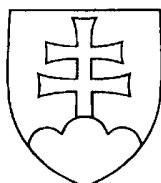


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **17. 5. 2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **01112237.1**
60/325 147
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **18. 5. 2001**
26. 9. 2001
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **EP, US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **8. 6. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **6/2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP02/05467**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/094879**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1559-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

C07K 16/28,
C07K 16/46,
C12N 5/10,
C12N 15/13,
C12N 15/62,
A61K 47/48,
A61K 51/10,
A61K 31/00,
A61K 47/10,
A61P 35/00,
A61P 35/04,
C12N 15/63
/(A61K 51/10,
A61K103:10)
(A61K 51/10,
A61K103:32)
(A61K 51/10,
A61K101:02)
(A61K 51/10,
A61K121:00)

(71) Prihlasovateľ: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, Ingelheim am Rhein, DE;**
BOEHRINGER INGELHEIM PHARMACEUTICALS INC., Ridgefield, CT, US;

(72) Pôvodca: **Adolf Günther, Wien, AT;**
Ostermann Elinborg, Wien, AT;
Patzelt Erik, Pundersdorf, AT;
Sproll Marlies, Gauting, DE;
Heider Karl-Heinz, Stockerau, AT;
Miglietta John J., Bethel, US;
Van Dongen Augustinus Antonius Maria Silvester, Utrecht, NL;

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Protilátková molekula, farmaceutický prostriedok s jej obsahom a jej použitie**

(57) Anotácia:
Sú opísané protilátky s definovanou sekvenciou a ich deriváty, ktoré sú špecifické pre epitop kódovaný variantovým exónom v6 CD44 génu, nukleokyselinové molekuly ich kódujúce, spôsob ich prípravy, farmaceutické prostriedky s ich obsahom a ich použitie na výrobu lieku na liečenie rakoviny.

SK 1559-2003 A3

Protilátková molekula, spôsob jej prípravy, farmaceutický prostriedok s jej obsahom a jej použitie, nukleová kyselina, rekombinantný DNA vektor a hostiteľ

Oblasť techniky

Predložený vynález spadá do oblasti onkológie. Vynález sa týka protilátok s definovanou sekvenciou, ktoré sú špecifické pre epitop kódovaný variantovým exónom v6 CD44 génu, a derivátov uvedenej protilátky. Vynález poskytuje aj nukleokyselinové molekuly kódujúce uvedené protilátkové proteíny. Vynález sa ďalej týka spôsobov produkcie uvedených protilátkových proteínov. Vynález poskytuje aj farmaceutické prostriedky obsahujúce uvedené protilátkové proteíny. Vynález sa ďalej týka použitia protilátkových proteínov na výrobu liečiva na liečenie rakoviny.

Doterajší stav techniky

Nedávno sa ukázalo, že expresia variantov povrchového glykoproteínu CD44 je nevyhnutná a postačujúca na spôsobenie takzvaného metastatického správania sa potkanej pankreatickej adenokarcinómovej bunkovej línie, ktorá nevytvára metastázy, ako aj potkanej fibrosarkómovej bunkovej línie, ktorá nevytvára metastázy (Günthert a ďalší, 1991). Hoci najmenšia CD44 izoforma, štandardná forma CD44s (alebo CD44std) sa exprimuje všade, v rôznych tkanivách vrátane epiteliálnych buniek, určité CD44 zostrihové varianty (CD44v, CD44var) sa exprimujú len v podskupine epiteliálnych buniek. CD44 varianty sa generujú alternatívnym zostrihom spôsobom, pri ktorom sú sekvencie desiatich exónov (v1-v10) úplne odstránené z CD44s, ale môžu sa objaviť vo väčších variantoch v rozličných kombináciách (Screaton a ďalší, 1992; Tölg a ďalší, 1993; Hofmann a ďalší, 1991). Varianty sa líšia v tom, že rôzne aminokyselinové sekvencie sú začlenené v určitom mieste extracelulárnej časti proteínu. Takéto varianty sa môžu detegovať v rôznych humánných nádorových bunkách, ako aj v ľudskom nádorovom tkanive. Takže sa nedávno skúmala expresia CD44 variantov v priebehu kolorektálnej karcinogenézy (Heider a ďalší, 1993a). Expresia CD44 variantov absentuje v normálnom ľudskom epiteli hrubého čreva, a len slabá expresia je detegovateľná v proliferujúcich

bunkách krýpt. V neskorších štádiách nádorovej progresie, napr. pri adenokarcinómoch, všetky malignity exprimujú CD44 varianty. Tkanivová expresia variantového CD44 vo vysokej hladine bola dokázaná aj v agresívnych, iných ako Hodgkinových lymfómoch (Koopman a ďalší, 1993).

Exón v6 sa javí ako hrajúci špeciálnu úlohu najmä v priebehu rozširovania metastáz (Rudy a ďalší, 1993). Na zvieracom modeli mohli protilátky proti v6 špecifickým epitopom zabrániť usadeniu metastatických buniek a rastu metastáz (Seiter a ďalší, 1993). V karcinómoch hrubého čreva, v6 expresia koreluje s nádorovou progresiou (Wielenga a ďalší, 1993). Pri črevných karcinómoch je v6 expresia dôležitým diagnostickým markerom na rozlišovanie nádorov črevného typu od nádorov difúzneho typu (Heider a ďalší, 1993b). V druhých dvoch publikáciách bola v6 expresia determinovaná použitím protilátok proti v6 špecifickým epitopom.

Keďže sa ukázalo, že CD44v6 je antigén spojený s nádorom s priaznivým expresným vzorcom v ľudských nádoroch a v normálnych tkanivách (Heider a ďalší, 1995; Heider a ďalší, 1996), bol predmetom diagnostických a terapeutických prístupov založených na protilátke (Heider a ďalší, 1996; WO 95/33771; WO 97/21104).

Jedným vážnym problémom, ktorý vzniká, keď sa používajú nehumánne protilátky na aplikácie ľuďom, je ten, že sa rýchlo vyvoláva ľudská anti-nehumánna reakcia, ktorá znižuje účinnosť protilátky u pacientov a znemožňuje pokračovanie v podávaní. Na prekonanie tohto problému boli v oblasti vyvinuté koncepty „humanizácie“ nehumánnych protilátok. V prvom prístupe bol pokus dosiahnuť humanizáciu nehumánnych protilátok konštrukciou nehumánnych/humánnych chimérnych protilátok, v ktorom sa nehumánne variabilné oblasti spájali s humánnymi konštantnými oblasťami (Boulianne G. L., Hozumi N. a Shulman, M.J. (1984) Production of functional chimeric mouse/human antibody Nature 312: 643). Takto generované chimérne protilátky si zachovávali väzobnú špecifickosť a afinitu pôvodnej nehumánnej protilátky. Avšak chimérne protilátky, hoci sú významne lepšie ako myšacie protilátky, ešte môžu vyvolať anti-chimérnu reakciu u ľudí (LoBuglio A.F., Wheeler R. H., Trang J., Haynes A., Rogers K., Harvey E. B., Sun L., Ghrayeb J. a Khazaeli M. B. (1989) Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: Kinetics and immune response. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 4220). Tento

prístup bol vylepšovaný ďalším znižovaním množstva nehumánných sekvencií zaštepovaním komplementaritu determinujúcich oblastí (CDRs) z nehumánných variabilných oblastí do humánných variabilných oblastí, a potom spájaním týchto „pretvarovaných ľudských“ variabilných oblastí s ľudskými konštantnými oblasťami (Riechmann L., Clark M., Waldmann H. a Winter G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332: 323). CDR-zaštepované alebo pretvarované ľudské protilátky obsahujú málo alebo žiadne proteínové sekvencie, ktoré môžu byť identifikované ako izolované z myšacích protilátok. Hoci protilátky humanizované prostredníctvom CDR-zaštepovania ešte môžu byť schopné vyvolať nejaké imunitné reakcie, ako napríklad anti-alotypovú alebo anti-idiotypovú reakciu, aké sú pozorované aj pri prirodzených ľudských protilátkach, CDR-zaštepovaná protilátka bude významne menej imunogénna ako myšacia protilátka, čo umožňuje dlhšie liečenie pacientov.

Avšak čoskoro vyšlo najavo, že len samotné CDR-zaštepovanie nevedie k protilátkam s dostatočnou väzobnou afinitou. CDR-zaštepované protilátky majú relatívne slabé väzobné charakteristiky v porovnaní s ich rodičovskými nehumánnymi protilátkami, pretože nie len aminokyseliny vo vnútri CDRs sa podieľajú na viazaní antigénu, ale aj iné. Preto nie sú CDR-zaštepované protilátky so slabou väzobnou afinitou považované za užitočné na terapiu. Preto sa robili pokusy vytvoriť protilátky, ktoré spájajú nízku imunogénnosť CDR-zaštepovaných protilátok s dobrými väzobnými vlastnosťami nehumánných rodičovských protilátok. Vyvinul sa koncept, podľa ktorého sa okrem CDR-zaštepovania musí zachovať jedna až niekoľko aminokyselín hľodavčieho pôvodu v humanizovanej kostrovej oblasti, aby sa zachovala väzobná afinita (Queen a ďalší, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 10029-10033).

Kvôli vysokej potenciálnej prospešnosti, ktoré by takéto protilátky mohli mať v diagnostike a terapii, existuje potreba protilátok so zlepšenými vlastnosťami, ktoré sú vhodné na liečenie ľudskej rakoviny.

Základným problémom predloženého vynálezu bolo poskytnúť protilátku s významne lepšími vlastnosťami v porovnaní so známymi CD44v6 špecifickými protilátkami.

Podstata vynálezu

Vyššie opísaný technický problém je riešený uskutočneniami charakterizovanými v nárokoch a opise. Vyššie uvedené nevýhody v stave techniky sú prekonané prostredníctvom nárokov a opisu predloženého vynálezu.

Aby sa vyriešili problémy uvedené vyššie, pôvodcovia predloženého vynálezu navrhli a generovali CD44v6 špecifickú humanizovanú protilátku označenú ako BIWA8, ktorá je aj CDR-zaštepovaná, a má aj mutovanú kosť, a má aj nízku imunogénnosť kombinovanú s vysokou afinitou.

Avšak pôvodcovia boli tiež schopní vytvoriť protilátku s ešte lepšou terapeutickou prospešnosťou, nazývanú BIWA4. I keď má táto protilátka menšiu väzobnú afinitu v porovnaní s BIWA8, prekvapujúco vykazuje oveľa priaznivejšiu biologickú distribúciu a príjem nádorom, keď sa podáva *in vivo*.

Predložený vynález spadá do oblasti onkológie. Vynález sa týka protilátok s definovanou sekvenciou, ktoré sú špecifické pre epitop kódovaný variantovým exómom v6 CD44 génu, a derivátov uvedenej protilátky. Vynález poskytuje aj nukleokyselinové molekuly kódujúce uvedené protilátkové proteíny. Vynález sa ďalej týka spôsobov produkcie uvedených protilátkových proteínov. Vynález poskytuje aj farmaceutické prostriedky obsahujúce uvedené protilátkové proteíny. Vynález sa ďalej týka použitia protilátkových proteínov na výrobu lieku na liečenie rakoviny.

Opis výhodných uskutočnení vynálezu

Pred uskutočneniami podľa predloženého vynálezu sa musí poznamenať, že tak ako sa používajú tu a v pripojených nárokoch, jednotné číslo zahŕňa množné číslo, ak z kontextu jasne nevyplýva opak. Takže napríklad odvolanie sa na „protilátku“ zahŕňa množstvo takýchto protilátok, odvolanie sa na „bunku“ je odvolaním sa na jednu alebo viacero buniek a ich ekvivalentov známych priemerným odborníkom v oblasti a podobne. Ak nie sú definované inak, všetky, tu používané, technické a vedecké výrazy majú rovnaké významy, ako sú bežné chápané priemerným odborníkom oblasti, do ktorej tento vynález spadá. Hoci akékoľvek metódy a materiály podobné alebo ekvivalentné s tými, ktoré sú tu

opísané, môžu byť použité na uskutočňovanie alebo testovanie predloženého vynálezu, budú teraz opísané výhodné metódy, zariadenia a materiály. Všetky tu uvedené publikácie sú tu začlenené prostredníctvom ich referencie za účelom opísania a uvedenia bunkových línií, vektorov a metodológií zverejnených v týchto publikáciách, ktoré by mohli byť použité v súvislosti s vynálezom. Nič, čo je tu uvedené, sa nemá považovať za pripustenie toho, že vynález nárokuje skutočnosť známu z iného, skoršieho vynálezu.

Výrazy „protilátková molekula“ alebo „protilátkový proteín“ alebo „protilátka“, tak ako sú tu používané, sa majú považovať za ekvivalent.

Pod „komplementaritu determinujúcimi oblasťami monoklonálnej protilátky“ sa rozumejú také aminokyselinové sekvencie, ktoré sa podieľajú na špecifickom viazaní antigénu podľa Kabata (Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. a Foeller C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (5. vyd.). NIH publikačné č. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) v súvislosti s Chotia a Lesk (Chothia a Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917).

Tak ako sa používa tu, výraz „kostrové modifikácie“ označuje výmenu, deléciu alebo pridanie jednej alebo viacerých aminokyselín do variabilných oblastí obklopujúcich jednotlivé komplementaritu determinujúce oblasti. Kostrové modifikácie môžu mať vplyv na imunogénnosť, produktivitu alebo väzobnú špecifitu protilátkového proteínu.

Podstatou vynálezu je teda protilátková molekula obsahujúca variabilnú oblasť ťažkého reťazca, ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 1, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzovanú molekulu alebo chemický derivát. Obe protilátky BIWA4 a BIWA8 obsahujú variabilnú oblasť ťažkého reťazca, ako je charakterizovaná v aminokyselinovej sekvencii č. 1.

„Fragment“ podľa vynálezu je kratšia protilátková molekula, tzn. akákoľvek polypeptidová podskupina, charakteristická tým, že je kódovaná kratšou nukleokyselinovou molekulou ako je tá opísaná nižšie, avšak ešte si zachováva svoju protilátkovú väzobnú aktivitu.

„Funkčný variant“ protilátkovej molekuly podľa vynálezu je protilátková molekula, ktorá má biologickú aktivitu (buď funkčnú alebo štrukturálnu), ktorá je v podstate podobná s protilátkovou molekulou podľa vynálezu, tzn. má v podstate podobnú substrátovú špecificitu alebo podobné štiepenie substrátu. Výraz „funkčný variant“ zahŕňa aj „fragment“, „alelický variant“, „funkčný variant“, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu“ alebo „chemické deriváty“. Takýto „funkčný variant“ napr. môže niesť jednu alebo niekoľko bodových mutácií, jednu alebo niekoľko nukleokyselinových výmen, delécií alebo inzercií alebo jednu alebo niekoľko aminokyselinových výmen, delécií alebo inzercií. Uvedený funkčný variant si ešte zachováva svoju biologickú aktivitu, ako napríklad protilátkovú väzobnú aktivitu, aspoň čiastočne alebo má aj zlepšenú uvedenú biologickú aktivitu.

„Funkčný variant“ protilátkovej molekuly podľa vynálezu je protilátková molekula, ktorá má biologickú aktivitu (buď funkčnú alebo štrukturálnu), ktorá je v podstate podobná s protilátkovou molekulou podľa vynálezu, tzn. v podstate podobnú väzobnú aktivitu voči cieľovej molekule. Výraz „funkčný variant“ zahŕňa aj „fragment“, „alelický variant“, „funkčný variant“, „variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu“ alebo „chemické deriváty“.

„Alelický variant“ je variant spôsobený alelickou odchýlkou, tzn. rozdielmi v dvoch alelách u ľudí. Takýto variant si ešte zachováva svoju biologickú aktivitu, ako napríklad protilátkovú cieľovú väzobnú aktivitu, aspoň čiastočne, alebo je táto biologická aktivita aj zlepšená.

„Variant založený na degenerovanosti genetického kódu“ je variant spôsobený skutočnosťou, že určitá aminokyselina môže byť kódovaná niekoľkými odlišnými nukleotidovými tripletmi. Takýto variant si ešte zachováva svoju biologickú aktivitu, ako napríklad protilátkovú cieľovú väzobnú aktivitu, aspoň čiastočne, alebo je táto biologická aktivita aj zlepšená.

„Fúzovaná molekula“ môže byť protilátková molekula podľa vynálezu fúzovaná napr. s reportérom, ako napríklad rádioaktívnou značkou, chemickou molekulou, ako napríklad toxínom, alebo fluorescenčnou značkou, alebo akoukoľvek inou molekulou známou v oblasti.

Tak ako sa používa tu, „chemický derivát“ podľa vynálezu je protilátková molekula podľa vynálezu chemicky modifikovaná alebo obsahujúca ďalšie chemické

skupiny, ktoré normálne nie sú časťou molekuly. Takéto skupiny môžu zlepšovať aktivitu molekuly, ako napríklad deštrukciu cieľa (napr. zabíjanie nádorových buniek), alebo môžu zlepšovať jej rozpustnosť, absorpciu, biologický polčas rozpadu, atď.

Pri mnohých použitíach protilátok podľa vynálezu je žiadateľné mať čo najmenšie možné antigén viažuce, tzn. CD44v6-viažuce jednotky. Preto je v inom výhodnom uskutočnení protilátkový proteín podľa vynálezu Fab fragment (viazanie antigénového fragmentu = Fab). Tieto CD44v6-špecifické protilátkové proteíny podľa vynálezu pozostávajú z variabilných oblastí oboch reťazcov, ktoré sú spolu držané príslušnou konštantnou oblasťou. Môžu byť vytvorené štiepením s proteázou, napr. s papaínom, z bežných protilátok, alebo podobné Fab fragmenty môžu byť vyrobené v priemernom čase aj genetickým inžinierstvom. V inom výhodnom uskutočnení je protilátkovým proteínom podľa vynálezu $F(ab')_2$ fragment, ktorý môže byť pripravený proteolytickým štiepením s pepsínom.

Použitím metód genetického inžinierstva je možné vyprodukovať skrátené protilátkové fragmenty, ktoré pozostávajú len z variabilných oblastí ťažkého (VH) a ľahkého reťazca (VL). Tieto sa označujú ako Fv fragmenty (variabilný fragment = fragment variabilnej časti). V inom výhodnom uskutočnení je CD44v6-špecifickou protilátkovou molekulou podľa vynálezu takýto Fv fragment. Keďže týmto Fv-fragmentom chýba kovalentné viazanie dvoch reťazcov prostredníctvom cysteínov konštantných reťazcov, Fv fragmenty sa často stabilizujú. Je výhodné spájať variabilné oblasti ťažkého a ľahkého reťazca krátkym peptidovým fragmentom, napr. 10 až 30 aminokyselinami. Výhodne 15 aminokyselinami. Týmto spôsobom sa získava jediné peptidové vlákno pozostávajúce z VH a VL, spojených peptidovým spojovníkom. Protilátkový proteín tohto druhu je známy ako jednoreťazcový Fv (scFv). Príklady scFv protilátkových proteínov tohto druhu známe z doterajšieho stavu techniky sú opísané v Huston a ďalší (1988, PNAS 16: 5879-5883). Preto v inom výhodnom uskutočnení je CD44v6 špecifickým protilátkovým proteínom podľa vynálezu jednoreťazcový Fv proteín (scFv).

V posledných rokoch sa vyvinuli rôzne stratégie na prípravu scFv vo forme multimérnych derivátov. Cieľom je, aby to viedlo najmä k rekombinantným protilátkam so zlepšenými farmakokinetickými a biodistribučnými vlastnosťami, ako

aj so zvýšenou väzobnou aviditou. Aby sa dosiahla multimerizácia scFv, pripravili sa scFv ako fúzované proteíny s multimerizačnými doménami. Multimerizačnými doménami môžu byť napr. CD3 oblasť IgG alebo závitnicová štruktúra (helix štruktúry), ako napríklad leucínové zipsové (leucin-zipper) domény. Avšak existujú aj stratégie, pri ktorých sa interakcie medzi VH/VL oblasťami scFv používajú na multimerizáciu (napr. di-, tri- a pentaprotilátky). Preto v inom výhodnom uskutočnení je protilátkovým proteínom podľa vynálezu CD44v6-špecifický diabody protilátkový fragment. Pod diabody priemerný odborník rozumie bivalentný homodimérny scFv derivát (Hu a ďalší, 1996, PNAS 16: 5879-5883). Skrátenie spojovníka v scFv molekule na 5 až 10 aminokyselín vedie k vytváraniu homodimérov, v ktorých sa uskutočňuje medzireťazcové VH/VL prikrývanie. Diabody môžu byť ďalej stabilizované začlenením disulfidových mostíkov. Príklady diabody protilátkových proteínov z doterajšieho stavu techniky je možné nájsť v Perisic a ďalší (1994, Structure 2: 1217-1226).

Pod minibody priemerný odborník rozumie bivalentný, homodimérny scFv derivát. Pozostáva z fúzovaného proteínu, ktorý obsahuje CH3 oblasť imunoglobulínu, výhodne IgG, najvýhodnejšie IgG1, ako dimerizačnú oblasť, ktorá je spojená s scFv prostredníctvom kĺbovej oblasti (napr. aj z IgG1) a spojovníkovej oblasti. Disulfidové mostíky v kĺbovej oblasti sú vytvárané poväčšine vo vyšších bunkách a nie v prokaryotoch. V inom výhodnom uskutočnení je protilátkovým proteínom podľa vynálezu CD44v6-špecifický minibody protilátkový fragment. Príklady minibody protilátkových proteínov z doterajšieho stavu techniky je možné nájsť v Hu a ďalší (1996, Cancer Res. 56: 3055-61).

Pod triabody priemerný odborník v oblasti rozumie trivalentný homotrimérny scFv derivát (Kortt a ďalší, 1997 Protein Engineering 10: 423-433). ScFv deriváty v, ktorých sú VH-VL fúzované priamo bez spojovníkovej sekvencie, vedú k vytvoreniu trimérov.

Priemerný odborník v oblasti bude oboznámený aj s takzvanými mini-protilátkami, ktoré majú bi-, tri- alebo tetraivalentnú štruktúru a sú odvodené od scFv. Multimerizácia sa uskutočňuje prostredníctvom di-, tri- alebo tetramérnych závitnicových štruktúr (Pack a ďalší, 1993 Biotechnology 11, 1271-1277; Lovejoy a ďalší, 1993 Science 259: 1288-129; Pack a ďalší, 1995 J. Mol. Biol. 246: 28-34).

Preto vo výhodnom uskutočnení je protilátkovým proteínom podľa vynálezu CD44v6-špecifická multimerizovaná molekula založená na vyššie uvedených protilátkových fragmentoch, ktorá môže byť napríklad triabody, tetravalentná miniprotilátka alebo pentabody.

Vo výhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly, kde variabilná oblasť ťažkého reťazca pozostáva z aminokyselín, ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 1.

V inom výhodnom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly obsahujúcej variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 2, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA4, tak ako sa používa tu, obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca, ako je definovaná v aminokyselinovej sekvencii č. 2.

V inom výhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly, kde variabilná oblasť ľahkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 2.

V inom výhodnom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly obsahujúcej variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 3, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA8 obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca, ako je definovaná v aminokyselinovej sekvencii č. 3.

V inom výhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly, kde variabilná oblasť ľahkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 3.

V inom, výhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, ktorá obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 1 a ktorá obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekvencii č. 2, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA4 obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca ako

je charakterizovaná v aminokyselinovej sekvencii č. 1 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je definovaná v aminokyselinovej sekvencii č. 2.

V najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde variabilná oblasť ťažkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 1 a kde variabilná oblasť ľahkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 2.

V inom, výhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, ktorá obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 1 a ktorá obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekvencii č. 3, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA8 obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca ako je charakterizovaná v aminokyselinovej sekvencii č. 1 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je definovaná v aminokyselinovej sekvencii č. 3.

V inom najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde variabilná oblasť ťažkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 1 a kde variabilná oblasť ľahkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 3.

V inom výhodnom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly, ktorá obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzanú molekulu alebo chemický derivát. Obe protilátky BIWA4 a BIWA8 obsahujú variabilnú oblasť ťažkého reťazca ako je charakterizovaná v nukleokyselinovej sekvencii č. 4.

V inom výhodnejšom uskutočnení, sa vynález týka protilátkovej molekuly, kde variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou, ako je definovaná v sekv. č. 4.

V inom výhodnom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly, ktorá obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 5, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA4, ako sa používa tu, obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je definovaná v nukleokyselinovej sekvencii č. 5.

V inom výhodnejšom uskutočnení, sa vynález týka protilátkovej molekuly, kde variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou, ako je definovaná v sekv. č. 5.

V inom výhodnom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly, ktorá obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 6, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA8, ako sa používa tu, obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je definovaná v nukleokyselinovej sekvencii č. 6.

V inom výhodnejšom uskutočnení, sa vynález týka protilátkovej molekuly, kde variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou, ako je definovaná v sekv. č. 6.

V inom, výhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, ktorá obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4 a ktorá obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekvencii č. 5, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA4 obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca ako je charakterizovaná nukleokyselinovou sekvenciou č. 4 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je definovaná v nukleokyselinovej sekvencii č. 5.

V najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou

sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4 a kde variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 5.

V inom, výhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, ktorá obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4 a ktorá obsahuje variabilnú oblasť ľahkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekvencii č. 6, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA8 obsahuje variabilnú oblasť ťažkého reťazca ako je charakterizovaná nukleokyselinovou sekvenciou č. 4 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je definovaná v nukleokyselinovej sekvencii č. 6.

V najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4 a kde variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 6.

Na generovanie humanizovaných CD44v6-špecifických protilátkových proteínov sa opísané nukleokyselinové sekvencie (pozri nižšie a príklady) exprimovali metódami molekulárnej biológie známymi v oblasti.

Variabilné oblasti protilátkových proteínov podľa predloženého vynálezu sú typicky spojené s aspoň časťou imunoglobulínovej konštantnej oblasti (Fc), typicky časťou ľudského imunoglobulínu. DNA sekvencie ľudských konštantných oblastí môžu byť izolované v súlade s dobre známymi postupmi z rôznych ľudských buniek, ale výhodne z imortalizovaných B buniek (pozri Kabat a ďalší, vyššie, a WO 87/02671). Takže protilátkové proteíny podľa vynálezu môžu obsahovať celú alebo len časť konštantnej oblasti, pokiaľ sa tieto špecificky viažu na CD44v6 antigén. Voľba typu a rozsahu konštantnej oblasti závisí na tom, či je požadovaná efektorová funkcia podobná fixácii komplementu alebo na protilátke závislá bunková toxicita, a na požadovaných farmakologických vlastnostiach protilátkového proteínu. Protilátkový proteín podľa vynálezu bude typicky tetramér pozostávajúci z dvoch párov ľahkých a ťažkých reťazcov, ale môže byť aj dimerický, tzn. pozostávajúci z páru ľahkého a ťažkého reťazca, napr. Fab alebo Fv fragment.

Preto sa ďalšie uskutočnenie vynálezu týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, ktoré sú charakteristické tým, že majú variabilnú ľahkú reťazcovú oblasť a variabilnú ťažkú reťazcovú oblasť, z ktorých je každá spojená s ľudskou konštantnou oblasťou. Konkrétne bola variabilná oblasť ľahkého reťazca spojená s ľudskou kappa konštantnou oblasťou a variabilná oblasť ťažkého reťazca bola spojená s ľudskou gamma-1 konštantnou oblasťou. Pre priemerného odborníka v oblasti sú dostupné aj iné konštantné oblasti na chimerizáciu ľahkých a ťažkých reťazcov.

Humanizácia variabilnej oblasti myšacej protilátky sa môže dosiahnuť využitím spôsobov známych v oblasti. EP 0239400 opisuje zaštepovanie CDRs myšacej variabilnej oblasti do kostry ľudskej variabilnej oblasti. WO 90/07861 opisuje spôsoby retvarovania CDR-zaštepenej variabilnej oblasti prostredníctvom zavedenia ďalších kostrových modifikácií. WO 92/11018 opisuje spôsoby produkcie humanizovaného Ig kombinujúce donorové CDRs s akceptorovou kostrou, ktorá má vysokú homológiu s donorovou kostrou. WO 92/05274 opisuje prípravu protilátok s mutovanou kostrou vychádzajúcu z myšacej protilátky. Ďalšími dokumentmi doterajšieho stavu techniky týkajúcimi sa humanizácie myšacích monoklonálnych protilátok sú EP 0368684, EP 0438310, WO 92/07075 alebo WO 92/22653.

V inom výhodnom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, ktorá je charakteristická tým, že každá variabilná oblasť ľahkého reťazca a variabilná oblasť ťažkého reťazca je separátne spojená s ľudskou konštantnou oblasťou.

V inom, výhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde ľudskou konštantnou oblasťou ľahkého reťazca je ľudská kappa konštantná oblasť.

V inom výhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkového proteínu podľa vynálezu, kde ľudskou konštantnou oblasťou ťažkého reťazca je ľudská IgG1 konštantná oblasť.

Výhodné sú aj protilátky obsahujúce ťažký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou č. 7 a/alebo ľahký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou č. 8 alebo ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou č. 9.

Takže iným dôležitým uskutočnením je protilátková molekula podľa vynálezu, ktorá obsahuje ťažký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 7 a ktorá obsahuje ľahký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 8, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúзованú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA4 obsahuje ťažký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou č. 7 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je definovaná v aminokyselinovej sekvencii č. 8.

V najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde ťažký reťazec pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 7 a kde ľahký reťazec pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 8. Protilátka BIWA4 pozostáva zo sekvencií ako sú uvedené v aminokyselinovej sekvencii č. 7 (ťažký reťazec) a aminokyselinovej sekvencii č. 8 (ľahký reťazec). BIWA4 je CDR-zaštepená protilátka bez kostrových modifikácií. Prekvapujúco má táto protilátka, napriek nižšej väzobnej afinite, vynikajúcu terapeutickú účinnosť, lepšiu biologickú distribúciu a príjem nádorom v porovnaní s protilátkou BIWA8, ktorá má mutácie v kostre (pozri príklad). Je to humanizovaná verzia protilátky VFF-18 (=BIWA1) uvedenej vyššie, ktorá má komplementaritu determinujúce oblasti z myšacej monoklonálnej protilátky VFF-18 v úplne humánnej kostre, a humánne konštantné oblasti. Je to preto protilátka s veľmi nízkou imunogénnosťou pre človeka, čo je kladný znak. Avšak keďže nemá žiadne myšacie kostrové zvyšky na optimalizáciu viazania antigénu, má významne nižšiu väzobnú afinitu voči antigénu ako jej rodičovská protilátka VFF-18, a preto by nemala byť považovaná za dobrého kandidáta na terapeutické liečivo. Neočakávane sa zistilo, že BIWA4, napriek jej slabšej väzobnej afinite, má veľmi pozitívnu biologickú distribúciu a príjem nádorom *in vivo*, čo ju robí vynikajúcou oproti iným humanizovaným verziám VFF-18 s vyššou väzobnou afinitou.

Iným dôležitým uskutočnením je protilátková molekula podľa vynálezu, ktorá obsahuje ťažký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 7 a ktorá obsahuje ľahký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 9, alebo jej fragment,

alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzovanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA8 obsahuje ťažký reťazec ako je charakterizovaný v aminokyselinovej sekvencii č. 7 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je definovaná v aminokyselinovej sekvencii č. 9.

V najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde ťažký reťazec pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 7 a kde ľahký reťazec pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 9. Protilátka BIWA8 pozostáva zo sekvencií uvedených v aminokyselinovej sekvencii č. 7 (ťažký reťazec) a aminokyselinovej sekvencii č. 9 (ľahký reťazec). BIWA 8 je CDR-zaštepená protilátka s kostrovými modifikáciami. Táto protilátka má významne vyššiu väzobnú afinitu ako BIWA4 (pozri príklad).

Výhodné sú aj protilátky, ktoré obsahujú ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 10 a/alebo ľahký reťazec ako je charakterizovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 11 alebo ako je charakterizovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 12. Uvedené sekvencie zahŕňajú netranslatované sekvencie a vedúcu sekvenciu ako sú klonované vo vektore pAD-CMV1/pAD-CMV19.

Preto iným dôležitým uskutočnením je protilátková molekula podľa vynálezu, ktorá obsahuje ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 10 a ktorá obsahuje ľahký reťazec ako je charakterizovaný nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 11 alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát. Protilátka BIWA4 obsahuje ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 10 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou č. 11.

V najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde ťažký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 10 a kde ľahký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 11.

Iným dôležitým uskutočnením je protilátková molekula podľa vynálezu, ktorá obsahuje ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou ako je

definovaná v sekv. č. 10 a ktorá obsahuje ľahký reťazec ako je charakterizovaný nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 12 alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát. Protilátka BIWA8 obsahuje ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 10 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou č. 12.

V najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde ťažký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 10 a kde ľahký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 12.

Výhodné sú aj protilátky obsahujúce ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 13 a/alebo ľahký reťazec ako je charakterizovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 14 alebo ako je charakterizovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 15. Uvedené sekvencie zahŕňajú vedúcu sekvenciu ako je klonovaná vo vektore N5KG1val.

Preto iným dôležitým uskutočnením je protilátková molekula podľa vynálezu, ktorá obsahuje ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 13 a ktorá obsahuje ľahký reťazec ako je charakterizovaný nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 14 alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA4 obsahuje ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 13 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou č. 14.

V najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde ťažký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 13 a kde ľahký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 14.

Iným dôležitým uskutočnením je protilátková molekula podľa vynálezu, ktorá obsahuje ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 13 a ktorá obsahuje ľahký reťazec ako je charakterizovaný nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 15 alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleo-

kyselinového kódu, fúzovanú molekulu alebo chemický derivát. Protilátka BIWA8 obsahuje ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 13 a variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou č. 15.

V najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde ťažký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 13 a kde ľahký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 15.

Najvýhodnejší je protilátkový proteín, ktorý obsahuje ťažký a ľahký reťazec ako sú kódované nukleokyselinovou sekvenciou č. 16. Uvedená sekvencia zahŕňa vedúcu sekvenciu ako je klonovaná vo vektore N5KG1val.

Preto iným veľmi dôležitým uskutočnením je protilátková molekula podľa vynálezu, ktorá obsahuje ťažký a ľahký reťazec ako sú kódované nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 16, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát. Protilátka BIWA4 obsahuje ťažký a ľahký reťazec ako sú kódované nukleokyselinovou sekvenciou č. 16.

V najvýhodnejšom uskutočnení sa vynález týka protilátkovej molekuly podľa vynálezu, kde ťažký a ľahký reťazec sú kódované nukleokyselinovou sekvenciou č. 16. Táto sekvencia kóduje celú protilátku BIWA4.

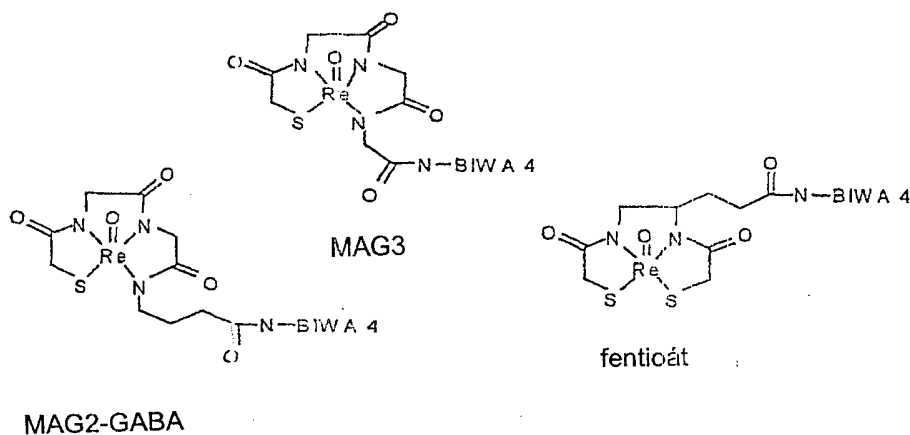
Protilátkové proteíny podľa vynálezu poskytujú vysoko špecifický nástroj pre cielené terapeutické látky voči CD44v6 antigénu. Preto sa ďalší predmet vynálezu týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, kde je protilátkový proteín konjugovaný s terapeutickou látkou. Z mnohých terapeutických látkou známych v danej oblasti techniky sú výhodné terapeutické látky vybrané zo skupiny, ktorá obsahuje rádioizotopy, toxíny, toxoidy, zápalogénne látky, enzýmy, antisense molekuly, peptidy, cytokíny a chemoterapeutické látky. Spomedzi rádioizotopov sa ako terapeutické látky môžu použiť gamma, beta a alfa emitujúce rádioizotopy. Ako terapeutické rádioizotopy sú výhodné β -emitujúce rádioizotopy. $^{186}\text{Rénium}$, $^{188}\text{rénium}$, $^{131}\text{jód}$ a $^{90}\text{ytrium}$ boli dokázané ako výnimočne užitočné β -emitujúce izotopy na dosiahnutie lokalizovaného ožiarenia a deštrukcie malígnych nádorových buniek. Preto rádioizotopy vybrané zo skupiny, ktorá obsahuje $^{186}\text{rénium}$, $^{188}\text{rénium}$, $^{131}\text{jód}$ a $^{90}\text{ytrium}$ sú výnimočne výhodné ako terapeutické látky konjugované

s protilátkovými proteínmi podľa vynálezu. Napríklad na rádiojodidáciu protilátky podľa vynálezu môže byť použitý spôsob opísaný vo WO 93/05804.

Takže výhodnejším predmetom podľa predloženého vynálezu je protilátkový proteín podľa vynálezu, kde terapeutickou látkou je terapeutická látka vybraná zo skupiny, ktorá obsahuje rádioizotopy, toxíny, toxoidy, prekursor a chemoterapeutické látky.

Výhodnejším predmetom podľa predloženého vynálezu je protilátkový proteín podľa vynálezu, kde je uvedená terapeutická látka spojená s protilátkovým proteínom prostredníctvom spojovníka vybraného zo skupiny, ktorá obsahuje MAG-3 (US 5082930 A, EP 0247866 B1 (strana 2, riadky 55-56 – strana 3, riadky 1-23)); MAG-2 GABA (US 5681927 A, EP 028407 B1 (strana 6, riadky 9-29)) a N2S2 ((=fentioát) US 4897255 A, US 5242679 A, EP 0188256 B1 (strana 2, riadky 38 až strana 3, riadok 18)), pričom všetky tieto dokumenty sú tu zahrnuté prostredníctvom ich citácie.

Vzorce uvedených spojovníkov sú nasledovné:



Výhodnejším predmetom predloženého vynálezu je protilátkový proteín podľa vynálezu, kde je terapeutická látka spojená s protilátkovým proteínom prostredníctvom MAG-2 GABA.

Výhodnejším predmetom podľa predloženého vynálezu je protilátkový proteín podľa vynálezu, kde rádioizotopom je β -emitujúci rádioizotop.

Výhodnejším predmetom podľa vynálezu je protilátkový proteín podľa vynálezu, kde rádioizotop je vybraný zo skupiny, ktorá obsahuje 186 rénium, 188 rénium 131 jód a 90 ytrium.

Výhodnejším predmetom podľa predloženého vynálezu je protilátkový proteín podľa vynálezu, kde rádioizotopom je $^{186}\text{rénium}$.

Ďalší predmet podľa predloženého vynálezu sa týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, ktoré sú charakteristické tým, že sú značené. Takéto CD44v6-špecifické značené protilátky umožňujú lokalizáciu a/alebo detekciu CD44v6 antigénu *in vitro* a/alebo *in vivo*. Značka je definovaná ako marker, ktorý môže byť priamo alebo nepriamo detegovaný. Nepriamy marker je definovaný ako marker, ktorý nemôže byť detegovaný ako taký, ale vyžaduje ďalší priamo detegovateľný marker špecifický pre nepriamy marker. Výhodnými značkami na uskutočňovanie vynálezu sú detegovateľné markery. Z veľkého množstva detegovateľných markerov je najvýhodnejší detegovateľný marker vybraný zo skupiny, ktorá obsahuje enzýmy, rádioizotopy, digoxigenín a biotín.

Takže výhodnejším predmetom predloženého vynálezu je protilátkový proteín podľa vynálezu, ktorý je charakteristický tým, že je značený. Výhodnejší je protilátkový proteín podľa vynálezu, kde je značkou detegovateľný marker. Výhodnejší je aj protilátkový proteín podľa vynálezu, kde je detegovateľný marker vybraný zo skupiny, ktorá obsahuje enzýmy, farbičky, rádioizotopy, digoxigenín a biotín.

Ďalší predmet predloženého vynálezu sa týka protilátkových proteínov podľa vynálezu, ktoré sú charakteristické tým, že sú konjugované so zobrazovacím činidlom. Veľké množstvo rôznych zobrazovacích činidiel, najmä rádioizotopov, je dostupných zo stavu techniky. Na uskutočňovanie vynálezu sú výhodnejšie gamma emitujúce izotopy. Najvýhodnejší je $^{125}\text{jód}$.

Preto je výhodnejším predmetom predloženého vynálezu protilátkový proteín podľa vynálezu konjugovaný so zobrazovacím činidlom. Výhodnejším predmetom predloženého vynálezu je protilátkový proteín podľa vynálezu, kde zobrazovacím činidlom je rádioizotop. Výhodnejším predmetom podľa predloženého vynálezu je protilátkový proteín podľa vynálezu, kde rádioizotopom je γ -emitujúci rádioizotop. Výhodnejším predmetom predloženého vynálezu je protilátkový proteín podľa vynálezu, kde rádioizotopom je ^{125}I .

Preto je výhodnejším predmetom predloženého vynálezu protilátkový proteín konjugovaný s rádioizotopom, ako je opísaný vyššie, kde protilátkový proteín má

špecifickú aktivitu od približne 0,5 do približne 15 mCi/mg, alebo od približne 0,5 do približne 14 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 10 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 5 mCi/mg, a najvýhodnejšie 2 až 6 mCi/mg alebo 1 až 3 mCi/mg.

Iným výhodným uskutočnením predloženého vynálezu je farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje protilátku podľa vynálezu a farmaceuticky prijateľný nosič alebo excipient.

Farmaceuticky prijateľný nosič môže obsahovať fyziologicky prijateľné zlúčeniny, ktoré slúžia napríklad na stabilizáciu alebo na zvýšenie absorpcie agonistu, antagonistu alebo modulátora AMPA glutamátového receptora. Takéto fyziologicky prijateľné zlúčeniny zahŕňajú napríklad sacharidy, ako napríklad glukózu, sacharózu alebo dextrány, antioxidanty, ako napríklad kyselinu askorbovú alebo glutatión, chelatačné činidlá, proteíny s nízkou molekulovou hmotnosťou alebo iné stabilizátory alebo excipienty (pozri aj napr. Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), 18. vyd. Mack Publ. Easton). Priemerný odborník v oblasti by vedel, že voľba farmaceuticky prijateľného nosiča, vrátane fyziologicky prijateľnej zlúčeniny, závisí napríklad na spôsobe podávania prostriedku.

Na zvieracom alebo ľudskom tele sa môže dokázať ako výhodné aplikovať farmaceutické prostriedky ako sú opísané vyššie intravenózne alebo iným spôsobom, napr. systémovo, lokálne alebo topicky na tkanivo alebo orgán, o ktorý je záujem, v závislosti na type a pôvode liečeného ochorenia alebo problému, napr. nádoru. Napríklad systémový spôsob účinku je požadovaný, ak je potrebná liečba rôznych orgánov a orgánových systémov, napr. pri systémových autoimunitných ochoreniach, alebo alergiách alebo transplantáciách cudzích orgánov alebo tkanív alebo nádorov, ktoré sú difúzne alebo je ich ťažké lokalizovať. Lokálny spôsob účinku by mohol prichádzať do úvahy len vtedy, keď sa očakávajú len lokálne manifestácie neoplastického alebo imunologického účinku, ako napríklad pri lokálnych nádoroch.

Farmaceutické prostriedky obsahujúce protilátkové proteíny podľa predloženého vynálezu môžu byť aplikované rôznymi spôsobmi aplikácie, ktoré sú odborníkovi známe, najmä intravenóznou injekciou alebo priamou injekciou do cieľových tkanív. Na systémovú aplikáciu je výhodný intravenózný, intravaskulárny, intramuskulárny, intraarteriálny, intraperitoneálny, orálny alebo intratekálny spôsob.

Lokálna aplikácia sa môže uskutočňovať subkutánne, intrakutánne, intrakardiálne, intralobálne, intramedulárne, intrapulmonálne alebo priamo do alebo do blízkosti tkaniva, ktoré sa má liečiť (spojivového, kostného, svalového, nervového, epiteliálneho tkaniva). V závislosti na požadovanom trvaní a účinnosti liečenia sa farmaceutické protilátkové prostriedky môžu podávať raz alebo niekoľkokrát, aj nesúvislo, napríklad denne niekoľko dní, týždňov alebo mesiacov, a v rôznych dávkach.

Na prípravu vhodných farmaceutických prostriedkov obsahujúcich protilátkové prípravky na vyššie opísané aplikácie môže odborník použiť známe injektovateľné, fyziologicky prijateľné sterilné roztoky. Na prípravu roztokov pripravených na použitie na parenterálnu injekciu alebo infúziu sú bežne dostupné vodné izotonické roztoky, ako napr. fyziologický roztok alebo zodpovedajúce plazmatické proteínové roztoky. Farmaceutické prostriedky môžu byť v lyofylizovanej forme alebo to môžu byť suché prípravky, ktoré je možné rekonštituovať so známym injektovateľným roztokom priamo pred použitím v sterilných podmienkach, napr. ako časti kitu. Finálny prípravok protilátkových prostriedkov podľa predloženého vynálezu sa pripravuje na injekciu, infúziu alebo perfúziu prostredníctvom miešania purifikovaných protilátok podľa vynálezu so sterilným fyziologicky prijateľným roztokom, ktorý môže byť doplnený so známymi nosičovými látkami a/alebo aditívami (napr. sérovým albumínom, dextrózou, bisulfitom sodným, EDTA).

Aplikované množstvo protilátky závisí na povahe ochorenia. U pacientov s rakovinou môže byť aplikovaná dávka „nahej“ protilátky, ktorá je obsiahnutá vo farmaceutickom prostriedku podľa vynálezu medzi 0,1 a 100 mg/m², výhodne medzi 5 a 50 mg/m² na aplikáciu, výhodne 10 mg/m² až približne 40 mg/m², výhodne 10 mg/m² až približne 30 mg/m², aj výhodne 20 mg/m² až približne 30 mg/m², a najvýhodnejšie približne 25 mg/m² povrchovej oblasti tela. Najvýhodnejšia dávka protilátkového proteínu je aj približne 50 mg/m² telesnej povrchovej oblasti.

Dávka rádioaktivity aplikovaná pacientovi pri jednom podaní musí byť dostatočne vysoká na to, aby bola účinná, ale musí byť nižšia ako dávka limitovaná toxicitou (DLT). Pre farmaceutické prostriedky obsahujúce rádioaktívne značené protilátky, napr. so ¹⁸⁶rénom, musí byť určená maximálne tolerovaná dávka (MTD),

ktorá nesmie byť prekročená pri terapeutických nastaveniach. Aplikácie rádioaktívne značenej protilátky pacientom s rakovinou sa potom môžu uskutočňovať opakovanou (mesačne alebo týždenne) intravenóznou infúziou dávky, ktorá je nižšia ako MTD (pozri napr. Welt a ďalší (1994) J. Clin. Oncol. 12: 1193-1203). Výhodné sú viacnásobné podávania, vo všeobecnosti v týždenných intervaloch, tzn. oddelené 4 až 24 týždňami, výhodne 12 až 20 týždňami. Priemerný odborník v oblasti však môže zvoliť rozdelenie podávania na dve alebo viacero aplikácií, ktoré môžu byť aplikované krátko jedna po druhej, alebo v určitých iných vopred určených intervaloch v rozsahu napr. 1 deň až 1 týždeň.

