

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.05.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.05.2001 26.09.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/01112237 2001/325147**
(33) Země priority: **EP US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 5/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/EP2002/005467**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/094879**

(21) Číslo dokumentu:

2003-3476

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
C 07 K 16/28 A 61 P 35/04
C 07 K 16/46
C 12 N 15/63
A 61 K 47/48
A 61 K 51/10
A 61 K 31/00
A 61 K 47/10
A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH, Ingelheim am Rhein, DE
BOEHRINGER INGELHEIM PHARMACEUTICALS
INC., Ridgefield, CT, US

(72) Původce:

Adolf Günther, Wien, AT
Ostermann Elinborg, Wien, AT
Patzelt Erik, Purkersdorf, AT
Spröll Marlies, Gauting, DE
Heider Karl-Heinz, Stockerau, AT
Miglietta John J., Bethel, CT, US
Van Dongen Augustinus Antonius Maria Silvester,
Utrecht, NL

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Protilátky specifické pro CD44v6

(57) Anotace:

Popisují se protilátky se specifikovanou sekvencí, které jsou specifické pro epitop, který je kódován proměnným exonem v6 genu CD44, a dále se popisují deriváty uvedených protilátek. Dále se popisují molekuly nukleových kyselin kódující uvedené proteiny protilátek. Řešení dále zahrnuje způsoby produkce uvedených proteinů protilátek, farmaceutické prostředky obsahující uvedené proteiny protilátek a použití při výrobě farmaceutického prostředku pro léčbu zhoubného bujení.

CZ 2003 - 3476 A3

Protilátky specifické pro CD44v6

Oblast techniky

Předmět vynálezu spadá do oboru onkologie. Popisují se protilátky se specifikovanou sekvencí, která je specifická pro epitop, jenž je kódován proměnným exonem v6 genu CD44 a deriváty uvedených protilátek. Vynález dále popisuje molekuly nukleové kyseliny kódující uvedené proteiny protilátek. Dále se popisují metody produkce uvedených protilátkových proteinů. Dále se popisují farmaceutické prostředky obsahující uvedené proteiny protilátek. Dále vynález zahrnuje použití při výrobě léčebných prostředků pro léčbu zhoubného bujení.

Dosavadní stav techniky

Ukázalo se, že exprese variant povrchového glykoproteinu CD44 je nezbytná a postačující pro spontánní tvorbu metastáz buněčné linie krysího pankreatického adenokarcinomu, která není metastázující, stejně jako nemetastázující buněčné linie krysího fibrosarkomu (popisuje se v publikaci Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Haußmann, I., Metzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. Cell 65: 13-24 (1991)). Zatímco nejmenší izoformy CD44, standardní forma CD44s (nebo CD44std) se jedinečně exprimují v různých tkáních, které zahrnují epiteliální buňky, jisté varianty CD44 upravené sestřihem (CD44v, CD44 var) se exprimují pouze v podsadě epiteliálních buněk. Varianty CD44 se vytvořily alternativním sestřihem tak, že sekvence deseti exonů (v1-v10) jsou v CD44s zcela odstraněny, ale mohou se vyskytovat ve větších variantách v různých kombinacích (popisuje se v publikaci Screatton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., and 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), Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. Nucleic Acids. Res. 21: 1225-1229 (1993), Hofmann, M., Rudy, W., Zoller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich, P., and 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)). Varianty se liší zavedenými aminokyselinovými sekvencemi v jistých místech extrabuněčné části proteinu. Takové varianty se mohou detekovat v různých lidských nádorových buňkách stejně jako v lidské nádorové tkáni. Tato skutečnost umožňuje zkoumat expresi variant CD44 v průběhu kolorektální karcinogeneze (popisuje se v publikaci Heider, K.-H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and 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)). V normálním epitelu lidského střeva nedochází k expresi variant CD44 a pouze slabou expresi je možné detekovat v proliferujících buňkách krypt. V pozdějších stádiích progresu nádoru například v adenokarcinomech všechny maligní varianty exprimují varianty CD44. Silná tkáňová exprese varianty CD44 je také prokázána v agresivních lymfomech, které nejsou Hodgkinova typu (popisuje se v publikaci Koopman, G., Heider, K.-H., Hordt, 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: 897-904 (1993)).

Exon v6 má speciální úlohu zvláště v průběhu rozšíření metastáz (popisuje se v publikaci Rudy, W., Hofmann, M., Schwartz-Albiez, R., Zöller, M., Heider, K.-H., Ponta, H., Herrlich, P. The tumor cell line are derived from different

splice variants: Each one line individually suffices to confer metastatic behaviour. Cancer Res. 53: 1262-1268 (1993)). two major CD44 proteins expressed on a metastaticra). Ve zvířecím modelu protilátky proti specifickým epitopům v6 mohou bránit zachycení metastatických buněk a následnému růstu metastáz (popisuje se v publikaci Seiter et al., 1993). V karcinomech střev exprese v6 koreluje s postupem nádoru (popisuje se v publikaci 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)). V gastrických karcinomech exprese v6 je důležitý diagnostický marker pro rozlišení nádorů intesticiálního typu od nádorů difúzního typu (popisuje se v publikaci Heider, K.-H., Dämmrich, J., Skroch-Angel, P., Müller-Hermelink, H.-K., Vollmers, H.-P., Ponta, H., Herrlich, P. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. Cancer Res. 53: 4197-4203 (1993b)). V publikacích 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) a Heider, K.-H., Dämmrich, J., Skroch-Angel, P., Müller-Hermelink, H.-K., Vollmers, H.-P., Ponta, H., Herrlich, P. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. Cancer Res. 53: 4197-4203 (1993b)). se stanovila exprese v6 za použití protilátek proti epitopům specifických pro V6.

Když se prokázalo, že CD44v6 je s tumorem asociovaný antigen s výhodným expresivním paternem v lidských nádorech a v normálních tkáních (popisuje se v publikaci Heider KH, Mulder JWR, Ostermann E, Susani S, Patzelt E, Pals ST, Adolf

GRA. Splice Variants of the surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumor cells are expressed in normal tissues of human and cynomolgus monkeys. Eur. J. Cancer 31A: 2358-2391, 1995 a Heider KH, Sproll M, Patzelt E, Beaumier P, Ostermann O, Ahorn H, Adolf GRA. Characterization of a high affinity monoclonal antibody specific for CDD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas. Cancer Immunology Immunotherapy 43: 245-253, 1996)) podrobil se diagnostice založené na protilátkách a zkoumalo se jeho terapeutické využití (popisuje se v publikaci Heider KH, Sproll M, Patzelt E, Beaumier P, Ostermann O, Ahorn H, Adolf GRA. Characterization of a high affinity monoclonal antibody specific for CDD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas. Cancer Immunology Immunotherapy 43: 245-253, 1996, WO 95/33771, WO 97/21104).

Jeden vážný problém, ke kterému dochází při aplikaci nelidských protilátek u lidí, je že uvedené protilátky rychle vyvolávají odezvu, která snižuje účinnost protilátky u pacientů a omezuje nepřerušovanou aplikaci. Aby se předešlo uvedenému problému, vyvinula se koncepce „humanizace“ protilátek, které nejsou lidské. První část humanizace protilátek, které nejsou lidské, je konstrukce nelidských/lidských chimerických protilátek, kde nelidské variabilní oblasti jsou spojené s lidskými konstantními oblastmi (popisuje se v publikaci Boulianne G. L., Hozumi N. and Shulman, M. J. (1984) Production of functional chimeric mouse/human antibody, Nature 312: 643). Takto vytvořené chimerické protilátky si ponechávají vazebnou specifitu a afinitu původní nelidské protilátky. Chimerické protilátky, ačkoli jsou podstatně lepší než myší protilátky mohou stále u lidí vyvolávat anti-chimerickou odezvu (popisuje se v publikaci LoBuglio A. F., Wheeler R. H., Trang J., Haynes A., Rogers K., Harvey E. B., Sun L., Ghrayeb J. and Khazaeli M. B. (1989) . Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man:

Kinetics and immune response. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 4220). Tento přístup se později detailněji rozvinul dalším snížením množství nelidských sekvencí zavedením oblastí determinujících komplementaritu (CDR) z nelidských variabilních oblastí do lidských variabilních oblastí a pak spojením těchto „přeformovaných lidských“ variabilních oblastí na lidské konstantní oblasti (popisuje se v publikaci Riechmann L., Clark M., Waldmann H. and Winter G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. Nature 332: 323). Lidské protilátky se zavedenou oblastí CDR nebo přeformované lidské protilátky obsahují pouze malé množství proteinových sekvencí, které se získaly z myších protilátek nebo tyto sekvence vůbec neobsahují. Ačkoli protilátky humanizované zavedením CDR jsou stále schopny vyvolat imunitní reakce, jako je anti-alotypová nebo anti-idiotypická odezva, jak je možné vidět dokonce v případě přirozených lidských protilátek, protilátky se zavedeným CDR jsou stále podstatně méně imunogenní ve srovnání s myší protilátkou, což umožňuje delší léčbu pacientů.

Brzy se však ukázalo, že samotné zavedení CDR nevede ke vzniku protilátek s dostatečnou vazebnou afinitou. Protilátky se zavedeným CDR vykazují relativně nízké vazebné charakteristiky ve srovnání s jejich předchůdci nelidskými protilátkami, protože více aminokyselin ve srovnání s aminokyselinami v CDR, se podílí na navázání antigenu. Proto protilátky se zavedeným CDR a nízkou vazebnou afinitou nejsou použitelné při terapii. Velké úsilí se proto věnuje vytvoření protilátek, které kombinují nízkou imunogenost protilátek se zavedenými CDR s dobrými vazebnými charakteristikami nelidských původních protilátek. Vedle zavedení CDR se jedna z několika aminokyselin v humanizované oblasti základní struktury zachovala jako zbytky pocházející z dárce, kterým je hlodavec, za účelem uchování vazebné afinity (popisuje se

v publikaci Queen et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 10029-10033).

Protože takové protilátky by mohly mít vysoké potencionální použití při diagnóze a terapii, je nutné vytvořit protilátky se zdokonalenými vlastnostmi, které jsou vhodné pro léčbu lidského zhoubného bujení.

Cílem vynálezu je vytvořit protilátky s podstatně lepšími vlastnostmi ve srovnání se známými specifickými protilátkami CD44v6.

Podstata vynálezu

Shora v textu popsaný technický problém řeší provedení vynálezu charakterizované v sekci nároky a v popisu vynálezu. Shora v textu uvedené nevýhody se překonají způsobem, jak se popisuje v sekci nároků a v popisu.

Za účelem vyřešit problémy uvedené shora v textu se navrhla a vytvořila humanizovaná protilátka specifická pro CD44v6 nazvaná BIWA8, která obsahuje zavedené CDR a mutovanou základní strukturu a vykazovala nízkou imunogennost kombinovanou s vysokou afinitou.

Vytvořila se protilátka, která vykazuje vysoké terapeutické využití a nazývá se BIWA4. Ačkoli tato protilátka vykazuje nižší vazebnou afinitu ve srovnání s BIWA8, překvapivě vykazuje výhodnější biologickou distribuci a pohlcení nádorem, když se aplikuje *in vivo*.

Vynález spadá do oblasti onkologie. Vynález popisuje protilátky se specifickovanou sekvencí, které jsou specifické pro epitop, který je kódován proměnným exonem v6 genu CD44 a dále vynález popisuje deriváty uvedených protilátek. Vynález dále popisuje způsoby produkce uvedených protilátkových proteinů. Vynález také popisuje farmaceutické prostředky

obsahující uvedené protilátkové proteiny. Vynález dále zahrnuje použití při výrobě léčebného prostředku pro léčbu zhoubného bujení.

Je nutné poznamenat, že v sekci popisu a nároků významy v jednotném čísle odpovídají významům v množném čísle, pokud není výslovně uvedeno jinak. Pak například význam „protilátka“ zahrnuje velké množství takových protilátek, termín „buněk“ znamená jednu nebo více buněk. Pokud není definováno jinak, všechny zde uvedené technické a vědecké termíny mají stejný význam, jako se používá v oboru, do kterého spadají. Ačkoli se při testování vynálezu nebo jeho zavádění do praxe mohou použít zde popsané libovolné metody a materiály, nyní se dále popisují výhodné metody, zařízení a materiály. Všechny zde zmiňované publikace jsou zde začleněny jako reference pro účely popisu a doložení buněčných linií, vektorů a metod, které je možné použít ve spojení s vynálezem.

Termíny „molekula protilátek“ nebo protein protilátek“ nebo „protilátka“ se považují za ekvivalentní.

Termín „oblasti determinující komplementaritu monoklonální protilátky“ jsou aminokyselinové sekvence podílející se na specifickém navázání antigenu podle Kabata (popisuje se v publikaci Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. and Foeller C. (1999) Sequences of proteins of Immunological interest (5th Ed.). NIH Publication No. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.) ve spojení s autory Chothia and Lesk (jak se popisuje v publikaci Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917).

Termín „úpravy základní struktury“ znamenají změnu, delecí nebo adicí jedné nebo více aminokyselin ve variabilních oblastech obklopujících jednotlivé oblasti determinující komplementaritu. Úpravy základní struktury mohou ovlivňovat

imunigennost, produktivnost nebo specifitu navázání proteinu protilátky.

Vynález popisuje molekulu protilátky obsahující variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí, jak se definuje v SEQ ID NO: 1, nebo její fragment, alelickou variantu, funkční variantu, glykosylační variantu, fúzní molekulu nebo chemický derivát. Obě protilátky BIWA 4 a BIWA 8 obsahují variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1.

Termín „fragment“ podle vynálezu se definuje jako kratší molekula protilátky, to znamená libovolná podsada polypeptidu, charakterizovaná tím, že je kódována kratší molekulou nukleové kyseliny, než se popisuje dále v textu, ale stále si uchovává vazebnou aktivitu protilátky.

Termín „funkční varianta“ molekuly protilátky podle vynálezu je molekula protilátky, který vykazuje biologickou aktivitu (buď funkční nebo strukturní), která je podstatně podobná molekule protilátky podle vynálezu, to znamená, že vykazuje podstatně podobnou substrátovou specifitu nebo štěpení substrátu. Termín „funkční varianta“ také zahrnuje „fragment“, „alelickou variantu“, funkční variantu“, variantu založenou na degenerovaném kódu nukleové kyseliny“ nebo „chemické deriváty“. „Funkční varianta“ například může nést jednu nebo více bodových mutací, jednu nebo několik změn, delecí nebo začlenění na úrovni nukleové kyseliny nebo několik změn, delecí nebo začlenění na úrovni aminokyseliny. Uvedená funkční varianta si stále uchovává svou biologickou aktivitu, jako je vazebná aktivita protilátky, nebo dokonce alespoň částečně zvyšuje uvedenou biologickou aktivitu.

Termín „funkční varianta“ molekuly protilátky podle vynálezu je molekula protilátky, který vykazuje biologickou aktivitu (buď funkční nebo strukturní), která je podstatně

podobná molekule protilátky podle vynálezu, to znamená, že vykazuje podstatně podobnou cílovou molekulu vazebné aktivity. Termín „funkční varianta“ také zahrnuje „fragment“, „alelickou variantu“, funkční variantu“, variantu založenou na degenerativním kódu nukleové kyseliny“ nebo „chemické deriváty“.

Termín „alelická varianta“ je varianta způsobená proměnlivostí alel, například rozdíly dvou alel u člověka. Uvedená varianta si stále uchovává svou biologickou aktivitu, jako je cíl vazebné aktivity protilátky, a alespoň částečně dochází k zesílení uvedené biologické aktivity.

Termín „varianta založená na degenerativním genetickém kódu“ je varianta způsobená skutečností, že jistá aminokyselina může být kódována několika různými nukleotidovými triplety. Uvedená varianta si stále uchovává svou biologickou aktivitu a alespoň částečně dochází ke zlepšení uvedené biologické aktivity.

Termín „fúzní molekula“ znamená molekulu protilátky podle vynálezu fúzovanou například s reportní molekulou, jako je radioaktivní značka, chemickou molekulou, jako je toxin, nebo s fluorescenční značkou nebo libovolnou jinou molekulou, která je známa v oboru.

Termín „chemický derivát“ podle vynálezu je molekula protilátky podle vynálezu, která se chemicky upravila nebo obsahuje další chemické části, které v normálním případě nejsou částí molekuly. Takové části mohou zlepšit aktivitu molekuly, jako je poškození cíle (například usmrcení nádorových buněk) nebo mohou vylepšit rozpustnost, absorpci, biologický poločas rozpadu atd..

Molekula je „podstatně podobná“ jiné molekule, jestliže obě molekuly vykazují podstatně podobné struktury nebo

biologickou aktivitu. Pokud molekuly vykazují podobnou aktivitu považují se za varianty. Tento termín se zde používá dokonce i v případě, jestliže struktura jedné z molekul se nenachází u té druhé nebo jestliže sekvence aminokyselinových zbytků není identická.

V případě mnoha použití protilátek podle vynálezu je nutné, aby protilátka vykazovala tu nejmenší možnou jednotku vázající se na antigen, to je jednotky vázající se na CD44v6. V jiném výhodném provedení vynálezu je proteinem protilátky podle vynálezu fragment Fab. Tyto proteiny protilátek specifikých pro CD44v6 podle vynálezu obsahují variabilní oblasti obou řetězců, které drží dohromady pomocí přilehlé konstantní oblasti. Ty se mohou vytvořit štěpením proteázou, jako je například papain, z běžných protilátek, ale podobné fragmenty Fab mohou také vznikat metodami genetického inženýrství. V jiném ve výhodném provedení vynálezu protein protilátky podle vynálezu je fragment $F(ab')_2$, který se může připravit proteolytickým štěpením pepsinem.

Použitím metod genetického inženýrství je možné produkovat zkrácené fragmenty protilátek, které obsahují pouze variabilní oblasti těžkého (VH) a lehkého (VL) řetězce. Tyto fragmenty se nazývají jako fragmenty Fv (variabilní fragmenty=fragment variabilní části). V jiném výhodném provedení vynálezu molekula protilátky specifická pro CD44v6 podle vynálezu je také fragment Fv. Protože tyto fragmenty Fv postrádají kovalentní spojení dvou řetězců pomocí cysteinů konstantních řetězců, jsou fragmenty Fv často stabilizovány. Je výhodné spojit variabilní oblasti těžkého a lehkého řetězce krátkým peptidovým fragmentem, který obsahuje například 10 až 30 aminokyselin, s výhodou 15 aminokyselin. Tímto způsobem se získal jediný peptidový řetězec obsahující VH a VL spojený peptidovým linkerem. Protilátkový protein tohoto druhu je znám jako jednořetězcový Fv (scFv). Příklady scFv-protilátkových

proteinů tohoto druhu jsou známy v oboru a popisují se například v publikaci Huston et al. 1988, PNAS 16: 5879-5883). V jiném výhodném provedení vynálezu protilátkovým proteinem specifickým pro CD44v6 podle vynálezu je jednořetězcový Fv protein (scFv).

V určitých letech se vyvinuly různé strategie pro přípravu scFv, jako multimerního derivátu. To zvláště vede ke vzniku rekombinantních protilátek se zlepšenými farmakokinetickými vlastnostmi a se zlepšením biologické distribuce a zvýšenou vazebnou aciditou. Za účelem dosáhnout multimerizace scFv se připravil scFv jako fúzní protein s multimerizačními doménami. Multimerizační domény mohou být například oblast CH3 IgG nebo šroubovicová struktura, jako jsou domény leucinového zipu. Avšak existují také strategie, kde interakce mezi oblastmi VH/VL scFv se používají pro multimerizaci (například se spojí dvě, tři a pět základních strukturních jednotek). V jiném výhodném provedení vynálezu je protilátkovým proteinem fragment protilátky obsahující dvě základní strukturní jednotky (tzv. „diabody“) specifické pro CD44v6. Diabody znamená bivalentní homodimerní derivát scFv (popisuje se v publikaci Hu et al., 1996, PNAS 16: 5879-5883). Zkrácení linkeru v molekule na 5 až 10 aminokyselin vede k vytvoření homodimerů, ve kterých probíhá super uložení vnitřních řetězců VH/VL. Fragment obsahující dvě základní strukturní jednotky je stabilizován začleněním disulfidových můstků. Příklady protilátkových proteinů obsahujících dvě základní strukturní jednotky se popisují v předchozím stavu techniky například v publikaci Perisic et al., 1994, Structure 2: 1217-1226).

Termín „minibody“ znamená bivalentní homodimerní derivát scFv. Obsahuje fúzní protein, který obsahuje oblast CH3 imunoglobulinu, s výhodou IgG, nejvýhodněji IgG1 jako dimerizační oblast, která je spojena s scFv oblastí kloubního spoje (například také z IgG1) a oblastí linkeru.

Disulfidové můstky oblasti kloubního spoje se nejčastěji tvoří ve vyšších buňkách a nikoli v prokaryontech. V jiném výhodném provedení vynálezu protilátkový protein podle vynálezu je protilátkový fragment minibody specifický pro CD44v6. Příklady protilátkových proteinů obsahujících minibody se popisují například v publikaci Hu et al., 1996, Cancer Res. 56: 3055-61).

Termín „triabody“ znamená trivalentní homotrimerický derivát scFv (popisuje se v publikaci Kort et al., 1997, Protein Engineering 10: 423-433). Deriváty ScFv, kde VH-VL se fúzíjí přímo bez linkerové sekvence vedou k vytvoření trimérů.

Odborníkovi je také jasný termín „miniprotilátky“. Jde o protilátky, které vykazují bi-, tri- nebo tetravalentní strukturu a získaly se z scFv. Multimerizace se provádí pomocí dimerních, trimerních nebo tetramerních šroubovicových struktur (popisuje se v publikaci Pack et al., 1993, Biotechnology 11:, 1271-1277, Lovejoy et al., 1993, Science 259: 1288-1293, Pack et al., 1995, J. Mol. Biol. 246: 28-34).

Proto ve výhodném provedení vynálezu protilátkový protein podle vynálezu je multimerizovaná molekula specifická pro CD44v6 založená na shora v textu popsaných protilátkových fragmentech. Mohou to například být triabody, tetravalentní miniprotilátky nebo pentabody.

Ve výhodnějším provedení vynálezu se popisuje molekula protilátek, kde variabilní oblast těžkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1.

V jiném výhodném provedení vynálezu vynález popisuje molekulu protilátky obsahující variabilní oblast lehkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí, jak se definuje v SEQ ID NO: 2 nebo její fragment, alelickou

variantu, funkční variantu, glykosylační variantu, fúzní molekulu nebo chemický derivát. Používaná protilátka BIWA4 obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce, jak se definuje v aminokyselinové sekvenci SEQ ID NO: 2.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátek, kde variabilní oblast lehkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 2.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátek obsahující variabilní oblast lehkého řetězce, kterou charakterizuje aminokyselinová sekvence, jak se definuje v SEQ ID NO: 3 její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA 8 obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 3.

V jiném vhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky, kde variabilní oblast lehkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 3.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátek podle vynálezu obsahující variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 1 a obsahující variabilní oblast lehkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí, jak se definuje v SEQ ID NO: 2 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA4 obsahuje variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1 a variabilní oblast lehkého řetězce definovanou aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 2.

Nejvýhodnější provedení vynálezu popisuje protilátkovou molekulu podle vynálezu, kde variabilní oblast těžkého řetězce zahrnuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1 a kde variabilní oblast lehkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 2.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu obsahující variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí, jak se definuje v SEQ ID NO: 1 a obsahující variabilní oblast lehkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 3 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA 8 obsahuje variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1 a variabilní oblast lehkého řetězce definovanou aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 3.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu, kde variabilní oblast těžkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1 a kde variabilní oblast lehkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 3.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátek obsahující variabilní oblast těžkého řetězce, kterou kóduje sekvence nukleové kyseliny definovaná v SEQ ID NO: 4 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát. Obě protilátky BIWA 4 a BIWA 8 obsahují variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 4.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky, kde variabilní oblast těžkého řetězce je kódovaná sekvencí nukleové kyseliny, jak se definuje v SEQ ID NO: 4.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátek obsahující variabilní oblast lehkého řetězce, kterou kóduje sekvence nukleové kyseliny definovaná v SEQ ID NO: 5, nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Používaná protilátka BIWA 4 obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce, jak se definuje v sekvenci nukleové kyseliny SEQ ID NO: 5.

V jiném vhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky, kde variabilní oblast lehkého řetězce je kódovaná sekvencí nukleové kyseliny, jak se definuje v SEQ ID NO: 5.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky obsahující variabilní oblast lehkého řetězce kódovaná sekvencí nukleové kyseliny definovaná sekvencí SEQ ID NO: 6 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA 8 obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce charakterizovanou sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 6.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátek, kde variabilní oblast lehkého řetězce je kódována sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 6.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu obsahující variabilní oblast těžkého řetězce kódovanou sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 4 a dále obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce kódovanou sekvencí nukleové kyseliny definované v SEQ ID NO: 5 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta,

varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA 4 obsahuje variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 4 a variabilní oblast lehkého řetězce definovanou sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 5.

V jiném nejvýhodnějším provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu, kde variabilní oblast těžkého řetězce je kódována sekvencí nukleové kyseliny, jak se definuje v SEQ ID NO: 4 a kde variabilní oblast lehkého řetězce je kódována sekvencí nukleové kyseliny, jak se definuje v SEQ ID NO: 5.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu obsahující variabilní oblast těžkého řetězce kódovanou sekvencí nukleové kyseliny, jak se definuje v SEQ ID NO: 4, a dále obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce kódovanou sekvencí nukleové kyseliny, jak se definuje v SEQ ID NO: 6, nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA8 obsahuje variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 4 a variabilní oblast lehkého řetězce definovanou sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 6.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu, kde variabilní oblast těžkého řetězce je kódována sekvencí nukleové kyseliny, jak se definuje v SEQ ID NO: 4, a variabilní oblast lehkého řetězce je kódována sekvencí nukleové kyseliny definované v SEQ ID NO: 6.

Za účelem vytvoření humanizovaných protilátkových proteinů specifických pro CD44v6 popsané sekvence nukleových kyselin

exprimovaných (popisuje se dříve v textu a v sekci příkladů) se exprimovaly pomocí metod molekulární biologie, které jsou dobře známy v oboru.

Variabilní oblasti protilátkových proteinů podle vynálezu jsou v typickém případě spojeny alespoň s částí konstantní oblasti imunoglobulinu (Fc), v typickém případě s uvedenou oblastí lidského imunoglobulinu. Sekvence DNA lidské konstantní oblasti se mohou izolovat dobře známými postupy z různých lidských buněk, ale s výhodou se mohou izolovat z nesmrtelných buněk B (popisuje se v publikaci Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. and Foeller C. (1999) Sequences of proteins of Immunological interest (5th Ed.). NIH Publication No. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD a v patentovém dokumentu WO 87/02671). Protože protilátkové proteiny podle vynálezu mohou obsahovat všechny nebo pouze část konstantní oblasti pokud vykazují specifické navázání na antigen CD44v6. Volba typu a rozsah konstantní oblasti závisí na skutečnosti, zda efektor funguje jako doplňková fixace nebo je požadovaná buněčná toxicita závislá na protilátce, dále závisí na požadovaných farmakologických vlastnostech protilátkového proteinu. Protein protilátky bude v typickém případě tetramer obsahující dva páry lehkého/těžkého řetězce, ale může být také dimerní, to znamená, že může obsahovat pár lehkého/těžkého řetězce, například fragment Fab nebo Fv.

Další provedení vynálezu popisuje proteiny protilátky charakterizované tím, že mají variabilní oblast lehkého řetězce a variabilní oblast těžkého řetězce, přičemž každá je spojená s lidskou konstantní oblastí. Variabilní oblast lehkého řetězce je spojena s konstantní oblastí lidského řetězce typu kappa a variabilní oblast těžkého řetězce je spojena s konstantní oblastí lidského řetězce gamma-1. Pro

odborníka jsou dostupné také jiné konstantní oblasti pro chimerizaci lehkých a těžkých řetězců.

Humanizace variabilní oblasti myších protilátek je možné dosáhnout použitím metod známých v oboru. V patentovém dokumentu EP 0239400 se popisuje zavádění CDR myší variabilní oblasti do základní struktury lidské variabilní oblasti. Patentový dokument WO 90/07861 popisuje způsoby přetváření variabilní oblasti se zavedenými CDR zavedením dalších úprav základní struktury. V patentovém dokumentu se WO 92/11018 popisují způsoby produkce humanizovaných Ig kombinací donorových CDR se základní strukturou příjemce, která vykazuje vysokou homologii se základní strukturou dárce. Patentový dokument WO 92/05274 popisuje přípravu protilátek s mutovanou základní strukturou, které vznikají z myší protilátky. Další publikace dosavadního stavu techniky popisující humanizaci myších monoklonálních protilátek jsou patentové dokumentu EP 0368684, EP 0438310, WO 92/07075 nebo WO 92/22653.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátek charakterizovaná tím, že se každá uvedená variabilní oblast lehkého řetězce a uvedená variabilní oblast těžkého řetězce samostatně spojují s lidskou konstantní oblastí.

V jiném vhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu, kde uvedená lidská konstantní oblast lehkého řetězce je konstantní oblast lidského řetězce typu kappa.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje protein protilátek, kde uvedená lidská konstantní oblast těžkého řetězce je konstantní oblast lidského IgG1.

Výhodné jsou také protilátky obsahující těžký řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 7 a/nebo

lehký řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 8 nebo SEQ ID NO: 9.

V jiném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátek obsahující těžký řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí, jak se definuje v SEQ ID NO: 7, a obsahující lehký řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí definovanou SEQ ID NO: 8 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA 4 obsahuje těžký řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 7 a variabilní oblast lehkého řetězce definovaného aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 8.

V nejvýhodnějším provedení vynálezu se popisuje protilátková molekula, kde těžký řetězec obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 7 a kde lehký řetězec obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 8. Protilátka BIWA4 obsahuje sekvence popsané aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 7 (těžký řetězec) a aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 8 (lehký řetězec). BIWA 4 je protilátka se zavedenou CDR bez úprav základní struktury. Překvapivě tato protilátka vykazuje přesto nižší vazebnou afinitu, vysokou terapeutickou účinnost, lepší biologickou distribuci a lepší pohlcení nádorem ve srovnání s protilátkou BIWA 8 s mutovanou základní strukturou (popisuje se v sekci příklady). To je humanizovaná verze protilátky VFF-18 (BIWA1) uvedené shora v textu, která vykazuje oblasti stanovující komplementaritu myši monoklonální protilátky VFF-18 v zcela lidské základní struktuře, a lidské konstatní oblasti. Jde o protilátku, která u člověka vykazuje velmi nízkou imunogenost, což je její favoritní rys. Jestliže pro optimalizaci navázání antigenu nevykazuje žádné zbytky myši základní struktury, pak vykazuje

podstatně nižší afinitu navázání antigenu ve srovnání s její původní protilátkou VFF-18 a proto se nepovažuje za dobrého kandidáta pro terapeutické účely. Neočekávaně se zjistilo, že BIWA 4 navzdory nízké vazebné afinitě vykazuje velmi výhodnou biologickou distribuci a pohlcení nádorem *in vivo*, což jí nadřazuje jiným humanizovaným verzím VFF-18 s vyšší vazebnou afinitou.

Jiné důležité provedení vynálezu je molekula protilátky podle vynálezu obsahující těžký řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 7 a obsahující lehký řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 9 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA 8 obsahuje těžký řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 7 a variabilní oblast lehkého řetězce definovanou aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 9.

Ve výhodném provedení podle vynálezu se popisuje molekula protilátky, kde těžký řetězec obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 7 a kde lehký řetězec obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 9. Protilátka BIWA 8 obsahuje sekvence popsané aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 7 (těžký řetězec) a aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 9 (lehký řetězec). BIWA 8 je protilátka se zavedenou CDR s úpravami základní struktury. Tato protilátka má podstatně vyšší vazebnou afinitu ve srovnání s BIWA4 (popisuje se v sekci příklady). Výhodné jsou také protilátky obsahující těžký řetězec kódovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 10 a/nebo lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 11 nebo SEQ ID NO: 12. Uvedené sekvence

zahrnují nepřekládané sekvence a vedoucí sekvenci klonované do vektoru pAD-CMV1/pAD-CMV19.

Jiné výhodné provedení vynálezu popisuje molekulu protilátky podle vynálezu obsahující těžký řetězec kódovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 10 a a dále obsahuje lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 11 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA 4 obsahuje těžký řetězec kódovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 10 a variabilní oblast lehkého řetězce kódovaného sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 11.

Ve výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky, kde těžký řetězec je kodován sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 10 a kde lehký řetězec je kodován sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 11.

V jiném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu obsahující těžký řetězec kódovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 10 a obsahující lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 12 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA 8 obsahuje těžký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 10 a variabilní oblast lehkého řetězce kodovanou sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 12.

Ve výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky, kde těžký řetězec je kodovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 10 a lehký řetězec je kodovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 12.

Výhodné jsou také protilátky obsahující těžký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 13 a/nebo lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 14 nebo SEQ ID NO: 15. Uvedené sekvence zahrnují vedoucí sekvenci klonovanou do vektoru N5KG1val.

V jiném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu obsahující těžký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 13 a obsahující lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 14 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA4 obsahuje těžký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 13 a variabilní oblast lehkého řetězce kodovanou sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 14.

Ve výhodném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu obsahující těžký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 13 a obsahující lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 14.

V jiném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu obsahující těžký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 13 a obsahující lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleové kyseliny, jak definuje SEQ ID NO: 15 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA8 obsahuje těžký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 13 a variabilní oblast lehkého řetězce kodovanou sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 15.

V jiném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu obsahující těžký řetězec kodovaný sekvencí

nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 13 a obsahující lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 15.

Nejvýhodnější je protilátkový protein obsahující těžký a lehký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 16. Uvedená sekvence zahrnuje vedoucí sekvenci klonovanou do vektoru N5KG1val.

V jiném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu obsahující těžký a lehký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 16 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleové kyseliny, fúzní molekula nebo chemický derivát. Protilátka BIWA4 obsahuje těžký a lehký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 16.

V jiném provedení vynálezu se popisuje molekula protilátky podle vynálezu obsahující těžký a lehký řetězec kodovaný sekvencí nukleové kyseliny definované v SEQ ID NO: 16. Tato sekvence kóduje celou protilátku BIWA4.

