
 GGTTTTATCATGAGGGTGTCCCTTGAGGCACAAGTCAGTCCGCTGTGAAAGGGGAGCATCC  
 ATCAGCTTCTCACTGACTACAGAGAATTAGGGAACTACTACTGCACAGCTGACAATGGCCT  
 TGGCGCCAAGCCAGTAAGGCTGTGAGCCTCTCAGTCACTGTTCCCGTGTCTCATCTGTCTC  
 CAACCTCAGCTCTCTGAGGACCTGATTTTGAAGGGAGCCAAGGTGACACTTCACTGTGAAG  
 CCCAGAGAGGTTCACTCCCCATCCTGTACCACTTTTATCATGAGGATGCTGCCCTGGAGCGT  
 AGGTCCGGCCAACCTCTGCAGGAGGAGTGGCCATCAGCTTCTCTGACTGCAGAGCATTCAGG  
 GAACTACTACTGCACAGCTGACAATGGCTTTTGGCCCCAGCGCAGTAAGGCGGTGAGCCTCT  
 CCATCACTGTCCCTGTGTCTCATCTGTCTCACCTCAGCTCTGCTGAGGCCCTGACTTTTG  
 AAGGAGCCACTGTGACACTTCACTGTGAAGTCCAGAGAGGTTCCCCACAAATCCTATACCA  
 GTTTTATCATGAGGACATGCCCTGTGGAGCAGCTCAACACCCTCTGTGGGAAGAGTGTCTC  
 TCAAGCTTCTCTGACTGAAGGACATTAGGGGAATTACTACTGCACAGCTGACAATGGCTTT  
 GTTCCCCAGCGCAGTGAAGTGGTGAGCCTTTTGTCACTGTTCCAGTGTCTCGCCCCATCCTC  
 AGCCTCAGGGTTCCAGGGCCCCAGGCTGTGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGG  
 CCCCCAGAGGGCTCTCCCCAATCCTGTACTGGTTTTATCATGAGGATGTACCCCTGGGGAGC  
 AGCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGAAGCTTCTTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACATTCTGG  
 AAACIACTCATGTGAGGCCAACAAATGGCCTAGTGGCCAGCACAGTGACACAATATCACTC  
 AGTGTATAGTTCCAGTATCTCGTCCCATCCTCACCTTCAAGGGCTCCAGGGGCCAGGCTGT  
 GGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGGCTCCTCCCCAATCCTGTACT  
 GGTTTTATCATGAAGATGTACCCCTGGGTAAAGATCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGGGGCTCC  
 TTCAACCTCTCTCTGACTACAGAACATTCTGGAATCTACTCCTGTGAGGCAGACAATGGTCC  
 GGAGGCCAGCGCAGTGAGATGGTGACACTGAAAGTTGCAGTTCCGGTGTCTCGCCCCGTCTC  
 CTCACCTCAGGGCTCCCGGGACCCATGCTGCGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGA  
 GGCCCTGAGAGGCTCTCCCTGATCCTGTACCGGTTTTTTCATGAGGATGTACCCCTAGGAA  
 ATAGGTCTGTCCTCTGGAGGAGCGTCTTAAACCTCTCTCTGACTGCAGAGCACTCTGGA  
 AACTACTCCTGTGAGGCCGACAATGGCCTCGGGGCCAGCGCAGTGAGACAGTGACACTTT  
 ATATCACAGGGCTGACCGCGAACAGAAGTG