Okrem toho bude aplikovaná dávka rádioaktivity v súlade s návodom načrtnutým nižšie. Vo všeobecnosti, dávka rádioaktivity na podanie bude medzi 30 a 75 mCi/m² telesnej povrchovej oblasti (BSA). Takže množstvo rádioaktívne značenej protilátky vo farmaceutickom prostriedku podľa vynálezu, výhodne značenej so ¹⁸⁶rénium, ¹⁸⁸rénium, ^{99m}technéciom, ¹³¹jódod alebo ⁹⁰ytriom, najvýhodnejšie značenej so ¹⁸⁶rénium, na aplikáciu pacientovi, je 10, 20, 30, 40, 50 alebo 60 mCi/m², výhodne 50 mCi/m². Vo výhodnom uskutočnení sa vynález týka farmaceutického prostriedku, kde dávka uvedenej rádioaktívne značenej protilátky podľa vynálezu je MTD, výhodne 50 mCi/m². Toto je rozsiahle ilustrované v klinických štúdiách, ako sú uvedené v príkladoch 3 až 6.

Výhodný je aj farmaceutický prostriedok podľa vynálezu, ktorý obsahuje protilátkový proteín konjugovaný s rádioizotopom podľa vynálezu, ako je definovaný vyššie, kde protilátkový proteín má špecifickú aktivitu od približne 0,5 do približne 15 mCi/mg, alebo od približne 0,5 do približne 14 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 10 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 5 mCi/mg a najvýhodnejšie 2 až 6 mCi/mg alebo 1 až 3 mCi/mg.

Výhodný je aj farmaceutický prostriedok podľa vynálezu, ktorý obsahuje protilátkový proteín konjugovaný s rádioizotopom podľa vynálezu ako je definovaný vyššie, kde uvedenou protilátkou alebo protilátkovým derivátom je vodný roztok s pH od približne 7 do približne 8, a v koncentrácii od približne 0,5 do približne 2,0 mg/ml.

Výhodným uskutočnením je farmaceutický prostriedok podľa vynálezu, ktorý ďalej obsahuje jeden alebo viacero látok chrániacich pred rádioaktivitou, ktoré sú

vybrané zo skupiny obsahujúcej kyselinu askorbovú, kyselinu gentizovú, kyselinu reduktovú, kyselinu erytrorbovú, kyselinu *p*-aminobenzoovú, kyselinu 4-hydroxybenzoovú, kyselinu nikotínovú, nikotínamid, kyselinu 2,5-dihydroxy-1,4-benzén-disulfónovú, povidón, inozitol a/alebo citrát.

Výhodným je farmaceutický prostriedok podľa vynálezu, kde látkou chrániacou proti rádioaktivitě je kyselina askorbová.

Iným výhodným uskutočnením je farmaceutický prostriedok podľa vynálezu, kde protilátkový proteín obsahuje protilátkovú molekulu vybranú zo skupiny, ktorá zahŕňa protilátkové molekuly BIWA4 alebo BIWA8, ako sú opísané vyššie, spojené so ¹⁸⁶rénium prostredníctvom MAG-2 GABA, pričom obsahujú aj kyselinu askorbovú ako látku chrániacu pred rádioaktivitou.

Iným výhodným uskutočnením predloženého vynálezu je použitie protilátkového proteínu podľa vynálezu na výrobu lieku na liečenie rakoviny. Vo výhodnom uskutočnení sa predložený vynález týka použitia protilátkových proteínov podľa vynálezu konjugovaných s terapeutickou látkou, ako je opísané vyššie, na liečenie rakoviny. Rakovina zahŕňa akékoľvek ochorenie spojené s malígnym rastom, ako napríklad tuhé nádory, sarkómy a leukémie. Nevyhnutnou podmienkou pre tieto ochorenia je expresia CD44v6. Rakoviny podľa vynálezu zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na:

- 1) Liečenie epiteliálnych karcinómov prsníkového, pľúcneho, kolorektálneho, hlavového a krčného, pankreatického, vaječníkového, močového, žalúdočného, kožného, endometriálneho, vaječníkového, semenníkového, ezofagiálneho, prostatického a obličkového pôvodu;
- 2) Sarkómy kostí a mäkkých tkanív: osteosarkóm, chondrosarkóm, fibrosarkóm, malígny fibrózny histocytóm (MFH), leiomyosarkóm;
- 3) Hematopoetické malignity: Hodgkinov a iný ako Hodgkinov lymfóm, leukémie;
- 4) Neuroektodermálne nádory: periférne nervové nádory, astrocytómy, melanómy;
- 5) Mezoteliómy.

Príklady rakovinových chorobných stavov spojených s tuhými nádormi zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na: kolorektálnu rakovinu, rakovinu iných ako malých buniek pľúc, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov,

rakovinu pľúc, rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastazujúce rakoviny mozgu.

Takže výhodným uskutočnením je použitie protilátkového proteínu podľa vynálezu, kde rakovina je vybraná zo skupiny, ktorá obsahuje kolorektálnu rakovinu, rakovinu iných ako malých buniek pľúc, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov, rakovinu pľúc, rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastatizujúce rakoviny mozgu.

Výhodné je aj použitie protilátkového proteínu podľa vynálezu, ako je definovaný vyššie, na výrobu lieku na liečenie rakoviny, kde množstvo protilátkového proteínu na aplikáciu je medzi 0,1 a 100 mg/m², výhodne medzi 5 a 50 mg/m² na aplikáciu, výhodne 10 mg/m² až približne 40 mg/m², výhodne 10 mg/m² až približne 30 mg/m², aj výhodne 20 mg/m² až približne 30 mg/m², a najvýhodnejšie približne 25 mg/m² povrchovej oblasti tela. Najvýhodnejšia dávka protilátkového proteínu je aj približne 50 mg/m² telesnej povrchovej oblasti.

Výhodné je aj použitie protilátkového proteínu konjugovaného s rádioizotopom podľa vynálezu, ako je definovaný vyššie, na výrobu lieku na liečenie rakoviny, kde dávka rádioaktivity na podanie je medzi 30 a 75 mCi/m² telesnej povrchovej oblasti (BSA). Výhodné je použitie protilátkového proteínu konjugovaného s rádioizotopom podľa vynálezu, ako je definovaný vyššie, na výrobu lieku na liečenie rakoviny, kde protilátkový proteín podľa vynálezu je rádioaktívne značený so ¹⁸⁶rénom, ¹⁸⁸rénom, ^{99m}technéciom, ¹³¹jódom alebo ⁹⁰ytriom, najvýhodnejšie značenej so ¹⁸⁶rénom. V ešte inom výhodnom uskutočnení sa vynález týka použitia protilátkového proteínu konjugovaného z rádioizotopom podľa vynálezu, ako je definovaný vyššie, na výrobu liečiva na liečenie rakoviny, kde protilátková dávka je 10, 20, 30, 40, 50 alebo 60 mCi/m², najvýhodnejšie 50 mCi/m². Toto je rozsiahle ilustrované v klinických štúdiách, ako sú uvedené v príkladoch 3 až 6.

Výhodné je aj použitie protilátkového proteínu konjugovaného s rádioizotopom podľa vynálezu, ako je definovaný vyššie, na výrobu lieku na liečenie rakoviny, kde protilátkový proteín má špecifickú aktivitu od približne 0,5 do približne 15 mCi/mg, alebo od približne 0,5 do približne 14 mCi/mg, výhodne približne 1 až

približne 10 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 5 mCi/mg a najvýhodnejšie 2 až 6 mCi/mg alebo 1 až 3 mCi/mg.

Výhodné je aj použitie protilátkového proteínu konjugovaného s rádioizotopom podľa vynálezu ako je definovaný vyššie, na výrobu lieku na liečenie rakoviny, kde uvedenou protilátkou alebo protilátkovým derivátom je vodný roztok s pH od približne 7 do približne 8, a v koncentrácii od približne 0,5 do približne 2,0 mg/ml.

Vynález sa ďalej týka spôsobu liečenia rakoviny, kde protilátkový proteín podľa vynálezu sa podáva raz až niekoľkokrát jedincovi, ktorý to potrebuje, pričom tento protilátkový proteín sa selektívne viaže na CD44v6, ničí nádorové bunky prostredníctvom terapeutickej látky spojenej s protilátkovým proteínom a monitoruje sa terapeutická úspešnosť. Uvedený protilátkový proteín môže byť prítomný ako nahý/nemodifikovaný protilátkový proteín, modifikovaný protilátkový proteín, ako napr. fúzovaný proteín, alebo protilátkový proteín konjugovaný s terapeutickou látkou, ktoré zahŕňa kontaktovanie nádoru s účinným množstvom protilátok. Spôsob liečenia nádorov, ako je opísaný vyššie, môže byť účinný *in vitro* alebo *in vivo*. Rakovinou môže byť akákoľvek rakovina, ako je opísaná vyššie.

Aplikované množstvo protilátky závisí na povahe ochorenia. U pacientov s rakovinou môže byť aplikovaná dávka „nahej“ protilátky medzi 0,1 a 100 mg/m², výhodne medzi 5 a 50 mg/m² na aplikáciu, výhodne 10 mg/m² až približne 40 mg/m², výhodne 10 mg/m² až približne 30 mg/m², aj výhodne 20 mg/m² až približne 30 mg/m², a najvýhodnejšie približne 25 mg/m² povrchovej oblasti tela. Najvýhodnejšia dávka protilátkového proteínu je aj približne 50 mg/m² telesnej povrchovej oblasti.

Dávka rádioaktivity aplikovaná pacientovi pri jednom podaní musí byť dostatočne vysoká na to, aby bola účinná, ale musí byť nižšia ako dávka limitovaná toxicitou (DLT). Pre rádioaktívne značené protilátky, napr. so ¹⁸⁶rénom, musí byť určená maximálne tolerovaná dávka (MTD), ktorá nesmie byť prekročená pri terapeutických nastaveniach. Aplikácie rádioaktívne značenej protilátky pacientom s rakovinou sa potom môžu uskutočňovať opakovanou (mesačne alebo týždenne) intravenóznou infúziou dávky, ktorá je nižšia ako MTD (pozri napr. Welt a ďalší (1994) J. Clin. Oncol. 12: 1193-1203). Výhodné sú viacnásobné podávania, vo

všeobecnosti v týždenných intervaloch, tzn. oddelené 4 až 24 týždňami, výhodne 12 až 20 týždňami. Priemerný odborník v oblasti však môže zvoliť rozdelenie podávania na dve alebo viacero aplikácií, ktoré môžu byť aplikované krátko jedna po druhej, alebo v určitých iných vopred určených intervaloch v rozsahu napr. 1 deň až 1 týždeň.

Okrem toho bude aplikovaná dávka rádioaktivity v súlade s návodom načrtnutým nižšie. Vo všeobecnosti, dávka rádioaktivity na podanie bude medzi 30 a 75 mCi/m² telesnej povrchovej oblasti (BSA). Takže množstvo rádioaktívne značenej protilátky, výhodne značenej so ¹⁸⁶rénium, ¹⁸⁸rénium, ^{99m}technécium, ¹³¹jódom alebo ⁹⁰ytriom, najvýhodnejšie značenej so ¹⁸⁶rénium, na aplikáciu pacientovi, je 10, 20, 30, 40, 50 alebo 60 mCi/m², výhodne 50 mCi/m². Vo výhodnom uskutočnení sa vynález týka spôsobu liečenia, kde sa rádioaktívne značená protilátka, ako je opísaná vyššie, podáva pacientovi trpiacemu rakovinou, kde dávka uvedenej rádioaktívne značenej protilátky podľa vynálezu je MTD, výhodne 50 mCi/m², pričom rakovine sa predchádza alebo sa ňou rakovina lieči. Toto je rozsiahle ilustrované v klinických štúdiách, ako sú uvedené v príkladoch 3 až 6.

Výhodný je aj spôsob liečenia rakoviny podľa vynálezu (pozri vyššie), kde protilátkový proteín, konjugovaný s rádioizotopom podľa vynálezu ako je definovaný vyššie, má špecifickú aktivitu od približne 0,5 do približne 15 mCi/mg alebo od približne 0,5 do približne 14 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 10 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 5 mCi/mg a najvýhodnejšie 2 až 6 mCi/mg alebo 1 až 3 mCi/mg.

Výhodný je aj spôsob liečenia rakoviny podľa vynálezu (pozri vyššie), kde protilátkový proteín, konjugovaný s rádioizotopom podľa vynálezu ako je definovaný vyššie, je vo vodnom roztoku s pH od približne 7 do približne 8 a v koncentrácii od približne 0,5 do približne 2,0 mg/ml.

Výhodne sa vynález týka spôsobu podľa vynálezu, kde nádorom je nádor vybraný zo skupiny rakovín obsahujúcej rakoviny hrubého čreva, rakoviny iných ako malých pľúcnych buniek, rakoviny prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakoviny vaječníkov, rakoviny pľúc, rakoviny močového mechúra, rakoviny pankreasu a metastazujúce rakoviny mozgu.

Ďalším predmetom predloženého vynálezu je nukleová kyselina, charakteristická tým, že kóduje protilátkový proteín podľa vynálezu. Takouto nukleovou kyselinou môže byť RNA alebo výhodne DNA. Uvedená DNA molekula môže byť chemicky syntetizovaná. Najprv sa môžu syntetizovať vhodné oligonukleotidy spôsobmi známymi v oblasti (napr. Gait, M.J., 1987, Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach. IRL Press, Oxford, UK), ktoré sa môžu použiť na výrobu syntetického génu. Spôsoby na generovanie syntetických génov sú v oblasti známe (napr. Stemmer a ďalší, 1995, Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides, *Gene* 164(1): 49-53; Ye a ďalší, 1992, Gene synthesis and expression in *E. coli* for pump, a human matrix metalloproteinase, *Biochem Biophys Res Commun* 186(1): 143-9; Hayden a d'Mandecki 1988, Gene synthesis by serial cloning of oligonucleotides, *DNA* 7(8): 571-7). Tieto spôsoby môžu byť použité na syntézu akejkoľvek DNA molekuly opísanej v predloženej prihláške, napr. DNA kódujúcej BIWA4.

Výhodne je nukleová kyselina podľa vynálezu charakteristická aj tým, že obsahuje 5' alebo 3' alebo 5' a 3' netranslatované oblasti. Nukleová kyselina podľa vynálezu môže obsahovať iné netranslatované oblasti upstream a/alebo downstream. Netranslatovaná oblasť môže obsahovať regulačný element, ako napr. transkripčnú iniciačnú jednotku (promótor) alebo zosilňovač. Uvedený promótor môže byť napríklad konštitutívny, inducibilný alebo vývojovo riadený promótor. Výhodne, bez toho, aby boli vylúčené iné známe promótory, konštitutívne promótory ľudského cytomegalovírusu (CMV) a Rous sarkómového vírusu (RVS), ako aj opičieho vírusu 40 (SV40) a Herpes simplex promótor. Inducibilné promótory podľa vynálezu zahŕňajú promótory antibiotikovej rezistencie, tepelné šokové promótory, hormónom indukovateľný „prsníkový nádorový vírusový promótor“ a metalotioneínový promótor. Výhodne je nukleová kyselina podľa vynálezu charakteristická aj tým, že kóduje fragment protilátkového proteínu podľa vynálezu. Tento označuje časť polypeptidu podľa vynálezu.

Výhodne je nukleová kyselina podľa vynálezu nukleová kyselina ako je uvedená v sekv. č. 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15 a/alebo 16. Najvýhodnejšie je uvedenou nukleovou kyselinou nukleová kyselina so sekv. č. 16.

Iným dôležitým predmetom predloženého vynálezu je rekombinantný DNA vektor charakteristický tým, že obsahuje nukleovú kyselinu podľa vynálezu. Výhodne uvedený vektor obsahuje nukleovú kyselinu ako je charakterizovaná v sekv. č. 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15 a/alebo 16. Najvýhodnejšie uvedený vektor obsahuje nukleovú kyselinu charakterizovanú v sekv. č. 16.

Príkladmi sú vírusové vektory, ako napr. Vaccinia, Semliki-Forest vírus a adenovírus. Vektory na použitie v COS bunkách majú SV40 počiatok replikácie a umožňujú dosiahnuť vysoký počet kópií plazmidov. Vektory na použitie v hmyzích bunkách sú napríklad *E. coli* transfer vektory a obsahujú napr. DNA kódujúcu polyhedrín ako promótor.

Iným výhodným predmetom predloženého vynálezu je rekombinantný DNA vektor podľa vynálezu, charakteristický tým, že je expresným vektorom.

Iným výhodným predmetom predloženého vynálezu je rekombinantný DNA vektor podľa vynálezu charakteristický tým, že je to vektor pAD-CMV alebo jeho funkčný derivát. Takýmito funkčnými derivátmi sú napr. pAD-CMV1, pAD-CMV19 alebo pAD-CMV25.

Iným výhodným predmetom podľa predloženého vynálezu je rekombinantný DNA vektor podľa vynálezu charakteristický tým, že je to sekv. č. 17 alebo jej funkčný derivát.

Iným výhodným predmetom podľa predloženého vynálezu je rekombinantný DNA vektor podľa vynálezu charakteristický tým, že je to sekv. č. 17 alebo jej funkčný derivát.

Výhodne uvedené vektory obsahujú aj jednu alebo niekoľko nukleokyselinových molekúl ako sú charakterizované v sekv. č. 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15 a/alebo 16.

Výhodný je aj vektor ako je opísaný v US 5648267 A alebo US 5733779 A obsahujúci nukleotidovú sekvenciu podľa vynálezu. Výhodne uvedený vektor obsahuje aj jednu alebo niekoľko nukleokyselinových molekúl ako sú charakterizované v sekv. č. 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15 a/alebo 16. Iným výhodným predmetom predloženého vynálezu je rekombinantný DNA vektor podľa vynálezu charakteristický tým, že je ním N5KG1Val alebo jeho derivát.

Iným dôležitým predmetom je hositeľ charakteristický tým, že obsahuje vektor podľa vynálezu.

Iný dôležitým predmetom je hositeľ podľa vynálezu charakteristický tým, že je ním eukaryotická hositeľská bunka. Eukaryotické hositeľské bunky podľa vynálezu zahŕňajú huby, ako napríklad *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Trichoderma*, hmyzie bunky (napr. zo *Spodoptera frugiperda* Sf-9, s bakulovírusovým expresným systémom), rastlinné bunky, napr. z *Nicotiana tabacum*, cicavčie bunky, napr. COS bunky, BHK, CHO alebo myelómové bunky.

V potomkoch buniek imunitného systému, v ktorých sa v našom tele vytvárajú protilátkové proteíny, sa protilátkové proteíny podľa vynálezu výnimočne dobre skladajú a glykozyľujú. Cicavčie hositeľské bunky, výhodne CHO alebo COS bunky, sú výhodné, napr. CHO DG44 (Urlaub a Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77(7): 4216-20 (1980)) alebo CHO-K1 (ATCC CCL-61) bunky. Takže iným výhodným predmetom je hositeľ podľa vynálezu charakteristický tým, že je ním BHK, CHO alebo COS bunka, najvýhodnejšie CHO DG44 alebo CHO-K1 (ATCC CCL-61) bunky.

Iným výhodným predmetom je hositeľ podľa vynálezu charakteristický tým, že je ním bakteriofág.

Iným výhodným predmetom je hositeľ podľa vynálezu charakteristický tým, že je ním prokaryotická hositeľská bunka. Príkladmi prokaryotických hositeľských buniek sú *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* alebo *Proteus mirabilis*.

Vynález sa ďalej týka spôsobu prípravy protilátkového proteínu podľa vynálezu, ktorý zahŕňa nasledujúce kroky: hositeľ podľa vynálezu sa kultivuje v podmienkach, v ktorých uvedená hositeľská bunka exprimuje protilátkový proteín, a protilátkový proteín sa izoluje. Protilátka podľa vynálezu môže byť produkovaná nasledovne. Nukleokyselinové molekuly kódujúce ľahký reťazec a ťažký reťazec sa môžu syntetizovať chemicky a enzymaticky, štandardnými metódami. Najprv sa môžu syntetizovať vhodné oligonukleotidy metódami známymi v oblasti (podrobnosti vyššie). Spôsoby na generovanie syntetických génov z oligonukleotidov sú v oblasti známe (podrobnosti vyššie). Tieto nukleokyselinové molekuly kódujúce protilátkové ťažké a ľahké reťazce môžu byť klonované do expresného vektora (buď oba reťazce do jednej vektorovej molekuly, alebo každý reťazec do oddelenej vektorovej

molekuly), ktorý sa potom zavádza do hostiteľskej bunky. Hostiteľskou bunkou je výhodne cicavčia hostiteľská bunka (podrobnosti vyššie), napr. COS, CHO alebo BHK bunka, výhodnejšie vaječníková bunka čínskeho škrečka (CHO). Hostiteľská bunka sa potom kultivuje vo vhodnom kultivačnom médiu v podmienkach, pri ktorých sa produkuje protilátka, a protilátka sa potom izoluje z kultúry v súlade so štandardnými postupmi. Postupy na produkciu protilátok z rekombinantnej DNA v hostiteľských bunkách a príslušné expresné vektory sú v oblasti dobre známe (pozri napr. WO 94/11523, WO 97/9351, EP 0481790).

Vynález sa výhodne týka spôsobu podľa vynálezu, v ktorom je hostiteľom cicavčia bunka, výhodne CHO alebo COS bunka.

Vynález sa výhodne týka spôsobu podľa vynálezu, v ktorom je hostiteľská bunka kotransfekovaná s dvoma plazmidmi, ktoré nesú expresné jednoty pre ľahký alebo pre ťažký reťazec.

Nasledujúce príklady slúžia na podrobnejšiu ilustráciu predloženého vynálezu, ale nemali by byť interpretované ako obmedzujúce tu opísaný rozsah vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

(pozri aj príklad 1)

Obrázok 1: Hodnotenie relatívnych väzobných afínít testovaných v kompetitívnej bunkovej ELISA. IC_{50} : koncentrácie cMAb a hMAbs, pri ktorých je viazanie sa mMAb BIWA 1 na pripojené A431 bunky redukované o 50 %. Uvedené sú IC_{50} hodnoty vo vzťahu k BIWA 2.

Obrázok 2: Biologické distribúcie spoločne injektovaných ^{125}I - a ^{131}I -značených CD44v6-špecifických Mabs (10 μCi , 50 μg) v HNX-OE myšiach nesúcich cudzí štep, na 3. alebo 4. deň p.i. Tri skupiny myší dostali buď (A) ^{131}I -U36 (čierne stĺpce) a ^{125}I -BIWA1 (čiarkované stĺpce) (n=5), alebo (B) ^{131}I -BIWA 4 (čierne stĺpce) a ^{125}I -BIWA2 (čiarkované stĺpce) (n=6), alebo (C) ^{131}I -BIWA 4 (čierne stĺpce) a ^{125}I -BIWA 8 (čiarkované stĺpce) (n=6). 3 (A) alebo 4 dni (B,C) po injekcii sa myšiam odobrala krv, usmrtili sa, vypitvali sa a stanovili sa hladiny rádioaktivity (%ID/g $\pm$ s.e.m) nádoru, krvi a niekoľkých orgánov (Bld: krv, Tum: nádor, Liv: pečeň, Spl:

slezina, Kid: obličky, Hrt: srdce, Stm: žalúdok, Ilm: tenké črevo, Cln: hrubé črevo, Blr: močový mechúr, Str: hrudná kosť, Msc: sval, Lng: pľúca, Skn: koža, Tng: jazyk).

Obrázok 3: Terapeutická účinnosť ^{186}Re -značených CD44v6-špecifických Mabs v HNX-OE nahých myšiach nesúcich xenoštep. Myši dostali 300 μCi ^{186}Re -U36 (- Δ -, obrázok A), 300 μCi ^{186}Re -BIWA 1 (- $\blacksquare$ -, obrázok A), 300 μCi ^{186}Re -BIWA4 (- $\square$ -, obrázok B), 300 μCi ^{186}Re -BIWA 2 (- $\blacktriangle$ -, obrázok B), 400 μCi ^{186}Re -BIWA 4 (- $\diamond$ -, obrázok C), 400 μCi ^{186}Re -BIWA 8 (- $\blacktriangle$ -, obrázok C) alebo fyziologický roztok (- $\circ$ -, obrázky A, B, C) ako kontrolu. Kontrolné skupiny na obrázkoch A a B sú rovnaké. Veľkosť nádoru je vyjadrená ako priemerný objem nádoru ($\pm$ s.e.m) počas liečenia vo vzťahu k priemernému objemu na začiatku terapie.

Obrázok 4: Vzťah medzi podávanou MAb dávkou a AUC pozorovaným po BIWA 4 intravenózne infúzii 10 pacientom v časti A štúdie.

Obrázok 5: Vzťah medzi podávanou MAb dávkou a maximálnou plazmatickou BIWA 4 koncentráciou pozorovanou po BIWA 4 intravenózne infúzii 10 pacientom v časti A štúdie.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Rádioimunoterapia

Materiály a metódy

Monoklonálne protilátky

mMAb BIWA 1 = VFF 18 (ktorá je vylučovaná hybridómovou bunkovou líniou, ktorá bola uložená 7. júna 1994 pod poradovým číslom DSM ACC2174 v SDM-Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Nemecko, pozri aj WO 95/33771) sa generovala imunizáciou BALB/c myši s glutatión S-transferázovým fúzaným proteínom obsahujúcim ľudské CD44 domény v3-v10 (Heider a ďalší, 1996). Epitop rozoznávaný s BIWA1 bol mapovaný na aminokyseliny 360-370 v doméne v6 CD44

(číslovanie podľa Kugelmana a ďalších (1992)). Vzorka používaná na predmetné štúdie sa získala po purifikácii na proteín-G-Sepharose a dialýze oproti PBS.

MAb U36 (IgG1) sa izolovala po imunizácii myší s HNSCC bunkovou líniou UM-SCC-22B a rozoznávala odlišný epitop vo vnútri CD44v6 ako BIWA 1. U36 sa purifikovala z koncentrovaného tkanivového kultivačného supernatantu afinitnou chromatografiou na proteín-A-Sepharose a ďalej sa purifikovala na Q-Sepharose.

Generovanie chimérnych a humanizovaných Mabs

mRNA sa izolovala z BIWA 1 hybridómovej bunkovej línie použitím QuickPrep mRNA purifikačného kitu (Pharmacia, Uppsala, Švédsko). cDNA z variabilného ťažkého (V_H) a variabilného ľahkého (V_L) reťazca sa generovala prostredníctvom RT-PCR.

Fragmenty sa klonovali do TA klonovacieho vektora pCR II (Invitrogen, Groningen, Holandsko) a sekvenovali sa. Skonstruovali sa dva expresné vektory odvodené od plazmidu pAD CMV1 (Himmler a ďalší, 1990) nesúce konštantnú oblasť ľudského gama-1, respektíve konštantnú oblasť ľudského kappa ľahkého reťazca. Následne sa V_H a V_L fragmenty BIWA 1 klonovali do zodpovedajúcich expresných vektorov pred konštantné oblasti. Chimérna protilátka sa označila ako cMAb BIWA 2. Humanizované verzie BIWA 1 ťažkých a ľahkých reťazcových variabilných oblastí (generované CDR zaštepovaním) sa klonovali pred imunoglobulínové konštantné oblasti vyššie uvedených expresných vektorov. Na konštrukciu humanizovaných protilátok sa použili ľudské variabilné oblasti odvodené z ťažkého reťazca z ľudského imunoglobulínového fragmentu s prístupovým číslom S31669 databanky GenPept a pre ľahký reťazec z ľudského imunoglobulínu HUMIGKAX (preskupený anti-myelínový kappa reťazec), Genbank prístupové číslo M29469. Výsledné Mabs sa označili hMAb BIWA 4, respektíve BIWA 8. BIWA 8 obsahovala dve aminokyseliny myšacej rodičovskej protilátky v kostre 2 ľahkého reťazca, zatiaľ čo BIWA 4 neobsahovala myšacie zvyšky v kostre.

Rekombinantné Mabs sa stabilne expimovali v dihydrofolát reduktázových deficientných vaječkových bunkách čínskeho škrečka prostredníctvom elektroporácie s expresnými plazmidmi obsahujúcimi ľahký a ťažký reťazec. Bunky sa vysiali na 96-jamkové mikrotitračné platne s hustotou 500 a 100 buniek na jamku

v selekčnom médiu (α -MEM s 10% dialyzovaným fetálnym teľacím sérom). Keď začali byť kolónie viditeľné (po približne 14 dňoch), testovali sa kultivačné supernatanty na ich IgG obsah prostredníctvom ELISA, a najlepší producenti sa expandovali. Génová amplifikácia sa uskutočňovala kultiváciou v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií metotrexátu (20 až 500 nM).

Produkcia chimérnych a humanizovaných MAb v laboratórnom meradle sa uskutočňovala v štandardnom kultivačnom médiu obsahujúcom 1% fetálne teľacie sérum. IgG frakcie sa purifikovali z tkanivových kultivačných supernatantov afinitnou chromatografiou na proteín A sepharose. Čistota sa testovala prostredníctvom SDS-PAGE a vysoko výkonnej veľkostnej vylučovacej chromatografie.

Hodnotenie protilátkovej afinity

Meranie kinetických a afinitných konštánt použitím rekombinantného antigénu sa uskutočňovalo na BIAcore 2000 systéme (BIAcore AB, Uppsala, Švédsko). Glutatión-S-transferázový fúzaný proteín obsahujúci domény v3-v10 ľudského CD44 (GST/CD44v3-v10; 20 μ g/ml) sa imobilizoval na CM5 senzorickom čipe prostredníctvom amínovej párovacej metódy v súlade s inštrukciami výrobcu, použitím 10mM octanu sodného pH 5,0 ako párovacieho tlmivého roztoku. 35 μ l MAb v rôznych koncentráciách (8 až 67 nM) v HBS (10mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,05% BIAcore povrchovo aktívna látka P20) sa injektovalo na antigénom pokrytý povrch s prietokovou rýchlosťou 5 μ l/min. Disociácia MAb sa hodnotila 5 minút v pretekajúcom tlmivom roztoku (HBS). Medzi dvoma analýzami sa povrch čipu regeneroval s jedným pulzom 15 μ l 30mM HCl. Analýza údajov a výpočet kinetických konštánt sa uskutočňovali s BIAcore-ovým BIAevaluation softwarom verzia 2.1. Pre všetky protilátky sa hodnotili asociačné rýchlosti (k_a), disociačné rýchlosti (k_d) a disociačné konštanty (K_d).

Hodnotili sa aj relatívne väzobné afinity prostredníctvom kompetitívnej bunkovej ELISA. Ľudské A431 bunky pochádzajúce z epidermoidného karcinómu vulvy, o ktorých je známe, že exprimujú vysoké hladiny CD44v6, sa vysiali na 96-jamkové tkanivové platne v 200 μ l na jamku RPMI 1640 s 10% fetálnym teľacím sérom v hustote 2,5 až 5×10^5 buniek/ml. Platne sa inkubovali cez noc pri 37 °C vo

zvlhčenom inkubátore s 5% CO₂ vo vzduchu. Po odstránení média sa bunky raz premyli s PBS, fixovali sa s 96% etanolom 1 minútu a znova sa premyli s PBS. cMAb BIWA 2, hMAb BIWA 4 a hMAb BIWA 8 (vopred nariedené na 10 µg/ml) sa aplikovali v 1:2 seriálnych riedeniach (8 krokov) v 100 µl/jamku v PBS/0,5% BSA/0,05% Tween 20 (testovací tlmivý roztok) a platne sa inkubovali 2 hodiny pri laboratórnej teplote na kruhovej trepačke. Kontrolné vzorky obsahovali len vopred nariedené vzorky, bez BIWA 1 (0% kontrola), alebo len BIWA 1, bez akejkoľvek konkurujúcej protilátky (100% kontrola). Po trojnásobnom premytí s PBS/0,05% Tween 20 (premývací tlmivý roztok) sa pridalo 100 µl sekundárnej protilátky (kozia anti-myšacia Fc konjugovaná s peroxidázou, nariedená na 1:15000 v testovacom tlmivom roztoku, DAKO Copenhagen, Dánsko) na detekciu mMAb BIWA 1 a platne sa inkubovali 1 hodinu pri laboratórnej teplote na kruhovej trepačke. Po trojnásobnom premytí s premývacím tlmivým roztokom sa platne vyvinuli so 100 µl/jamku tetrametylbendidínového substrátového roztoku (Kierkegaard a Perry Laboratories, Gaithersburg, USA). Reakcia sa zastavila po 15 minútach s 50 µl/jamku 1M kyseliny fosforečnej. Absorbancia sa merala na odčítavači ELISA platní pri 450 nm (referencia 610-690 nm).

Rádiojodizácia protilátok

Jodizácia MAbs sa uskutočňovala v podstate ako je opísané v Haisma a ďalší (1986) použitím buď ¹²⁵I (100 mCi/ml) alebo ¹³¹I (200 mCi/ml), ktoré boli oba kúpené od Amersham, Aylesbury, Anglicko. Jeden mg MAb IgG sa rozpustil v 500 µl PBS, pH = 7,4, a 1 mCi ¹²⁵I alebo ¹³¹I sa zmiešali v liekovke potiahnutej so 75 µg Iodogen-u (Pierce, Oud Bijerland, Holandsko). Po 5 minútach inkubovania pri laboratórnej teplote sa voľný jód odstránil gélovou filtráciou na PD10 kolóne (Pharmacia-LKB, Woerden, Holandsko). Po odstránení nenaviazaného ¹²⁵I alebo ¹³¹I, rádiochemická čistota vždy dosiahla 97 %, ako sa determinovalo prostredníctvom TLC a HPLC postupov, ktoré už boli opísané (Van Gog a ďalší, 197a). Nevytvárali sa žiadne agregáty ani fragmenty, ako bolo stanovované prostredníctvom HPLC analýzy.

Príprava MAbs značených ^{186}Re niom

^{186}Re niom značené MAbs sa pripravili multikrokovým postupom použitím chelátového S-benzoylmerkaptotriglycínu (S-benzoyl-MAG3), ako už bolo opísané (Van Gog a ďalší, 1997a). Pri tomto postupe po syntéze na tuhej fáze na prípravu ^{186}Re -MAG3 nasleduje esterifikácia s 2,3,5,6-tetrafluórénolom (TFP) a konjugácia reaktívneho ^{186}Re -MAG3-TFP esteru s MAb. Po konjugácii sa ^{186}Re -značená MAb purifikovala na PD10 kolóne. Po odstránení nenaviazaného ^{186}Re rádiochemická čistota vždy presahovala 98 %.

Väzobný test pre rádioaktívne značené protilátky

In vitro väzobné charakteristiky značených MAbs používaných v biodistribučných a terapeutických štúdiách sa determinovali v imunoreaktívnom teste, v podstate ako už bolo opísané (Van Gog a ďalší, 1997a). Na testovanie viazania jodizovaných alebo ^{186}Re -značených MAbs sa použili UM-SCC-11B bunky fixované v 0,1% glutaraldehyde. UM-SCC-11B bunky láskavo poskytol Dr. T. E. Carey, University of Michigan, Ann Arbor, MI. Pripravilo sa päť seriálnych riedení (v rozsahu od 5×10^6 buniek na skúmavku do $3,1 \times 10^5$ buniek na skúmavku) s 1% BSA v PBS. Nadbytok neoznačeného MAb IgG sa pridal do druhej skúmavky s najnižšou koncentráciou buniek, aby sa určilo nešpecifické viazanie. Do každej skúmavky sa pridal IgG značený s 10 000 cpm ^{125}I , ^{131}I alebo ^{186}Re a vzorky sa inkubovali cez noc pri 4 °C. Bunky sa scentrifugovali, merala sa rádioaktivita v pelete a supernatante na gama snímači (LKB-Wallace 1282 CompuGamma, Kabi Pharmacia, Woerden, Holandsko) a vypočítalo sa percento naviazanej a voľnej rádioaktivity. Údaje sa graficky analyzovali v modifikovanom Lineweaver Burk grafe a imunoreaktivita sa determinovala prostredníctvom lineárnej extrapolácie na podmienky predstavujúce neobmedzený nadbytok antigénu.

Biodistribučné štúdie na nahých myšiach nesúcich HNSCC

Na biodistribučné experimenty sa použili nahé myši nesúce subkutánne implantované ľudské HNSCC xenoštep (HNX-OE), ako už bolo opísané (Van Gog a ďalší, 1997a). Samičky myší (Hsd: beztýmusové nu/nu, 25-32 g, Harlan CPB, Zeist, Holandsko) mali v čase experimentov 8 až 10 týždňov. Tri biodistribučné

experimenty sa uskutočňovali s myšami nesúcimi 1 alebo 2 nádory v rozsahu 30 až 470 mm³. V prvom experimente sa 10 µCi (50 µg) ¹³¹I-značenej mMAb U36 injektovalo naraz s 10 µCi (50 µg) ¹²⁵I-značenej mMAb BIWA 1 myšiam nesúcim nádory s veľkosťou 133 ± 28 mm³ (n=20 myši, 37 nádorov). V druhom experimente sa 10 µCi (50 µg) ¹³¹I-značenej hMAb BIWA 4 a 10 µCi (50 µg) ¹²⁵I-značenej cMAb BIWA2 spolu injektovalo myšiam nesúcim nádory s veľkosťou 167 ± 31 mm³ (n=21 myši, 32 nádorov). V treťom experimente sa 10 µCi (50 µg) ¹³¹I-značenej hMAb BIWA 4 a 10 µCi (50 µg) ¹²⁵I-značenej hMAb BIWA 8 sa spoločne injektovalo myšiam s nádormi s veľkosťou 130 ± 21 mm³ (n=23 myši, 40 nádorov). Konjugáty sa intravenózne (i.v.) injektovali v objeme 100 µl po nariedení v 0,9% NaCl. Na získanie porovnateľného odstraňovania spoločne injektovaných MAb z krvi/tela sa kombinovali len MAb s identickým myšacím alebo ľudským izotypom. Protilátková dávka (celková dávka 100 µg na myš) sa zvolila dostatočne vysoká, aby sa zabránilo rýchlej izotypovej eliminácie MAb z krvi (Sharkey a ďalší, 1991, Van Gog a ďalší, 1997b), a dostatočne nízka, aby sa predišlo saturácii antigénu v nádore.

V označených časových bodoch po injekcii sa myši anestetizovali, odobrala sa im krv, usmrtili sa a vypitvali sa. Okrem nádorov sa vybrali nasledujúce orgány: pečeň, slezina, obličky, srdce, žalúdok, tenké črevo, hrubé črevo, močový mechúr, hrudná kosť, sval, pľúca, koža a jazyk. Po zvážení sa rádioaktivita v nádoroch, krvi a orgánoch odčítala v duálnom izotopovom gama snímači (LKB-Wallace 1282 CompuGamma) s automatickou korekciou pre ¹³¹I-komptony v ¹²⁵I oknovom nastavení. Príjem rádioaktivity do týchto tkanív sa vypočítal ako percento injektovanej dávky na gram tkaniva (% ID/g).

Až do dňa podávania MAb sa myši rutinne chovali v špecifických bezpatogénnych podmienkach, v sterilných klietkach v čistej miestnosti s riadenou vlhkosťou a teplotou, klasifikovanou ako 2000 podľa federálneho štandardu 209d. V deň injekcie sa myši preniesli do rádionuklidového centra a sterilne sa im podávali rádioimunokonjugáty za aseptických podmienok v laminárnom prietokovom príklope.

Rádioimunoterapeutické štúdie na nahých myšiach

Zvieracie RIT štúdie sa uskutočňovali na porovnanie terapeutickej účinnosti rozličných MAbS značených so ^{186}Re . Imunoreaktívne frakcie konjugátov vždy presahovali 75 %. Tri terapeutické experimenty sa uskutočňovali s myšami nesúcimi 1 alebo 2 HNX-OE nádory v rozsahu od 45 do 195 mm³. ^{186}Re dávky sa zvolili na úrovni maximálne tolerovanej dávky (MTD) (tzn. 400 μCi) alebo nižšie (300 μCi). MTD úroveň je definovaná ako dávka vedúca k 5 až 15% úbytku telesnej hmotnosti. V prvom experimente myši dostali jediná i.v. injekciu buď s 300 μCi (100 μg) ^{186}Re -značenej mMAb U36, alebo 300 μCi (100 μg) ^{186}Re -značenej mMAb BIWA 1. V druhom experimente sa podávalo buď 300 μCi (100 μg) ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4, alebo 300 μCi (100 μg) ^{186}Re -značenej cMAb BIWA 2, a v treťom experimente buď 400 μCi (100 μg) ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4, alebo 400 μCi (100 μg) ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 8. Priemerné objemy nádorov boli podobné vo všetkých experimentálnych skupinách. Experiment 1: 95 mm³ $\pm$ 34 mm³ (n=7 myší, 12 nádorov) pre ^{186}Re -mMAb U36 ošetrovanú skupinu, 91 mm³ $\pm$ 15 mm³ (n=7 myší, 12 nádorov) pre ^{186}Re -mMAb BIWA 1 ošetrovanú skupinu a 99 mm³ $\pm$ 54 mm³ (n=6 myší, 11 nádorov) pre kontrolnú skupinu. Experiment 2: 101 mm³ $\pm$ 35 mm³ (n=7 myší, 12 nádorov) pre ^{186}Re -hMAb BIWA 4 ošetrovanú skupinu, 92 mm³ $\pm$ 43 mm³ (n = 7 myší, 12 nádorov) pre ^{186}Re -cMAb BIWA 2 ošetrovanú skupinu, zatiaľ čo kontrolná skupina bola rovnaká ako v experimente 1. Experiment 3: 105 mm³ $\pm$ 43 mm³ (n=8 myší, 13 nádorov) pre ^{186}Re -hMAb BIWA 4 ošetrovanú skupinu, 100 mm³ $\pm$ 42 mm³ (n=8 myší, 13 nádorov) pre ^{186}Re -hMAb BIWA 8 ošetrovanú skupinu a 110 mm³ $\pm$ 46 mm³ (n=7 myší, 11 nádorov) pre kontrolnú skupinu. V priebehu ošetrovania sa nádory merali dvakrát týždenne a vypočítaval sa objem nádoru vo vzťahu k objemu nádoru na začiatku ošetrovania. Toxicita sa monitorovala prostredníctvom merania telesnej hmotnosti dvakrát týždenne. Myši sa usmrtili, keď nádory presiahli 1000 mm³.

Štatistika

Rozdiely v tkanivovom príjme medzi spoločne injektovanými MAbS sa štatisticky analyzovali pre každý časový bod so Studentovým *t*-testom pre párové údaje. Rozdiely v priemernom objeme nádoru medzi rôznymi RIT ošetrovanými

skupinami sa štatisticky analyzovali pre každý časový bod so Studentovým *t*-testom pre nezávislé vzorky.

Výsledky

In vitro väzobné charakteristiky CD44v6-špecifických MAb

Väzobné afinity piatich MAb sa analyzovali použitím rekombinantného antigénu, ako aj ľudských nádorových bunkových línii. Kinetické a afinitné konštanty sa hodnotili prostredníctvom plazmónovej rezonancie použitím GST/CD44v3-v10 ako imobilizovaného antigénu. Tabuľka 1 uvádza asociačné rýchlosti (k_a), disociačné rýchlosti (k_d) a disociačné konštanty (K_d). mMAB BIWA 1 a cMAB BIWA 2, obsahujúce identické variabilné oblasti, majú podobné k_a , k_d a K_d a vykazujú najvyššiu afinitu. Na rozdiel od nich, mMAB U36 a hMAB BIWA 4 majú nízku k_a a vysokú k_d , čo vedie k značne zníženým disociačným konštantám (faktor 35,0, respektíve 10,5). hMAB BIWA 8, obsahujúca myšacie zvyšky v ľahkej reťazcovej kostrovej oblasti 2, vykazuje značný pokles k_d vedúci k zvýšenej afinite.

Tabuľka 1

Kinetiky a afinitné konštanty MAb nasmerovaných proti CD44v6

Protilátka	k_a ($\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d (M)	K_d vzhľadom na myšaciu BIWA 1
Myšacia BIWA 1	$1,3 \times 10^5$	$4,2 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-10}$	1,0
Myšacia U36	$1,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-8}$	35,0
Chimérna BIWA 2	$1,7 \times 10^5$	$4,1 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-10}$	0,7
Humanizovaná BIWA 4	$6,5 \times 10^4$	$2,2 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-9}$	10,5
Humanizovaná BIWA 8	$7,5 \times 10^4$	$6,3 \times 10^{-5}$	$8,4 \times 10^{-10}$	2,6

Hodnotili sa aj relatívne väzobné afinity cMAB a hMAbs v kompetitívnej bunkovej ELISA použitím humánných A431 nádorových buniek (obrázok 1). Podľa afinitných meraní na rekombinantnom antigéne bola cMAB BIWA 2 najúčinnější kompetitor, po nej nasledovala hMAB BIWA 8 a hMAB BIWA 4. Podobné výsledky

(nie sú uvedené) sa získali s dvoma inými ľudskými HNSCC bunkovými líniami (FaDu a LICR-LON-HN5).

Biodistribúcia v nahých myšiach nesúcich HNSCC

Biodistribučné štúdie sa uskutočňovali v myšiach nesúcich HNX-OE xenoštep. Dve MAb s identickým myšacím alebo humánnym izotypom sa označili buď so ^{125}I , alebo so ^{131}I a injektovali sa naraz (50 μg , 10 μCi každá). Každý pár MAb sa vybral tak, aby poskytol postupný pokles v rozdiel v afinitách: mMAb U36 má 35,0 násobne nižšiu afinitu ako mMAb BIWA 1 (experiment 1), hMAb BIWA 4 má 14,0 násobne nižšiu afinitu ako cMAb BIWA 2 (experiment 2) a hMAb BIWA 4 má 4,0 násobne nižšiu afinitu ako hMAb BIWA 8 (experiment 3). Imunoreaktívne frakcie všetkých jodizovaných MAb boli aspoň 74 % po extrapolácii (tabuľka 2).

Tabuľka 2

Imunoreaktívna frakcia jodizovaných MAb determinovaná prostredníctvom viazania UM-SCC-11B buniek

Č. exper.	Protilátka	Značka	Viazanie na 5×10^6 buniek (%)	Viazanie Extrapolované ^a (%)
1	Myšacia U36	^{131}I	59,7	87,4
	Myšacia BIWA 1	^{125}I	91,1	91,1
2	Humanizovaná BIWA 4	^{131}I	77,4	82,3
	Chimérna BIWA 2	^{125}I	80,5	79,9
3	Humanizovaná BIWA 4	^{131}I	77,3	74,5
	Humanizovaná BIWA 8	^{125}I	91,8	92,1

^a Imunoreaktivita sa determinovala prostredníctvom lineárnej extrapolácie na podmienky reprezentujúce neohraničený nadbytok antigénu: pozri Materiály a Metódy

Biodistribúcie v experimente 1 sa determinovali v dňoch 1, 2, 3 a 7 po injekcii; biodistribúcie v experimentoch 2 a 3 sa determinovali v dňoch 1, 2, 4 a 7 po injekcii.

V tabuľke 3 sú uvedené vypočítané priemerné %ID/g nádoru a krvi všetkých troch experimentov.