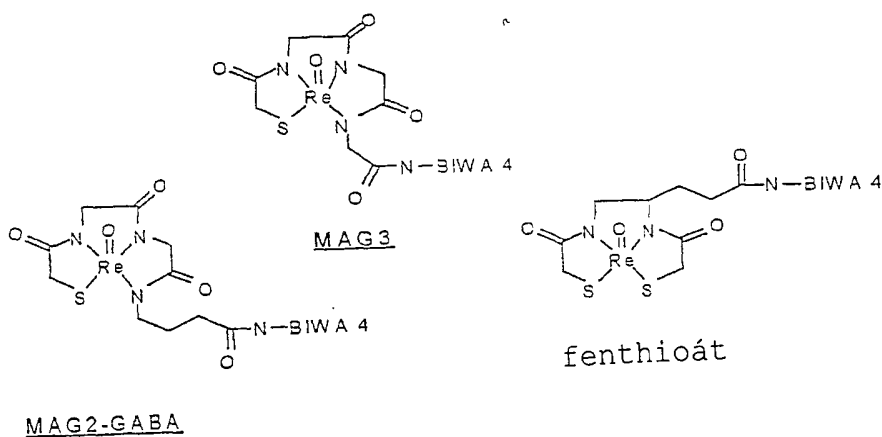
Protilátkové proteiny jsou vysoce specifický nástroj pro cílení terapeutických antigenů na antigen CD44v6. Vynález dále popisuje proteiny protilátek, kde uvedený protilátkový protein je konjugovaný s terapeutickým činidlem. Terapeutická činidla se vybrala ze skupiny zahrnující radioizotopy, toxiny, toxoidy, činidla způsobující záněty, enzymy, nesmyslné molekuly, peptidy, cytokiny a chemoterapeutická činidla. Jako terapeutická činidla se mohou využít radioizotopy zahrnující radioizotopy emitující záření gamma, beta a alfa. Jako terapeutické radioizotopy se preferují izotopy emitující beta záření. Prokázalo se, že jako zvláště použitelné izotopy emitující záření beta k dosažení lokalizovaného ozáření a destrukce maligních nádorových buněk je možné použít

$^{186}\text{rhenium}$, $^{188}\text{rhenium}$, $^{131}\text{jód}$ a $^{90}\text{yttrium}$. Radioizotopy vybrané ze skupiny obsahující $^{186}\text{rhenium}$, $^{188}\text{rhenium}$, $^{131}\text{jód}$ a $^{90}\text{yttrium}$ jsou zvláště výhodné jako terapeutická činidla konjugovaná s proteiny protilátek podle vynálezu. Může se například použít radioaktivní značení protilátky jódem, jak se popisuje v patentovém dokumentu WO 93/05804.

Vynález dále popisuje protein protilátky, kde uvedené terapeutické činidlo se vybralo ze skupiny zahrnující radioizotopy, toxiny, toxoidy, pro-léky a chemoterapeutická činidla.

Výhodné provedení vynálezu popisuje protein protilátky, kde uvedené terapeutické činidlo je spojeno s proteinem protilátky prostřednictvím linkeru vybraného ze skupiny obsahující MAG-3 (popisuje se v americkém patentovém dokumentu č. 5082930 A, v EP 0247866B1 (strana 2, řádek 55 až 56 až strana 3, řádky 1 až 23)), MAG-2 GABA (popisuje se v americkém patentovém dokumentu č. 5681927 A a v EP 0284071 B1 (stránka 6, řádky 9 až 29)) a N2S2 ((jede o fenthioát), popisuje se v americkém patentovém dokumentu č. 4897255 A, č. 5242679 A, v EP 0188256 B1 (strana 2, řádky 38, až strana 3, řádky 18)).

Vzorce uvedených linkerů jsou následující:



Vynález dále popisuje protein protilátky podle vynálezu, kde uvedené terapeutické činidlo je spojené s proteinem protilátky prostřednictvím MAG-2 GABA.

Výhodnou předmětnou věcí vynálezu je protilátkový protein, kde uvedený radioizotop emituje beta záření.

Výhodnou předmětnou věcí vynálezu je protilátkový protein, kde uvedený radioizotop se vybral ze skupiny zahrnující ¹⁸⁶rhenium, ¹⁸⁸rhenium, ¹³¹jód a ⁹⁰yttrium.

Výhodnou předmětnou věcí vynálezu je protilátkový protein, kde uvedeným radioizotopem je ¹⁸⁶rhenium.

Vynález dále popisuje protilátkové proteiny charakterizované tím, že jsou značené. Taková značená protilátka specifická pro CD44v6 umožňuje lokalizaci a/nebo detekci antigenu CD44v6 *in vitro* a/nebo *in vivo*. Značka se definuje jako marker, který je možné detekovat přímo nebo nepřímo. Nepřímo detekovatelný marker znamená, že není možné detekovat samotný marker, ale potřebuje další přímo detekovatelný marker specifický pro nepřímý marker. Výhodné značky pro využití vynálezu v praxi jsou detekovatelné markery. Detekovatelné markery se vybraly ze skupiny zahrnující enzymy, barviva, radioizotopy, digoxigenin a biotin.

Vynález dále popisuje protilátkový protein charakterizovaný tím, že je značený. Výhodný je protilátkový protein podle vynálezu, kde uvedená značka je detekovatelný marker. Výhodnější je protilátkový protein, kde detekovatelný marker se vybral ze skupiny obsahující enzymy, barviva, radioizotopy, digoxigenin a biotin.

Dále vynález popisuje popisuje protilátkové proteiny charakterizované tím, že jsou konjugovány zobrazitelným činidlem. V oboru je dostupné velké množství zobrazitelných

činidel, zvláště radioizotopů. V případě zavedení vynálezu do praxe jsou výhodné izotopy emitující gamma záření. Nejvýhodnější je $^{125}\text{jód}$.

Vynález dále popisuje protilátkový protein konjugovaný s radioizotopem, jak se popisuje shora v textu, kde protilátkový protein vykazuje specifickou aktivitu přibližně od 0,5 do 15 mCi/mg nebo od 0,5 do přibližně 14 mCi/mg, s výhodou přibližně od 1 do 10 mCi/mg, s výhodou přibližně od 2 do 6 mCi/mg nebo od 1 do 3 mCi/mg.

Jiné výhodné provedení vynálezu je farmaceutický prostředek obsahující protilátku podle vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič nebo excipient.

Farmaceuticky přijatelný nosič může obsahovat fyziologicky přijatelné sloučeniny, které působí například tak, že stabilizují nebo zvyšují absorpci agonisty, antagonisty nebo modulátoru glutamátového receptoru AMPA. Takový fyziologicky přijatelná sloučenina zahrnuje například sacharidy, jako je glukóza, sacharóza nebo dextrany, antioxidanty, jako je kyselina askorbová nebo glutathionát, chelatační činidla, proteiny s nízkou molekulovou hmotností nebo jiné stabilizátory nebo excipienty (popisuje se také například v publikaci Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), 18 th ed., Mack Publ. Easton). Pro odborníka je zřejmé, že volba farmaceuticky přijatelného nosiče, který zahrnuje fyziologicky přijatelnou sloučeninu závisí například na způsobu aplikace prostředku.

V případě zvířecího nebo lidského těla může být výhodné aplikovat farmaceutické prostředky, jak se popisuje shora v textu prostřednictvím intravenózním nebo jiným způsobem, například systémově, lokálně nebo povrchově do tkáně nebo do orgánu v závislosti na typu a původu onemocnění nebo léčeného onemocnění, jako je například nádor. Systémový mód aplikace se

požaduje v případě, že léčbu vyžadují různé orgány nebo orgánové systémy, jako například systémové autoimunitní onemocnění nebo alergie nebo při transplantacích cizorodých orgánů nebo tkání nebo nádorů, které jsou difúzní nebo se těžko lokalizují. Lokální způsob působení se bude zvažovat, jestliže se zvažuje pouze lokální nádorové projevy nebo imunologické působení, jako jsou například lokální nádory.

Farmaceutické prostředky obsahující protilátkové proteiny se mohou aplikovat různými způsoby, které jsou dobře známy v oboru, jako je intravenózní injekce nebo přímá injekce do cílové tkáně. V případě systémové aplikace je výhodný intravenózní, intravaskulární, intramuskulární, intraarteriální, intraperitoneální, orální nebo intratekální způsob aplikace. Lokální aplikace se může provést subkutánně, intrakutánně, intrakardiálně, intralobulárně, intramedulárně, intrapulmonárně nebo přímo do léčené tkáně nebo blízko ní (konektivní, kostní, svalová, nervová, epiteliální tkáň). V závislosti na požadovaném trvání a účinnosti léčby se může farmaceutický prostředek aplikovat jednou nebo několikrát, také přerušovaně například denně po dobu několik dní, týdnů nebo měsíců a v různých dávkách. Při přípravě vhodných farmaceutických prostředků obsahujících protilátkové přípravky vhodné pro aplikaci, jak se popisuje shora v textu, odborník může použít známé fyziologicky přijatelné sterilní roztoky, které je možné zavést injekcí. Za účelem přípravy roztoku pro parenterální injekci nebo infúzi, jsou dostupné vodné izotonické roztoky, jako je například fyziologický roztok nebo odpovídající roztoky plazmových proteinů. Farmaceutické prostředky mohou být přítomné jako lyofylizáty nebo suché přípravky, které je možné přímo obnovit za použití známého injektovatelného roztoku přímo před použitím za sterilních podmínek. Tyto přípravky mohou být součástí sady. Konečný přípravek protilátkových prostředků podle vynálezu se může připravit smícháním čištěných protilátek podle vynálezu se

sterilním fyziologicky přijatelným roztokem, který je možné doplnit známým nosičem nebo/a aditivy (například sérum, albumin, dextróza, sulfit sodný, EDTA) a může se aplikovat injekcí, infúzí nebo perfúzí.

Množství aplikované protilátky závisí na podstatě onemocnění. U pacientů se zhoubným bujením se může aplikovat dávka samotné protilátky, která je obsažená ve farmaceutickém prostředku podle vynálezu, 0,1 až 100 mg/m², s výhodou 5 až 50 mg/m² při jedné aplikaci, s výhodou 10 mg/m² až 40 mg/m², s výhodou 10 mg/m² až 30 mg/m², také s výhodou 20 mg/m² až přibližně 30 mg/m² a nejvýhodněji přibližně 25 mg/m² povrchové plochy těla. Výhodná je také dávka protilátkového proteinu přibližně 50 mg/m² povrchové plochy těla.

Dávka radioaktivity aplikovaná pacientovi při jedné aplikaci musí být dostatečně vysoká, aby byla účinná, ale musí být nižší než je dávka mezní toxicity (DLT). V případech farmaceutických prostředků obsahujících radioaktivně značené protilátky, například ¹⁸⁶rhenium, se stanovila maximální tolerovaná dávka (MTD), která nesmí být při aplikaci překročena. Aplikace radioaktivně značené protilátky pacientovi se zhoubným bujením se může provést opakovaně (měsíčně nebo týdně) intravenózní infúzí dávky, která se pohybuje pod hodnotou MTD (popisuje se v publikaci Welt et al., (1994) J. Clin. Oncol. 12: 1193-1203). Výhodná je více násobná aplikace v obecném případě v týdenních intervalech, avšak radioaktivně značené materiály by se měly aplikovat v delších intervalech, to je 4 až 24 týdnů, s výhodou 12 až 20 týdnů. Odborník však může rozdělit aplikaci do dvou nebo více aplikací, které se mohou aplikovat v krátkých časových intervalech nebo v jiném předem stanoveném rozmezí intervalů, například od 1 dne do 1 týdne.

Aplikovaná dávka radioaktivity bude v souladu s pokyny uvedenými dále v textu. V obecném případě dávka radioaktivity při jedné aplikaci se bude pohybovat mezi 30 a 75 mCi/m² povrchové plochy těla (BSA). Množství radioaktivně značené protilátky ve farmaceutickém prostředku podle vynálezu s výhodou značeném s ¹⁸⁶rheniem, ¹⁸⁸rheniem, ¹³¹jódem, ^{99m}techneciem a ⁹⁰yttriem, s výhodou značeným s ¹⁸⁶rheniem aplikované pacientovi je 10, 20, 30, 40, 50 nebo 60 mCi/m², s výhodou 50 mCi/m². Ve výhodném provedení vynálezu se popisuje farmaceutický prostředek, kde dávka uvedené radioaktivně značené protilátky podle vynálezu je MTD, s výhodou 50 mCi/m². Což je uvedeno v klinické studii a popisuje se v příkladech 3 až 6.

Výhodný je také farmaceutický prostředek podle vynálezu obsahující protilátkový protein konjugovaný s radioizotopem podle vynálezu, jak se definuje shora v textu, přičemž protilátkový protein vykazuje specifickou aktivitu od přibližně 0,5 do 15 mCi/mg nebo od 0,5 do 14 mCi/mg, s výhodou přibližně od 1 do 10 mCi/mg, s výhodou od 1 do 5 mCi/mg a nejvýhodněji od 2 do 6 mCi/mg nebo od 1 do 3 mCi/mg.

Výhodný je také farmaceutický prostředek podle vynálezu obsahující protilátkový protein konjugovaný s radioizotopem podle vynálezu, jak se definuje shora v textu, kde uvedená protilátka nebo její derivát je ve vodném roztoku při pH od 7 do 8 a v koncentraci od 0,5 do 2 mg/ml.

Výhodné provedení vynálezu je farmaceutický prostředek podle vynálezu, který dále obsahuje jeden nebo více činidel chránících radioaktivitu vybraných ze skupiny zahrnující kyselinu askorbovou, gentisovou, „reductic“, „erythrorbic, p-aminobenzoovou, 4-hydroxybenzoovou, nikotinovou, nikotinamid, 2,5-dihydroxy-1,4-benzendisulfonovou, povidon, inositol a/nebo citrát.

Výhodný je farmaceutický prostředek podle vynálezu, kde činidlo chránící radioaktivitu je kyselina askorbová.

V jiném výhodném provedení vynálezu se popisuje farmaceutický prostředek, kde uvedený protilátkový protein obsahuje molekulu protilátky vybrané ze skupiny obsahující molekuly protilátek BIWA4 nebo BIWA8, jak se popisuje shora v textu, spojených s ¹⁸⁶rheniem prostřednictvím MAG-2 GABA a dále obsahuje činidlo chránící radioaktivitu, což je kyselina askorbová.

Jiné výhodné provedení vynálezu popisuje použití protilátkového proteinu podle vynálezu při výrobě léčebného prostředku pro léčbu zhoubného bujení. Ve výhodném provedení vynálezu se popisuje použití protilátkových proteinů podle vynálezu konjugovaných s terapeutickým činidlem, jak se popisuje shora v textu při léčbě zhoubného bujení. Zhoubné bujení zahrnuje libovolné onemocnění spojené s maligním růstem, jako jsou pevné nádory, sarkomy a leukemie. Nezbytným předpokladem takového onemocnění je exprese CD44v6.

Zhoubné bujení podle vynálezu zahrnuje, ale není omezeno na:

- 1) Léčba epiteliálních karcinomů, které zahrnují karcinom prsu, plic, kolorektální karcinom, karcinom v oblasti hlavy a krku, pankreatický karcinom, karcinom vaječníků, močového měchýře, zažívacího traktu, kůže, endometria, testikulární karcinom, ezofageální karcinom, karcinom prostaty a ledvin.
- 2) Sarkomy kostí a měkké tkáně: osteosarkom, chondrosarkom, fibrosarkom, maligní fibrózní histiocytem (MFH), leiomyosarkom.
- 3) Hematopoietické zhoubné bujení: Hodgkinův lymfom, lymfom, který je jiný než Hodgkinův, leukémie.

- 4) Neuroektodermální nádory: nádory periferních nervů, astrocytomy, melanomy.
- 5) Mezotheliomy.

Příklady stádií nádorových onemocnění asociovaných s pevnými nádory zahrnují, ale nejsou omezeny na kolorektální karcinom, karcinom plic, který není karcinomem z malých buněk, karcinom prsu, karcinom oblasti hlavy a krku, karcinom vaječníků, karcinom plic, karcinom močového měchýře, pankreatický karcinom a metastázující karcinomy mozku.

Výhodné je také použití protilátkového proteinu podle vynálezu, jak se definuje shora v textu při výrobě léčebného prostředku pro léčbu zhoubného bujení, kde množství protilátkového proteinu při jedné aplikaci je 0,1 až 100 mg/m², s výhodou 5 až 50 mg/m², s výhodou 10 mg/m² až 40 mg/m², s výhodou 10 mg/m² až 30 mg/m², také s výhodou 20 mg/m² až 30 mg/m² a nejvýhodnější je přibližně 25 mg/m² povrchové plochy těla. Výhodné je, když dávka proteinu protilátky je přibližně 50 mg/m² povrchové plochy těla.

Výhodné je také použití protilátkového proteinu konjugovaného s radioizotopy podle vynálezu, jak se definuje shora v textu, při výrobě léčebného prostředku pro léčbu zhoubného bujení, kde dávka radioaktivity na jednu dávku je 30 až 75 mCi/m² povrchové plochy těla (BSA). Výhodné je použití protilátkového proteinu konjugovaného s radioizotopem podle vynálezu, jak se definuje shora v textu při výrobě léčebného prostředku pro léčbu zhoubného bujení, kde protilátkový protein podle vynálezu je značen radioaktivně s ¹⁸⁶rheniem, ¹⁸⁸rheniem, ¹³¹jódem, ^{99m}techneciem a ⁹⁰yttriem. Nejvýhodnější je značení ¹⁸⁶rheniem. Jiné výhodné provedení vynálezu popisuje použití protilátkového proteinu konjugovaného s radioizotopem podle vynálezu, jak se definuje shora v textu při výrobě léčebného prostředku pro léčbu zhoubného bujení, kde dávka

protilátky je 10, 20, 30, 40, 50 nebo 60 mCi/m², s výhodou 50 mCi/m². Což je uvedeno v klinické studii a popisuje se v příkladech 3 až 6.

Výhodné také je použití protilátkového proteinu konjugovaného s radioizotopem podle vynálezu, jak se definuje shora v textu při výrobě léčebného prostředku pro léčbu zhoubného bujení, kde protilátkový protein vykazuje specifickou aktivitu od 0,5 do 15 mCi/mg nebo 0,5 až 14 mCi/mg, s výhodou přibližně 1 až 10 mCi/mg, s výhodou 1 až 5 mCi/mg a nejvýhodnější je specifická aktivita 2 až 6 mCi/mg nebo 1 až 3 mCi/mg.

Výhodné je také použití protilátkového proteinu konjugovaného s radioizotopem podle vynálezu, jak se definuje shora v textu při výrobě léčebného prostředku pro léčbu zhoubného bujení, kde uvedená protilátka nebo její derivát je ve vodném roztoku při hodnotě pH od 7 do 8 a koncentrace se pohybuje od 0,5 do 2,0 mg/ml.

Vynález dále popisuje způsob léčby zhoubného bujení, kde protilátkový protein podle vynálezu se aplikuje v rozsahu jedné dávky až několikrát jedinci, který to potřebuje, přičemž uvedený protilátkový protein se selektivně váže na CD44v6, ničí nádorové buňky prostřednictvím terapeutického činidla spojeného s protilátkovým proteinem a zaznamenává se úspěch terapie. Uvedený protilátkový protein může být přítomen jako nahý/neupravený protilátkový protein, upravený protilátkový protein, jako je například fúzní protein nebo protilátkový protein konjugovaný s terapeutickým činidlem, který zahrnuje kontakt nádoru s účinným množstvím uvedených protilátek. Způsob léčby nádorů, jak se popisuje shora v textu může být účinný *in vitro* nebo *in vivo*. Termín „karcinom“ znamená libovolné zhoubné bujení popsané shora v textu.

Množství aplikované protilátky závisí na podstatě onemocnění. U pacientů se zhoubným bujením se může aplikovat dávka samotné protilátky 0,1 až 100 mg/m², s výhodou 5 až 50 mg/m² při jedné aplikaci, s výhodou 10 mg/m² až 40 mg/m², s výhodou 10 mg/m² až 30 mg/m², také s výhodou 20 mg/m² až přibližně 30 mg/m² a nejvýhodněji přibližně 25 mg/m² povrchové plochy těla. Výhodná je také dávka protilátkového proteinu přibližně 50 mg/m² povrchové plochy těla.

Dávka radioaktivity aplikovaná pacientovi při jedné aplikaci musí být dostatečně vysoká, aby byla účinná, ale musí být nižší než je dávka mezní toxicity (DLT). V případě farmaceutických prostředků obsahujících radioaktivně značené protilátky, například ¹⁸⁶rhenium, se stanovila maximálně tolerovaná dávka (MTD), která nesmí být při aplikaci překročena. Aplikace radioaktivně značené protilátky pacientovi se zhoubným bujením se může provést opakovaně (měsíčně nebo týdně) intravenózní infúzí dávky, které se pohybuje pod hodnotou MTD (popisuje se v publikaci Welt et al., (1994) J. Clin. Oncol. 12: 1193-1203). Výhodná je vícenásobná aplikace v obecném případě v týdenních intervalech, avšak radioaktivně značené materiály by se měly aplikovat v delších intervalech, to je 4 až 24 týdnů, s výhodou 12 až 20 týdnů. Odborník však může rozdělit aplikaci do dvou nebo více aplikací, které se mohou aplikovat v krátkých časových intervalech nebo v jiném předem stanoveném rozmezí intervalů, například od 1 dne do 1 týdne.

Aplikovaná dávka radioaktivity bude v souladu s pokyny uvedenými dále v textu. V obecném případě dávka radioaktivity při jedné aplikaci se bude pohybovat mezi 30 a 75 mCi/m² povrchové plochy těla (BSA). Množství radioaktivně značené protilátky ve farmaceutickém prostředku podle vynálezu s výhodou značeném s ¹⁸⁶rheniem, ¹⁸⁸rheniem, ¹³¹jódem, ^{99m}techneciem a ⁹⁰yttriem, s výhodou značeným s ¹⁸⁶rheniem

aplikované pacientovi je 10, 20, 30, 40, 50 nebo 60 mCi/m², s výhodou 50 mCi/m². Ve výhodném provedení vynálezu se popisuje farmaceutický prostředek, kde dávka uvedené radioaktivně značené protilátky podle vynálezu je MTD, s výhodou 50 mCi/m². Což je uvedeno v klinické studii a popisuje se v příkladech 3 až 6.

Výhodný je také způsob léčby zhoubného bujení podle vynálezu (popisuje se shora v textu), kde protilátkový protein konjugovaný s radioizotopem podle vynálezu vykazuje specifickou aktivitu od 0,5 do 15 mCi/mg nebo 0,5 až 14 mCi/mg, s výhodou přibližně 1 až 10 mCi/mg, s výhodou 1 až 5 mCi/mg a nejvýhodnější je specifická aktivita 2 až 6 mCi/mg nebo 1 až 3 mCi/mg.

Výhodná je také léčba zhoubného bujení podle vynálezu (popisuje se shora v textu), kde protilátkový protein konjugovaný s radioizotopem podle vynálezu, jak se definuje shora v textu je vodném roztoku při pH od 7 do 8 a v koncentraci od 0,5 do 2,0 mg/ml.

Vynález dále popisuje způsob podle vynálezu, kde nádorem je nádor vybraný se skupiny zahrnující kolorektální karcinom, karcinom plic, který není karcinomem z malých buněk, karcinom prsu, karcinom oblasti hlavy a krku, karcinom vaječníků, karcinom plic, karcinom močového měchýře, pankreatický karcinom a metastázující karcinomy mozku.

Další předmětnou věcí vynálezu je nukleová kyselina charakterizovaná tím, že kóduje protilátkový protein podle vynálezu. Uvedenou nukleovou kyselinou může být RNA nebo s výhodou DNA. Uvedená molekula DNA se může syntetizovat chemicky. Nejdříve je možné syntetizovat vhodné oligonukleotidy metodami podle vynálezu (popisuje se například v publikaci Gait, M. J., 1984, Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach. IRL Press, Oxford, UK), které se mohou

použít k produkci syntetického genu. Způsoby vytváření syntetických genů jsou dobře známy v oboru (popisuje se například v publikaci Stemmer et al., 1995, Single-step assembly od a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides, Gene 164(1): 49-53, Ye et al., 1992, Gene synthesis and expression in *E. coli* for pump, a human matrix metalloproteinase, Biochem Biophys Res Commun 186(1):143-9, Hayden et Mandecki, 1988, Gene synthesis by serial cloning of oligonucleotides, DNA 7(8): 571-7). Tyto metody je možné použít při syntéze libovolné popsané molekuly DNA, jako je například DNA kódující BIWA4.

Nukleová kyselina podle vynálezu je s výhodou charakterizovaná tím, že obsahuje 5'nebo 3' a 3'nepřekládané oblasti. Nukleová kyselina podle vynálezu může obsahovat jiné nepřekládané oblasti po směru a/nebo proti směru exprese. Nepřekládaná oblast může obsahovat regulační element, jako je například iniciační jednotka transkripce (promotor) nebo zesilovač. Uvedený promotor může například být konstitutivní, indukovatelný nebo vývojem řízený promotor. Bez vyjmenovávání jiných známých promotorů, je možné použít konstitutivní promotory lidského cytomegaloviru (CMV) a viru Rousova sarkomu (RSV) stejně jako opičího viru 40 (SV40) a promotor viru Herpes simplex. Indukovatelné promotory podle vynálezu obsahují promotory rezistence na antibiotika, promotory teplotního šoku, promotor viru karcinomu prsní žlázy, který je možné indukovat hormonem, a metalothioneinu. Výhodná je podle vynálezu nukleová kyselina charakterizovaná tím, že kóduje fragment protilátkového proteinu podle vynálezu. To odpovídá části polypeptidu podle vynálezu.

Nukleovou kyselinou podle vynálezu je nukleová kyselina popsaná v SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15 a/nebo 16. Nejvýhodnější nukleovou kyselinou je nukleová kyselina popsaná v SEQ ID NO: 16.

Vynález dále popisuje rekombinantní DNA vektor charakterizovaný tím, že obsahuje nukleovou kyselinu podle vynálezu. Uvedený vektor s výhodou obsahuje nukleovou kyselinu charakterizovanou v SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15 a/nebo 16. Nejvýhodnější je, když uvedený vektor obsahuje nukleovou kyselinu charakterizovanou v SEQ ID NO: 16.

Příklady jsou virové vektory, jako je vakcinie, Semliki-Forest virus a adenovirus. Vektory vhodné pro použití v buňkách COS mají počátek replikace SV40, což umožňuje dosáhnout vysokého počtu kopií plazmidů. Vektory vhodné pro použití v hmyzích buňkách jsou například transferové vektory *E. coli* a obsahují například DNA kódující polyhedrin jako promotor.

Dále vynález popisuje rekombinantní DNA vektor charakterizovaný tím, že je expresivním vektorem.

Dále vynález popisuje rekombinantní DNA vektor charakterizovaný tím, že je vektor pAD-CMV nebo jeho funkční derivát. Takovými deriváty jsou například pAD-CMV1, pAD-CMV19 nebo pAD-CMV25.

Dále vynález popisuje rekombinantní DNA vektor charakterizovaný tím, že jde o SEQ ID NO: 17 nebo její funkční derivát.

Dále vynález popisuje rekombinantní DNA vektor charakterizovaný tím, že jde o SEQ ID NO: 18 nebo její funkční derivát.

Uvedené vektory také s výhodou obsahují jednu nebo několik molekul nukleové kyseliny charakterizované v SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15 a/nebo 16.

Výhodný je také vektor popsany v americkém patentovém dokumentu č. 5648267 A nebo č. 5733779 A obsahující

nukleotidovou sekvenci podle vynálezu. Uvedený vektor s výhodou obsahuje jednu nebo několik molekul nukleových kyselin charakterizovaných v SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15 a/nebo 16. Dále vynález popisuje rekombinantní DNA vektor charakterizovaný tím, že jde o vektor N5KG1Val nebo jeho derivát.

Dále vynález popisuje hostitele charakterizovaného tím, že obsahuje vektor podle vynálezu.

Dále vynález popisuje hostitele charakterizovaného tím, že jde o eukaryontní hostitelskou buňku. Eukaryontní hostitelské buňky podle vynálezu zahrnují plísně, jako je *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosacharomyces*, *Trichoderma*, hmyzí buňky (které pocházejí například z *Spodoptera frugiperda* Sf-9, s bakulovirovým expresivním systémem), rostlinné buňky, například z *Nicotiana tabacum*, savčí buňky, například buňky COS, BHK, CHO nebo buňky myelomu. U potomků buněk imunitního systému, kde se také v těle člověka tvoří proteiny protilátek podle vynálezu, jsou proteiny protilátek zvláště dobře baleny a glykosylovány. Výhodné jsou savčí hostitelské buňky, s výhodou CHO nebo COS, například CHO DG44 (popisuje se v publikaci Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77(7): 4216-20 (1980)) nebo buňky CHO-K1 (ATCC CCL-61). Dále vynález popisuje hostitele charakterizovaného tím, že jím jsou buňky BHK, CHO nebo COS. Nejvýhodnější jsou buňky CHO G44 nebo CHO-K1 (ATCC CCL-61).

Dále vynález popisuje výhodného hostitele, kterým je bakteriofág.

Jinou předmětnou věcí vynálezu je hostitel charakterizovaný tím, že jde o prokaryontní hostitelskou buňku. Příklady prokaryontních hostitelských buněk jsou *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* nebo *Proteus mirabilis*.

Vynález dále popisuje způsob přípravy proteinu protilátky charakterizovaný tím, že obsahuje následující kroky: hostitel podle vynálezu se kultivuje za podmínek, při kterých uvedená hostitelská buňka exprimuje uvedený protilátkový protein, který je dále izolován. Protilátka podle vynálezu se může produkovat následujícím způsobem. Molekula nukleové kyseliny kódující lehký řetězec a těžký řetězec se může syntetizovat chemicky a enzymaticky za použití standardních metod. Vhodné oligonukleotidy se mohou syntetizovat za pomoci metod, které jsou dobře známy v oboru (detaily se popisují shora v textu). Způsoby vytvoření syntetických genů z oligonukleotidů jsou dobře známy v oboru (detaily se popisují shora v textu). Tyto molekuly nukleových kyselin kódující těžký a lehký řetězec protilátky se mohou klonovat do expresivního vektoru (buď oba řetězce do jedné molekuly vektoru nebo každý řetězec do samostatné molekuly vektoru), které se pak zavedou do hostitelské buňky. Hostitelskou buňkou je s výhodou savčí hostitelská buňka (detaily se popisují shora v textu), například COS, CHO nebo BHK, s výhodou buňky vaječníků čínských křečků (CHO). Hostitelská buňka se pak kultivuje ve vhodném kultivačním médiu za podmínek, kdy dochází k produkci protilátky a protilátka se pak izoluje z kultury za použití standardních postupů. Postupy pro produkci protilátek z rekombinantní DNA v hostitelských buňkách a respektive expresivních vektorů jsou dobře známy v oboru (popisuje se například v patentovém dokumentu WO 94/11523, WO 97/9351, EP 0481790).

Vynález popisuje způsob charakterizovaný tím, že uvedenou hostitelskou buňkou je savčí buňka, s výhodou buňka CHO nebo COS.

Vynález s výhodou popisuje způsob charakterizovaný tím, že hostitelská buňka se transfekuje společně se dvěma plazmidy, které nesou expresivní jednotky pro lehký a těžký řetězec.

Přehled obrázků na výkrese

Na Obr. 1 je zobrazeno hodnocení relativní vazebné afinity testované testem ELISA za použití kompetitivních buněk. IC50 se definuje jako koncentrace cMAb a hMAb, při kterém navázání mMAb BIWA 1 na zachycené buňky A431 se redukuje na 50 %. Indikovaly se hodnoty IC50 vztažené na BIWA 2.

Na Obr. 2 je zobrazena biologická distribuce monoklonálních protilátek specifických pro CD44v6 značených ^{125}I a ^{131}I , které se společně aplikovaly injekcí myším, které nesou xenoimplantát HNX-OE, 3 nebo 4 dni po infúzi. Třem skupinám myši se aplikovaly buď

- (A) ^{131}I -U36 (černé sloupce) a ^{125}I -BIWA 1 (šrafované sloupce) (n=5),
- (B) ^{131}I -BIWA 4 (černé sloupce) a ^{125}I -BIWA 2 (šrafované sloupce) (n=6) nebo
- (C) ^{131}I -BIWA 4 (černé sloupce) a ^{125}I -BIWA 8 (šrafované sloupce) (n=6)

3 dni (A) nebo 4 dni (B,C) po infúzi se myším odebral vzorek krve, usmrtily se a provedla se pitva a stanovil se stupeň radioaktivity (%ID/g $\pm$ exponenciálně vyrovnaný průměr) nádoru, krve a orgánů (význam zkratek: Tum: nádor, Liv: játra, Spl: slezina, Kid: ledviny, Hrt: srdce, Stm: žaludek, Ilm: ileum, Cln: střevo, Blr: močový měchýř, Str: sternum, Msc: sval, Lng: plíce, Skn: kůže, Tng: jazyk).

Na Obr. 3 je zobrazena účinnost terapie monoklonálních protilátek specifických pro CD44v6 značených ^{186}Re u nahé myši nesoucí xenoimplantát HNX-OE. Myši se aplikovalo 300 μCi ^{186}Re -U36 (- ✱ -, Obr. A), 300 μCi ^{186}Re -BIWA 1 (- ✱ -, Obr. A), 300 μCi ^{186}Re -BIWA 4 (- ✱ -, Obr. B), 300 μCi ^{186}Re -BIWA 2 (- ✱ -, Obr. B), 400 μCi ^{186}Re -BIWA 4 (- ✱ -, Obr. C), 400 μCi ^{186}Re -BIWA 8 (- ✱ -, Obr. C) nebo fyziologický roztok (- ✱ -, Obr. A, B, C), který slouží jako kontrola. Kontrolní skupiny na Obr. A a B jsou

stejně. Velikost nádoru se vyjadřuje jako průměrná hodnota objemu nádoru ($\pm$ exponenciálně vyrovnaný průměr) během léčby vztaženo k průměrné hodnotě objemu nádoru na začátku léčby.

Obr. 4 zobrazuje vztah mezi aplikovanou dávkou monoklonální protilátky a hodnotou AUC pozorovanou po intravenózní infúzi BIWA 4 10 pacientům v části A uvedené studie.

Obr. 5 popisuje vztah mezi aplikovanou dávkou monoklonální protilátky a maximální koncentrací BIWA 4 v plazmě pozorované po následující intravenózní infúzi BIWA 4 10 pacientům ve studii v části A.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Radioimunoterapie

Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky BIWA 1 s názvem VFF 18 (které vylučují buněčné linie hybridoma uložené 7.6.1994 s přístupovým číslem DSM ACC2174 v instituci Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Německo, popisuje se v patentovém dokumentu WO 95/33771) se vytvořily imunizací myši Balb/c s fúzním proteinem glutathion S-tranferázy, který obsahuje domény v3-V10 lidského CD44 (popisuje se v publikaci Heider KH, Sproll M, Patzelt E, Beaumier P, Ostermann O, Ahorn H, Adolf GRA. Characterization of a high affinity monoclonal antibody specific for CDD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas. Cancer Immunology Immunotherapy 43: 245-253, 1996)). Zmapoval se epitop rozeznávaný protilátkou BIWA 1, jde o aminokyseliny 360 až 370 v doméně v6 genu CD44 (číslování aminokyselin se provádí podle publikace Kugelman, L.C., Gangluly, S., Haggerty, J.G., Weisman, S.M. and Milstone, L.M. The coreprotein of epican, a heparan sulfate

proteoglycan on keratinocytes, is an alternative form of CD44. *J. Invest. dermatol.*, 99: 886-891, 1992). Dávkování používané v této studii se získalo po čištění na protein-G-sefaroze a dialýzou proti PBS.

Monoklonální protilátky U36 (IgG1) se získaly po imunizaci myší HNSCC buněčnou linií UM-SCC-22B a tyto protilátky rozeznávají odlišný epitop v CD44v6 ve srovnání s protilátkou BIWA 1. Monoklonální protilátka U36 se izolovala z koncentrovaného supernatantu tkáňových kultur afinitní chromatografií na protein-A-sefaroze a dále na Q-sefaroze.

Tvorba chimerických a humanizovaných monoklonálních protilátek

mRNA se izolovala z buněčné linie hybridomu protilátky BIWA 1 použitím sady QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia, Uppsala, Švédsko). cDNA z variabilního těžkého (V_H) a lehkého (V_L) řetězce se vytvořila použitím RT-PCR.