Φirypa 35A

GCCCTTTTGCCACAGGAGTCGCCGGGGGCTGCTCAGCATAGCAGGCCTTGCTGCGGGGGC  
 ACTGCTGCTCTACTGCTGGCTCTCGAGAAAAGCAGGGAGAAAAGCCTGCTGACCCCGCC  
 GGAGCCCTCCAGACTCGGACTCCCAAGAGCCCACTATCACAATGTACCAGCCTGGGAAAG  
 GCTGCAACCAAGTGTACACTAATGCAAAATCCTAGAGGAGAAAATGTGGTTTACTCAGAAAGTA  
 CGGATCATCCAAAGAGAAAAGAAACATGCAGTGGCCTCTGACCCCAGGCATCTCAGGAACA  
 AGGGTTCCCTATCATCTACTCTGAAGTTAAGGTGGCGTCAACCCCGGTTTCCGGATCCCTG  
 TTCTTGGCTTCCTCAGTCTCTCAGAGATGAGTCCACACGTCTCTCCAACCTGCTGTTTACGCCT  
 CTGCACCCCAAGTTTCCCTTGGGGGAGAAAGCAAGCATTTGAAGTGGGAAGATTTAGGCTGCC  
 CCAGACCATACTACTGGCCTTTGTTTACATGTCTCTATTCTCAGTCTGACCAGAATGCAGG  
 GCCCTGCTGGACTGTACCTGTTTCCAGTTAAAGCCCTGACTGGCAGGTTTTTTAATCCAGT  
 GGCAAGGTGCTCCCACTCCAGGGCCCAAGCACATCTCCTGGATTCTTAGTGGGCTTACGCTG  
 TGATTGCTGTTCTGAGTACTGCTCTCATCACACCCCAACAGAGGGGGTCTTACCACACAAAG  
 GGAGAGTGGGCTTCAGGAGATGCCGGGCTGGCCTAACAGCTCAGGTGCTCCTAAACTCCG  
 ACACAGAGTTCTGCTTGGGTGGATGCATTTCTCAATTGTCTCAGCCTGGTGGGCTACT  
 GCAGTGTGCTGCCAAATGGGACAGCACACAGCCTGTGCACATGGGACATGTGATGGGTCTC  
 CCCACGGGGGCTGCATTTACACTCCTCCACCTGTCTCAAACTCTAAGGTGGGCACTTGACA  
 CCAAGGTAACCTTCTCTCTGCTCATGTGTCTAGTGTCTACCTGCCCAAGTAAGTGGCTTTCATA  
 CACCAAGTCCCAAGTTCTTCCCATCTTAACAGAAAGTAACCCAGCAAGTCAAGGCCAGGAGG  
 ACCAGGGGTGCAGACAGAACACATACTGGAACACAGGAGGTGCTCAATTACTATTTGACTG  
 ACTGACTGAATGAATGAATGAATGAGGAAGAAAAGTGTGGGTAATCAAACTGGCATAAAAT  
 CCAAGTGCCTCCCTAGGAAATCCGGGAGGTATTCTGGCTTCCCTAAGAAAACAACGGAAGAG  
 AAGGAGCTTGGATGAGGAAACTGTTTACGCAAGAGGAAGGGCTTCTCACACTTTCATGTGCTT  
 GTGGATCACTGAGGATCCTGTGAAAATACAGATACTGATTTCAGTGGGTCTGTGTAGAGCCT  
 GAGACTGCCATTCTAACATGTTCCCAAGGGGATGCTGATGCTGCTGGCCTGGGACTGCACTG  
 CATGCATGTGAAGCCCTATAGGTCTCAGCAGAGGGCCATGGAGAGGGAAATGTGTGGCTCTG  
 GCTGCCCAGGGCCCAACTCGGTTACACAGGATCTGTGCTGCTCCTGGCCAACCTTTGGCCAC  
 AGCACCACCAAGCTGCTGTGCTGAGAGAGCTTCTTCTGTGACATGTTGGCTTTCATCAGCC  
 ACCCTGGGAAGCGGAAAGTAGCTGCCACTATCTTTGTTTCCCACTCAGGCCTCACACTTT  
 CCCATGAAAAGGGTGAATGTATATAACCTGAGCCCTCTCCATTACAGATTGTTCTCCCCTCT  
 CTGAGCAATGGGATGTTCTGTTCCGCTTTTATGATATCCATCACATCTTATCTTGATCTTTGC  
 TCCCATGGGATTGTACAGTGATGACTTTTAAGCCCAAGGGCCCTGAAATAAAATCCTTCCAA  
 GGCAATGGAAAGCTCTCTCCACCTGAACCATGGCTTTTCATGCTTCCAAGTGTACAGGGCCTT  
 GCCCAGATAGACAGGGCTGACTCTGCTGCCCAACCTTTCAGGAGGAAACCAAGACACCTG  
 AGACAGGAGCCTGTATGCAGCCCAAGTGCAGCCTTGCAGAGGACAAGGCTGGAGGCATTTGT  
 CATCACTACAGATATGCAACTAAAATAGACGTGGAGCAAGAGAAATGCATTCCCAACCGAGG  
 CCGCTTTTTAGGCCTAGTTGAAAGTCAAGAAGGACAGCAGCAAGCATAGGCTCAGGATTA  
 AAGAAAAAAATCTGCTCACAGTTTGTCTGGAGGTACATCACCAACAAAGCTCACGCCCTA  
 TGCAGTTCTGAGAAAGTGGAGGCACCAAGGCTCAAAAGAGGAAATTTAGAATTTCTCATTTG  
 GAGAGTAAGGTACCCCATCCCAAGATGATAACTGCACAGTGGCAGAACAAATCCTCCACCT  
 AATGTGGGTGGACCCCATCCAGTCTGTTGAAGGCCTGAGTGTAAACAAAAGGGCTTATTCTTC  
 CTCAAGTAAGGGGGAACCTCTGCTTTGGGCTGGGACATAAGTTTTCTGCTTTCAGACGCAA  
 ACTGAAAAATGGCTCTTCTTGGGTCTTGAGCTTGCTGGCATATGGACTGAAAGAAACTATGC  
 TATGGATCTCTGGATCTCCAGCTTCTGACTGCAGATCTTGAGATATGTCAGCCTCTACAG  
 TCACAAGAGCTAATTCATTCTAATAAACCAATCTTCTGTAAG