Tabuľka 3

Hladiny jodizovaných CD44v6 špecifických MAbs s rozličnou afinitou v nádore a krvi po spoločnej injekcii myšiam nesúcim HNX-OE

Číslo experimentu	Čas po injekcii	Konj. A (%ID/g)		Konj. B (%ID/G)		Pomer konj. A:B	
		Nádor	Krv	Nádor	Krv	Nádor	Krv
1 Konj. A: ^{131}I -mMAb U36 Konj. B: ^{125}I -mMAb BIWA1	1 d	15,7	17,9	13,0	17,8	1,2	1,0
	2 d	18,4	15,0	13,4	14,9	1,4	1,0
2 Konj. A: ^{131}I -hMAb BIWA4 Konj. B: ^{125}I -cMAb BIWA2	1 d	10,8	10,2	9,1	10,6	1,2	1,0
	2 d	12,4	10,2	9,8	10,1	1,3	1,0
	4 d	12,9	7,2	8,9	7,2	1,5	1,0
	7 d	7,6	3,3	4,8	2,7	1,6	1,2
3 Konj. A: ^{131}I -hMAb BIWA4 Konj. B: ^{125}I -hMAb BIWA8	1 d	10,5	11,1	9,5	11,4	1,1	1,0
	2 d	10,9	10,0	9,6	9,8	1,1	1,0
	4 d	11,7	6,2	9,6	5,9	1,2	1,0
	7 d	10,1	4,2	7,8	3,9	1,3	1,1

Pre každý pár spoločne injektovaných MAbs sú poskytnuté príjmové pomery nádoru a krvi. Na obrázku 2 je znázornený priemer %ID/g a s.e.m nádoru, krvi a rôznych orgánoch 3 (experiment 1) alebo 4 dní p.i. (experimenty 2 a 3).

Pri priamom porovnaní dvoch myšacích MAbs, príjem nízko afinitnej U36 nádorom bol významne vyšší ako príjem vysoko afinitnej BIWA 1 vo všetkých časových bodoch ($p < 0,001$) (tabuľka 3). Na rozdiel od toho sa nezistili žiadne významné rozdiely medzi príjmovými hodnotami týchto MAbs v krvi a normálnych tkanivách na 1., 2. a 3. deň p.i.. Na 7. deň p.i. boli hladiny BIWA 1 v krvi a vo väčšine orgánov významne nižšie ($p < 0,05$) ako hladiny U36, z čoho vyplýva rýchlejšie vymiznutie BIWA 1 z krvi/tela. Na obrázku 2A je ilustrovaný o 50 % vyšší príjem U36 nádorom v porovnaní s BIWA 1 na 3. deň p.i.

Podobné vzťahy sa zistili pri hodnotení dvoch iných MAb párov. hMAb BIWA 4, hoci má najnižšiu afinitu, vykazovala významne vyšší príjem nádorom ($p < 0,001$)

ako cMAb BIWA 2 a hMAb BIWA 8 vo všetkých časových bodoch (tabuľka 3). Na rozdiel od toho, MAb hladiny v krvi a v normálnych tkanivách boli pre tieto páry MAbs podobné na 1., 2. a 4. deň p.i. Po 7 dňoch p.i. boli BIWA 2 a BIWA 8 hladiny v krvi a vo väčšine orgánov významne nižšie ($p < 0,05$) ako hladiny BIWA 4, z čoho vyplýva rýchlejšie vymiznutie týchto MAbs z krvi/tela. Na obrázku 2B je ilustrovaný o 45 % vyšší príjem BIWA 4 nádorom v porovnaní s BIWA 2, zatiaľ čo na obrázku 2C je ilustrovaný o 20 % vyšší príjem BIWA 4 nádorom v porovnaní s BIWA 8, v časových bodoch 4 dni po injekcii.

Zodpovedajúce výsledky sa získali z ďalšieho experimentu (údaje nie sú znázornené), v ktorom sa rádioaktívne značky zamenili: ^{125}I -BIWA 4 *versus* ^{131}I -BIWA 8 namiesto ^{131}I -BIWA 4 *versus* ^{125}I -BIWA 8. Údaje z tohto posledného experimentu vylučujú možnosť, že typ rádioaktívnej značky má vplyv na farmakokinetické správanie značenej MAb.

Rádioimunoterapia u nahých myší nesúcich HNSCC

Z týchto troch biodistribučných experimentov sa zdá, že nízko afinitné MAbs vykazovali vyšší a selektívnejší nádorový príjem ako vysoko afinitné MAbs, a teda mohli by byť vhodnejšie na RIT. Na testovanie tejto možnosti sa nasledujúce ošetrovacie skupiny porovnávali v RIT štúdiách s myšami nesúcimi HNX-OE xenoštep:

Experiment 1: 300 μCi ^{186}Re -U36 alebo 300 μCi ^{186}Re -BIWA 1 alebo fyziologický roztok ako kontrola. Experiment 2: 300 μCi ^{186}Re -BIWA 4 alebo 300 μCi ^{186}Re -BIWA 2 alebo fyziologický roztok ako kontrola. Experiment 3: 400 μCi ^{186}Re -BIWA 4 alebo 400 μCi ^{186}Re -BIWA8 alebo fyziologický roztok ako kontrola.

Na obrázku 3 je priemerný relatívny objem nádoru (ako percento objemu nádoru v deň 0) pre kontrolu a ošetrované skupiny vyneseny do grafu ako funkcia času. Nádory myší v kontrolnej skupine vo všetkých troch experimentoch vykazovali exponenciálny rast pričom čas, za ktorý sa objem nádoru zdvojnásobil, bol približne 7 dní. V skupinách ošetrovaných so ^{186}Re -značenými MAbs nádory prestali rásť, v niektorých prípadoch to bolo sprevádzané regresiou nádoru krátko po injekcii konjugátov. Avšak všetky nádory nakoniec znova rástli.

V experimente 1 podávanie 300 μCi ^{186}Re -BIWA 1 viedlo k poklesu nádorového rastu, ale nie k redukcii priemernej veľkosti nádoru. Avšak podávanie 300 μCi ^{186}Re -U36 spôsobovalo redukciiu priemerného objemu nádoru zo 185 mm^3 na 120 mm^3 medzi dňom 7 a dňom 17 po injekcii, a potom nádory opäť začali rásť. Priemerný relatívny objem nádoru v skupine ošetrovanej so ^{186}Re -U36 bol významne menší ($p < 0,001$), ako priemerný objem nádoru v skupine ošetrovanej so ^{186}Re -BIWA 1 od 14. dňa ďalej.

V experimente 2 podávanie buď 300 μCi ^{186}Re -BIWA 4, alebo 300 μCi ^{186}Re -BIWA 2 viedlo k zastaveniu rastu nádoru na 7. deň, pričom opätovne začal rásť na 17. deň p.i.. BIWA 4 bola účinnejšia v RIT ako BIWA 2 od 14. dňa ďalej, ale významný rozdiel medzi priemernými relatívnymi objemami nádoru sa zistil len na 14. deň p.i. ($p < 0,05$).

V experimente 3 sa myši ošetrovali buď so 400 μCi ^{186}Re -BIWA 4, alebo BIWA 8, čo viedlo k zníženiu relatívneho objemu nádoru na minimálne $80 \pm 62 \%$, respektívne $98 \pm 81 \%$ na 19. deň. Potom začali nádory opäť rásť.

Z týchto údajov vyplýva, že nízko afinitná MAb BIWA 4 je účinnejšia v RIT ako vysoko afinitné MAb cBIWA 2 a BIWA 8.

Príklad 2

Detaily sekvencií

Tento príklad znázorňuje detaily sekvencií, napr. polohu klonovacích miest, vedúce sekvencie a netranslatované oblasti.

Skratky:

aa = aminokyseliny

nt = nukleotidová sekvencia

Sekv. č. 1 VH BIWA 4/8 aa

EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTGSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGSYTYILD
SIKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGLDYWGRGTLTVSS

Sekv. č. 2VL BIWA 4 aa

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSINYIYWYQQKPGQAPRLLIYLTSLASGVPARFS
GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCLQWSSNPLTFGGGKVEIK

Sekv. č. 3 VL BIWA 8 aa

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSINYIYWLQKPGQAPRILIIYLTSLASGVPARFS
GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCLQWSSNPLTFGGGKVEIK

Sekv. č. 4 VH BIWA 4/8 nt

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTAAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCGCCAGGCTCCGG
GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCTAGAC
AGTATAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAAAT
GAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGACAGGGGTTGGACTACT
GGGGTCGAGGAACCTTAGTCACCGTCTCCTCA

Sekv. č. 5 VL BIWA 4 nt

GAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCT
GTCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGG
CTCCTAGACTCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGC
CGTTTATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACATTCGGTGGTGGGACCAAGGTGG
AGATTAAA

Sekv. č. 6 VL BIWA 8 nt

GAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCT
GTCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGG
CTCCTAGACTCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGC
CGTTTATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACATTCGGTGGTGGGACCAAGGTGG
AGATTAAA

Sekv. č. 7 ťažký reťazec (variabilný + konštantný) BIWA 4/8 aa

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGSYTTYL
DSIKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGLDYWGRGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTI PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

Sekv. č. 8 ľahký reťazec (variabilný + konštantný) BIWA 4 aa

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSIYIYWYQQKPGQAPRLLIYLTSLNLSGVPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCLQWSSNPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sekv. č. 9 ľahký reťazec (variabilný + konštantný) BIWA 8 aa

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSIYIYWYQQKPGQAPRLLIYLTSLNLSGVPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCLQWSSNPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sekv. č. 10 ľahký reťazec (variabilný + konštantný) BIWA 4/8 nt; inzerť v pAD-
CMV1/pAD-CMV19, obsahuje intróny (malé písmená) medzi CH1-kľb, kľb-CH2,
CH2-CH3, vedúca sekvencia je podčiarknutá, netranslatované sekvencie sú
vytlačené kurzívou, klonovacie miesta sú vytlačené tučne

aagctttgacagacgcacaaccctggactcccaagtctttctcttcagtgacaaacacagac
ataggatatcacatttggcttctgacacaactgtgttcactagcagcctcaaacagacaccAT
GAACTTTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTAATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGC
AGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCGCCAGGCTCCGGGGAAGGG
GCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCTAGACAGTATAA
AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAAATGAACAGT
CTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGACAGGGGTGGACTACTGGGGTCG
AGGAACCTTAGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC
CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCC
GGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAAAGTTggtgagaggccagcacagggaggagggtgtctgctggaagcaggctcagcgt
cctgctggacgcacccggctatgcagccccagtcacagggcagcaaggcaggccccgctctg
cctcttcacccggagcctctgcccggccactcatgctcagggagagggtcttctggctttt
tcccaggctctgggcaggcacaggctaggtgcccctaaccaggccctgcacacaaaggggc
aggtgctgggctcagacctgccaaagagccatatccgggaggaccctgcccctgacctaaagcc
caccacaaaggccaaactctccactccctcagctcggacaccttctctcctcccagattcca
gtaactcccaatcttctctctctgcaGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACC
GTGCCCAggttaagccagcccaggcctcgccctccagctcaaggcgggacaggtgccctaaga
gtagcctgcatccaggacagggcccagccgggtgctgacacgtccacctccatctcttct
caGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG
GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT
GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCGTC
CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC

AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAggtgggacccgtgggggtgcgagggccac
atggacagaggccggctcggccaccctctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtc
ctacaGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAATGAgtgcgacggccgcgaattc

Sekv. č. 11 ľahký reťazec (variabilný + konštantný) BIWA 4 nt; sekvencia v pAD-CMV1/pAD-CMV19, vedúca sekvencia je podčiarknutá, netranslatované sekvencie sú vytlačené kurzívou, klonovacie miesta tučne

aagcttgatcttcaggatatcacatttgcttctgacacaactgtgtttcactagcaacctcaa
acagacaccATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATGAGTGCCTCAGTCAT
AATGTCCAGGGGAGAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGG
AGAGGGCCACCCTGTCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGTACCAGCAG
AAGCCAGGACAGGCTCCTAGACTCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCC
TGCGCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGC
CTGAAGATTTTGCCGTTTATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACATTCGGTGGT
GGGACCAAGGTGGAGATTAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC
TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAACTGCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG
TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG**gaattc**

Sekv. č. 12 ľahký reťazec (variabilný + konštantný) BIWA 8 nt; sekvencia v pAD-CMV1/pAD-CMV19, vedúca sekvencia je podčiarknutá, netranslatované sekvencie sú vytlačené kurzívou, klonovacie miesta tučne

aagcttgatcttcaggatatcacatttgcttctgacacaactgtgtttcactagcaacctcaa
acagacaccATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATGAGTGCCTCAGTCAT
AATGTCCAGGGGAGAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGG
AGAGGGCCACCCTGTCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGTACCAGCAG
AAGCCAGGACAGGCTCCTAGACTCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCC
TGCGCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGC
CTGAAGATTTTGCCGTTTATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACATTCGGTGGT
GGGACCAAGGTGGAGATTAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC
TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAACTGCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAG
TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG**gaattc**

Sekv. č. 13 ťažký reťazec (variabilný + konštantný) BIWA 4/8 nt; sekvencia v N5KG1 val, neobsahuje žiadne intróny, vedúca sekvencia je podčiarknutá

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGT
GCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTAAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCGCCAGGCTCCGGGGAAG
GGGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCTAGACAGTAT
AAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAAATGAACA
GTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGACAGGGGTGGACTACTGGGGT
CGAGGAACCTTAGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC
ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
CCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG
CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCT
GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA
AGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTTGCACCAGGACTGGCTGAAT
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACCGGGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA
TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA
CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

Sekv. č. 14 ľahký reťazec (variabilný + konštantný) BIWA 4 nt; sekvencia v N5KG1val, vedúca sekvencia je podčiarknutá

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGA
AATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCTGT
CCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCT
CCTAGACTCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGTGG
CAGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCCG
TTTATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACATTTCGGTGGTGGGACCAAGGTGGAG
ATTAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAACTGCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA
CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGA
CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC
TTCAACAGGGGAGAGTGTGTA

Sekv. č. 15 ľahký reťazec (variabilný + konštantný) BIWA 8 nt; sekvencia v N5KG1val, vedúca sekvencia je podčiarknutá

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGA
AATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCTGT
CCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCT
CCTAGACTCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGTG
CAGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCCG
TTTATTACTGCCCTGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACATTGCGTGGTGGGACCAAGGTGGAG
ATTAAACGGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAACTGCTAGCGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA
CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGA
CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
AACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC
TTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

Sekv. č. 16 BIWA 4 v N5KG1val

CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC
GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCAC
GTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTG
CTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAAATTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGGGTCGCGACG
TACCGGGCCCCCCTCGATTAATTAATCGAGCTACTAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTG
CATAATGAGAAAAAAGGAAAATTAATTTTAACACCAATTCAGTAGTTGATTGAGCAAATGC
GTTGCCAAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTCTCTGCACAGATAAGGACAAACATTATTCA
GAGGGAGTACCCAGAGCTGAGACTCCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAAT
ATGCTTGTCATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACGTTGGTAAGGGCCAATCTGCTC
ACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCT
CCTCACATTTGCTTCTGACATAGTTGTGCCAGCATGGAGGAATCGATCCTCCATGCTTGAAC
AAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGG
GCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCC
GGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGTAAAGTGCGGCCG
CTCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCCTC
GGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACTG
GCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGA
TGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGA
CTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACC
CTAACTGACACACATTCCACAGAATTAATTCCCCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGG
TCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCC
TGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC
GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGG
CCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACTCTAC
GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA
GCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTT
GGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATG
GGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTGAACCGTCAGAT
CGCCTGGAGACGCCATCACAGATCTCTCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCC
TGCTGCTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTG
TCTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCTGTCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACAT
ATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCTAGACTCTTGATTTATCTCACATCCAACC

TGGCTTCTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACA
ATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGCGTTTATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCC
GCTCACATTCGGTGGTGGGACCAAGGTGGAGATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCT
TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG
TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCA
CCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGAATTCAGATCCG
TAACGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTCGTGACAACATGCGGCCGTGATATCTACGTATG
ATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTT
CCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTCCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGC
ATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG
GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGAC
TAGTAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATAATGAGAAAAAAGGAAAATTAATTTTAA
CACCAATTCAGTAGTTGATTGAGCAAATGCGTTGCCAAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTT
CTCTGCACAGATAAGGACAAACATTATTAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAGACTCCTAAGCC
AGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTTGTTCATCCCGAAGCCTGATTCGGTAGA
GCCACACCTTGGTAAGGGCCAATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGA
GCATATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACATAGTTGTGTTGGG
AGCTTGGATAGCTTGGACAGCTCAGGGCTGCGATTTTCGCGCCAACTTGACGGCAATCCTAG
CGTGAAGGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCCATCATGGTTTCGACCATTGAACTGCATCGT
CGCCGTGTCCCAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGA
ACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTG
GTGATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAG
AATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCAGAGGAGCTCATTTTCTTGCC
AAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAGTAGACATG
GTTTGGATAGTTCGGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTTAG
ACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATT
TGGGGAAATATAAACTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAA
GGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTCGAGAAGAAAGACTACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCT
CTGCTCCCCCTCCTAAAGCTATGCATTTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATC
AGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCT
TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCAT
TGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGA
TTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTC
GAAGCGGCCGCTCCGGATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG
TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAG
CGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTG
GCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGG
GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCTCATTTCAGT
GATCAGCACTGAACACAGACCCGTCGACATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGG
CTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAG
CCTGGAGGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTATGACAT
GTCTTGGGTTCCGCCAGGCTCCGGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTAGTGGTG
GTAGTTACACCTACTATCTAGACAGTATAAAGGGCCGATTACCCTCTCCAGAGACAATGCC
AAGAACTCCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG
TGCAAGACAGGGGTTGGACTACTGGGGTCGAGGAACCTTAGTACCGTCTCCTCAGCTAGCA

CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGG
CGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC
TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG
AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAAC
TCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC
TCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA
GCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
GGTGTAACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCC
TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGGATCC
GTTAACGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGGCCGTGATATCTACGTA
TGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCC
TTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTCTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT
CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGG
GAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGG
GGCTCGACAGCGCTGCGATCGCCTCGAGGCCGCTACTAACTCTCTCCTCCCTCCTTTTTCT
GCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGC
TCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGAT
CTCCTGTCTATCTACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCG
GCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCG
AGCACGTAATCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCTCAGGG
GCTCGCGCCAGCCGAACGTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCG
TCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGA
TTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCG
TGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGCTGCTTTACGGTATCG
CCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGA
CTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCC
ACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGAT
CCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCAACCCCAACTTGTTTTATTGCAGCTT
ATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTACTG
CATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATCTATCTTATCATGTCTGGATCGCGGCCGG
CCGCACCGCGGTGGAGCTTTAATTAAGGCGCGCCAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAG
GGTTAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCG
CTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATG
AGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC
TCTTCCGCTTCTTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACA
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG
TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT

TCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTG
TGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGT
CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGGACAGTATTTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAG
ATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC
TCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA
CCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT
TGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCG
TTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAA
TAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATC
CAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAA
CGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCA
GCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT
AGTCTCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGT
TATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG
GTGAGTACTCAACCAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGAAAA
CGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACC
CACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTC
ATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATA
CATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACTTTCCCCGAAAAGT
GCCACA

Sekv. č. 17 pAD-CMV1, klonovacie miesta sú vytlačené tučne

TCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC
CATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC
GACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT
GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC
TATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAC
GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAA
CGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGT
ACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTAACTGG
CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCA**AAGCTT**CTGCAGGTGACATCGATG
GATCCGGTACCTCGAGCGC**GAATT**CTCTAGAGGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGG
TGTGACATAATTGGACAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTT
TAAGTGTATAATGTGTTAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTAT
GGAAGTGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGA
AGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAA
GAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATG
CTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCA
CTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATATTTGATGTATAGTGCCTTGACTAGAGATCATAA
TCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTG

AACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGG
TTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTACTGCATTCTA
GTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAATTCTGAGAACTA
GCCTTAAAGACAGACAGCTTTGTTCTAGTCAGCCAGGCAAGCATATGTAAATAAAGTTCCTC
AGGGAACCTGAGGTTAAAAGATGTATCCTGGACCTGCCAGACCTGGCCATTACAGTAAACAGA
AGATTCCGCCTCAAGTTCCGGTTAACAACAGGAGGCAACGAGATCTCAAATCTATTACTTCT
AATCGGGTAATTAAAACCTTTCAACTAAAACACGGACCCACGGATGTCACCAC'TTTTCCTTC
CCCGGCTCCGCCCTTCTCAGTACTCCCCACCATTAGGCTCGCTACTCCACCTCCACTTCCGG
GCGCGACACCCACGTGCCCTCTCCACCCGACGCTAACCCCGCCCTGCCCCGTCTGACCCCG
CCCACCACCTGGCCCCGCCCGTTGAGGACAGAAGAAACCCCGGGCAGCCGACGCAAGGCG
GACGGGTAGACGCTGGGGGCGCTGAGGAGTCGTCTCTACCTTCTCTGCTGGCTCGGTGGGG
GACGCGGTGGATCTCAGGCTTCCGGAAGACTGGAAGAACCGGCTCAGAACCGCTTGTCTCCG
CGGGGCTTGGGCGGCGGAAGAATGGCCGCTAGACGCGGACTTGGTGCGAGGCATCGCAGGAT
GCAGAAGAGCAAGCCCGCCGGGAGCGCGCGGCTGTACTACCCCGCGCCTGGAGCGGCCACGC
CGGACTGGGCGGGGCCGCTGGTGGAGGCGGAGTCTGACCTCGTGGAGGCGGGGCTCTGA
TGTTCAAATAGGATGCTAGGCTTGTGAGGCGTGGCCTCCGATTCACAAGTGGGAAGCAGCG
CCGGGCGACTGCAATTTTCGCGCCAACTTGGGGGAAGCACAGCGTACAGGCTGCCTAGGTGA
TCGCTGCTGCTGTCATGGTTCGACCGCTGAAGTGCATCGTCGCCGTGTCCAGAATATGGGC
ATCGGCAAGAACGGAGACCTTCCCTGGCCAATGCTCAGGTACTGGCTGGATTGGGTAGGGA
AACCGAGGCGGTTTCGCTGAATCGGGTCGAGCACTTGGCGGAGACGCGCGGGCCACTACTTA
GGGACAGTCATGAGGGGTAGGCCCCGCCGCTGCTGCCCTTGCCCATGCCCGCGGTGATCCCC
ATGCTGTGCCAGCCTTTGCCAGAGGCGCTCTAGCTGGGAGCAAAGTCCGGTCACTGGGCAG
CACCACCCCCCGGACTTGCATGGGTAGCCGCTGAGATGGAGCCTGAGCACACGTGACAGGGT
CCCTGTTAACGCAGTGTTTCTCTAACTTTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCAAAGAATGAC
CACCACCTCCTCAGTGGAAGGTAAACAGAACCTGGTGATTATGGGCCGAAACCTGGTTCT
CCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAGCTC
AAGGAACCACCACAAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTCTGGACCATGCCTTAAACTTAT
TGAACAACCAGAGTTAGCAGATAAAGTGGACTGGTTTGGATAGTTGGAGGCAGTTCGGTTTA
CAAGGAAGCCATGAATCAGCCAGGCCATCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAAT
TTGAAAGTGACACGTTCTTCCCAGAAATTGATTTGGAGAAATATAAACTTCTCCCAGAGTAC
CCAGGGGTCTTTTCTGAAGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAATTTGAAGTCTATGA
GAAGAAAGGCTAACAGAAAGATACTTGCTGATTGACTTCAAGTTCTACTGCTTTCCTCCTAA
AATTATGCATTTTTTACAAGACCATGGGACTTGTGTTGGCTTTAGATCCTGTGCATCCTGGGC
AACTGTTGTACTCTAAGCCACTCCCCAAAGTCATGCCCCAGCCCCCTGTATAATTCTAAACAA
TTAGAATTATTTTCATTTTCATTAGTCTAACCAGGTTATATTAAATATACTTTAAGAAACAC
CATTTGCCATAAAGTTCTCAATGCCCCCTCCCATGCAGCCTCAAGTGGCTCCCCAGCAGATGC
ATAGGGTAGTGTGTGTACAAGAGACCCCAAAGACATAGAGCCCCCTGAGAGCATGAGCTGATA
TGGGGGCTCATAGAGATAGGAAGCTAGATGAATAAGTACAAAGGGCAGAAATGGGTTTTAAC
CAGCAGAGCTAGAACTCAGACTTTAAAGAAAATTAGATCAAAGTAGAGACTGAATTATTCTG
CACATCAGACTCTGAGCAGAGTTCTGTTCACTCAGACAGAAAATGGGTAAATTGAGAGCTGG
CTCCATTGTGCTCCTTAGAGATGGGAGCAGGTGGAGGATTATATAAGGTCTGGAACATTTAA
CTTCTCCGTTTCTCATCTTCAGTGAGTTCGAAGGATACTACAATTCTGTGGAATGTGTGTC
AGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTC
AATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAG
CATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCATCCCGCCCCCTAA
CTCCGCCCCAGTTCCGCCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTTATTTATGCAGAG
GCCGAGGCGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTT
TGCAAAAAAGCTAATTCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC

GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGC
TCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAA
ATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTG
ATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACG
TTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTAT
CTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATG
AGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATATTAACGTTTACAATTTCAGGT
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACTTCAAAT
ATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAG
TATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTG
TTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA
GTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAACG
TTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACG
CCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCA
CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCAT
AACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGC
TAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAG
CTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACT
GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTT
ATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGTATCATTGCAGCACTGGGGCCA
GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACCTGTCAGACC
AAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAG
GTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTG
AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAA
TCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTTGCCGGATCAAGAG
CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCT
TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCG
CTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTG
GACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCAC
ACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAG
AAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGA
ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGG
GTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCC

Sekv. č. 18 pAD-CMV19, klonovacie miesta sú vytlačené tučne

TCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC
CATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC
GACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT
GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC
TATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTCAC
GGGGATTTC AAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTTGGCACCAAAATCAA
CGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGT

ACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTAACTGG
CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCC**AAGCTT**CTGCAGGTCGACATCGATG
GATCCGGTACCTCGAGCGC**GAATT**CTCTAGAGGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGG
TGTGACATAAATTGGACAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTT
TAAGTGTATAATGTGTTAACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTAT
GGAACCTGATGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGCCTTTAATGAGGAAAACCTGTTTGTCTCAGA
AGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACATTCTACTCCTCCAAAAA
GAAGAGAAAGGTAGAAGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGAATTGCTAAGTTTTTTGAGTCATG
CTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCA
CTGCTATACAAGAAAATTATGGAAAAATATTTGATGTATAGTGCTTGACTAGAGATCATAA
TCAGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTG
AACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGG
TTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTTACTGCATTCTA
GTTGTGTTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAATTCTGAGAACTA
GCCTTAAAGACAGACAGCTTTGTTCTAGTCAGCCAGGCAAGCATATGTAAATAAAGTTCCCTC
AGGGAACCTGAGGTTAAAGATGTATCCTGGACCTGCCAGACCTGGCCATTACGTAAACAGA
AGATTCCGCCTCAAGTTCCGGTTAAACAACAGGAGGCAACGAGATCTCAATCTATTACTTCT
AATCGGGTAATTAAAACCTTTCAACTAAAACACGGACCCACGGATGTCACCACTTTTCCTTC
CCCGGCTCCGCCCTTCTCAGTACTCCCCACCATTAGGCTCGTACTCCACCTCCACTTCCGG
GCGCGACACCCACGTGCCCTCTCCCACCCGACGCTAACCCCGCCCCGTGCCGTCTGACCCCG
CCCACCACCTGGCCCCGCCCCGTTGAGGACAGAAGAAACCCCGGGCAGCCGAGCCAAGGCG
GACGGGTAGACGCTGGGGGCGCTGAGGAGTCGTCTCTACCTTCTCTGCTGGCTCGGTGGGG
GACGCGGTGGATCTCAGGCTTCCGGAAGACTGGAAGAACCGGCTCAGAACCGCTTGTCTCCG
CGGGGCTTGGGCGGCGGAAGAATGGCCGCTAGACGCGGACTTGGTGCGAGGCATCGCAGGAT
GCAGAAGAGCAAGCCCGCCGGGAGCGCGCGGTGTACTACCCCGCGCCTGGAGCGGCCACGC
CGGACTGGGCGGGGCCGGCTGGTGAGGCGGAGTCTGACCTCGTGAGGCGGGGCCTCTGA
TGTTCAAATAGGATGCTAGGCTTGTGAGGCGTGGCCTCCGATTACAAAGTGGGAAGCAGCG
CCGGGCGACTGCAATTTGCGGCCAACTTGGGGGAAGCACAGCGTACAGGCTGCCTAGGTGA
TCGCTGCTGCTGTATGGTTCGACCGCTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCAGAATATGGGC
ATCGGCAAGAACGGAGACCTTCCCTGGCCAATGCTCAGGTACTGGCTGGATTGGGTAGGGA
AACCGAGGCGGTTTCGCTGAATCGGGTCGAGCACTTGGCGGAGACGCGCGGGCCAACCTACTTA
GGGACAGTCATGAGGGGTAGGCCCCGGGCTGCTGCCCTTGCCCATGCCCGCGGTGATCCCC
ATGCTGTGCCAGCCTTTGCCAGAGGCGCTCTAGCTGGGAGCAAAGTCCGGTCACTGGGCAG
CACCACCCCCCGGACTTGATGGGTAGCCGCTGAGATGGAGCCTGAGCACACGTGACAGGGT
CCCTGTTAACGCAGTGTTTTCTCTAACTTTTCAAGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGAC
CACCACCTCCTCAGTGGAAGGTAAACAGAACCTGGTGATTATGGGCCGAAAACCTGGTTCT
CCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAGCTC
AAGGAACCACCACAAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTCTGGACCATGCCTTAAACTTAT
TGAACAACCAGAGTTAGCAGATAAAGTGGACTGGTTTGGATAGTTGGAGGCAGTTCCGTTTA
CAAGGAAGCCATGAATCAGCCAGGCCATCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAAT
TTGAAAGTGACACGTTCTTCCCAGAAATTGATTTGGAGAAATATAAACTTCTCCCAGAGTAC
CCAGGGGTCTTTTCTGAAGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAATTTGAAGTCTATGA
GAAGAAAGGCTAACAGAAAGATACTTGCTGATTGACTTCAAGTTCTACTGCTTTCCTCCTAA
AATTATGCATTTTTTACAAGACCATGGGACTTGTGTTGGCTTTAGATCCTGTGCATCCTGGGC
AACTGTTGTACTCTAAGCCACTCCCCAAAGTCATGCCCCAGCCCCTGTATAATTCTAAACAA
TTAGAATTATTTTCATTTTCATTAGTCTAACCAGGTTATATTAAATATACTTTAAGAAACAC
CATTTGCCATAAAGTTCTCAATGCCCCCTCCCATGCAGCCTCAAGTGGCTCCCCAGCAGATGC
ATAGGGTAGTGTGTGTACAAGAGACCCCAAGACATAGAGCCCCTGAGAGCATGAGCTGATA

TGGGGGCTCATAGAGATAGGAAGCTAGATGAATAAGTACAAAGGGCAGAAATGGGTTTTAAC
CAGCAGAGCTAGAACTCAGACTTTAAAGAAAATTAGATCAAAGTAGAGACTGAATTATTCTG
CACATCAGACTCTGAGCAGAGTTCTGTTCACCTCAGACAGAAAATGGGTAAATTGAGAGCTGG
CTCCATTGTGCTCCTTAGAGATGGGAGCAGGTGGAGGATTATATAAGGTCTGGAACATTTAA
CTTCTCCGTTTCTCATCTTCAGTGAGTTCGAAGGGATACTACAATTCTGTGGAATGTGTGTC
AGTTAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTC
AATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAG
CATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA
CTCCGCCCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAG
GCCGAGGCGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTT
TGCAAAAAAGCTAATTCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGC
GCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCG
TCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAA
ATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAACTTG
ATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACG
TTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTAT
CTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATG
AGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTACAGGT
GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACTTCAAAT
ATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAG
TATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCTG
TTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA
GTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAACG
TTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACG
CCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGAGTACTCA
CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCAT
AACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGC
TAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAG
CTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACT
GGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTT
ATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGTATCATTGCAGCACTGGGGCCA
GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA
ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACTGTCAGACC
AAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAG
GTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTG
AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAA
TCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTGCGGATCAAGAG
CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTT
TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCG
CTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTG
GACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCAC
ACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAG
AAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGA
ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCG
GTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCAGCTGC

Príklad 3

Klinická štúdia 1170.1

1. Zoznam skratiek a definícií výrazov

ADCC	Bunkovo sprostredkovaná cytotoxicita závislá na protilátke
AE	Nepriaznivá udalosť
ALT	Alanín aminotransferáza
a.p.	Predožadný
AP	Alkalická fosfatáza
AST	Aspartát aminotransferáza
AUC	Oblasť pod koncentračno-časovou krivkou
Bq	Becquerel, SI jednotka rádioaktivity Becquerel (1 Bq = jeden rozpad/s)
BSA	Hovädzí sérový albumín
CD44v6	CD44 variantová izoforma v6
CDS	Korporovaná lieková bezpečnosť
cGy	Ceti Gray-ová miera rádioaktivity
CHO	Vaječníkové bunky čínskeho škrečka
Ci	Curie; jednotka rádioaktivity; $1 \text{ Ci} = 37 \times 10^9 \text{ rozpadov/s} = 37 \text{ GBq}$
CL	Totálne vymiznutie z tela
cMAb	Chimérna monoklonálna protilátka
cm	Centimeter
$C_{\max}$	Maximálna pozorovaná koncentrácia lieku
cpm	Impulzy za minútu
CRF	Prípadová správa/záznamová forma
CT (scan)	Počítačová tomografia
CTC	Zvyčajné kritériá toxicity
CV	Koeficient odchýlky
DLT	Dávka limitujúca toxicitu
ECG	Elektrokardiogram
ELISA	S enzýmom spojený imuno-sorbenčný test
ENT	Ucho Nos Krk

f	Samička
FDA	Správa potravín a liekov
g	Gram
GBq	SI jednotka rádioaktivity Giga Becquerel (1 GBq = 10^9 rozpadov/s)
GCP	Dobrá klinická prax
GGT	Gama glutaryl transpeptidáza
GMP	Dobrá výrobná prac
Gy	Gray
HAHA	Ľudská-anti-ľudská protilátka
Hb	Hemoglobín
HER2	Receptor 2 ľudského epidermálneho rastového faktora
hMAb	Humanizovaná monoklonálna protilátka
HNSCC	Karcinóm skvamóznych buniek hlavy a krku
HPLC	Vysoko účinná kvapalná chromatografia
hr/ h	Hodina
hrs	Hodiny
Ht	Hematokryt
^{131}I	Jód-131 (polčas rozpadu 8,05 dňa)
ICH	Medzinárodná komisia pre harmonizáciu
ID	Injektovaná dávka
IEC	Nezávislá etická komisia
IgG	Imunoglobulín G
INN	Medzinárodný názov nepredstavujúci ochrannú známku
IRB	Ústavná revízna komisia
IZZ	Určený na liečenie
i.v.	Intravenózný (intravenózne)
KeV	Kiloelektrovolt
l/L	Liter
m	Samček
m ²	metre štvorcové
MAb	Monoklonálna protilátka
MAG2GABA-	Merkaptoacetylglycylglycyl-gama-aminobutyrate-tetrafluorfenolester

TFP	(MAG2GABA-TFP), chelát používaný na pripájanie ^{186}Re na monoklonálnu protilátku (budúca metóda)
MAG3	Merkaptoacetyltriglycín. Chelát používaný na pripájanie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a ^{186}Re na monoklonálne protilátky
MBq	SI jednotka rádioaktivity; Mega Becquerel ($1 \text{ MBq} = 10^6$ rozpadov/s)
mCi	Mili Curie; jednotka rádioaktivity; $1 \text{ mCi} = 37$ miliónov rozpadov/s = 37 MBq
MCV	Priemerný korpuskulárny objem
mGy	MiliGray
μg	Mikrogram
mg	Miligram
min	Minúta
ml/mL	Mililiter
mMAb	Myšacia monoklonálna protilátka
mmHg	Milimetre ortuťového stĺpca
μmol	Mikromol
mmol	Milimol
MRI	Magnetické rezonančné zobrazovanie
MRT	Priemerný rezidenčný čas
mSv	Mili Sievert
MTD	Maximálna tolerovaná dávka
NA/n.a.	Neaplikovateľné
NCI	US národný ústav zaoberajúci sa rakovinou
ND	Neuskutočnené
ng	Nanogram
No/N	Číslo
nos	Nešpecifikovaný žiadny iný
NSCLC	Rakovina iných ako malých pľúcnych buniek
n.y.r.	Ešte neizolované
p.a.	<i>Posterior anterior</i>
PBS	Fosfátom tlmený fyziologický roztok

p.i.	Po infúzii
p.o.	<i>Per os</i>
PP	Podľa protokolu
Pt./Pat	Pacient
Pts.	Pacienti
¹⁸⁶ Re	Rénium-186, rádionuklid; polčas rozpadu 3,7 dňa (tkanivová penetrácia β-častíc približne 1,2 mm)
Recov.	Izolovaný
RES	Retikuloendoteliálny systém
RIS	Rádioimunoscintigrafia
RIT	Rádioimunologická terapia
ROI	Oblasť záujmu
SAE	Závažný vedľajší účinok
SCC	Karcinóm skvamóznych buniek
sCD44v6	Rozpustný CD44v6
SD	Stabilné ochorenie
sGOT	Sérová glutámová oxaloctová transamináza
sGPT	Sérová glutámová pyruvátová transamináza
SOC	Systémová orgánová trieda
SOP	Štandardný operačný postup
SPECT	Jednofotónová emisná počítačová tomografia
t _{1/2}	Eliminačný polčas rozpadu
^{99m} Tc	Technécium 99m (polčas rozpadu 6 hodín)
TLC	Chromatografia na tenkej vrstve
T _{max}	Časový bod, v ktorom je pozorovaná maximálna koncentrácia lieku
TNM	Nádorový uzlový metastatický systém na odstupňovanie nádorov
TSH	Tyroidný stimulujúci hormón
UICC	Union Internationale Contre le Cancer (medzinárodná jednotka proti rakovine)
unk	Neznámy
V _{ss}	Zdanlivý objem distribúcie v stacionárnych podmienkach

V_z	Zdanlivý objem distribúcie počas terminálnej fázy
WBC	Počet bielych krviniek
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia

2. Ciele štúdie

2.1 Všeobecný cieľ/klinický cieľ

Všeobecným cieľom predloženej štúdie bolo stanoviť bezpečnosť a tolerovateľnosť intravenózne podávanej ^{99m}Tc a ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4, aby sa potvrdila preferenčná akumulácia ^{99m}Tc -značenej hMAb BIWA 4 v nádore, aby sa určila maximálne tolerovaná radiačná dávka ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4, a aby sa navrhla bezpečná dávka pre fázu II vývoja. Na dosiahnutie tohto cieľa sa štúdia rozdelila na dve časti:

Časť A:

Ciele:

- Stanoviť bezpečnosť a tolerovateľnosť jednej infúzie intravenózne podávanej ^{99m}Tc -značenej hMAb BIWA 4 u pacientov s pokročilým karcinómom skvamózných buniek hlavy a krku.
- Stanoviť biologickú distribúcie jednej infúzie ^{99m}Tc -značenej hMAb BIWA 4 pri rozličných BIWA 4 dávkových hladinách u pacientov s pokročilým karcinómom skvamózných buniek hlavy a krku.
- Študovať farmakokinetiky jedinej infúzie ^{99m}Tc -značenej hMAb BIWA 4.

Časť B:

Ciele:

- Stanoviť kvalitatívne a kvantitatívne toxické účinky ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4 a študovať očakávateľnosť, nástup, trvanie, intenzitu, reverzibilitu toxických vedľajších účinkov a ich vzťah k dávke.
- Stanoviť maximálnu tolerovanú radiačnú dávku intravenózne podávanej ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4 pacientom s rakovinou hlavy a krku.
- Študovať farmakokinetiky intravenózne podávanej ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4 u pacientov s rakovinou skvamózných buniek hlavy a krku.

- Sekundárnym cieľom bolo stanoviť predbežné terapeutické účinky ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4.

Nasledujúce ciele načrtnuté v protokole nemohli byť riešené v priebehu uskutočňovania testu. Vývoj programu so spojovníkovým chelatačným merkpto-acetyltriglycínom (MAG3), používaným na pripájanie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a ^{186}Re na monoklonálne protilátky, sa prerušil a tým sa test ukončil. Ďalší vývoj s BIWA 4 bude pokračovať použitím spojovníka merkptoacetylglucylglycyl-gama-aminobutyrát-tetrafluór-fenolového esteru (MAG2GABA-TFP).

- MTD na jednodávkové liečenie sa musela identifikovať pred tým, ako vstúpilo viac pacientov, aby sa definovala MTD na druhé liečenie so ^{186}Re -značenou hMAb BIWA 4.
- Navrhnuť bezpečnú dávku na prvú a následné infúzie so ^{186}Re -značenou hMAb BIWA 4 na ďalšie štúdie.
- Získať počiatočné výsledky pre dávkový režim na opakované dávkovanie.

2.2 Primárne premenné

- Bezpečnosť: klinické laboratórne testy, zhodnotenie ľudskej-anti-ľudskej-protilátky (HAHA), merania vitálnych znakov a negatívny účinky.
- Účinnosť: biotické biodistribučné údaje (len časť A) a rádioimunologické scintigrafické obrazy (časti A a B vrátane dozimetrie pre časť B testu).
- Farmakokinetické výsledky.

2.3 Sekundárne premenné

Sekundárnou premennou v štúdií bola reakcia nádoru (len časť B).

3. Plán skúmania

3.1 Celkový dizajn a plán štúdie – opis

Test sa uskutočňoval v dvoch častiach. Časť A hodnotila optimálnu dávku studenej BIWA 4 a kvantifikovala príjem nádorom, zatiaľ čo časť B skúmala maximálnu tolerovanú dávku ^{186}Re -BIWA 4.

3.1.1 Časť A

Táto časť klinického testu bola neriadenou štúdiou so zvyšujúcou sa dávkou v po sebe idúcich skupinách. Bola navrhnutá tak, aby poskytla počiatočné údaje o bezpečnosti a tolerovateľnosti jedinej infúzie ^{99m}Tc -značenej hMAb BIWA 4, aby sa skúmal vzor a úroveň biologickej distribúcie, a aby sa zaviedol farmakokinetický profil hMAb BIWA 4 u pacientov s rakovinou hlavy a krku. Tri proteínové dávky hMAb BIWA 4 sa použili v tejto časti A štúdie s tromi pacientmi, ktorí sa plánovali liečiť, na každej dávkovej úrovni.

Pacienti sa rutinne vyšetrovali oddelením otolaryngológie, aby sa určil rozsah nádoru. Toto zahŕňalo fyzické vyšetrovanie, počítačovú tomografiu (CT) alebo MRI skeny hlavy a krku a panendoskopi (voliteľne). Počas týchto procedúr sa odoberali vzorky tkanív, ktoré boli podozrivé na nádor, a skúmali sa prítomnosť karcinómu skvamózných buniek. Na základe výsledkov týchto vyšetrení sa pacienti určili na podstúpenie chirurgického zákroku, vrátane operácie krku.

Injektovala sa rádioaktívne značená protilátka a pacient sa pozoroval, či sa nevyskytnú negatívne účinky. Rádioimunologické scintigrafické skeny sa uskutočňovali 21 hodín po infúzii (p.i.), pred chirurgickým zákrokom. Pacienti sa podrobili chirurgickému zákroku 48 hodín (h) po infúzii rádioaktívne značenej hMAb BIWA 4. Patológ vyšetřil vzorku vyoperovanú z krku, aby určil presné zasiahnutie nádorom. Okrem toho sa meralo množstvo ^{99m}Tc v biopsiách z nádorového miesta (miest) a z normálnych tkanív v chirurgických vzorkách. Nádorové miesta a nádorom infiltrované uzliny sa vyšetrovali na prítomnosť CD44v6 antigénu prostredníctvom imunohistochemických techník. Prvých troja pacienti dostali 2 mg hMAb BIWA 4 značenej s 20 mCi ^{99m}Tc spolu s 23 mg neznačenej hMAb BIWA 4. Druhej skupine troch hodnotených pacientov sa podávali 2 mg hMAb BIWA 4 značenej s 20 mCi ^{99m}Tc spolu so 48 mg neznačenej hMAb BIWA 4 a tretej skupine sa podávali 2 mg značenej protilátky spolu s 98 mg neznačenej protilátky.

Farmakokinetické hodnotenia sa uskutočňovali v špecifikovaných časových bodoch.

3.1.2 Časť B

Táto časť klinického testu bola otvorenou neriadenou dávkovou eskalačnou štúdiou. Navrhla sa na hodnotenie bezpečnosti a tolerovateľnosti ^{186}Re -značenej

hMAb BIWA 4, aby sa určila maximálne tolerovaná dávka (MTD) na intravenózne podávanie ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4, a aby sa určili predbežné terapeutické účinky ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4 u pacientov s rakovinou hlavy a krku, pre ktorých neboli dostupné žiadne liečebné možnosti. Okrem toho sa hodnotil farmakokinetický profil ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4.

Všetci pacienti vstúpia do tejto časti testu dostali dávku hMAb BIWA 4, ktorá bola vybraná na základe výsledkov časti A tejto štúdie. hMAb BIWA 4 sa označila so vzrastajúcimi dávkami ^{186}Re . Na nižších dávkových hladinách (pozorovaná toxicita neprekročila stupeň 1) vstúpili dvaja pacienti na dávkovú skupinu, a na vyšších hladinách (stupeň toxicity 2) vstúpili minimálne traja pacienti na dávkovú skupinu. Všetci pacienti sa hodnotili na určenie bezpečnosti podávanej hMAb BIWA 4.

Pacienti sa rutinne vyšetrovali oddelením otolaryngológie, aby sa určil rozsah nádoru. Toto zahŕňalo fyzické vyšetrenie a CT alebo MRI skenovanie nádorových lokalít.

^{186}Re -značená protilátka sa injektovala so zvyšujúcimi sa radiačnými dávkami: pacienti v prvej dávkovej skupine dostali radiačnú dávku 20 mCi/m^2 , po ktorej dávka pre pacientov v následných dávkových skupinách sa zvyšovala o 10 mCi/m^2 , až kým sa nedosiahla MTD. Pacienti sa pozorovali, či sa nevyskytnú negatívne účinky. Uskutočňovali sa rádioimunologické scintigrafické skeny.

3.1.3 Štúdiové postupy pri každej vizite

3.1.3.1 Program vizity

a) Skriningová vizita

Pred vstupom do štúdie sa každý pacient skrinoval na spôsobilosť. Zaznamenali sa demografické údaje a medicínsky relevantná anamnéza, zaznamenala sa súbežná terapia a urobilo sa všeobecné fyzické vyšetrenie a zmerala sa telesná hmotnosť. Určilo sa Karnofského výkonnostné skóre. Musel byť získaný písomný informovaný súhlas. Pre ženy schopné pôrodu bol potrebný tehotenský test. Urobil sa elektrokardiogram s 12-olovom (ECG) a urobili sa laboratórne testy bezpečnosti krvi, ako aj moču. Odoberali sa aj krvné vzorky na

HAHA-testovanie. Urobil sa röntgen hrudníka a uskutočnilo sa stanovenie všetkých ochorení (CT/MRI, ušno-nosno-hrudné (ENT) vyšetrenie).