Fragmenty se klonovaly do TA klonovacího vektoru pCRII (od firmy Invitrogen, Groningen, Nizozemí) a sekvenovaly se. Zkonstruovaly se dva expresivní vektory získané z plazmidu pAD CMV1 (popisuje se v publikaci Himmeler, A., Maurer-Fogy, I., Kronke, M., Schurich, P., Pfizenmaier, K., Lantz, M., Olsson, I., Hauptmann, R., Stratowa, C., and 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) nesoucí konstantní oblast lidského gamma-1 a konstantní oblast lidského lehkého řetězce kappa. Následně fragmenty V_H a V_L protilátky BIWA 1 se klonovaly do odpovídajících expresivních vektorů před konstantní oblastí. Chimerická protilátka se pojmenovala cMAb BIWA 2. Humanizované verze variabilních oblastí lehkého a těžkého řetězce protilátky BIWA 1 (vytvořené zavedením CDR) se klonovaly před konstantní oblastí imunoglobulinu shora v textu uvedených expresivních vektorů.

Za účelem konstrukce humanizovaných protilátek se používané lidské variabilní oblasti získaly z těžkého řetězce lidského imunoglobulinového fragmentu s přístupovým číslem S31669 uloženého v databance GenPept a v případě lehkého řetězce z lidského imunoglobulinu HUMIGKAX (upravený kappa řetězec proti myelinu), přístupové číslo uložení v Genbank je M29469. Výsledné monoklonální protilátky nazvané hMAb BIWA 4 a BIWA 8 respektive BIWA 8 obsahovaly dvě aminokyseliny myši původní protilátky v základní struktuře 2 lehkého řetězce, zatímco protilátka BIWA 4 neobsahovala v základní struktuře žádné myši zbytky.

Rekombinantní monoklonální protilátky se stabilně exprimovaly v buňkách vaječníků čínských křečků, které jsou deficitní v produkci dihydrofolátové reduktázy a do kterých se elektroporací zavedly plazmidy exprimující těžký a lehký řetězec. Buňky se pak nanosly na mikrotitrační destičky obsahující 96 prohlubní v hustotě 500 a 100 buněk do jedné prohlubně do selekčního kultivačního média (kterým je α -MEM s 10 % dialyzovaným fetálním telecím sérem). Když se kolonie zviditelní (po přibližně 14-ti dnech), v supernatantech kultur se stanovil obsah IgG pomocí testu ELISA a buňky s nejlepším výsledkem se pomnožily. Amplifikace genu se provedla kultivací v přítomnosti zvýšené koncentrace metotrexátu (20 až 500 nM).

Příprava chimerických a humanizovaných monoklonálních protilátek v laboratorním měřítku se uskutečnila ve standardním kultivačním médiu, který obsahuje 1 % fetálního telecího séra. Frakce IgG se izolovaly ze supernatantů tkáňových kultur afinitní chromatografií na sefaroze s proteinem A. Čistota se testovala pomocí SDS-PAGE a vysoko výkonnou chromatografií s exkluzí podle velikosti molekul.

Hodnocení afinity protilátek

Měření kinetických a afinitních konstant za použití rekombinantního antigenu se provedlo za použití systému BIAcore 2000 (BIAcore AB, Uppsala, Švédsko). Fúzní protein glutathion-S-transferáza obsahující domény v3-v10 lidského CD44 (GST/CD44v3-v10, v koncentraci 20 µg/ml) se imobilizovaly na senzorovém čipu CM5 způsobem spojování aminů podle instrukcí výrobce, kdy se jako interakční pufr používá 10 mM acetátu sodného s hodnotou pH 5,0. 35 µl monoklonální protilátky v různých koncentracích (8 až 67 nM) v HBS (10 mM HEPES, pH7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,05 % BIAcore povrchově aktivní činidlo P20) se injekcí nanoslo na povrch pokrytý antigenem při hodnotě průtoku 5 µl/min. Disociace monoklonálních protilátek se stanovovala po dobu 5 minut v průtoku pufru (HBS). Mezi dvěma analýzami se povrch čipu regeneroval jedním pulzem 15 µl 30 mM HCl. Analýza dat a výpočet kinetických konstant se provedl pomocí software BIAcore BIAevaluation, verze 2.1. Pro všechny protilátky se stanovila asociační (k_a) a disociační (k_d) rychlost a disociační konstanty (K_d).

Relativní vazebné afinity se také hodnotily testem ELISA s kompetitivními buňkami. Lidské buňky A431, které pocházejí z spinocelulárního karcinomu vulvy a jsou známy, že exprimují vysoké množství CD44v6 se nanosly na kultivační destičky s 96 prohlubněmi v kultivačním médiu RPMI 1640 s 10 % fetálním telecím sérem o objemu 200 µl do jedné prohlubně, přičemž hustota buněk je 2,5 až 5 x 10⁵ buněk/ml. Destičky se inkubovaly přes noc při teplotě 37 °C v huminidizovaném inkubátoru v atmosféře 5 % CO₂. Po odstranění kultivačního média se buňky promyly jednou v pufru PBS, fixovaly se 96 % etanolem po dobu 1 minuty a promyly se znovu pufrům PBS. cMAb BIWA2, hMAb BIWA 4 a hMAb BIWA 8 (ředěné na koncentraci 10 µg/ml) se aplikovaly v sériovém ředění 1:2 (8 kroků ředění) v objemu 100 µl do jedné prohlubně v PBS/0,5 % BSA/0,05 % Tween 20 (testovací pufr) a vše se inkubovalo po dobu 30 minut

při teplotě místnosti. Přidalo se 100 μ l ředěné monoklonální protilátky BIWA 1 (20 ng/ml) a destičky se inkubovaly po dobu 2 hodiny při teplotě místnosti na orbitální míchačce. Kontrolní vzorky obsahovaly pouze předem ředěné vzorky bez protilátky BIWA 1 (0 % kontrola) nebo pouze protilátku BIWA 1 bez žádných konkurenčních protilátek (100 % kontrola). Po tří násobném promytí pomocí pufru PBS/0,05 % Tween 20 (promývací pufr) se přidalo za účelem detekce protilátky BIWA1 100 μ l sekundární protilátky (kozí anti-myší Fc konjugovaný s peroxidázou v ředění 1:15 000 testovacího pufru, od firmy Dako, Kodaň, Dánsko) a destičky se inkubovaly po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti na orbitální míchačce. Po trojnásobném promytí promývacím pufrem se destičky nechaly vyvíjet pomocí roztoku substrátu tetrametylbenzidinu o objemu 100 μ l na jednu prohlubeň (Kierkegaard and Perry laboratories, Gaithersburg, USA). Reakce se zastavila po 15 minutách přidáním 50 μ l 1 M kyseliny fosforečné do každé prohlubně. Absorbance se měřila čtecím zařízením pro test ELISA při vlnové délce 450 nm (referenční vlnová délka je 610 až 690 nm).

Značení protilátek radioaktivním jódem

Značení protilátek radioaktivním jódem se provedlo v podstatě stejným způsobem, jak se popisuje v publikaci Haisma, H.J., Hilgers, J., and Zurawski, V.R. Jr. Iodination of monoclonal antibodies for diagnosis and therapy using a convenient one vial method. J. Nucl. Med., 27: 1890-1895, 1986 za použití buď ^{125}I (100 mCi/ml) nebo ^{131}I (200 mCi/ml) (oba radioaktivní prvky pocházejí od firmy Amersham, Aylesbury, Velká Británie). V jedné zkumavce potažené 75 μ g přípravku Iodogen (od firmy Pierce, Oud Bijerland, Nizozemí) se smíchal 1 mg monoklonální protilátky IgG rozpuštěné v 500 μ l PBS, pH7,4 a 1 mCi ^{125}I nebo ^{131}I . Po 5 minutách inkubace při teplotě místnosti se odstranil volný jód gelovou filtrací na koloně PD-10 (od firmy Pharmacia-LKB, Woerden, Nizozemí). Po

odstranění nevázaného ^{125}I nebo ^{131}I radiochemická čistota přesáhla 97%, jak se stanovilo postupy TLC a HPLC popsány dříve v textu v publikaci Van Gog, F.B., Brakenhoff, R.H., Snow, G.B., and Van Dongen, G. A. M. S. Rapid elimination of mouse/human chimeric monoclonal antibodies in nude mice. Cancer Immunol. Immunother., 44: 103-11, 1997b. Nedošlo k vytvoření žádných agregátů ani fragmentů, jak se stanovilo analýzou HPLC.

Příprava monoklonálních protilátek značených $^{186}\text{rheniem}$

Monoklonální protilátky značené $^{186}\text{rheniem}$ postupem zahrnujícím více kroků za použití chelátu S-benzoylmerkaptotriglycin (S-benzoyl-MAG3), jak se popisuje dříve v textu v publikaci Van Gog, F.B., Brakenhoff, R.H., Snow, G.B., and Van Dongen, G. A. M. S. Rapid elimination of mouse/human chimeric monoclonal antibodies in nude mice. Cancer Immunol. Immunother., 44: 103-11, 1997b. V tomto postupu syntéza na pevné fázi pro přípravu $^{186}\text{Re-MAG3}$ je následovaná esterifikací s 2,3,5,6-tetrafluorfenolem (TFP) a konjugací reaktivního esteru $^{186}\text{Re-MAG3-TFP}$ s monoklonální protilátkou. Po konjugaci monoklonální protilátky značené pomocí ^{186}Re došlo k její izolaci na koloně PD10. Po odstranění nevázaného ^{186}Re radiochemická čistota opět přesahuje 98%.

Vazebný test radioaktivně značených protilátek

In vitro vazebné charakteristiky značených monoklonálních protilátek používaných při studiu biodistribuce a terapie se stanovily imunoreaktivním testem v podstatě jak se popisuje v publikaci Van Gog, F.B., Brakenhoff, R.H., Snow, G.B., and Van Dongen, G. A. M. S. Rapid elimination of mouse/human chimeric monoclonal antibodies in nude mice. Cancer Immunol. Immunother., 44: 103-11, 1997b. Za účelem testování monoklonálních protilátek značených radioaktivním jódem a ^{186}Re se buňky UM-SCC-11B fixovaly 0,1 % glutaraldehydem. Buňky UM-

SCC-11B se získaly od Dr. T.E. Carey, University of Michigan, Ann Arbor, MI. Připravilo se pět sériových ředění (v rozsahu 5×10^6 až $3,1 \times 10^5$ buněk v jedné zkumavce) s 1% BSA v PBS. Za účelem stanovení nespecifického navázání se do druhé zkumavky obsahující nižší koncentraci buněk přidal nadbytek neznačené monoklonální protilátky IgG. Do každé zkumavky se přidalo IgG značené pomocí 10 000 cpm ^{125}I , ^{131}I nebo ^{186}Re a vzorky se inkubovaly přes noc při teplotě 4 °C. Buňky se izolovaly centrifugací a počítačem gamma se měřila radioaktivita peletu a supernatantu (LKB-Wallace 1282 CompuGamma, Kabi Pharmacia, Woerden, Nizozemí) a vypočítalo se procento vázané a volné radioaktivity. Data se graficky analyzovaly v upraveném Lineweaver-Burkově grafu a imunoreaktivita se stanovila lineární extrapolací za podmínek reprezentující nekonečný nadbytek antigenu.

Studie biodistribuce u nahých myši nesoucích HNSCC

V případě experimentů biodistribuce se použily nahé myši nesoucí subkutánně implantovaný lidský xenograft HNSCC (HNX-OE), jak se popisuje v publikaci Van Gog, F.B., Brakenhoff, R.H., Snow, G.B., and Van Dongen, G. A. M. S. Rapid elimination of mouse/human chimeric monoclonal antibodies in nude mice. *Cancer Immunol. Immunother.*, 44: 103-11, 1997b. Samice myši (Hsd: atymické nu/nu, 25 až 32 g, Harlan CPB, Zeist, Nizozemí), které byly v době experimentů 8 až 10 týdnů staré. Tři experimenty biodistribuce se provedly s myšima, které nesou jeden nebo dva nádory v rozmezí od 30 do 470 mm³. V prvním experimentu se monoklonální protilátky U36 značené ^{131}I s aktivitou 10 µCi (50 µg) zavedly injekcí současně s monoklonální protilátkou BIWA 1 značenou ^{125}I s aktivitou 10 µCi (50 µg) do myši nesoucí nádory o velikosti $133 \pm 28 \text{ mm}^3$ (n=20 myši, 37 nádorů). Ve druhém experimentu se hMAb BIWA 4 značená ^{131}I s intenzitou 10 µCi (50 µg) a cMAb BIWA 2 značená ^{125}I se společně zavedly injekcí do myši nesoucí nádory o

velikosti $167 \pm 31 \text{ mm}^2$ ($n=21$ myší, 32 nádorů). Ve třetím experimentu se hMAb BIWA 4 značená ^{131}I s intenzitou $10 \text{ } \mu\text{Ci}$ ($50 \text{ } \mu\text{g}$) a hMAb BIWA 8 značená ^{125}I se společně zavedly injekcí do myší nesoucí nádory o velikosti $130 \pm 21 \text{ mm}^2$ ($n=23$ myší, 40 nádorů). Konjugáty byly zavedeny intravenózní injekcí (iv) do objemu $100 \text{ } \mu\text{l}$ po ředění s $0,9\%$ NaCl. Aby se získala srovnatelná clearance krev/tělo společně zavedených monoklonálních protilátek, kombinovaly se pouze monoklonální protilátky s identickým myším nebo lidským izotypem. Dávka protilátek (celková dávka $100 \text{ } \mu\text{g}$ na jednu myš) se vybrala dostatečně vysoká, aby bránila rychlé eliminaci monoklonálních protilátek z krve, která je spojená s izotypem (popisuje se v publikaci Sharkey, R.M., Natale, A., Goldenberg, D. M., and Mattes, M.J. Rapid blood clearance of immunoglobulin G2a and immunoglobulin G2b in nude mice. *Cancer Res.*, 51: 3102-3107, 1991, Van Gog, F.B., Brakenhoff, R.H., Snow, G.B., and Van Dongen, G. A. M. S. Rapid elimination of mouse/human chimeric monoclonal antibodies in nude mice. *Cancer Immunol. Immunother.*, 44: 103-11, 1997b) a dostatečně nízká, aby se zabránilo saturaci antigenu v nádoru.

V určitém časovém bodě po infúzi se myš uvedla do anestezie, odebraly se vzorky krve, usmrtila se a provedla se disekce. Vedle nádorů se odstranily následující orgány: játra, slezina, ledviny, srdce, žaludek, ileum, střeva, močový měchýř, svaly, plíce, kůže a jazyk. Po zvážení se stanovila radioaktivita v nádorech, krvi a orgánech duálním počítačem izotopu gamma (LKB-Wallace 1282 CompuGamma) s automatickou korekcí pro ^{131}I -comptony při nastavení ^{125}I . Pohlčení radioaktivity do těchto tkání se vypočítalo jako procento injekcí zavedené dávky na jeden gram tkáně (%ID/g).

Do dne aplikace monoklonální látky se myši normálním způsobem přechovávaly za specifických podmínek bez patogenů, ve sterilních klecích v čisté místnosti, kde se řídí vlhkost a

teplota (klasifikace 2000 podle federálního standardu 209d). V den injekce se myš transportovala na oddělení „Radio Nuclide Center“ a za aseptických podmínek v boxu s laminárním prouděním se aplikovaly sterilní radioimunologické konjugáty.

Studie radioimunoterapie u nahých myší

Studie RIT provedená na zvířatech se uskutečnila za účelem porovnání terapeutické účinnosti s různými monoklonálními protilátkami značenými ^{186}Re . Imunoreaktivní frakce konjugátů vždy byly vyšší než 75 %. Tři terapeutické experimenty se provedly na myších, které nesou 1 nebo 2 HNX-OE nádory o velikosti 45 až 195 mm³. Dávky ^{186}Re se vybraly na úrovni maximální tolerovatelné dávky (MTD) (to je 400 μCi) nebo nižší (300 μCi). Stupeň MTD se definuje jako dávka vedoucí ke ztrátě 5 až 15 % tělesné hmotnosti. V prvním experimentu se myším aplikovala jediná intravenózní injekce obsahující buď 300 μCi (100 μg) monoklonální protilátky U36 značené ^{186}Re a 300 μCi (100 μg) monoklonální protilátky BIWA 1 značené ^{186}Re . Ve druhém experimentu se aplikovalo buď 300 μCi (100 μg) lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re nebo 400 μCi (100 μg) lidské monoklonální protilátky BIWA 8 značené ^{186}Re . Průměrný objem nádorů byl podobný ve všech experimentálních skupinách.

Experiment 1: ve skupině ošetřené myší monoklonální protilátkou U36 značenou ^{186}Re je velikost nádoru $95 \pm 34 \text{ mm}^3$ (n=7 myší, 12 nádorů), ve skupině ošetřené myší monoklonální protilátkou BIWA 1 značenou ^{186}Re je velikost nádoru je $91 \pm 15 \text{ mm}^3$ (n=7 myší, 12 nádorů) a v případě kontrolní skupiny ošetřené myší monoklonální protilátkou BIWA 1 značenou ^{186}Re je velikost nádoru je $99 \pm 54 \text{ mm}^3$ (n=6 myší, 12 nádorů).

Experiment 2: ve skupině ošetřené lidskou monoklonální protilátkou BIWA 4 značenou ^{186}Re je velikost nádoru $101 \pm 35 \text{ mm}^3$ (n=7 myší, 12 nádorů), ve skupině ošetřené cMab BIWA 2

značenou ^{186}Re je velikost nádoru je $92 \pm 43 \text{ mm}^3$ ($n=7$ myší, 12 nádorů) a v případě kontrolní skupiny byl postup stejný jako v experimentu 1.

Experiment 3: ve skupině ošetřené lidskou monoklonální protilátkou BIWA 4 značenou ^{186}Re je velikost nádoru $105 \text{ mm}^3 \pm 43 \text{ mm}^3$ ($n=8$ myší, 13 nádorů), ve skupině ošetřené lidskou monoklonální protilátkou BIWA 8 značenou ^{186}Re je velikost nádoru $100 \pm 42 \text{ mm}^3$ ($n=8$ myší, 13 nádorů) a v případě kontrolní skupiny je velikost nádoru $110 \pm 46 \text{ mm}^3$ ($n=7$ myší, 11 nádorů).

Během léčby se nádory měřily dvakrát týdně a vypočítaly se objemy nádorů vztahující se k objemu na počátku léčby. Toxicita se monitorovala měřením tělesné hmotnosti dvakrát týdně. Myš se usmrtila, když objem nádoru přesáhl hodnotu 1 000 mm^3 .

Statistika

Statisticky se analyzovaly rozdíly v pohlcení tkáně mezi jednotlivými monoklonálními injekcemi, které se zavedly společně. Statisticky se analyzovaly rozdíly průměrného objemu nádoru v různých RIT skupinách v každý časový bod pomocí Studentova t-testu.

Výsledky

Vazebné charakteristiky *in vitro* monoklonálních protilátek specifických pro CD44v6

Vazebné afinity pěti monoklonálních protilátek se analyzovaly za použití rekombinantního antigenu stejně jako lidské nádorové buněčné linie. Kinetické a afinitní konstanty se hodnotily povrchovou plasmonovou rezonancí za použití GST/CD44v3-v10 jako imobilizovaného antigenu. Tabulka č. 1 zobrazuje asociační (k_a), disociační (k_d) rychlosti a disociační konstanty (K_d). Myší monoklonální protilátka BIWA 1

a cMAb BIWA 2 obsahující identické variabilní oblasti mají podobné k_a , k_d a K_d a zobrazuje nejvyšší afinitu. Naopak myší monoklonální protilátka U36 a lidská monoklonální protilátka BIWA 4 mají nižší k_a a vyšší k_d , což vede ke znatelně nižším disociačním konstantám (faktory 35,0 a 10,5). Lidská monoklonální protilátka BIWA 8 obsahující myší zbytky v oblasti 2 základní struktury lehkého řetězce zobrazují znatelné snížení hodnoty k_d , což je výsledek zvýšené afinity.

protilátka	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d (M)	K_d vztaženo k myšimu BIWA 1
myší BIWA 1	$1,3 \times 10^5$	$4,2 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-10}$	1,0
myší U36	$1,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-8}$	35,0
chimerická 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

Relativní vazebné afinity cMAb a hMAb se také hodnotily pomocí testu ELISA s konkurenčními buňkami za použití lidských nádorových buněk A431 (Obr. 1). V souladu s měřením afinity vůči rekombinantnímu antigenu byla cMAb BIWA 2 nejúčinnější konkurent, pak následovaly lidské monoklonální protilátky BIWA 8 a BIWA 4. Podobné výsledky (nejsou zobrazeny) se získaly s dvěma dalšími lidskými buněčnými liniemi HNSCC (FaDu a LICR-LON-HN5).

Biodistribuce u nahých myší nesoucích HNSCC

Studie distribuce se provedly u nahých myši nesoucích xenograft HNX-OE. Dvě monoklonální protilátky s identickým myším nebo lidským izotypem se značily buď ^{125}I nebo ^{131}I a zavedly se společně injekcí (hodnota pro každou protilátku 50 μg , 10 μCi). Každý pár monoklonálních protilátek se vybral tak, aby došlo k postupnému snížení rozdílů afinit: monoklonální protilátka U36 vykazuje 35 násobně nižší afinitu než monoklonální protilátka BIWA 1 (experiment 1), lidská monoklonální protilátka BIWA 4 vykazuje 14-ti násobně nižší afinitu ve srovnání s cMab BIWA 2 (experiment 2) a lidská monoklonální protilátka BIWA 4 vykazuje 4 násobně nižší afinitu ve srovnání s BIWA 8 (experiment 3). Imunoreaktivní frakce všech monoklonálních protilátek značených jódem byly alespoň 74 % po extrapolaci (uvedeno v tabulce č. 2).

Tabulka č. 2: Imunoreaktivní frakce monoklonálních protilátek značených jódem určených navázáním na buňky UM-SCC-11B

experiment č.	protilátka	značení	navázání na 5×10^6 buněk (%)	navázání extrapolova- né ^a (%)
1	myši U36	^{131}I	59,7	87,4
	myši BIWA 1	^{125}I	91,1	91,1
2	humanizované BIWA 4	^{131}I	77,4	82,3
	chimerické BIWA 2	^{125}I	80,5	79,9
3	humanizované BIWA 4	^{131}I	77,3	74,5
	humanizované			

	BIWA 8	^{125}I	91,8	92,1
--	--------	------------------	------	------

^a Imunoreaktivita se stanovila lineární extrapolací na podmínky reprezentující nekonečný nadbytek antigenu: popisuje se v sekci Materiály a metody

Biodistribuce v experimentu 1 se stanovily v den 1, 2, 3 a 7 po infúzi. Biodistribuce v experimentech 2 a 3 se stanovily v den 1, 2, 4 a 7 dní po infúzi. Kalkulované průměry %ID/g nádoru a krve všech tří experimentů jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Množství monoklonálních protilátek specifických pro CD44v6 značených jódem v nádoru a krvi s různou afinitou aplikovaných společně injekcí myším nosoucím HNX-OE

		konjugát A (%ID/g)		konjugát B (%ID/g)		poměr konj. A:B	
exp.č.	doba po injekci	nádor	krev	nádor	krev	nádor	
1. Konj.A: ^{131}I mMAb U35 Konj.B: ^{125}I mMAb BIWA1	1 den	15,7	17,9	13,0	17,8	1,2	1,0
	2 dny	18,4	15,0	13,4	14,9	1,4	1,0
	3 dny	20,6	11,8	13,7	11,0	1,5	1,1
	7 dní	16,5	7,1	7,8	4,8	2,1	1,5
2. Konj.A: ^{131}I -hMAb BIWA4 1.0 Konj.B: ^{125}I -cMAb BIWA2	1 den	10,8	10,2	9,1	10,6	1,2	
	2 dny	12,4	10,2	9,8	10,1	1,3	1,0
	4 dny	12,9	7,2	8,9	7,2	1,5	1,0
	7 dní	7,6	3,3	4,8	2,7	1,6	1,2

3. Konj.A: ¹³¹ I -hMAb BIWA4 1.0 Konj.B: ¹²⁵ I -hMAb BIWA8	1 den	10,5	11,1	9,5	11,4	1,1	
	2 dny	10,9	10,0	9,6	9,8	1,1	1,0
	4 dny	11,7	6,2	9,6	5,9	1,2	1,0
	7 dní	10,1	4,2	7,5	3,9	1,3	1,1

V případě každého páru společně zavedených monoklonálních protilátek se uvádějí poměry pohlcení nádorem a krví. Na Obr. 2 jsou zobrazeny průměrná hodnota %ID/g a exponenciálně vyrovnaný průměr nádoru, krve a různých orgánů 3 dni (experiment 1) nebo 4 dni po infúzi (experiment 2 a 3).

Při přímém porovnání dvou myších monoklonálních protilátek pohlcení protilátky U36 s nízkou afinitou k nádoru je podstatně vyšší než pohlcení protilátky BIWA 1 s vysokou afinitou ve všech časových bodech ($p < 0,001$) (Tabulka 3). Naopak nepodstatné rozdíly se zjistily mezi hodnotami pohlcení uvedených protilátek do krve a normálními tkáněmi 1, 2 a 3 dni po infúzi. 7 dní po infúzi množství protilátky BIWA 1 v krvi a ve většině orgánů byla podstatně nižší ($p < 0,05$), než množství protilátky U36, což indikuje rychlejší clearance protilátky BIWA 1 z krve/těla. Na Obr. 2A je znázorněn 50 % vyšší pohlcení protilátky U36 v porovnání s protilátkou BIWA1 3 dni po infúzi.

Podobný vztah se zjistil při hodnocení dvou dalších párů monoklonálních protilátek. Lidská monoklonální protilátka BIWA 4, i když vykazuje nižší afinitu, vykazovala podstatně vyšší pohlcení nádorem ($p < 0,001$) ve všech časových bodech než cMAb BIWA 2 a lidská monoklonální protilátka BIWA 8 (tabulka č. 3). Naopak množství monoklonální protilátky v krvi a v normálních tkáních bylo podstatně stejné u všech uvedených párů monoklonálních protilátek 1, 2 a 4 dni po infúzi. 7 dní po

infúzi množství protilátek BIWA 2 a BIWA 8 v krvi a ve většině orgánů je podstatně nižší ($p < 0,05$) ve srovnání s množstvím BIWA 4, což indikuje rychlejší clearance uvedených monoklonálních protilátek z krve/těla. Na Obr. 2B je zobrazeno o 45 % vyšší pohlcení protilátky BIWA 4 nádorem než protilátky BIWA 2, zatímco na Obr. 2C je znázorněno o 20 % vyšší pohlcení protilátky BIWA 4 nádorem v porovnání s protilátkou BIWA 8 ilustrovanou na Obr. 2C v případě 4 dní po infúzi ve všech časových bodech.

Podobné výsledky se získaly z dalších experimentů (data nejsou zobrazena), ve kterých se změnily radioaktivní značky: ^{125}I -BIWA 4 verzus ^{131}I -BIWA 8 místo ^{131}I -BIWA 4 verzus ^{125}I -BIWA 8. Data získaná z posledního uvedeného experimentu ukazují možnost, že typ radioaktivní značky měl vliv na farmakokinetické chování značené monoklonální protilátky.

Radioimunoterapie u nahých myši nesoucích HNSCC

Z těchto tří experimentů biodistribuce je zřejmé, že monoklonální protilátka s nízkou afinitou vykazuje vyšší a více selektivní pohlcení nádorem ve srovnání s monoklonální protilátkou s vyšší afinitou a tak jsou vhodnější pro RIT. Za účelem testování této možnosti se tyto léčené skupiny porovnávaly ve studiích RIT s myšmi, které nesou xenograft HNX-OE.

Experiment 1: 300 μCi monoklonální protilátky U36 značené ^{186}Re nebo 300 μCi monoklonální protilátky BIWA 1 značené ^{186}Re nebo fyziologický roztok jako kontrola

Experiment 2: 300 μCi lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re nebo 300 μCi cMAb BIWA 2 značené ^{186}Re nebo fyziologický roztok jako kontrola.

Experiment 3: 400 μCi lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re nebo 400 μCi lidské monoklonální protilátky BIWA 8 značené ^{186}Re nebo fyziologický roztok jako kontrola.

Na Obr. 3 se průměrný relativní objem nádoru (vyjádřeno jako procento objemu nádoru v den 0) v případě kontroly a ošetřené skupiny vynesl proti času. Nádory myši v kontrolní skupině ve všech třech experimentech vykazují exponenciální růst, přičemž ke zdvojnásobení objemu nádoru dojde přibližně po 7 dnech po infúzi. Ve skupinách ošetřených monoklononální protilátkou značenou ^{186}Re nádory zastavily růst, ve stejném případě došlo krátce po zavedení konjugátů k regresi nádorů. Avšak všechny nádory začaly opět růst.

V experimentu 1 aplikace 300 μCi ^{186}Re -BIWA 1 vedlo ke snížení rychlosti růstu nádorů, ale nikoliv k redukci průměrné velikosti nádoru. Aplikace 300 μCi ^{186}Re -U36 však způsobila redukci průměrného objemu nádoru ze 185 mm^3 na 120 mm^3 mezi dnem 7 a dnem 17 po infúzi, po které nádory začaly opět růst. Průměrný objem nádoru ve skupině ošetřené ^{186}Re -U36 byl podstatně nižší ($p < 0,001$) ve srovnání s hodnotami dosaženými ve skupině ošetřené ^{186}Re -BIWA1 po 14 dnech.

V experimentu 2 aplikace buď 300 μCi ^{186}Re -BIWA 4 nebo 300 μCi ^{186}Re -BIWA 2 vede k růstu nádoru zablokováném v den 7, přičemž k opětovnému růstu došlo v den 17 po infúzi. Protilátka BIWA 4 byla účinnější v RIT než protilátka BIWA 2 ze dne 14, ale podstatný rozdíl se zjistil mezi průměrnými relativními objemy nádoru v den 14 po infúzi ($p < 0,05$).

V experimentu 3 se myším aplikovalo buď 400 μCi ^{186}Re -BIWA 4 nebo BIWA 8, což vede ke snížení relativního objemu nádoru na minimum $80 \pm 62\%$ a $98 \pm 81\%$ v den 19. Po tom začal nádor opět růst.

Příklad 2: Detailní popis sekvencí

Tento příklad ukazuje detaily sekvencí, například polohu klonovacích míst a nepřekládaných oblastí.