Φirypa 35B

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHRYLQKE  
 ILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFSSASLILQAPLSVFEGDSVVLRCRAKAEVTL  
 NNTIYKNDNVLAFLNKRDFHHPHACLKDNAGAYRCTGYKESCCPVSSNTVKIQVQEPFTRPVLR  
 ASSFPISGNPVTLTCTQLSLERSDVPLRFRRDDQTLGLGWSLSPNFQITAMWSKDSGFYWC  
 KAATMPHVSISDPRSWIQVQIPASHPVLTLSPEKALNFEKTKVTLHCETQEDSLRTLRYFYHEG  
 VPLRHKSVRCERGASISFSLTTENSGNYCTADNGLGAKPSKAVSLSVTPVSHPVNLSSPEDLI  
 FEGAKVTLHCEAQRGSLPILYQPHHEDAALERRSANSAGGVAISFSLTAHSGNYCTADNGFG  
 PQRSKAVSLITVPVSHPVLTLSAEALTFFEGATVTLHCEVQRGSPQILYQFYHEDMPLWSSSTPS  
 VGRVSFSFSLTEGHSNGNYCTADNGFGPQRSEVVSFLVTVPSRPILTLRVPRQAQVVGDLLELH  
 CEAPRGSPPIYWFYHEDVTLGSSSAPSGGEASFNLSLTAHSGNYSCEANNGLVAQHSDTISLSV  
 IVPVSRPILTFRAPQAQVVGDLLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGASFNLSL  
 TEHSGIYSCEADNGPEAQRESEMVTLKVAVPVSRPVTLRAPGTHAAVVGDLLELHCEALRGSLIL  
 YRFFHEDVTLGNRSSPSGGASLNLSTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLTYTGLTANRSGPF  
 ATGVAGGLLSIAGLAAGALLLYCWLRSRKAQRKPSDPAASPPDSQSQPTYHNPVPAWHEELQPV  
 YTNANPRGENVVYSEVRHIEKKKHAVASDPRHLRNKGSPIYSEVKVASTPVSGSLFLASSAPHR

Φirypa 36

ATGCTGCTGTGGGTGATACTACTGGTCTGGCTCTGTCACTGGACAGTTTGTAAAGACATACAAGTC  
 CATIATTTTCTCCAGCTTCCATGGACCACAGTCTTCCGAGGAGAGAGAGTGAATCTGACTTGCAGG  
 GATTTGGCTTCTACTCATCAAAAAACAAAATGGTACTATCGGCACCTTGGGAAAGAAATATCGAGA  
 GAAACCCAAAAAATACCTTGAGGTTCAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAGGCCAGGGCTCCC  
 CTCTCAGTAGCCCTGTGTCTTGGACTTTTCTTCAGCTTCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGT  
 TGAAGGAGACTCTGTGTTCTGAGGTGCCGGGCAAGGCCGGAAGTAACACTGAAGACTACTATTTAC  
 AAGAATGAAAATGTCTTGCATTTCTTAATAAATCAACTGACTTCCATATTTCTCATGCAAGTCTCAAG  
 GACAATGGTGCATATCGCTGTACTGGATATAAGGAAACCTGTTGCCITGTTCTTCCAACACAGTCAA  
 AATCCAAGTCCAAGAGTCATTTACACGTCCAGTGTGAGAGTCACTCTCCAGCCCATCAGCGGGA  
 GCCCAGTGACCTGACCTGTGAGACCCAGCTCTCTCTAGAGAGGTGAGATGTCCCGCTCCAGTTCTGC  
 TTCTTCAGAAATGACCAGATGCTGGGATCAGGCTGCAGCCTCTCCCGAAGTTCCGGATTACTGCCAT  
 GTGGAGTAAAGATTGAGATCCTACTGGTGTAAAGCAACCAATGTGTTATGACACCACATCTAACA  
 GCTTGAGATCCTGGATACAGGTGCTGATCCCCGATCTCATCTGTCTCTCACTCTCAGCCCTGAAAAG  
 GCTCTGAATTTTGAAGGAAACCAAGGTGAACTTCACTGTGAAACCCAGGAAGATTCTCTGCGCACTT  
 GTACAAAGTTTATCATGACGCTGTCTCCCTGAGGTACAAGTCACTGCTGCTGTGAAAAGGGAGCATCCA  
 TCAGCTTCTCACTGACTACAGAGCAATTCAGGGAACCTACTACTGCACAGCTGACAATGGCCATGGTGCC  
 AAGCCAGTGAGGCTGTAAGCCTGTGAGTCACTGTCCCTGTGTCTCGCCCTGTCTCACCCTCAGCTCT  
 GCAGAGGACCTGATTTCTGAGGGAGCCAAAGTTGACACTTCACTGTGAAGCCAGAGAGGTTCACTCCC  
 CATCTGTATACCAGTTTCATCATGAGAATGCCCTCCCTGGGGAATAGGTGCGCCCACTCTGCAGGAGGAG  
 TGGCCATCAGCTTCTCTGACTGCAGACCATTCGGGGAACTACTACTGCACAGCTAACAAATGGCTTT  
 GGCCCCCAGCGCAGTGAGGCACTGAGCCTCTCCATCACTGTACCCGTGTCTCGTCTGTCTCACCCTC  
 AGCTCTGTGAGGCCCTGACTTTTGAAGGAGCCACGGTGACACTTTACTGTGAGGTCCAGAGAGGTTT  
 CCCACGAATCCTATACCAGTTTATCATGAGGACGTGCCCTGGGGAGCAACTCAACACCCCTCTGTGG  
 GAAAAGTGTCTTCACTTCTCTGACTGCAGCACATTCAAGGAATTACTACTGCACAGCTGACAAAC  
 GGTCTTGGTCCCAGCGCAGTGAGGCGGTGAGCCTCTTTGTCACTGTCCAGTGTCTCGCCCTCCTC  
 ACCCTCAGGGTCCCAGGGCCAGGCTGTGGTGGGGACCTTCTGGAGCTTCGCTGTGAGGCCCTGAG  
 AGGCTCTCCCCGATCATGTACTGGTTTATCATGAGGATGTACCCCTGGGGAGCAGCTCAGTCCCCTC  
 TGGAGGAGAACTCTTCAACCTCTCTGACTGCAGAACATTCTGAAACTACTCATGTGAGGCCA  
 ACAATGGCCTGGTGGCCAGCACAGTGATACAATATCACTCAGTGTATAGTCCAGTGTCTCGTCCC  
 ATCTCTACCTTCAGAGCTCCCAGGGCCAGGCTGTAGTGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGC  
 CTTGAGGAGGCTCTCCCAATCCTGTACTGGTTTATCATGAAGATGTACCTTGGGTAAGATCTCAGC  
 CCCCTCTGGAGGAGGAGCCTACTTCAACCTCTCTGACTACAGAACATTCTGGAATCTACTCTGTGA  
 GGGGACAATGGTCTGGAGGCCAGCGCAGTGAGATGGTGACACTGAAAGTTGAGTTCCGGTGTCT  
 CGCCCCCTCTCACCCTCAGGGCTCCCAGGGCCAGGTTGGGTGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTG  
 TGAGGCCCTGAGAGGCTCTCCCTGATCTCTGACTGACAGAACACTCTGAAACTACTCTCT  
 GCTCAGCCCTCTCTGGAGGAGGCTTCTCAACCTCTCTGACTGCAGAACACTCTGAAACTACTCTCT  
 GTGAGGCCGACAATGGTCTGGGGGCCAGCGCAGTGAGACAGTGACACTTTATCTCACAGGGCTGAC  
 CTGAGAACAGAAAGTGGCCCTGTTGCCACGGGTGTACCCGGGGTCTGCTCAGCCTAGCAGGCTTCTG  
 CTGTGGCACTGCTGCTCTACTGCTGCTCTCAAGAAAAGCAGGGAGAGAGCCTGCTCTGACCCCTGC  
 AAGAGCCCTTCACTTGGACTCCAGGAGGCCACCTACCACAAATGTACCAGCTTGGGAAGAGCTGC  
 AACTAGTGTACAGTAATGTGAATCTAGAGGAGAAAATGTGGTTTACTCAGAACTACGGATCATCCG  
 AGAGAAAAAGAAACATGCAGTGCCCTCTAACCCAGGCATCTCAGGAACAAGGGTCTCTGTATCATC  
 TACTCTGAAGTGAAGGTGGCATCAACCCAGCCTCCAGATGCTGTCTTGGCTTCTCAGCTCTCTCAC  
 AGATGA