Na konci tejto vizity sa zhodnotili výsledky potrebných vyšetrení, overili sa inklúzne a exklúzne kritériá a zorganizoval sa chirurgický zákrok (len časť A).

b) Vizita 2: 1. až 7. deň štúdie

Časti A a B

Na prvý deň štúdie, ktorý nebol neskôr ako 3 týždne po skriningovej vizite, boli pacienti prijatí do nemocnice. Všetky potrebné základné laboratórne testy, ktoré neboli získané pri skriningovej vizite, sa museli urobiť a vyhodnotiť pred infúziou a museli byť splnené kritériá spôsobilosti. Zmerala sa telesná hmotnosť. Museli sa zaznamenať všetky paralelné terapie. Každá negatívna udalosť začínajúca po podpísaní písomného informovaného súhlasu musela byť zaznamenaná do pacientovho spisu a do prípadového formulára (CRP).

V deň ošetrovania sa pred podaním protilátky odobrala vzorka krvi na farmakokinetiku (vrátane stanovenia rozpustného CD44v6) a zaznamenali sa vitálne známky. Odobral sa moč za 0 až 4 hodiny, 4 až 8 hodín, 8 až 12 hodín a 12 až 24 hodín počas prvých 24 hodín a potom v 24 hodinových intervaloch až do 48 hodín po infúzii v časti A a 96 hodín po infúzii v časti B.

Protilátka sa podávala na oddelení nukleárnej medicíny alebo v určenej miestnosti v nemocnici. Protilátka sa musela podávať cez periférnu hornú okrajovú žilu tak proximálne, ako to len bolo možné. Vo všetkých prípadoch sa infúzia podávala počas 5 minút, po premytí s 10 ml fyziologického roztoku cez voľne prúdiaci kanál. Na získanie reprodukovateľných farmakokinetických výsledkov sa musela použiť striekačková pumpa. Preto bolo potrebné nariediť objem s 0,9% NaCl na 20 ml. Po tejto protilátkovej infúzii nasledovalo prepláchnutie s 10 ml fyziologického roztoku. Akákoľvek podozrivá extravazácia bola dokumentovaná v CRF a pacient sa podrobne opísal.

Dostupná bola pohotovostná jednotka s resuscitačným vybavením, anti-histamíny, kortikosteroidy a epinefrín boli na dosah, aby zabránili nožnej anafylaxii. Denne sa zaznamenávali nežiadúce účinky a zmeny v sprievodnej terapii.

Časť A

Vitálne znaky sa zaznamenávali po 10, 60 a 120 minútach p.i. 21, 48 a 144 hodín po infúzii sa odoberali krvné vzorky na testovanie bezpečnosti a CD44v6.

Krvné vzorky na farmakokinetiky sa odoberali na konci infúzie a 5, 10, 30 minút a 1, 2, 4, 16, 21, 48, 72 hodín po konci infúzie a na 7. deň (144 hodín p.i. vrátane vzoriek séra na stanovovanie HAHA a rozpustného CD44v6).

Moč na farmakokinetiky sa odoberal za 0 až 4 hodiny, 4 až 8 hodín, 8 až 12 hodín a 12 až 24 hodín v priebehu prvých 24 hodín a 24 hodinová vzorka do 48 hodín p.i.

Scintigrafické zobrazenia celého tela sa robili priamo po infúzii a 21 hodín po infúzii. 21 hodín po infúzii sa okrem zobrazenia celého tela robila aj jednofotónová emisná počítačová tomografia (SPECT) a rovinné zobrazenia hlavovej a krčnej oblasti.

Pacient sa operoval 48 hodín p.i. a ostal v nemocnici v pooperačnej starostlivosti.

Na 7. deň (144 hodín p.i.) sa odoberali bezpečnostné vzorky moču.

Denne sa zaznamenávali negatívne účinky a zmeny v sprievodnej terapii.

Časť B

Vitálne znaky sa zaznamenávali po 10, 60, 120 a 240 minútach po infúzii. 21, 48 a 144 hodín po infúzii sa odoberali krvné vzorky na testovanie bezpečnosti a CD44v6. Krvné vzorky na stanovenie HAHA sa odoberali 144 hodín po infúzii. Aj vzorka moču na bezpečnosť sa odoberala 144 hodín p.i.

Vzorky krvi na farmakokinetiky sa odoberali na konci infúzie a 5 a 30 minút a 1, 2, 4, 16, 21, 48, 72 hodín po konci infúzie a na 7. deň (144 hodín p.i.) po infúzii. Pôvodne plánovaná vzorka po 10 minútach sa vynechala kvôli zmenene I.

Moč na farmakokinetiky sa odoberal za 0 až 4 hodiny, 4 až 8 hodín, 8 až 12 hodín a 12 až 24 hodín v priebehu prvých 24 hodín a 24 hodinové vzorky do 96 hodín p.i.

Scintigrafické zobrazenia celého tela sa robili priamo po, 21, 48, 72 a 144 hodín p.i. a voliteľne dva týždne p.i., ak to umožňovala sčítacia štatistika.

Plošné zobrazenia oblasti hlavy a krku sa robili 21, 48 (voliteľne), 72 a 144 hodín p.i. a voliteľne dva týždne p.i., ak to umožňovala sčítacia štatistika.

SPECT zobrazovanie sa uskutočňovalo len sedemdesiatdva hodín po infúzii.

Denne sa zaznamenávali negatívne účinky a zmeny v sprievodnej terapii.

Po troch dňoch pacienti mohli opustiť nemocnicu.

c) Vizita 3: Sledovacie vizity

Časť A

Pacienti navštívili ambulantnú kliniku šesť týždňov po infúzii. Uskutočnilo sa fyzické vyšetrenie, odobrali sa bezpečnostné vzorky krvi a moču, zmerala sa telesná hmotnosť a vitálne známky a zaznamenali sa negatívne účinky. Získali sa aj krvné vzorky na farmakokinetiky, stanovenie HAHA a rozpustného CD44v6. Pre ženy s možnosťou rodiť bol potrebný tehotenský test. Zaznamenal sa sled negatívnych účinkov. Zaznamenali sa akékoľvek zmeny v sprievodnej terapii.

Časť B

Pacienti navštevovali ambulantnú kliniku týždenne aspoň šesť týždňov, aby sa zaznamenávali negatívne účinky a odoberali bezpečnostné krvné vzorky. Krvné vzorky na farmakokinetiky sa odoberali 240 hodín a 336 hodín po infúzii. Pôvodne plánovaná vzorka 6 týždňov p.i. sa vynechala kvôli zmene 1. Zaznamenávali sa aj akékoľvek zmeny v sprievodnej terapii. Hodnotenie ochorenia uskutočnené na základnej úrovni sa opakovalo šesť týždňov po infúzii a, ak bolo indikované, aj potom (hodnotenie sa uskutočňovalo po šiestich týždňoch a nie po štyroch týždňoch ako je uvedené raz v protokole). Šesť týždňov po infúzii sa odobrali krvné vzorky na bezpečnosť, stanovenie HAHA a rozpustného CD44v6, zaznamenali sa vitálne znaky a odmerala sa telesná hmotnosť. V priebehu tejto návštevy sa urobilo fyzické vyšetrenie. Odobrala sa bezpečnostná vzorka moču. U žien schopných pôrodu bol potrebný tehotenský test.

d) Vizity 4 a 5: druhé ošetrenie (Časť B)

Druhé ošetrenie načrtnuté v originálnom protokole sa neuskutočnilo, kvôli predčasnému ukončeniu testu, pretože sa zmenil linker. Pacienti, ktorí reagovali na

prvú dávku ^{186}Re -BIWA 4, boli spôsobilí na druhé podávanie. Podrobili sa rovnakému režimu vizít ako pre prvé podávanie.

3.2 Diskusia dizajnu štúdie vrátane voľby kontrolných skupín

Cieľom predloženej štúdie bolo zhodnotiť preferenčnú akumuláciu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -značenej BIWA 4 v nádore (časť A) a vyhodnotiť maximálnu tolerovanú dávku ^{186}Re -BIWA 4 (časť B), ako aj farmakokinetiky BIWA 4 u pacientov trpiacich na pokročilú rakovinu hlavy a krku (časti A a B).

Otvorený dizajn sa použil ako všeobecná prax u týchto typov fázy I testov v onkológii. Minimálne dvaja pacienti s nižšími radiačnými dávkami a traja pacienti s vyššími radiačnými dávkami sa zahrnuli do časti B testu. V prípade výskytu stupňa 4 bežných toxických kritérií (CTC) hematológie a stupňa 3 nehematologickej toxicity súvisiacich s liekmi sa ošetrili ďalší traja pacienti s príslušnými dávkami (ďalšie podrobnosti o dávkach sú uvedené v častiach 3.4.4 a 3.4.5).

Podávaná dávka BIWA 4 bola založená na predchádzajúcich výsledkoch s mMAb BIWA 1 indikujúcich, že výsledkom dávky 50 mg je vysoký a selektívny príjem nádorovým tkanivom s nízkym príjmom do iných ako nádorových tkanív a na výsledkoch z časti A testu (pozri aj časť 3.4.4.1).

Východisková dávková rádioaktivita pre zvolenú rádioaktivitu bola založená na predchádzajúcich údajoch naznačujúcich, že dávka 20 mCi/m^2 môže byť bezpečnou dávkou (pozri aj časť 3.4.4.2).

Kritériá účinnosti, ktoré sa aplikovali, ako aj kritériá na stanovenie tolerovateľnosti, sú dobre zavedené pre túto populáciu pacientov a môžu byť hodnotené aj pri otvorenom dizajne.

3.3 Selekcia populácie na štúdiu

3.3.1 Kritériá na zahrnutie

- Pacienti s histologickým potvrdením karcinómu skvamózných buniek hlavy a krku.
- Pacienti určený na chirurgický zákrok prostredníctvom disekcie krku (časť A) alebo
- Pacienti buď s lokálnym a/alebo regionálnym opakujúcim sa ochorením, pre ktoré neboli dostupné liečebné ošetrovacie možnosti, alebo so vzdialenými metastázami.

Nádorové depozity museli byť merateľné buď klinicky, alebo jednou alebo viacerými rádiologickými technikami (CT, MRI, kostná scintigrafia). Pretože sa očakávalo, že RIT bude účinnejší v nádorových depozitoch s menšou veľkosťou, uprednostňovaní boli pacienti s léziami merajúcimi < 3 cm v najväčšom rozmere (časť B).

- Pacienti starší ako 18 rokov.
- Pacienti mladší ako 80 rokov.
- Pacienti, ktorí dali „písomný informovaný súhlas“.
- Pacienti, u ktorých sa očakávalo, že budú žiť najmenej 3 mesiace.
- Pacienti v dobrom výkonnostnom stave: Karnofsky > 60

3.3.2 Vylučovacie kritériá

- Život ohrozujúca infekcia, alergická dispozícia, zlyhanie orgánu (bilirubín > 30 $\mu\text{mol/l}$ a/alebo kreatinín > 150 $\mu\text{mol/l}$) alebo dôkaz o nedávnom infarkte myokardu na ECG alebo nestabilná angína pectoris.
- Ženy pred menopauzou (posledná menštruácia $\leq$ 1 rok pred začiatkom štúdie):
 - nie chirurgicky sterilné (hysetrektómia, ligácia vaječníkov) a
 - nepraktizujúce prijateľný spôsob antikoncepcie (alebo neplánujú v ňom pokračovať počas štúdie). Prijateľné spôsoby antikoncepcie zahŕňajú orálnu antikoncepciu, implantovateľné alebo injektovateľné antikoncepčné prostriedky.
- Ženy s pozitívnym sérovým tehotenským testom na základnej úrovni.
- Chemoterapia alebo rádioterapia v rámci 4 týždňov pred zaradením do štúdie.
- Počet bielych krviniek < 3000/ mm^3 , počet granulocytov < 1500/ mm^3 alebo počet krvných doštičiek < 100000/ mm^3 .
- Hematologické poruchy, kongestívne zlyhanie srdca, bronchiálna astma, potravinová alebo kontaktná alergia, závažná atopia alebo alergia.

3.3.3 Vyňatie subjektov z terapie alebo hodnotenia

3.3.3.1 Kritériá na ukončenie ošetrovania subjektu

Infúzia sa musela ukončiť hneď, keď sa u pacienta vyvinula tachykardia (pulz vyšší ako 120 za minútu), hypotenzia (tlak krvi nižší ako 100 mm Hg, systolický), núdzová respirácia, bolesť v hrudi alebo akékoľvek symptómy, ktoré pacient nemohol tolerovať.

3.3.3.2 Odpadnutia a stiahnutia

Subjekty mohli kedykoľvek slobodne prerušiť svoju účasť na tejto štúdii.

Hodnotenie rádioaktívne značenej hMAb BIWA 4 sa nepovažovalo za uskutočnené, keď pacient predčasne odstúpil od štúdie kvôli dobrovoľnému stiahnutiu sa. Prípád sa považoval za nezhodnotiteľný, ak neboli dostupné adekvátne sledovacie informácie. Plánovala sa náhrada všetkých nezhodnotiteľných pacientov.

Ak pacient prerušil štúdiu v skorom štádiu, musel sa dôvod zdokumentovať v CRF. Ak sa pacient nevrátil na odoberanie post-infúzných krvných vzoriek na HABA determináciu alebo farmakokinetiky, dôvod musel byť zdokumentovaný. Ak sa u pacienta vyvinuli závažné vedľajšie účinky, režim štúdie musel pokračovať s čo najmenšími odchýlkami v závislosti na závažnosti vedľajších účinkov (SAE).

3.4 Ošetrenia

3.4.1 Poskytované ošetrenia

Pacientom v časti A sa podávala ^{99m}Tc -BIWA 4 v rádioaktívnej dávke 20 mCi. BIWA 4 bola podávaná v dávkach 25 mg, 50 mg alebo 100 mg, každá trom pacientom. Liek sa podával intravenózne ako jedna dávka.

Pacienti v časti B dostávali 50 mg BIWA 4 značenej s réniom 186. Najnižšia rádioaktívna dávka bola 20 mCi/m², ktorá sa postupne zvyšovala na dávkovú úroveň 10 mCi/m². Testovaný liek sa podával intravenózne ako jedna dávka.

3.4.2 Identita skúmaného produktu

Časť A:

Látka (INN):	BIWA 4 (bivatuzumab)
Farmaceutická forma:	roztok pre injekciu
Šifrové číslo:	BIWA 4 LOI 99 1D 1A
Číslo vzorky:	B981101
Zdroj:	Boehringer Ingelheim Pharma KG
Sila jednotky:	5 mg/ml
Denná dávka:	25 mg
Trvanie používania:	jedna dávka

Spôsob podávania: intravenózne
Dávkovanie: infúzia počas piatich minút

Látka (INN): BIWA 4 (bivatuzumab)
Farmaceutická forma: roztok pre injekciu
Šifrové číslo: BIWA 4 LOI 99 1D 1A
Číslo vzorky: B981101
Zdroj: Boehringer Ingelheim Pharma KG
Sila jednotky: 5 mg/ml
Denná dávka: 50 mg
Trvanie používania: jedna dávka
Spôsob podávania: intravenózne
Dávkovanie: infúzia počas piatich minút

Látka (INN): BIWA 4 (bivatuzumab)
Farmaceutická forma: roztok pre injekciu
Šifrové číslo: BIWA 4 LOI 99 1D 1A
Číslo vzorky: B981101
Zdroj: Boehringer Ingelheim Pharma KG
Sila jednotky: 5 mg/ml
Denná dávka: 100 mg
Trvanie používania: jedna dávka
Spôsob podávania: intravenózne
Dávkovanie: infúzia počas piatich minút

BIWA 4 sa podávala ako rádioaktívny konjugát spojený s ^{99m}Tc . Spojovníkovou molekulou bol MAG3. MAG3 sa kúpil od Mallinckrodt, Petten, Holandsko.

^{99m}Tc sa objednal lokálne prostredníctvom laboratória, kde sa pripravoval rádioimunologický konjugát (laboratórium Prof. Dr. van Dongena, Oddelenie nádorovej biológie, katedra otorinolaryngológie/chirurgie hlavy a krku, Vrije

Universiteit University Medical Center, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, Holandsko).

Časť B

Látka (INN):	BIWA 4 (bivatuzumab)
Farmaceutická forma:	roztok pre injekciu
Šifrové číslo:	BIWA 4 LOI 99 1D 1A
Číslo vzorky:	B981101
Zdroj:	Boehringer Ingelheim Pharma KG
Sila jednotky:	5 mg/ml
Denná dávka:	50 mg
Trvanie používania:	jedna dávka
Spôsob podávania:	intravenózne
Dávkovanie:	infúzia počas piatich minút

BIWA 4 sa podávala ako rádioaktívny konjugát spojený s ^{186}Re . Spojovníkovou molekulou bol MAG3. MAG3 sa kúpil od Mallinckrodt, Petten, Holandsko.

^{186}Re sa objednal lokálne prostredníctvom laboratória, kde sa pripravoval rádioimunologický konjugát (laboratórium Prof. Dr. van Dongena, Oddelenie nádorovej biológie, katedra otorinolaryngológie/chirurgie hlavy a krku, Vrije Universiteit University Medical Center, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, Holandsko).

3.4.2.1 Vlastnosti a kvalita testovaného lieku

Vlastnosti protilátky

Antigén rozoznávaný prostredníctvom hMAb BIWA 4 je transmembránový glykoproteín lokalizovaný na vonkajšom bunkovom povrchu a je internalizovaný len v malom rozsahu (< 20 %). Ďalšia analýza odhalila, že hMAb BIWA 4 rozoznáva epitop kódovaný variantovým exónom v6 z CD44. Ukázalo sa, že antigén exprimujú všetky primárne nádory hlavy a krku (n = 54) a väčšina buniek vo vnútri týchto nádorov. Porovnateľná expresia sa pozorovala v šesťdesiatich deviatich nádorom

ingiltrovaných lymfatických uzlinách zo vzoriek vyrezaných z krku (R97-2054). Vzor reaktivity hMAb BIWA 4 v ľudských normálnych tkanivách je uvedený v prílohe III protokolu. Zistilo sa, že reaktivita hMAb BIWA 4 je v podstate obmedzená na skvamózne epitely. Ako bolo demonštrované v predchádzajúcej RIS štúdii s myšacou monoklonálnou protilátkou (mMAb) BIWA 1, reaktivita s normálnym skvamóznym epitelom nebola limitujúcim faktorom na jej využitie pri nádorovom zacielení, čo sa týka príjmu nádorom.

Kvalitatívna kontrola ^{99m}Tc - alebo ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4

Protilátka sa označila s ^{99m}Tc alebo ^{186}Re v súlade s metódou opísanou vo Fritzberg a ďalší (R96-2106: pozri prílohu IV protokolu), ktorá bola modifikovaná podľa Visser a ďalší (R96-2094) a Van Gog a ďalší (R96-2111).

Procedúry rádioaktívneho označovania hMAb BIWA 4 s ^{99m}Tc a ^{186}Re sa hodnotili s ohľadom na finálnu kvalitu pripraveného konjugátu. V piatich nezávislých označovacích experimentoch, uskutočňovaných v súlade s postupom opísaným v prílohe IV protokolu, sa zistilo percento značky naviazanej na protilátku 96 až 99 %.

V tomto klinickom skúmaní sa rádiochemická čistota každej pripravenej ^{99m}Tc - alebo ^{186}Re -značenej protilátkovej vzorky hodnotila prostredníctvom chromatografie na tenkej vrstve (TLC) alebo vysoko výkonnej kvapalnej chromatografie (HPLC) a prostredníctvom pasážovania cez PD-10 gélovú filtračnú kolónu, a musela byť vyššia ako 90 %, aby sa mohla podávať pacientovi.

Imunoreaktívna frakcia každej $^{99m}\text{Tc}/^{186}\text{Re}$ -značenej protilátkovej vzorky sa skontrolovala po podaní použitím uznaných metód a musela byť vyššia ako 60 %. V stručnosti, analýzy sa v podstate uskutočňovali podľa postupu opísaného v Lindmo a ďalší (R96-2104). UM-SCC 11B bunky (ľudský hrtanový karcinóm), obsahujúce CD44v6 antigén, sa fixovali v 0,1% glutaraldehyde. Urobilo sa šesť riedení v rozsahu od 5×10^6 buniek na skúmavku až $3,1 \times 10^5$ buniek na skúmavku, s 1% hovädzím sérovým albumínom (BSA) vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku (PBS).

Do skúmaviek sa pridala ^{99m}Tc -značená s hodnotou 80000 impulzov za minútu (cpm) alebo ^{186}Re -značená hMAb BIWA 4 s hodnotou 10000 cpm a inkubovalo sa cez noc pri laboratórnej teplote.

Do poslednej vzorky sa pridala nadbytok neznačenej hMAb BIWA 4, aby sa určilo nešpecifické viazanie. Bunky sa scentrifugovali a určila sa rádioaktivita v pelete a supernatante na gama snímači a vypočítalo sa percento naviazanej a voľnej rádioaktívne značenej MAb (LKB-Wallac 1218 CompuGamma).

Údaje sa graficky analyzovali v modifikovanom Lineweaver Burk grafe a imunoreaktívna frakcia sa určila prostredníctvom lineárnej extrapolácie na podmienky reprezentujúce neohraničený antigénový nadbytok.

V prípade, že sa nedosiahla vyhodnocovacia úroveň 60 % v tomto väzobnom teste, príprava infúzie sa prehodnotila v druhom väzobnom teste. Na tento účel sa protilátkový prípravok označil so ^{131}I . Imunoreaktívna frakcia aspoň v jednom z týchto dvoch testov musela byť vyššia ako 60 % pre každého pacienta, aby bol zhodnotiteľný, a aby štúdia pokračovala s ďalším pacientom.

Protilátková bezpečnosť

BIWA 4 používaná na rádioaktívne značenie s ^{99m}Tc a ^{186}Re v tejto štúdii je dobre charakterizovaným monoklonálnym protilátkovým produktom, ktorý bol vyrobený kultivačnou fermentáciou vaječníkových buniek čínskeho škrečka (CHO). Základná bunková banka sa zaviedla v podmienkach dobrej výrobnéj praxe (GMP) a podrobne sa skúmal je mikrobiologický stav (baktérie, plesne, mykoplazmy), ako aj stav vírusov (náhodné vírusy, retrovírusy). S výnimkou endogénnych retrovírusov, o ktorých je známe, že sú prítomné vo všetkých CHO bunkách, sa nedetegovali žiadne kontaminanty.

V súlade s Potravinovou a liekovou správou (FDA) z roku 1994 „Body, ktoré treba brať do úvahy“, čo je dokument o MAb používaných v klinických štúdiách vo fáze I u pacientov s rakovinou, štandardný zostupný purifikačný proces, ktorý sa potvrdil ako účinný na odstránenie vírusov, sa aplikoval na purifikáciu BIWA 4 materiálu. Do hodnotenia boli zahrnuté štyri modelové vírusy (MuLV, PsRV, REO-3, SV 40). Koncentrovaná objemová izolácia sa skúmala na titer retrovírusov, aby sa zaistilo to, aby bol následný zostupný purifikačný proces schopný adekvátne

odstrániť retrovírus. Údaje o odstránení endotoxínov boli v rámci akceptačných limitov ($\leq 0,01$ EU/mg) a boli dostupné pre objemový produkt. Okrem toho sa úspešne uskutočnilo pyrogénne testovanie v súlade s návodom európskej farmakopoei.

Finálna hMAb BIWA 4 na použitie na ďalšie rádioaktívne značenie sa analyzovala veľmi podrobne a dokázalo sa, že je vysoko čistá (SDS PAGE, izoelektrická fokusácia), pričom sterilný roztok obsahuje minimálne hladiny endotoxínov ($\leq 0,01$ EU/mg). Výsledky testovania pyrogénnosti boli v súlade so štandardnom podľa európskej Farmakopoei. Rovnosť BIWA 4 produktu z výroby predklinických a klinických dodávok sa demonštrovala prostredníctvom analytických výsledkov.

Rádioaktívne značenie hMAb BIWA 4 s ^{99m}Tc alebo ^{186}Re sa uskutočňovalo na oddelení otolaryngológie a chirurgie hlavy a krku v Vrije Universiteit University Medical Center podľa štandardných operačných postupov (SOPs). Sterilita finálneho produktu bola garantovaná. Absencia endotoxínov sa testovala v priebehu hodnotiacich kôl. Na podávanie lieku pacientovi v univerzitnej nemocnici Nijmegen sa príslušné množstvo rádioaktívnej hMAb BIWA 4 transportovalo v špeciálnej nádobe priamo po príprave do študijného centra v Nijmegene. Mohlo ubehnúť 24 hodín medzi značením zlúčeniny a jej podaním pacientovi.

Priradenie jednotlivých réniových vzoriek pacientom je uvedené v prílohe 16.1.6.

3.4.2.2 Balenie, značenie a dodávanie

BIWA 4 bola dodávaná firmou Boehringer Ingelheim Holandsko. Produkovaná bola firmou Boehringer Ingelheim, Nemecko použitím GMP výrobných a purifikačných postupov a bola plnená do liekoviek ako sterilný nepyrogénny roztok obsahujúci 25 mg hMAb BIWA 4 v 5 ml izotonického PBS, pH 7,2. Príklady označení liekoviek s natívnymi a aj značenými protilátkami sú zahrnuté v klinickom testovacom manuáli.

Jedna vzorka s celkovým množstvom 27 g hMAb BIWA 4 bola pripravená a naplnená do liekoviek. Značenie hMAb BIWA 4 s ^{99m}Tc alebo so ^{186}Re sa

uskutočňovala v certifikovanom nukleárnom laboratóriu triedy B vo Vrije Universiteit University Medical Center, Amsterdam.

3.4.2.3 Uskladňovacie podmienky

Neznačená hMAb BIWA 4 sa musela uskladňovať v nemocničnej lekárni v obmedzene dostupnej oblasti na študovanie materiálov pri monitorovanej teplote medzi +2 a +8 °C.

3.4.3 Spôsob priradovania subjektov do ošetrovacích skupín

Nepoužila sa žiadna randomizácia. Pacienti sa priradovali do rozličných dávkových skupín podľa postupnosti, ako boli zaradovaní.

3.4.4 Výber dávok v štúdií

3.4.4.1 Výber BIWA 4 dávok

Časť A

Keďže hMAb BIWA 4 nikdy predtým nebola podávaná pacientom, bolo nevyhnutné mať informácie o jej bezpečnosti a biologickej distribúcii pred začiatkom RIT testov. Jej biologická distribúcia mohla silno závisieť na MAb dávke použitej na zacielenie nádoru a musela byť opatrne zvažovaná. Na základe MAb proteínových dávkových eskalačných štúdií s nízko afinitnou anti-CD44v6 mMAb U36 a vysoko afinitnou anti-CD44v6 mMAb BIWA 1 sa odvodilo, že optimálna dávka je v rozsahu 25 až 100 mg, pričom 50 mg je optimum pre mMAb U36.

Na potvrdenie toho, že táto dávka je adekvátna aj na sprostredkovanie afinity hMAb BIWA 4 a na získanie počiatočnej informácie o variabilite príjmu nádorom sa hodnotila biologická distribúcia s 25, 50 a 100 mg celkovej hMAb BIWA 4 a traja hodnotení pacienti sa plánovali na ošetrovanie pre každú z týchto dávkových hladín.

Všetci hodnotení pacienti dostali jednu intravenóznú infúziu 2 mg hMAb BIWA 4 označenú s 20 mCi ^{99m}Tc , čo sa meralo radiačným kalibračným systémom tesne pred podaním. Pacienti určení na obdržanie 25 mg, 50 mg alebo 100 mg, dostali 23, 48, respektíve 98 mg neoznačenej hMAb BIWA 4 podávanej spolu s týmito 2 mg hMAb BIWA 4 označenej s 20 mCi ^{99m}Tc .

Výber BIWA 4 dávky pre časť B

Na teoretických základoch sa 50mg hMAb BIWA 4 dávka vypočítala ako najvhodnejšia pre vývoj. Časť A tejto štúdie sa uskutočňovala na to, aby sa potvrdil preferenčný príjem hMAb BIWA 4 nádorom pri troch testovaných dávkových úrovniach (25 mg, 50 mg a 100 mg). Očakávalo sa, že pomer príjmu nádorom (vyjadrený ako percento injektovanej dávky na kilogram, % ID/kg) a nenádorového príjmu pre tieto tri dávkové hladiny by sa nemal veľmi líšiť. Ak by tomu bolo tak, hMAb BIWA 4 dávka na použitie pre časť B štúdie by bola 50 mg. Avšak, ak by existoval klinicky relevantný rozdiel medzi týmito dávkovými úrovňami, ktorý by favorizoval jednu úroveň voči ostatným, bola by sa vybrala dávková úroveň s najlepším vzorom biologickej distribúcie.

V tomto prípade bol klinicky relevantný rozdiel definovaný ako rozdiel pomeru nádorového (priemerný nádorový príjem) príjmu a príjmu kostnou dreňou (priemer príjmu kostnou dreňou = bunková frakcia a supernatant) vyšší ako 50 %.

Konečnou dávkou, ktorá sa vybrala, bolo 50 mg hMAb BIWA 4, na základe výsledkov v časti A.

3.4.4.2 Výber radiačnej východiskovej dávky

Časť B:

hMAb BIWA 4 dávka vybraná v časti A štúdie sa označila so zvyšujúcimi sa dávkami ^{186}Re .

Bolo zverejnené, že maximálna tolerovaná dávka ^{186}Re -značenej myšacej MAb NR-LU-10 je 90 mCi/m^2 pre intenzívne predošetrovaných pacientov, zatiaľ čo dávku limitujúca myelosupresia je pozorovaná pri 120 mCi/m^2 . Pri chimérnej MAb NR-LU-13, rozoznávajúcej rovnaký antigén ako NR-LU-10, nastala reverzibilná myelosupresia pri 60 mCi/m^2 . V štúdii s cMAb U36, uskutočňovanej na Vrije Universiteit University Medical Center, dávku limitujúca myelosupresia bola pozorovaná pri 41 mCi/m^2 .

Vzhľadom na vyššie uvedené výsledky bola radiačná dávka 20 mCi/m^2 , podávaná ako ^{186}Re -značená hMAb BIWA 4, považovaná za bezpečnú východiskovú dávku.

Dávka sa postupne zvyšovala s prírastkami 10 mCi/m^2 . Dvaja hodnotení pacienti vstúpili s najnižšími dávkovými hladinami. Keď sa pozorovala toxicita súvisiaca s liekom v $\geq$ stupni 2 podľa CTC, ošetrovali sa minimálne traja pacienti pre dávkovú hladinu.

Pred prístupom pacientov k nasledujúcej vyššej dávkovej úrovni muselo byť isté, že pacienti pri prebiehajúcej dávkovej hladine nevykazujú dávkovú limitujúcu toxicitu (DLT) definovanú ako: CTC nehematologická toxicita stupňa 3 závislá od lieku alebo CTC hematologická toxicita stupňa 4 závislá od lieku, s výnimkou nauzey a zvracania bez adekvátnej antiemetickej liečby. Za týmto účelom sa všetci pacienti s takouto prebiehajúcou dávkovou hladinou museli pozorovať dostatočne dlho na to, aby bolo isté, že možná indukovaná toxicita je reverzibilná.

Keď pri prebiehajúcej dávkovej hladine jeden pacient pocítil DLT, počet pacientov ošetrovaných na tejto dávkovej hladine sa zvýšil na maximálne šesť pacientov. Keď jeden zo šiestich pacientov pocítil DLT, dávka sa zvýšila na nasledujúcu hladinu. Keď dvaja alebo viacerí pacienti pocítili DLT, nasledujúca dávková hladina sa expandovala (ak to už predtým nebolo urobené) na celkovo šesť pacientov, aby sa stanovila MTD a bezpečná odporúčaná dávka pre fázu II.

Pôvodne sa plánovalo, že v prípade prijateľnej toxicity (menej ako dvaja pacienti s DLT) pri danej dávkovej hladine, by mohli pristúpiť ďalší dvaja pacienti, ktorí by dostali túto dávku a zvyšujúcu sa, nižšiu druhú dávku. Tento plán nebol uskutočnený kvôli zmene spojovníka. MAG3 bude nahradený MAG2GABA-TFP, porovnateľným spojovníkom, ale s pohodlnejším postupom na pripájanie. Súčasný vývojový program s MAG3 sa ukončil.

Alternatívne, pacienti, ktorí reagovali na a tolerovali prvé podanie $^{186}\text{Re-BIWA}$ 4, boli vhodní na druhé podanie dávky 50 mCi/m^2 $^{186}\text{Re-BIWA}$ 4.

3.4.5 Výber a načasovanie dávky pre každý subjekt

3.4.5.1 Dávkovací a ošetrovací režim

Výskumníci umožnili, aby bol testovaný liek podávaný v akomkoľvek čase. Avšak čas, ktorý uplynul medzi rádioaktívnym značením a podaním, nemal prekročiť 24 hodín.

3.4.6 Zaslepovanie

Toto bol otvorený neriadený test. Nerobilo sa žiadne zaslepovanie.

3.4.7 Predchádzajúca a paralelná terapia alebo procedúry

3.4.7.1 Záchranná medikácia a ďalšia liečba (liečby)

Anafylaxia sa považovala za najzávažnejší potenciálny vedľajší účinok a bolo nariadené okamžité ukončenie protilátkovej infúzie a zavedenie príslušných resuscitačných prostriedkov. Predbežnými opatreniami, ktoré sa museli uskutočniť, boli: resuscitačné vybavenie v dosahu: anti-histaminiká, kortikosteroidy a epinefrín. Akýkoľvek pacientovi, ktorý mal tento typ negatívnej reakcie, už nemohol dostať ďalšiu monoklonálnu protilátku.

Pacientom bolo umožnené podrobovať sa inému ošetrovaniu (ošetreniam), buď kvôli indikácii štúdie, alebo pre nepríbuzné ochorenia, za predpokladu, že boli splnené inkluzívne a exkluzívne kritériá. Všetky paralelné terapie museli byť zaznamenané v CRF.

V prípade závažnej hematologickej toxicity (CTC stupeň 4) bola povolená cytokinová intervencia alebo iné metódy na zmiernenie toxicity kostnej drene.

3.4.7.2 Obmedzenia

Ďalšia chemoterapia alebo rádioterapia nebola povolená a posledná chemoterapia alebo rádioterapia musela byť ukončená viac ako 4 týždne pred zahrnutím do štúdie. Všetky predchádzajúce chemoterapie a rádioterapie boli zaznamenané v CRF.

3.4.8 Prispôsobenie sa liečbe

Študovaný liek sa podával ako jedna intravenózna infúzia. Prispôsobenie sa overilo farmakokinetickými hodnoteniami a s rádioimunologickými scintigrafickými obrazmi.

3.5 Účinnosť/klinická farmakológia a bezpečnostné premenné

3.5.1 Účinnosť/farmakodynamiky a stanovované miery bezpečnosti a vývojový diagram

Vývojové diagramy:

Časť A

Skúmania uskutočňované v časti A a príslušné časy sú podrobne uvedené v nižšie znázornenom vývojovom diagrame. Opisy skúmaní sú uvedené v nasledujúcich častiach:

Tabuľka 3.5.1:1

Vývojový diagram: Časť A: Biodistribučná štúdia s ^{99m}Tc-značenou hMAb BIWA 4

	Vizita 1	Vizita 2						Vizita 3
	Skríningová vizita*	Deň 1*		Deň 2	Deň 3	Deň 4	Deň 7	Ďalšie sledovanie týždeň 6
		pred injekc.	po injekc.					
Podpísaný informovaný súhlas	x							
Demograf. údaje	x							
Paralel. terapia	x	x	x	x	x	x	x	X
Lieková anamnéza	x							
Fyzické vyšetrenie	x							
ECG	x							
Röntgen hrudníka	x							
Analýza bezpečnosti krvi	x ¹	x ¹		x ¹	x ¹		x ¹	x ¹
Analýza bezpečnosti moču	x						x	x
Tehotenský test	x						x	x
Stanovenie HAHA	x ²						x ²	x ²
ENT vyšetrenie	x							
CT alebo MRI	x							
In-/exkluzívne kritériá	x							
Negatívne účinky		x	x	x	x	x	x	X
Vitálne známky	x ³	x ³	x ³					x ³
Telesná hmotnosť	x	x						x
Imunoscintigrafia:								
- Sken celého tela			x ⁴	x ⁴				
- Plošný sken				x ⁵				
- SPECT sken				x ⁵				
Farmakokinetiky:								
Krvné vzorky		x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶	6
Odoberanie moču		x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶			
Sérový rozpustný CD44v6		x ⁷		x ⁷	x ⁷		x ⁷	6
Chirurgický zákrok					x			

- *: Predinfúzne hodnotenia by sa nemali uskutočniť viac ako 3 týždne pred skutočnou infúziou.
- x¹: Krvné vzorky sa testovali na: glukózu, sodík, draslík, vápnik, chlorid, kreatinín, celkový proteín, albumín, sérovú glutámovú oxaloctovú transaminázu (sGOT), sérovú glutámovú pyruvát transaminázu (sGPT), alkalickú fosfatázu, gamaglutaryl transpeptidázu (GGT), bilirubín, močovinu, kyselinu močovú, tyroidný stimulujúci hormón (TSH), hemoglobín (Hb), hematokrit (Ht), priemerný korpuskulárny objem (MCV), retikulocyty, leukocyty, neutrofily, pásy, lymfocyty, bazoily, eozinofily, monocyty a krvné doštičky, pri prvej skrínigovej vizite alebo v deň 1 pred infúziou, 21, 48 a 144 hodín po infúzii a šesť týždňov po infúzii (p.i.).
- x²: HAHA sa stanovovalo v sérovej vzorke získanej pri skrínigovej vizite, po jednom týždni (144 hodín) a po šiestich týždňoch p.i.
- x³: Vitálne známky sa hodnotili pri skrínigovej vizite, pred infúziou, 10, 60 a 120 minút po infúzii a po 6 týždňoch.
- x⁴: Sken celého tela sa urobil okamžite po infúzii a 21 hodín p.i.
- x⁵: SPECT sken a plošný sken sa uskutočnil raz, 21 hodín p.i.
- x⁶: Vzorky krvi na farmakokinetiky sa získali pred infúziou, na konci infúzie, 5, 10, 30 minút; 1, 2, 4, 16, 21, 48, 72 a 144 hodín po infúzii a šesť týždňov p.i. Krvné vzorky sa odoberali na s enzýmom spojený imunologický absorbný test (ELISA) a na meranie rádioaktivity (podrobnosti pozri v časti 9.5.4.1). Moč sa odoberal za 0 až 4 hodiny, 4 až 8 hodín, 8 až 12 hodín a 12 až 24 hodín počas prvých 24 hodín a v 24-hodinových vzorkách v zostávajúcom čase, až do 48 hodín po infúzii.
- x⁷: Rozpustný CD44v6 sa meral zo sérovej vzorky získanej pred infúziou, 21, 48 a 144 hodín p.i. a šesť týždňov p.i.
- 6: Týždeň 6

Časť B

Uskutočňované skúmania a príslušné časy sú uvedené v nižšie uvedenom vývojovom diagrame. Jednotlivé vyšetrenia sú opísané podrobnejšie v nasledujúcich častiach

Tabuľka 3.5.1: 2

Vývojový diagram časť B: Dávková eskalačná štúdia so ¹⁸⁶Re-značenou hMAb BIWA 4

	Vizita 1	Vizita 2						Vizita 3
	Skriningová vizita*	Deň 1*		Deň 2	Deň 3	Deň 4	Deň 7	Ďalšie sledovanie týždeň č.
		pred injekc.	po injekc.					
Podpísaný informovaný súhlas	x							
Demograf. údaje	x							
Paralel. terapia	x	x	x	x	x	x	x	2, 3, 4, 5, 6
Lieková anamnéza	x							
Fyzické vyšetrenie	x							6
ECG	x							
Röntgen hrudníka	x							
Analýza bezpečnosti krvi	x ¹	x ¹		x ¹	x ¹		x ¹	2, 3, 4, 5, 6
Analýza bezpečnosti moču	x						x	6
Tehotenský test	x						x	6
Stanovenie HAHA	x ²						x ²	6
ENT vyšetrenie	x							6 x ⁸
CT alebo MRI	x							6 x ⁸
CT hrudníka	x ⁸							
In-/exkluzívne kritériá	x							
Negatívne účinky		x	x	x	x	x	x	2, 3, 4, 5, 6
Vitálne známky	x ³	x ³	x ³					6
Telesná hmotnosť	x	x						6
Imunoscintigrafia:								
- Sken celého tela			x ⁴	x ⁴				
- Plošný sken				x ⁵				
- SPECT sken				x ⁵				
Farmakokinetiky:								
Krvné vzorky		x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶	6
Odoberanie moču		x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶			
Sérový rozpustný CD44v6		x ⁷		x ⁷	x ⁷		x ⁷	6

*: Predinfúzne hodnotenia by sa nemali uskutočniť viac ako 3 týždne pred skutočnou infúziou.

x¹: Krvné vzorky sa testovali na: glukózu, sodík, draslík, vápnik, chlorid, kreatinín, celkový proteín, albumín, sGOT, sGPT, alkalickú fosfatázu, GGT, bilirubín, močovinu, kyselinu močovú, TSH, Hb, Ht, MCV, retikulocyty, leukocyty, neutrofily, pásy, lymfocyty, bazoily, eozinofily, monocyty a krvné doštičky, pri prvej skriningovej vizite alebo v deň 1 pred infúziou, 21, 48 a 144 hodín po

infúzií. V priebehu 2. až 6. týždňa po infúzií sa bezpečnostné vzorky krvi odoberali aspoň týždenne.

- x²: HAHA sa stanovovalo v sérovej vzorke získanej pri skriningovej vizite, 144 hodín a šesť týždňov po infúzií.
- x³: Vitálne známky sa hodnotili pri skriningovej vizite, pred infúziou, 10, 60, 120 a 240 minút po infúzií a po 6 týždňoch.
- x⁴: Sken celého tela sa urobil okamžite po infúzií a 21, 48, 72, 144 hodín p.i. a voliteľne dva týždne p.i.
- x⁵: Plošný sken sa robil 21, 48 (voliteľne), 72, 144 hodín po infúzií a voliteľne dva týždne p.i. SPECT sken sa uskutočnil 72 hodín p.i.
- x⁶: Vzorky krvi na farmakokinetiky sa získali pred infúziou, na konci infúzie, 5, 30 minút; 1, 2, 4, 16, 21, 48, 72, 144, 240 a 336 hodín po konci infúzie. Krvné vzorky sa odoberali na ELISA a na meranie rádioaktivity. Moč sa odoberal za 0 až 4 hodiny, 4 až 8 hodín, 8 až 12 hodín a 12 až 24 hodín počas prvých 24 hodín a v 24-hodinových vzorkách v zostávajúcom čase, až do 96 hodín po infúzií.
- x⁷: Rozpustný CD44v6 sa meral zo sérovej vzorky získanej pred infúziou, 21, 48 a 144 hodín p.i. a šesť týždňov p.i.
- x⁸: Stanovovanie ochorenia sa opakovalo každých 6 týždňov, až kým sa nespozorovala progresia ochorenia alebo jeho ubúdanie. CT hrudníka sa urobil na začiatku a opakoval sa počas sledovania, ak boli abnormality.

3.5.1.1 Rádioimunoscintigrafia a dozimetria

Údaje získané z rádioimunoscintigrafie (RIS) boli prezentované kvalitatívne pre obe časti A aj B (tzn. príjem nádorom, kostnou dreňou, pečeňou, pľúcami, tenkým črevom a ďalšími orgánmi sa vyjadril ako nízky, stredný alebo vysoký), a kvalitatívne v časti B.

Na kvalitatívne hodnotenie sa ratingová škála transformovala do čísel (0 znamenala žiadny príjem, 1 znamenala nízky príjem, 2 znamenala stredný príjem a 3 znamenala vysoký príjem). Vypočítali a prezentovali sa priemerné hodnoty.

Pre časť B sa kvantitatívna prezentácia RIS výsledkov použila na dozimetrické výpočty ako je načrtnuté v časti 5.1.4 protokolu prostredníctvom zahrnutia nasledujúcich parametrov:

- skutočná orgánová aktivita v danom časovom bode vyjadrená v MBq
- rezidenčný čas rádioaktivity v orgánoch vyjadrený v hodinách
- absorbčná (radiačná) dávka vyjadrená v mGy/MBq
- účinná (radiačná) dávka vyjadrená v mSv.

Viac detailov týkajúcich sa analýzy dozimetrie je možné nájsť v dozimetrickej správe (s dátumom 21. november 2001).

e) Rádioimunoscintigrafické postupy

Opis metód použitých pre časti A a B a časových bodov je uvedený v nasledujúcej časti:

Časť A

Priamo po infúzii a 21 hodín po infúzii sa získali digitálne obrazy celého tela (anterior posterior (a.p.) a posterior anterior (p.a.)) s gama fotoaparátom s duálnou hlavou s veľkým obrazovým poľom s nízko energetickým kolimátorom. 21 hodín po infúzii sa získali plošné a SPECT obrazy hlavy a krku. Získal sa aj kalibračný zdroj. Údaje sa uložili, aby bola možná kvantitatívna analýza.

Časť B

Priamo po, 21, 48, 72 a 144 hodín po podaní rádioimunologického konjugátu sa získali digitálne obrazy celého tela (a.p. a p.a.) s gama fotoaparátom s duálnou hlavou s veľkým obrazovým poľom s nízko energetickým kolimátorom. Ďalšie plošné obrazy oblasti hlavy a krku sa robili 21, 48 (voliteľne), 72 a 144 hodín po infúzii. Voliteľne sa ďalšie zobrazovanie (celého tela a plošné) uskutočňovalo dva týždne po infúzii. Kalibračný zdroj (tzn. alikvota so známou frakciou injektovanej dávky v 10ml liekovke), zavedený v Adamsovom fantóme, musel byť umiestnený medzi spodkom nôh pacienta počas skenovania celého tela. Počiatočná aktivita kalibračného zdroja musela byť 100 až 200 MBq ^{186}Re a tento zdroj musel byť používaný v priebehu štúdií zobrazovania celého tela. Zaznamenávať sa muselo

energetické okno a vrcholové nastavenia, rýchlosť skenovania, dĺžka skenu, dátum skenovania, čas, kedy skenovanie začalo a trvanie skenovania. Merala sa anterior-posterior hrúbka krku a brucha, pričom pacient bol v polohe na chrbte na skenovacom stole.

Pri každom zobrazovacom sedení sa museli urobiť zadné a plošné statické obrazy a tesne pred alebo tesne po tomto obraze sa musel získať statický obraz z kalibračného zdroja v Adamsovom fantóme.

72 hodín po infúzii sa musela uskutočniť SPECT štúdia krku. Museli sa zaznamenať metódy používané na rekonštrukciu a filtrové funkcie s hraničnými frekvenciami.

Jednofotónová emisná počítačová tomografia (SPECT)

SPECT obrazy sa získavali použitím rotujúceho gama fotoaparátu s dvojitou hlavou vybaveného nízko energetickým kolimátorom. Akvizícia vyžadovala najmenej tridsať minút. Dvadsať percentné symetrické okná sa centrovali na 137 keV fotónové vrcholy.

Plošné a SPECT údajové akvizičné parametre

Plošné zobrazovanie zahŕňalo nasledujúce minimálne požiadavky: matica 128 x 128 (detail) alebo 256 x 256 (celé telo) a minimálne 400000 impulzov s maximálnym akvizičným časom 10 minút pre detail a 60 minút pre celé telo.

SPECT zobrazovanie zahŕňalo nasledujúce minimálne požiadavky: 64 obrazov, maticová veľkosť 64 x 64, 360 stupňový kruhový orbit, 60 sekúnd akvizícií na uhol.