Zkratky:

aa = aminokyseliny

nt = nukleotidová sekvence

SEQ ID NO: 1 VH BIWA 4/88 aa

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGSY
TYYLDSIKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGLDYWGRGTLVTVSS

SEQ ID NO: 2 VL BIWA 4 aa

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSINYIWYQQKPGQAPRLIYLTSLNLSGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCLQWSSNPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 3 VL BIWA 8 aa

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSINYIWLQKPGQAPRILIYLTSLNLSGVPARF
SGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCLQWSSNPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 4 VH BIWA 4/8 nt

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTAAGACTCTCC
TGTCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCGCCAGGCTCCGGGG
AAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCTAGACAGT
ATAAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAAATGAAC
AGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGACAGGGGTGGACTACTGGGGT
CGAGGAACCTTAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 5 VL BIWA 4 nt

GAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCTG
TCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCT
CCTAGACTCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCCGTT
TATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACATTCGGTGGTGGGACCAAGGTGGAGATT
AAA

SEQ ID NO: 6 VL BIWA 8 nt

GAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCTG
TCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGCTCCAGCAGAAGCCAGGACAGGCT
CCTAGAATCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCCGTT
TATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACATTCGGTGGTGGGACCAAGGTGGAGATT
AAA

SEQ ID NO: 7 těžký řetězec (variabilní a konstantní oblast)

BIWA 4/8 aa

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGSY
TYYLDSIKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGLDYWGRGTLVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 8 lehký řetězec (variabilní a konstantní oblast)
BIWA 4/8 aa

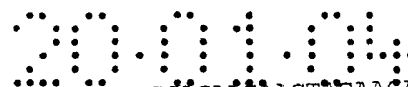
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSINYIYQYQKPGQAPRLIYLTSLNLSGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCLQWSSNPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST
LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 9 lehký řetězec (variabilní a konstantní oblast)
BIWA 8 aa

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSINYIYWLQKPGQAPRILIYLTSLNLSGVPARF
SGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCLQWSSNPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL
TLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 10 těžký řetězec (variabilní a konstantní oblast)
BIWA 4/8 nt, inzert v pAD-CMV1/pAD-CMV19, obsahuje introny
(malá písmena) mezi CH1-pantová oblast, pantová oblast-CH2,
CH2-CH3, vedoucí sekvence (podtrženo), nepřekládané sekvence
(italika), klonovací místa (tučné písmo)

aagctttgacagacgcacaaacctggactcccaagtctttctcttcagtgacaaacacagacataggatatcaca
tttgcttttgacacaaactgtgttcactagcagcctcaaacagacaccATGAACCTTGGGCTCAGCTTGATTTTCC
TTGTCCTAATTTTAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGCAG
GGTCCCTAAGACTCTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCCCGAGGCTC
CGGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCTAGACAGTATAAAGG
GCCGATTCAACATCTCCAGAGACATGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCAAGACAGGGGTGGACTACTGGGGTCGAGGAACCTTAGTCACCGTCTCTCTCAGCTA
GCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACA
CCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCCTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG
GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTggtgagagggc
cagcacaggggagggaggggtgtctgtgtggaagcagggtcagcgctcctgctggaagcgcacacccggctatgcagccc
cagtcacagggcagcaaggcagggcccgctgtgctcttccacccggagcctctgcccgcgccactcatgtcagggg
gaggggtcttctgtggtttttccagggtctgtgggcaggcacagggtaggtgcccctaaccaggccctgcacacaaa
ggggcaggtgtgtgggtcagacctgccaagagccatctccgggaggaccctgcccctgacctaaagcccaccccaa
aggccaaactctccactccctcagctcggacaccttctctcctccagattccagtaactcccaatcttctctct
gcaGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAggtaaagccagcccaggccctcgccctcc
agctcaaggcgggacaggtgccttagagtagcctgcacccaggacagggcccccagccgggtgtgtgacacgtccac
ctccatctcttctcctcagCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACAC
CCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTT
CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAA
CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAggtgggacccgtgggggtgcgagggccaca
tggaacagaggccgggtctcgggccacccctctgcccgtgagagtgaccgctgtaccaacctctgtcctacaGGGCAGCC
CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT



GGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC
CACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGTAAATGAgtagcgagcgcggaattc

SEQ ID NO: 11 lehký řetězec (variabilní a konstantní oblast)
BIWA 4 nt, sekvence v pAD-CMV1/pAD-CMV19, vedoucí sekvence
(podtrženo), nepřekládané sekvence (italika), klonovací místa
(tučné písmo)

aagottgatcttcaggatatcacatttgottotgacacaactgtgttcaactagcaacctcaaacagacaccATGG
ATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATGAGTGCTCAGTCATAATGTCCAGGGGAGAAATTGTTCTCA
CCCAGTCTCCAGCAACCCCTGTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCTGTCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAA
ATTACATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCTAGACTCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTT
CTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTG
AAGATTTTGCCGTTTATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCGCTCACATTGCGTGGTGGGACCAAGGTGGAGA
TTAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTGTA
GCGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT
CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGC
TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGgaattc

SEQ ID NO: 12 lehký řetězec (variabilní a konstantní oblast)
BIWA 8 nt, sekvence v pAD-CMV1/pAD-CMV19, vedoucí sekvence
(podtrženo), nepřekládané sekvence (italika), klonovací místa
(tučné písmo)

aagcttgatcttcaggatatcacatttgcttctgacacaactgtgttcaactagcaacctcaaacagacaccATGG
ATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATGAGTGCTCAGTCATAATGTCCAGGGGAGAAATTGTTCTCA
CCCAGTCTCCAGCAACCCCTGTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCTGTCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAA
ATTACATATACTGGCTCCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCTAGAATCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTT
CTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTG
AAGATTTTGCCGTTTATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCGCTCACATTGCGTGGTGGGACCAAGGTGGAGA
TTAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTGTA
GCGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT
CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGC
TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGgaattc

SEQ ID NO: 13 těžký řetězec (variabilní a konstantní oblast)
BIWA 4/8 nt, sekvence v N5KG1val, neobsahuje introny, vedoucí
sekvence (podtrženo)

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTG
CAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAGCCTGGAGGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTCACTTTAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCGCCAGGCTCCGGGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCTAGACAGTATAAAG
GGCCGATTCAACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTG
AGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGACAGGGGTGGACTACTGGGGTTCGAGGA
ACCTTAGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC
TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCT
CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGC
ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT

GAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
 TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
 TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
 GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
 AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
 TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
 AAATGA

SEQ ID NO: 14 lehký řetězec (variabilní a konstantní oblast)
 BIWA 4 nt, sekvence v N5KG1val, vedoucí sekvence (podtrženo)

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAA
 ATTGTTCTCAGCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCTGTCC
 TGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCT
 AGACTCTTGATTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGTGGCAGT
 GGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCCGTTTAT
 TACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACATTCGGTGGTGGGACCAAGGTGGAGATTAAA
 CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
 ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAG
 GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
 AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
 TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
 GAGTGTGA

SEQ ID NO: 15 lehký řetězec (variabilní a konstantní oblast)
 BIWA 8 nt, sekvence v N5KG1val, vedoucí sekvence (podtrženo)

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAA
 ATTGTTCTCAGCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACCCTGTCC
 TGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGTCCAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCT
 AGAATCTTGATTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGTGGCAGT
 GGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCCGTTTAT
 TACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACATTCGGTGGTGGGACCAAGGTGGAGATTAAA
 CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA
 ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAG
 GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
 AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC
 TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
 GAGTGTGA

SEQ ID NO: 16 BIWA 4 v N5KG1val

CTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCG
 CTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGT

TCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTT
 TACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGGGTCGCGACGTACC
 GGGCCCCCCTCGATTAATTAATCGAGCTACTAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATAA
 TGAGAAAAAAGGAAAATTAATTTTAACACCAATTCAGTAGTTGATTGAGCAAATGCGTTGCC
 AAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTCTCTGCACAGATAAGGACAAACATTATTGAGAGGGAG
 TACCCAGAGCTGAGACTCCTAAGCCAGTGAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTTGT
 CATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCCACACCTTGGTAAGGGCCAATCTGCTCACACAGGAT
 AGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTT
 GCTTCTGACATAGTTGTGCCAGCATGGAGGAATCGATCCTCCATGCTTGAACAAGATGGATTG
 CACGCAGTTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACA
 ATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTC
 AAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAAGTGCAGGTAAGTGCGGCCGCTCTAGGCCCTCCAA
 AAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTGCATAAA
 TAAAAAAATTAGTCAGCCATGCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAAGTGGGCGGAGTTAGGGGC
 GGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATA
 CTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATG
 CTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTAAGTACACACATTC
 CACAGAATTAATTCCCCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCA
 TATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGAC
 CCCCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCAT
 TGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAATGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT
 ATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAG
 TACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACC
 ATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATT
 CCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTT
 CCAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAG
 GTCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCACAGATCT
 CTCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCCTCCTGCTGCTCTGGCTCCCAGATAACCAC
 GGAGAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGAGGGCCACC
 CTGTCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAATTACATATACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAG
 GCTCCTAGACTCTTGATTTATCTCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCGCGCTTCAGT
 GGCAGTGGGTCTGGAACCGACTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCC
 GTTTATTACTGCCTGCAGTGGAGTAGTAACCGCTCACATTCCGTGGTGGGACCAAGGTGGAG
 ATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
 TCTGGAAGTGCCTCTGTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
 TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
 AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
 AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
 CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAATTGAGAT
 CCGTTAACGGTTACCAACTACCTAGACTGGATTGCTGACAACATGCGGCCGTGATATCTACGT
 ATGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCC
 TTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATC
 GCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGA
 GGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACAGCTGGGAC
 TAGTAGCTTTGCTTCTCAATTTCTTATTTGCATAATGAGAAAAAAGGAAAATTAATTTTAAC
 ACCAATTGAGTAGTTGATTGAGCAAATGCGTTGCCAAAAGGATGCTTTAGAGACAGTGTCT
 CTGCACAGATAAGGACAAACATTATTGAGAGGGAGTACCCAGAGCTGAGACTCCTAAGCCAGT
 GAGTGGCACAGCATTCTAGGGAGAAATATGCTTGTGTCATCACCGAAGCCTGATTCCGTAGAGCC
 ACACCTTGGTAAGGGCCAATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGGAGCCAGGGCAGAGCAT
 ATAAGGTGAGGTAGGATCAGTTGCTCCTCACATTTGCTTCTGACATAGTTGTGTTGGGAGCTT

GGATAGCTTGGACAGCTCAGGGCTGCGATTTCGCGCCAAACTTGACGGCAATCCTAGCGTGAA
 GGCTGGTAGGATTTTATCCCCGCTGCCATCATGGTTCGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTG
 TCCCAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTC
 AAGTACTTCCAAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATG
 GGTAGGAAAACCTGGTCTCCATTCCCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATA
 GTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACCGAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTTTGGAT
 GATGCCCTTAAGACTTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTC
 GGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTTAGACTCTTTGTGACA
 AGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAA
 CTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAG
 TTTGAAGTCTACGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCTCCTA
 AAGCTATGCATTTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGCTTTAGATCAGCCTCGACTGTGCC
 TTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGC
 CACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA
 TTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG
 GCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTCGAAGCGGCCGCTCCGGATA
 TGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGT
 ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA
 TGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC
 CAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTC
 CAAAATGTGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGG
 TCTATATAAGCAGAGCTGGGTACGTCTCACATTCAGTGATCAGCACTGAACACAGACCCGTC
 GACATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAA
 GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTAAGACTCTCCTGT
 GCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCGCCAGGCTCCGGGGAAG
 GGGCTGGAGTGGGTCTCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACCTACTATCTAGACAGTATA
 AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAAATGAACAGT
 CTGAGGGCTGAGGACACGGCCGT
 GTATTACTGTGCAAGACAGGGGTTGGACTACTGGGGTTCGAGGAACCTTAGTACCGTCTCCTC
 AGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
 CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAA
 CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTA
 CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
 CGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAA
 AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCTT
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGCT
 GGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
 TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTT
 CACCGTCTTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
 CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT
 GTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT
 CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA
 CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC
 CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
 GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGGATCCGTAAACGG
 TTACCAACTACCTAGACTGGATTTCGTGACAACATGCGGGCCGTGATATCTACGTATGATCAGCC
 TCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACC
 CTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTG
 AGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAA
 GACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGAACCAGCTGGGGCTCGACAGCGC

TGGGATCGCCTCGAGGCCGCTACTAACTCTCTCCTCCCTCCTTTTTCTGTCAGGACGAGGCAG
 CGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTG
 AAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTATCTCACC
 TTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGATC
 CGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGG
 AAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAC
 GTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATG
 CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGC
 TGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTG
 GCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCA
 TCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGA
 CCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTT
 GGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCT
 GGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTATTATGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG
 CATCAAAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAACT
 CATCAATCTATCTTATCATGTCTGGATCGCGGCCGCGCCGACCGCGGTGGAGCTTTAATTAAG
 GCGCGCCAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATG
 GTCATAGCTGTTTCTGTGTGAA
 ATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG
 GTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCCG
 GAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTA
 TTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTCCGGCTGCGGCGAG
 CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA
 AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGT
 TTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC
 GAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTC
 CTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC
 TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCTGTTCCGCTCCAAGCTGGGCT
 GTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGT
 CCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG
 CGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAA
 GGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCT
 CTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTA
 CGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT
 GGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCTAGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGA
 TCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTG
 ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCA
 TAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCA
 GTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGC
 CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGCTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTA
 ATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCA
 TTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCC
 AACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTC
 CTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGC
 AGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATA
 ATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAA
 AACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACT
 GATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATG
 CCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATCTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAAT

ATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGA
 AAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACA

SEQ ID NO: 17 pAD-CMV1, klonovací místa jsou znázorněna tučným
 písmem

TCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT
 CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAAT
 GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGC
 CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCG
 CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACCTATTAGTCATCGCTAT
 TACCATTGCTGATGCGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGGATTTCCAAAGTCT
 CCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTGAACAACCTC
 CGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAG
 AGAACCCACTGCTTAACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTTCTGCAGGTCGAC
 ATCGATGGATCCGCTACCTCGAGCGCGAATTCTCTAGAGGATCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTGTGAC
 ATAATTGGACAAACTACCTACAGAGATTTAAAGCTCTAAGGTAAATATAAAATTTTAACTGTATAATGTGTAA
 ACTACTGATTCTAATTGTTTGTGTATTTTAGATTCCAACCTATGGAAGTGAATGGGAGCAGTGGTGGAAATGC
 CTTTAATGAGGAAAACCTGTTTTGCTCAGAGAAATGCCATCTAGTGATGATGAGGCTACTGCTGACTCTCAACA
 TTCTACTCCTCCAAAAAGAGAGAAAGGTAGAAGCCCCAAGGACTTTCTCTCAGAAATGCTAAGTTTTTTGAG
 TCATGCTGTGTTTAGTAATAGAACTCTTGCTTGCTTTGCTATTTACACCACAAAGGAAAAAGCTGCACTGCTATA
 CAAGAAAATTATGGAAAAATATTGATGTATAGTGCTTGAAGTACAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAG
 AGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTG
 TTAAGTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTT
 TTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCAATTCTGAGAAAC
 TAGCCTTAAAGACAGACAGCTTTGTTCTAGTCAGCGAGGCAAGCATATGTAATAAAGTTCTCAGGGAAGTGA
 GTTAAAGATGTATCCTGGACCTGCCAGACCTGGCCATTCACTAAACAGAGATTCCGCTCAAGTTCCGGTTA
 ACAACAGGAGGCAACGAGATCTCAATCTTACTTCTAATCGGGTAAATTAACCTTTCAACTAAAACACGGAC
 CCACGGATGTCACCACTTTTCTTCCCCGGCTCCGCCCCCTCTCAGTACTCCCCACCATTAGGCTCGCTACTCCA
 CCTCCACTTCCGGCGGACACCCACGTGCCCTCTCCACCCGACGCTAACCCCGCCCCCTGCCCGTCTGACCCCC
 CCCACCACCTGGCCCCCGCGTTGAGGACAGAGAAACCCCGGGCAGCGCAGCCAAAGGCGGACGGGTAGACGG
 TGGGGGCGCTGAGGAGTCTCTCTACCTTCTCTGCTGGCTCGGTGGGGGACGGCGGTGGATCTCAGGCTTCCGG
 AGACTGGAAGAACCGGCTCAGAACCGCTTGTCTCCGCGGGGCTTGGGCGGCGGAAGAATGGCCGCTAGACGGG
 CTTGGTGCGAGGCATCGCAGGATGCAGAAGAGCAAGCCCGCGGGAGCGCGCGGCTGTACTACCCCGCGCTGGA
 GCGGCCACGCGGACTGGGCGGGGCGCGCTTGGTGAGGCGGAGTCTGACCTCGTGAGGCGGGGCTCTGATGT
 TCAATAGGATGCTAGGCTTGTGAGGCGTGGCCTCCGATTCAAGTGGGAAGCAGCGCCGGGCGACTGCAATT
 TCGCGCCAACTTGGGGGAAGCACAGCGTACAGGCTGCGTAGGTGCTGCTGCTGTGATGTTTCGACCGCTG
 AACTGCATCTGCGCGTCTCCAGAATATGGGCATCGGCAAGACGGAGACCTTCCCTGGCCAATGCTCAGGTAC
 TGGCTGGATTGGGTTAGGGAAACCGAGGCGGTTGCTGCTGAATCGGCTCGAGCACTTGGCGGAGACGCGCGGGCCAA
 CTACTTAGGGACAGTCATGAGGGGTAGSCCCGCGGCTGCTGCCCTTGGCCATGCCCGCGGTGATCCCCATGCTG
 TGCCAGCCTTTGCCAGAGGCGCTCTAGCTGGGAGCAAGTCCGCTCACTGGGCAGCACACCACCCCGGACTTGC
 ATGGGTAGCCGCTGAGATGAGGCTGAGCACAGCTGACAGGGTCCCTGTAAACGAGTGTCTCTAACTTTCAG
 GAACGAGTTCAGTACTTCCAAAGAATGAACCAACCTCCTCAGTGGAGGTAAACAGAACCTGGTGATTATGGG
 CCGGAAAACCTGGTTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGA
 GCTCAAGGAACCAACCAAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAGTCTGGACCATGCCTTAAACTTATTTGAACAACC
 AGAGTTAGCAGATAAAGTGGACATGGTTTGGATAGTTGGAGGAGTCCGTTTACAGGAAGCCATGAATCAGCC
 AGGCCATCTCAGACTCTTTGTGACAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTCTTCCAGAAATTGATTT
 GGAGAAATATAAACTTCTCCAGAGTACCCAGGGGTCTTTCTGAAGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATPA
 ATTTGAAGTCTATGAGAAGAAAGGCTAACAGAAAGATACTTGTGATTGACTTCAAGTTCTACTGCTTTCTCTCT
 AAAATTATGCAATTTTACAAGACCATGGGACTTGTGTTGGCTTTAGATCCTGTGCATCCTGGGCAACTGTTGTAC
 TCTAAGCCACTCCCCAAAGTCATGCCCCAGCCCCCTGTATAATTCTAAACAATTAGAATTATTTTCAATTTTCA
 GTCTAACCAGGTTATATTAATATACTTTAAGAAACACCATTTGCCATAAAGTTCTCAATGCCCTCCCATGCAG
 CCTCAAGTGGCTCCCCAGCAGATGCATAGGGTAGTGTGTGTACAAGAGACCCCAAGACATAGAGCCCCCTGAGAG
 CATAGCTGATATGGGGCTCATAGAGATAGGAGCTAGATGAATAAGTACAAAGGCGAGAAATGGGTTTTAACCA
 GCAGAGCTAGAAGTCAAGCTTTAAAGAAAATTAGATCAAGTAGAGACTGAATTATTTCTGCACATCAGACTCTGA
 GCAGAGTTCTGTTCACTCAGACAGAAAATGGGTAAATTGAGAGCTGGCTCCATTGTGCTCTAGAGCTGGGAGC
 AGGTGGAGGATTATATAAGGTCTGGAACATTTAACTTCTCCGTTTCTCATCTTCAAGTGAAGATTCCAGGGGATACT
 ACAATTCTGTGAATGTGTGTGCTAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAGC

ATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCCGCCCTAACTCCGCCCATGTCGGCC
CATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCGCCTCTGAGCTATCCAGAAAGT
AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAATTCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCC
CTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCCCCCTAGC
GCCCCCTCCTTTCGCTTCTCCTTCTCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGG
GCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAACTTGATTAGGGTGATGCTTACGT
AGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGAAGCTCTTG
TTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCC
TATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAATATTAACGTTTACAATTTCA
GGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGATCGG
CTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGT
GTCGCCCTTATTTCCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCAGCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAA
GATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGT
TTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATT
GACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACA
GAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATATGCAAGTCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCG
GCCAATTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAATGGGGGATCATGTA
ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATCGCTGTA
GCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAAGTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGAC
TGGATGGAGCGCGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAA
TCTGGAGCCCGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTA
GTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTG
ATTAAGCATTGGTAAGTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTT
AAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGA
CGGTGAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTCAA
ACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCGGGATCAAGAGCTAACCAACTCTTTTTCCGAAGTTAAAT
GGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT
GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTT
ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAG
CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
GAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGG
GGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCCGCACTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCG
TCAGGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCC

SEQ ID NO: 19 pAD-CMV19, klonovací místa jsou znázorněna
tučným písmem

TCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT
CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAAT
GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGC
CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC
CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT
TACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAAGTACCGGGGATTTCCAAGTCT
CCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTGGCACCACCAATCAACGGGACTTTCCAAATGTGCTAACCACTC
CGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
TCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGG
CCGGGAACGCTGCATTGGAACGCGGATTCGCCGTGCCAGAGTCAGGTAAGTACCGCCTATAGAGAAGACTCTTG
GGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTGCTCTATTGGTCTATTTTCCACCCCTTAGGCTGCTGGTGCTTAACTGGC
TTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTTCTGCAGGTGACATCGATGGATCCGGTACCTCG
AGCGCGAATCTCTAGAGATATCTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTT
TCACAAATAAGCAATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCT
GGATCAATCTGAAAAACTAGCCTTAAAGACAGACAGCTTGTCTAGTCAGCCAGGCAAGCATATGTAAATAAA
GTTCTCAGGGAAGTGAAGTTAAAGATGTATCCTGGACCTGCCAGACCTGGCCATTACGTAACAGAGATTC
CGCCTCAAGTTCGGGTTAACACAGGAGGCAACGAGATCTCAAACTCTATTACTTCTAATCGGGTAATTAACCT
TTCAACTAAACACGGACCCACGGATGTACCCACTTTTCTTCCCGGCTCCGCCCTTCTAGTACTTCCCGCC
ATTAGGCTCGCTACTCCACCTCCACTTCCGGGCGGACACCCACGTGCCCTCTCCACCCGACGCTAACCCCGCC
CCTGCCGCTCTGACCCCGCCACCACTGGCCCCGCCCCGTTGAGGACAGAAGAAACCCGGGCGAGCCGAGCCA
AGGCGGACGGGTAGACGCTGGGGGCGGTGAGGAGTCGTCTCTACCTTCTCTGCTGGCTGGGTGGGGACGCGGT

GGATCTCAGGCTTCCGGAAGACTGGAAGAACC GGCTCAGAACC GGCTTGTCTCCGCGGGGCTTGGGCGGCGGAAGA
ATGCGCGCTAGACGCGGACTTGGTGCGAGGCATCGCAGGATGCAGAAAGCAAGCCCGCGGGAGCGCGCGGCTG
TACTACCCCGCGCCTGGAGCGGCCACGCGGACTGGGCGGGGCGCGCCTGGTGGAGGCGGAGTCTGACCTCGTGG
AGGCGGGGCTCTGATGTTCAAATAGGATGCTAGGCTTGTGAGGCGTGGCCTCCGATTCAACAAGTGGGAAGCAG
CGCCGGGCGACTGCAATTTGCGGCCAACTTGGGGGAAGCACAGCGTACAGGCTGCCTAGGTGATCGCTGCTGCT
GTCATGGTTCGACCGCTGAAC TGCATCGTCGCGCTGTCCAGAATATGGGCATCGGCAAGAACGGAGACCTTCCC
TGGCCAATGCTCAGGTACTGGCTGGATTGGGTAGGGAACCGAGGCGGTTGCTGAATCGGGT CGAGCACTTGG
CGGAGACGCGCGGGCCAAC TACTTAGGGACAGT CATGAGGGGTAGGCCCGCGGCTGCTGCCCTTGCCCATGCC
GCGGTGATCCCCATGCTGTGCCAGCCTTTGCCAGAGGCGCTTAGCTGGGAGCAAAGTCCGGTCACTGGGCAGC
ACCACCCCGGACTTGCATGGGTAGCCGCTGAGATGGAGCCTGAGCACACGTGACAGGGTCCCTGTTAACGCAG
TGTTTTCTCTAACTTT CAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAATGACCACCACCTCCTCAGTGGAAAGGTAAACA
GAACCTGGTGATTATGGGCCGGAAAACCTGGTTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGACAGAATTAA
TATAGTTCTCAGTAGAGAGCTCAAGGAACCACCACAAGGAGCTCATTTTCTTGCCAAAAGTCTGGACCATGCCTT
AAACTTATTGAACAACCAGAGTTAGCAGATAAAGTGGACATGGTTTGGATAGTTGGAGGCAGTTCCGTTTACAA
GGAAGCCATGAATCAGCCAGGCCATCTCAGACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTT
CTTCCAGAAATGATTGGAGAAATATAAACTTCTCCAGAGTACCCAGGGTCCCTTTCTGAAGTCCAGGAGGA
AAAAGGCATCAAGTATAAATTTGAAGTCTATGAGAAGAAAGCTAACAGAAAGATACTTGCTGATTGACTTCAAG
TTCTACTGCTTTCTCTAAATATATGCATTTTACAAGACCATGGGACTTGTGTTGGCTTTAGATCCTGTGCAT
CCTGGGCAACTGTTGTA CTCTAAGCCACTCCCCAAGTCATGCCCCAGCCCCCTGTATAATTCTAAACAATTAGAA
TTATTTTTCATTTT CATTAGTCTAACCAGGTTATATTAAATATACTTTAAGAAACACCATTGCCATAAAGTTCTC
AATGCCCCCTCCCATGCAGCCTCAAGTGGCTCCCCAGCAGATGCATAGGGTAGTGTGTGTACAAGAGACCCCAAAG
ACATAGAGCCCCCTGAGAGCATGAGCTGATATGGGGGCTCATAGAGATAGGAGCTAGATGAATAAGTACAAAGGGC
AGAAATGGGTTTTAACCAGCAGAGCTAGA ACTCAGACTTTAAAGAAAATTAGATCAAAGTAGAGACTGAATTTAT
CTGCACATCAGACTCTGAGCAGAGTTCTGTTCACTCAGACAGAAATGGGTAAATTGAGAGCTGGCTCCATTGTG
CTCCTTAGAGATGGGAGCAGGTGAGGATTATATTAAGGCTGGAACATTTAACTTCTCCGTTTCTCATCTTCAGT
GAGATTTCAAAGGGATACATAATTCTGTGGAATGTGTGTGCTAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCA
GGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGC
AGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTA ACTCCGCCCATCCCGCCCCCTA
ACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCGCCT
CTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAATTCAGCCTGAA
TGGCGAATGGGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTT
TAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCCAGATAGGGTTGAGTGTGTGTTCC
AGTTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGA
TGCCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCCAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCT
AAAGGGAGCCCCGACTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAA
CGGCGGGGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCG
CCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATA
CATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATG
AGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCCATTATCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCCTTCTGTTTTGCTCAGCCAGAA
ACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGC
GGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCGCCCCGAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGC
GCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTT
GAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACC
ATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
AACATGGGGGATCATGTAAC TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGT
GACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTA ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCC
CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGC
TGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGT
AAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAANTAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTA ACTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTA
AACTTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGT
GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGC
GTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCCCGCTACACGCGTGGTTTGTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACT
CTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGC
CACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGT
GGCGTAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGCTGAACG
GGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGA
GAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGC

Příklad 3: Klinická studie 1170.1

1. Seznam zkratek a definice termínů

ADCC	cytotoxicita zprostředkovaná buňkou závislou na protilátce
AE	nežádoucí jev
ALT	alanin aminotransferáza
a.p.	anterior posterior
AP	alkalická fosfatáza
AST	aspartát aminotransferáza
AUC	plocha pod křivkou koncentrace-čas
Bq	becquerel, jednotka SI pro radioaktivitu (1 Bq = jeden rozpad za vteřinu)
BSA	albumin bovinního séra
CD44v6	izoforma v6 varianty CD44
CDS	bezpečnost použitých léčebných prostředků
cGy	jednotka sdělené energie radioaktivního záření
CHO	buňky vaječníků čínských křečků
Ci	jednotka radioaktivity, $1 \text{ Ci} = 37 \times 10^9$ rozpadů/vteřinu = 37 GBq
CL	celkové odstranění z těla
cMAb	chimerická monoklonální protilátka
cm	centimetr
$C_{\max}$	maximální pozorovaná koncentrace léků
cpm	počet pulzů za minutu
CRF	forma zápisu
CT	(scan) počítačová chromatografie
CTC	běžné kritérium toxicity
CV	variační koeficient
DLT	dávka mezní toxicity

ECG	elektrokardiogram
ELISA	enzymová imunoanalýza
ENT	uši, nos, hrdlo
f	samice
FDA	Úřad pro správu potravin a léčiv
g	gram
GBq	jednotka SI pro radioaktivitu, jeden gigabecquerel (1GBq=10 ⁹ rozkladů za jednu vteřinu)
GCP	dobrá klinická praxe
GGT	gamma-glutaryltranspeptidáza
GMP	dobře fungující výroba
Gy	Gray
HAHA	lidská anti-lidská protilátka
Hb	hemoglobin
HER2	receptor 2 lidského epidermálního růstového faktoru
hMAb	humanizovaná lidská protilátka
HNSCC	spinocelulární karcinom v oblasti hlavy a krku
HPLC	vysoko výkonnostní kapalná chromatografie
hod	hodina
Ht	hematokrit
¹³¹ I	jód-131 (poločas rozpadu 8,05 dne)
ICH	mezinárodní komise harmonizace
ID	dávka zavedená injekcí
IEC	nezávislá etická komise
IgG	imunoglobulín
INN	mezinárodní neregistrovaný název
IRB	komise „Institutional Review Board“
ITT	určený k léčbě
i.v.	intravenózně
KeV	kiloelektronvolt
l	litr
m	samec
m ²	metr čtvereční
MAb	monoklonální protilátka

MAG2GABA-TFP	ester merkaptoacetylglucylglycyl-gamma-aminobutyrate tetrafluorophenol MA pro spojování ^{186}Re s monoklonální G2GABA-TFP), chelát používaný pro spojování s monoklonální protilátkou
MAG3	merkaptopacetyltriglycin, chelát používaný při spojení $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a ^{186}Re s monoklonální protilátkou
MBq	jednotka SI pro radioaktivitu, megabecquerel (1 MBq=10 ⁶ rozkladů za jednu vteřinu)
mCi	jednotka pro radioaktivitu, 1 mCi=37x10 ⁶ rozkladů za vteřinu = 37 MBq
MCV	průměrný korpuskulární objem
mGy	miliGray
μg	mikrogram
mg	miligram
min	minuta
ml	mililitr
mMAb	myší monoklonální protilátka
mmHg	milimetry rtuťového sloupce
μmol	mikromol
mmol	milimol
mRI	zobrazení magnetickou rezonancí
MRT	střední doba zdržení
mSv	milisievert
MTD	maximální tolerovaná dávka
n.a.	není možné aplikovat
NCI	instituce „US National Cancer Institute“
ND	neprovedeno
ng	nanogram
č.	číslo
nos	pokud není uvedeno jinak
NSCLC	zhoubné bujení buněk, které nejsou malými buňkami plic
n.y.r.	nebylo ještě získáno
p.a.	posterior anterior

PBS	fyziologický roztok pufrovaný fosfátem
p.i.	po infúzi
p.o.	ústí
pp	podle protokolu
pt./Pat	pacient
Pts.	pacienti
^{186}Re	rhenium-186, radionukleotid, poločas rozpadu 3,7 dní (penetrace tkáně β -částicemi o velikosti 1,2 mm)
Recov.	získáno
RES	retikuloendoteliální systém
RIS	radioimunoscintigrafie
RIT	radioimunoterapie
ROI	oblast zájmu
SAE	seriový nežádoucí účinek
SCC	spinocelulární karcinom
sCD44v6	rozpustný CD44v6
SD	stabilní onemocnění
sGOT	sérová glutamo-oxaloctová transamináza
sGPT	sérum glutamát pyruvát transamináza
SOC	systém třídění orgánů
SOP	standardní operační postupy
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie
$t_{1/2}$	poločas eliminace
^{99m}Tc	technecium 99m (poločas rozpadu 6 hodin)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
$T_{\max}$	čas, kdy se pozorovala maximální koncentrace léku
TNM	systém metastáz nádorů uzlin pro prozatímní nádory
TSH	tyreotropní hormon
UICC	instituce „Union Internationale Contre le Cancer“
unk	neznámý
V_{ss}	zdánlivý objem distribuce za podmínek klidového stádia
V_z	zdánlivý objem distribuce během terminální fáze
WBC	počet bílých krvinek

WHO světová zdravotnická organizace

2. Cíle studie

2.1 Obecný cíl/klinický cíl

Obecným cílem studie je určit bezpečnost a tolerovatelnost intravenózně zavedené lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc a ^{186}Re , aby se potvrdila preferenční akumulace lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc v nádoru a stanovila se maximální tolerovaná dávka záření lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re a aby se stanovila bezpečná dávka pro II. fázi vývoje. Aby se dosáhlo tohoto cíle, studie se rozdělila do dvou částí:

Část A:

Cíle:

- Stanovit bezpečnost a tolerovatelnost lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc aplikovanou jedinou intravenózní infúzí u pacientů s pokročilým stádiem spinocelulárního karcinomu.
- Stanovit biodistribuci lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc aplikovanou jedinou infúzí při různých dávkách protilátky BIWA 4 u pacientů s pokročilým stádiem spinocelulárního karcinomu v oblasti hlavy a krku.
- Studium farmakokinetiky lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc .

Část B:

Cíle:

- Stanovení kvalitativních a kvantitativních toxických účinků lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re a studium

možnosti předpovědět toxické vedlejší účinky, jejich vznik, trvání, intenzitu, reverzibilitu a závislost na dávce.

- Stanovení maximální tolerovatelné dávky ozáření intravenózně aplikované lidské monoklonální protilátky značené ^{186}Re u pacientů s karcinomem v oblasti krku a hlavy.
- Studium farmakokinetiky intravenózně aplikované lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re u pacientů s spinocelulárním karcinomem v oblasti hlavy a krku.
- Druhotným cílem studie je stanovení preliminárních terapeutických účinků lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re .

Následující cíle uvedené v protokolu nemohou být během provádění studie adresné. Vývoj programu, kde se používá jako linker chelát merkptoacetyltriglycin (MAG3) pro spojení $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a ^{186}Re s monoklonálními protilátkami, se přerušil a tak se studie ukončila. Další vývoj s protilátkou BIWA 4 pokračoval za použití linkeru ester merkptoacetylglycylglycyl-gamma-aminobutyráttetrafluorofenol (MAG2GABA-TPF).

- Nejdříve se stanovila MTD pro léčbu s jedinou dávkou a pak vstoupili do studie další pacienti za účelem definování MTD pro další léčbu s lidskou monoklonální protilátkou BIWA 4 značenou ^{186}Re .
- Stanovení bezpečné dávky pro první a návazné infúze lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re pro další studie.
- Získání počátečních výsledků pro vytvoření plánu aplikace dávek při opakovaném podávání.

2.2 Primární proměnné

- Bezpečnost: klinické laboratorní testy, hodnocení lidských anti-lidských protilátek (HAHA), stanovení vitálních znaků a vedlejších účinků.
- Účinnost: data biodistribuce z biopsie (pouze část A) a radioimunoscintigrafické zobrazení (část A a B zahrnující dozimetrii pro část B studie).
- Farmakokinetické výsledky.

2.3 Sekundární proměnné

Sekundární proměnnou v případě studie byla nádorová odezva (pouze část B).

3. Plán výzkumu

3.1 Návrh a plán studie - popis

Studie se provedla ve dvou částech. Část A hodnotila optimální dávku protilátky BIWA 4 a kvantifikovala pohlcení protilátky nádorem, zatímco část B zkoumala maximální tolerovanou dávku protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re .

3.1.1 Část A:

Tato část klinické studie nebyla řízena. Studie se navrhla tak, aby se získaly počáteční data o bezpečnosti a tolerovatelnosti lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené $^{99\text{m}}\text{Tc}$, za účelem zkoumání paternu a stupně biodistribuce a stanovení farmakokinetického profilu lidské monoklonální protilátky BIWA 4 u pacientů se zhoubným bujením v oblasti krku a hlavy. Dávky tří proteinů lidské monoklonální protilátky BIWA 4 se použily v části A studie se třemi pacienty, u kterých se plánuje léčba každou dávkou.

Pacienti se sledovaly na oddělení otolaryngologie, aby se stanovil rozsah nádoru. To zahrnuje zkoumání fyzického stavu,

počítačovou tomografií (CT) nebo MRI oblasti krku a hlavy a panendoscopií. Během těchto postupů se odebíraly vzorky tkáně, nádoru a zkoumala se přítomnost spinocelulárního karcinomu. Na základě výsledků zkoumání pacienti podstoupily operaci zahrnující disekci krku.

Radioaktivně značené protilátky se zavedly injekcí a u pacienta se pozorovaly nežádoucí účinky. 21 hodin po infúzi (p.i.) před chirurgickým zákrokem se provedl radioimunoscintigraf. Pacienti prodělali chirurgický zákrok 48 hodin po infúzi radioaktivně značené lidské monoklonální protilátky BIWA 4. Patologové zkoumaly disekci krku, aby stanovily skutečný nádor. Stanovilo se množství ^{99m}Tc v biopsiích odebraných v místech nádoru a v normální tkáni. V místě nádoru a v uzlinách prostoupených nádorem se zkoumala přítomnost antigenu CD44v6 imunohistochemickými metodami. Prvním třem pacientům se aplikovaly 2 mg lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené 20 mCi ^{99m}Tc kombinované s 23 mg neznačené monoklonální protilátky BIWA 4. Druhé skupině tři hodnocených pacientů se aplikovaly 2 mg lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené 20 mCi ^{99m}Tc kombinované se 48 mg neznačené lidské monoklonální protilátky BIWA 4 a třetí skupině se aplikovaly 2 mg značené protilátky s 98 mg neznačené protilátky.

Farmakokinetické hodnocení se provedlo ve specifikovaném čase.

3.1.2 Část B:

Tato část klinické studie nebyla otevřeně řízena, jde o studii se zvyšující se dávkou. V této studii se sledovala bezpečnost a tolerovatelnost lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re , stanovila se maximální tolerovaná dávka (MTD) intravenózně aplikovatelné lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re a stanovily se preliminární

terapeutické účinky lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re u pacientů se zhoubným bujením v oblasti krku a hlavy, v případě kterých neexistují jiné možnosti léčby. Navíc se stanovil farmakokinetický profil lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re .

Všem pacientům vstupujícím do této části studie se aplikovala dávka lidské monoklonální protilátky BIWA 4, která se vybrala na základě výsledků ze studie části A. Lidská monoklonální protilátka BIWA 4 se značila se zvyšujícími se dávkami ^{186}Re . Při nižších dávkách (pozorovaná toxicita nepřesáhla stupeň 1) v ošetřované skupině byli dva pacienti a při vyšších dávkách (toxicita $\geq$ stupni 2) skupina obsahuje minimálně 3 pacienty. Hodnotili se všichni pacienti, aby se stanovila bezpečnost aplikované lidské monoklonální protilátky BIWA 4.

Pacienti se rutinně sledovali na oddělení otolaryngologie, aby se stanovil rozsah nádorů. To zahrnuje fyzické testování a CT a MRI oblasti nádoru.

Protilátky značené ^{186}Re se zavedly injekcí se zvyšující se dávkou radiace: pacienti ve skupině, které se aplikovala první dávka, se vystavili dávce záření 20 mCi/m^2 , po té se pacientům v dalších skupinách aplikovaly dávky vždy zvýšené o 10 mCi/m^2 až do dosažení MTD. U pacientů se sledoval výskyt nežádoucích účinků. Provedly se radioimunoscintigrafy.