## Φirypa 37

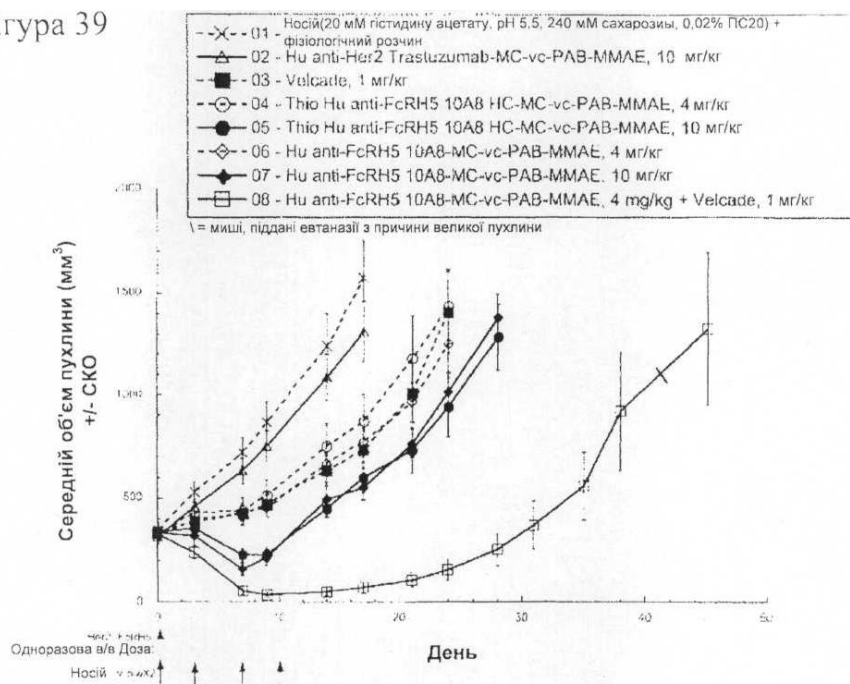
MLLWVILVLAPVSGQFVRTYKSHFLQPPWTTVFRGERVNLTKGFGFYSSQKTKWYYRHLGK  
 EISRETQKNTLEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVSLDFSSASLILQAPLSVFEGDSVVLRCRAKAEVT  
 LKTTIYKNENVLAFLNKSTDFHISHASLKDNGAYRCTGYKETCCLVSSNTVKIQVQESFTRPVL  
 VSSFQPISGSPVTLTCTQLSLERSDVPVQFCFRNDQMLGSGCSLSPKFRITAMWSKDSGSYWC  
 KAATMCDYDTSNLSRWQVLIASHPVLTLSPKALNFBGTKVKLHCETQEDSLRTLYKFYHDC  
 VPLRYKSVRCEKGASISFSLTTEHSGNYCYCTADNGHGAKPSEAVSLSVTPVSRPVLTLSSAEDLI  
 SEGAKLTLHCEAQRGSLPTVYQFHENASLGNRSASAGGVAISFSLTADHSGNYCYCTANNGFG  
 PQRSEAVSLSITVPVSRPVLTLSSAEALTFEGATVTLYCEVQRGSPRILYQFYHEDVPLGNSSTPSV  
 GKVSFSFSLTAAHSGNYCYCTADNGFGPQRSEAVSLFVTPVSRPILTLRVPRAQAVVGDLLRLC