Analýza údajov

21 hodín po infúzii, po anteriórnom zobrazení celého tela, sa museli po celom tele a kalibračnom zdroji nakresliť pravouhlé oblasti, o ktoré bol záujem (ROI's). Museli sa nakresliť aj nepravidelné ROI's okolo orgánov, ktoré akumulovali ¹⁸⁶Re (napr. pečene, sleziny a ľavej obličky) a okolo nádoru. Musela sa nakresliť aj jedna alebo viacero reprezentatívnych oblastí pozadia. Tieto oblasti sa museli odzrkadliť na posteriórnych obrazoch. Pôvodne sa plánovalo nakresliť ROI okolo krížovej kosti

na posteriornom obraze. Tento plán sa v priebehu testu neuskutočnil. Všetky oblasti museli byť uložené v počítači, aby premietal tieto ROI's na obrazy v iných časových bodoch. Musel sa zaznamenať počet pixelov a impulzy na jeden pixel v každej oblasti. Počet impulzov v oblasti pre všetky zobrazovacie časové body sa musel zaznamenať digitálne do tabuľkového kalkulačného programu.

Výpočet absorbovanej dávky v orgánoch

Množstvo aktivity v orgánoch, nádore a celom tele sa odhadlo z geometrického priemeru impulzov v ROI's anteriorných a posteriorných pohľadov. Keď to bolo indikované, aplikovala sa korekcia pozadia a oslabenia. Aktivita v moči nebola použitá na odhadnutie absorbovanej dávky v močovom mechúre, ako sa pôvodne plánovalo. Namiesto toho sa použil dynamický model močového mechúra. Vypočítali sa usadzovacie časy v orgánoch a vo zvyšku tela a importovali sa do MIRDOSE3 programu.

Testy potrebné na kontrolu kvality

Plošné zobrazovanie

Týždenne sa na oddelení nukleárnej medicíny uskutočňovali rutinné kvalitatívne kontroly:

- 1) 100M nasycovacia tabuľka.
- 2) Každý týždeň sa získalo vonkajšie ^{57}Co nasýtenie s nízko energetickým kolimátorom.

SPECT zobrazovanie

Kvalitatívna kontrola SPECT zobrazovacieho systému musela zahŕňať centrum rotačnej determinácie.

Tomografické spracovanie

Filtrovaný spätný projekčný algoritmus sa použil na tomografickú obrazovú rekonštrukciu použitím rampového filtra.

Ukladanie údajov

Všetky plošné obrazy alebo tomografické údaje sa museli permanentne ukladať na magnetickú pásku alebo optický disk. Pre tomografické štúdie sa pôvodné projekčné obrazy a rekonštruované štúdie museli zapísať na záložnú pásku.

Kópie zobrazení a záznamov

Pre všetkých pacientov sa vyžadovali kópie relevantných zobrazení, patologických a chirurgických záznamov. Potrebné boli aj kópie MRI a CT správ.

3.5.1.2 Bioptické biodistribúcie ^{99m}Tc -značenej hMAb BIWA 4 (časť A)

Pacienti, ktorí vstúpili do časti A štúdie, sa podrobili chirurgickému zákroku 48 hodín po infúzii rádioaktívne značenej hMAb BIWA 4. Odobrali sa biopsie z nádorového miesta (miest) a z normálnych tkanív (toľko, koľko to len bolo možné) vo forme chirurgickej vzorky. Potom sa v celkovej anestéze odobrala aj kostná biopsia a aspirát kostnej drene. Aspiráty kostnej drene sa centrifugovali, aby sa zhodnotila rádioaktivita v supernatante (plazma) a v sedimente (bunková frakcia). Všetky biopsie sa odvážili a zmeralo sa množstvo ^{99m}Tc . Vzorkový príjem rádioaktivity do nádoru sa hodnotil porovnaním %ID/kg v nádore s %ID/kg v normálnom tkanive.

CD44v6 antigénová expresia sa hodnotila imunohistochemicky použitím kryostatických rezov, ktoré sa najprv inkubovali s mMAb BIWA 1, potom s anti-myšacím imunoglobulínovým G (IgG) sekundárnym reakčným činidlom. Chirurgická vzorka a biopsie sa skúmali histo/cytopatologicky.

Hodnotenie chirurgickej vzorky a biologickej distribúcie

Po obdržaní sa chirurgická vzorka spracovala v nasledujúcom chronologickom poradí.

1. Urobili sa fotky vzorky. Polaroid spredu a diapozytívy spredu a zozadu.
2. Posúdila sa veľkosť chirurgickej vzorky.
3. Odobrali sa biopsie primárneho nádoru, podozrivej lymfatickej uzliny, a ak to bolo možné, z normálnych tkanív v chirurgickej vzorke, ako napríklad

normálna sliznica, normálna lymfatická uzlina, tuk a sval. Všetky biopsie sa odvážili a odmeralo sa množstvo ^{99m}Tc . Všetky údaje sa konvertovali na percentá injektovanej dávky/kilogram tkaniva. Špecifický príjem rádioaktivity do nádoru sa hodnotil prostredníctvom porovnania %ID/kg v nádore s %ID/kg v normálnom tkanive.

4. Potom sa vzorka prichytila na dosku a fixovala sa v 4% formaldehyde najmenej 36 hodín.
5. Po vypitvaní sternokleidomastoidového svalu (štruktúra s vysokou rádio-denzitou) sa urobila vzorková rádiografia, aby sa ukázala presná veľkosť a lokalizácia zúčastnených lymfatických uzlín. Táto rádiografia sa robila počas ponorenia vzorky v 96% etanole, ktorý má rovnakú absorpciu röntgenového žiarenia ako tuk.
6. Všetky uzliny vizualizované s röntgenovým žiarením sa označili na Polaroidu a na vzorkovej rádiografii.
7. Všetky uzliny nájdené prostredníctvom vyšetrenia chirurgickej vzorky a prostredníctvom röntgenu sa vypitvali zo vzorky.
8. Všetky makroskopické uzliny sa kompletne spracovali na mikroskopií a hodnotil sa jediný rez. Zo všetkých makroskopicky pozitívnych uzlín sa urobili dve alebo viacero mikroskopických vzoriek. Zaznamenávali sa makroskopické dôkazy o prítomnosti alebo absencii nádorovej nekrózy.
9. Ďalej sa zaznamenával počet zahrnutých uzlín a počet, lokalizácia a úroveň lymfatických uzlín (podľa klasifikácia Memorial Sloan Kettering Cancer Center) u nádoru obsahujúceho uzliny.

3.5.1.3 Reakcia nádoru (časť B)

Nádorovou reakciou bol účinnosťný parameter pre rádioimunologické terapeutické ošetrenie. Reakcia nádoru sa hodnotila prostredníctvom meraní nádoru, čo sa hodnotilo klinicky a/alebo prostredníctvom CT, MRI alebo scintigrafie kostí. Hodnotenie sa robilo podľa responzívnych kritérií Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO). Pozri prílohu VI protokolu (R96-0941).

3.5.1.4 Fyzické vyšetrenie

Pred začlenením do štúdie sa zhodnotil stav ochorenia u každého pacienta prostredníctvom ENT vyšetrenia (vrátane palpácie) a prostredníctvom CT alebo MRI nádorového miesta (miest).

Na každé krčné miesto sa opísali všetky hlavové a krčné lézie.

Palpácia

Všetci pacienti sa na začiatku vyšetřili otolaryngológom/chirurgom hlavy a krku. Tento klinický vyšetřovateľ hodnotil počet, miesto, lokalizáciu a mobilitu všetkých hmatateľných lymfatických uzlín v oblasti hlavy a krku. Charakter lymfatických uzlín sa opisoval ako: nepodozrivý, podozrivý alebo infiltrovaný nádorom. Stav krčných lymfatických uzlín sa klasifikoval podľa systému nádorových uzlinových metastáz na určovanie štádia nádorov (TNM) podľa Union Internationale Contre le Cancer (UICC) diagnostiky.

Rádiologické vyšetřenie

V závislosti na lokalizácii miest (miest) nádoru bolo potrebné jedno alebo viacero z nasledujúcich vyšetření: CT, MRI, kostná scintigrafia. V prípade prítomnosti nádoru bola vo všeobecnosti výhodná MRI oblasti hlavy a krku. V prípade kostných lézií bolo výhodné CT. V časti B sa všetky rádiologické chorobné hodnotiace parametre získané na začiatku opakovali šesť týždňov po infúzii a každých šesť týždňov až do progresie alebo úbytku, kvôli sledovaniu. Pre pacientov, ktorí vstúpili do časti B štúdie, sa na začiatku získal CT hrudníka a ten sa opakoval pri nasledujúcom sledovaní, ak boli prítomné nádorové lézie v hrudníku. Ako ďalšia technika na zobrazovanie nádoru mohol byť využitý ultrazvuk. Návod na vyšetřenia je uvedený nižšie:

Primárny nádor/loko-regionálny opakovaný výskyt

Pre pacientov, ktorí sa zúčastnili časti A štúdie, a pacientov s loko-regionálnym opakovaným výskytom (časť B) sa musel urobiť CT sken a/alebo MRI oblasti hlavy a krku.

Počítačová tomografia

Počítačová tomografia oblasti hlavy a krku: Dynamické CT bolo výhodnejšie ako špirálové CT. Avšak špirálové CT mohlo byť nápomocné u pacientov, ktorí neboli schopní spolupracovať.

Pacient musel byť vyšetrovaný v polohe na chrbte, s mierne povytiahnutým krkom a imobilizovanou hlavou a plecami uvoľnenými a spustenými smerom dolu. Pacient musel pokojne dýchať s použitím brušných, a nie hrudníkových svalov. Oblasť skenovania bola určená na základe počiatočného náhľadu urobeného v bočnej projekcii. Rovina skenu musela byť rovnobežná s rovinou hlasiviek. Rutinne sa museli použiť kontinuálne trojmilimetrové rezy. Zobrazovanie sa muselo uskutočňovať od základne lebky až po horné medzihrudie.

Zobrazovanie prostredníctvom magnetickej rezonancie

Pacienti museli byť vyšetrovaní v polohe na chrbte, s mierne povytiahnutým krkom a imobilizovanou hlavou. V priebehu vyšetrovania bolo nutné pokojné dýchanie s použitím brušných, a nie hrudníkových svalov. Získali sa príslušné zobrazenia na demonštrovanie anatómie krku a na zhodnotenie rozsahu primárnej lézie a prítomnosti rozloženia lymfatických uzlín. Museli sa získavať od základne lebky až po horné medzihrudie.

Vzdialené metastázy

U všetkých pacientov zúčastniacich sa na časti B štúdie sa na začiatku urobilo CT skenovanie hrudníka. Ďalšie vyšetrenia na vizualizáciu metastáz, ako kostná scintigrafia alebo CT brucha, boli voliteľné.

CT hrudníka

Získavali sa špirálové CT skeny. Pacienti sa vyšetrovali v polohe na chrbte a museli zdvihnúť ramená nad hlavy. Pacienti museli dýchať pokojne s použitím brušných, a nie hrudníkových svalov. Pacient bol skenovaný od polohy tesne nad pľúcami až na úroveň nadobličkových žliaz. Zobrazenia sa museli fotografovať v mediastinálnom a pľúcnom nastavení.

CT brucha

Získavali sa špirálové skeny. Pacienti sa vyšetروvali v polohe na chrbte a museli ruky zdvihnúť nad hlavu. Pacienti museli dýchať pokojne. U všetkých pacientov sa použil orálny kontrast. Oblasť na skenovanie prebiehala od polohy tesne nad bránicou, až po symfýzu. Zobrazenia museli byť fotografované v abdominálnom a pečenevom nastavení.

Kostná scintigrafia

Po intravenóznei infúzii maximálne 600 MBq ^{99m}Tc značenej HDP/MDP, sa pacient požiadal, aby skonzumoval dostatok tekutín na to, aby sa pravidelne vyprázdňoval. Statické pohľady sa získavali 3 hodiny po infúzii: jeden pohľad na celé telo, a ak to bolo nevyhnutné, 3 detailnejšie pohľady. Podozrivé lézie mohli vyžadovať podrobnejšiu analýzu prostredníctvom CT a/alebo MRI.

Plánovalo sa uskutočňovanie zaznamenávania reakcie kostných metastáz podľa separátnej sady responzívnych kritérií. Neboli poskytnuté žiadne údaje.

3.5.1.5 Rozpustný CD44v6

Rozpustný CD44v6 (sCD44v6) sa musel merať v sére. Koncentrácie sa determinovali prostredníctvom schváleného senzýmom spojeného imuno-sorbčného testu (ELISA), ktorý bol založený na komerčne dostupnom testovacom kite a uskutočňoval sa v súlade so súčasnými medzinárodnými smernicami vo firme Boehringer Ingelheim na oddelení farmakokinetík a liekového metabolizmu, Biberach, Nemecko. 5ml vzorky krvi (spracované na sérum) sa odoberali pred infúziou, 21, 48 a 144 hodín po infúzii a šesť týždňov po infúzii. Vzorky sa nechali zraziť a scentrifugovali sa, aby sa pripravilo sérum. Skladovacie a prepravné podmienky: Vzorka na ELISA meranie sa umiestnila do kryoskúmaviek, starostlivo sa označila, aby bola možná jednoznačná identifikácia, uskladnila sa pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, až kým rádioaktivita neklesla (^{186}Re : 4 týždne, ^{99m}Tc : 3 dni), a zasielala sa na BI oddelenie farmakokinetík a liekového metabolizmu, Biberach, Nemecko v dávkach každé štyri týždne. Sérové vzorky sa zasielali v suchom ľade.

3.5.1.6 Bezpečnosť

Ochrana subjektov

Všetci pacienti sa starostlivo monitorovali počas podávania a po podaní rádioaktívne značenej monoklonálnej protilátky. Na tento účel bol prítomný aspoň jeden z vyšetrovateľov.

Laboratórne hodnotenia

Izolovali sa vzorky krvi na glukózu, sodík, draslík, vápnik, chlorid, kreatinín, celkový proteín, albumín, sérovú glutámovú oxaloctovú transaminázu (sGOT), sérovú glutámovú pyruvát transaminázu (sGPT), alkalickú fosfatázu, gamaglutaryl transpeptidázu (GGT), bilirubín, močovinu, kyselinu močovú, tyroidný stimulujúci hormón (TSH), hemoglobín (Hb), hematokrit (Ht), priemerný korpuskulárny objem (MCV), retikulocyty, leukocyty, neutrofily, pásy, lymfocyty, bazoily, eozinofily, monocyty a krvné doštičky v nasledujúcich časových bodoch:

- Pri skríningovej vizite alebo na deň jedna pred infúziou a
- 21, 48 a 144 hodín po infúzii.
- Pre časť A 6 týždňov po infúzii. Pre časť B: v priebehu týždňov 2, 3, 4, 5 a 6 štúdie aspoň raz týždenne (častejšie v prípade toxicity).

Základné laboratórne hodnotenia pred infúziou sa mohli získavať buď pri skríningovej vizite, alebo na deň jedna štúdie, za predpokladu, že vzorky sa získali menej ako 21 dní pred infúziou rádioaktívne značenej hMAb BIWA 4 a urobili sa všetky potrebné hodnotenia. Pred infúziou protilátky sa výsledky všetkých požadovaných laboratórnych testov museli zhrnúť a skontrolovať z hľadiska prípustnosti zodpovedným lekárom. To isté sa aplikovalo v časti B štúdie pri druhom podávaní hMAb BIWA 4.

Vzorky moču sa odoberali na štandardný nemocničný skrining (proteíny, krv a glukóza) v nasledujúcich časových bodoch:

- Skríningová vizita
- Jeden týždeň po infúzii (144 hodín p.i.)
- Šesť týždňov po infúzii

U žien, ktoré mali potenciál rodiť sa vyžadoval tehotenský test pri skriningovej vizite a na konci štúdie.

Hodnotenie ľudskej-anti-ľudskej protilátky

V sérových vzorkách sa hodnotila prítomnosť a/alebo vývoj HABA. Preto sa 5ml vzorky krvi (ktoré mali byť spracované na sérum) odoberali pri skriningovej vizite, týždeň (144 hodín p.i.) a šesť týždňov po infúzii protilátky. Pre pacientov, ktorí obdržali dve BIWA 4 podania sa v časti B štúdie odobrala ďalšia HABA vzorka pred druhým podaním. Sérová hladina sa hodnotila prostredníctvom overených ELISA metód.

Vzorky sa nechali zraziť a sцентриfugovali sa na prípravu séra.

Skladovacie a prepravné podmienky: Vzorka na ELISA meranie sa umiestnila do kryokúmaviiek, starostlivo sa označila, aby bola možná jednoznačná identifikácia, uskladnila sa pri -20 °C, až kým rádioaktivita neklesla (¹⁸⁶Re: 4 týždne, ^{99m}Tc: 3 dni), a zasielala sa na BI oddelenie farmakokinetík a liekového metabolizmu, Biberach, Nemecko v dávkach každé štyri týždne. Sérové vzorky sa zasielali v suchom ľade.

Akékoľvek zvýšenia v hladinách ľudských anti-ľudských protilátok sa starostlivo porovnávali od prípadu k prípadu s možnými negatívnymi účinkami na pacienta. Tieto údaje sa zhromažďovali a analyzovali retrospektívne v priebehu štúdie.

Negatívne účinky

Všetky negatívne účinky sa zaznamenávali do CRF. Účinky sa odstupňovali podľa US National Cancer Institute CTC (NCI-CTC) verzie 2.0 (verzia tohto dokumentu sa stiahla z internetovej stránky <http://ctep.info.nih.gov/CTC3/ctc.htm>). Všetky SAEs sa museli zaznamenať.

Imunogénnosť a toxicita

Pred uskutočňovaním tohto testu neexistovali žiadne ľudské údaje týkajúce sa bezpečnosti a imunogénnosti hMAb BIWA 4. V predchádzajúcej štúdii uskutočňovanej s rodičovskou myšacou protilátkou BIWA 1 sa nevyskytla žiadna

klinicky významná toxicita. Žiadna toxicita sa neočakávala pri samotnej nahej hMAb BIWA 4 (žiadne efektorové funkcie na protilátke závislej bunkovo sprostredkovanej cytotoxicity (ADCC) *in vitro*; neočakávaná žiadna interferencia s proliferáciou antigén exprimujúcich buniek). Demonštrovalo sa, že hMAb BIWA 4 by mohla byť bezpečne podávaná myšiam (xenoštepové štúdie) a opiciam (štúdie na toxicitu). Dobrá lokálna tolerabilita bola demonštrovaná v troch lokálnych štúdiách toxicity.

Myšacia a chimérna MAb U36 (anti-CD44v6-epitop s definovanou prekryvajúcou sa epitopovou špecifitou) boli doteraz bezpečné u HNSCC pacientov; žiadne toxicity s výnimkou myelotoxicity (spôsobenej ^{186}Re -značkami) neboli pozorované vo fáze I dávkovej eskalačnej RIT štúdie s cMAb U36. Teoreticky bolo možné, že by mohli nastať hypersenzitívne reakcie na rádioaktívne značenú hMAb BIWA 4. Monoklonálne protilátky boli podávané niekoľkým tisícom pacientov na diagnostické aplikácie.

Hoci to bolo nepravdepodobné, potenciálne reakcie na intravenózne podávanú BIWA 4 mohli zahŕňať hypotenziu, prechodnú horúčku a triašky, kožné vyrážky, dyspnoe, svrbenie, nutkanie na zvracanie a anafylaxiu.

Preto sa zaznamenávali vitálne známky (tlak krvi, teplota, tep a rýchlosť dýchania) pri skríningovej vizite a v nasledujúcich časových bodoch: pred infúziou a 10, 60, 120 minút po infúzii a po 6 týždňoch. Ďalšie vitálne známky sa zaznamenávali 240 minút po infúzii a to len pre pacientov, ktorí sa zúčastnili časti B.

V tejto štúdii sa použili rádionuklidy. Radiačná záťaž spojená s gama emitujúcim rádionuklidom $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (v tejto štúdii 20 mCi) bola podobná záťaži, ktorá sa vyskytuje v mnohých rutinných procedúrach jadrovej medicíny, a je známa ako malá. Aby sa minimalizovalo vystavenie močového mechúra a obličiek rádioaktívite, pacienti sa dobre hydratovali a požiadali sa, aby sa často vyprázdňovali v priebehu prvých 48 hodín (96 hodín po infúzii so ^{186}Re -značenou protilátkou).

Pre beta- a gama-emitujúci rádionuklid ^{186}Re Breitz a ďalší (R98-2459) zistili maximálnu tolerovanú dávku ^{186}Re -značeného MAb IgG u ťažko predošetrených pacientov 90 mCi/m². Jedným z cieľov tejto štúdie bolo skúmať toxicitu ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4 u pacientov, ktorí mali buď lokálne a/alebo regionálne opätovne sa vyskytujúce ochorenie, pre ktoré neboli dostupné možnosti liečebného ošetrovania, alebo ktorí mali vzdialené metastázy. Pretože mohla nastať toxicita

v kostnej dreni, štítnej žľaze, obličkách a pečeni, odoberali sa krvné vzorky na testovanie funkcie orgánov, ako je opísané v časti 3.5.1.6.

Na monitorovanie výskytu úbytku alebo prírastku hmotnosti sa zaznamenávala telesná hmotnosť pri skrínigovej vizite, pred infúziou v deň 1 a po 6 týždňoch.

Pacienti sa monitorovali na výskyt lokálnej toxicity. Akákoľvek známka lokálnej toxicity sa zaznamenávala ako negatívny účinok.

3.5.2 Primeranosť meraní

Použité merania boli pre tento typ testu dobre akceptované.

3.5.3 Primárna účinnosť/farmakodynamické premenné

3.5.3.1 Časť A testu

Primárnymi účinnosťnými premennými determinovanými v časti A testu boli biopsiová distribúcia a rádioimunoscintigrafia. Opis metód ako získať údaje je uvedený v časti 3.5.1.1 a 3.5.1.2.

Príjem do normálneho tkaniva a do nádoru sa meral v biopsiách chirurgickej vzorky a príjem sa vyjadril ako percento injektovanej dávky na kg (%ID/kg). Časový priebeh príjmu do nádoru a iných tkanív sa hodnotil a porovnával vzhľadom na rôzne dávky BIWA 4.

3.5.3.2 Časť B testu

Primárne parametre účinnosti boli analyzované rádioimunoscintigrafiou a dozimetriou.

3.5.4 Merania koncentrácie liekov/farmakokinetiky

Tak v časti A, ako aj v časti B štúdie sa určovali koncentrácie rádioaktívne značenej BIWA 4 v krvi.

3.5.4.1 Spôsoby a načasovanie odoberania vzoriek

Vzorky krvi od pacientov sa odoberali a pracovalo sa s nimi nasledovne: 7 ml krvi (3,5 ml v skúmavkách obsahujúcich draselné EDTA a 3,5 ml v koagulačných

skúmvkách: uvádza sa množstvo požadovaných mililitrov podľa dodatku A) sa odoberalo z periférnej žily na ramene oproti miestu infúzie v určených časových bodoch (tzn. tesne pred podaním protilátky, na konci infúzie a 5, 10, 30 minút; 1, 2, 4, 16, 21, 48, 72 hodín po konci infúzie a 7 dní p.i (144 hodín) a 6 týždňov po infúzii). Koniec infúzie sa považoval za $t = 0$.

V časti B testu sa vynechali plánované vzorky 10 minút a 6 týždňov po infúzii. Namiesto toho sa odoberali vzorky 240 a 366 hodín po infúzii podľa dodatku 1.

Moč sa odoberal počas 48 hodín po infúzii ^{99m}Tc -značenej hMAb BIWA 4 a počas 96 hodín po infúzii ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4. Moč sa odoberal za 0 až 4 hodiny, 4 až 8 hodín, 8 až 12 hodín a 12 až 24 hodín počas prvých 24 hodín a v 24 hodinových vzorkách vo zvyšný čas. Na determináciu vylučovanej rádioaktivity sa determinovala rádioaktivita vo vzorkách moču.

Krvné vzorky sa scentrifugovali na prípravu séra. Pred spracovaním sa merala rádioaktivita v celkovej krvi. Rádioaktivita sa merala aj v sére. Uskladnenie vzoriek krvi v chladničke bolo povinné, hoci vzorky sa nesmeli zmraziť. Použitím alikvoty získanej z konjugátového prípravku sa ako štandard pripravilo odvážené riedenie injektovanej pacientovej dávky. Odčítavanie patientských vzoriek a štandardov sa uskutočňovalo podľa lokálnych SOPs. Výsledky sa zaznamenávali do príslušných sekcií CRF. Obsah rádionuklidu sa zaznamenával ako percento injektovaných dávok (vyjadrené ako %ID/kg krvi alebo séra). Okrem odčítania rádioaktivity sa všetky vzorky analyzovali na prítomnosti imunitných komplexov prostredníctvom HPLC analýzy.

Na všetky skúmvky so vzorkami sa uviedli nasledujúce informácie: číslo testu, číslo pacienta, identifikácia vzorky (tzn. sérum, plazma alebo krv), čas vo vzťahu k infúzii, skutočný čas, skutočný dátum a izotop (tzn. ^{99m}Tc alebo ^{186}Re). Objem každej vzorky moču sa meral a zaznamenával a na všetky vzorky moču sa uviedli nasledujúce informácie: číslo testu, číslo pacienta, celkový objem vzorky, interval odoberania, skutočný čas, dátum a izotop (tzn. ^{99m}Tc alebo ^{186}Re).

Dátumy, časy a výsledky meraní rádioaktivity všetkých farmakokinetických vzoriek sa zaznamenávali v CRF.

Plazmatické vzorky na ELISA meranie sa prepravovali v kryoskúmvkách, starostlivo sa označili, aby bola možná jednoznačná identifikácia, uskladnili sa pri

-20 °C, až kým rádioaktivita neklesla (^{186}Re : 4 týždne, $^{99\text{m}}\text{Tc}$: 3 dni), a zasielali sa na BI oddelenie farmakokinetík a liekového metabolizmu, Biberach, Nemecko v dávkach každé štyri týždne. Sérové vzorky sa zasielali v suchom ľade.

3.5.4.2 Analytické determinácie

Plazmatické vzorky sa merali overenými ELISA metódami v Boehringer Ingelheim oddelení farmakokinetík a liekového metabolizmu, v Biberach, Nemecko. Vyšetrovateľ robil odčítanie rádioaktivity v celej krvi, v sére a v moči.

3.5.4.3 Parametre a hodnotenie

Nasledujúce farmakokinetické parametre sa použitím WinNonlin 3.1 Professional (Pharsight Corporation, Mountain View, CA) determinovali v celkovej krvi a plazme; sérové hladiny a zobrazovanie údajov sú opísané nižšie:

Primárnymi farmakokinetickými parametrami sú časový bod, v ktorom sa pozoruje maximálna koncentrácia lieku (T_{max}), maximálna pozorovaná koncentrácia lieku (C_{max}), oblasť pod koncentračno-časovou krivkou $(\text{AUC})_{0 \rightarrow \infty}$, terminálny eliminačný polčas rozpadu ($t_{1/2}$), objemová distribúcia (terminálna fáza a predpokladaný stabilný stav), odstránenie z celého tela (CL) a priemerný rezidenčný čas $(\text{MRT})_{0 \rightarrow \infty}$.

Primárnymi cieľmi farmakokinetickej analýzy boli:

Determinácia a porovnanie rozloženia celkovej rádioaktivity a imuno-reaktívnej hMAb BIWA 4 po podaní jedinej dávky $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -značenej (časť A) a ^{186}Re -značenej hMAb (časť B) BIWA 4.

Na výpočet zo zobrazovacích údajov a údajov o rozložení krvi, frakcia injektovanej rádioaktivity dosahujúcej pečeň a slezinu počas štúdií. Na dosiahnutie tohto cieľa sa použil WinNonlin® softwarový balík na uskutočňovanie nekompartmentálnej farmakokinetickej analýzy plazmatickej koncentrácie oproti časovému profilom imunoreaktívnej hMAb BIWA 4 a úrovni rádioaktivity v celkovej krvi ako funkcie času po intravenóznom podaní.

Výsledky sú uvedené ako sumárna štatistika.

3.5.5 Farmakokinetický/farmakodynamický vzťah

Najprv bol na opísanie distribúcie a metabolizmu ^{186}Re -značenej BIWA 4 u ľudí určený kompartmentálny farmakokinetický model. Zamýšľalo sa skombinovať údaje z BIWA 4 plazmatických hladín, meraní rádioaktivity celkovej krvi a séra, rádioaktivity zo zobrazovaní celého tela a špecifických oblastí, o ktoré je záujem, podávanej dávky ^{186}Re -značenej BIWA 4, dávky neznačenej BIWA 4, hladín rozpustného CD44v6 a zhodnotenia rádioaktívne značenej protilátky pred infúziou.

Výsledky boli uvedené ako sumárna štatistika. Avšak variabilita bola príliš vysoká na to, aby sa to mohlo použiť ako racionálny model.

3.5.6 Primárna bezpečnostná premenná

Determinácia maximálnej tolerovanej dávky a zhodnotenie bezpečnosti boli primárnymi koncovými bodmi časti B testu. Merania sa uskutočnili ako je opísané v časti 3.5.1.6.

3.5.6.1 Toxicita limitujúca dávku a maximálna tolerovaná dávka

DLT sa definovala ako nehematologická CTC toxicita stupňa 3 súvisiaca s liekom alebo nehematologická CTC toxicita stupňa 4 súvisiaca s liekom s výnimkou nutkania na zvracanie a zvracania bez adekvátneho antiemetického ošetrovania.

MTD sa definovala ako dávková hladina, pri ktorej sa u menej ako dvoch zo šiestich pacientov vyvinula s liekom súvisiaca DLT.

3.6 Zaistenie kvality údajov

Test sa vo všeobecnosti uskutočňoval v súlade s princípmi dobrej klinickej praxe, ako je to špecifikované v príslušných nariadeniach a spolu so štandardnými operačnými postupmi odrážajúcimi tieto nariadenia.

V priebehu štúdie zástupca Boehringer Ingelheim Holandsko kontaktoval a/alebo navštívil miesto štúdie, aby monitoroval postup štúdie. Často kontaktoval vyšetrovateľa a miestne návštevy za účelom auditu údajov, vrátane porovnávania zdrojových dokumentov s formulármi prípadových správ a kontroly liekovej zodpovednosti. V priebehu týchto miestnych návštev musel byť zástupcovi

z Boehringer Ingelheim Holandsko k dispozícii vyšetrovateľ a/alebo jeho poverený zástupca.

Náležito vyplnené CRFs sa pravidelne zbierali. Údajmi boli dvojité interné údaje. Uskutočňovalo sa zhrnutie údajov a nedôveryhodné údaje sa diskutovali s vyšetrovateľom.

Závažné negatívne účinky sa zaznamenávali v súlade s návodom definovaným v protokole a CRF a v súlade s Boehringer Ingelheim SOPs.

3.7 Štatistické metódy plánované v protokole a determinácie veľkosti vzorky

3.7.1 Štatistické a analytické plány

3.7.1.1 Štatistický návrh/model

Dizajny používané v tomto teste sa bežne používajú vo fáze I onkologických testov.

Časť A

Časť A tejto fázy I testu bola neriadenou štúdiou so zvyšujúcou sa dávkou v po sebe idúcich skupinách na determináciu bezpečnosti, tolerovateľnosti, biologickej distribúcie a farmakokinetík jedinej infúzie ^{99m}Tc -značenej hMAb BIWA 4 u pacientov s pokročilým karcinómom skvamózných buniek hlavy a krku.

Tri hMAb BIWA 4 dávkové úrovne sa použili v tejto časti štúdie s tromi pacientmi, ktorí sa plánovali pre každú dávkovú úroveň. U všetkých pacientov bol dokázaný nádor hlavy a krku a boli určení na chirurgický zákrok.

Časť B

Časť B tejto fázy I testu bola neriadenou štúdiou so zvyšujúcou sa dávkou v po sebe idúcich skupinách na determináciu bezpečnosti, tolerovateľnosti, MTD, farmakokinetík a predbežných terapeutických účinkov jedinej infúzie ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4 u pacientov s pokročilým karcinómom skvamózných buniek hlavy a krku, pre ktorých neboli dostupné žiadne liečebné ošetrovacie možnosti.

V tejto časti štúdie sa radiačná dávka zvyšovala. Dvaja pacienti sa ošetrovali s danými dávkovými úrovňami, ak bol pozorovaná CTC toxicita so stupňom nižším ako 2.

Hodnotenie bezpečnosti a tolerovateľnosti (časti A a B)

Bezpečnosť a tolerovateľnosť štúdie sa hodnotila prostredníctvom zmien v laboratórnych parametroch, vitálnych známkach, vývoja HAHA a incidencie negatívnych prípadov. Výsledky boli zaznamenávané pre každú dávkovú hladinu oddelene, ako aj celkovo.

Hodnotenie biologickej distribúcie (časť A)

Biologická distribúcia ^{99m}Tc -značenej hMAb BIWA 4 v tuhom tkanive sa hodnotila prostredníctvom rádioimunoscintigrafie (pozri časť 3.5.1.1) a prostredníctvom meraní rádioaktivity biopsiových vzoriek (pozri časti 3.5.1.1 a 3.5.1.2). Možná bola len opisná štatistika, pretože len maximálne 3 pacienti obdržali jednu dávkovú hladinu.

Hodnotenie imunoscintigrafickým zobrazovaním (časti A a B)

V daných časových bodoch po podaní rádioaktívne značenej protilátky sa získavali imunoscintigrafické zobrazenia (pozri časť 9.5.1.1). Znova bola aplikovateľná len opisná štatistika.

Farmakokinetické hodnotenie (časti A + B)

Nasledujúce farmakokinetické parametre sa determinovali z plazmy alebo séra, hladiny v moči a zobrazovacie údaje sú opísané nižšie:

Primárne parametre (iné ako kompartmentové)

$T_{\max}$, $C_{\max}$, AUC (0 až nekonečný čas), koncový eliminačný polčas rozpadu, objem distribúcie (terminálna fáza V_z a predpokladaný ustálený stav V_{ss}), CL a MRT (0 až nekonečný čas). Z celkového moču sa determinovalo kumulatívne vylučovanie rádioaktivity v moči v čase.

Sekundárne parametre (kompartmentové)

Plánovalo sa vyvinutie kompartmentového farmakokinetického modelu na definovanie distribúcie a metabolizmu ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4 u ľudí. Model zhromažďoval údaje z meraní rádioaktivity v sére a moči, rádioaktivity zo zobrazení

celého tela a špecifických zaujímavých oblastí, podávanej dávky ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4, za studena nanášanej dávky hMAb BIWA 4, hladín rozpustného CD44v6 a hodnotenia rádioaktívne značenej protilátky pred infúziou.

Plánovalo sa zaznamenávať výsledky pre každú dávkovú hladinu oddelene a prostredníctvom sumárnej štatistiky.

Hodnotenie terapeutickkej účinnosti (časť B)

Parametrom terapeutickkej účinnosti bola reakcia nádoru. Reakcia nádoru sa hodnotila v súlade s WHO smernicou. Súčet produktov najväčších zvislých priemerov všetkých meraných nádorových lézií bol primárnym parametrom nádorovej reakcie. Na hodnotenie reakcie kostných lézií boli separátne kritériá.

3.7.1.2 Nulová a alternatívna hypotéza

Všetky analýzy v tomto teste mali opisnú a prieskumnú povahu. Akékoľvek štatistické testy sa uskutočňovali len na poskytnutie štatistického rámca na prehľad výsledkov a poskytnutie pomoci pri plánovaní ďalších štúdií. Nepredpokladali sa žiadne formálne štatistické dôsledky a preto sa neuskutočňovali žiadne štatistické testy.

3.7.1.3 Plánované analýzy

Rozlišovali sa dve populácie:

- Zámer liečiť podskupinu pozostávajúcu zo všetkých pacientov, ktorí dostali infúziu rádioaktívne značenej hMAb BIWA 4 a od ktorých boli dostupné základné začiatkové údaje.
- Protokolová podskupina pozostáva z hodnotených pacientov. Pacient bol hodnotený, ak boli splnené nasledujúce kritériá:

Časť A

1. Splnenie kritérií na zámer liečiť podskupinu.
2. Pokračujúce sledovanie negatívnych účinkov, vitálnych známk a bezpečnosti krvných a močových vzoriek bolo adekvátne.

3. Imunoreaktívna frakcia v aspoň jednom z oboch uskutočňovaných testov bola vyššia ako 60 %.
4. Boli dostupné adekvátne biopsie a scintigrafické zobrazenia na hodnotenie biologickej distribúcie.

Časť B

1. Splnenie kritérií na zámer liečiť podskupinu.
2. Pokračujúce sledovanie negatívnych účinkov, vitálnych známk a bezpečnosti krvných a močových vzoriek bolo adekvátne.
3. Imunoreaktívna frakcia v aspoň jednom z oboch uskutočňovaných testov bola vyššia ako 60 %.
4. Reakcia: Pacienti (Pts.) sa hodnotili z hľadiska reakcia a to, ak sa získali adekvátne nádorové merania na začiatku a ak pacienti boli sledovaný najmenej v priebehu šiestich týždňov. Ak bola pozorovaná progresia ochorenia v rámci týchto šiestich týždňov, bola tiež hodnotená reakcia pacientov.

Primárna analýza

Primára analýza sa uskutočňovala pre každú protokolovú podskupinu.

Nehodnotení pacienti sa nahradili. Preto sa plánovalo, pre časť A, že hodnotená skupina bude pozostávať z 9 pacientov a zámerom bolo liečiť podskupinu pozostávajúcu z najmenej 9 pacientov. Pre časť B počet pacientov závisel na toxicite, s ktorou sa stretli. Pacienti, ktorí boli hodnotení z hľadiska toxicity, ale nie z hľadiska reakcie, sa nenahrádzali.

Farmakokinetické údaje

Analýza farmakokinetických údajov sa uskutočňovala Dr. Thomasom R. MacGregorom, z Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc. Ridgefield CT, USA.

Primárnymi cieľmi farmakokinetickej analýzy boli:

1. Determinovať a porovnať dispozíciu celkovej rádioaktivity a imunoreaktívnej hMAb BIWA 4 po podaní jednotlivých dávok ^{99m}Tc -značenej hMAb BIWA 4 a ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4.

2. Identifikovať príslušnú za studena zavádzanú dávku hMAb BIWA 4.
3. Zhodnotiť dispozíciu druhej dávky ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4.
4. Vypočítať, zo zobrazovacích údajov a údajov o dispozícii, frakciu injektovanej rádioaktivity zasahujúca pečeň a slezinu v priebehu štúdií. Na dosiahnutie tohto cieľa sa použil WinNonLin® softwarový balík na uskutočňovanie nekompartimentovej farmakokinetickej analýzy plazmatickej koncentrácie vs. časových profilov imunoreaktívnej hMAb BIWA 4 a hladín rádioaktivity v celkovej krvi ako funkcie času, po intravenóznom podaní. Akékoľvek merania zahŕňajúce rádioaktivitu sa normalizovali na frakciu rádioaktívnej značky, ktorá bola naviazaná na proteín a imunoreaktívna pred infúziou. Špecifické farmakokinetické parametre, ktoré boli generované, zahŕňajú: $T_{\max}$, $C_{\max}$, AUC (0 až nekonečný čas), koncový eliminačný polčas rozpadu, objem distribúcie (terminálna fáza a predpokladaný ustálený stav), celkové odstránenie z tela a priemerný rezidenčný čas (0 až nekonečný čas). Z celkového moču sa determinovalo kumulatívne vylučovanie rádioaktivity v moči v čase.

Sekundárny cieľ farmakokinetickej analýzy, vývoj farmakokinetického modelu na opísanie distribúcie a metabolizmu ^{186}Re -značenej hMAb BIWA 4 u ľudí, sa nedosiahol, kvôli vysokej variabilite údajov (najmä rádioascintigrafických údajov).

Sekundárna analýza

Sekundárne analýzy sa uskutočňovali so zámerom liečiť podskupinu pacientov participujúcich v časti B štúdie.

Sekundárne analýzy sa obmedzili na kľúčové koncové body: napr.: rýchlosť reakcie, trvanie reakcie, čas na progresiu.

Provizórna analýza

Neuskutočňovali sa žiadne provizórne analýzy.

3.7.1.4 Zaobchádzanie s chýbajúcimi údajmi

V tejto fáze I štúdie sa očakávalo, že väčšina údajov bude dostupná na analýzu. V prípade chýbajúcich údajov bolo najpravdepodobnejšie, že dôvod chýbania nesúvisí so záverom. Žiadne chýbajúce údaje sa nevkladali.

3.7.2 Determinácia veľkosti vzorky

V časti A traja pacienti na dávkovú hladinu poskytli nejaké informácie o bezpečnosti hMAb BIWA 4 a o anticipovanej správnej dávke 50 mg neznačenej hMAb BIWA 4.

V časti B sa šiesti pacienti považovali za dostatočné množstvo na stanovenie DLT. Tabuľka 3.7.2:1 uvádza pravdepodobnosti pozorovania DLT u 2 alebo viacerých zo 6 pacientov.

Tabuľka 3.7.2: 1 Predpokladané populačné pomery DLT

	0,40	0,42	0,45
Pravdepodobnosť pozorovania DLT u dvoch alebo viacerých zo šiestich pacientov	0,77	0,80	0,84

Zdroj: Pravdepodobnosti vypočítané z kumulatívnej distribučnej funkcie binominálnej distribúcie s $n = 6$ a rôznych p 's.

S eskalačnou schémou v tomto teste bola pravdepodobnosť, že dvaja alebo viacerí pacienti vykazujú DLT, najmenej 80 %, ak základná individuálna pravdepodobnosť pre pacienta na dosiahnutie DLT bola 42 % alebo vyššia.

3.8 Zmeny vo vedení štúdie alebo plánovaných analýzach

Nasledujúce zmeny v protokole sa implementovali prostredníctvom opravy.

Časové body na odoberanie vzoriek krvi sa nastavili prostredníctvom implementácie opravy č. 1 z 1. septembra 1999. Vzorky po 10 minútach a 6 týždňoch sa zrušili, zatiaľ čo ďalšie vzorky sa odoberali 240 a 336 hodín po konci infúzie v časti B testu. Ukázalo sa, že pôvodný rozvrh odoberania vzoriek krvi nebol postačujúci na adekvátne pokrytie predpokladaného polčasu rozpadu 50 hodín, ktorý bol pozorovaný v časti A testu. Celkovo sa odoberalo 3,5 ml krvi do draselných EDTA skúmaviek a 3,5 ml do koagulačných skúmaviek.

Protokol uvádzal, že pacientom je možné podávať druhú dávku ^{186}Re -BIWA 4 po tom, ako sa determinuje MTD. Tento postup bol modifikovaný prostredníctvom opravy 2. Pacienti sa považovali za vhodných pre druhý liečebný cyklus v prípade,

že reagovali na prvé podanie ^{186}Re -BIWA 4, nemali negatívne účinky alebo boli zotavení z negatívnych účinkov a nemali žiadne HAHA protilátky. Reakcia bola definovaná ako stabilné ochorenie (tzn. žiadna zmena), čiastočná remisia alebo kompletná remisia. Druhá podávaná dávka bola vždy 50 mCi/m². Kvôli zmene v spojovníku sa test ukončil pred tým, ako sa preskúmala druhá dávka s dávkovacím režimom opísaným v protokole. Oprava 2 sa vydala na to, aby bolo umožnené pacientom, ktorí reagovali, byť ošetrovanými akýmkoľvek spôsobom.

Test sa skompletizoval a ukončil po tom ako sa dosiahla MTD, kvôli zmene spojovníka. MAG3 sa nahradí s MAG2GABA-TFP v budúcom vývoji BIWA 4 projektu.

Vzorky boli dostupné na sCD44v6 determináciu vo viacerých časových bodoch ako sa pôvodne plánovalo.

Nasledujúce zmeny sa urobili po zhodnotení údajov a po diskusii v rámci testovacieho tímu.

Pomer %ID/kg nádoru versus %ID/kg nenádorového tkaniva sa robil len pre kostnú dreň, kvôli variabilite výsledkov.

To isté platí pre hodnotenie veľkosti nádoru. Meranie neboli kompletne, takže ohrozili racionálne hodnotenie. Preto sa nerobila žiadna formálna analýza.

4. Pacienti v štúdií

4.1 Dispozícia pacientov

Z 33 pacientov traja pacienti prerušili test kvôli negatívnym účinkom pred podávaním testovaného lieku (tabuľka 6.1:1). Títo traja pacienti neboli zahrnutí do analýzy. Do tohto testu vstúpilo a liečilo sa v ňom celkovo 30 pacientov.

Časť A

Desať z 30 ošetrovaných pacientov bolo zahrnutých v časti A pričom vždy traja a traja dostávali 25 mg, respektíve 100 mg $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BIWA 4, zatiaľ čo štyria pacienti dostali 50 mg $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BIWA 4. Všetci pacienti v časti A dokončili test.

Časť B

Dvaja z 20 pacientov ošetrovaných v časti B prerušili kvôli negatívnym účinkom (dvaja pacienti zomreli). Trom pacientom sa podala druhá dávka 50 mCi/m².

Tabuľka 6.1: 1 Dispozícia pacientov

	Časť A			Časť B					Spolu
	^{99m} Tc-BIWA 4			¹⁸⁶ Re-BIWA 4 [mCi/m ²]					
	25 mg BIWA4	50 mg BIWA 4	100 mg BIWA 4	20	30	40	50	60	
Skrínovaní									33
Podieľajúci sa	3	4	3	2	4	3	6	5	30
Ošetrovaní	3	4	3	2	4	3	6	5	30
Ukončiaci	3	4	3	2	3	2	6	5	28
Prerušili	0	0	0	0	1	1	0	0	2
kvôli AE	0	0	0	0	1	1	0	0	2
kvôli neúčinnosti	0	0	0	0	0	0	0	0	0
z iného dôvodu	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Zdroj: príloha 16.1.9.2 tabuľka 1.1

4.2 Odchýlky od protokolu

Porušeniami protokolu boli väčšinou odchýlky ($>\pm 10\%$) od časových okien poskytnutých v protokole týkajúcich sa odoberania vzoriek krvi a/alebo moču. Postihnutí pacienti neboli vylúčený z analýzy, ale sa na určovanie koncentrácií v krvi, plazme, sére a moči použili vzorky krvi a moču odoberané v aktuálnych časoch.

5. Hodnotenie účinnosti/klinickej farmakológie

Výsledky z časti A potvrdili dávku 50 mg BIWA 4 ako optimálnu dávku na liečenie. Z údajov z časti B vyplýva, že pacienti môžu klinicky profitovať zo ¹⁸⁶Re-BIWA 4 terapie pri radiačnej dávke nižšej ako dávka, pre ktorú bola pozorovaná DLT.

Namerané koncentrácie BIWA 4 boli úmerné dávke a obličkami bolo vylučované mierne množstvo podávanej dávky.

5.1 Analýza súborov údajov

Všetci pacienti, ktorí dostali aspoň jednu dávku testovaného lieku, boli zahrnutý do zamýšľanej analýzy. Sedem pacientov z časti A bolo zahrnutých v jednej protokolovej analýze. Žiadna analýza na jeden protokol sa neuskutočňovala v časti B.

5.2 Demografické a iné základné charakteristiky

Priemerný vek všetkých podieľajúcich sa pacientov bol 56 rokov (v rozsahu od 37 do 78). 19 pacienti boli muži a 11 bolo žien (tabuľka 5.2:1).

Traja pacienti ošetrovaní v skupine A nikdy nefajčili, zatiaľ čo sedem pacientov fajčilo aj v danom čase (čas fajčenia v rozsahu 19 až 47 rokov). Častá konzumácia alkoholu sa uvádzala u ôsmich pacientov, zatiaľ čo dvaja boli abstinenti (tabuľka 5.2:1).