3.1.3 Postupy při každé návštěvě

3.1.3.1 Plán návštěv

a) Kontrolní návštěvy

Dříve než každý pacient vstoupil do studie se ověřila jeho způsobilost. Sledoval se jeho demografický původ, jeho léčebná historie, průvodní terapie a provedly se obecné fyzikální

testy a stanovila se tělesná hmotnost. Stanovilo se skóre podle Karnofského. Bylo nutné získat psaný souhlas. U plodných žen se provedl těhotenský test. Provedl se elektrokardiogram s 12-ti senzory (ECG) a provedly se laboratorní testy pro odhad bezpečnosti krve a moče. Odebraly se vzorky krve pro test HABA. Provedl se rentgen hrudníku a zhodnocení celého onemocnění (CT/MRI, prohlídka uší-nosu-hrdla (ENT)).

Nakonec této návštěvy se hodnotily výsledky požadovaných vyšetření, ověřila se začleněná a vyčleněná kritéria a provedl se plán chirurgického zákroku (pouze část A).

b) Návštěva 2: dny studie 1 až 7

Části A a B:

První den studie, což nebylo déle než 3 týdny po první kontrolní návštěvě, byl pacient přijat do nemocnice. Provedla se všechna požadovaná základní laboratorní vyšetření, která nebyla provedena při kontrolní návštěvě a hodnotila se způsobilost pacientů a dodržení požadovaných kritérií. Stanovila se tělesná hmotnost. Zaznamenávaly se všechny průvodní terapie. Každý nežádoucí projev se zaznamenával do pacientova spisu do záznamu studie (CRF).

V den aplikace léčby, dříve než se aplikovala protilátka, se odebral vzorek krve pro stanovení farmakokinetických faktorů (zahrnující stanovení rozpustného CD44v6) a zaznamenaly se vitální znaky. Moč se shromažďovala během prvních 24 hodin od 0 do 4 hodin, od 4 do 8 hodin, od 8 do 12 hodin a od 12 do 24 hodin a pak ve 24 hodinových intervalech až do 48 a 96 hodin po infúzi v případě části A respektive části B.

Protilátka se aplikovala na oddělení nukleární medicíny nebo v místnosti nemocnice k tomu vyhrazené. Protilátka se musí aplikovat do periferní nejvyšší možné žíly. Ve všech

případech se infúze aplikovala po dobu 5 minut po prvních 10 ml fyziologického roztoku prostřednictvím volně průtočné kanyly. Bylo nutné provést ředění objemu pomocí 0,9% NaCl na 20 ml. Po této infúzi protilátek následovala propláchnutí 10 ml fyziologického roztoku. Do CRF se zaznamenal libovolný podezřelý extravazát a pacient se sledoval.

Připravené také bylo oddělení intenzivní péče s resuscitačním vybavením, anti-histaminy, kortikoidy a k neutralizaci možné anafylaxe byl připraven epinefrin. Denně se zaznamenávaly nežádoucí účinky a změny v současné terapii.

Část A:

Vitální znaky se zaznamenávaly 10, 60 a 120 minut po aplikaci injekce. 21, 48 a 144 hodin po infúzi se odebraly vzorky krve a stanovila se jejich bezpečnost a obsah rozpustného CD44v6.

Vzorky krve pro stanovení farmakokinetických faktorů se odebíraly až do konce infúze a 5, 10 a 30 minut a 1, 2, 4, 16, 21, 48, 72 hodin po konci infúze a 7. den (144 hodin po aplikaci injekce se odebral vzorek séra pro stanovení HAHA a rozpustného CD44v6).

Od 0 do 4 hodin, od 4 do 8 hodin, od 8 do 12 hodin a od 12 do 24 hodin během prvních 24 hodin a od 24 hodin do 48 hodin po aplikaci injekce se shromažďovala moč pro stanovení farmakokinetických faktorů.

Přímo po infúzi a 21 hodin po infúzi se provedl scintigraf celého těla. 21 hodin po infúzi vedle zobrazení celého těla se provedla jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT) a planární zobrazení oblastí krku a hlavy.

Pacient se operoval do 48 hodin po infúzi a setrval v nemocnici v rámci pooperační péče.

V den 7 (144 hodin po infúzi) se odebraly vzorky moče a stanovila se bezpečnost.

Denně se zaznamenávaly nežádoucí projevy a změny v souběžné léčbě.

Část B:

10, 60, 120 a 240 minut po infúzi se zaznamenávaly vitální znaky. 21, 48 a 144 hodin po infúzi se odebraly vzorky krve pro stanovení bezpečnosti. 144 hodin po infúzi se odebral vzorek krve pro stanovení HAHA. 144 hodin po infúzi se odebral vzorek moči pro stanovení bezpečnosti.

Na konci infúze a 5 a 30 minut a 1, 2, 4, 16, 21, 48, 72 hodin a v den 7 po aplikaci infúze se odebraly vzorky krve pro stanovení farmakokinetických faktorů. Původně plánovaný vzorek odebraný 10 minut po aplikaci byl vynechán.

Od 0 do 4 hodin, od 4 do 8 hodin, od 8 do 12 hodin a od 12 do 24 hodin během prvních 24 hodin a během 24 až 96 hodin po aplikaci injekce se shromažďovala moč pro stanovení farmakokinetických faktorů.

Přímo po aplikaci injekce a 21, 48 a 72 a 144 hodin po aplikaci injekce se provedlo scintigrafické zobrazení celého těla a jestliže to dovoluje zbytkové záření provedlo se toto zobrazení také po 2 týdnech od aplikaci injekce.

Planární zobrazení oblasti krku a hlavy se provedlo 21, 48, 72 a 144 hodin po infúzi a jestliže to dovoluje zbytkové záření provedlo se toto zobrazení také po 2 týdnech od aplikaci injekce.

Zobrazení SPECT se provedlo pouze 72 hodin po infúzi.

Po třech dnech pacienti opustily nemocnici.

c) Návštěva 3: Návštěva s programem sledování

Část A:

Šest týdnů po infúzi pacienti navštívili polikliniku. Provedly se fyzické testy, shromáždily se vzorky krve a moči pro stanovení bezpečnosti, stanovila se tělesná hmotnost a vitální znaky a zaznamenaly se nežádoucí účinky. Získaly se také vzorky krve pro stanovení farmakokinetických faktorů, HAMA a rozpustného CD44v6. V případě plodných žen se vyžadoval těhotenský test. Zaznamenaly se libovolné změny souběžné terapie.

Část B:

Alespoň po dobu šest týdnů pacienti jednou týdně navštěvovaly polikliniku a zaznamenávaly se nežádoucí projevy a shromažďovaly se vzorky krve. Vzorky krve pro stanovení farmakokinetických faktorů se odebíraly 240 a 336 hodin po infúzi. Původně plánovaný vzorek, který se měl odebrat 6 týdnů po infúzi se vypustil. Zaznamenávaly se libovolné změny provedené v souběžné terapii. Hodnocení onemocnění se opakovalo po dobu šesti měsíců po infúzi a i dále pokud je to uvedeno (hodnocení se provedlo spíše po šesti týdnech než po čtyřech týdnech, jak se uvádí v protokolu). Šest týdnů po infúzi se odebraly vzorky krve pro stanovení bezpečnosti, HAMA a rozpustného CD44v6, zaznamenaly se vitální znaky a tělesná hmotnost. Během této návštěvy se také provedly fyzické testy. Odebral se vzorek moči pro stanovení bezpečnosti. V případě plodných žen se vyžadoval těhotenský test.

d) Návštěvy 4 a 5: sekundární léčba (část B)

Sekundární léčba jak je uvedená v původním protokolu se neprovedla, což bylo způsobeno předčasným ukončením studie vzhledem ke změně linkeru. Pacienti, kterým se aplikovala první dávka monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re byli

způsobili pro druhou aplikaci. Podrobili se stejnému plánu návštěv jako v případě první aplikace.

3.2 Diskuze návrhu studie zahrnující volbu kontrolních skupin

Cílem studie bylo stanovit preferenční akumulaci monoklonální protilátky značené ^{99m}Tc v nádoru (část A) a hodnotit maximální tolerovanou dávku monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re (část B) stejně jako farmakokinetické faktory BIWA 4 u pacientů, které trpí pokročilým stádiem karcinomu v oblasti krku a hlavy (část A a B).

Použil se typ studie s otevřeným designem, jak se v obecném případě používá u těchto typů studií fáze I v onkologii. Skupina, kde se aplikovala nižší dávka radiace zahrnuje minimálně dva pacienty a skupina, kde se aplikuje vyšší dávka zahrnuje tři pacienty. Obě skupiny jsou zahrnuty v části B studie. V případě výskytu kritéria běžné toxicity (CTC) spojené s léčebným prostředkem stupeň 4 hematologická toxicita a stupeň 3 nehematologická toxicita se další tři pacienti ošetřili uvedenou dávkou (další detaily dávkování jsou uvedeny v sekci 3.4.4 a 3.4.5).

Dávka monoklonální protilátky BIWA 4 se aplikovala na základě předchozích výsledků s monoklonální protilátkou BIWA 1, což ukazuje, že dávka 50 mg vede k vysokému a selektivnímu pohlcení nádorovou tkání a k nízkému pohlcení nenádorových tkání a výsledky k výsledkům z části A studie (popisuje se také v sekci 3.4.1).

Intenzita radioaktivity v případě první dávky se vybrala na základě předchozích dat naznačujících, že dávka 20 mCi/m^2 může být bezpečnou dávkou (popisuje se také v sekci 3.4.4.2).

Aplikované kritérium účinnosti stejně jako kritérium pro stanovení tolerovatelnosti jsou dobře prokazatelné u populace pacientů a mohou se také hodnotit v otevřené studii.

3.3 Výběr populace pro studii

3.3.1 Kritérium inkluze

- Pacienti, u kterých se histologicky prokázal spinocelulární karcinom oblasti krku a hlavy,
- pacienti určeni pro chirurgický zákrok, kterým je disekce v oblasti krku (část A) nebo
- pacienti buď s lokálním a/nebo oblastním recidivujícím onemocněním, kde není možná alternativní léčba, nebo kde s vyskytují vzdálené metastáze. Uložení nádoru musí být měřitelné buď klinicky nebo jednou nebo více radiologických metod (CT, MRI, kostní scintigrafie).

Protože se očekává, že RIT bude účinnější u nádorů menších velikostí, jsou výhodnější pacienti s výskytem lézí, které jsou menší než 3 cm (část B).

- pacienti starší 18-ti let,
- pacienti mladší 80-ti let,
- pacienti, kteří písemně souhlasí s léčbou,
- pacienti, kde se předpokládá, že přežijí tři měsíce,
- pacienti s charakteristikou Karnofsky vyšší jak 60.

3.3.2 Kritérium pro vyloučení ze studie

- infekce ohrožující život, alergie, selhání orgánu (bilirubin $>30 \mu\text{mol/l}$ a/nebo kreatinin $150 \mu\text{mol/l}$) nebo důkaz infarktu myokardu na ECG nebo nestabilní angina pectoris,
- ženy před menopauzou (poslední menstruace byla před rokem dříve než začala studie):

- ženy sterilní po chirurgickém zákroku (hysterektomie, tubální ligace) a
- ženy, které praktikují nepřijatelné způsoby antikoncepce (nebo toto plánují v průběhu studie). Přijatelné metody kontroly početí zahrnují aplikaci antikoncepčních přípravků zavedených orálně, injekcí nebo ve formě implantátů,
- ženy jejichž sérum je pozitivní v těhotenském testu,
- osoby, které prodělaly chemoterapii nebo radioterapii 4 týdny před zařazením do studie,
- počet bílých krvinek je nižší než $3\ 000/\text{mm}^3$, počet granulocytů je nižší než $1\ 500/\text{mm}^3$ nebo počet krevních destiček je nižší než $100\ 000/\text{mm}^3$,
- hematologické poruchy, městnavé srdeční selhání, bronchiální astma, elementární a kontaktní alergie, těžké atopie nebo alergie.

3.3.3 Vyjmutí jedince z terapie nebo hodnocení

3.3.3.1 Kriterium pro zastavení léčby subjektu

Infúze se musí stanovit bezprostředně, jestliže se u pacienta vyvinula tachykardie (puls je vyšší než 120 tepů za minutu), tlak (systolický krevní tlak je nižší než 100 mm rtuťového sloupce), špatné dýchání, bolest na prsou nebo libovolné jiné symptomy, které nemůže pacient tolerovat.

3.3.3.2 Vypadnutí ze studie

Jedinci byli ochotni kdykoliv vystoupit ze studie.

Hodnocení radioaktivně značených lidských monoklonálních protilátek BIWA 4 se nepovažuje za reálné, jestliže pacient byl ze studie odstraněn na základě jeho samovolného

odstoupení. Tento případ se považuje za nehodnotitelný, jestliže nejsou dostupné adekvátní následující informace. Plánovalo se, že nehodnotitelní pacienti se nahradí.

Jestliže přerušil studii dříve, důvod se dokumentoval do CRF. Jestliže se pacient nepodrobil odběru vzorků po infúzi pro provedení testu HAHA nebo stanovení farmakokinetiky, důvod se dokumentoval. Jestliže u pacientů došlo k vyvinutí vážných nežádoucích jevů, plán studie musí být dodržován, co nejvíce je to možné v závislosti na vážnosti nežádoucích jevů (SAE).

3.4 Léčba

3.4.1 Aplikovaná léčba

Pacientům v části A se aplikovala monoklonální protilátka BIWA 4 značená ^{99m}Tc s dávkou radioaktivity 20 mCi. Aplikovaná dávka BIWA 4 je 25 mg, 50 mg nebo 100 mg v případě každého ze tří pacientů. Léčebný prostředek se aplikoval intravenózně jako jediná dávka.

Pacientům v části B se aplikovalo 50 mg monoklonální protilátky BIWA 4 značené rheniem 186. Nejnižší radioaktivní dávka byla 20 mCi/m², která se zvýšila na dávku 10 mCi/m². Léčebný prostředek se aplikoval intravenózně jako jediná dávka.

3.4.2 Identita zkoumaného produktu

Část A:

Látka (INN):	BIWA 4 (bivatuzumab)
Farmaceutická forma:	injekční roztok
Chiffreovo číslo:	BIWA 4 LOI 99 1D 1A
Číslo vsádky:	B981101
Zdroj:	firma Boehringer Ingelheim Pharma KG
Jednotková síla:	5mg/ml
Denní dávka:	25 mg

Doba použití: jediná dávka
 Způsob aplikace: intravenózní
 Posologie: infúze během pěti minut

Látka (INN): BIWA 4 (bivatuzumab)
 Farmaceutická forma: injekční roztok
 Chiffreovo číslo: BIWA 4 LOI 99 1D 1A
 Číslo vsádky: B981101
 Zdroj: firma Boehringer Ingelheim Pharma KG
 Jednotková síla: 5mg/ml
 Denní dávka: 50 mg
 Doba použití: jediná dávka
 Způsob aplikace: intravenózní
 Posologie: infúze během pěti minut

Látka (INN): BIWA 4 (bivatuzumab)
 Farmaceutická forma: injekční roztok
 Chiffreovo číslo: BIWA 4 LOI 99 1D 1A
 Číslo vsádky: B981101
 Zdroj: firma Boehringer Ingelheim Pharma KG
 Jednotková síla: 5mg/ml
 Denní dávka: 100 mg
 Doba použití: jediná dávka
 Způsob aplikace: intravenózní
 Posology: infúze během pěti minut

Monoklonální protilátka BIWA 4 se aplikovala jako radiokonjugát spojený s ^{99m}Tc . Molekulu linkeru tvoří MAG3. MAG3 se získal od firmy Mallinckrodt, Petten, Nizozemí.

^{99m}Tc se objednal prostřednictvím laboratoře, kde se připravoval radiokonjugát (laboratoř Prof. Dr. van Dongen, Sekce nádorové virologie, Katedra otorinolaryngologie/chirurgie hlavy a krku, Vrije Universiteit

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

Část B:

Látka (INN):	BIWA 4 (bivatuzumab)
Farmaceutická forma:	injekční roztok
Chiffreovo číslo:	BIWA 4 LOI 99 1D 1A
Číslo vsádky:	B981101
Zdroj:	firma Boehringer Ingelheim Pharma KG
Jednotková síla:	5mg/ml
Denní dávka:	50 mg
Doba použití:	jediná dávka
Způsob aplikace:	intravenózní
Posology:	infúze během pěti minut

Monoklonální protilátka BIWA 4 se aplikovala jako radiokonjugát spojený s ^{186}Re . Molekula linkeru byla mAG3. MAG3 se získal od firmy Mallinckrodt, Petten, Nizozemí.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ se objednal prostřednictvím laboratoře, kde se připravoval radiokonjugát (laboratoř Prof. Dr. van Dongen, Sekce nádorové biologie, Katedra otorinolaryngologie/chirurgie hlavy a krku, *Vrije Universiteit* University Medical Center, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, Nizozemí).

3.4.2.1 Charakteristika a kvalita léčebných prostředků

Charakteristiky protilátek

Antigen rozeznávaný lidskou monoklonální protilátkou BIWA 4 je transmembránový glykoprotein lokalizovaný na vnějším povrchu buňky a je internalizovaný pouze malým rozsahem (méně než 20 %). Další analýza ukázala, že lidská monoklonální protilátka BIWA 4 rozeznává epitop kódovaný proměnným exonem v6 molekuly CD44. Ukázalo se, že antigen se exprimuje ve všech primárních nádorech v oblasti hlavy a krku (n=54) a ve většině

buněk těchto nádorů. Porovnatelná exprese se pozorovala u 68 lymfatických uzlin, které jsou infiltrovány nádorem, a které pocházejí z disekce krku (R97-2054). Reaktivita lidské monoklonální protilátky BIWA 4 v lidské normální tkáni se uvádí v dodatku protokolu „Dodatek III“. Zjistilo se, že reaktivita lidské monoklonální protilátky BIWA 4 je podstatná pro omezení dlaždicového epitelia. Jak ukazuje předchozí studie RIS s myší monoklonální protilátkou (mMAb) BIWA 1, reaktivita protilátky s normálním dlaždicovým epitelem není limitující faktor pro použití při cílení do nádoru s ohledem na pohlcování nádorem.

Kontrola kvality lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc nebo ^{186}Re .

Protilátka se značila s ^{99m}Tc nebo ^{186}Re podle způsobu popsaného v publikaci Fritzberg et al. (R96-2106: popisuje se v doplňku protokolu sekci „Doplněk IV“), který se upravil podle publikace Van Gog, F.B., Visser, G. W.M., Stroomer, J. W.G., Roos, J.C., Snow, G.B., and Van Dongen, G.A.M.S. High dose ^{186}Re -labeling of monoclonal antibodies for clinical applications: pitfalls and solutions. Cancer, 80: 2360-2370, 1997a (R96-2094) a Van Gog, F.B., Brakenhoff, R.H., Snow, G.B., and Van Dongen, G. A. M. S. Rapid elimination of mouse/human chimeric monoclonal antibodies in nude mice. Cancer Immunol. Immunother., 44: 103-11, 1997b (R96-2111).

Postupy pro radioaktivní značení lidské monoklonální protilátky BIWA 4 s ^{99m}Tc a ^{186}Re se hodnotily s ohledem na konečnou kvalitu připraveného konjugátu. V pěti nezávislých experimentech značení provedených podle postupu popsaného v doplňku IV protokolu, procento značky navázané na protilátku bylo 96 až 99 %.

Při tomto klinickém zkoumání radiochemická čistota každé připravené dávky protilátky značené ^{99m}Tc nebo ^{186}Re se

stanovila chromatografií na tenké vrstvě (TLC) nebo vysoko výkonnou kapalnou chromatografií (HPLC) a pasážováním gelovou filtrační kolonou PD-10 a více jak 90 % se aplikuje pacientovi.

Imunoreaktivní frakce každé dávky protilátky značené $^{99m}\text{Tc}/^{186}\text{Re}$ se po aplikaci kontrolovala použitím ověřených postupů a musí být přibližně 60 %. Analýzy se v podstatě provedly podle postupu, jak se popisuje v publikaci Lindmo et al. (R96-2104). Buňky UM-SCC 11B (karcinom lidského hrtanu) obsahující antigen CD44v6 se fixovaly v 0,1 % glutaraldehydu. Připravilo se šest ředění s 1% bovinním sérovým albuminem (BSA) ve fyziologickém roztoku pufovaném fosforečnanem (PBS), které jsou v rozmezí 5×10^6 až $3,1 \times 10^5$ buněk v jedné zkumavce.

Do zkumavek se přidalo 80 000 pulzů za jednu minutu (cpm) lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc nebo 10 000 pulzů za jednu minutu lidské monoklonální protilátky značené ^{186}Re a vše se inkubovalo přes noc při teplotě místnosti.

Do posledního vzorku se přidal nadbytek neznačené lidské monoklonální protilátky BIWA 4, aby se stanovilo nespecifické navázání. Buňky se centrifugovaly a stanovila se radioaktivita supernatantu v počítači pro gamma záření a vypočítalo se procento vázané a volné monoklonální protilátky značené radioaktivně (LKB-Wallac 1218 CompuGamma).

Data se analyzovala graficky v upraveném grafu podle Lineweaver-Burka a imunoreaktivní frakce se stanovila lineární extrapolací za podmínek reprezentujících nekonečný nadbytek antigenu.

V případě, že se při tomto vazebném testu nedosáhlo hodnoty 60 % přípravek pro zavedení infúzí se znovu hodnotil v druhém vazebném testu. Pro tento účel se protilátkový přípravek značil pomocí ^{131}I . Imunorekativní frakce v alespoň

jednom z obou testů musela být větší než 60 % v případě každého pacienta, který byl hodnocen a v případě, že studie pokračovala s jiným pacientem.

Bezpečnost protilátek

Monoklonální protilátka BIWA 4 používaná v případě radioaktivního značení s ^{99m}Tc a ^{186}Re je velmi dobře charakterizovaným produktem monoklonální protilátky a vznikla fermentací kultury buněk vaječníků čínských křečků (CHO). Zavedla se buněčná banka za podmínek GMP) a testoval se mikrobiologický status (bakterie, plísňe, mykoplasma) stejně jako virový status (nahodilé viry, retroviry). S výjimkou endogenních retrovirů, o kterých se ví, že jsou přítomny ve většině buněk CHO, se nedetekovaly žádné jiné kontaminanty. V souladu s dokumentem Úřadu pro správu potravin a léčiv (FDA) (1994) „Points to consider“, který se vydal v případě monoklonálních protilátek používaných v klinických studiích ve fázi I v případě pacientů trpících karcinomem se použil standardizovaný čistící postup, který se hodnotil účinností odstranění viru, a aplikoval se při čištění materiálu BIWA 4. Pro dokazování se použily čtyři modely virů (MuLV, PsRV, REO-3, SV40). Sebrala se koncentrovaná dávka a testoval se titr retroviru, aby se zaručilo, že následný čistící postup bude schopný adekvátně odstranit retrovirus. Data pro odstranění endotoxinů byly v přijatelném limitu (menší nebo roven 0,01 EU/mg) a byly dostupné dávkované produkty. Dále se úspěšně provedl test pyrogenicity podle „European Pharmacopoea“.

Konečná lidská monoklonální protilátka BIWA 4, která se použije pro další značení, se detailněji analyzovala a prokázalo se, že její čistota je vysoká (test SDS PAGE, izoelektircká fokusace), jde o sterilní roztok, který obsahuje minimální množství endotoxinů (menší nebo roven 0,01 EU/mg). Výsledky testování pyrogenicity se porovnaly se standardem

(European Pharmacopoea standard). Rovnost produktu BIWA 4 z výroby pro pre-klinické a klinické studie se demonstrovala analytickými výsledky.

Radioaktivní značení lidské monoklonální protilátky BIWA 4 s ^{99m}Tc nebo ^{186}Re se provedlo na oddělení otolaryngologie a chirurgie krku a hlavy instituce Vrije Universiteit University Medical Center podle standardních operačních postupů (SOP). Sterilita konečného produktu byla garantována. Během hodnocení se provedly testy přítomnosti endotoxinů. V případě aplikace léčebného prostředku pacientovi v instituci University Hospital Nijmegen se správné množství radioaktivně značené lidské monoklonální protilátky BIWA 4 přeneslo ve speciálním kontejneru přímo po přípravě do studijního centra v Nijmegenu. Interval mezi značením sloučeniny a aplikací pacientovi byl 24 hodin.

Alokace jednotlivých dávek rhenia pacientům se také popisuje v doplňku 16.1.6

3.4.2.2 Balení, značení a dodávka

Monoklonální protilátka BIWA 4 se získala od firmy Boehringer Ingelheim, Nizozemí. Tento přípravek vyrobila firma Boehringer Ingelheim, Německo za použití výrobního a čistícího postupu GMP a naplnila se do zkumavek jako sterilní, nepyrogenní roztok obsahující 25 mg lidské monoklonální protilátky BIWA 4 v 5 ml izotonického PBS, pH7,2. Příklady značek zkumavek v případě přirozené a také značené protilátky se uvádějí v manuálu klinické studie.

Připravila se jedna dávka s celkovým množstvím 27 g lidské monoklonální protilátky BIWA 4 a naplnila se do zkumavek. Značení lidské monoklonální protilátky BIWA 4 pomocí ^{99m}Tc nebo ^{186}Re se uskutečnilo v nukleární laboratoři třídy B instituce Vrije Univeriteit University Medical Center, Amsterdam.

3.4.2.3 Podmínky skladování

Neznačená lidská monoklonální protilátka BIWA 4 se musí skladovat v nemocniční lékárně v oblasti s omezeným přístupem. Skladovací teplota se sleduje a udržuje se na 2 až 8°C.

3.4.3 Způsoby rozdělování jedinců do skupin

Nepoužilo se náhodné rozdělení. Pacienti se rozdělovali do skupin, kde se aplikovaly odlišné dávky podle sekvence zařazení.

3.4.4 Selekce dávek

3.4.4.1 Selekce dávek BIWA 4

Část A:

Protože se lidská monoklonální protilátka BIWA 4 nikdy dříve pacientům neaplikovala, bylo podstatné prokázat její bezpečnost a biodistribuci dříve než začnou studie RIT. Její biodistribuce může silně záviset na dávce monoklonální protilátky používané při cílení do nádoru a volba dávky bude vyžadovat zvážení. Na základě studií se zvyšující se dávkou proteinu monoklonální protilátky U36 proti CD44v6 s nízkou afinitou, se předpokládá, že optimální dávka byla v rozmezí 25 až 100 mg, přičemž optimální dávka v případě U36 je 50 mg.

Aby se potvrdilo, že tato dávka také odpovídá střední afinitě lidské monoklonální protilátky BIWA 4 a aby se získala počáteční informace o variabilnosti pohlcení nádoru biodistribuce se odhadla na 25, 50 a 100 mg celkové lidské monoklonální protilátky BIWA 4 a plánovalo se, že se vždy třem pacientům aplikuje každá z těchto dávek.

Všem pacientům, kteří se hodnotili, se aplikovalo jedinou intravenózní infúzí 2 mg lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené 20 mCi ^{99m}Tc, což se stanovilo kalibračním systémem pro

radiaci dříve než došlo k aplikaci. Plánovalo se, že pacientům se aplikuje 25 mg, 50 mg nebo 100 mg, přičemž se aplikovalo 23 mg, 48 mg nebo 98 mg neznačené lidské monoklonální protilátky BIWA 4 spolu s 2 mg lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené 20 mCi ^{99m}Tc .

Výběr dávky monoklonální protilátky BIWA 4 v případě části B:

Na základě teoretických podkladů se vypočítala dávka lidské monoklonální protilátky BIWA 4 50 mg jako nejvhodnější pro zobrazení. Uskutečnila se část A studie, aby se potvrdil preferenční pohlcení lidské monoklonální protilátky BIWA 4 ve třech testovaných dávkách (25 mg, 50 mg a 100 mg). Očekávalo se, že pohlcení nádorem (exprimováno jako procento dávky na jeden kilogram zavedené injekcí, %ID/kg) a poměr pohlcení nádorem ku nenádorové pohlcení v případě uvedených tří dávek se nebude příliš lišit. Jestliže k tomu došlo, dávka lidské monoklonální protilátky BIWA 4, která se použije v části B byla 50 mg. Avšak, jestli existuje klinicky relevantní rozdíl mezi těmito dávkami, což favorizuje jednu dávku vůči ostatním, pak se vybrala dávka s nejlepším paternem biodistribuce.

V tomto případě se definoval klinicky relevantní rozdíl jako rozdíl poměru pohlcení nádorem (průměrná hodnota pohlcení nádory) ku pohlcení kostní dřeně (průměrná hodnota pohlcení kostní dřeně = buněčná frakce a supernatant) více než 50 %.

Nakonec vybraná dávka byla 50 mg lidské monoklonální protilátky BIWA 4 na základě výsledků části A.

3.4.4.2 Výběr dávky startující záření

Část B:

Dávka lidské monoklonální protilátky BIWA 4 vybraná v části A studie se značila zvyšujícími se dávkami ^{186}Re .

Ukázalo se, že maximální tolerovaná dávka myší monoklonální protilátky NR-LU-10 značené ^{186}Re byla 90 mCi/m^2 v případě předem ošetřených pacientů, zatímco dávka limitující myelosupresi byla 120 mCi/m^2 . V případě chimerické monoklonální protilátky NR-LU-13, která rozeznává stejný antigen jako NR-LU-10, se reverzibilní myelosuprese objevila při 60 mCi/m^2 . Při studii s cMAB U36 provedené v instituci Vrije Universiteit University Medical Center byla dávka, při které dochází k omezení myelosuprese 41 mCi/m^2 .

Na základě shora v textu uvedených výsledků dávka záření 20 mCi/m^2 se aplikovala jako lidská monoklonální protilátka BIWA 4 značená ^{186}Re a tato dávka se považuje za bezpečnou počáteční dávku.

Dávka se zvyšovala v krocích o 10 mCi/m^2 . Dva pacienti byli zahrnuti do studie při aplikaci nejnižší dávky. V případě, že podle CTC toxicita spojená s podáním léčebného prostředku dosáhla stupně 2, pak nejméně tři pacienti byly léčení uvedenou dávkou.

Dříve než se pacientům aplikovala další vyšší dávka, bylo nutné se ujistit, že pacienti nebyli vystaveni DLT, která se definuje jako stupeň tři nehematologické toxicity nebo stupeň 4 hematologické toxicity vyjma nevolnosti a zvracení bez adekvátní antiemetické léčby. Za tímto účelem se všichni pacienti, kterým se aplikovala uvedená dávka, sledovaly dostatečně dlouho, aby se ujistily, že vyvolaná toxicita je reverzibilní.

V případě uvedené dávky pouze jeden pacient byl vystaven působení DLT, proto se počet pacientů, kterým se aplikovala uvedená dávka zvýšil na celkový počet šesti pacientů. V případě, že jeden z šesti pacientů se vystavil působení DLT, další vyšší dávka se aplikovala celkovému počtu šesti pacientů

(jestliže se neprovedlo už dříve) za účelem stanovit MTD a bezpečnou doporučenou dávku v případě fáze II.

Původně se plánovalo, že v případě přijatelné toxicity (pokud se méně jak u dvou pacientů zjistila DLT) se může uvedená dávka aplikovat dalším pacientům a druhá dávka se může opět zvýšit. Tento plán nebylo možné provést, což je způsobeno změnou linkeru. MAG3 se nahradil MAG2GABA-TFP, což je porovnatelný linker s vhodnějším spojovacím postupem. Zakončil se program vyvíjení s MAG3.

V jiném případě pacienti, kdo odpovídali na první aplikovanou dávku monoklonální protilátky BIWA 4 značenou ^{186}Re a tolerovali jí, byli vhodní pro aplikaci druhé dávky ^{186}Re -BIWA 4 50 mCi/m².

3.4.5 Výběr a načasování dávky každému subjektu

3.4.5.1 Dávka a plán léčby

Dávku bylo možné aplikovat v libovolném okamžiku. Avšak musel se dodržet interval mezi radioaktivním značením monoklonální protilátky a její aplikací, který nesměl překročit 24 hodin.

3.4.6 Slepé stanovení

Šlo o otevřený neřízený test. Neprovedlo se slepé stanovení.

3.4.7 Předcházející a současná léčba nebo postupy

3.4.7.1 Záchranná medikace a další léčba(y)

Anafylaxe se považuje za nejzávažnější potencionální vedléjší účinek a je nutné ihned přerušit infúzi protilátek a je nutné provést vhodná resuscitační měření. Je nutné provést bezpečnostní opatření. Připravit resuscitační zařízení, anti-

histaminika, kortikosteroidy a epinefrin. Každý pacient, u kterého se projevila tato nežádoucí reakce, byl vyloučen z aplikace další monoklonální protilátky.

Pacientům bylo možné aplikovat jinou léčbu v případě, že to indikovala studie, nebo v případě onemocnění, které se nevztahovalo k aplikaci protilátek, a byla splněna všechna kritéria uvedená shora v textu. Všechny současné léčby byly zaneseny do CRF.

V případě vážné hematologické toxicity (CTC stupeň 4) bylo možné použít cytokiny nebo další metody pro zmírnění toxicity kostní dřeně.

3.4.7.2 Omezení

Nebylo možné provést další chemoterapii nebo radioterapii a poslední by měla skončit více než 4 týdny před zařazením jednotlivce do studie. Všechny předchozí chemoterapie a radioterapie byly zaznamenány do CRF.

3.4.8 Současná léčba

Léčebný prostředek se aplikoval jedinou intravenózní infúzí. Kompliance se ověřila stanovením farmakokinetiky a radioimunoscintigrafickým zobrazením.

3.5 Účinnost/klinická farmakologie a proměnné bezpečnosti

3.5.1 Účinnost/farmakodynamické charakteristiky a odhady bezpečnosti a schéma postupu

Schéma postupu:

Část A:

Zkoumání uskutečněné v části A a příslušná doba jsou uvedeny detailněji ve schématu postupu dále v textu. Popis výzkumu je uveden v následujících sekcích.