EALRGSPPIMYWFYHEDVTLGSSSVPSGGEASFNLSTAEHSGNYSCEANGLVAQHSDTISLSVI  
 VPVSRPILTRAPRAQAVVGDLLHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGAAYFNLSTT  
 EHSQIYSCEADNGLEAQRSEMVTLLKVAVPVSRPVLTLRAPRAQAVVGDLLHCEALRGSPIL  
 YQFYHEDVTLGNSSALSGGAFFNLSTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLTLTGLTENRSGP  
 VATGVTGGLSLAGLAVALLLYCWLRSKAGREPASDPCRSPSPLDSQPTYHNPVPAWEELQP  
 VYSNVNPRGENVVYSEVRIREKKKHAVASNPRHLRNKGSCITYSEVKVASTPASRCLFLASSAP  
 HR

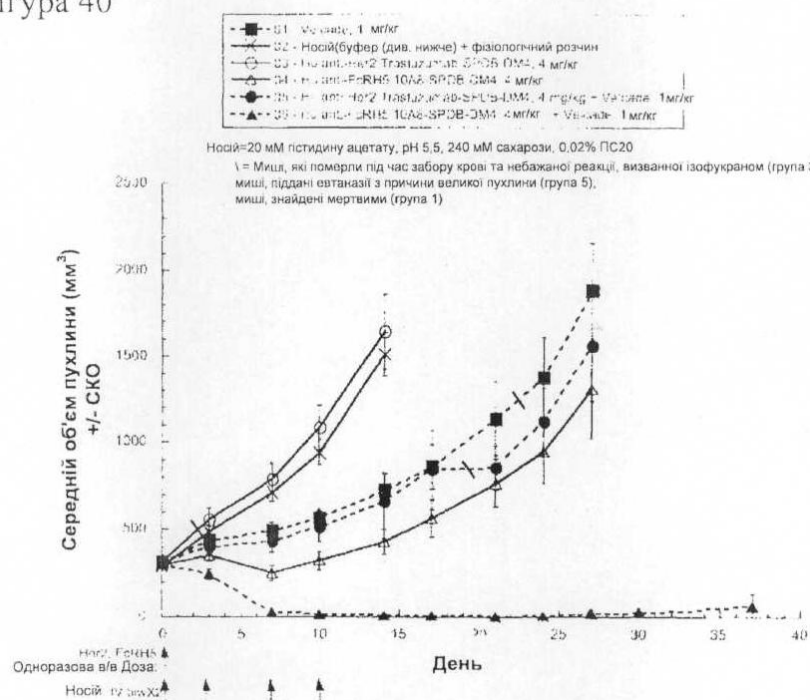
## Φirypa 38



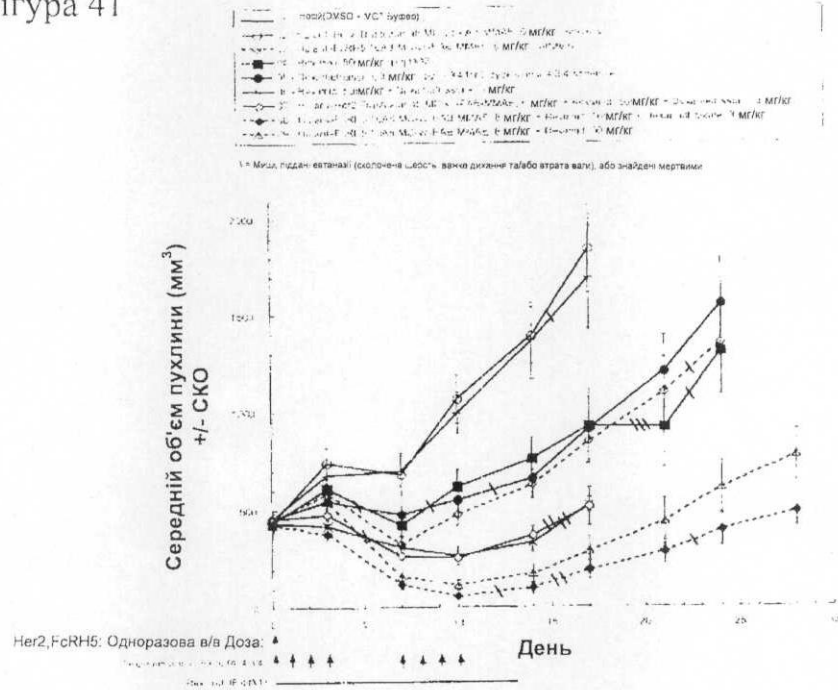
Фігура 39