Všetci pacienti v časti B boli buď ex-fajčiari, alebo fajčili (tabuľka 5.2:1) s priemerným trvaním fajčenia 35 rokov (v rozsahu od 10 do 86 rokov). Šiesti pacienti boli abstinenti, zatiaľ čo zvyšní pacienti často konzumovali alkohol (tabuľka 5.2:1).

U všetkých pacientov zahrnutých v časti A bolo štádium ochorenia lokálne operovateľné, zatiaľ čo pacienti z časti B mali opakované ochorenie (15 pacientov) a/alebo metastázy (3 pacienti). Jeden pacient mal lokálne neoperovateľné ochorenie. Informácie pre jedného pacienta chýbali.

Súbežné ochorenia alebo relevantná anamnéza boli uvádzané u 28 pacientov (tabuľka 5.2:1). Súbežná terapia bola potrebná u všetkých pacientov. Najčastejšie používanými liekmi boli analgetiká, sedatíva, laktulóza, H₂-blokátory, anti-emetiká a antimikrobiotiká.

Tabuľka 5.2:1

Demografické a základné charakteristiky. Udávané sú priemery pre vek. Všetky ostatné čísla označujú počty pacientov

	Časť A			Časť B					Spolu
	^{99m} Tc-BIWA 4			¹⁸⁶ Re-BIWA 4 [mCi/m ²]					
	25 mg BIWA4	50 mg BIWA 4	100 mg BIWA 4	20	30	40	50	60	
n	3	4	3	2	4	3	6	5	30
vek [priemer]	45,7	58,5	58,7	57,0	61,0	53,0	57,0	60,4	56,4
muži/ženy	2/1	2/2	1/2	1/1	3/1	2/1	5/1	3/2	19/11
konc. ochorenia	3	3	2	2	4	3	6	5	28
súbežná terapia	3	4	3	2	4	3	6	5	30
fajčiari	2	4	1	0	1	0	3	1	12
ex-fajčiari	0	0	0	2	3	3	3	4	15
konzumenti alkoholu	3	3	2	0	3	3	6	2	22

Počiatočná diagnóza ochorenia bola známa u pacientov z časti A približne jeden mesiac pred zahrnutím do štúdie, zatiaľ čo pacienti zahrnutí v časti B boli chorý priemerne dva roky (rozsah 0,1 až 17,5 rokov; tabuľka 5.2:2). Karnofského skóre bolo v rozsahu od 70 do 100 u pacientov z časti A. Pacienti z časti B mali Karnofského skóre od 70 do 90 (tabuľka 5.2:2).

Pri diagnóze boli metastázy uvádzané u jedného pacienta v časti B testu.

Všetci pacienti v časti B sa podrobili predchádzajúcej rádio- a/alebo chemoterapii, zatiaľ čo pacienti v časti A sa nepodrobili ani predchádzajúcej chemo- ani rádioterapii (tabuľka 5.2: 2). Najčastejšie používanými systémovými protirakovinovými liekmi boli cisplatina, metotrexát a flurouracil.

Predchádzajúci chirurgický zákrok bol radikálny u jedenástich z 13 pacientov v časti B, ktorí mali predchádzajúci chirurgický zákrok. Len jeden pacient z časti A sa podrobil predchádzajúcemu chirurgickému zákroku (tabuľka 5.2:2).

Veľkosť lézií (vrátane metastáz) nádorov bol v rozsahu od 14 mm² do 10304 mm². Primárna nádorová veľkosť bola primerane diferencovaná u väčšiny pacientov. Lymfatické uzliny boli postihnuté u 13 pacientov (tabuľka 5.2:2).

Tabuľka 5.2:2

Demografické a základné charakteristiky. Uváňané sú priemery pre vek známeho ochorenia a Karnofského skóre. Všetky ostatné čísla označujú počty pacientov

	Časť A			Časť B				
	^{99m} Tc-BIWA 4			¹⁸⁶ Re-BIWA 4 [mCi/m ²]				
	25 mg BIWA4	50 mg BIWA4	100 mg BIWA4	20	30	40	50	60
n	3	4	3	2	4	3	6	5
roky známosti ochorenia	0,11	0,08	0,07	9,30	2,13	1,17	0,80	1,16
Karnofského skóre	90	90	100	80	75	76,7	85	80
Radikálny chirurg. zákrok	0	0	0	2	2	1	2	4
Postihnuté lymf. uzliny	2	2	0	2	3	2	1	1
Predchádzajúca chemoterapia	0	0	0	1	3	1	4	1
Predchádzajúca rádioterapia	0	0	0	2	4	3	6	5

5.3 Merania prispôsobenia sa liečbe

Všetky lieky sa podávali pod dozorom výskumníka alebo jeho delegáta. Odoberala sa krv na determináciu farmakokinetík BIWA 4. Všetci pacienti mali detegovateľné hladiny BIWA 4 v krvi.

5.4 Účinnosť/klinické farmakologické výsledky

Traja zo šiestich pacientov vykazovali stabilné ochorenie pri maximálnej tolerovanej dávke 50 mCi/m². V časti A testu sa potvrdilo, že dávka 50 mg BIWA 4 je optimálna dávka, čo sa týka koncentrácií v krvi a selektívneho príjmu nádorom. Plazmatické koncentrácie BIWA 4 boli proporcionálne k dávke v rozsahu 25 mg až 100 mg BIWA 4 v časti A a vrcholili v 0,9 hodine s koncovým eliminačným polčasom rozpadu od 54 do 74 hodín v časti A, a 94 hodín v časti B.

5.4.1 Analýza účinnosti/farmakodynamických parametrov

5.4.1.1 Primárne koncové body

Primárnym koncovým bodom účinnosti bola biologická distribúcia ^{99m}Tc-BIWA 4 v časti A. Ďalšími primárnymi koncovými bodmi boli analýzy rádioimuno-scitigrafických zobrazení a farmakokinetických parametrov (opísaných v časti 5.4.2) pre časť A, respektíve pre časť B testu. Dozimetria sa robila len pre časť B.

Biologická distribúcia ^{99m}Tc-BIWA 4 v časti A

V priebehu chirurgického zákroku sa získali tkanivové vzorky a príjem ^{99m}Tc -BIWA 4 sa vyjadril ako % injektovanej dávky (ID) na kg tkaniva.

Podskupina určená na liečenie (ITT): Relatívna biologická distribúcia ^{99m}Tc -BIWA 4 bola najvyššia v nádore vo všetkých troch dávkovacích skupinách s výnimkou pacienta 1 (25 mg BIWA 4), pacienta 5 (5 mg BIWA 4, žiadne nádorové bunky) a pacienta 9 (100 mg BIWA 4). Príjem do nádoru bol v rozsahu od 6 do 17 % ID/kg v dávkovej skupine 25 mg, 5 až 28 % ID/kg v dávkovej skupine 50 mg a 13 až 17 % ID/kg v dávkovej skupine 100 mg. Vypočítaný priemerný pomer príjmu nádorom a príjmu kostnou dreňou bol 1,7 v 25mg dávkovej skupine, 2,6 v 50mg dávkovej skupine a 2 v 100mg dávkovej skupine (tabuľky 7.2:1 a 7.2:2).

Podskupina na jeden protokol: Relatívna biologická distribúcia ^{99m}Tc -BIWA 4 bola najvyššia v nádore vo všetkých troch dávkovacích skupinách s výnimkou pacienta 1 (25 mg BIWA 4). Príjem do nádoru bol v rozsahu od 6 do 17 % ID/kg v dávkovej skupine 25 mg, 23 až 28 % ID/kg v dávkovej skupine 50 mg a 16 % ID/kg v dávkovej skupine 100 mg. Vypočítaný priemerný pomer príjmu nádorom a príjmu kostnou dreňou bol 1,7 v 25mg dávkovej skupine, 3,2 v 50mg dávkovej skupine a 2,5 v 100mg dávkovej skupine (tabuľky 7.2:1 a 7.2:3).

Ukázalo sa, že trend vyššieho príjmu nádorom s malou veľkosťou je v 25mg BIWA 4 dávkovej skupine. Podobné hodnotenie nebolo možné pre 50mg a 100mg BIWA 4 dávkovú skupinu, kvôli limitovanému počtu pacientov (tabuľka 7.2:4).

Vysoký príjem v %ID/kg sa pozoroval v supernatante z kostnej drene (až do 17 %ID/kg) a v plazme alebo krvi (až do 13 %ID/kg), ktorý bol vždy nižší ako príjem nádorom v protokolovej populácii s výnimkou pacienta 1 (25 mg BIWA 4). Príjem kožou a sliznicou bol vždy nižší ako príjem primárnym nádorom v protokolovej podskupine.

Rádioimunos cintigrafické zobrazenia ^{99m}Tc -BIWA 4 v časti A

Zatiaľ čo žiadny príjem rádioaktivity sa nezistil v nádore priamo po infúzii, stredný príjem 1,9 sa zaznamenal po 21 hodinách. Príjem rádioimunokongugátu sa ukázal byť nižší v kostnej dreni a obličkách tak priamo po infúzii, ako aj 21 hodín po infúzii. Príjem bol nižší ako stredný v pľúcach, zatiaľ čo pečeň odhalila vyšší príjem.

Podobný vzor bol pozorovaný pre protokolovú populáciu. Jediným rozdielom sa ukázal byť vyšší príjem v obličkách, zatiaľ čo príjem bol nižší v pľúcach, v porovnaní s populáciou určenou na liečenie.

Rádioimunoscintigrafické zobrazenia ^{186}Re -BIWA 4 v časti B

Rádioimunoscintigrafické vyšetrenia sa robili okamžite po infúzii a 21, 48, 72, 144 a 336 hodín po infúzii. Takmer žiadny príjem nádorom nebol pozorovaný priamo po infúzii. Relatívny príjem nádorom sa ukázal byť na dávke závislý a zvyšoval sa s časom, pričom stredný príjem sa dosiahol po 72 hodinách a maximálny príjem po 144 hodinách s poklesom po 336 hodinách.

Biologická distribúcia rádioaktivity bola podobná v kostnej dreni, pľúcach, pečeni, obličkách a tenkom čreve a nevykazovala rovnaký na dávke závislý efekt (s výnimkou tenkého čreva). Navyše, relatívny príjem rádioaktivity sa ukázal byť konštantným alebo mierne sa znižujúcim v čase a bol podobný pre všetky dávky rádioaktivity. Príjem kostnou dreňou bol najnižší pre väčšinu ošetrovacích skupín.

5.4.1.2 Sekundárne koncové body

Sekundárnymi koncovými bodmi účinnosti boli nádorová reakcia na terapiu v časti B a hladina CD44v6 expresie v nádore v časti A. Expresia rozpustného CD44v6 sa determinovala tak v časti A, ako aj v časti B testu.

CD44v6 expresia v nádore v časti A

Údaje o determinácii CD44v6 antigénovej expresie sú dostupné pre siedmich pacientov. CD44v6 antigénová expresia sa pozorovala byť vo viac ako 90 % nádorových buniek u piatich pacientov a vo viac ako 80 % nádorových buniek u dvoch pacientov, pričom CD44v6 antigénová expresia sa detegovala ako prítomná vo viac ako 90 % buniek lymfatických uzlinových metastáz u štyroch pacientov, ktorých lymfatické uzliny boli dostupné na hodnotenie. Homogénna CD44v6 antigénová expresia sa pozorovala u všetkých pacientov v sliznici.

Nádorová reakcia v časti B

Pacienti, ktorí boli ošetrovaný s dávkami do 40 mCi/m^2 $^{186}\text{Re-BIWA 4}$, nevykazovali klinickú reakciu nádoru. Všetci pacienti vykazovali progresívne ochorenie. Jeden pacient nebol hodnotený kvôli úmrtiu.

U troch zo šiestich pacientov, ktorí boli ošetrovaný s 50 mCi/m^2 $^{186}\text{Re-BIWA 4}$, sa vyvinulo stabilné ochorenie alebo nenastala žiadna zmena po prvom cykle. Dvaja z týchto troch pacientov, ktorí boli ošetrený v ďalšom cykle s 50 mCi/m^2 $^{186}\text{Re-BIWA 4}$, mali progresívne ochorenie po druhom cykle. Progresívne ochorenie sa pozorovalo po celkovo 148 dňoch (pacient 109), respektíve 127 dňoch (pacient 116) po prvom podaní testovaného lieku.

U jedného pacienta ošetreného so 60 mCi/m^2 $^{186}\text{Re-BIWA 4}$ sa vyvinulo stabilné ochorenie po prvom cykle. U tohto pacienta sa vyvinulo progresívne ochorenie po druhom cykle s 50 mCi/m^2 $^{186}\text{Re-BIWA 4}$ (173 dní po prvom podaní testovaného lieku).

Celkový čas na progresiu pacientov, ktorí nereagovali na terapiu, bol v rozsahu od 0 do 55 dní s priemerom približne päť až šesť týždňov bez ohľadu na liečebnú skupinu.

Rozpustný CD44v6 v časti A a B

Rozpustný CD44v6 sa determinoval u všetkých pacientov ošetrovaných s BIWA 4 v predložennom teste.

Množstvo detegovaného rozpustného CD44v6 malo tendenciu sa zvyšovať pri pacientoch ošetrovaných s $^{186}\text{Re-BIWA 4}$ (tabuľka 7.2:6) počas testu v časti B, zatiaľ čo u pacientov ošetrovaných s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ v časti A nebolo možné pozorovať žiadny takýto trend.

5.4.2 Lieková dávka, lieková koncentrácia a ich vzťah k reakcii

Farmakokinetiky BIWA 4 budú prezentované separátne pre časť A a časť B, pretože bolo odlišné rádioaktívne značenie (časť A: $^{99\text{m}}\text{Tc}$; časť B: ^{186}Re).

5.4.2.1 Analytická výkonnosť týkajúca sa BIWA 4, HAHAs a CD44v6

Overené testy sa použili na analýzu plazmatických vzoriek. Analýza kvalitatívnych kontrolných vzoriek vyprodukovala výsledky s vysokou presnosťou a precíznosťou.

Analytická výkonnosť s ohľadom na gama snímanie vzoriek

Nebola testovaná signálová linearita scintilačného kryštálu v gama snímači. Dá sa predpokladať na základe typu zariadenia, aspoň v energetickom rozsahu, ktorý bol použitý v predloženej štúdii. Kalibračné vzorky vykazovali typicky 40000 až 100000 impulzov za minútu vs menej ako 50 až 100 impulzov za minútu pri vzorkách pozadia. Presnosť siedmich meraní na kalibračný štandard bola pravidelne v rámci 2 %. To isté platí pre presnosť jednotlivých trojitých meraní v krvi, sére a moči. Vzorky krvi a séra vykazovali typicky aktivity medzi 2000 a 100000 impulzov za minútu.

Neboli žiadne kvalitatívne kontrolné vzorky na odčítavanie rádioaktivity. Z presnosti opakovaných meraní kalibračných štandardov a vzoriek odvodených z predloženej štúdie vyplýva, že presnosť trojitých meraní bola lepšia ako aspoň 2 %.

5.4.2.1 Farmakokinetiky

Časť A

Časť A pozostávala z 10 pacientov, ktorí dostali jednotkovú BIWA 4 dávku v rozsahu od 25 do 100 mg s konštantnou rádioaktívne značenou dávkou 20 mCi ^{99m}Tc . Farmakokinetické parametre v plazme pre BIWA 4 namerané prostredníctvom ELISA po krátkej intravenózne infúzii sú uvedené v tabuľke 5.4.2.2:1.

Tabuľka 5.4.2.2:1

Farmakokinetické parametre pre BIWA 4 v plazme z časti A štúdie

Pacient	BIWA 4 dávka (mg)	t _{max} (min)	C _{max} (ng/ml)	Polčas rozpadu (h)	AUC _{inf} (μg.h/ml)	Vz (l)	CL (ml/min)	MRT (h)
1	25	0	6634	44,1	387,4	4,1	1,076	58,0
2	25	30	6640	67,0	534,7	4,5	0,779	94,8
3	25	10	9890	53,3	542,9	3,5	0,768	71,0
4	50	29	14900	64,9	1112,3	4,2	0,749	84,8
5	50	121	15500	102,8	1580,2	4,7	0,527	135,2
8	50	5	13900	53,0	831,0	4,6	1,003	71,7
10	50	41	16700	83,8	1461,6	4,1	0,570	110,0
6	100	4	30500	85,0	2548,9	4,8	0,654	112,0
7	100	17	30600	76,0	2709,6	4,0	0,615	110,4
9	100	30	24500	44,6	1708,1	3,8	0,976	61,1
Geometrický priemer								
	25 mg	-	7503	54,0	482,7	4,0	0,863	73,1
	50 mg	29	15216	73,8	1208,8	4,4	0,689	97,5
	100 mg	13	28383	66,0	2276,4	4,2	0,732	91,1

Bolo pozorované zvýšenie C_{max} BIWA 4 plazmatických koncentrácií a oblasť pod krivkou bola proporcionálna k podávanej dávke (obrázky 4 a 5).

Determinovali sa aj sérové koncentrácie rádioaktívnej značky (^{99m}Tc) a farmakokinetické parametre sú prezentované v tabuľke 5.4.2.2:2.

Tabuľka 5.4.2.2:2

Farmakokinetické parametre pre ^{99m}Tc-BIWA 4 v sére z časti A štúdie

Pacient	^{99m} Tc-BIWA 4 dávka (mCi)	t _{max} (min)	C _{max} (%ID/kg)	Polčas rozpadu (h)	AUC _{inf} (%ID.h/kg)	Vz (l)	CL (kg/min)	MRT (h)
1	19,0 mCi	117	52,66	44,6	3376,9	1,9	0,030	63,8
2	20,0 mCi	10	28,08	55,6	2151,7	3,7	0,048	79,1
3	21,4 mCi	10	39,11	27,5	1445,3	2,7	0,072	41,5
4	19,5 mCi	29	31,84	31,3	1432,8	3,2	0,072	43,8
5	19,1 mCi	121	32,29	39,6	1934,8	3,0	0,054	56,3
8	18,8 mCi	114	28,41	42,8	1620,1	3,8	0,060	60,8
10	19,3 mCi	41	40,31	43,1	2247,1	2,8	0,042	62,3
6	19,3 mCi	120	30,45	45,3	1946,5	3,4	0,054	65,2
7	19,8 mCi	77	35,79	36,0	1628,6	3,2	0,060	51,1
9	18,3 mCi	238	31,94	35,5	1805,6	2,8	0,054	50,6
Harmonický priemer				38,7				
Geometrický priemer		57,9	34,5	39,4	1898,0	3,0	0,053	56,5

Geometrický priemer polčasu rozpadu pre BIWA 4 meraný prostredníctvom ELISA v plazme po intravenóznejs infúzii bol v rozsahu od 54 do 73,8 hodín pre tri liečebné skupiny študované v časti A. Geometrický priemer polčasu rozpadu pre ^{99m}Tc -rádioaktívne značenú BIWA 4 pre rovnaké vzorky bol kratší, s hodnotou 39,4 hodiny v sére a 46,4 hodiny v krvi. Odhaduje sa, že diskrepancia medzi dvoma priermi je spôsobená dlhším časom na odoberanie vzoriek, ktorý bol možný pri BIWA 4 kvôli obmedzeniam rádioaktivitového testu.

Rádioaktivita bola vylučovaná do moču v množstvách uvádzaných v tabuľke 5.4.2.2:3. Kvôli nekompletnosti zbierok v priebehu 48 hodín (tzn. kumulatívne údaje nemusia byť vždy porovnateľné kvôli rozdielom v trvaní zbierania), sa nerobilo žiadne ďalšie hodnotenie týchto údajov o vylučovaní do moču. Pre šesť pacientov s kompletnými 48-hodinovými zbierkami bolo priemerné množstvo zhromaždenej rádioaktivity 10 % z počiatočnej dávky.

Tabuľka 5.4.2.2:3

Množstvo rádioaktivity (^{99m}Tc) vylučovanej (ako percento počiatočnej dávky) do moču v časti A

Pacient	0-4	4-8	8-12	12-24	24-48	Kumulatívne množstvo (%ID)
1	2,80	10,13	5,08	n.a	n.a	18,01
2	1,94	0,97	0,52	3,09	3,23	9,75
3	0,29	1,44	1,19	n.a	n.a.	2,92
4	1,68	1,42	1,95	1,14	2,21	8,40
5	2,20	1,60	1,02	3,96	3,98	12,76
8	1,29	2,45	0,88	3,67	3,00	11,29
10	n.a	n.a	n.a	n.a.	n.a.	
6	2,55	1,59	1,80	1,89	2,00	9,83
7	n.a.	3,14	n.a.	1,79	3,13	8,06
9	1,54	3,34	0,00	1,05	2,31	8,24

n.a. = neaplikovateľné, žiadne dostupné údaje

Časť B

Časť B pozostávala z 20 pacientov, ktorí dostali BIWA 4 dávky v množstve 50 mg s rôznymi rádioaktívne značenými dávkami ^{186}Re -BIWA 4 v rozsahu od 20 do

60 mCi/m². Traja pacienti dostali druhú intravenóznú infúziu, zatiaľ čo 17 pacientov dostalo v priebehu terapie len jedinú dávku.

Graficky, bol súlad medzi plazmatickými BIWA 4 koncentráciami a sérovými rádioaktivitovými koncentráciami pre každého pacienta a u troch pacientov, ktorí dostali ¹⁸⁶Re-BIWA 4 pri dvoch príležitostiach. Tento súlad pozorovaný graficky kontrastuje s dojemom dlhšieho polčasu rozpadu rádioaktivity, keď boli údaje modelované (nekompartmentové hodnotenie). Geometrický priemer polčasu rozpadu 122 hodín pre rádioaktivitovú časť ¹⁸⁶Re-BIWA 4 bol dlhší ako plazmatický polčas rozpadu 94 hodín determinovaný prostredníctvom ELISA pre BIWA 4.

Zoskupovanie (tabuľky 5.4.2.2:6 a 5.4.2.2:7) farmakokinetických parametrov prostredníctvom množstva podávanej rádioaktivity vykazovalo určité trendy dlhšej expozície so zvyšujúcou sa dávkou rádioaktivity, ale počty jedincov v každej dávkovej skupine sú príliš malé na vytvorenie akéhokoľvek logického záveru.

Tabuľka 5.4.2.2:6

Geometrické priemery plazmatických BIWA 4 farmakokinetických parametrov zoskupované prostredníctvom množstva udávanej rádioaktivity

¹⁸⁶ Re dávka (mCi/m ²)	n	C _{max} (ng/ml)	Polčas rozpadu (h)	AUC _{inf} (μg.h/ml)	Vz (l)	CL (ml/h)	MRT (h)
20	2	12160	106,5	1217	6,3	41,1	130,3
30	4	15239	86,2	1399	4,4	35,7	116,2
40	3	11121	90,6	1201	5,4	41,7	125,1
50	9*	12982	92,4	1055	6,3	47,4	117,4
60	5	11927	99,8	939	7,7	53,2	115,9

*sú zahrnutí pacienti, ktorí dostali dve dávky 50 mCi/m²

Tabuľka 5.4.2.2:7

Geometrické priemery sérových ¹⁸⁶Re-BIWA 4 farmakokinetických parametrov zoskupované prostredníctvom množstva udávanej rádioaktivity

¹⁸⁶ Re dávka (mCi/m ²)	n	C _{max} (%ID/kg)	Polčas rozpadu (h)	AUC _{inf} (%ID.h/kg)	Vz (kg)	CL (kg/h)	MRT (h)
20	2	30,88	114,4	3296	5,01	0,030	154,6
30	4	40,09	98,8	4365	3,27	0,023	134,5
40	3	28,82	126,4	3856	4,73	0,026	172,4

50	9*	40,22	123,3	4182	4,25	0,024	162,5
60	4	32,10	145,2	3493	6,00	0,029	185,5

*sú zahrnutí pacienti, ktorí dostali dve dávky 50 mCi/m²

5.4.2.2 Farmakokinetická/farmakodynamická analýza

Farmakokinetická/farmakodynamická analýza sa neuskutočňovala.

5.4.3 Štatistické/analytické otázky

Analýza sa uskutočňovala tak, ako bolo pôvodne plánované. Podrobnosti sú opísané v časti 3.7.1.3.

5.4.3.1 Primárne koncové body

Neaplikovateľné

5.4.3.2 Sekundárne koncové body

Neaplikovateľné.

5.4.4 Interakcie liek-liek a liek-ochorenie

Nerobili sa žiadne testy týkajúce sa interakcie liek-liek alebo liek-ochorenie.

5.4.5 Prejavy subjektov

Podrobnosti pozri v časti 6.4.2.2 a 6.4.2.3.

5.5 Závery o účinnosti/klinickej farmakológii

Časť A

Výsledky z časti A potvrdili dávku 50 mg BIWA 4 ako optimálnu dávku na liečenie na základe koncentrácií v krvi a na základe úrovni príjmu tkanivom. Distribúcia, hodnotená prostredníctvom rádioscintigrafie a biopsiových meraní, bola takmer vo všetkých prípadoch najvyššia v nádoroch v porovnaní s inými tkanivami. Prijem rádioaktivity sa zvyšoval v nádoroch s časom. CD44v6 expresia bola prítomná vo viac ako 80 % buniek primárneho nádoru a vo viac ako 90 % buniek lymfatických uzlinových metastáz, a vo všetkých získaných vzorkách sliznice.

Množstvo rozpustného CD44v6 sa ukázalo byť konštantné pred a po podaní ^{99m}Tc -BIWA 4.

Namerané koncentrácie BIWA 4 boli proporcionálne k dávke v rozsahu 25 mg až 100 mg BIWA 4. Mierne množstvo podanej dávky bolo vylučované obličkami. % ID vylučované do moču bolo podobné vo všetkých dávkových skupinách.

Časť B

Z údajov z časti B vyplýva, že pacienti môžu mať klinický úžitok zo ^{186}Re -BIWA 4 terapie pri MTD. Jeden z piatich pacientov ošetrovaných so 60 mCi/m^2 mal stabilné ochorenie. Traja zo šiestich pacientov mali stabilné ochorenie pri maximálne tolerovanej dávke 50 mCi/m^2 . Čas do progresie bol v rozsahu 127 až 173 dní u tých pacientov, ktorí dostali druhú dávku 50 mCi/m^2 . Rádioimuno-scintigrafia indikuje príjem rádioaktivity do nádorového tkaniva. Biologická distribúcia bola porovnateľná v iných tkanivách bez ohľadu na dávku. Dozimetrická analýza neodhalila neočakávane vysoko absorbované dávky v iných ako nádorových tkanivách s výnimkou semenníkov. Avšak relevancia pozorovanej dávky v semenníkoch vo vzťahu k poškodeniu plodnosti je teraz nejasná.

Detegované množstvo rozpustného CD44v6 malo tendenciu sa zvyšovať u pacientov ošetrovaných so ^{186}Re -BIWA 4.

Plazmatické koncentrácie BIWA 4 vrcholili v 0,92 hodine a protilátka sa eliminovala s geometrickým priemerom polčasu rozpadu 94 hodín pre BIWA 4, čo sa determinovalo prostredníctvom ELISA. $C_{\max}$ a AUC hodnoty (ELISA meranie) boli podobné ako hodnoty získané v časti A testu pre 50 mg BIWA 4 dávkovú skupinu.

Dávku limitujúca toxicita nastávala pri dávke 60 mCi/m^2 , zatiaľ čo dávka 50 mCi/m^2 ^{186}Re -BIWA 4 sa ukázala byť maximálne tolerovanou dávkou v predloženom teste. Dávku limitujúcou toxicitou boli negatívne účinky na kostnú dreň, tzn. trombocytopenia a leukopenia.

6.1 Rozsah expozície

Všetkým desiatim pacientom ošetrovaným v časti A testu sa podávala jediná dávka ^{99m}Tc -BIWA 4. Dávky BIWA 4 boli buď 25 mg , alebo 50 mg , alebo 100 mg , zatiaľ čo dávka ^{99m}Tc bola 20 mCi .

V časti B sa 20 pacientom podávala jediná dávka ^{186}Re -BIWA 4. Traja pacienti dostali druhú dávku 50 mCi/m^2 , vďaka stabilnému ochoreniu (žiadna zmena). Dávka BIWA 4 sa udržiavala stabilná na 50 mg , zatiaľ čo rádioaktivita ^{186}Re sa zvyšovala s telesnými povrchovými prírastkami 10 mCi/m^2 .

Dávka sa vypočítavala podľa telesnej povrchovej oblasti (tabuľka 6.1:1).

Tabuľka 6.1:1

Priemerná dávka podávanej rádioaktivity

	Časť A			Časť B				
	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BIWA 4			^{186}Re -BIWA 4 [mCi/m^2]				
	25 mg BIWA4	50 mg BIWA 4	100 mg BIWA 4	20	30	40	50	60
N	3	4	3	2	4	3	6	5
$\text{mCi } ^{99\text{m}}\text{Tc}$	$20,1 \pm 1,2$	$19,2 \pm 0,3$	$19,1 \pm 0,8$	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
$\text{mCi } ^{186}\text{Re}$	n.a	n.a	n.a	$33,1 \pm 1,7$	$52,4 \pm 5,6$	$70,6 \pm 5,2$	$87,2 \pm 8,5$	$97,2 \pm 8,3$

n.a = neaplikovateľné, uvádzané sú priemerné hodnoty a štandardná odchýlka

Rádiochemická čistota lieku bola vyššia ako 95 % a imunoreaktívna frakcia bola vyššia ako 80 %.

Po podaní testovaného lieku nasledovala pozorovacia perióda trvajúca najmenej 6 týždňov.

6.2 Negatívne účinky (Aes)

Negatívne účinky sa uvádzali u všetkých ošetrovaných pacientov. Kvôli AE prerušili dvaja pacienti pozorovaciu periódu v časti B. Neuskutočnila sa žiadna akcia s testovaným liekom, kým nebolo ukončené ošetrovanie.

Časť A

U väčšiny pacientov v časti A sa vyvinuli telesné negatívne účinky (50 %), ktoré mohli byť spôsobené aj podstúpeným chirurgickým zákrokom a s ním spojenou bolesťou. Neuvažoval sa žiadny špeciálny vzor negatívnych účinkov a u žiadneho z pacientov sa nevyvinuli CTC kritéria 3 alebo 4, ktoré by boli považované za súvisiace s liekom (tabuľky 6.2.2: 1 a 2).

Traja pacienti sa stretli so závažnými negatívnymi účinkami, ktoré sú opísané v časti 6.3.1.

Časť B

Negatívne účinky v systémovej orgánovej triede (SOC) „telo ako celok“ sa uvádzali u 65 % pacientov, nasledovali negatívne účinky zo systémovej orgánovej triedy „krvné doštičky, krvácanie a poruchy zrážania“ (60 % pacientov) a „poruchy bielych krviniek a retikuloendoteliálneho systému“ (50 % pacientov). S liekom súvisiaca trombocytopéia nastala u 11 pacientov (55 %) a leukopénia u 10 (50 %) pacientov priemerne 21 dní po začiatku rádioimunoterapie a vo všeobecnosti boli reverzibilné po 6 týždňoch. Pri týchto účinkoch bola pozorovaná na dávke závislá reakcia (tabuľka 6.2.2:3).

Hematologická dávku limitujúca toxicita definovaná ako s liekom súvisiaci CTC stupeň 4 bola pozorovaná u troch pacientov.

Nehematologická dávku limitujúca toxicita, definovaná ako s liekom súvisiaca nehematologická toxicita CTC stupňa 3 alebo 4, nastala u 4 pacientov (pri 30 mCi/m² sa u jedného pacienta vyvinuli vyrážky a Quinckekov edém, dvaja pacienti mali horúčku pri 60 mCi/m² a jeden pacient bol unavený pri 60 mCi/m²).

Šiesti z deviatich pacientov, u ktorých sa objavili závažné negatívne účinky, zomreli. Úmrtia a závažné negatívne účinky sú opísané v časti 12.3.1.

6.2.2 Prejav negatívnych účinkov

Časť A

Nasledujúce negatívne účinky roztriedené podľa SOC, výhodný termín a tri dávkové skupiny BIWA 4 sú uvádzané u viac ako jedného pacienta v časti A testu (tabuľka 6.2.2:1). Viac podrobností, ako aj výhodné termíny je možné nájsť v časti 7.3.1.

Tabuľka 6.2.2:1

Pacienti s negatívnymi účinkami v časti A (pred-chirurgické ošetrenie s jednou dávkou 20 mCi ^{99m}Tc-BIWA 4)

	^{99m} Tc-BIWA 4			
	25 mg BIWA4	50 mg BIWA4	100 mg BIWA4	celkovo
počet pacientov (% ošetrovaných pacientov)	3 (100)	4 (100)	3 (100)	10 (100)
počet pacientov bez negatívneho účinku	3 (100)	4 (100)	3 (100)	10 (100)
aplikácia miestnych porúch	2 (66,7)	0 (0)	0 (0)	2 (20,0)
telo ako celok	2 (66,7)	2 (50,0)	1 (33,3)	5 (50,0)
bolesť	1 (33,3)	1 (25,0)	1 (33,3)	3 (30,0)
metabolické a výživové poruchy	1 (33,3)	2 (50,0)	1 (33,3)	4 (40,0)
pokles hmotnosti	1 (33,3)	1 (25,0)	0 (0)	2 (20,0)
porucha mechanizmu odolnosti	0 (0)	4 (100)	0 (0)	4 (40,0)
Infekcia	0 (0)	3 (75,0)	0 (0)	3 (30,0)
cievne poruchy	1 (33,3)	1 (25,0)	1 (33,3)	3 (30,0)
krvácanie (nešpecifikované)	1 (33,3)	1 (25,0)	0 (0)	2 (20,0)

údavané sú SOCy a výhodné termíny v prípade, že boli uvádzané pre viac ako jedného pacienta; čísla v zátvorkách označujú percento ošetrovaných pacientov

Účinky, ktoré boli vyšetrovateľom považované za súvisiace s liekom, odstupňované podľa CTC kritérií, sú uvedené v tabuľke 6.2.2:2. Účinky mali stupeň 1 podľa CTC.

Tabuľka 6.2.2:2

Závažnosť s liekom súvisiacich (podľa posúdenia vyšetrovateľa) negatívnych účinkov podľa CTC kritérií v časti A (pred-chirurgické ošetrenie s jednou dávkou 20 mCi ^{99m}Tc-BIWA 4)

	^{99m} Tc-BIWA 4			
	25 mg BIWA 4	50 mg BIWA 4	100 mg BIWA 4	celkovo
počet pacientov	3	4	3	10
Počet neg. účinkov považovaných za súvisiacich s liekom	0	2	0	2
Porucha pečene a žlčového systému	0	2	0	2
sGOT zvýšené	0	1	0	1
SGPT zvýšené	0	1	0	1

sGOT = sérová glutámová oxáloctová transamináza

sGPT = sérová glutámová pyruvátová transamináza

Časť B

Tabuľka 6.2.2:3 prezentuje počet pacientov s negatívnymi účinkami rozdelenými podľa SOC, výhodný termín a radiačné dávkové skupiny ^{186}Re -BIWA 4 (do úvahy sú brané prvé a druhé dávky ^{186}Re -BIWA 4)

	186Re-BIWA 4 [mCi/m ²]					
	20	30	40	50	60	celkovo
Počet ošetrovaných pacientov	2 (100)	4 (100)	3 (100)	6 (100)	5 (100)	20 (100)
počet pacientov s neg. účinkami	2 (100)	4 (100)	3 (100)	6 (100)	5 (100)	20 (100)
telo ako celok	2 (100)	3 (75,0)	2 (66,7)	2 (33,3)	4 (80,0)	13 (65,0)
alergická reakcia	0 (0)	1 (25,0)	0 (0)	0 (0)	1 (20,0)	2 (10,0)
únavu	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	1 (20,0)	2 (10,0)
horúčka	0 (0)	0 (0)	2 (66,7)	0 (0)	2 (40,0)	4 (20,0)
opuch úst	1 (50,0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	2 (10,0)
bolesť	0 (0)	2 (50,0)	0 (0)	1 (16,7)	1 (20,0)	4 (20,0)
porucha centrálného a periférneho nervového systému	0 (0)	1 (25,0)	2 (66,7)	1 (16,7)	0 (0)	4 (20,0)
porucha gastro-intestinálneho systému	0 (0)	1 (25,0)	1 (33,3)	2 (33,3)	3 (60,0)	7 (35,0)
mukozitída	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	3 (60,0)	4 (20,0)
stomatitída	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	1 (20,0)	2 (10,0)
poruchy pečene a žlčového systému	1 (50,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (20,0)	2 (10,0)
sGPT zvýšené	1 (50,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (20,0)	2 (10,0)
metabolické a výživové poruchy	1 (50,0)	0 (0)	1 (33,3)	1 (16,7)	1 (20,0)	4 (20,0)
neoplazma	0 (0)	0 (0)	2 (66,7)	0 (0)	2 (40,0)	4 (20,0)
malígne zhoršenie neoplazmy	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	2 (40,0)	3 (15,0)
Poruchy krvných doštičiek, krvácania a zrážania krvi	0 (0,0)	1 (25,0)	1 (33,3)	5 (83,3)	5 (100)	12 (60,0)
trombocytopenia	0 (0,0)	1 (25,0)	1 (33,3)	4 (66,7)	5 (100)	11 (55,0)
poruchy červených krviniek	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	3 (60,0)	5 (25,0)
anémia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	3 (60,0)	5 (25,0)
porucha respiračného systému	0 (0)	1 (25,0)	1 (33,3)	0 (0)	2 (40,0)	4 (20,0)
bronchitída	0 (0)	1 (25,0)	0 (0)	0 (0)	1 (20,0)	2 (10,0)
dyspnoe	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (40,0)	2 (10,0)

nádcha	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	1 (20,0)	2 (10,0)
poruchy kože apendixu	1 (50,0)	1 (25,0)	1 (33,3)	0 (0)	1 (20,0)	4 (20,0)
vyrážky	0 (0)	1 (25,0)	0 (0)	0 (0)	1 (20,0)	2 (10,0)
proruchy bielych krviniek a RES	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	4 (66,7)	5 (100)	10 (50,0)
granulocytopénia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	2 (40,0)	3 (15,0)
leukopénia	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	4 (66,7)	5 (100)	10 (50,0)

prezentované sú SOCy a výhodné termíny v prípade, keď boli uvádzané u viac ako jedného pacienta; sGPT = sérová glutámová pyruvátová transamináza; RES = retikuloendoteliálny systém; čísla v zátvorkách označujú percento ošetrovaných pacientov.

S liekom súvisiace negatívne účinky boli uvádzané u 75 % pacientov. S liekom súvisiaca leukopénia bola uvádzaná u 50 % pacientov a trombocytopénia u 55 % pacientov.

Negatívne účinky považované za súvisiace s liekom sú uvedené v tabuľke 6.2.2:4, odstupňované podľa CTC.

CTC kritéria uvádzané v časti B (do úvahy je braná prvá a druhá dávka)

		¹⁸⁶ Re-BIWA 4 [mCi/m ²]					
	negatívny účinok	20	30	40	50	60	celkovo
CTC stupeň 1		1	0	2	6	5	14
	opuch tváre	0	n.a.	0	0	0	1
	leukopénia	0	n.a.	1	2	0	3
	moniliáza	0	n.a.	0	0	1	1
	mukozitída	0	n.a.	0	0	1	1
	abnormálne krvné doštičky	0	n.a.	0	1	0	1
	purpura	0	n.a.	0	0	1	1
	stomatitída	0	n.a.	0	1	0	1
	trombocytopénia	0	n.a.	1	2	2	5
CTC stupeň 2		0	1	0	7	7	15
	anémia	n.a.	0	n.a.	1	1	2
	dna	n.a.	0	n.a.	1	0	1
	leukopénia	n.a.	0	n.a.	1	2	3
	mukozitída	n.a.	0	n.a.	2	3	5
	stomatitída	n.a.	0	n.a.	0	1	1
	strata chuti	n.a.	0	n.a.	1	0	1
	trombocytopénia	n.a.	1	n.a.	1	0	2
CTC stupeň 3		0	2	0	2	8	12
	alergická reakcia	n.a.	1	n.a.	0	0	1
	únava	n.a.	0	n.a.	0	1	1
	horúčka	n.a.	0	n.a.	0	2	2
	leukopénia	n.a.	0	n.a.	1	1	2

	vyrážky	n.a.	1	n.a.	0	0	1
	trombocytopénia	n.a.	0	n.a.	1	4	5
CTC stupeň 4		0	0	0	3	5	8
	anémia	n.a.	n.a.	n.a.	0	1	1
	granulocytopénia	n.a.	n.a.	n.a.	1	2	3
	leukopénia	n.a.	n.a.	n.a.	1	2	3
	trombocytopénia	n.a.	n.a.	n.a.	1	0	1

udávaný je počet negatívnych účinkov; n.a. = neaplikovateľné

6.2.3 Analýza negatívnych účinkov

Časť A

Žiadne negatívne účinky vyskytujúce sa v časti A testu neboli považované za súvisiace s liekom s výnimkou jedného pacienta, u ktorého sa vyskytlo mierne a reverzibilné zvýšenie AST a ALT CTC stupňa 1.

Nebol pozorovaný žiadny rozdiel v AE profile, keď sa porovnávali rôzne BIWA 4 dávky.

Časť B

Trombocytopénia a leukopénia boli závislé na dávke (tabuľky 6.2.2:3 a 6.2.2:4) a limitujúce dávku. Časový priebeh je poskytnutý v časti 6.4.2.1.

Alergická reakcia sa uvádzala u dvoch pacientov, u jedného s liekom súvisiaci Quinckerov opuch a vyrážky (30 mCi/m^2) a jeden pacient (60 mCi/m^2) mal alergickú reakciu po transfúzii trombocytového koncentrátu, ktorá nebola považovaná za súvisiacu s liekom. Jeden pacient (20 mCi/m^2) mal žihľavku, ktorá tiež nebola považovaná za súvisiacu s liekom, a jeden pacient (20 mCi/m^2) mal opuch tváre súvisiaci s liekom.

HAHAs sa detegovali u dvoch pacientov (pozri časť 12.4.3).

Prerušenie kvôli negatívnym účinkom nastalo u dvoch pacientov. Obaja zomreli.

Negatívne účinky vyžadovali iniciáciu súbežnej terapie u 17 pacientov. Títo pacienti sú krátko opísaní v časti 6.3.1.

6.3 Smrť, iné závažné negatívne účinky a iné významné negatívne účinky

Závažné negatívne účinky boli uvádzané u 12 pacientov. Z nich šesť pacientov zomrelo v priebehu testu alebo v priebehu sledovania. Všetci pacienti, ktorí zomreli, boli ošetrovaný v časti B testu. Žiadny z pacientov ošetrovaných v časti A nezomrel. Všetky fatálne prípady boli spôsobené progresiou ochorenia.

Dvaja pacienti v časti B prerušili test predčasne kvôli negatívnym účinkom (smrť pacienta 112, ako aj pacienta 105).

Negatívnymi účinkami vyžadujúcimi terapiu boli najčastejšie trombo-
cytopénia, leukopénia a horúčka.

Zahrnuté do textu

7.1 Demografické údaje

Detaily o demografických údajoch nie sú zahrnuté

7.2 Údaje o účinnosti a farmakodynamike

- | | |
|----------------|--|
| Tabuľka 7.2: 1 | Pomer príjmu nádorom ku príjmu kostnou dreňou - časť A testu |
| Tabuľka 7.2: 2 | Pomer príjmu nádorom ku príjmu kostnou dreňou (ITT podskupina) - A časť testu |
| Tabuľka 7.2: 3 | Pomer príjmu nádorom ku príjmu kostnou dreňou (PP podskupina) - A časť testu |
| Tabuľka 7.2: 4 | Veľkosť nádoru a % príjmu protilátky - časť A testu (na protokolovú populáciu) |
| Tabuľka 7.2: 5 | CD44v6 antigénová expresia v nádore a inom tkanive - časť A testu |
| Tabuľka 7.2: 6 | Rozpustný CD44v6 v sére. Priemerné hodnoty sú udávané v ng/ml. |

Tabuľka 7.2: 1

Pomer príjmu nádorom ku príjmu kostnou dreňou - časť A testu

Časť A ^{99m} Tc-BIWA 4				
	pacient č.	príjem nádorom (%ID/kg; vypočítaný)	príjem kostnou dreňou (%ID/kg; vypočítaný)	pomer nádor/kostná dreň (vypočítaný)
25 mg BIWA 4	1*	6,14	5,58	1,10
	2*	15,78	7,49	2,11
	3*	16,78	8,63	1,95
50 mg BIWA 4	4*	28,10	6,98	4,03
	8*	27,76	7,57	3,67
	10*	22,63	11,54	1,96
100 mg BIWA 4	6*	15,89	6,47	2,46
	7	16,99	7,70	2,21
	9	13,31	10,11	1,32

* = zahrnuté a protokolovú analýzu; %ID = % injektovanej dávky; výpočty sa uskutočňovali tak, že sa brali do úvahy vzorky s rôznymi hmotnosťami

Tabuľka 7.2: 2

Pomer príjmu nádorom ku príjmu kostnou dreňou (ITT podskupina) - časť A testu

	Časť A - ^{99m} Tc-BIWA 4 pomer nádor/kostná dreň (vypočítaný)
25 mg BIWA 4	1,72
50 mg BIWA 4	2,57
100 mg BIWA 4	1,99

udávané sú priemerné hodnoty; ITT = určený na ošetrovanie; výpočty sa uskutočňovali tak, že sa brali do úvahy vzorky s rôznymi hmotnosťami

Tabuľka 7.2: 3

Pomer príjmu nádorom ku príjmu kostnou dreňou (PP podskupina) - časť A testu

	Časť A - ^{99m} Tc-BIWA 4 pomer nádor/kostná dreň (vypočítaný)
25 mg BIWA 4	1,72
50 mg BIWA 4	3,22
100 mg BIWA 4	2,46

udávané sú priemerné hodnoty; PP = per protokol; výpočty sa uskutočňovali tak, že sa brali do úvahy vzorky s rôznymi hmotnosťami

Tabuľka 7.2: 4

Veľkosť nádoru a % príjmu protilátky - časť A testu (na protokolovú populáciu)

Časť A - ^{99m} Tc-BIWA 4			
	pacient č.	veľkosť nádoru [mm ²]	prijem nádorom (%ID/kg, vypočítaný)
25 mg BIWA 4	1	1350	6,14
	2	900	15,78
	3	225	16,78
50 mg BIWA 4	4	n.a.	28,10
	8	1504	27,76
	10	1400	22,63
100 mg BIWA 4	6	800	15,89

n.a. = neaplikovateľné; udáva sa len dĺžka alebo šírka, ale nie dĺžka a šírka; výpočty sa robili tak, že sa brali do úvahy rôzne hmotnosti vzoriek

Tabuľka 7.2: 5

CD44v6 antigénová expresia v nádore a inom tkanive – časť A testu

Časť A - ^{99m} Tc-BIWA 4				
	pacient č.	CD44v6 antigénová expresia v nádore	CD44v6 expresia v sliznici	CD44v6 expresia v lymf. uzlinových metastázach
25 mg BIWA 4	1*	n.a.	n.a.	n.a.
	2*	++/+++; >80 %	+++	++/+++; > 90%
	3*	+++; > 90 %	+++	+++; > 90 %
50 mg BIWA 4	4*	+++; > 90 %	+++	+++; > 90 %
	8*	n.a.	n.a.	n.a.
	10*	++; > 90%	+++	+++; > 90 %
100 mg BIWA 4	6*	+++; > 80 %	+++	n.a.
	7	+++; > 90 %	+++	n.a.
	9	+++; > 90 %	+++	n.a.