Tabulka 3.5.1.1 Schéma postupu: Část A: Studie biodistribuce
s lidskou monoklonální protilátkou BIWA 4
značenou ^{99m}Tc

	návštěva 1	návštěva 2						návštěva 3
	test. návštěva	den 1*		den 2	den 3	den 4	den 7	kontrolní týden 6
		před inf.	po inf.					
písemný souhlas	x							
demografie	x							
souběžná léčba	x	x	x	x	x	x	x	X
anamnéza	x							
fyzické testy	x							x
ECG	x							
rentg. hrudníku	x							
anal. bezpečn. krve	x ¹	x ¹		x ¹	x ¹		x ¹	x ¹
anal. bezpečn. moče	x						x	x
těhotenský test	x							x
stanovení HAHA	x ²						x ²	x ²
test ENT	x							
CT nebo MRI	x							
kritéria začlenění/vyjmutí	x							
vedlejší účinky		x	x	x	x	x	x	x
vitální znaky	x ³	x ³	x ³					x ³
tělesná hmotnost	x	x						x
imunonoscintigrafie								
-snímek celého těla			x ⁴	x ⁴				
-planární snímek				x ⁵				
-SPECT				x ⁵				
farmakokinetika:								
vzorků krve		x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶	6
shromážděné moče		x ⁶	x ⁶	x ⁶	x ⁶			
CD44v6 rozp. v seru		x ⁷		x ⁷	x ⁷		x ⁷	6

chirurgický zákrok					x			
--------------------	--	--	--	--	---	--	--	--

*Hodnocení by se nemělo provádět dříve než 3 týdny před infúzí.

x¹ Ve vzorcích krve se stanovovala: glukóza, sodík, draslík, vápník, chloridy, kreatinin, celkové proteiny, albumin, sérová glutamo-oxaloctová transamináza (sGOT), sérum glutamát pyruvát transamináza (sGPT), alkalická fosfatáza, glutaryltranspeptidáza gamma (GGT), bilirubin, močovina, kyselina močová, tyreotropní hormon (TSH), hemoglobin (Hb), hematokrit (Ht), průměrná hodnota korpuskulárního objemu (MCV), retikulocyty, leukocyty, neutrofily, lymfocyty, bazofily, eosinofily, monocyty a destičky při testovací návštěvě nebo v den 1 před infúzí a 21, 48 a 144 hodin po infúzi a šest týdnů po infúzi (p.i.).

x² Hodnota HAHA se stanovila ve vzorku séra získaném při testovací návštěvě, po jednom týdnu (144 hodin) a po 6 týdnech po infúzi.

x³ Vitální znaky se hodnotily při testovací návštěvě, před infúzí, 10, 60 a 120 minut po infúzi a po 6 týdnech.

x⁴ Snímek celého těla se provedl bezprostředně po infúzi a 21 hodin po infúzi.

x⁵ Snímek SPECT a planární snímek se provedl jedenkrát 21 hodin po infúzi.

x⁶ Vzorky krve pro stanovení farmakokinetických parametrů se získaly před infúzí, na konci infúze, během 5, 10, 30 minut, 1, 2, 4, 16, 21, 48, 72 a 144 hodin po ukončení infúze a šest týdnů po infúzi. Vzorky krve odebrané pro test ELISA a pro stanovení radioaktivity (detaily se popisují v sekci 9.5,4.1). Moč se shromažďovala během 0 až 4 hodin, 4 až 8 hodin, 8 až 12 hodin a 12 až 24 hodin během prvních 24 hodin a ve zbývajícím čase do 48 hodin po infúzi ve 24 hodinových intervalech.

x⁷ Ve vzorku séra získaném před infúzí se stanovil rozpustný CD44v6, 21, 48 a 144 hodin po infúzi a šest týdnů po infúzi.

Část B:

Tabulka 3.5.1: 2 Schéma postupu část B studie se zvyšující se dávkou lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re

[illegible]

vitální znaky	x^3	x^3	x^3					6
tělesná hmotnost	x	x						6
imunoscintigrafie								
-snímek celého těla			x^4	x^4	x^4	x^4	x^4	
-planární snímek				x^5	(x^5)	x^5	x^5	
-SPECT						x^5		
farmakokinetika:								
vzorků krve		x^6	x^6	x^6	x^6	x^6	x^6	6
shromážděné moče		x^6	x^6	x^6	x^6	x^6		
CD44v6 rozp. v seru		x^7		x^7	x^7		x^7	6

*Hodnocení by se nemělo provádět dříve než 3 týdny před infúzí.

x^1 Ve vzorcích krve se stanovovala: glukóza, sodík, draslík, vápník, chloridy, kreatinin, celkové proteiny, albumin, sérová glutamo-oxalocetová transamináza (sGOT), sérum glutamát pyruvát transamináza (sGPT), alkalická fosfatáza, glutaryltranspeptidáza gamma (GGT), bilirubin, močovina, kyselina močová, tyreotropní hormon (TSH), hemoglobin (Hb), hematokrit (Ht), průměrná hodnota korpuskulárního objemu (MCV), retikulocyty, leukocyty, neutrofily, lymfocyty, bazofily, eosinofily, monocyty a destičky při testovací návštěvě nebo v den 1 před infúzí a 21, 48 a 144 hodin po infúzi. Během 2 až 6 týdnů po infúzi se alespoň jednou týdně odebíral vzorek krve pro stanovení bezpečnosti.

x^2 Hodnota HAHA se stanovila ve vzorku séra získaném při testovací návštěvě, po jednom týdnu (144 hodin) a po 6 týdnech po infúzi.

x^3 Vitální znaky se hodnotily při testovací návštěvě, před infúzí, 10, 60 a 120 minut po infúzi a po 6 týdnech.

x^4 Snímek celého těla se provedl bezprostředně po infúzi a 21, 48, 72 a 144 hodin po infúzi a také je možné ho provést po dvou týdnech po infúzi.

x⁵ Planární snímek se provedl 21, 48, 72, 144 hodin po infúzi a je možné ho provést po dvou týdnech po infúzi. Snímek SPECT se provedl 72 hodin po infúzi.

x⁶ Vzorky krve pro stanovení farmakokinetických parametrů se získaly před infúzí, na konci infúze, během 5, 30 minut, 1, 2, 4, 16, 21, 48, 72 a 144, 240 a 336 hodin po ukončení infúze a šest týdnů po infúzi. Vzorky krve odebrané pro test ELISA a pro stanovení radioaktivity. Moč se shromažďovala během 0 až 4 hodin, 4 až 8 hodin, 8 až 12 hodin a 12 až 24 hodin během prvních 24 hodin a ve zbývajícím čase do 96 hodin po infúzi ve 24 hodinových intervalech.

x⁷ Ve vzorku séra získaném před infúzí se stanovil rozpustný CD44v6, 21, 48 a 144 hodin po infúzi a šest týdnů po infúzi.

x⁸ Hodnocení onemocnění se opakovalo každých 6 týdnů až do progresu onemocnění nebo ztráty kontroly. Provedlo se CT hrudníku a v případě abnormalit a opakovalo se v případě zjištěných abnormalit.

3.5.1.1 Radioimunoscintigrafie a dozimetrie

Data získaná z radioimunoscintigrafie (RIS) se prezentovala kvalitativně v případě části A a B (to je pohlcení nádorem, kostní dřením, plicema, střevem, ledvinami a dalšími orgány vyjádřeno jako slabé, střední nebo silné) a kvantitativně v případě části B.

V případě hodnocení kvality se posuzovací stupnice převedla na čísla (0 znamená žádné pohlcení, 1 znamená slabé pohlcení, 2 znamená střední pohlcení a 3 znamená silné pohlcení). Vypočítaly se a vyjádřily se průměrné hodnoty.

V případě části B kvantitativní hodnocení RIS využívá dozimetrické výpočty, jak se popisuje v sekci 5.1.4 protokolu a výpočet zahrnuje následující parametry:

- Skutečná aktivita orgánu v daném čase vyjádřená v MBq.

- Doba zdržení radioaktivity v orgánech vyjádřená v hodinách.
- Absorbovaná dávka (záření) vyjádřená v mGy/MBq.
- Účinná dávka (záření) vyjádřená v mSv.

Detaily dozimetrického měření je možné najít ve zprávě dosimetrického měření (s datem 21.11.2001).

e) radioimunoscintigrafické postupy

Popis metod používaných v části A a B a časy jsou uvedeny v následujících sekcích.

Část A

Přímo po infúzi a 21 hodin po infúzi se získalo digitální zobrazení celého těla (anterior posterior (a.p.) a posterior anterior (p.a.)) za použití gamma snímače s dvěma hlavama vybaveným nízkoenergetickým kolimátorem. 21 hodin po infúzi se získalo planární zobrazení a zobrazení SPECT oblasti hlavy a krku. Je nutno provést kalibraci zdroje. Data se uchovávají, aby se mohla provést kvantitativní analýza.

Část B

Přímo po infúzi a 21, 48, 72 a 144 hodin po aplikaci radioimunokonjugátu se získalo digitální zobrazení celého těla (anterior posterior (a.p.) a posterior anterior (p.a.)) za použití gamma snímače s dvěma hlavama vybaveným nízkoenergetickým kolimátorem. 21 hodin po infúzi se získalo planární zobrazení a zobrazení SPECT oblasti hlavy a krku. Další planární zobrazení oblasti hlavy a krku se provedlo 21, 48, 72 a 144 hodin po infúzi. Další planární zobrazení (celé tělo a planární zobrazení) se provedlo dva týdny po infúzi. V případě zobrazení celého těla se musel kalibrační zdroj (to je alikvot se známou frakcí dávky ve zkumavce o objemu 10 ml se zavedl injekcí) začleněný do Adamsova modelu umístit mezi spodní částí nohou. Iniciační aktivita kalibračního zdroje

musí být 100 až 200 MBq ^{186}Re a tento zdroj se musí použít během zobrazení celého těla. Musí se zaznamenat hodnoty energetického okna, maxima nastavení, rychlost snímání, délka snímání, data zobrazení, počáteční čas snímání a doba trvání snímání. Musí se změřit tloušťka a.p. oblasti krku a břicha, zatímco pacient byl v poloze vleže na zádech na zobrazovací tabuli.

Při každé zobrazovací relaci se provedlo anterior a planární statické zobrazení a před nebo po tomto zobrazení je nutné získat statické zobrazení z kalibračního zdroje v Admasově modelu.

72 hodin po infúzi se provedla SPECT studie oblasti krku. Metody používané pro rekonstrukci a funkce filtrů, které odbourávají určité frekvence je nutné zaznamenat.

Jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPECT)

Zobrazení SPECT se získalo za použití dvouhlavového rotačního gamma snímače vybaveného nízkoenergetickým kolimatorem. Akvizice vyžaduje alespoň tři minuty. Dvaceti procentní symetrická okna se centralizovala do fotonového maxima 137 keV.

Akviziční parametry dat planárního zobrazení a SPECT

Planární zobrazení zahrnovalo následující minimální požadavky: matrice 128x128 (detail) nebo 256x256 (celé tělo) a minimum 400 000 pŕl兹ů s maximálním akvizičním časem 10 minut v případě detailu a 60 minut v případě celého těla.

Zobrazení SPECT zahrnovalo následující minimální požadavky: 64 zobrazení, velikost matrice 64x64, kruhová oběžná dráha 360 stupňů, 60 sekund akvizice na úhel.

Analýza dat

21 hodin po infúzi se provedlo anterior zobrazení celého těla, vybraných pravúhlých oblastí (ROI) podél celého těla a kalibračního zdroje. Také se zobrazily nepravidelné ROI okolo orgánů, které akumulují ^{186}Re (například játra, slezina a levá ledvina) a okolo nádoru. Zobrazila se také jedna nebo více reprezentativních oblastí pozadí. Tyto oblasti se musí zrcadlově převrátit do posterior zobrazení. Původně se plánovalo zobrazit ROI v okolí kosti křížové v posterior zobrazení. Tento plán se během studie neuskutečnil. Všechny oblasti se musí uchovávat na počítači za účelem promítnout tyto ROI do zobrazení v jiných časech. Zaznamenával se počet pixelů a impulzy na jeden pixel v každé oblasti. Počet impulzů v oblastech pro všechna zobrazení ve všech časech se digitálně zaznamenávají do tabulkového procesoru.

Výpočet dávky absorbované v orgánech

Množství aktivity v orgánech, v nádoru a v celém těle se odhadl z geometrického průměru impulzů v ROI anterior a posterior zobrazení. V případě indikace se aplikuje korekce pozadí a atenuace. Aktivita stanovená v moči se nepoužívala k odhadu absorbované dávky v močovém měchýři, jak se původně plánovalo. Místo toho se použil dynamický model močového měchýře. Vypočítaly se rezidenční časy v orgánech a ve zbytku těla a přenesly se do programu MIRDSE3.

Požadovaná kvalita kontrolních testů

Planární zobrazení

Rutiní kontroly kvality se prováděly jednou týdně na oddělení nukleární medicíny:

- 1) použila se 100 M zaplavená vrstva
- 2) každý týden se provádělo vnější zaplavení ^{57}Co s nízkoenergetickým kolimatorem

Zobrazení SPECT

Kontrola kvality systému zobrazení SPECT musí zahrnovat centrování determinace rotace.

Tomografické zpracování

Při rekonstrukci tomografického zobrazení se používal algoritmus filtrované zpětné projekce za použití rampového filtru.

Uchovávání dat

Všechna planární zobrazení a tomografická data se musí permanentně zapisovat na magnetickou pásku nebo optický disk. V případě tomografických studií se musí na pásku zapsat původní zobrazení a rekonstruované studie.

Kopie zobrazení a záznamy

V případě všech pacientů je nutné pořizovat kopie všech relevantních zobrazení, patologické a chirurgické záznamy. Jsou nutné pořizovat také kopie všech MRI a CT.

3.5.1.2 Biodistribuce lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc v biopsii (část A)

Pacienti zahrnutí do studie část A se podrobily chirurgickému zákroku 48 hodin po infúzi radioaktivně značené lidské monoklonální protilátky BIWA 4. Odebrala se biopsie z místa nádoru a z normální tkáně (tolik kolik je možné). Také se za celkové anestezie odebrala biopsie z kosti a aspirát kostní dřeně. Aby se stanovila radioaktivita supernatantu (plazma) a v sedimentu (buněčná frakce), centrifugoval se aspirát kostní dřeně.

Všechny biopise se vážily a měřilo se množství ^{99m}Tc , Specifické pohlčení radioaktivity nádorem se hodnotilo porovnáním %ID/kg nádoru s %ID/kg normální tkáně.

Expres antigenu CD44v6 se hodnotila imunohistochemicky za použití sekci kryostatů, které se nejdříve inkubovaly s myší monoklonální protilátkou BIWA 1, pak se sekundárním činidlem proti myšímu imunoglobulinu G (IgG). Chirurgické preparáty a biopsie se zkoumaly histo/cytopatologicky.

Hodnocení chirurgických preparátů a biodistribuce

Po získání chirurgických preparátů došlo k jejich následujícímu zpracování:

- 1) Udělaly se snímky preparátu. Polaroidem se udělaly snímky z přední části a diapozitivy se zobrazila přední a zadní část snímku.
- 2) Odhadla se velikost chirurgického preparátu.
- 3) Odebraly se biopsie primárního nálezu, z podezřelé lymfatické uzliny a jestliže je to možné také z normální tkáně, která je obsažena v preparátu, jako je normální sliznice, normální lymfatická uzlina, tuk a sval. Všechny biopsie se zvážily a stanovilo se množství ^{99m}Tc . Všechna data se převedla na procenta injektovatelné dávky/jeden kilogram tkáně. Specifické pohlčení radioaktivity do nádoru se hodnotilo porovnáním %ID/kg nádoru s %ID/kg normální tkáně.
- 4) Dále se preparát připevnil na podložku a fizoval se 4% formaldehydem po dobu alespoň 36 hodin.
- 5) Po disekci sternomastoidálního svalu (struktura s vysokou radiodenzitou) se připravil radiograf, aby se zobrazila skutečná velikost a výskyt lymfatických uzlin. Tento

radiograf se provedl, zatímco se preparát ponořil do 96% etanolu, který vykazuje stejnou absorpci X-záření jako tuk.

- 6) Všechny uzliny zviditelněné zářením X se indikovaly polaroidem a na radiografu.
- 7) Všechny uzliny zjištěné testováním chirurgického preparátu a zářením X se z preparátu izolovaly.
- 8) Všechny makroskopicky negativní uzliny se zpracovaly pod mikroskopem a hodnotila se jediná sekce. Ze všech makroskopicky pozitivních uzlin se vytvořily dva nebo více segmentů. Zaznamenal se makroskopický důkaz přítomnosti nebo nepřítomnosti nádorové nekrózy.
- 9) Dále se zaznamenal počet uzlin v preparátu a počet, lokalizace a stupeň klasifikace lymfatických uzlin obsahující nádor (podle klasifikace Memorial Sloan Kattering Cancer Center).

3.5.1.3 Nádorová odezva (Část B)

Parametrem účinnosti radioiminoaterapie je odezva nádoru. Odezva nádoru se hodnotila měřením nádoru, což se provedlo klinicky a/nebo pomocí CT, MRI nebo kostní scintigrafií. Hodnocení se provedlo podle kritéria odezvy Světové zdravotnické organizace (WHO). Doplněk protokolu (R96-0941) označený jako Doplněk VI.

3.5.1.4 Fyzické testy

Před zařazením do studie se hodnotil status onemocnění každého pacienta testem ENT (zahrnuje vyšetření palpací) a CT nebo MRI místa nádoru.

Všechny léze hlavy a krku se popsaly z bočního pohledu.

Palpace

Všichni pacienti byli vyšetřeni otolaryngologistou/specialistou v oblasti chirurgie hlavy a krku. Tito kliničtí specialisté stanovili počet, velikost, umístění nebo pohyblivost všech hmatatelných lymfatických uzlin v oblasti krku a hlavy. Charakter lymfatických uzlin se popisuje jako: není podezření na přítomnost nádoru, existuje podezření přítomnosti nádoru a lymfatické uzliny jsou infiltrovány nádorem. Status krčních lymfatických uzlin se klasifikuje podle systému metastáz nádorů uzlin („Tumor Node Metastasis“ (TNM)) v rámci diagnostiky instituce Union Internationale Contre le Cancer (UICC).

Radiologický test

V závislosti na umístění nádorového místa je nutné provést jeden nebo více následujících testů: CT, MRI, kostní scintigrafie. V případě výskytu nádoru je výhodné provést MRI oblasti krku a hlavy. V případě, že existují kostní léze je výhodné provést CT. V případě části B se všechny parametry radiologického hodnocení opakovaly 6 týdnů po infúzi a každých šest týdnů až do progresu onemocnění nebo ztráty kontroly. V případě pacientů zahrnutých do části B studie se provedlo CT hrudníku a opakovalo se jako kontrola, jestliže se zaznamenaly abnormality. Další technikou zobrazení nádoru je použití ultrazvuku. Popis zkoumání se popisuje dále v textu.

Primární nádor/lokální-regionální léčba

U čtyř pacientů, kteří jsou zařazeni do části A studie a u pacientů s lokální-regionální léčbou (část B) se provedlo CT a/nebo MRI oblasti hlavy a krku.

Počítačová tomografie

Počítačová tomografie oblasti krku a hlavy:

Ve srovnání se spirálovým CT se preferuje dynamické CT. Avšak spirálové CT je možné s výhodou použít v případě pacientů, kteří nejsou schopni spolupracovat.

Test se provede v poloze pacienta ležícího na zádech, krk je slabě zakloněn, hlava je imobilizována a ramena jsou uvolněna a tlačena dolů. Pacient klidně dýchá za použití spíše abdominálních než hrudních svalů. Zobrazení oblasti stanovené z počátečního pohledu se provede v laterální projekci. Rovina zobrazení musí být paralelní k rovině hlasivkových vazů. Rutině se používají navazující pruhy o tloušťce 3 mm. Zobrazení se provede od vrcholku lebky do horní části mezihrudí.

Zobrazení magnetickou rezonancí

Pacienti musí ležet v poloze na zádech, krk slabě hyperextendovaný a hlavu imobilizovanou. Během snímání je nutné, aby pacienti klidně dýchali za použití břišních svalů spíše než hrudních svalů. Získala se vhodná zobrazení k demonstraci anatomie oblasti krku a ke zhodnocení rozsahu primární léze a jejich výskyt v lymfatických uzlinách. Zobrazení se provede od vrcholku lebky do horní části mezihrudí.

Vzdálené metastáze

U všech pacientů zařazených do části B studie se provedlo CT hrudníku. Jako další metoda zobrazení metastáz se může zvolit kostní scintigrafie nebo CT břicha.

CT hrudníku

Použilo se spirálové CT. Pacienti leželi v poloze na zádech a své paže měli zvednuté za hlavou. Pacienti klidně dýchali za použití spíše břišních svalů než hrudních svalů. Snímání pacienta začalo v oblasti nad plícema až do úrovně

nadledvinek. Zobrazení se muselo fotografovat při mediastinálním nastavení a při nastavení v oblasti plic.

CT břicha

Získalo se spirálové zobrazení. Pacienti leželi v poloze na zádech a své paže měli zvednuté za hlavou. Pacienti klidně dýchali. U všech pacientů se použila orálně aplikovaná kontrastní látka. Zobrazená oblast je od oblasti bránice do oblasti symfýzy. Zobrazení se muselo vyfotografovat při nastavení v oblasti břicha a jater.

Kostní scintigrafie

Po intravenózní infúzi maximálně 600 MBq HDP/MDP značené ^{99m}Tc je nutné, aby pacient vypil dostatek tekutin a často se vyprazdňoval. Statické zobrazení se získalo 3 hodiny po infúzi: zobrazení celého těla a, jestliže je to nezbytné, provedly se 3 detailnější zobrazení. Očekávané léze budou potřebovat bližší analýzu pomocí CT a/nebo MRI.

Podle sady kritérií odezvy se mělo provést zaznamenání odezvy kostních metastáz. Data nejsou k dispozici.

3.5.1.5 Rozpustný CD44v6

Stanovila se koncentrace rozpustného CD44v6 (sCD44v6) v seru. Koncentrace se stanovila testem ELISA založeném na běžně dostupné testovací sadě a testy se provedly podle mezinárodního protokolu v instituci „Boehringer Ingelheim Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Biberach, Německo“. Vzorky krve (budou se dále zpracovávat na serum) o objemu 5 ml se odebraly v čase před infúzí, 21, 48 a 144 hodin po infúzi a 6 týdnů po infúzi. Vzorky se nechaly srážet a sraženina se odstranila centrifugací. Podmínky uchovávání a přepravy. Vzorek určený pro test ELISA se uzavřel do kryozkumavek a opatrně se označil, uchovával se při teplotě -

20°C dokud neklesla radioaktivita (v případě ^{186}Re 4 týdny, v případě $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 3 dny) a posílaly se každé čtyři týdny na oddělení B1 instituce „Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism“, Biberach, Německo. Vzorky séra se uchovávaly na suchém ledě.

3.5.1.6 Bezpečnost

Ochrana subjektů

Všichni pacienti se během aplikaci radioaktivně značených monoklonálních protilátek a po ní pozorně sledovali. Pro tyto účely byla k dispozici vždy alespoň jedna osoba.

Laboratorní hodnocení

Shromáždily se vzorky krve, ve kterých se v dále v textu uvedených časech, stanovil obsah glukózy, sodíku, draslíku, vápníku, chloridu, kreatininu, celkového proteinu, albuminu, sérové glutamo-oxaloctová transaminázy (sGOT), sérové glutamát pyruvát transaminázy (sGPT), alkalické fosfatázy (AP), gamma-glutaryltranspeptidázy (GGT), bilirubinu, močoviny, kyseliny močové, tyreotropního hormonu (TSH), hemoglobinu (Hb), hematokritů (Ht), průměrnou hodnotu korpuskulárního objemu (MCV), retikulocytů, leukocytů, neutrofilů, lymfocytů, bazofilů, eosinofilů, monocytů a destiček.

Uvedené časy jsou:

- při testovací návštěvě nebo v den 1 před infúzí a
- 21, 48 a 144 hodin po infúzi.
- v případě části A 6 týdnů po infúzi. V případě části B během 2, 3, 4, 5 a 6 týdnů studie alespoň jednou týdně (častěji v případě toxicity).

Základní laboratorní testy před infúzí se mohly získat buď při testovací návštěvě nebo první den studie, přičemž vzorky se získaly ne dříve než 21 dní před infúzí lidské monoklonální protilátky BIWA 4 a provedla se všechna požadovaná stanovení. Výsledky všech požadovaných laboratorních testů se zaznamenaly a odpovědný praktický lékař kontroloval jejich způsobilost před infúzí protilátky. Stejný způsob se aplikoval v případě aplikace druhé lidské monoklonální protilátky BIWA 4 v části B.

Vzorky moče se shromáždily za účelem provedení standardních testů (stanovení proteinů, krve a glukózy) v těchto časech:

- při testovací návštěvě
- jeden týden po infúzi (144 hodin po infúzi)
- 6 týdnů po infúzi

Těhotenský test se vyžadoval v případě plodných žen při testovací návštěvě a na konci studie.

Stanovení lidských anti-lidských protilátek

Ve vzorcích séra se hodnotila přítomnost a/nebo vývoj HAHA. Proto se vzorky krve (které se zpracovaly na serum) o objemu 5 ml odebraly při testovací návštěvě, jeden týden (144 hodin) a šest týdnů po infúzi protilátky. V případě pacientů, kterým se aplikovala protilátka BIWA 4 dvakrát v části B, se shromáždily další vzorky před druhou aplikací. Množství protilátek v séru se hodnotilo testem ELISA.

Vzorky se nechaly srážet a sraženina se centrifugovala za účelem přípravy séra.

Podmínky uchovávání a přepravy:

Vzorky pro provedení testu ELISA se daly do kryozkumavek, opatrně se označily a uchovávaly se při teplotě -20°C do okamžiku, kdy radioaktivita klesla (v případě ^{186}Re 4 týdny, v případě $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tři dny) a každé čtyři týdny se odesílaly na oddělení BI instituce Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Biberach, Německo. Vzorky séra se posílaly na suchém ledu.

Jakékoliv zvýšení množství lidských anti-lidských protilátek se pozorně porovnávalo s možnými nežádoucími projevy. Tato data se shromažďovala a zpětně se analyzovala během průběhu studie.

Něžádoucí účinky

Všechny nežádoucí účinky se zaznamenávaly do CRF. Nežádoucí projevy se klasifikovaly v souladu s US National Cancer Institute CTC (NCI-CTC) verze 2.0 (verze tohoto dokumentu se získala z internetu <http://ctep.info.nih.gov/CTC3/ctc.htm>). Všechny SAE se zaznamenávaly.

Imunogennost a toxicita

Dříve než se provedla tato studie neexistovaly žádná data s ohledem na bezpečnost a imunogennost lidské monoklonální protilátky BIWA 4. V předešlé studii provedené s parenterální myší protilátkou BIWA 1 se nepočítalo s klinicky podstatnou toxicitou. Nepočítalo se s žádným toxickým účinkem při aplikaci samotné lidské neznačené monoklonální protilátky BIWA 4 (žádné projevy efektoru cytotoxicity zprostředkovaná buňkami závislými na protilátkách (ADCC) in vitro, neočekávala se interference s proliferací buněk vyjadřujícími antigen). Ukázalo se, že lidskou monoklonální protilátku je možné bezpečně aplikovat myším (xenograftová studie) a opicím

(studie toxicity). Ve třech lokálních studiích toxicity se demonstrovala dobrá lokální tolerovatelnost.

Myší a chimerické monoklonální protilátky U36 (protilátka proti epitopu CD44v6 s definovanou specifitou k překrývajícimu se epitopu) byla pro HNSCC pacienty bezpečná. Ve fázi I studie RIT se zvyšující se dávkou s cMAb U36 se neprokázala toxicita s výjimkou myelotoxicity (způsobené značením ^{186}Re). Teoreticky bylo možné, že se může objevit hypersenzitivní reakce na radioaktivně značenou lidskou monoklonální protilátku BIWA 4. Monoklonální protilátky se aplikovaly tisíce pacientům pro diagnostické účely.

Ačkoliv to není pravděpodobné, potencionální reakce na intravenózně zavedenou monoklonální protilátku BIWA 4 může zahrnovat hypotenzi, přechodnou teplotu a zimnici, kožní vyrážku, dyspnoeu, svědění a anafylaxi.

Vitální znaky se proto zaznamenávaly (krevní tlak, teplota, tepová frekvence a dechová frekvence) při testovací návštěvě a v následujícím čase: před infúzí a 10, 60, 120 minut po infúzi a po 6 týdnech po infúzi. V případě pacientů, kteří se začlenily pouze do části B studie se vitální znaky zaznamenávaly 240 minut po infúzi.

Při této studii se použily radionukleotidy. Záření spojené s radionukleotidem emitujícím gamma záření $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (v této studii 20 mCi) bylo podobné záření zaznamenanými rutinními postupy nukleární medicíny a hodnotilo se jako slabé. Aby se minimalizovala expozice močového měchýře a ledvin záření, pacient byl dobře hydratován a musel se vybrzdňovat v krátkých intervalech během prvních 48 hodin (96 hodin po infúzi v případě protilátky značené ^{186}Re).

V případě radionukleotidu ^{186}Re emitujícího beta a gamma záření (popisuje se v publikaci Breitz et al. (R98-2456) se

zjistila maximální tolerovaná dávka monoklonální protilátky IgG značené ^{186}Re u silně předem ošetřených pacientů 90 mCi/m^2 . Jeden z cílů studie bylo zkoumat toxicitu lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re u pacientů, kteří trpí lokálním a/nebo oblastním recidivujícím onemocněním, v případě kterých není možná jiná volba léčby, nebo vykazují vzdálené metastáze. Protože může dojít k výskytu toxicity kostní dřeně, štítné žlázy, ledvin a jater, odebíraly se vzorky krve určené pro testy funkce orgánů, jak se popisuje v sekci 3.5.1.6.

Za účelem sledování úbytku nebo nárůstu tělesné hmotnosti se tělesná hmotnost zaznamenala při testovací návštěvě, před infúzí v den 1 a po 6 týdnech.

U pacientů se sledoval výskyt lokální toxicity. Libovolný znak lokální toxicity se zaznamenával jako nežádoucí jev.

3.5.2 Vhodnost měření

Používaná měření byla dobře přijatelná pro tento typ studie.

3.5.3 Primární účinnost/farmakodynamické proměnné

3.5.3.1 Studie část A

Proměnné primární účinnosti stanovené ve studii v části A byly distribuce v biopsii a radioimunoscintigrafie. Popis metod, které se používají k získání dat, se popisují v sekci 3.5.1.1 a 3.5.1.2.

Pohlčení v normální tkáni a v nádoru se měřilo v biopsiích chirurgického preparátu a pohlčení se vyjádřilo jako procento dávky zavedené injekcí na jeden kilogram ($\% \text{ID/kg}$). Hodnotil se a provnával se časový průběh pohlčení do nádoru a jiných tkání, přičemž se berou v úvahu různé dávky monoklonální protilátky BIWA 4.

3.5.3.2 Studie část B

Primární parametry účinnosti se analyzovaly radioimunoscintigrafií a dozimetrií.

3.5.4 Měření koncentrace léčebného prostředku/farmakokinetika

Koncentrace radioaktivně značené protilátky BIWA 4 v krvi se stanovila ve studii v části A a B.

3.5.4.1 Metody a časování odběru vzorků

Vzorky krve pacientů se odebíraly a zpracovávaly následujícím způsobem: 7 ml krve (3,5 ml krve se odebralo do zkumavky obsahující etylendiamintetraacetát draselný a 3,5 ml krve se odebralo do koagulační zkumavky: požadovaná množství vyjádřená v mililitrech jsou uvedena dodatku 1) se odebralo s periferní žíly protější paže než je místo aplikace infúze v určeném čase (to znamená právě před aplikací protilátky, na konci infúze a 5, 10, 30 minut, 1,2,4,16, 21, 48, 72 hodin po ukončení infúze a 7 dní po infúzi (144 hodin) a 6 týdnů po infúzi). Konec infúze se označil jako $t=0$.

Ve studii v části B se plánovaný odběr vzorků v čase 10 minut a 6 týdnů po infúzi zrušil. Místo toho se vzorky odebraly 240 a 366 hodin po infúzi jak se uvádí v dodatku 1.

Moč se odebírala během 48 hodin po infúzi lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc a během 96 hodin po infúzi lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re . Moč se shromažďovala 0 až 4 hodiny, 4 až 8 hodin, 8 až 12 hodin a 12 až 24 hodin během prvních 24 hodin a ve zbývajícím čase se vzorky odebíraly v intervalu 24 hodin. Sledovala se radioaktivita vzorků moče za účelem stanovení vylučování radioaktivity.

Za účelem přípravy séra se vzorky krve centrifogovaly. Před zpracováním se měřila radioaktivita v celé krvi. Radioaktivita se také stanovila v séru. Obligátní bylo uchovávat vzorky krve v lednici, přičemž uvedené vzorky se nesměly zamrazit. Za použití alikvotu uchovaného z přípravy konjugátu se jako standard připravilo hmotnostní ředění dávky pacienta zavedené injekcí. Stanovení pulzů v případě vzorků pacienta a standardů se provedlo v souladu s lokálním SOP. Výsledky se zaznamenaly do vhodných sekcí CRF. Obsah radionukleotidu se zaznamenal jako procento dávek zavedených injekcí (vyjádřeno jako %ID/kg krve nebo séra). Bez ohledu na stanovení radioaktivity se u všech vzorků zjišťovala přítomnost imunitních komplexů pomocí HPLC.

Označení zkumavek zahrnovaly následující informace: číslo studie, číslo pacienta, identifikaci vzorku (to znamená, zda jde o serum, plazmu nebo krev), čas vztažený k infúzi, skutečný čas, skutečné datum a izotop (to je ^{99m}Tc nebo ^{186}Re). Měřil se a zaznamenával se objem každého vzorku a na označeních všech vzorků moče jsou uvedeny následující informace: číslo studie, číslo pacienta, celkový objem vzorku, interval odebrání, skutečný čas, datum a izotop (to je ^{99m}Tc nebo ^{186}Re).

Datum, časy a výsledky měření radioaktivity všech farmakokinetických vzorků se zaznamenávaly do CRF.

Vzorky plazmy v případě testu ELISA se přenesly do kryozkumavek a pozorně se značily a uchovával se při teplotě -20°C dokud neklesla radioaktivita (v případě ^{186}Re 4 týdny, v případě ^{99m}Tc 3 dny) a posílaly se každé čtyři týdny na oddělení B1 instituce „Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism“, Biberach, Německo. Vzorky plazmy se uchovávaly na suchém ledu.

3.5.4.2 Analytická stanovení

Vzorky plazmy se zkoumaly testy ELISA v instituci „Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism“, Biberach, Německo. Stanovení radioaktivity se provedlo ve vzorcích plné krve, v séru a moči.

3.5.4.3 Parametry a hodnocení

Následující farmakokinetické parametry se stanovily za použití WinNonlin 3.1 Professional (Pharsight Corporation, Mountain View, Kalifornie) v celé krvi, v plazmě, v séru.

Primární farmakokinetické parametry jsou čas, při kterém se pozorovala maximální koncentrace léčebného prostředku (T_{max}), maximálně pozorovaná koncentrace léčebného prostředku (C_{max}), plocha pod křivkou koncentrace-čas (AUC) $_{0-\infty}$, konečná eliminace poločasu rozpadu ($t_{1/2}$), objem distribuce (konečná fáze a předpokládané klidové stádium), celková tělesná clearance (CL) a střední doba zdržení (MRT) $_{0-\infty}$.

Primární cíle farmakokinetické analýzy jsou:

Stanovení a porovnání rozmístění celkové radioaktivity a imunoreaktivní lidské monoklonální protilátky BIWA 4 po aplikaci jediné dávky lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc (část A) a lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re (část B).

Vypočítání frakce radioaktivity zavedené injekcí obsažené během studie v játrech a ve slezině za použití dat ze zobrazení a dat z krevních testů. Po dosažení těchto cílů se použil software WinNonlin®, aby se provedla, po intravenózní aplikaci, farmakokinetická analýza koncentrace plazmy verzus časové profily imunoreaktivní lidské monoklonální protilátky BIWA 4 a stupně radioaktivity celé krve, jako funkce času.

Výsledky jsou zaznamenány jako statistické přehledy.

3.5.5 Farmakokinetický/farmakodynamický vztah

Za účelem popsání distribuce a metabolismu monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re u člověka se použil částečný farmakokinetický model. Kombinovaly se data popisující koncentraci BIWA 4 v plazmě, v plné krvi a stanovení radioaktivity v séru, a data o radioaktivitě získaná ze zobrazení celého těla a specifických oblastí, dále data o aplikované dávce monoklonální protilátky značené ^{186}Re , o dávce neznačené monoklonální protilátce BIWA 4, o množství rozpustného CD44v6 a stanovení radioaktivně značené protilátky před infúzí.