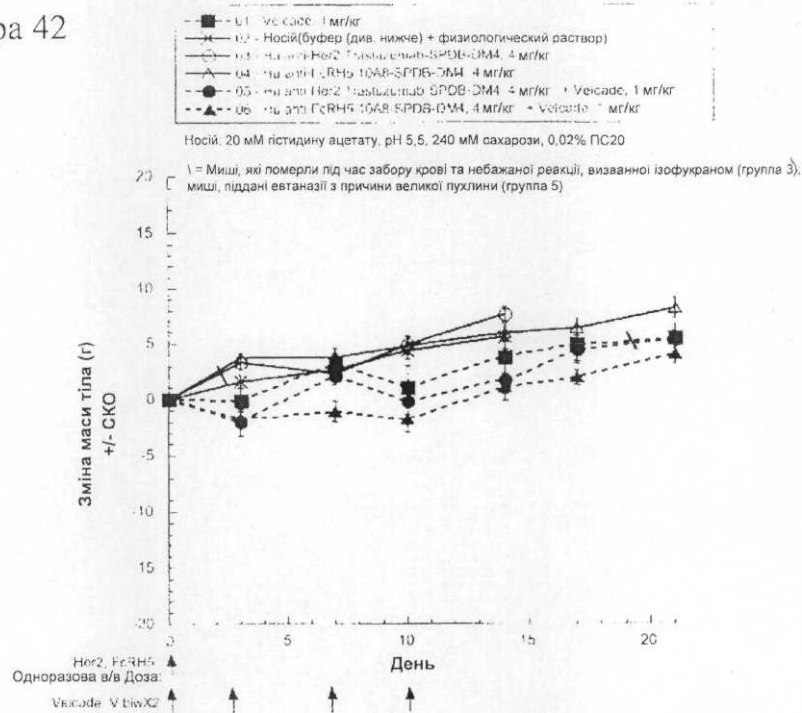
Фігура 40



Фігура 41

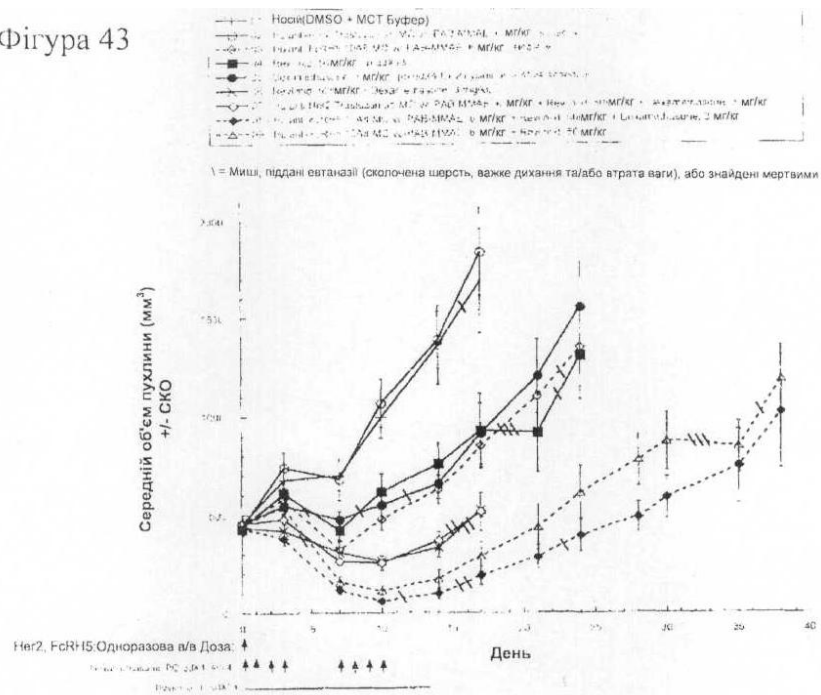


Фігура 42

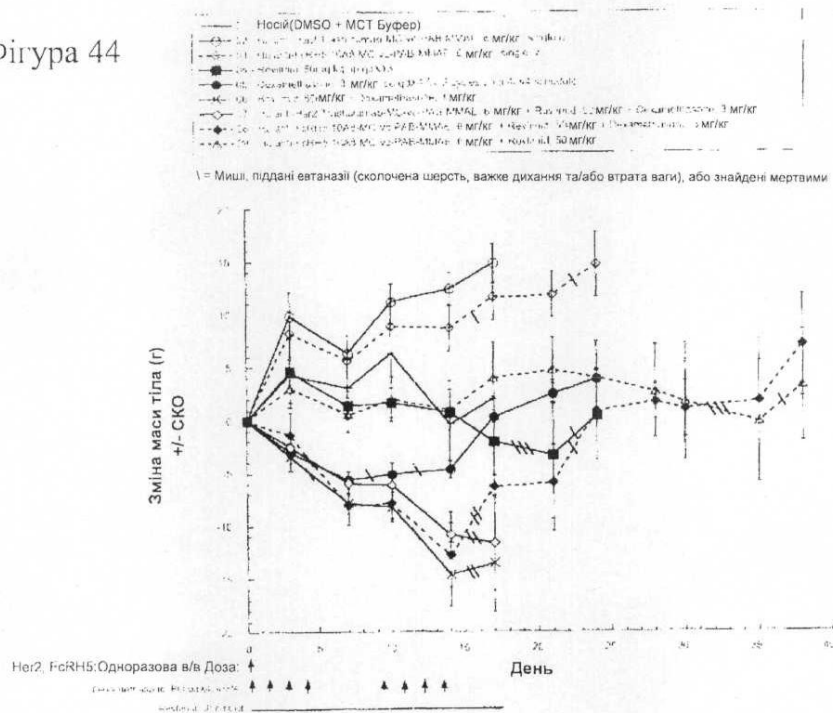




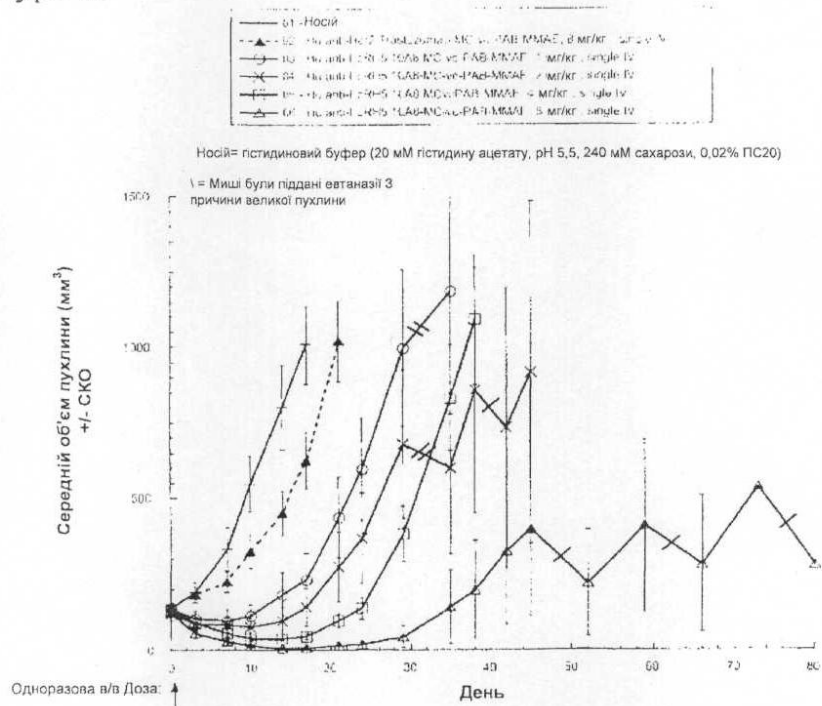
Фігура 43



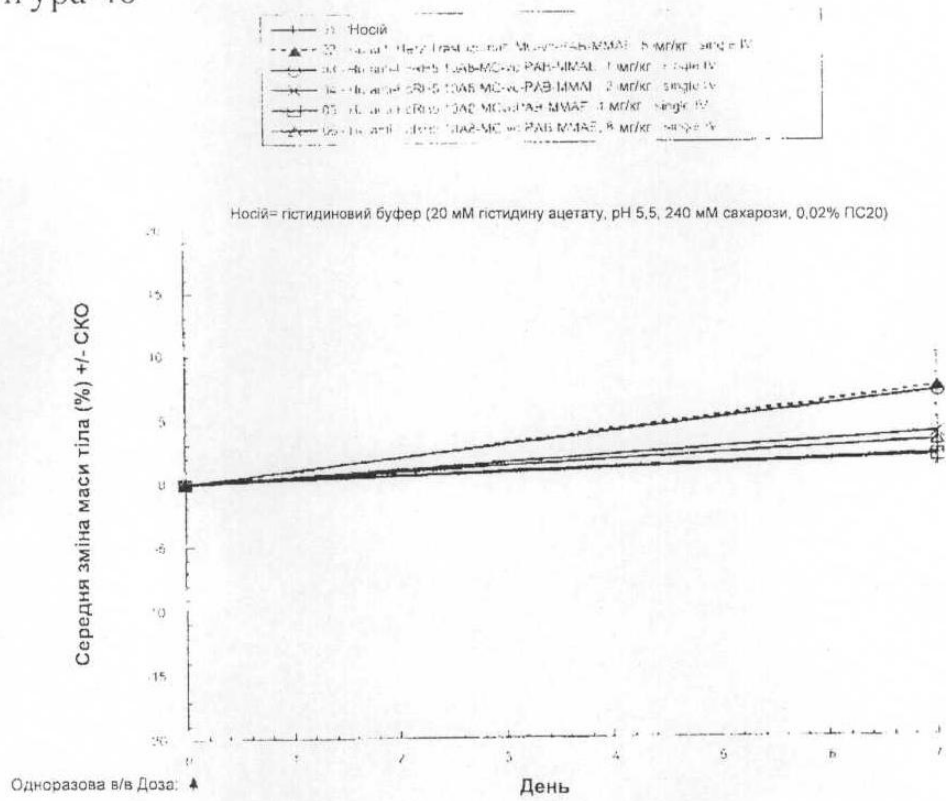
Фігура 44