* = zahrnutý per protokolovú analýzu; n.a. = neaplikovateľné

Tabuľka 7.2: 6

	Časť A			Časť B				
	^{99m} Tc-BIWA 4			¹⁸⁶ Re-BIWA 4 [mCi/m ²]				
	25 mg BIWA4	50 mg BIWA 4	100 mg BIWA 4	20	30	40	50	60
n	3	4	3	2	4	3	6	5
pre-dávka	203	337	174	408	262	346	171	160
21 hodín	223	301	179	396	177	403	199	170
48 hodín	200	275	157	384	198	423	199	174
72 hodín	140	386	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
144 hodín	188	282	182	444	284	516	233	195
240/336 hodín	n.a.	n.a.	n.a.	445	337	n.a.	n.a.	n.a.
6 týždňov	23	310	210	289	220	487	226	162

n.a. = neaplikovateľné, údaje zahrňajú druhé dávkovanie

Výsledky týkajúce sa účinnosti

Časť A

Výsledky z časti A potvrdili, že dávka 50 mg BIWA 4 je optimálna dávka na liečenie založené na koncentráciách v krvi a úrovniach príjmu tkanivom. Distribúcia, hodnotená prostredníctvom rádioscintigrafie a biopsiových meraní, bola takmer vo všetkých prípadoch najvyššia v nádore v porovnaní s inými tkanivami. Príjem rádioaktivity nádorom sa zvyšoval s časom. CD44v6 expresia bola prítomná u viac ako 80 % buniek primárneho nádoru a u viac ako 90 % buniek lymfatických uzlinových metastáz a vo všetkých získaných vzorkách sliznice.

Žiadna korelácia nebola pozorovaná medzi veľkosťou nádoru a príjmom rádioaktivity v 50mg BIWA 4 dávkovej skupine. Množstvo rozpustného CD44v6 sa ukázalo byť konštantné pred a po podaní ^{99m}Tc -BIWA 4.

Namerané koncentrácie BIWA 4 boli proporcionálne k dávke v rozsahu 25 až 100 mg BIWA 4. Mierne množstvo dávky bolo vylučované obličkami. Percento injektovanej dávky (%ID) vylučované v moči bolo podobné vo všetkých dávkových skupinách.

Časť B

Z údajov z časti B vyplýva, že pacienti môžu mať klinický úžitok zo ^{186}Re -BIWA 4 terapie pri maximálnej tolerovanej dávke (MTD). Jeden z piatich pacientov ošetrovaných so 60 mCi/m^2 mal stabilné ochorenie. Traja zo šiestich pacientov mali stabilné ochorenie pri maximálnej tolerovanej dávke 50 mCi/m^2 . Čas do progresie bol v rozsahu 127 až 173 dní u tých pacientov, ktorí dostali druhú dávku 50 mCi/m^2 . Rádiomunoscintigrafia indikuje príjem rádioaktivity do nádorového tkaniva. Biologická distribúcia bola porovnateľná v iných tkanivách bez ohľadu na dávku. Dozimetrická analýza neodhalila neočakávane vysoko absorbované dávky v iných ako nádorových tkanivách s výnimkou semenníkov. Detegované množstvo rozpustného CD44v6 malo tendenciu sa zvyšovať u pacientov ošetrovaných so ^{186}Re -BIWA 4.

Plazmatické koncentrácie BIWA 4 vrcholili v 0,92 hodine a protilátka sa eliminovala s geometrickým priemerom polčasu rozpadu 94 hodín pre BIWA 4, čo

sa determinovalo prostredníctvom ELISA. $C_{\max}$ a AUC hodnoty (ELISA meranie) boli podobné ako hodnoty získané v časti A testu pre 50 mg BIWA 4 dávkovú skupinu.

Tolerovateľnosť jednej dávky BIWA 4 spojená s nízkou radiáciou dávky technécia-99 bola prijateľná. Dva z troch závažných negatívnych účinnkov boli spôsobené komplikáciami, ktoré boli výsledkom chirurgického zákroku.

Časť B

Maximálne tolerovaná dávka (MTD) bola 50 mCi/m^2 ^{186}Re -BIWA 4.

Dávku limitujúcimi negatívnymi účinkami boli na dávke závislé reverzibilné redukcie počtu trombocytov a leukocytov s následnou horúčkou u jednotlivých pacientov. Klinickými symptómami trombocytopenie boli mierne petechie.

Mukozitída bola pozorovaná u pacientov ošetrovaných s dávkami s vyššou radiáciou, ale nelimitovala dávku.

V priebehu testu neboli pozorované žiadne relevantné zmeny v hodnotách tyroidného stimulačného hormónu (TSH).

U dvanástich pacientov sa vyskytli závažné negatívne účinky. Z nich šesť pacientov zomrelo v priebehu časti B testu, najmä v dôsledku progresie základného ochorenia.

Alergické reakcie boli pozorované zriedka, s jedným závažným Quinkeovým opuchom súvisiacim s liekom. Žiadne alergické reakcie sa nevyskytli v priebehu alebo krátko po infúzii lieku.

U dvoch pacientov sa vyvinuli HAHA. Opakované dávkovanie neindukovalo vývoj HAHA.

Záver

Z výsledkov vyplýva príjem ^{186}Re -BIWA 4 do nádorového tkaniva a klinický úžitok u pacientov s pokročilým karcinómom skvamóznych buniek hlavy a krku. Bezpečnostný profil sa ukázal byť akceptovateľným. BIWA 4 vykazovala k dávke proporcionálne farmakokinetiky a nádorový príjem sa relevantne nemenil medzi dávkami 50 mg a 100 mg BIWA 4.

Príklad 4

Úvod. U pacientov s pokročilým štádiom karcinómu skvamózných buniek hlavy a krku (HNSCC) je zvýšené riziko vývoja lokoregionálnych rekurentných nádorov a/alebo vzdialených metastáz. Pre týchto pacientov je potrebný vývoj efektívnej adjuvantnej systémovej liečby. Vediac, že HNSCC, ako taká, je citlivá na žiarenie, mohlo by sa zacielenie rádionuklidov selektívne na HNSCC prostredníctvom monoklonálnych protilátok, ako formy rádioimunoterapie, podieľať na účinnejšej terapii.

Cieľ. Determinovať bezpečnosť, maximálnu tolerovanú dávku (MTD), imunogénnosť a účinnosť rádioimunoterapie s réniom ^{186}Re -značenou humanizovanou monoklonálnou protilátkou BIWA 4 u pacientov s HNSCC.

Pacienti a metódy. Fáza I dávkovej eskalačnej štúdie sa uskutočňovala na HNSCC pacientoch, pre ktorých neboli dostupné žiadne liečebné terapeutické možnosti. Celkovo sa 20 pacientom podávala ^{186}Re -značená BIWA 4 intravenózne v dávkach 20, 30, 40, 50 alebo 60 mCi/m². Traja pacienti dostali najmenej 3 mesiace po dávke 50 alebo 60 mCi/m², druhú dávku 50 mCi/m².

Výsledky. Všetky jednotkové, ako aj opakované podávania boli dobre tolerované a neboli pozorované žiadne známky akútnych negatívnych účinkov. Jedinými významnými prejavmi toxicity pri vyšších dávkach boli orálne mukozitídy a dávku limitujúca myelotoxicita pozostávajúca z trombopénie a leukocytopénie. MTD bola stanovená pri 5 mCi/m². U jedného paciera sa vyvinula humánna-anti-humánna reakcia po jedinom podaní. Stabilné ochorenie, trvajúce 4 až 19 týždňov, sa pozorovalo u 5 pacientov ošetrovaných s najvyššími dávkovými hladinami.

Záver. Rádioimunoterapia so ^{186}Re -značenou BIWA 4 u HNSCC pacientov sa zdá byť bezpečnou a je možné dosiahnuť tumoricídne dávky. Navyše, vďaka nízkemu podielu imunogénnosti sa zdajú byť možné opakované podania. Výsledky tejto fázy I štúdie stimulujú ďalší vývoj rádioimunoterapie s réniom- ^{186}Re -značenou humanizovanou monoklonálnou protilátkou BIWA 4 smerom k adjuvantnej terapii pacientov s rakovinou hlavy a krku.

Zoznam sekvencií

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Protilátky špecifické pre CD44v6

<130> 1-1212 PCT

<140> ešte nepriradené

<141> 2002-05-16

<150> EP 01112237.1

<151> 2001-05-18

<150> US 60/325147

<151> 2001-09-26

<160> 18

<170> Patentln Ver. 2.1

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400>1

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	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		
Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Ser	Ile
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	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	Gln	Gly	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
			100					105					110		
Ser	Ser														

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400>2

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Ile
          20           25           30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
          35           40           45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65           70           75           80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
          85           90           95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400>3

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Ile
          20           25           30
Tyr Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ile Leu Ile Tyr
          35           40           45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65           70           75           80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
          85           90           95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 4

<211> 342

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 4

gaagtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttagtgaagc	ctggagggtc	cctaagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cactttcagt	agctatgaca	tgtcttgggt	tcgccaggct	120
ccggggaagg	ggctggagtg	ggtctcaacc	attagtagtg	gtggtagtta	cacctactat	180
ctagacagta	taaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	atgccaagaa	ctccctgtac	240
ctgcaaatga	acagtctgag	ggctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	aagacagggg	300
ttggactact	ggggtcgagg	aaccttagtc	accgtctcct	ca		342

<210> 5

<211> 318

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 5

gaaattgttc	tcaccagtc	tccagcaacc	ctgtctctgt	ctccagggga	gagggccacc	60
ctgtcctgca	gtgccagctc	aagtataaat	tacatatact	ggtaccagca	gaagccagga	120
caggctccta	gactcttgat	ttatctcaca	tccaacctgg	cttctggagt	ccctgcgcgc	180
ttcagtggca	gtgggtcttg	aaccgacttc	actctcacia	tcagcagcct	ggagcctgaa	240
gattttgccg	tttattactg	cctgcagtgg	agtagtaacc	cgctcacatt	cggtggtggg	300
accaaggtgg	agattaaa					318

<210> 6

<211> 318

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 6

gaaattgttc	tcaccagtc	tccagcaacc	ctgtctctgt	ctccagggga	gagggccacc	60
ctgtcctgca	gtgccagctc	aagtataaat	tacatatact	ggtaccagca	gaagccagga	120
caggctccta	gactcttgat	ttatctcaca	tccaacctgg	cttctggagt	ccctgcgcgc	180
ttcagtggca	gtgggtcttg	aaccgacttc	actctcacia	tcagcagcct	ggagcctgaa	240
gattttgccg	tttattactg	cctgcagtgg	agtagtaacc	cgctcacatt	cggtggtggg	300
accaaggtgg	agattaaa					318

<210> 7

<211> 444

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 7

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	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		
Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Ser	Ile
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	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	Gln	Gly	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
			100					105					110		
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
		115					120					125			
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
	130					135					140				
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
145					150					155					160
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu
				165				170						175	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr
			180					185					190		
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val
		195					200					205			
Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
	210					215					220				
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
225					230					235					240
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
				245					250					255	
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
		260						265					270		
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
		275				280					285				
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
	290				295						300				
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
305					310					315					320
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
			325						330					335	
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr					

<210> 8

<211> 213

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 8

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Ile
          20           25           30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
          35           40           45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65           70           75           80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
          85           90           95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
          100          105          110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
          115          120          125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
          130          135          140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145          150          155          160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
          165          170          175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
          180          185          190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
          195          200          205
Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

<210> 9

<211> 213

<212> PRT

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 9

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Ile
          20           25           30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
          35           40           45

```

Leu	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
50						55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu
65				70						75					80
Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Cys	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	
			85					90					95		
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro
			100					105					110		
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr
		115					120					125			
Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
		130					135					140			
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu
145					150					155					160
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
				165				170					175		
Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala
			180					185					190		
Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe
		195					200						205		
Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
		210													

<210> 10

<211> 2135

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 10

aagcttttgac	agacgcacaa	ccctggactc	ccaagtcttt	ctcttcagtg	acaaacacag	60
acataggata	tcacatttgc	ttctgacaca	actgtgttca	ctagcagcct	caaacagaca	120
ccatgaactt	tgggctcagc	ttgattttcc	ttgtccta	tttaaaaggt	gtccagtgtg	180
aagtgcagct	ggtggagtct	gggggaggct	tagtgaagcc	tggaggggtcc	ctaagactct	240
cctgtgcagc	ctctggattc	actttcagta	gctatgacat	gtcttgggtt	cgccaggctc	300
cggggaaggg	gctggagtgg	gtctcaacca	ttagtagtgg	tggtagttag	acctactatc	360
tagacagtat	aaagggccga	ttcaccatct	ccagagacaa	tgccaagaac	tccctgtacc	420
tgcaaatgaa	cagtctgagg	gctgaggaca	cgcccggtga	ttactgtgca	agacaggggt	480
tggactactg	gggtcgagga	accttagtca	ccgtctcctc	agctagcacc	aagggcccat	540
cggctcttccc	cctggcaccc	tcctccaaga	gcacctctgg	gggcacagcg	gccttgggct	600
gcctggtcaa	ggactacttc	cccgaaccgg	tgacgggtgtc	gtggaactca	ggcgccctga	660
ccagcggcgt	gcacaccttc	ccggctgtcc	tacagtccctc	aggactctac	tccctcagca	720
gcgtggtgac	cgtgccttcc	agcagcttgg	gcacccagac	ctacatctgc	aacgtgaatc	780
acaagcccag	caacaccaag	gtggacaaga	aagttggtga	gaggccagca	cagggaggga	840
gggtgtctgc	tggaagcagg	ctcagcgctc	ctgcctggac	gcaccccggc	tatgcagccc	900
cagtccaggg	cagcaaggca	ggccccgtct	gcctcttcac	ccggagcctc	tgcccgcctc	960
actcatgctc	aggagagagg	tcttctggct	ttttcccagg	ctctgggcag	gcacaggcta	1020
ggtgccccta	acccaggccc	tgcacacaaa	ggggcagggtg	ctgggctcag	acctgccaa	1080
agccatatcc	gggaggaccc	tgcccctgac	ctaagccccc	cccaaaggcc	aaactctcca	1140
ctccctcagc	tcggacacct	tctctcctcc	cagattccag	taactcccaa	tcttctctct	1200
gcagagccca	aatcttgtga	caaaactcac	acatgcccac	cgtgcccagg	taagccagcc	1260
caggcctcgc	cctccagctc	aaggcgggac	aggtgccccta	gagtagcctg	catccaggga	1320
caggccccag	ccgggtgctg	acacgtccac	ctccatctct	tctcagcac	ctgaactcct	1380

```

gggggggaccg tcaagtettcc ttttccccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg 1440
gacccttgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt 1500
caactggtag gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca 1560
gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa 1620
tggcaaggag tacaagtgc aaggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac 1680
catctccaaa gccaaagggtg ggacccgtgg ggtgcgaggg ccacatggac agaggccggc 1740
tcggcccacc ctctgccctg agagtgaacc ctgtaccaac ctctgtccta cagggcagcc 1800
ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt 1860
cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag 1920
caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc 1980
cttcttcttc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt 2040
ctcatgctcc gtgatgcag aggtctctga caaccactac acgcagaaga gcctctccct 2100
gtctccgggt aaatgagtg gacggccgcg aattc 2135

```

<210> 11

<211> 785

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 11

```

aagcttgatc ttcaggatat cacatttgct tctgacacaa ctgtgttcac tagcaacctc 60
aaacagacac catggatttt caggtgcaga ttttcagctt cctgctaata agtgcctcag 120
tcataatgtc caggggagaa attgtttctc cccagtctcc agcaaccctg tctctgtctc 180
caggggagag ggccaccctg tcctgcagtg ccagctcaag tataaattac atatactggt 240
accagcagaa gccaggacag gctcctagac tcttgattta tctcacatcc aacctggctt 300
ctggagtccc tgcgcgcttc agtggcagtg ggtctggaac cgacttcaact ctcaaatca 360
gcagcctgga gcctgaagat tttgccgttt attactgcct gcagtggagt agtaaccgcg 420
tcacattcgg tgggtgggacc aaggtggaga ttaaaccggac tgtggctgca ccatctgtct 480
tcattctccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgctagcgtt gtgtgcctgc 540
tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat 600
cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca 660
gcagcaccct gacgtgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag 720
tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttagg 780
aattc 785

```

<210> 12

<211> 785

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 12