Výsledky se zaznamenávají jako statistické přehledy. Avšak kolísání bylo velmi vysoké, aby se data mohla použít pro vytvoření významného modelu.

3.5.6 Primární proměnná bezpečnosti

Stanovení maximální tolerované dávky a stanovení bezpečnosti byly primární konečné body studie části B. Měření se provedlo způsobem popsáným v sekci 3.5.1.6.

3.5.6.1 Dávka mezní toxicity a maximální tolerovaná dávka

DLT se definuje jako nehematologická toxicita CTC stupeň 3 spojená s aplikací léčebného prostředku nebo hematologická toxicita CTC stupeň 4 spojená s aplikací léčebného prostředku. Zahrnuje nauseu a zvracení adekvátní antiemetické léčbě.

MTD se definuje jako dávka, při které se méně než u dvou pacientů ze šesti vyvinula DLT spojená s aplikací léčebného prostředku.

3.6 Data zabezpečení kvality

Studie se v obecném případě provedla podle principů GCP jak se specifikuje ve vhodných předpisech a ve standardech chirurgických zákroků, které odrážejí tyto předpisy.

V průběhu studie reprezentant firmy Boehringer Ingelheim The Netherlands navštívil místo výzkumu, aby sledoval pokračování studie. Docházelo k častým kontaktům a návštěvám za účelem provedení auditu dat zahrnující porovnání zdrojových dokumentů s CRF a kontroly účinnosti léčebného prostředku. Osoby odpovědné za výzkum musely spolupracovat se zástupci firmy Boehringer Ingelheim The Netherlands během jejich návštěv.

CFR se shromažďovaly. Pořizovaly se kopie dat. Prováděla se kontrola dat a nepřijatelná data se diskutovala s pracovníky odpovědnými za klinickou studii.

Vážné nežádoucí projevy se zaznamenávaly způsobem definovaným v protokolu a v CRF a podle SOP firmy Boehringer Ingelheim.

3.7 Statistické metody planované v protokolu a stanovení rozsahu výběrového souboru

3.7.1 Statistické a analytické plány

3.7.1.1 Statistický projekt/model

Statistickým modelem při této studii se běžně používá ve fázi I onkologických studiích.

Část A

Část A fáze I této studie byla neřízená, sekvenční skupinová studie s rostoucí dávkou, jejímž cílem je stanovení bezpečnosti, tolerovatelnosti, biodistribuce a farmakokinetiky lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc aplikované

jedinou infúzi pacientům s pokročilým stádiem spinocelulárního karcinomu v oblasti hlavy a krku.

V této části studie se použily tři odlišné dávky lidské monoklonální protilátky BIWA 4, kdy pro každou dávku se plánovali tři pacienti. U všech pacientů se prokázal nádor v oblasti hlavy a krku a byli způsobilí pro chirurgický zákrok.

Část B

Část B fáze I této studie byla otevřená neřízená studie s rostoucí dávkou, jejímž cílem je stanovení bezpečnosti, tolerovatelnosti, MTD, farmakokinetiky a předběžných terapeutických účinků lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re aplikované jedinou infúzí pacientům s pokročilým stádiem spinocelulárního karcinomu v oblasti hlavy a krku, pro které nejsou dostupné jiné možnosti léčby.

V této části studie se zvyšovala dávka radiace. Dvěma pacientům se aplikovala dávka, při které se pozoroval stupeň toxicity nižší než je stupeň toxicity 2 CTC. Jestliže se pozoroval stupeň toxicity vyšší nebo roven stupni toxicity 2, musela se dávka aplikovat alespoň třem pacientům.

Hodnocení bezpečnosti a tolerovatelnosti (část A + B)

Bezpečnost a tolerovatelnost studie se hodnotily jako změny laboratorních parametrů, vitálních znaků, vývoj HAHA a výskytu nežádoucích projevů. Výsledky se zaznamenávaly odděleně pro každou dávku stejně jako průměrné hodnoty.

Hodnocení biodistribuce (část A)

Biodistribuce lidské monoklonální protilátky značené $^{99\text{m}}\text{Tc}$ v pevné tkáni se hodnotila radioimunoscintigrafií (popisuje se v sekci 3.5.1.1) a měřením radioaktivity biopsií (popisuje se

v sekci 3.5.1.1 a 3.5.1.2). Protože jedna dávka se aplikovala pouze třem pacientům, pro zpracování výsledků byla možná pouze popisná statistika.

Hodnocení imunoscintigrafického zobrazení (část A + B)

V daných časech po aplikaci radioaktivně značené protilátky se získalo imunoscintigrafické zobrazení (uvedeno v sekci 9.5.1.1). Opět se použila pouze popisná statistika.

Farmakokinetické hodnocení (část A + B)

Následující farmakokinetické parametry se stanovily z plazmy nebo séra, z moče a dat zobrazení, jak se popisuje dále v textu:

Primární parametry

T_{max} , C_{max} , $AUC_{0-\infty}$, konečná eliminace poločasu rozpadu ($t_{1/2}$), objem distribuce (konečná fáze V_z a předpokládané klidové stádium V_{ss}), celková tělesná clearance (CL) a střední doba zdržení (MRT) $_{0-\infty}$. Kumulativní urinární exkrece radioaktivity v průběhu času se stanovila z celkového objemu moče.

Sekundární parametry

Plánovalo se vyvinutí částečného farmakokinetického modelu za účelem definování distribuce a metabolismu lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re u lidí. Model porovnával data získaná z měření radioaktivity v séru a v moči, radioaktivity ze zobrazení celého těla a specifických oblastí, aplikovanou dávku lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re , množství rozpustného CD44v6 a stanovení radioaktivně značené protilátky před infúzí.

Plánovalo se zaznamenávat výsledky odděleně pro každou dávku a jako průměrné hodnoty statistických souhrnů.

Hodnocení terapeutického účinku (část B)

Odezva nádoru je parametr terapeutické účinnosti. Odezva nádoru se hodnotila podle pravidel WHO. Součet produktů největšího svislého průměru všech měřených nádorových lézí je primárním parametrem odezvy nádoru. Existuje oddělené kritérium pro hodnocení odezvy kostních lézí.

3.7.1.2 Nulová a alternativní hypotézy

Všechny analýzy této studie byly svou podstatou popisné a ověřovací. Libovolné statistické testy se provedly pouze, aby poskytly statistický základ, ze kterého je možné plánovat cíle a průběh dalších studií. Předvídaly se neformální statistické inference a provedly se testy, které nejsou statistické.

3.7.1.3 Plánované analýzy

Odlišily se dvě populace:

- Záměr léčit podmnožinu všech pacientů, kterým se aplikovala infúze radioaktivně značené lidské monoklonální protilátky BIWA 4 a v případě kterých byla data dostupná.
- Podmnožina podle protokolu zahrnuje hodnotitelné pacienty. Pacient může být hodnocen pokud splňuje následující kritéria:

Část A

1. Zcela splňuje kritéria pro záměr léčit podmnožinu pacientů.
2. Sledování nežádoucích účinků, vitálních znaků a bezpečnosti vzorků krve a moče bylo adekvátní.
3. Imunoreaktivní frakce v alespoň jednom ze dvou provedených testů byla větší než 60 %.
4. Adekvátní biopsie a scintilační zobrazení byly hodnotitelné pro stanovení biodistribuce.

Část B:

1. Zcela splňuje kritéria pro záměr léčit podmnnožinu pacientů.
2. Sledování nežádoucích účinků, vitálních znaků a bezpečnosti vzorků krve a moče bylo adekvátní.
3. Imunoreaktivní frakce v alespoň jednom ze dvou provedených testů byla větší než 60 %.
4. Odezva: Je možné hodnotit odezvu pacienta (Pts.), jestliže se získalo adekvátní měření nádoru a jestliže pacienti byli sledováni alespoň šest týdnů. Jestliže se během období šest týdnů pozorovalo postup onemocnění, u pacientů se také hodnotila odezva.

Primární analýzy

Primární analýza se provedla v podmnožině podle protokolu.

Nahradili se pacienti, které není možné hodnotit. V případě části A se plánovalo, že hodnotitelná podmnožina bude zahrnovat 9 pacientů. V případě části B počet pacientů závisí na skutečnosti, zda dojde k toxickému účinku. Pacienti, u kterých se hodnotila toxicita, ale ne odezva, nebyli nahrazeni.

Farmakokinetická data:

Analýzu farmakokinetických dat provedl Dr. Thomas R. MacGregor, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc. Ridgefield CT, USA.

Primární parametry farmakokinetické analýzy byly:

1. Stanovení a porovnání rozmístění celkové radioaktivity a imunoreaktivní lidské monoklonální protilátky BIWA 4 po aplikaci jediné dávky lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc a lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re .

2. Identifikace vhodné dávky lidské monoklonální protilátky BIWA 4.
3. Stanovení rozdělení druhé dávky lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re .
4. Výpočet frakce radioaktivity zavedné infúzí, která se objevuje v játrech a ve slezině za použití dat ze zobrazení a z krevních testů. Aby se dosáhlo uvedeného cíle, provedla se po intravenózní aplikaci za použití softwaru WinNonLin® farmakokinetická analýza koncentrace v plazmě verzus časový profil imunoreaktivní lidské monoklonální protilátky BIWA 4 a stupeň radioaktivity v celé krvi, jako funkce času. Libovolná měření zahrnující radioaktivitu se vztahují k frakci radioaktivního značení vázaného na protein a je imunoreaktivní před infúzí. Vytvořené specifické farmakokinetické parametry zahrnují: $T_{\max}$, $C_{\max}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$, terminální eliminace poločasu rozpadu, objem distribuce (terminální fáze a předpokládané klidové stádium), clearance celého těla a střední doba zdržení ($0 \rightarrow \infty$). Kumulativní urinární exkrece radioaktivity v čase se stanovila z celkového objemu moči.

Sekundární cíle farmakokinetické analýzy vytvořit farmakokinetický model, který bude popisovat distribuci a metabolismus lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{186}Re u lidí, se nesplnil vzhledem k vysokému kolísání dat (zvláště radioscintigrafická data).

Sekundární analýza

Sekundární analýza se provedla za účelem léčit podmnnožinu pacientů, kteří jsou začleněni do studie části B.

Sekundární analýza se omezila na klíčové body: podíl odpovědi, doba trvání odpovědi, čas postupu onemocnění.

Předběžná analýza

Předběžná analýza se neprovedla.

3.7.1.4 Ošetření chybějících dat

Ve fázi I studie se očekávalo, že většina dat je pro analýzu dostupných. V případě chybějících dat bylo velmi pravděpodobné, že důvod nesouvisí s koncem studie. Chybějící data nebyla začleňována.

3.7.2 Stanovení rozsahu výběrového souboru

V části A studie tři pacienti, kterým se aplikovala jedna výška dávky, umožňují získat informace o bezpečnosti lidské monoklonální protilátky BIWA 4 a o předpokládané optimální dávce 50 mg neznačené lidské monoklonální protilátky BIWA 4.

V části B studie se šest pacientů považuje za dostatečný počet pro stanovení DLT. Tabulka 3.7.2.1 vykazuje pravděpodobnost 2 nebo více ze šesti pacientů, u kterých se projevila DLT, a předpokládané frekvence výskytu DLT v populaci všech pacientů.

Tabulka 3.7.2.1 Předpokládaná frekvence DLT v populaci

	0,40	0,42	0,45
Pravděpodobnost pozorování DLT u dvou nebo více ze šesti pacientů	0,77	0,80	0,84

Zdroj: Pravděpodobnost vypočtená z kumulativní distribuční funkce binomiální distribuce s hodnotou $n=6$ a s kolísáním hodnot p' .

Vzhledem ke schématu zvyšování radioaktivity existuje pravděpodobnost alespoň 80 % v případě 2 nebo více pacientů, kteří vykazují DLT, v případě, že individuální pravděpodobnost pro pacienta, že dosáhne DLT je 42 % nebo vyšší.

3.8 Změny v provedení studie nebo v plánovaných analýzách

Následující změny v protokolu byla začleněny prostřednictvím dodatku.

Časy odběru vzorků krve se upravily začleněním dodatku č. 1 z 1. září 1999. Odběry vzorků 10 minut a 6 týdnů po infúzi se vynechaly, zatímco další vzorky se odebraly po 240 a 336 hodinách po infúzi v části B studie. Ukázalo se, že původní plán odběru vzorků nebyl dostatečný, aby adekvátně pokryl předpokládaný poločas rozpadu 50 hodin, který se pozoroval v části A studie. Celkem se odebralo 3,5 ml krve do zkumavky obsahující etylendiamintetraacetát draselný a 3,5 ml do koagulačních zkumavek.

Protokol uvádí, že pacientům je možné aplikovat druhou dávku ^{186}Re -BIWA 4 po té, co se u nich stanovila MTD. Tento postup se upravil v dodatku č. 2. Pacienti se považují za vhodní pro druhý cyklus léčby v případě, že odpovídají na první aplikaci ^{186}Re -BIWA 4, neobjevily se u nich žádné nežádoucí účinky nebo tyto nežádoucí účinky pominuly a neprokázaly se protilátky HAHA. Odezva se definovala jako stabilní onemocnění (to je bez změn), částečná remise nebo úplná remise. Druhá aplikovaná dávka byla 50 mCi/m². Na základě změny linkeru se studie ukončila dříve, než se zkoumala druhá dávka s dávkovacím režimem popsáným v protokolu. Další léčba pacientů, kteří vyzkazovali odezvu, se popisuje v dodatku 2.

Studie se zakončila po dosažení MTD na základě změny linkeru. MAG3 se nahradil MAG2GABA-TFP.

Vzorky dostupné pro stanovení sCD44v6 se odebírali častěji, než bylo původně plánováno.

Následující změny se provedly po získání dat a na základě diskuze s týmem provádějícím studii.

zahrnuto	3	4	3	2	4	3	6	5	30
ošetřeno	3	4	3	2	4	3	6	5	30
dokončilo	3	4	3	2	3	2	6	5	28
přerušilo	0	0	0	0	1	1	0	0	2
způsobeno AE	0	0	0	0	1	1	0	0	2
způsobeno nízkou účinností	0	0	0	0	0	0	0	0	0
jiné důvody	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Zdroj dodatek 16.1.9.2, tabulka 1.1

4.2 Odchyly od protokolu

Většina porušení protokolu byly odchyly (větší než přibližně 10 %) od časových intervalů uvedených v protokolu pokud jde o vzorky krve a/nebo moče. Postižení pacienti nebyli vyjmuti z analýzy, ale při stanovení koncentrací v krvi, plazmě, v séru a moči použil skutečný čas pro odebrání vzorků krve a moče.

5. Hodnocení účinnosti/klinické farmakologie

Výsledky z části A potvrdily, že dávka 50 mg monoklonální protilátky BIWA 4 je optimální dávkou pro léčbu. Data části B studie indikují, že pro pacienty je klinicky výhodná léčba pomocí ^{186}Re -BIWA 4 v případě, že dávka záření je nižší než dávka, při které se pozorovalo DLT.

Získané koncentrace BIWA 4 byly úměrné dávce a malé množství aplikované dávky se vylučovalo prostřednictvím ledvin.

5.1 Analyzované sady dat

Všichni pacienti, kterým se aplikovala alespoň jedna dávka léčebného prostředku, se zahrnuli do analýzy zaměřené na léčbu. Sedm pacientů z části A se začlenilo do analýzy podle protokolu. V části B se neprovedla analýza podle protokolu.

5.2 Demografie a jiné základní charakteristiky

Průměrný věk všech pacientů zahrnuje 56 let (v rozmezí 37 až 78 let). Devatenáct pacientů byli muži a jedenáct pacientů byly ženy (tabulka 5.2:1).

Tři pacienti léčení v části A nikdy nekouřili, zatímco sedm pacientů jsou kuřáci (rozmezí věku pacientů v souboru je 19 až 47 let). Časté požívání alkoholu se uvádí u osmi pacientů, zatímco dva byli abstinenti (tabulka 5.2:1).

Všichni pacienti v části B byli buď bývalí kuřáci nebo současní kuřáci (tabulka 5.2:1) s průměrným věkem 35 let (v rozmezí 10 až 86 let). Šest pacientů byli abstinenti, zatímco zbývalí pacienti byli častými konzumenty alkoholu (tabulka 5.2:1).

Stádium onemocnění u všech pacientů v části A bylo lokální s možným chirurgickým zákrokem, zatímco v případě pacientů v části B jde o recidivu (15 pacientů) a/nebo o výskyt metastáz (3 pacienti). Jeden pacient vykazoval lokální onemocnění, kde nebyla možnost zvolit chirurgický zákrok. V případě jednoho pacienta informace chybí.

Souběžná onemocnění nebo relevantní anamnéza je známa u 28 pacientů (tabulka 5.2:1). Souběžná terapie byla nutná u všech pacientů. Nejběžněji používané léčebné prostředky jsou analgetika, sedativa, laktulóza, H₂-bloker, antiemetická a antimikrobiální činidla.

Tabulka 5.2:1: Demografie a základní charakteristiky. Dány jsou průměrné hodnoty stáří. Všechny jiné obrázky značí čísla pacientů.

	část A			část B					celkem
	^{99m} Tc-BIWA 4			¹⁸⁶ Re-BIWA4 (mCi/m ²)					
	25mg BIWA4	50mg BIWA4	100mg BIWA4	20	30	40	50	60	

počet	3	4	3	2	4	3	6	5	30
věk (průměrná hodnota)	45,7	58,5	58,7	57	61	53	57	60,4	56,4
muž/žena	2/1	2/2	1/2	1/1	3/1	2/1	5/1	3/2	19/11
souběžné onemocnění	3	3	2	2	4	3	6	5	28
souběžná terapie	3	4	3	2	4	3	6	5	30
kuřáci	2	4	1	0	1	0	3	1	12
bývalí kuřáci	0	0	0	2	3	3	3	4	15
konzumenti alkoholu	3	3	2	0	3	3	6	2	22

Počáteční diagnóza onemocnění byla známa u pacientů z části A přibližně jeden měsíc před začleněním do studie, zatímco pacienti, kteří jsou začleněni do části B studie trpěli onemocněním v průměru dva roky (rozmezí 0,1 až 17,5 let, tabulka 5.2:2). Skóre podle Karnofsky je v rozmezí 70 až 100 u pacientů z části A. Pacienti z části B vykazovaly skóre podle Karnofsky 70 až 90 (tabulka 5.2:2).

Metastáze se ve studii v části B objevily u jednoho pacienta.

Všichni pacienti v části B prodělali radioterapii a/nebo chemoterapii, zatímco pacienti v části A neprodělali ani chemoterapii ani radioterapii (tabulka 5.2:2). Nejčastějšími používanými systémovými léčebnými prostředky určenými proti zhoubnému bujení je cisplatina, metotrexát a fluorouracil.

Chirurgický zákrok byl u 11 z 13 pacientů v části B, kteří prodělali předchozí chirurgický zákrok, radikální (tabulka 5.2:2).

Velikost nádorů (zahrnující metastáze) byla v rozmezí 14 mm² až 10304 mm². U většiny pacientů místo primárního nádoru bylo středně diferenciováno. Lymfatické žlázy byli zasažené u 13 pacientů (tabulka 5.2:2).

Tabulka 5.2:1: Demografie a základní charakteristiky. Dány jsou průměrné hodnoty stáří. Všechny jiné obrázky značí čísla pacientů.

	část A			část B				
	^{99m} Tc-BIWA 4			¹⁸⁶ Re-BIWA4 (mCi/m ²)				
	25mg BIWA4	50mg BIWA4	100mg BIWA4	20	30	40	50	60
počet	3	4	3	2	4	3	6	5
počet let s onemocněním	0,11	0,08	0,07	9,3	2,13	1,17	0,8	1,16
skóre podle Karnofsky	90	90	100	80	75	76,7	85	80
radikální chirurgický zákrok	0	0	0	2	2	1	2	4
zasažené lymfatické žlázy	2	2	0	2	3	2	1	1
předchozí chemoterapie	0	0	0	1	3	1	4	1
předchozí radioterapie	0	0	0	2	4	3	6	5

5.3 Hodnocení dodržování léčby

Všechny léčebné prostředky se aplikovaly za dohledu vědců nebo jejich asistentů. Krev se odebírala za účelem stanovení farmakokinetiky protilátky BIWA 4. Všichni pacienti vykazují v krvi detekovatelné množství protilátky BIWA 4.

5.4 Účinnost/výsledky klinické farmakologie

Tři ze šesti pacientů dosáhli stabilního stádia onemocnění při maximální tolerované dávce 50 mCi/m². V části A studie se potvrdilo, že dávka 50 mg BIWA 4 je optimální dávkou, co se týká koncentrací v krvi a selektivní pohlcení nádorem. Koncentrace BIWA 4 v plazmě byla přímo úměrná dávce v rozmezí 25 až 100 mg BIWA 4 v části A a vrcholem v čase 0,9 hodin s terminálním eliminačním poločasem 54 až 74 hodin a 94 hodin v případě části A respektive části B.

5.4.1 Analýza účinnosti/farmakodynamika

5.4.1.1 Primární konečné body

Primární konečný bod v případě účinnosti byl biodistribuce lidské monoklonální protilátky značené ^{99m}Tc v části A. Dalšími primárními konečnými body byly analýzy radioimunoscintigrafických zobrazení a farmakokinetiky (popsané v sekci 5.4.2) v případě části A respektive B. Dozimetrie se provedla pouze v části B.

Biodistribuce ^{99m}Tc -BIWA 4 v části A

Vzorky tkáně se získaly během chirurgického zákroku a pohlčení ^{99m}Tc -BIWA 4 exprimované jako % injektovatelné dávky (ID)/kg tkáně.

Podmnožina určená k léčbě (ITT):

Relativní biodistribuce ^{99m}Tc -BIWA 4 byla nejvyšší v nádoru u všech třech skupin dávky s výjimkou pacienta 1 (25 mg BIWA 4), pacienta 5 (50 mg BIWA 4, žádné nádorové buňky) a pacienta 9 (100 mg BIWA 4). Pohlčení nádorem se pohybuje v rozmezí od 6 do 17 % ID/kg, 5 do 28 % ID/kg a 13 až 17 % ID/kgv případě skupiny, kde se aplikovala dávka 25 mg, 50 mg respektive 100 mg. Vypočítaný průměrný poměr pohlčení nádorem verzus pohlčení kostní dřeně byl 1,7, 2,6 a 2 ve skupině, kde se aplikovala dávka 25 mg, 50 mg respektive 100 mg (tabulka 7.2:1 a 7.2:2).

Podmnožina podle protokolu (PP):

Relativní biodistribuce lidské monoklonální protilátky značené ^{99m}Tc BIWA 4 byla nejvyšší u nádoru ve všech třech skupinách s výjimkou pacienta 1 (aplikovala se dávka 25 mg BIWA 4). Pohlčení nádorem je v rozmezí 6 až 17 %ID/kg, 23 až 28 %ID/kg a 16 % ID/kg v případě skupiny, kde se aplikuje dávka 25 mg, 50 mg respektive 100 mg. Vypočítaný průměrný poměr pohlčení nádoru verzus pohlčení kostní dřeně byl 1,7,

3,2 a 2,5 ve skupině, kde se aplikovala dávka 25 mg, 50 mg respektive 100 mg (tabulka 7.2:1 a 7.2:3).

Trend směřující k silnějšimu pohlcení s menší velikostí nádoru se jeví ve skupině, kde se aplikovala dávka BIWA 4 25 mg. Podobné hodnocení není možné v případě skupin, kde se aplikovala BIWA 4 v dávce 50 mg a 100 mg, což je způsobeno omezeným počtem pacientů (tabulka 7.2:4).

Silné pohlcení %ID/kg se pozorovalo v supernatantu kostní dřeně (až 17 %ID/kg) a v plazmě nebo v krvi (až 13 %ID/kg), který byl vždy nižší než pohlcení v nádoru v populaci podle protokolu s výjimkou pacienta 1 (25 mg BIWA 4). Pohlcení kůží a sliznicí bylo vždy nižší než pohlcení primárním nádorem v podmnožině podle protokolu.

Radioimunoscintigrafická zobrazení ^{99m}Tc -BIWA 4 v části A

Zatímco se nezjistilo žádné pohlcení radioaktivity nádorem přímo po infúzi, po 21 hodinách došlo k pohlcení médiem 1,9. Pohlcení radioimunokonjugátu se jeví být nižší v kostní dřeni a v ledvinách přímo po infúzi a 21 hodin po infúzi. V porovnání s médiem pohlcení v plicích bylo nízké, zatímco pohlcení v játrech bylo vyšší.

Podobný patern se pozoroval v populaci podle protokolu. Jediným rozdílem se jeví být vyšší pohlcení v ledvinách, zatímco pohlcení v plicích bylo nižší ve srovnání s populací určenou pro léčbu.

Radioimunoscintigrafická zobrazení ^{186}Re BIWA 4 v části B

Radioimunoscintigrafické testy se provedly bezprostředně po infúzi a 21, 48, 72, 144 a 336 hodin po infúzi. Pohlcení nádorem přímo po infúzi nebylo prakticky patrné. Relativní pohlcení v nádoru se jeví být závislé na dávce a časem roste

až dosáhne středního a vysokého pohlcení po 72 až 144 hodinách s poklesem po 336 hodinách.

Biodistribuce radioaktivity byla podobná v kostní dřeni, v plicích, játrech, ledvinách a ve střevech a nepotvrdil se stejný účinek závislý na dávce (s výjimkou střev). Relativní pohlcení radioaktivity se jeví být konstantní nebo časem slabě klesá a je podobné v případě všech dávek radioaktivity. Pohlcení kostní dřeni je nejnižší v případě většiny skupin.

5.4.1.2 Sekundární koncové body

Sekundární koncové body účinnosti byly nádorová odezva na léčbu v části B a síla exprese CD44v6 v nádoru v části A. Exprese rozpustného CD44v6 se stanovila v případě obou částí studie.

Exprese CD44v6 v nádoru v části A

V případě sedmi pacientů jsou dostupná data o expresi antigenu CD44v6. Exprese antigenu CD44v6 se pozorovala ve více než 90 % a 80 % nádorových buněk u pěti a dvou pacientů, zatímco exprese antigenu CD44v6 se detekovala ve více než 90 % buněk metastáz lymfatických uzlin u čtyř pacientů, jejichž lymfatické žlázy byly dostupné pro hodnocení. Homogenní exprese antigenu CD44v6 se pozorovala u všech pacientů ve sliznici.

Odezva nádoru v části B

Pacienti, kterým se aplikovaly dávky 40 mCi/m^2 $^{186}\text{Re-BIWA}$ 4, nevykazují odezvu nádoru. Všichni pacienti vykazují postupující onemocnění. U jednoho pacienta odezvu nádoru nebylo možno hodnotit vzhledem k jeho úmrtí.

U tří ze šesti pacientů, kterým se aplikovalo 50 mCi/m^2 $^{186}\text{Re-BIWA}$ 4, se vyvinulo stabilní onemocnění a nedošlo ke

změnám během prvního cyklu. Dva z těchto tří pacientů, kterým se aplikovala v jiném cyklu dávka 50 mCi/m^2 ^{186}Re -BIWA 4, vykazovali postupující onemocnění po druhém cyklu. Postupující onemocnění se pozorovalo po celkem 148 dnech (pacient 109) a 127 dnech (pacient 116) po první aplikaci léčebného prostředku.

Jeden pacient, kterému se aplikovalo 60 mCi/m^2 ^{186}Re -BIWA 4, vykazuje stabilní onemocnění po druhém cyklu s dávkou 50 mCi/m^2 ^{186}Re -BIWA 4 (173 dní po aplikaci léčebného prostředku).

Čas postupu pacientů, kteří neodpovídají na léčbu je v rozmezí 0 až 55 dní s průměrnou hodnotou přibližně 5 až 6 týdnů bez ohledu na léčebnou skupinu.

Rozpustný CD44v6 v části A a B

Rozpustný CD44v6 se stanovil u všech pacientů ošetřených lidskou monoklonální protilátkou BIWA 4.

Množství rozpustného CD44v6 se detekovalo za účelem zvýšit ^{186}Re -BIWA 4 u ošetřených pacientů (tabulka 7.2:6) během studie v části B, zatímco u pacientů ošetřených s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ v části A není možné pozorovat takový trend.

5.4.2 Dávka léčebného prostředku, koncentrace léčebného prostředku a vztah k odezvě

Farmakokinetiky BIWA 4 jsou přítomné odděleně v případě části A a B, protože radioaktivní značky se liší (část A: $^{99\text{m}}\text{Tc}$, část B: ^{186}Re).

5.4.2.1 Analytická činnost s ohledem na monoklonální protilátku BIWA 4, HAHA a CD44v6

Za účelem analýzy vzorků plazmy se používaly potvrzené testy. Analýza kvality kontrolních vzorků produkuje výsledky s vysokou přesností a správností.

Analýza s ohledem na počítání impulzů gamma záření ve vzorcích

Neprovedly se testy signální linearity scintilačního krystalu. Na základě typu přístroje alespoň v rozmezí energie ve studii se použil uvedený krystal. Kalibrační vzorky vykazovaly v typickém případě 40 000 až 200 000 pulzů za minutu, přičemž ve vzorcích pozadí vykazují méně než 50 až 100 pulzů za minutu. Přesnost sedmi měření v kalibračním standardu je běžně 2 %. To samé platí v případě jednotlivých měření v krvi, séru a v moči. Vzorky krve a sera vykazovaly typickou aktivitu mezi 2 000 a 100 000 pulzů za minutu.

V případě stanovení radioaktivity neexistují vzorky pro kontrolu kvality. Přesnost opakovaného měření kalibračních standardů a vzorků získaných ze současné studie indikuje, že přesnost třech měření byla alespoň lepší než 2 %.

5.4.2.1 Farmakokinetika

Část A

Část A zahrnuje 10 pacientů, kterým se aplikovala jediná dávka lidské monoklonální protilátky BIWA 4 v rozmezí 25 až 100 mg s konstantní radioaktivně značenou dávkou 20 mCi ^{99m}Tc . Farmakokinetické parametry v plazmě v případě protilátky BIWA 4 měřené testem ELISA po krátké intravenózní infúzi jsou uvedeny v tabulce 5.4.2.2:1

Tabulka 5.4.2.2:1 Farmakokinetické parametry v případě protilátky BIWA 4 v plazmě v části A studie

pacient	BIWA4 dávka (mg)	tmax (min)	Cmax (ng/ml)	poločas rozpadu (h)	AUC _{inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	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	9590	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 průměr								
	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

Pozorovalo se zvýšení koncentrací $C_{\max}$ BIWA 4 v plazmě a plocha pod křivkou je úměrná aplikované dávce (obrázky č. 4 a 5).

Také se v séru stanovily koncentrace a farmakokinetické parametry radioaktivního značení ^{99m}Tc . Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.4.2.2:2.

Tabulka 5.4.2.2:2 Farmakokinetické parametry pro ^{99m}Tc -BIWA 4 v séru v případě části A studie

pacient	^{99m}Tc - BIWA4 dávka (mCi)	$T_{\max}$ (min)	$C_{\max}$ (%ID/ml)	poločas rozpadu (h)	AUC_{inf} (%ID.h/kg)	V_z (kg)	CL (kg/min)	MRT (h)
1	19,0	117	52,66	44,6	3376,9	1,9	0,030	63,8
2	20,0	10	28,08	55,6	2152,7	3,7	0,0048	79,1
3	21,4	10	39,11	27,5	1445,3	2,7	0,072	41,5
4	19,5	29	31,84	31,3	1432,8	3,2	0,072	43,8
5	19,1	121	32,29	39,6	1934,8	3,0	0,054	56,3
8	18,8	114	28,41	42,8	1620,1	3,8	0,060	60,8
10	19,3	41	40,31	43,1	2247,1	2,8	0,042	62,3
6	19,3	120	30,45	45,3	1946,5	3,4	0,054	65,2
7	19,8	77	35,79	36,0	1628,6	3,2	0,060	51,1
9	18,3	238	31,94	35,5	1805,6	2,8	0,054	50,6

harmonický průměr			38,7				
geometrický průměr	57,9	34,5	39,4	1898,0	3,0	0,053	56,5

Geometrický průměr poločasu rozpadu lidské monoklonální protilátky BIWA 4 měřený testem ELISA v plazmě po intravenózní infúzi v rozmezí 54 až 73,8 hodin v případě tří léčených skupin studovaných v části A. Geometrický průměr poločasu rozpadu v případě lidské monoklonální protilátky BIWA 4 značené ^{99m}Tc v případě některých vzorků byl kratší než 39,4 hodin v séru a 46,4 hodin v krvi. Odchylka mezi dvěma průměrnými odhady se přisuzuje delšímu testovacímu času možnému s protilátkou BIWA 4, které jsou dány omezením testů pro stanovení radioaktivity

Radioaktivita se vylučovala do moče v množství uvedeném v tabulce 5.4.2.2:3. Vzhledem k neúplným odběrům po dobu 48 hodin, (to znamená, že kumulativní data nemusí být vždy porovnatelná, vzhledem k trvání odběrů) se neprovádělo další hodnocení dat spojených s vylučováním radioaktivity do moče. V případě šesti pacientů s kompletními odběry moče po dobu 48 hodin, průměrné množství radioaktivity bylo 10 % počáteční dávky.

Tabulka 5.4.2.2:3 Množství radioaktivity (^{99m}Tc) vylučované (jako procento počáteční dávky) do moče v části A

interval odběru vzorků (h)						
pacient	0-4	4-8	8-12	12-24	24-48	kumulativní množství (%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. znamená nebylo aplikováno, data nejsou dostupná

Část B

Část B zahrnuje 20 pacientů, kterým se aplikovala monoklonální protilátka BIWA 4 v dávce 50 mg, přičemž dávka radioaktivity daná radioaktivním značením ^{186}Re je v rozmezí 20 až 60 mCi/m². Třem pacientům se aplikovala druhá intravenózní infúze, zatímco jiným 17 pacientů prodělalo pouze jeden cyklus terapie.

V grafickém znázornění existuje konzistence mezi koncentracemi monoklonální protilátky BIWA 4 v plazmě a koncentracemi radioaktivity v séru v případě každého pacienta a s pacienty kterým se protilátka ^{186}Re -BIWA 4 aplikovala dvakrát. Tato konzistence pozorovaná v grafické formě je v kontrastu s vnímáním delšího poločasu rozpadu radioaktivity, když data jsou modelována. Geometrický průměr poločasu rozpadu 122 hodin v případě radioaktivní části ^{186}Re -BIWA 4 je delší než poločas rozpadu 96 hodin pro BIWA 4 v plazmě, jak se stanovilo testem ELISA.

Tabulky 5.4.2.2: 6 a 5.4.2.2: 7 znázorňující zařazení farmakokinetických parametrů do skupin podle aplikovaného množství radioaktivity dále znázorňují některé trendy delší expozice se zvýšenou aplikovanou dávkou radioaktivity, ale počet jedinců ve skupině každé dávky je příliš málo, aby se vytvořily libovolné konzistentní závěry.