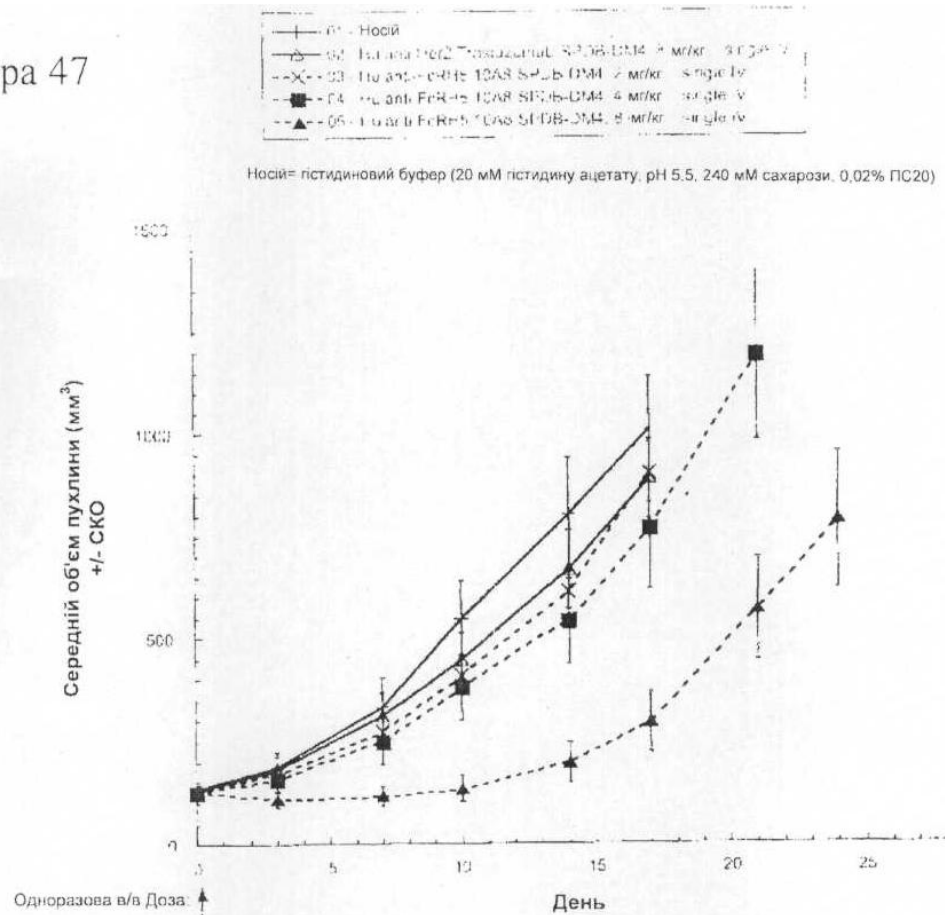
Фігура 45



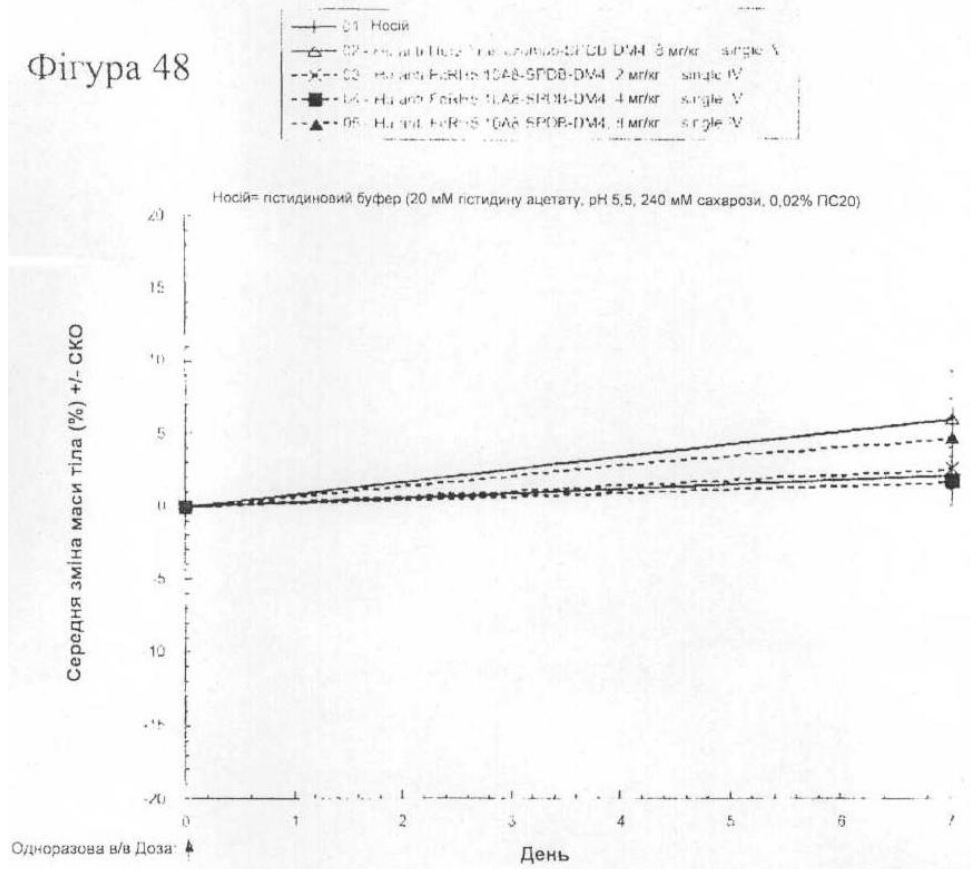
Фігура 46



Фігура 47



Фігура 48



---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

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

---

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