```

aagcttgatc ttcaggatat cacatttgct tctgacacaa ctgtgttcac tagcaacctc 60
aaacagacac catggatttt caggtgcaga ttttcagctt cctgctaata agtgcctcag 120
tcataatgtc caggggagaa attgtttctc cccagtctcc agcaaccctg tctctgtctc 180
caggggagag ggccaccctg tcctgcagtg ccagctcaag tataaattac atatactggt 240
accagcagaa gccaggacag gctcctagac tcttgattta tctcacatcc aacctggctt 300

```

ctggagtgccc	tgcgcgcttc	agtggcagtg	ggtctggaac	cgacttcact	ctcacaatca	360
gcagcctgga	gcctgaagat	tttgccgttt	attactgcct	gcagtggagt	agtaaccgcg	420
tcacattcgg	tgggtgggacc	aaggtggaga	ttaaaccggac	tgtggctgca	ccatctgtct	480
tcatcttccc	gccatctgat	gagcagttga	aatctggaac	tgctagcggt	gtgtgcctgc	540
tgaataactt	ctatcccaga	gaggccaaag	tacagtggaa	ggtggataac	gccctccaat	600
cgggtaactc	ccaggagagt	gtcacagagc	aggacagcaa	ggacagcacc	tacagcctca	660
gcagcaccct	gacgctgagc	aaagcagact	acgagaaaca	caaagtctac	gcctgcgaag	720
tcacccatca	gggcctgagc	tgcgccgtca	caaagagctt	caacagggga	gagtgttagg	780
aattc						785

<210> 13

<211> 1392

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 13

atggagtttg	ggctgagctg	gctttttctt	gtggctatatt	taaaagggtgt	ccagtgtgaa	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggctta	gtgaagcctg	gaggggtccct	aagactctcc	120
tgtgcagcct	ctggattcac	tttcagtagc	tatgacatgt	cttgggttcg	ccaggctccg	180
gggaaggggc	tggagtgggt	ctcaaccatt	agtagtggtg	gtagttacac	ctactatcta	240
gacagtataa	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatg	ccaagaactc	cctgtacctg	300
caaatgaaca	gtctgagggc	tgaggacacg	gccgtgtatt	actgtgcaag	acaggggttg	360
gactactggg	gtcgaggaac	cttagtcacc	gtctcctcag	ctagcaccaa	gggcccctcg	420
gtcttccccc	tggcaccctc	ctccaagagc	acctctgggg	gcacagcggc	cctgggctgc	480
ctgggtcaagg	actacttccc	cgaaccgggtg	acgggtgtcgt	ggaactcagg	cgccctgacc	540
agcggcgctg	acaccttccc	ggctgtccta	cagtcctcag	gactctactc	cctcagcagc	600
gtggtgaccg	tgccctccag	cagcttgggc	acctcagacct	acatctgcaa	cgtgaatcac	660
aagcccagca	acaccaagg	ggacaagaaa	gttgagccca	aatcttgtga	caaaactcac	720
acatgcccac	cgtgcccagc	acctgaactc	ctggggggac	cgtcagtcct	cctcttcccc	780
ccaaaaccca	aggacaccct	catgatctcc	cggacccttg	aggtcacatg	cgtgggtggg	840
gacgtgagcc	acgaagacct	tgagggtcaag	ttcaactggg	acgtggacgg	cgtggaggtg	900
cataatgcca	agacaaagcc	gcggggaggag	cagtacaaca	gcacgtaccg	ggtgggtcag	960
gtcctcaccg	tcttgcacca	ggactggctg	aatggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	1020
aacaaagccc	tcccagcccc	catcgagaaa	acctctcca	aagccaaagg	gcagccccga	1080
gaaccacagg	tgtacaccct	gcccccatcc	cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	1140
ctgacctgcc	tgggtcaaagg	cttctatccc	agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	1200
gggcagccgg	agaacaacta	caagaccacg	cctcccgtgc	tggactccga	cggctccttc	1260
ttcctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	agcaggtggc	agcaggggaa	cgtcttctca	1320
tgctccgtga	tgcattgaggc	tctgcacaac	cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	1380
ccgggtaaat	ga					1392

<210> 14

<211> 702

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 14

atggaagccc	cagctcagct	tctcttccctc	ctgctgctct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgttc	tcacccagtc	tccagcaacc	ctgtctctgt	ctccagggga	gagggccacc	120
ctgtcctgca	gtgccagctc	aagtataaat	tacatatact	ggtaccagca	gaagccagga	180
caggctccta	gactcttgat	ttatctcaca	tccaacctgg	cttctggagt	ccctgcgcgc	240
ttcagtggca	gtgggtctgg	aaccgacttc	actctcacia	tcagcagcct	ggagcctgaa	300
gattttgccc	tttattactg	cctgcagtgg	agtagtaacc	cgctcacatt	cgggtggtggg	360
accaaggtgg	agattaaacg	gactgtggct	gcaccatctg	tcttcatctt	cccgccatct	420
gatgagcagt	tgaaatctgg	aactgctagc	gttgtgtgcc	tgctgaataa	cttctatccc	480
agagaggcca	aagtacagtg	gaaggtggat	aacgccctcc	aatcgggtaa	ctcccaggag	540
agtgtcacag	agcaggacag	caaggacagc	acctacagcc	tcagcagcac	cctgacgctg	600
agcaaagcag	actacgagaa	acacaaagtc	tacgcctgcg	aagtcaccca	tcagggcctg	660
agctcgcccc	tcacaaagag	cttcaacagg	ggagagtgtt	ga		702

<210> 15

<211> 702

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 15

atggaagccc	cagctcagct	tctcttccctc	ctgctgctct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgttc	tcacccagtc	tccagcaacc	ctgtctctgt	ctccagggga	gagggccacc	120
ctgtcctgca	gtgccagctc	aagtataaat	tacatatact	ggtaccagca	gaagccagga	180
caggctccta	gactcttgat	ttatctcaca	tccaacctgg	cttctggagt	ccctgcgcgc	240
ttcagtggca	gtgggtctgg	aaccgacttc	actctcacia	tcagcagcct	ggagcctgaa	300
gattttgccc	tttattactg	cctgcagtgg	agtagtaacc	cgctcacatt	cgggtggtggg	360
accaaggtgg	agattaaacg	gactgtggct	gcaccatctg	tcttcatctt	cccgccatct	420
gatgagcagt	tgaaatctgg	aactgctagc	gttgtgtgcc	tgctgaataa	cttctatccc	480
agagaggcca	aagtacagtg	gaaggtggat	aacgccctcc	aatcgggtaa	ctcccaggag	540
agtgtcacag	agcaggacag	caaggacagc	acctacagcc	tcagcagcac	cctgacgctg	600
agcaaagcag	actacgagaa	acacaaagtc	tacgcctgcg	aagtcaccca	tcagggcctg	660
agctcgcccc	tcacaaagag	cttcaacagg	ggagagtgtt	ga		702

<210> 16

<211> 9568

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: humanizovaná protilátková sekvencia

<400> 16

ctgacgcgcc	ctgtagcggc	gcattaagcg	cggcggtgt	ggtggttacg	cgcagcgtga	60
ccgctacact	tgccagcgcc	ctagcgcccc	ctcctttcgc	tttcttccct	tcctttctcg	120
ccacgttcgc	cggctttccc	cgtcaagctc	taaatcgggg	gctcccttta	gggttccgat	180
ttagtgtttt	acggcacctc	gacccccaaa	aacttgatta	gggtgatggg	tcacgtaggg	240
tcgcgacgta	ccgggcccc	cctcgattaa	ttaatcgagc	tactagcttt	gcttctcaat	300
ttcttatttg	cataatgaga	aaaaaaggaa	aattaatttt	aacaccaatt	cagtagttga	360

ttgagcaaat	gcgttgccaa	aaaggatgct	ttagagacag	tgttctctgc	acagataagg	420
acaaacatta	ttcagagggg	gtacccagag	ctgagactcc	taagccagtg	agtggcacag	480
cattctaggg	agaaatatgc	ttgtcatcac	cgaagcctga	ttccgtagag	ccacacgttg	540
gtaagggcca	atctgctcac	acaggataga	gagggcagga	gccagggcag	agcatataag	600
gtgaggtagg	atcagttgct	cctcacattt	gcttctgaca	tagttgtgcc	agcatggagg	660
aatcgatcct	ccatgcttga	acaagatgga	ttgcacgcag	gttctccggc	cgcttgggtg	720
gagaggctat	tcggctatga	ctgggcacaa	cagacaatcg	gctgctctga	tgccgcogtg	780
ttccggctgt	cagcgcaggg	gcgcccgggt	ctttttgtca	agaccgacct	gtccggtgcc	840
ctgaatgaac	tgcaggtaa	tgcggccgct	ctaggcctcc	aaaaaagcct	cctcactact	900
tctggaatag	ctcagaggcc	gaggcgccct	cggcctctgc	ataaataaaa	aaaattagtc	960
agccatgcat	ggggcggaga	atgggcggaa	ctgggcggag	ttaggggcgg	gatgggcgga	1020
gttaggggag	ggactatggt	tgctgactaa	ttgagatgca	tgctttgcat	acttctgcct	1080
gctggggagc	ctggggactt	tcacacacct	gttgctgact	aattgagatg	catgctttgc	1140
atacttctgc	ctgctgggga	gcctggggac	tttccacacc	ctaactgaca	cacattccac	1200
agaattaatt	cccctagtta	ttaatagtaa	tcaattacgg	ggtcattagt	tcatagccca	1260
tatatggagt	tccgcgttac	ataaacttac	gtaaatggcc	cgcctggctg	accgcccac	1320
gacccccgcc	cattgacgtc	aataatgacg	tatgttccca	tagtaacgcc	aatagggact	1380
ttccattgac	gtcaatgggt	ggactattta	cggtaaactg	cccacttgcc	agtacatcaa	1440
gtgtatcata	tgccaagtac	gccccctatt	gacgtcaatg	acggtaaatg	gcccgcctgg	1500
cattatgccc	agtacatgac	cttatgggac	tttctactt	ggcagtacat	ctacgtatta	1560
gtcatcgcta	ttaccatggt	gatgcgggtt	tggcagtaca	tcaatgggag	tggtatggcg	1620
tttgactcac	ggggatttcc	aagtctccac	cccattgacg	tcaatgggag	tttgttttgg	1680
cacaaaaatc	aacgggactt	tccaaaatgt	cgtaacaact	ccgccccatt	gacgcaaatg	1740
ggcggtaggc	gtgtacgggtg	ggaggtctat	ataagcagag	ctgggtacgt	gaaccgtcag	1800
atcgcttga	gacgccatca	cagatctctc	accatggaag	ccccagctca	gcttctcttc	1860
ctcctgctgc	tctggctccc	agataccacc	ggagaaattg	ttctcaccca	gtctccagca	1920
accctgtctc	tgtctccagg	ggagagggcc	accctgtcct	gcagtgccag	ctcaagtata	1980
aattacatat	actggtacca	gcagaagcca	ggacaggctc	ctagactcct	gatttatctc	2040
acatccaacc	tggcttctgg	agtccctgcg	cgcttcagt	gcagtgggtc	tggaaaccgac	2100
ttcactctca	caatcagcag	cctggagcct	gaagattttg	ccgtttatta	ctgcctgcag	2160
tggagtagta	acccgctcac	attcgggtgg	gggaccaagg	tggagattaa	acgtacgggtg	2220
gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcga	tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	2280
tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	2340
gataacgccc	tccaatcggg	taactcccag	gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	2400
agcacctaca	gcctcagcag	cacctgagc	ctgagcaaa	cagactacga	gaaacacaaa	2460
gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	2520
aggggagagt	gttgaattca	gatccgttaa	cggttaccaa	ctacctagac	tggattcgtg	2580
acaacatgcg	gccgtgatat	ctacgtatga	tcagcctcga	ctgtgccttc	tagttgccag	2640
ccatctgttg	tttgeccctc	ccccgtgcct	tccttgaccc	tggaaagggtg	cactccact	2700
gtcctttcct	aataaaatga	ggaaattgca	tgcattgtc	tgagttaggtg	tcattctatt	2760
ctgggggggtg	gggtggggca	ggacagcaag	ggggaggatt	gggaagacaa	tagcaggcat	2820
gctgggggatg	cgggtgggctc	tatggaacca	gctgggacta	gtagctttgc	ttctcaattt	2880
cttattttgca	taatgagaaa	aaaaggaaaa	ttaatttta	caccaattca	gtagttgatt	2940
gagcaaatgc	gttgccaaaa	aggatgcttt	agagacagt	ttctctgcac	agataaggac	3000
aaacattatt	cagagggagt	acccagagct	gagactccta	agccagttag	tggcacagca	3060
ttctagggag	aaatatgctt	gtcatcaccg	aagcctgatt	ccgtagagcc	acaccttggt	3120
aagggccaat	ctgctcacac	aggatagaga	gggcaggagc	cagggcagag	catataaggt	3180
gaggtaggat	cagttgctcc	tcacatttgc	ttctgacata	gttggtgttg	gagcttggat	3240
agcttggaca	gctcagggct	gcgatttcgc	gccaaacttg	acggcaatcc	tagcgtgaag	3300
gctggtagga	ttttatcccc	gctgccatca	tggttcgacc	attgaactgc	atcgctgcgc	3360
tgtcccaaaa	tatggggatt	ggcaagaacg	gagacctacc	ctggcctccg	ctcaggaacg	3420
agttcaagta	cttccaaaga	atgaccacaa	cctcttcagt	ggaaggtaaa	cagaatctgg	3480
tgattatggg	taggaaaacc	tggttctcca	ttcctgagaa	gaatcgacct	ttaaaggaca	3540
gaattaatat	agttctcagt	agagaactca	aagaaccacc	acgaggagct	cattttcttg	3600
ccaaaagttt	ggatgatgcc	ttaagactta	ttgaacaacc	ggaattggca	agtaaagtag	3660
acatggtttg	gatagtcgga	ggcagttctg	tttaccagga	agccatgaat	caaccaggcc	3720
accttagact	ctttgtgaca	aggatcatgc	aggaatttga	aagtgcacacg	tttttcccag	3780
aaattgattt	ggggaaatat	aaacttctcc	cagaataccc	aggcgtcctc	tctgaggtcc	3840

aggaggaaaa	aggcatcaag	tataagtttg	aagtctacga	gaagaaagac	taacaggaag	3900
atgctttcaa	gttctctgct	cccctcctaa	agctatgcat	ttttataaga	ccatggggact	3960
tttgctggct	ttagatcagc	ctcgactgtg	ccttctagtt	gccagccatc	tggtgtttgc	4020
ccctcccccg	tgccttcctt	gaccttgga	ggtgccactc	ccactgtcct	ttcctaataa	4080
aatgaggaaa	ttgcatcgca	ttgtctgagt	aggtgtcatt	ctattctggg	gggtgggggtg	4140
gggcaggaca	gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca	ggcatgctgg	ggatgcgggtg	4200
ggctctatgg	aaccagctgg	ggctcgaagc	ggccgctccg	gatatgccaa	gtacgcccc	4260
tattgacgtc	aatgacggta	aatggccccg	ctggcattat	gcccagtaca	tgaccttatg	4320
ggactttcct	acttggcagt	acatctacgt	attagtcatc	gctattacca	tggtgatgcg	4380
gttttggcag	tacatcaatg	ggcgtggata	gcggtttgac	tcacggggat	ttccaagtct	4440
ccacccccatt	gacgtcaatg	ggagtttggt	ttggcaccaa	aatcaacggg	actttccaaa	4500
atgtcgtaac	aactccgccc	cattgacgca	aatgggcggt	aggcgtgtac	ggtgggaggt	4560
ctatataagc	agagctgggt	acgtcctcac	attcagtgat	cagcactgaa	cacagaccgc	4620
tcgacatgga	gtttgggctg	agctggcttt	ttcttgtggc	tattttaaaa	ggtgtccagt	4680
gtgaagtgca	gctggtggag	tctgggggag	gcttagtgaa	gcctggaggg	tccttaagac	4740
tctcctgtgc	agcctctgga	ttcactttca	gtagctatga	catgtcttgg	gttcgccagg	4800
ctccggggaa	ggggctggag	tgggtctcaa	ccattagtag	tggtggtagt	tacacctact	4860
atctagacag	tataaagggc	cgattcacca	tctccagaga	caatgccaa	aactccctgt	4920
acctgcaaat	gaacagtctg	agggctgagg	acacggccgt	gtattactgt	gcaagacagg	4980
ggttggaacta	ctggggctga	ggaaccttag	tcaccgtctc	ctcagctagc	accaagggcc	5040
catcggtcct	ccccctggca	ccctcctcca	agagcacctc	tgggggcaca	gcggccctgg	5100
gctgcctggt	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacggg	gtcgtggaac	tcaggcgccc	5160
tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttcccggtcg	tctacagctc	ctcaggactc	tactccctca	5220
gcagcgtggt	gaccgtgccc	tccagcagct	tgggcaccca	gacctacatc	tgcaacgtga	5280
atcacaaaggc	cagcaacacc	aagggtggaca	agaaagttga	gccccaaatct	tgtgacaaaa	5340
ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	gtcttcctct	5400
tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccggac	ccctgaggtc	acatgcgtgg	5460
tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	gacggcgtgg	5520
aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	taccgtgtgg	5580
tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaattg	caaggagtac	aagtgcgaag	5640
tctccaacaa	agccctccca	gcccccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	aaagggcagc	5700
cccaggaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	aagaaccagg	5760
tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	gagtgggaga	5820
gcaatgggca	gccgggagaa	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	tccgacggct	5880
ccttcttcct	ctacagcaag	ctcacctggg	acaagagcag	gtggcagcag	gggaacgtct	5940
tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	agcctctccc	6000
tgtctccggg	taaatgagga	tccgttaacg	gttaccaact	acctagactg	gattcgtgac	6060
aacatgcggc	cgtgatattct	acgtatgata	agcctcgact	gtgccttcta	gttgccagcc	6120
atctgttgtt	tgccctccc	ccgtgccttc	cttgaccctg	gaagggtgcca	ctcccactgt	6180
cctttcctaa	taaaatgagg	aaattgcata	gcattgtctg	agtaggtgtc	attctattct	6240
gggggggtggg	gtggggcagg	acagcaaggg	ggaggattgg	gaagacaata	gcaggcatgc	6300
tggggatgcg	gtgggctcta	tggaaaccagc	tggggctcga	cagcgtgctg	atcgccctcga	6360
ggcgcctact	aactctctcc	tccctccttt	ttcctgcagg	acgaggcagc	gcggctatcg	6420
tggctggcca	cgacgggctg	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	tgaagcggga	6480
agggactggc	tgctattggg	cgaagtgcog	gggcaggatc	tcctgtcatc	tcaccttgct	6540
cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	6600
gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcgaaa	catcgcatcg	agcgagcacg	tactcggtatg	6660
gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	6720
gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgcgcgat	ccgcagggcg	aggatctcgt	cgtgacctat	6780
ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatgggtg	gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	6840
tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	6900
gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	cgcttctctg	tgcttttacg	tatcgccgct	6960
cccgattcgc	agcgcatacg	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	agcgggactc	7020
tggggttcga	aatgaccgac	caagcgacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	7080
cgccgcctt	ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	ggctggatga	7140
tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcccc	ccccaaactg	tttattgcag	7200
cttataatgg	ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	gcattttttt	7260
cactgcattc	tagttgtggt	ttgtccaaac	tcataaatct	atcttatcat	gtctggatcg	7320

cggccggcgcg	caccgcgggtg	gagctttaat	taaggcgcgc	cagctccagc	ttttgttccc	7380
tttagtgagg	gttaatttcg	agcttggcgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	7440
attgttatcc	gctcacaatt	ccacacaaca	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	7500
gggggtgccta	atgagtgagc	taactcacat	taattgcgtt	gcgctcactg	cccgctttcc	7560
agtcgggaaa	cctgtcgtgc	cagctgcatt	aatgaatcgg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	7620
gtttgcgtat	tgggcgctct	tccgcttcct	cgctcactga	ctcgctgcgc	tcggtcgttc	7680
ggctgcggcg	agcgggtatca	gctcactcaa	aggcggtaat	acggttatcc	acagaatcag	7740
gggataacgc	aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	7800
aggccgcgtt	gctggcgttt	ttccataggc	tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	7860
gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaacccga	caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	7920
ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttaccgga	tacctgtccg	7980
cctttctccc	ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	8040
cgggtgtaggt	cgttcgctcc	aagctgggct	gtgtgcacga	accccccggt	cagcccgacc	8100
gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	ggtaagacac	gacttatcgc	8160
cactggcagc	agccactggt	aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	ggtgctacag	8220
agttcttgaa	gtgggtggct	aactacggct	acactagaag	gacagtattt	ggtatctgcg	8280
ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaaaaaa	8340
ccaccgctgg	tagcgggtgg	ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	8400
gatctcaaga	agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtgg	aacgaaaact	8460
cacgttaagg	gattttgggt	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	8520
attaaaaatg	aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaaacttg	tctgacagtt	8580
accaatgctt	aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	tctatttcgt	tcattccatag	8640
ttgcctgact	ccccgtcgtg	tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggcccca	8700
gtgctgcaat	gataccgcga	gacccacgct	caccggctcc	agattttatca	gcaataaacc	8760
agccagccgg	aaggggccgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	tccatccagt	8820
ctattaattg	ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagttcgcc	agttaatagt	ttgcgcaacg	8880
ttgttgccat	tgctacaggc	atcgtgggtg	cacgctcgtc	gtttgggtatg	gcttcattca	8940
gctccgggtt	ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	catggttggtg	aaaaaagcgg	9000
ttagctcctt	cggtcctccg	atcgttggtc	gaagtaagtt	ggccgcagtg	ttatcactca	9060
tggttatggc	agcactgcat	aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgtttttctg	9120
tgactgggtga	gtactcaacc	aagtcattct	gagaatagtg	tatgcggcga	ccgagttgct	9180
cctgcccggc	gtcaatacgg	gataataccg	cgccacatag	cagaacttta	aaagtgtctca	9240
tcattggaaa	acgttcttcg	gggcgaaaaa	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	9300
gttcgatgta	acccactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	atcttttact	ttcaccagcg	9360
tttctgggtg	agcaaaaaa	ggaaggcaaa	atgccgcaaa	aaagggaata	agggcgacac	9420
ggaaatgttg	aatactcata	ctcttccttt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcagggtt	9480
attgtctcat	gagcgggata	atatttgaat	gtatttagaa	aaataaacia	ataggggttc	9540
cgcgcacatt	tccccgaaaa	gtgccaca				9568

<210> 17

<211> 6414

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: plazmid

<400> 17

tcgacattga	ttattgacta	gttattaata	gtaatcaatt	acgggggtcat	tagttcatag	60
cccatatatg	gagttccgcg	ttacataact	tacggtaaat	ggccccgctg	gctgaccgcc	120
caacgacccc	cgcccatgga	cgtcaataat	gacgtatggt	cccatagtaa	cgccaatagg	180
gactttccat	tgacgtcaat	gggtggagta	tttacggtaa	actgcccact	tggcagtaca	240
tcaagtgtat	catatgccaa	gtacgcccc	tattgacgtc	aatgacggta	aatggccccg	300
ctggcattat	gccagtaga	tgaccttatg	ggactttcct	aottggcagt	acatctacgt	360
attagtcatc	gctattacca	tgggtgatgcg	gttttggcag	tacatcaatg	ggcgtggata	420

gcggtttgac	tcacggggat	ttccaagtct	ccaccccatt	gacgtcaatg	ggagtttgtt	480
ttggcaccaa	aatcaacggg	actttccaaa	atgtcgtaac	aactccgccc	cattgacgca	540
aatgggcggg	aggcgtgtac	ggtgggaggt	ctatataagc	agagctctct	ggctaactag	600
agaacccact	gcttaactgg	cttatcgaaa	ttaatacgac	tcactatagg	gagacccaag	660
cttctgcagg	tcgacatcga	tggatccggg	acctcgagcg	cgaattctct	agaggatctt	720
tgtgaaggaa	ccttactttc	gtggtgtgac	ataattggac	aaactaccta	cagagattta	780
aagctctaag	gtaaatataa	aatttttaag	tgtataatgt	gttaaaactac	tgattctaat	840
tgtttgtgta	tttttagattc	caacctatgg	aactgatgaa	tgggagcagt	ggtggaatgc	900
ctttaatgag	gaaaacctgt	tttgctcaga	agaaatgcca	tctagtgatg	atgaggctac	960
tgctgactct	caacattcta	ctcctccaaa	aaagaagaga	aaggtagaag	accccaagga	1020
ctttccttca	gaattgctaa	gttttttgag	tcattgctgtg	tttagtaata	gaactcttgc	1080
ttgctttgct	atttacacca	caaaggaaaa	agctgcactg	ctatacaaga	aaattatgga	1140
aaaatatattg	atgtatagtg	ccttgactag	agatcataat	cagccatacc	acattttgtag	1200
aggttttact	tgcttttaaaa	aacctcccac	acctccccct	gaacctgaaa	cataaaatga	1260
atgcaattgt	tggtgttaac	ttgtttattg	cagcttataa	tggttacaaa	taaagcaata	1320
gcatcacaaa	tttcacaaat	aaagcatttt	tttcaactgca	ttctagtgtg	ggtttgtcca	1380
aactcatcaa	tgtactttat	catgtctgga	tcaattctga	gaaactagcc	ttaaagacag	1440
acagctttgt	tctagtcagc	caggcaagca	tatgtaaata	aagttcctca	gggaactgag	1500
gttaaaagat	gtatcctgga	cctgccagac	ctggccattc	acgtaaacag	aagattccgc	1560
ctcaagttcc	ggttaacaac	aggaggcaac	gagatctcaa	atctattact	tctaactcggg	1620
taattaaaac	ctttcaacta	aaacacggac	ccacggatgt	cacctacttt	tccttccccg	1680
gctccgccct	tctcagtact	ccccaccatt	aggctcgcta	ctccacctcc	acttccgggc	1740
gcgacacca	cgtgccctct	cccacccgac	gctaaccgcc	cccctgcccg	tctgaccccg	1800
cccaccacct	ggccccgccc	cgttgaggac	agaagaaacc	ccgggcagcc	gcagccaagg	1860
cggacgggta	gacgctgggg	gcgctgagga	gtcgctctct	accttctctg	ctggctcggt	1920
gggggacgcg	gtggatctca	ggcttccgga	agactggaag	aaccggctca	gaaccgcttg	1980
tctccgcggg	gcttgggcgg	cggagaagaatg	gccgctagac	gcggaacttg	tgcgaggcat	2040
cgcaggatgc	agaagagcaa	gcccgcgggg	agcgcgcggc	tgtactacct	cgcgcctgga	2100
gcggccacgc	cggactgggc	ggggccgggc	tggtggaggc	ggagtctgac	ctcgtggagg	2160
cggggcctct	gatgttcaaa	taggatgcta	ggcttgttga	ggcgtggcct	ccgattcaca	2220
agtgggaagc	agcgcggggc	gactgcaatt	tcgcgccaaa	cttgggggaa	gcacagcgta	2280
caggctgcct	aggtgatcgc	tgctgctgtc	atggttcgac	cgtggaactg	catcgtcgcc	2340
gtgtcccaga	atatgggcac	cggcaagaac	ggagaccttc	cctggccaat	gctcaggtac	2400
tggctggatt	gggttaggga	aaccgaggcg	gttcgctgaa	tcgggtcgag	cacttggcgg	2460
agacgcgcgg	gccaactact	tagggacagt	catgaggggt	aggcccgcgg	gctgctgccc	2520
ttgcccatgc	ccgcgggtgat	ccccatgctg	tgccagcctt	tgcccagagg	cgtctagct	2580
gggagcaaa	tcgggtcact	gggcagcacc	accccccgga	cttgcattgg	tagccgctga	2640
gatggagcct	gagcacacgt	gacaggggtc	ctgttaacgc	agtgtttctc	taactttcag	2700
gaacgagttc	aagtacttcc	aaagaatgac	caccacctcc	tcagtggaag	gtaaacagaa	2760
cctggtgatt	atgggcccga	aaacctgggt	ctccattcct	gagaagaatc	gacctttaaa	2820
ggacagaatt	aatatagttc	tcagtagaga	gctcaaggaa	ccaccacaag	gagctcattt	2880
tcttgccaaa	agtctggacc	atgccttaaa	acttattgaa	caaccagagt	tagcagataa	2940
agtggacatg	gtttggatag	ttggaggcag	ttccgtttac	aaggaagcca	tgaatcagcc	3000
aggccatctc	agactctttg	tgacaaggat	catgcaggaa	tttgaaaagt	acacgttctt	3060
cccagaaatt	gatttgagga	aatataaact	tctcccagag	taccagggg	tcctttctga	3120
agtccaggag	gaaaaaggca	tcaagtataa	atltgaagtc	tatgagaaga	aaggctaaca	3180
gaaagatact	tgctgattga	cttcaagttc	tactgctttc	ctcctaaaat	tatgcatttt	3240
tacaagaoca	tgggacttgt	gttggcttta	gacccgtgtg	atcctgggca	actgttgtac	3300
tctaagccac	ttcccaaagt	catgccccag	cccctgtata	attctaaaca	attagaatta	3360
ttttcatttt	cattagtcta	accaggttat	attaaatata	ctttaagaaa	caccatttgc	3420
cataaagttc	tcaatgcccc	tcccattgcag	cctcaagtgg	ctccccagca	gatgcattag	3480
gtagtgtgtg	tacaagagac	cccaaagaca	tagagccctt	gagagcatga	gctgatattg	3540
gggctcatag	agataggaag	ctagatgaat	aagtacaaag	ggcagaaatg	ggttttaacc	3600
agcagagcta	gaactcagac	tttaaagaaa	attagatcaa	agtagagact	gaattattct	3660
gcacatcaga	ctctgagcag	agttctgttc	actcagacag	aaaatgggta	aattgagagc	3720
tggtccatt	gtgctcctta	gagatgggag	cagggtggag	attatataag	gtctggaaca	3780
tttaacttct	ccgtttctca	tcttcagtga	gttccaagg	atactacaat	tctgtggaat	3840
gtgtgtcagt	tagggtgtgg	aaagtcccca	ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	3900

atgcatctca	attagtcagc	aaccaggtgt	ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	3960
agtatgcaaa	gcatgcatct	caatttagtca	gcaaccatag	tcccgcacct	aactccgccc	4020
atcccgcgcc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	actaattttt	4080
tttatattatg	cagaggccga	ggcgccctctg	agctattcca	gaagtagtga	ggaggctttt	4140
ttggaggcct	aggcttttgc	aaaaaagcta	attcagccctg	aatggcgaat	gggacgcgcc	4200
ctgtagcggc	gcattaagcg	cggcgggtgt	ggtggttacg	cgcagcgtga	ccgctacact	4260
tgccagcgcc	ctagcgcccg	ctcctttcgc	ttcttccct	tcctttctcg	ccacgttcgc	4320
cggctttccc	cgtcaagctc	taaatcgggg	gctcccttta	gggttccgat	ttagtgtttt	4380
acggcacctc	gacccccaaa	acttgattag	ggtgatgggt	cacgtagtgg	gccatcgccc	4440
tgatagacgg	tttttcgccc	tttgacgttg	gagtcacagt	tctttaatag	tggaactctg	4500
ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	tcggtctatt	cttttgattt	ataagggatt	4560
ttgccgattt	cggcctattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	taacgcgaat	4620
tttaacaaaa	tattaacgtt	tacaatttca	ggtggcactt	ttcggggaaa	tgtgcgcgga	4680
acccctattt	gtttattttt	tctaaatact	tcaaatatgt	atccgctcat	gagacaataa	4740
ccctgataaa	tgcttcaata	atattgaaaa	aggaagagta	tgagtattca	acatttccgt	4800
gtcgccctta	ttcccttttt	tgcggcattt	tgcccttcctg	tttttgetca	cccagaaacg	4860
ctggtgaaag	taaaagatgc	tgaagatcag	ttgggtgcac	gagtggttta	catcgaactg	4920
gatctcaaca	gcggttaagat	ccttgagagt	tttcgccccg	aagaacgttt	tccaatgatg	4980
agcactttta	aagttctgct	atgtggcgcg	gtattatccc	gtattgacgc	cgggcaagag	5040
caactcggtc	gcgcataca	ctattctcag	aatgacttgg	ttgagtactc	accagtcaca	5100
gaaaagcatc	ttacggatgg	catgacagta	agagaattat	gcagtgtgc	cataaccatg	5160
agtgaataca	ctgcggccaa	cttacttctg	acaacgatcg	gaggaccgaa	ggagctaacc	5220
gcttttttgc	acaacatggg	ggatcatgta	actcgccttg	atcgttggga	accggagctg	5280
aatgaagcca	taccaaaccg	cgagcgtgac	accacgatgc	ctgtagcaat	ggcaacaacg	5340
ttgcgcaaac	tattaactgg	cgaactactt	actctagctt	cccggcaaca	attaatagac	5400
tggatggagg	cggataaagt	tgcaggacca	cttctgcgct	cggcccttcc	ggctggctgg	5460
tttattgctg	ataaatctgg	agccggtgag	cgtgggtctc	gcggtatcat	tgcagcactg	5520
gggcccagatg	gtaagccctc	ccgtatcgta	gttatctaca	cgacggggag	tcaggcaact	5580
atggatgaac	gaaatagaca	gatcgctgag	ataggtgcct	cactgattaa	gcattggtaa	5640
ctgtcagacc	aagtttactc	atatatactt	tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	5700
aaaaggatct	aggatgaagat	cctttttgat	aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	5760
ttttcgttcc	actgagcgct	agaccccgta	gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	5820
ttttttctgc	gcgtaatctg	ctgcttgcaa	acaaaaaaac	caccgctacc	agcgggtggt	5880
tgtttgcggg	atcaagagct	accaactctt	tttccgaagg	taactggctt	cagcagagcg	5940
cagataccaa	atactgtcct	tctagtgtag	ccgtagttag	gccaccactt	caagaactct	6000
gtagcaccgc	ctacatacct	cgtctgcta	atcctgttac	cagtggctgc	tgccagtggc	6060
gataagtcgt	gtcttacccg	gttggaactca	agacgatagt	taccggataa	ggcgcagcgg	6120
tcgggctgaa	cgggggggttc	gtgcacacag	cccagcttgg	agcgaacgac	ctacaccgaa	6180
ctgagatacc	tacagcgtga	gcattgagaa	agcgccacgc	ttcccgaagg	gagaaaggcg	6240
gacaggatct	cggtaagcgg	cagggctcga	acaggagagc	gcacgaggga	gcttccaggg	6300
ggaaacgcct	ggtatcttta	tagtcctgtc	gggtttcggc	acctctgact	tgagcgtcga	6360
tttttgtgat	gctcgtcagg	ggggcgagac	ctatggaaaa	acgccagcaa	cgcc	6414

<210> 18

<211> 6062

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: plazmid

<400> 18

togacattga	ttattgacta	gttattaata	gtaatcaatt	acgggggtcat	tagttcatag	60
cccatatatg	gagttccgcg	ttacataact	tacggtaaatt	ggcccgccctg	gctgaccgcc	120
caacgacccc	cgcccattga	cgtcaataat	gacgtatggt	cccatagtaa	cgccaatagg	180
gactttccat	tgacgtcaat	gggtggagta	tttacggtaa	actgcccact	tggcagtaca	240
tcaagtgtat	catatgccaa	gtacgcccc	tattgacgtc	aatgacggta	aatggcccg	300
ctggcattat	gcccagtaca	tgaccttatg	ggactttcct	acttggcagt	acatctacgt	360
attagtcato	gctattacca	tggatgatgcg	gttttggcag	tacatcaatg	ggcgtggata	420
gcgggtttgac	tcacggggat	ttccaagtct	ccaccccatt	gacgtcaatg	ggagtttgtt	480
ttggcaccaa	aatcaacggg	actttccaaa	atgtcgtaac	aactccgccc	cattgacgca	540
aatggggcgg	aggcgtgtac	ggtggggaggt	ctatataagc	agagctcgtt	tagtgaaccg	600
tcagatcgcc	tggagacgcc	atccacgctg	ttttgacctc	catagaagac	accgggaccg	660
atccagccctc	cgcgcccg	aacggtgcat	tggaaacggg	attccccctg	ccaagagtca	720
ggtaagtacc	gcctatagag	aagactcttg	ggtttctgat	aggcactgac	tctctctgcc	780
tattgggtcta	ttttccacc	cttaggtctg	tgggtgctta	ctggcttatc	gaaattaata	840
cgactcacta	tagggagacc	caagcttctg	caggtcgaca	tcgatggatc	cggtagctcg	900
agcgcgcaatt	ctctagagat	atcttgttta	ttgcagctta	taatggttac	aaataaagca	960
atagcatcac	aaatttcaca	aataaagcat	ttttttcact	gcattctagt	tgtggtttgt	1020
ccaaactcat	caatgtatct	tatcatgtct	ggatcaattc	tgaaaaacta	gccttaaaga	1080
cagacagctt	tgttctagtc	agccaggcaa	gcatatgtaa	ataaagttcc	tcagggaact	1140
gaggttaaaa	gatgtatcct	ggacctgcca	gacctggcca	ttcacgtaaa	cagaagattc	1200
cgccctcaagt	tcgggttaac	aacaggaggc	aacgagatct	caaactctatt	acttctaata	1260
gggtaattaa	aacctttcaa	ctaaaaacacg	gacccacgga	tgtcaccac	ttttccttcc	1320
ccggctccgc	ccttctcagt	actcccacc	attaggctcg	ctactccacc	tccacttccg	1380
ggcgcgacac	ccacgtgccc	tctcccaccg	gacgctaacc	ccgcccctgc	ccgtctgacc	1440
ccgcccacca	cctggccccg	ccccgttgag	gacagaagaa	accccgggca	gcccgcagca	1500
aggcgagcgg	gtagacgctg	ggggcgctga	ggagtcgtcc	tctaccttct	ctgctggctc	1560
ggtgggggac	gcggtggatc	tcaggcttcc	ggaagactgg	aagaaccggc	tcagaaccgc	1620
ttgtctccgc	ggggcttggg	cggcggaaga	atggccgcta	gacgcggact	tgggtgcgag	1680
catcgagga	tgcagaagag	caagcccgc	gggagcgcg	ggctgtaacta	ccccgcgcct	1740
ggagcgggcca	cgccggactg	ggcgggggccg	gcctggtgga	ggcgaggtct	gacctcgtgg	1800
aggcggggccc	tctgatgttc	aaataggatg	ctaggcttgt	tgaggcggtg	cctccgattc	1860
acaagtggga	agcagcgccg	ggcgactgca	atttcgcgcc	aaacttgggg	gaagcacagc	1920
gtacaggctg	cctagggtgat	cgctgctgct	gtcatgggtc	gaccgctgaa	ctgcactcgtc	1980
gccgtgtccc	agaatatggg	catcggaag	aacggagacc	ttccctggcc	aatgctcagg	2040
tactggctgg	attgggttag	ggaaaccgag	gcggttcgct	gaatcggttc	gagcacttgg	2100
cggagacgcy	cgggccaact	acttagggac	agtcatgagg	ggtaggccc	ccggctgctg	2160
cccttgccca	tgcgcgcggt	gatccccatg	ctgtgcccag	ctttgcccag	aggcgctcta	2220
gctgggagca	aagtccggtc	actgggcagc	accaccccc	ggacttgcac	gggtagccgc	2280
tgagatggag	cctgagcaca	cgtgacaggg	tccctgttaa	cgcaagtgtt	ctctaaacttt	2340
caggaaacgag	ttcaagtact	tccaaagaat	gaccaccacc	tccctcagtgg	aaggtaaaca	2400
gaacctgggtg	attatgggccc	ggaaaaacctg	gttctccatt	cctgagaaga	atcgaccttt	2460
aaaggacaga	attaatatag	ttctcagtag	agagctcaag	gaaccaccac	aaggagctca	2520
ttttcttgcc	aaaagtctgg	accatgcctt	aaaacttatt	gaacaaccag	agttagcaga	2580
taaagtggac	atggttttga	tagttggagg	cagttccgtt	tacaagggaag	ccatgaatca	2640
gccaggccat	ctcagactct	ttgtgacaag	gatcatgcag	gaatttgaaa	gtgacacgtt	2700
cttcccagaa	attgatttgg	agaaatataa	acttctccca	gagtaccac	gggtcctttc	2760
tgaagtccag	gaggaaaaag	gcatcaagta	taaatttgaa	gtctatgaga	agaaaaggcta	2820
acagaaagat	acttgctgat	tgacttcaag	ttctactgct	ttcctcctaa	aattatgcat	2880
ttttacaaga	ccatgggact	tgtgttggct	ttagatcctg	tgcatcctgg	gcaactgttg	2940
tactctaagc	cactccccaa	agtcacgccc	cagcccctgt	ataattctaa	acaattagaa	3000
ttattttcat	tttcatttag	ctaaccaggt	tatcttaaat	atactttaag	aaacaccatt	3060
tgcataaag	ttctcaatgc	ccctcccattg	cagcctcaag	tggctcccca	gcagatgcat	3120
agggtagtgt	gtgtacaaga	gaccccaag	acatagagcc	cctgagagca	tgagctgata	3180
tgggggctca	tagagatagg	agctagatga	ataagtacaa	agggcagaaa	tgggttttaa	3240
ccagcagagc	tagaactcag	actttaaaga	aaattagatc	aaagttagaga	ctgaattatt	3300
ctgcacatca	gactctgagc	agagttctgt	tactcagac	agaaaatggg	taaattgaga	3360
gctggctcca	ttgtgctcct	tagagatggg	agcaggtgga	ggattatata	aggtctggaa	3420
catttaactt	ctccgtttct	catcttcagt	gagattccaa	gggatactac	aattctgtgg	3480
aatgtgtgtc	agttagggtg	tggaaagtcc	ccaggctccc	cagcaggcag	aagtatgcaa	3540
agcatgcac	tcaattagtc	agcaaccagg	tgtggaaagt	ccccaggctc	cccagcaggc	3600
agaagtatgc	aaagcatgca	tctcaattag	tcagcaacca	tagtcccgc	cctaactccg	3660
cccatccgc	ccctaactcc	gcccagttcc	gcccattctc	cgcccatgg	ctgactaatt	3720

tttttttattt	atgcagagggc	cgaggcgccct	ctgagctattt	ccagaagtag	tgaggagggt	3780
tttttgagg	cctaggctttt	tgcaaaaaag	ctaattcagc	ctgaatggcg	aatgggaaat	3840
tgtaaacgtt	aatatttttgt	taaaaattcgc	gttaaaatttt	tgttaaatca	gctcattttt	3900
taaccaatag	gccgaaatcg	gcaaaatccc	ttataaatca	aaagaataga	ccgagatagg	3960
gttgagtgtt	gttccagttt	ggaacaagag	tccactatta	aagaacgtgg	actccaacgt	4020
caaaggggcg	aaaaccgtct	atcagggcgga	tggccacta	cgtgaaccat	caccctaata	4080
aagttttttg	ggtcagagtg	ccgtaaagca	ctaaatcgga	accctaagg	gagccccga	4140
tttagagctt	gacgggggaa	gccggcggaac	gtggcgagaa	aggaaggga	gaaagcgaaa	4200
ggagcggg	ctagggcgct	ggcaagtgt	gcggtcacgc	tgcggtaac	caccacaccc	4260
gccgcgctta	atgcgcgct	acagggcgcg	tcaggtggca	cttttcgggg	aaatgtgogc	4320
ggaaccccta	tttgtttatt	tttctaaata	cattcaaata	tgtatccgct	catgagacaa	4380
taaccctgat	aaatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	gtatgagtat	tcaacatttc	4440
cgtgtcgccc	ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	ctgtttttgc	tcacccagaa	4500
acgctgggtga	aagtataaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	cacgagtggg	ttacatcgaa	4560
ctggatctca	acagcggtaa	gatccttgag	agttttcgcc	ccgaagaacg	ttttccaatg	4620
atgagcactt	ttaaagttct	gctatgtggc	gcggtattat	cccgtattga	cgccgggcaa	4680
gagcaactcg	gtcgccgcat	acactattct	cagaatgact	tggttgagta	ctcaccagtc	4740
acagaaaagc	atcttacgga	tggcatgaca	gtaagagaat	tatgcagtgc	tgccataacc	4800
atgagtgata	acactgcggc	caacttactt	ctgacaacga	tcggaggacc	gaaggagcta	4860
accgcttttt	tgcaaacat	gggggatcat	gtaactcgcc	ttgatcgttg	ggaaccggag	4920
ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	tgctgtagc	aatggcaaca	4980
acgttgcgca	aactattaac	tggcgaaact	cttactctag	cttcccggca	acaattata	5040
gactggatgg	aggcggataa	agttgcagga	ccacttctgc	gctcggccct	tcgggctggc	5100
tggttttattg	ctgataaatc	tggagccggg	gagcgtgggt	ctcgcggtat	cattgcagca	5160
ctggggccag	atggtaaagg	ctcccgtatc	gtagttatct	acacgacggg	gagtcaggca	5220
actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagatagggtg	cctcactgat	taagcatttg	5280
taactgtcag	accaagttta	ctcatatata	cttttagattg	atttaaaaact	tcattttttaa	5340
tttaaaagga	tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	tgacaaaaat	cccttaacgt	5400
gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	ttcttgagat	5460
ccttttttttc	tgcgcgtaat	ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	accagcgggtg	5520
gtttgtttgc	cggatcaaga	gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	cttcagcaga	5580
gcgcagatac	caaatactgt	ccttctagtg	tagccgtagt	taggccacca	cttcaagaac	5640
tctgtagcac	cgctacata	cctcgctctg	ctaactctgt	taccagtggc	tgctgccagt	5700
ggcgataagt	cgtgtcttac	cggttggtgac	tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgag	5760
cggtcgggct	gaacgggggg	ttcgtgcaca	cagcccagct	tgagcggaac	gacctacacc	5820
gaactgagat	acctacagcg	tgagcattga	gaaagcgcca	cgcttccoga	agggagaaaag	5880
gcggacaggt	atccggtaag	cggcaggggtc	ggaacaggag	agcgacagag	ggagcttcca	5940
gggggaaacg	cctggtatct	ttatagtcct	gtcgggtttc	gccacctctg	acttgagcgt	6000
cgatttttgt	gatgctcgtc	agggggggcgg	agcctatgga	aaaacgccag	caacgcagct	6060
gc						6062

Zoznam literatúry

Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Haubmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H. a Herrlich, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65 : 13-24 (1991).

Haisma, H. J., Hilgers, J. a Zurawski, V. R. ml. Iodination of monoclonal antibodies for diagnosis and therapy using a convenient one vial method. *J. Nucl. Med.*, 27: 1890-1895, 1986.

Heider, K.-H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P. a Pals, S. T. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.* 120: 227-233 (1993a).

Heider, K.-H., Dämmrich, J., Skroch-Angel, P., Muller-Hermelink, H.-K., Vollmers, H.-P., Herrlich, P. a Ponta, H. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal-and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res.* 53 : 4197-4203 (1993b).

Heider KH, Mulder JWR, Ostermann E, Susani S, Patzelt E, Pals ST, Adolf GRA. Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumor cells are expressed in normal tissues of humans and cynomolgus monkeys. *Eur. J. Cancer* 31A : 2385-2391, 1995.

Heider KH, Sproll M, Susani S, Patzelt E, Beaumier P, Ostermann O, Ahorn H, Adolf GRA. Characterization of a high affinity monoclonal antibody specific for CD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas. *Cancer Immunology Immunotherapy* 43: 245-253, 1996.

Himmeler, A., Maurer-Fogy, I., Kronke, M., Scheurich, P., Pfizenmaier, K., Lantz, M., Olsson, I., Hauptmann, R., Stratowa, C. a Adolf, G. R. Molecular cloning and expression of human and rat tumor necrosis factor receptor chain (p60) and its soluble derivative, tumor necrosis binding protein. *DNA & Cell Biol.*, 9 : 705-715, 1990.

Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich P. a Gunthert, U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51 : 5292-5297 (1991).

Kugelman, L. C., Gangluly, S., Haggerty, J. G., Weissman, S. M. a Milstone, L. M. The core protein of epican, a heparan sulfate proteoglycan on keratinocytes, is an alternative form of CD44. *J. Invest. Dermatol.*, 99 : 886-891, 1992.

Koopman, G., Heider, K.-H., Horts, E., Adolf, G. R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S. T. Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* 177 : 897904 (1993).

Rudy, W., Hofmann, M., Schwartz-Albiez, R., Zoller, M., Heider, K.-H., Ponta, H., Herrlich, P. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: Each one individually suffices to confer metastatic behaviour. *Cancer Res.* 53 : 1262-1268 (1993).

Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U. a Bell, J. I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 : 12160-12164 (1992).

Sharkey, R. M., Natale, A., Goldenberg, D. M. a Mattes, M. J. Rapid blood clearance of immunoglobulin G2a and immunoglobulin G2b in nude mice. *Cancer Res.*, 51 : 3102-3 107, 1991.

Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P. a Ponta, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids. Res.* 21 : 1225-1229 (1993).

Van Gog, F. B., Visser, G. W. M., Stroome, J. W. G., Roos, J. C., Snow, G. B. a Van Dongen, G. A. M. S. High dose ¹⁸⁶Re-labeling of monoclonal antibodies for clinical application: pitfalls and solutions. *Cancer*, 80 : 2360-2370, 1997a.

Van Gog, F. B., BrakenhoS, R. H., Snow, G. B. a Van Dongen, G. A. M. S. Rapid elimination of mouse/human chimeric monoclonal antibodies in nude mice. *Cancer Immunol. Immunother.*, 44 : 103-111, 1997b.

Wielenga, V. J. M., Heider, K.-H., Offerhaus, G. J. A., Adolf, G. R., van den Berg, F. M., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S. T. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. Cancer Res. 53: 4754-4756 (1993).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Protilátková molekula obsahujúca variabilnú oblasť ťažkého reťazca, ktorá má aminokyselinovú sekvenciu definovanú v sekv. č. 1, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

2. Protilátková molekula, v ktorej variabilná oblasť ťažkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 1.

3. Protilátková molekula obsahujúca variabilnú oblasť ľahkého reťazca, ktorá má aminokyselinovú sekvenciu definovanú v sekv. č. 2, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

4. Protilátková molekula, v ktorej variabilná oblasť ľahkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 2.

5. Protilátková molekula obsahujúca variabilnú oblasť ľahkého reťazca ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 3, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

6. Protilátková molekula, v ktorej variabilná oblasť ľahkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 3.

7. Protilátková molekula podľa nároku 1 a 3 obsahujúca variabilnú oblasť ťažkého reťazca, ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 1, a obsahujúca variabilnú oblasť ľahkého reťazca, ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 2, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

8. Protilátková molekula podľa nároku 2 a 4, ktorej variabilná oblasť ťažkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 1, a ktorej variabilná oblasť ľahkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 2.

9. Protilátková molekula podľa nároku 1 a 5 obsahujúca variabilnú oblasť ťažkého reťazca, ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 1, a obsahujúca variabilnú oblasť ľahkého reťazca, ako je charakterizovaná aminokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 3, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

10. Protilátková molekula podľa nároku 2 a 6, ktorej variabilná oblasť ťažkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 1, a ktorej variabilná oblasť ľahkého reťazca pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 3.

11. Protilátková molekula obsahujúca variabilnú oblasť ťažkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

12. Protilátková molekula, ktorej variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4.

13. Protilátková molekula obsahujúca variabilnú oblasť ľahkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 5, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

14. Protilátková molekula, ktorej variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 5.

15. Protilátková molekula obsahujúca variabilnú oblasť ľahkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 6, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

16. Protilátková molekula, ktorej variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 6.

17. Protilátková molekula podľa nároku 11 a 13 obsahujúca variabilnú oblasť ťažkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4, a obsahujúca variabilnú oblasť ľahkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 5, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

18. Protilátková molekula podľa nároku 12 a 14, ktorej variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4, a ktorej variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 5.

19. Protilátková molekula podľa nároku 11 a 15 obsahujúca variabilnú oblasť ťažkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4, a obsahujúca variabilnú oblasť ľahkého reťazca kódovanú nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 6, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

20. Protilátková molekula podľa nároku 12 a 16, ktorej variabilná oblasť ťažkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 4, a ktorej variabilná oblasť ľahkého reťazca je kódovaná nukleokyselinovou sekvenciou ako je definovaná v sekv. č. 6.

21. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 20, kde každý variabilný ľahký reťazec a každý variabilný ťažký reťazec je separátne spojený s ľudskou konštantnou oblasťou.

22. Protilátková molekula podľa nároku 21, kde ľudskou konštantnou oblasťou ľahkého reťazca je ľudská kapa konštantná oblasť.

23. Protilátková molekula podľa nároku 21 alebo 22, kde ľudskou konštantnou oblasťou ťažkého reťazca je ľudská IgG1 konštantná oblasť.

24. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 23 obsahujúca ťažký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 7, a obsahujúca ľahký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 8, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

25. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 24, kde ťažký reťazec pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 7, a kde ľahký reťazec pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 8.

26. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 25 obsahujúca ťažký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 7, a obsahujúca ľahký reťazec ako je charakterizovaný aminokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 9, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, glykozylačný variant, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

27. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 26, kde ťažký reťazec pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 7, a kde ľahký reťazec pozostáva z aminokyselín ako sú charakterizované aminokyselinovou sekvenciou č. 9.

28. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 27 obsahujúca ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 10, a obsahujúca ľahký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 11, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

29. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 28, kde ťažký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 10, a kde ľahký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 11.

30. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 29 obsahujúca ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 10, a obsahujúca ľahký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 12, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

31. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 30, kde ťažký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 10, a kde ľahký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 12.

32. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 31 obsahujúca ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 13, a obsahujúca ľahký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 14, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

33. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 32, kde ťažký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 13, a kde ľahký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 14.

34. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 33 obsahujúca ťažký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 13, a obsahujúca ľahký reťazec ako je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 15, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

35. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 34, kde ťažký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 13, a kde ľahký reťazec je kódovaný nukleokyselinovou sekvenciou č. 15.

36. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 35, obsahujúca ťažký a ľahký reťazec, ako sú kódované nukleokyselinovou sekvenciou definovanou v sekv. č. 16, alebo jej fragment, alelický variant, funkčný variant, variant založený na degenerovanosti nukleokyselinového kódu, fúzovaná molekula alebo chemický derivát.

37. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 36, kde ťažký a ľahký reťazec sú kódované nukleokyselinovou sekvenciou č. 16.

38. Protilátková molekula podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 37, ktorá je konjugovaná s terapeutickou látkou.

39. Protilátkový proteín podľa nároku 38, kde terapeutická látka je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z rádioizotopov, toxínov, toxoidov, zápalových látok a chemoterapeutických látok.

40. Protilátkový proteín podľa nároku 39, kde terapeutická látka je spojená s protilátkovým proteínom prostredníctvom spojovníka vybraného zo skupiny obsahujúcej MAG-3 GABA, MAG-2 GABA a N2S2.

41. Protilátkový proteín podľa nároku 40, kde terapeutická látka je spojená s protilátkovým proteínom prostredníctvom MAG-2 GABA.

42. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 38 až 41, kde rádioizotopom je β -emitujúci rádioizotop.

43. Protilátkový proteín podľa nároku 42, kde rádioizotop je vybraný zo skupiny obsahujúcej $^{186}\text{rénium}$, $^{188}\text{rénium}$, $^{131}\text{jód}$ a $^{90}\text{ytrium}$.

44. Protilátkový proteín podľa nároku 43, kde rádioizotopom je $^{186}\text{rénium}$.

45. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 39 až 44, kde protilátkový proteín má špecifickú aktivitu od približne 0,5 do približne 15 mCi/mg alebo od približne 0,5 do približne 14 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 10 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 5 mCi/mg a najvýhodnejšie 2 až 6 mCi/mg alebo 1 až 3 mCi/mg.

46. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 37, ktorý je označený.

47. Protilátkový proteín podľa nároku 46, kde značkou je detegovateľný marker.

48. Protilátkový proteín podľa nároku 47, kde detegovateľný marker je vybraný zo skupiny, ktorá obsahuje enzýmy, farbičky, rádioizotopy, digoxigenín a biotín.

49. Protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 37 konjugovaný so zobraziteľným činidlom.

50. Protilátkový proteín podľa nároku 49, kde zobraziteľným činidlom je rádioizotop.

51. Protilátkový proteín podľa nároku 50, kde rádioizotopom je γ -emitujúci rádioizotop.

52. Protilátkový proteín podľa nároku 51, kde rádioizotopom je ^{125}I .

53. Farmaceutický prostriedok, vyznačujúci sa tým, že obsahuje protilátkový proteín podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 45 a farmaceuticky prijateľný nosič alebo excipient.

54. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 53, vyznačujúci sa tým, že protilátkový proteín je konjugovaný s rádioizotopom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 39 až 44 a má špecifickú aktivitu od približne 0,5 do približne 15 mCi/mg alebo od približne 0,5 do približne 14 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 10 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 5 mCi/mg, a najvýhodnejšie 2 až 6 mCi/mg alebo 1 až 3 mCi/mg.

55. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 53 alebo 54, vyznačujúci sa tým, že množstvo rádioaktívne značenej protilátky vo farmaceutickom prostriedku, ktorý má byť aplikovaný pacientovi, je 10, 20, 30, 40, 50 alebo 60 mCi/m².

56. Farmaceutický prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 53 až 55, vyznačujúci sa tým, že množstvo rádioaktívne značenej protilátky vo farmaceutickom prostriedku, ktorý sa má aplikovať pacientovi, je 50 mCi/m².

57. Farmaceutický prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 53 až 56, vyznačujúci sa tým, že ďalej obsahuje jedno alebo viaceré látky chrániace pred žiarením zo skupiny obsahujúcej kyselinu askorbovú, kyselinu gnetizovú, kyselinu redukčovú, kyselinu erytrobovú, kyselinu *p*-aminobenzoovú, kyselinu 4-hydroxybenzoovú, kyselinu nikotínovú, nikotínamid, kyselinu 2,5-dihydroxy-1,5-benzéndisulfónovú, providón, inozitol a/alebo citrát.

58. Farmaceutický prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 53 až 57, vyznačujúci sa tým, že látkou chrániacou pred žiarením je kyselina askorbová.

59. Farmaceutický prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 53 až 58, vyznačujúci sa tým, že protilátový proteín obsahuje protilátkovú molekulu vybranú zo skupiny obsahujúcej protilátkové molekuly podľa nárokov 8, 10, 18, 20, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 36, 37, spojenú so ¹⁸⁶rénom prostredníctvom MAG-2 GABA, pričom ďalej obsahuje kyselinu askorbovú ako látku chrániacu pred žiarením.

60. Použitie protilátkového proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 45 na výrobu lieku na liečenie rakoviny.

61. Použitie protilátkového proteínu podľa nároku 60, kde rakovina je vybraná zo skupiny obsahujúcej kolorektálnu rakovinu, rakovinu iných ako malých buniek pľúc, rakovinu prsníka, rakovinu hlavy a krku, rakovinu vaječníkov, rakovinu pľúc, rakovinu močového mechúra, rakovinu pankreasu a metastatické rakoviny mozgu.

62. Použitie protilátkového proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 60 alebo 61, kde protilátkový proteín je konjugovaný s rádioizotopom podľa ktoréhokoľvek z nárokov 39 až 44 a má špecifickú aktivitu od približne 0,5 do približne 15 mCi/mg alebo od približne 0,5 do približne 14 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 10 mCi/mg, výhodne približne 1 až približne 5 mCi/mg, a najvýhodnejšie 2 až 6 mCi/mg alebo 1 až 3 mCi/mg.

63. Použitie protilátkového proteínu podľa nároku 62, kde množstvo rádioaktívne značenej protilátky vo farmaceutickom prostriedku, ktorý sa má aplikovať pacientovi, je 10, 20, 30, 40, 50 alebo 60 mCi/m².

64. Použitie protilátkového proteínu podľa nároku 62, kde množstvo rádioaktívne značenej protilátky vo farmaceutickom prostriedku, ktorý sa má aplikovať pacientovi, je 50 mCi/m².

65. Nukleová kyselina, ktorá kóduje protilátkový proteín podľa jedného z nárokov 1 až 37.

66. Rekombinantný DNA vektor, ktorý obsahuje nukleovú kyselinu podľa nároku 65.

67. Rekombinantný DNA vektor podľa nároku 66, ktorým je expresný vektor.

68. Rekombinantný DNA vektor podľa nároku 66 alebo 67, ktorým je vektor pAD-CMV alebo jeho funkčný derivát.

69. Rekombinantný DNA vektor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 66 až 68, ktorým je vektor N5KG1Val alebo jeho derivát.

70. Hostiteľ, ktorý obsahuje vektor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 66 až 69.

71. Hostiteľ podľa nároku 70, ktorým je eukaryotická hostiteľská bunka.

72. Hostiteľ podľa nároku 70 alebo 71, ktorým je cicavčia bunka.

73. Hostiteľ podľa ktoréhokoľvek z nárokov 70 až 72, ktorým je BHK, CHO alebo COS bunka.

74. Hostiteľ podľa nároku 70, ktorým je bakteriofág.

75. Hostiteľ podľa nároku 70, ktorým je prokaryotická hostiteľská bunka.

76. Spôsob prípravy protilátkového proteínu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 37, vyznačujúci sa tým, že zahŕňa nasledujúce kroky: kultiváciu hostiteľa podľa jedného z nárokov 70 až 75 v podmienkach, v ktorých sa protilátkový proteín exprimuje uvedenou hostiteľskou bunkou, a izoláciu protilátkového proteínu.

77. Spôsob podľa nároku 76, vyznačujúci sa tým, že hostiteľom je cicavčia bunka, výhodne CHO alebo COS bunka.

78. Spôsob podľa nároku 76 alebo 77, vyznačujúci sa tým, že hostiteľská bunka sa kotransfekuje s dvoma plazmidmi, ktoré nesú expresné jednotky pre ľahký alebo ťažký reťazec.

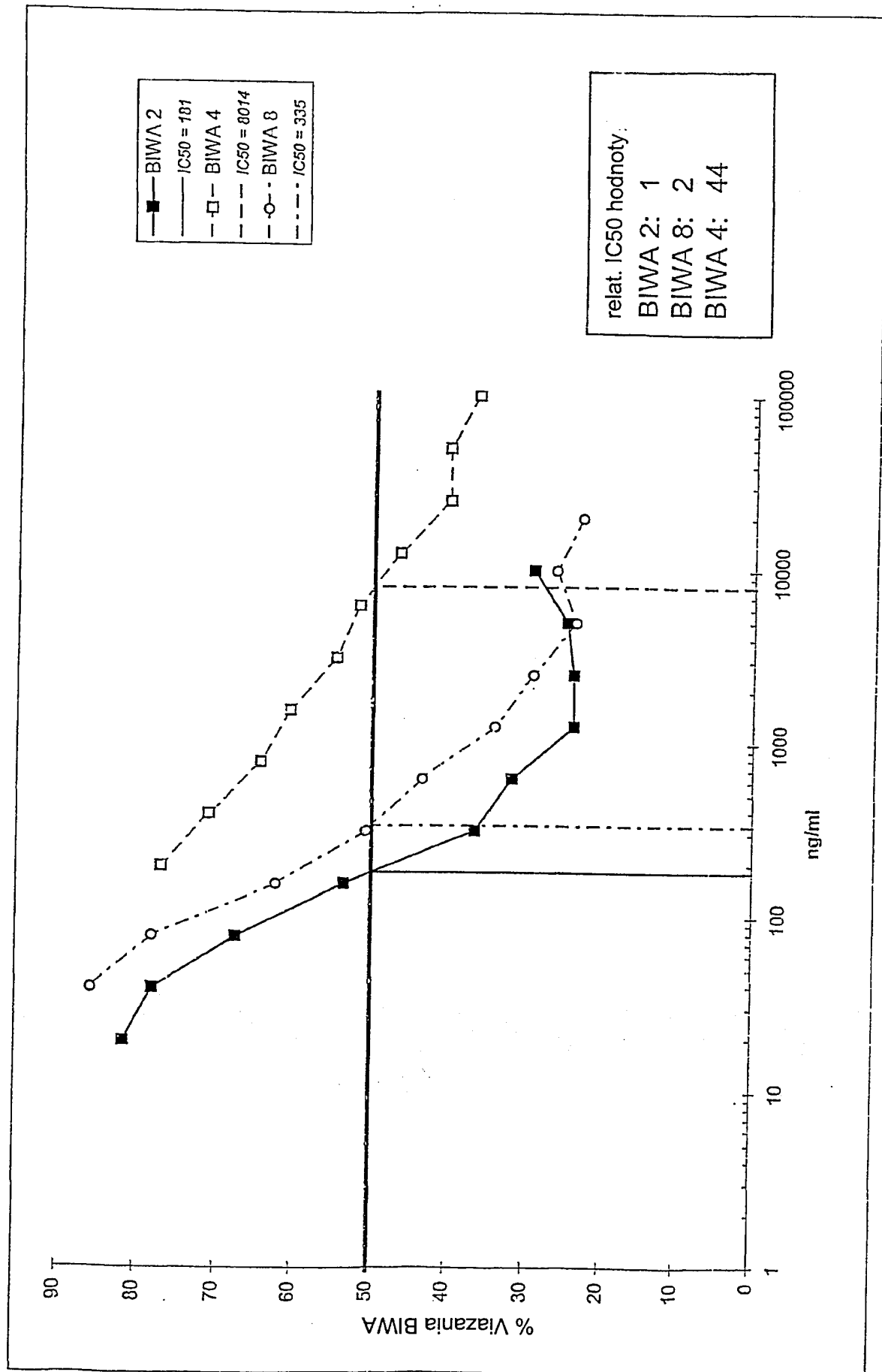


Fig. 1

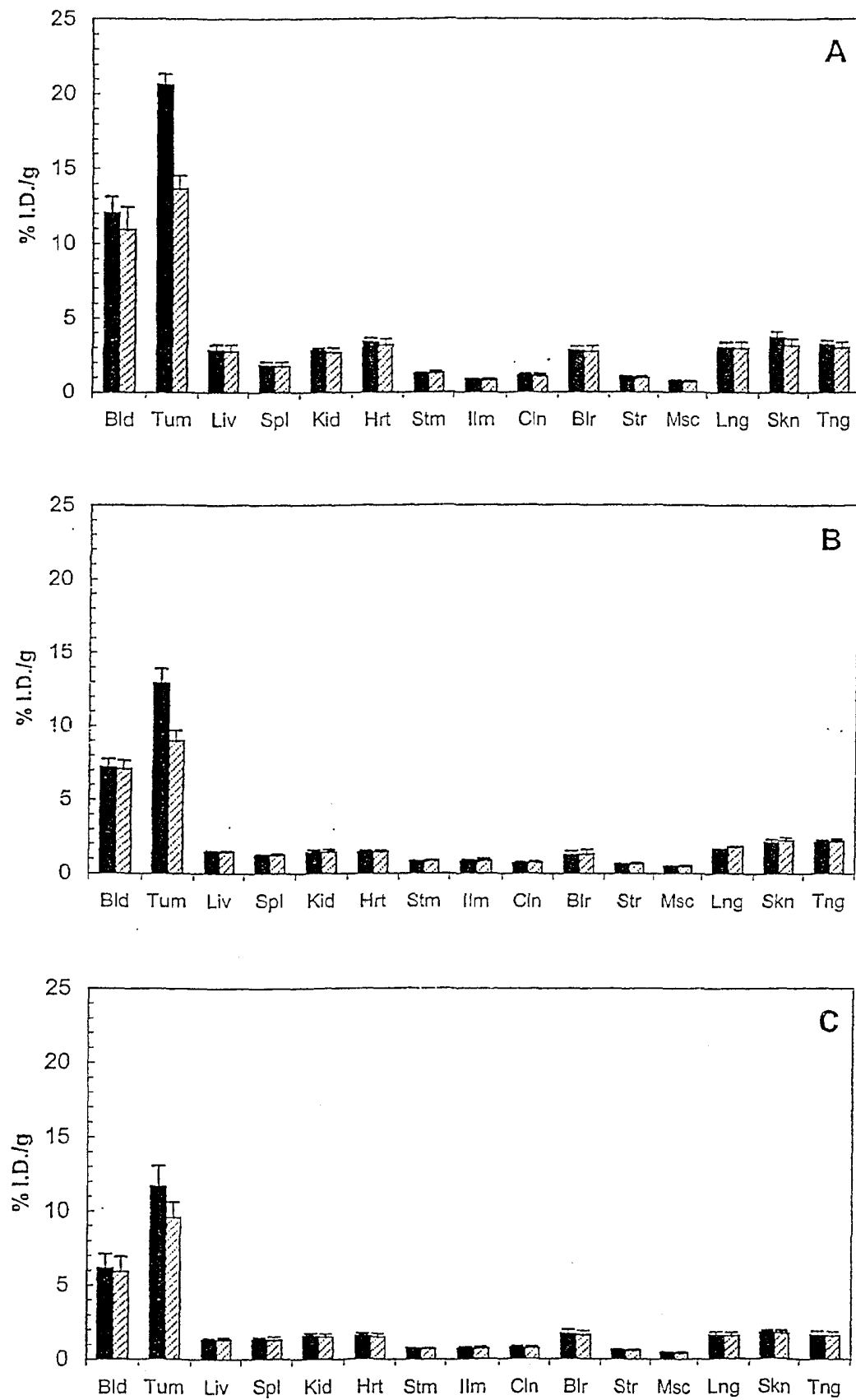


Fig. 2

3/5

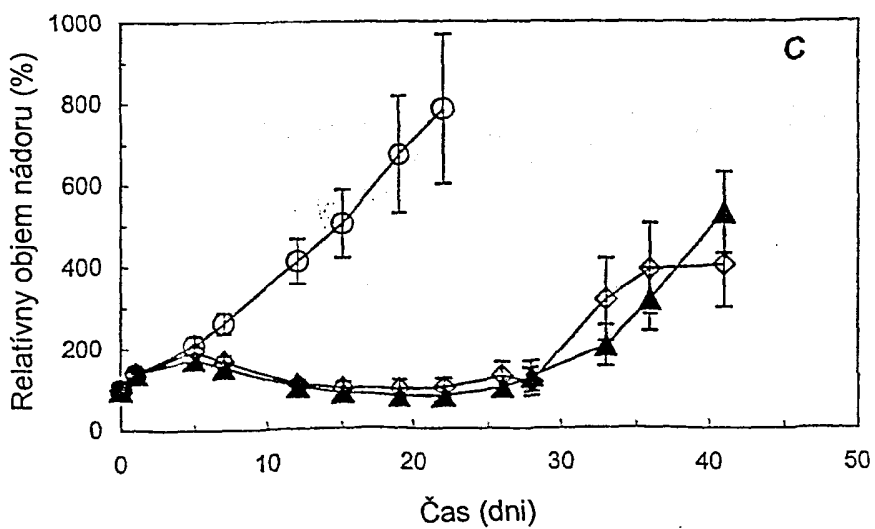
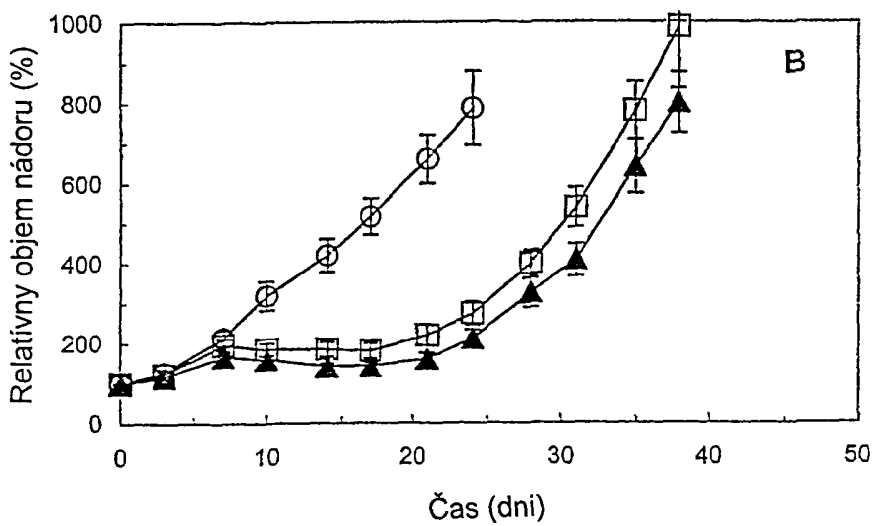
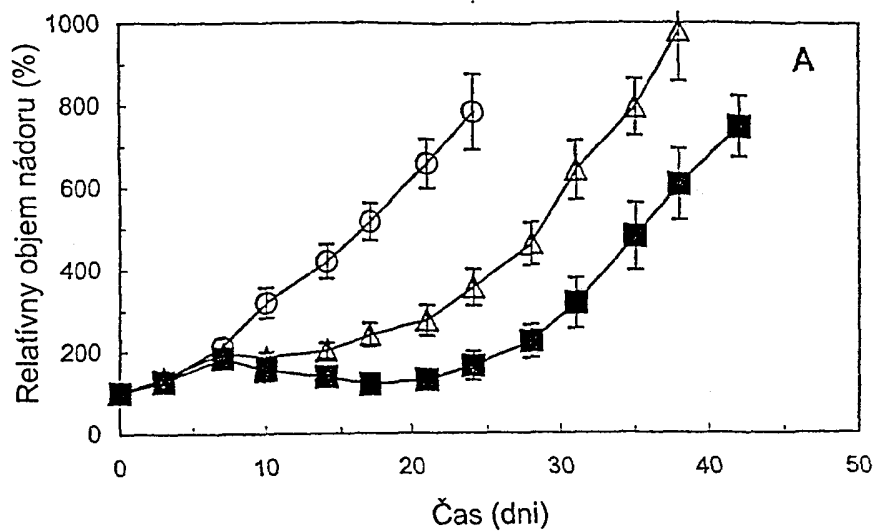


Fig. 3

1170.1 Časť A Vyhodnotenie Cmax proporcionality

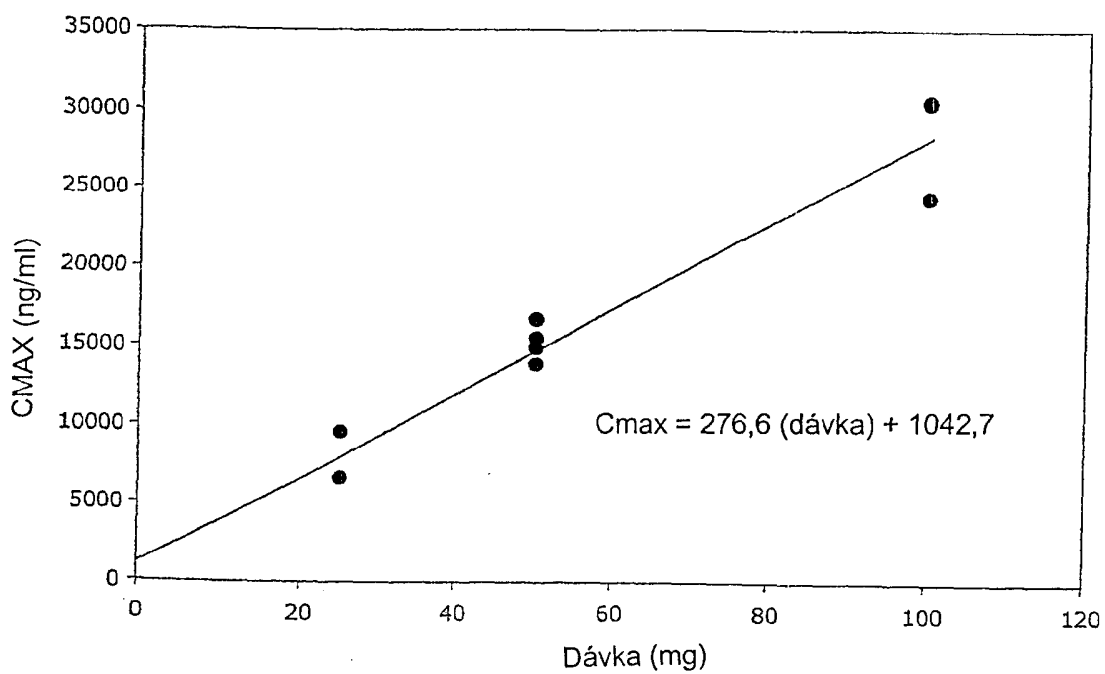


Fig. 4

1170.1 Časť A Vyhodnotenie AUC proporcionality

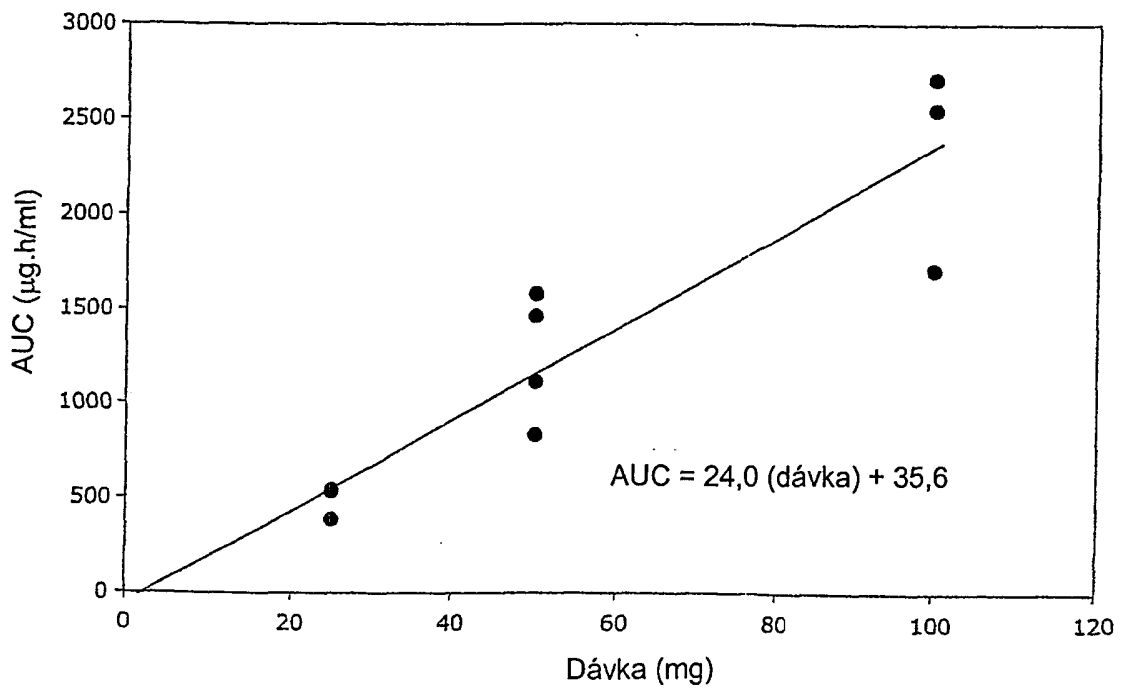


Fig. 5