Tabulka 5.4.2.2:6 Geometrické průměry farmakokinetických parametrů monoklonální protilátky BIWA 4 v plazmě, které jsou zařazeny do skupiny podle množství aplikované radioaktivity

Dávka ^{186}Re (mCi/m ²)	n	C _{max} (ng/ml)	poločas rozpadu (h)	AUC _{inf} (μg.h/ml)	V _z (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

*jsou zahrnuti pacienti, kterým se aplikovali dvě dávky 50 mCi/m²

Tabulka 5.4.2.2:7 Geometrické průměry farmakokinetických parametrů ^{186}Re -BIWA 4 v sérech rozdělených do skupin podle množství aplikované radioaktivity

Dávka ^{186}Re (mCi/m ²)	n	C _{max} (%ID/kg)	poločas rozpadu (h)	AUC _{inf} (%ID.h/ml)	V _z (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

*jsou zahrnuti pacienti, kterým se aplikovaly dvě dávky 50 mCi/m²

5.4.2.2 Farmakokinetická/farmakodynamická analýza

Provedla se farmakokinetická/farmakodynamická analýza.

5.4.3 Statistické/analytické otázky

Provedla se analýza tak, jak bylo původně plánováno. Detaily se popisují v sekci 3.7.1.3.

5.4.3.1 Primární konečné body

Neaplikovalo se.

5.4.3.2 Sekundární konečné body

Neaplikovalo se.

5.4.4 Interakce léčebný prostředek-léčebný prostředek a léčebný prostředek-onemocnění

Testy zahrnující Interakce léčebný prostředek-léčebný prostředek a léčebný prostředek-onemocnění se neprovedly.

5.4.5 Zobrazení subjektu

Detailněji popsáno v sekci 6.4.2.2 a 6.4.2.3

5.5 Účinnost/závěry týkající se klinické farmakologie

Část A

Výsledky z části A potvrdily, že dávka 50 mg protilátky BIWA 4 je optimální dávka pro léčbu na základě koncentrací v krvi a stupně pohlcení tkání. Distribuce hodnocená radioscintigrafií a hodnocení biopsií bylo ve většině případů nejvyšší v nádoru ve srovnání s jinými tkáněmi. Pohlcení radioaktivity v čase rostlo. K expresi CD44v6 docházelo ve více než 80 % a 90 % buněk primárního nádoru a v metastázách lymfatických uzlin ve všech získaných preparátech sliznice.

Množství rozpustného CD44v6 se jeví být konstantní před a po aplikaci ^{99m}Tc -BIWA 4.

Měřené koncentrace BIWA 4 byli přímo úměrné dávce, která je v rozmezí 25 mg až 100 mg. Mírné množství aplikované dávky se vylučovalo prostřednictvím ledvin. %ID vylučované do moči bylo podobné v případě všech skupin aplikovaných dávek.

Část B

Data z části B ukazují, že pro pacienty může být z klinického hlediska výhodná terapie pomocí ^{186}Re -BIWA 4 MTD protilátky ^{186}Re -BIWA 4. U jednoho z pěti pacientů ošetřených 60 mCi/m^2 se dosáhlo stabilizace onemocnění. Tři ze šesti pacientů dosáhli stabilního stavu onemocnění při maximální tolerované dávce 50 mCi/m^2 . Čas do dosažení opětného postupu onemocnění se pohyboval v rozmezí 127 a 173 dní u pacientů, kterým se aplikovala druhá dávka 50 mCi/m^2 . Radioimunoscintigrafie indikuje pohlcení radioaktivity v nádorové tkáni. Biodistribuce byla porovnatelná v jiných tkáních bez ohledu na dávku. Dozimetrická analýza neprokázala neočekávaně vysoké absorbované dávky v tkáních, jiné než se očekávaly v případě nádoru varlat. Avšak důležitost pozorované dávky v případě varlat ve spojení s poškozením plodnosti je v současné době nejasná.

Množství rozpustného detekovatelného CD44v6 vedlo ke zvýšení ^{186}Re -BIWA 4 u ošetřovaných pacientů.

Koncentrace BIWA 4 v plazmě dosáhly maxima v čase 0,92 hodin a protilátky se eliminovaly s geometrickým průměrem poločasu rozpadu 94 hodin v případě protilátky BIWA 4 stanovené testem ELISA. Hodnoty C_{max} a AUC (měření testem ELISA) byly podobné těm získaným v části A studie v případě skupiny pacientů, kterým se aplikovalo 50 mg.

Toxicita limitující dávku se projevila při dávce 60 mCi/m^2 , zatímco dávka 50 mCi/m^2 ^{186}Re BIWA 4 je maximální tolerovaná dávka ve studii. Toxicita limitující dávku se jeví jako nežádoucí projev v případě kostní dřeně, to je trombocytopenie a leukopenie.

6.1 Rozsah expozice

Všem deseti pacientům léčených v části A studie se aplikovala jedna dávka ^{99m}Tc -BIWA 4. Dávky BIWA 4 byly buď 25 mg, 50 mg nebo 100 mg, zatímco dávka ^{99m}Tc byla 20 mCi.

V části B se 20 pacientům aplikovala jedna dávka ^{186}Re -BIWA 4. Třem pacientům se aplikovala druhá dávka 50 mCi/m², čímž dosáhnou stabilního stavu onemocnění (bez změn). Dávka BIWA 4 se udržovala stabilní 50 mg, zatímco radioaktivita ^{186}Re vzrostla na 10 mCi/m² tělesného povrchu.

Dávka se vypočítala podle plochy povrchu těla (tabulka 6.1:1).

Tabulka 6.1:1 Aplikovaná průměrná dávka radioaktivity

	část A			část B				
	^{99m}Tc -BIWA 4			^{186}Re -BIWA 4 (mCi/m ²)				
	25mg BIWA 4	50mg BIWA4	100mg BIWA 4	20	30	40	50	60
N	3	4	3	2	4	3	6	5
mCi ^{99m}Tc	20,1±1,2	19,2±0,3	19,1±0,8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
mCi ^{186}Re	n.a.	n.a.	n.a.	33,1±1,7	52,4±5,6	70,6±5,2	87,2±8,5	97,2±8,3

n.a.=neaplikováno, průměrné hodnoty a standardní odchylka

Radiochemická čistota léčebného prostředku byla vyšší než 95 % a imunoreaktivní frakce byla vyšší než 80 %.

Po aplikaci léčebného prostředku následovala doba pozorování alespoň 6 týdnů.

6.2 Nežádoucí projevy (AE)

U všech léčených pacientů se projevíly nežádoucí účinky. Dva pacienti přerušily dobu sledování v části B z důvodu nežádoucích projevů. U těchto pacientů se nehodnotilo působení léčebného prostředku, protože léčba byla ukončena.

Část A

U většiny pacientů v části A došlo nežádoucím projevům v těle jako celku (50 %), které vznikly na základě prodělaného chirurgického zákroku a bolesti spojené s tímto zákrokem. Nezaznamenal se žádný speciální patern nežádoucích účinků a žádný pacient nevykazuje CTC kritérium 3 nebo 4, které se hodnotí jako spojené s léčebným prostředkem (tabulky 6.2.2: 1 a 2).

Tři pacienti vykazují nežádoucí projevy, které se popisují v sekci 6.3.1.

Část B

Nežádoucí projevy podle systému třídění orgánů (SOC) „tělo jako celek“ se zaznamenaly u 65 % pacientů. Dále následovaly nežádoucí projevy systému třídění „poruchy krevních destiček, krvácení a srážení“ (60 % pacientů) a „poruchy bílých krvinek a retikuloendotelového systému“ (50 % pacientů). Trombocytopenie a leukopenie spojená s léčebným prostředkem se projevila u 11 (55 %) a 10 (50 %) pacientů v průměru 21 dní po počátku radioimunoterapie. Proces byl vratný po 6 týdnech. V případě uvedených nežádoucích projevů se pozorovala závislost na dávce (tabulka 6.2.2: 3).

Hematologická toxicita limitující dávku definovaná jako CTC stupeň 4 spojená s aplikací léčebného prostředku se projevila u třech pacientů.

Nehematologická toxicita limitující dávku definovaná jako stupeň 3 nebo 4 CTC spojená s aplikací léčebného prostředku se objevila u 4 pacientů (při dávce 30 mCi/m² se u jednoho pacienta objevila vyrážka a Quinckeův edém, u dvou pacientů se objevila teplota při dávce 60 mCi/m² a u jednoho pacienta, kterému se aplikovala dávka 60 mCi/m² se projevila únava.

Šest s devíti pacientů, kteří vykazovali vážné nežádoucí účinky zemřeli. Úmrtí a vážné nežádoucí účinky jsou popsány v sekci 12.3.1.

6.6.2 Popis nežádoucích projevů

Část A

Následující nežádoucí projevy začleněné podle SOC, výhodné termíny a skupiny pacientů, kterým se aplikovaly tři odlišné dávky lidské monoklonální protilátky BIWA 4, se zaznamenaly u více než jednoho pacienta ve skupině A studie (tabulka 6.2.2:1). Více detailů stejně jako preferované termíny se zjistily v sekci 7.3.1.

Tabulka 6.2.2:1 Pacienti s nežádoucími účinky v části A (léčba před chirurgickým zákrokem pomocí jediné dávky 20 mCi ^{99m}Tc -BIWA 4)

	^{99m}Tc -BIWA 4			
	25 mg BIWA 4	50 mg BIWA 4	100 mg BIWA 4	celkem
počet pacientů (% léčených pacientů)	3 (100)	4 (100)	3 (100)	10 (100)
počet pacientů s nežádoucím projevem	3 (100)	4 (100)	3 (100)	10 (100)
aplikační místní poruchy	2 (66,7)	0 (0)	0 (0)	2 (20,0)
tělo jako celek	2 (66,7)	2 (50,0)	1 (33,3)	5 (50,0)
bolest	1 (33,3)	1 (25,0)	1 (33,3)	3 (30,0)
poruchy metabolizmu a výživy	1 (33,3)	2 (50,0)	1 (33,3)	4 (40,0)
snížení tělesné hmotnosti	1 (33,3)	1 (25,0)	0 (0)	2 (20,0)
poruchy	0 (0)	4 (100)	0 (0)	4 (40,0)

mechanizmu rezistence				
infekce	0 (0)	3 (75,0)	0 (0)	3 (30,0)
vaskulární poruchy	1 (33,3)	1 (25,0)	1 (33,3)	3 (30,0)
krvácení (nespecifiková né)	1 (33,3)	1 (25,0)	0 (0)	2 (20,0)

dány jsou SOC a preferované termíny v případě, že se zaznamenaly u více než jednoho pacienta, číslo v závorkách udává procento léčených pacientů.

Jevy, které jsou spojeny s aplikací léčebného prostředku se hodnotí podle kriteria CTC, jak se uvádí v tabulce 6.2.2:2. Jevy se začlenily podle CTC do stupně 1.

Tabulka 6.2.2:2 Vážnost nežádoucích jevů spojených s aplikací léčebného prostředku (určeno vědeckým pracovníkem) podle kriterie CTC je uvedeno v části A (léčba před chirurgickým zákrokem pomocí jediné dávky 20 mCi ^{99m}Tc -BIWA 4).

	^{99m}Tc -BIWA 4			
	25 mg BIWA 4	50 mg BIWA 4	100 mg BIWA 4	celkem
počet pacientů	3	4	3	10
počet nežádoucích projevů spojených s léčebným prostředkem	0	2	0	2
poruchy jater a biliárního systému	0	2	0	2
zvýšené sGOT	0	1	0	1
zvýšené sPPT	0	1	0	1

sGOT= sérová glutamo-oxaloctová transamináza

sGPT= sérum glutamát pyruvát transamináza

Část B

Tabulka 6.2.2:3 zobrazuje počet pacientů s nežádoucími projevy zařazenými podle SOC, preferovaný termín a skupiny podle aplikované dávky záření ^{186}Re -BIWA 4.

uvažuje se první a druhá dávka ^{186}Re -BIWA 4).

	^{186}Re -BIWA 4 (mCi/m ²)					
	20	30	40	50	60	celkem
počet léčených pacientů	2(100)	4(100)	3(100)	6(100)	5(100)	20 (100)
počet pacientů s nežádoucím projevem	2(100)	4(100)	3(100)	6(100)	5(100)	20 (100)
tělo jako celek	2(100)	3(75,0)	2(66,7)	2(33,3)	4(80,0)	13(65,0)
alergická reakce	0(0)	1(25,0)	0(0)	0(0)	1(20,0)	2(10,0)
únava	0(0)	0(0)	0(0)	1(16,7)	1(20,0)	2(10,0)
teplota	0(0)	0(0)	2(66,7)	0(0)	2(40,0)	4(20,0)
edém úst	1(50,0)	0(0)	0(0)	1(16,7)	0(0)	2(10,0)
bolest	0(0)	2(50,0)	0(0)	1(16,7)	1(20,0)	4(20,0)
porucha centrálního a periferního nervového systému	0(0)	1(25,0)	2(66,7)	1(16,7)	0(0)	4(20,0)
porucha gastro.intes tinálního systému	0(0)	1(25,0)	1(33,3)	2(33,3)	3(60,6)	7(35,0)
mukozitida	0(0)	0(0)	0(0)	1(16,7)	3(60,0)	4(20,0)
stomatitida	0(0)	0(0)	0(0)	1(16,7)	1(20,0)	2(10,0)
poruchy jater a biliárního systému	1(50,0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(20,0)	2(10,0)
sGPT zvýšeno	1(50,0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(20,0)	2(10,0)
poruchy metabolizmu a výživy	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)
maligní novotvar	0(0)	0(0)	1(33,3)	0(0)	2(40,0)	3(15,0)

poruchy krevních destiček, krvácení a poruchy srážení	0 (0)	1 (25,0)	1 (33,3)	5 (83,3)	5 (100)	12 (60,0)
trombocytope nie	0 (0)	1 (25,0)	1 (33,3)	4 (66,7)	5 (100)	11 (55,0)
porucha červených krvinek anémie	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	3 (60,0)	5 (25,0)
porucha respiračního systému	0 (0)	1 (25,0)	1 (33,3)	0 (0)	2 (40,0)	4 (20,0)
bronchitida	0 (0)	1 (25,0)	0 (0)	0 (0)	1 (20,0)	2 (10,0)
dusnost	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (40,0)	2 (10,0)
rinitida	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	1 (20,0)	2 (10,0)
porucha kůže a přídatné části	1 (50,0)	1 (25,0)	1 (33,3)	0 (0)	1 (20,0)	4 (20,0)
vyrážka	0 (0)	1 (25,0)	0 (0)	0 (0)	1 (20,0)	2 (10,0)
porucha bílých buněk a RES	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	4 (66,7)	5 (100)	10 (50,0)
granulocytopenie	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	2 (40,0)	3 (15,0)
leukopenie	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)	4 (66,7)	5 (100)	10 (50,0)

dány jsou SOC a preferované termíny v případě, že se zaznamenaly u více než jednoho pacienta, sGPT= sérum glutamát pyruvát transamináza, RES= retikuloendoteliální systém, číslo v závorkách udává procento léčených pacientů.

Nežádoucí projevy spojené s aplikací léčebného prostředku se zaznamenali u 75 % pacientů. Leukopenie spojená s aplikací léku se zaznamenala u 50 % a trombocytopenie se zaznamenala u 55 % pacientů.

Nežádoucí projevy spojené s aplikací léčebného prostředku jsou uvedeny v tabulce 6.2.2:4 a jsou hodnoceny podle kritéria CTC.

podle kritéria CTC je uvedeno v části B (první a druhá uvažovaná dávka)

nežádoucí účinek		$^{186}\text{Re-BIWA 4 (mCi/m}^2\text{)}$					
		20	30	40	50	60	celkem
CTC stupeň 1		1	0	2	6	5	14
	edém obličeje	1	n.a.	0	0	0	1
	leukopenie	0	n.a.	1	2	0	3
	kandidóza	0	n.a.	0	0	1	1
	mukositóza	0	n.a.	0	0	1	1
	abnormality krevních destiček	0	n.a.	0	0	0	1
	purpura	0	n.a.	0	0	1	1
	stomatitida	0	n.a.	0	0	0	1
	trombocytopenie	0	n.a.	0	0	2	5
		0	1	0	7	7	15
CTC stupeň 2	anémie	n.a.	0	n.a.	1	1	2
	dna	n.a.	1	n.a.	1	0	1
	leukopenie	n.a.	0	n.a.	1	2	3
	mukositida	n.a.	0	n.a.	2	3	5
	stomatitida	n.a.	0	n.a.	0	1	1
	ztráta chuti	n.a.	0	n.a.	1	0	1
	trombocytopenie	n.a.	1	n.a.	1	0	2
		0	2	0	2	8	12
CTC stupeň 3	alergická reakce	n.a.	1	n.a.	0	0	1
	únava	n.a.	0	n.a.	0	1	1
	horečka	n.a.	0	n.a.	0	2	2
	leukopenie	n.a.	0	n.a.	1	1	2
	vyrážka	n.a.	1	n.a.	0	0	1
	trombocytopenie	n.a.	0	n.a.	4	4	5
		0	0	0	3	5	8
CTC stupeň 4	anémie	n.a.	n.a.	n.a.	0	1	1
	granulocytopenie	n.a.	n.a.	n.a.	1	2	3
	leukopenie	n.a.	n.a.	n.a.	1	2	3
	trombocytopenie	n.a.	n.a.	n.a.	1	0	1

dán je počet nežádoucích projevů, n.a.=neaplikováno

6.2.3 Analýza nežádoucích projevů

Část A

V části A studie se neobjevil žádný nežádoucí projev, který je spojený s aplikací léčebného prostředku s výjimkou jednoho pacienta, který vykazuje mírné a reverzibilní zvýšení AST a ALT, což spadá do CTC stupeň 1.

Při porovnání různých dávek BIWA 4 se nepozoroval odlišný profil AE.

Část B

Trombocytopenie a leukopenie byly závislé na dávce (tabulka 6.2.2: 3 a 6.2.2: 4) a limitují dávku. Časový průběh se popisuje v sekci 6.4.2.1.

způsobující toxicitu limitující dávku (tabulka 6.2.2: 3 a 6.2.2: 4).

Alergická reakce se zaznamenala u dvou pacientů. U jednoho pacienta se zaznamenal Quinckeův edém a vyrážka (dávka 30 mCi/m²) a jeden pacient (při dávce 60 mCi/m²) vykazuje alergickou reakci po transfúzi koncentrovaných trombocytů, která není spojená s aplikací léčebného prostředku. Jeden pacient vykazuje kopřivku, která také není spojená s aplikací léčebného prostředku a další pacient vykazuje edém obličeje spojený s dávkou 20 mCi/m².

U dvou pacientů se detekovala HAMA (popisuje se v sekci 12.4.3).

K přerušení léčby na základě nežádoucích projevů došlo u dvou pacientů. Oba pacienti zemřeli.

Nežádoucí projevy vyžadovaly začít aplikovat souběžnou léčbu u 17 pacientů. Tito pacienti se krátce popisují v sekci 6.3.1.

6.3 Úmrtí, jiné vážné nežádoucí projevy a jiné podstatné nežádoucí projevy

Vážné nežádoucí projevy se zaznamenaly u 12 pacientů. Z toho 12 pacientů zemřelo v průběhu studie nebo následovně. Všichni pacienti, kteří zemřeli, byli zařazeni do části B studie. Žádný z pacientů zařazený do části A studie nezemřel. Všechna úmrtí byla způsobena postupem onemocnění.

Dva pacienti zahrnutí do části B studie ukončily studii předčasně na základě nežádoucích projevů (pacient 112 a 105).

Nežádoucí projevy, který vyžadovaly léčbu byly nejčastěji trombocytopenie, leukopenie a horečka.

7.1 Demografická data

Detaily demografických dat nejsou zahrnuty

7.2 Účinnost/farmakodynamická data

Tabulka 7.2:1 Poměr pohlcení nádorem ku pohlcení kostní dřeni
- část A studie

Část A				
^{99m} Tc-BIWA 4				
	pacient č.	pohlcení nádorem (%ID/kg, vypočítáno)	pohlcení kostní dřeni (%ID/kg, vypočítáno)	poměr nádor/kostní dřeň (vypočítáno)
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
	9*	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

č. =číslo

* =zahrnuto v analýze podle protokolu

%ID =% dávky zavedené injekcí

výpočet se provedl tak, že se započítaly různé molekulové hmotnosti vzorku

Tabulka 7.2: 2 Poměr pohlcení nádorem ku pohlcení kostní dřeni
(podmnožina ITT)- část A studie

část A ^{99m} Tc-BIWA 4 poměr nádor/kostní dřev (vypočítáno)	
25 mg BIWA 4	1,72
50 mg BIWA 4	2,57
100 mg BIWA 4	1,99

jsou dány průměrné hodnoty

ITT = určený k léčbě

výpočet se provedl tak, že se započítaly různé molekulové hmotnosti vzorku

Tabulka 7.2: 3 Poměr pohlcení nádorem ku pohlcení kostní dřeni
(podmnožina PP)- část A studie

část A ^{99m} Tc-BIWA 4 poměr nádor/kostní dřev (vypočítáno)	
25 mg BIWA 4	1,72
50 mg BIWA 4	3,22
100 mg BIWA 4	2,46

jsou dány průměrné hodnoty

PP = podle protokolu

výpočet se provedl tak, že se započítaly různé molekulové hmotnosti vzorku

Tabulka 7.2: 4 Velikost nádoru a % pohlcení protilátky - část
A studie (populace podle protokolu)

Část A			
^{99m} Tc-BIWA 4			
	pacient č.	velikost nádoru (mm ²)	pohlčení nádorem (%ID/kg, vypočteno)
25 mg BIWA 4	1	1350	6,14
	2	900	15,78
	3	225	16,68
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

č. = číslo

n.a.= není aplikováno

je dána pouze délka nebo šířka, nikdy ne délka a šířka
výpočet se provedl tak, že se započítaly různé molekulové
hmotnosti vzorku

Tabulka 7.2: 5 Expresse antigenu CD44v6 v nádoru a v jiné tkáni
- část A studie

Část A				
^{99m} Tc-BIWA 4				
	pacient č.	expresse antigenu CD44v6 v nádoru	expresse antigenu CD44v6 ve sliznici	expresse antigenu CD44v6 v metastázách lymfatických uzlin
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.

č. =číslo

* =zahrnuto v analýze podle protokolu

n.a.= není aplikováno

Tabulka 7.2: 6 Rozpustný CD44v6 v séru. Průměrné hodnoty jsou vyjádřeny v ng/ml.

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

není aplikováno

data zahrnují druhou dávku

Část A:

Výsledky ze studie z části A potvrdily, že dávka 50 mg BIWA 4 je optimální dávka pro léčbu založenou na koncentracích v krvi a stupněm pohlcení tkání. Distribuce hodnocená radioscintigrafií a měřením v biopsiích byla skoro ve všech případech nejvyšší v nádoru ve srovnání s jinými tkáněmi. Pohlcení radioaktivity v nádoru s časem rostlo. Expres CD44v6 probíhala ve více než 80 % a 90 % buněk primárního nádoru a v metastázách lymfatických uzlin respektive ve všech získaných preperátech sliznice.

Ve skupině, kde se aplikovalo 50 mg BIWA 4 se nepozorovala korelace mezi velikostí nádoru a pohlcením radioaktivity.

Množství rozpustného antigenu CD44v6 se jeví být konstantní před a po aplikaci ^{99m}Tc -BIWA.

Stanovené koncentrace protilátky BIWA 4 byly úměrné dávce v rozmezí 25 až 100 mg BIWA 4. Malé množství aplikované dávky se vylučovalo ledvinami. Procento dávky zavedené injekcí (%ID) vylučované do moči bylo podobné ve všech skupinách.

Část B

Data z části B ukazují, že pro pacienty může být klinicky výhodná terapie pomocí ^{186}Re -BIWA 4 při maximální tolerované dávce (MTD). U jednoho z pěti pacientů ošetřených dávkou 60 mCi/m² se dosáhlo stabilního stádia onemocnění. U tří ze šesti pacientů se dosáhlo stabilního stádia onemocnění při maximální tolerované dávce 50 mCi/m². Časové období do dosažení postupu onemocnění se pohybovalo v rozmezí 127 a 173 dní u těch pacientů, kterým se aplikovala druhá dávka 50 mCi/m². Radioimunoscintigrafie indikuje pohlcení radioaktivity do nádorové tkáně. Biodistribuce se porovnala i v jiných tkáních bez ohledu na dávku. Dozimetrická analýza neukázala neočekávaně vysokou absorbovanou dávku do tkání jiných než se očekává v případě nádoru varlat. Ukázalo se, že množství rozpustného CD44v6 má tendenci růst v případě pacientů ošetřených ^{186}Re -BIWA 4. Koncentrace BIWA 4 v plazmě dosáhly vrcholu při 0,92 hodinách a protilátka se eliminovala s geometrickým průměrem poločasu rozpadu 94 hodin v případě protilátky BIWA 4, což se stanovilo testem ELISA. Hodnoty $C_{\max}$ a AUC (stanovené testem ELISA) jsou podobné těm hodnotám získaným v části A studie ve skupině s dávkou 50 mg BIWA 4.

Tolerovatelnost jediné dávky BIWA 4 spojená s nízkou hodnotou záření technecia-99 byla přijatelná. Dva ze tří vážných nežádoucích projevů byly způsobeny komplikacemi po chirurgickém zákroku.

Část B:

Maximální tolerovaná dávka (MTD) byla 50 mCi/m² ¹⁸⁶Re-BIWA 4. Nežádoucí projevy limitující dávku jsou na dávce závislá reverzibilní redukce počtu trombocytů a leukocytů s následnou horečkou u jednotlivců. Klinickým projevem trombocytopenie byla slabá petechie.

Mucozitida se pozorovala u pacientů ošetřených vyšší dávkou záření, ale neomezuje dávku.

V průběhu studie se nepozorovaly relevantní změny hodnot tyreotropního hormonu (TSH).

12 pacientů vykazalo vážné nežádoucí projevy. Z nichž šest pacientů během části B studie zemřelo, což hlavně způsobil postup onemocnění.

Alergické reakce se pozorovaly řídce, pouze v jednom případě se pozoroval vážný edém podle Quincke spojený s aplikací léčebného prostředku. Během nebo krátce po infúzi léčebného prostředku se neobjevila alergická reakce.

U dvou pacientů došlo k HAHA. Opakovaná aplikace dávky nevyvolala HAHA.

Závěry:

Výsledky ukazují, že lidské monoklonální protilátka BIWA 4 značená ¹⁸⁶Re je pohlcena nádorovou tkání, což přináší z klinického hlediska pozitivní účinek pacientům s pokročilým stádiem spinocelulárního karcinomu v oblasti hlavy a krku. Profil bezpečnosti se zdá přijatelný. Lidská monoklonální protilátka BIWA 4 vykazovala farmakokinetické parametry úměrné dávce a pohlcení nádorem, které se mezi dávkami 50 mg a 100 mg relevantně nemění.

Příklad 4:

Úvod.

Pacientům s pokročilým stádiem spinocelulárního karcinomu v oblasti hlavy a krku (HNSCC) hrozí nebezpečí vzniku lokoregionálního recidivujícího nádoru a/nebo vzdálených metastáz. V případě těchto pacientů je nutné zavést účinnou systémovou léčbu. Poznatek, že HNSCC je zaručeně citlivý na radioaktivní záření, pak umožňuje použít jako účinnější terapii cílené zavádění radionukleotidů selektivně do HNSCC použitím monoklonálních protilátek jako formy radioimunoterapie.

Cíl.

Stanovit bezpečnost, maximální tolerovanou dávku (MTD), imunogennost a účinnost radioimunoterapie s rheniem-186 pomocí humanizované monoklonální protilátky BIWA 4 značenou ^{186}Re u pacientů s HNSCC.

Pacienti a způsoby.

Fáze I studie s rostoucí dávkou se provedla u pacientů s HNSCC, v případě kterých není možné volit jinou léčebnou metodu. Celkem 20 pacientům se aplikovala monoklonální protilátka BIWA 4 značená ^{186}Re intravenózně v dávce 20, 30, 40, 50 nebo 60 mCi/m². Třem pacientům se aplikovalo alespoň 3 měsíce po dávce 50 nebo 60 mCi/m² druhá dávka 50 mCi/m².

Výsledky.

Všechny jednotlivé stejně jako opakované aplikace byly dobře tolerovány a nepozorovaly se žádná znamení akutních nežádoucích projevů. Podstatnými projevy toxicity při vyšších dávkách byly orální mukositida a dávku limitující myelotoxicita zahrnující trombocytopenii a leukocytopenii. MTD se ustanovila na hodnotě 50 mCi/m². U jednoho pacienta vznikla po první aplikaci lidská anti-lidská odezva. Stabilní stádium

onemocnění trvající 4 až 19 týdnů se pozorovalo u 5 pacientů léčených nejvyšší dávkou.

Závěr.

Radioimunoterapie pacientů trpících HNSCC pomocí lidské monoklonální protilátky značené ^{186}Re se zdá být bezpečná a je možné dosáhnout tumorocidních dávek. Vzhledem k nízkému stupni imunogennosti je možná opakovaná aplikace. Výsledky této fáze studie podporují další vývoj radioimunoterapie v případě pacientů trpících zhoubným bujením v oblasti krku a hlavy s humanizovanou monoklonální protilátkou BIWA 4 značenou ^{186}Re .

Seznam sekvencí

(1) Informace o SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 114 aminokyselinových zbytků

(B) TYP: aminokyselinová

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 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																		

(1) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 106 aminokyselinových zbytků
- (B) TYP: aminokyselinová
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 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

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 106 aminokyselinových zbytků
- (B) TYP: aminokyselinová
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 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

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 342 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

```

gaagtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctaagactc 60
tctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgaca tgtcttgggt tcgccaggct 120
ccgggggaagg 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

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 318 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

```

gaaattgttc tcacccagtc tcacagcaacc ctgtctctgt ctccagggga gagggccacc 60
ctgtcctgca gtgccagctc aagtataaat tacatatact ggtaccagca gaagccagga 120
caggctccta gactcttgat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgcgcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg aaccgacttc actctcaca tcagcagcct ggagcctgaa 240
gattttgccg tttattactg cctgcagtgg agtagtaacc cgctcacatt cggtggtggg 300
accaaaggtgg agattaaa                                     318

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 318 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

```

gaaattgttc tcaccagtc tcacagcaacc ctgtctctgt ctccagggga gagggccacc 60
ctgtcctgca gtgocagctc aagtataaat tacatatact ggctccagca gaagccagga 120
caggctocta gaatcttgat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt cctgogcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg aaccgacttc actctcacia tcagcagcct ggagcctgaa 240
gattttgccg tttattactg cctgcagtgg agtagtaacc cgctcacatt cggtggtggg 300
accaaggtagg agattaaa                                     318

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 444 aminokyselinových zbytků
- (B) TYP: aminokyselinová
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 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 Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

(1) Informace o SEQ ID NO: 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 213 aminokyselinových zbytků
- (B) TYP: aminokyselinová
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

- (A) Název/klíč: umělá sekvence
- (D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 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

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 213 aminokyselinových zbytků

(B) TYP: aminokyselinová

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 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	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	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			

(1) Informace o SEQ ID NO: 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 2135 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
 (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

```

aagctttgac agacgcacaa ccctggactc ccaagtcttt ctcttcagtg acaaacacag 60
acataggata tcacatttgc ttctgacaca actgtgttca ctagcagcct caaacagaca 120
ccatgaactt tgggctcagc ttgattttcc ttgtcctaata tttaaaaggt gtccagtgtg 180
aagtgcagct ggtggagtct gggggaggct tagtgaagcc tggagggtcc ctaagactct 240
cctgtgcagc ctctggattc actttcagta gctatgacat gtcttgggtt cgccaggctc 300
cggggaaggg gctggagtgg gtctcaacca ttagtagtgg tggtagttac acctactatc 360
tagacagtat aaagggccga ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac tccctgtacc 420
tgcaaatgaa cagtctgagg gctgaggaca cggcgtgtga ttactgtgca agacaggggc 480
tggactactg gggtcgagga accttagtca ccgtctctc agctagcacc aaggggcccat 540
cggctcttcc cctggcacc tctctcaaga gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct 600
gcctggtcaa ggactacttc ccggaaccgg tgacgggtgc gtggaactca ggcgcctga 660
ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtgct tacagtctc aggactctac tccctcagca 720
gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc aacgtgaatc 780
acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagtgtgtga gaggccagca cagggaggga 840
gggtgtctgc tggaagcagg ctccagcgct ctgcttgac gcatcccgcc tatgcagccc 900
cagtccaggg cagcaaggga ggcccgctc gctctctcac ccggagcctc tgcccgcctc 960
actcatgctc agggagaggg tcttctggct ttttcccagg ctctgggcag gcacaggcta 1020
ggtgccccta acccaggccc tgcccctgac ctaagcccac cccaaaggcc aaactctcca 1140
agccatctcc gggaggaccc tctctctctc cagattccag taactcccaa tcttctctct 1200
ctccctcagc tcggacacct tctctctctc acatgcccac cgtgcccagg taagccagcc 1260
gcagagccca aatcttgtga caaaactcac aggtgcccct gagtagcctg catccaggga 1320
caggcctcgc cctccagctc aaggcgggac aggtgcccct gagtagcctg catccaggga 1380
caggccccag ccgggtgctg acacgtccac ctccatctct tctcagcac ctgaactcct 1440
ggggggacgg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaaccaag gacaccctca tgatctcccg 1500
gacccctgag gtcacatgctg ttgtgtgtga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt 1560
caactggtac gtggacggcg tggagggtga taatgccaag acaaagccgc gggaggagca 1620
gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa 1680
tggcaaggag tacaagtgcg aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tccagaaaaa 1740
catctccaaa gccaaagggt ggacccgtgg ggtgcgaggg ccacatggac agaggccggc 1800
tcggcccacc ctctgcccct agagtgaccg ctgtaccaac ctctgtccta cagggcagcc 1860
ccgagaacca cagggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccagg 1920
cagcctgacc tgccctggta aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag 1980
caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc 2040
cttcttccct tacagcaagc tcaccgtgga caagcagag tggcagcagg ggaacgtctt 2100
ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctga caaccaact acgcagaaga gcctctccct 2135
gtctccgggt aatgagtgac gacggccgag aattc

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 785 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

```

aagcttgatc ttcaggatat cacatttgct tctgacacaa ctgtgttcac tagcaaccto 60
aaacagacac catggatttt cagggtgcaga ttttcagctt cctgctaatag agtgcctoag 120
tcataatgtc caggggagaa attgttctca cccagtctcc agcaaccctg tctctgtctc 180
caggggagag gccacccctg tcctgcagtg ccagctcaag tataaattac atatactggg 240
accagcagaa gccaggacag gctcctagac tcttgattta tctcacatcc aacctggctt 300
ctggagtccc tgcgcgcttc agtggcagtg ggtctggaac cgacttcaact ctcacaatca 360
gcagcctgga gcctgaagat tttgccgttt attactgcct gcagtggagt agtaaccggc 420
tcacattcgg tgggtgggacc aaggtggaga ttaaacggac tgtggctgca ccatctgtct 480
tcattctccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgctagcgtt gtgtgcctgc 540
tgaataaact ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat 600
cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca 660
gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact acgaçaaaca caaagtctac gcoctgcgaag 720
tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttagg 780
aattc

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 785 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

```

aagcttgatc ttcaggatat cacatttgct tctgacacaa ctgtgttcac tagcaacctc 60
aaacagacac catggatttt caggtgcaga ttttcagctt cctgctaag agtgccctcag 120
tcataatgtc caggggagaa attgtttctca cccagtctcc agcaaccctg tctctgtctc 180
caggggagag ggccaccctg tcctgcagtg ccagctcaag tataaattac atatactggc 240
tccagcagaa gccaggacag gctcctagaa tcttgattta tctcacatcc aacctggctt 300
ctggagtccc tgccgccttc agtggcagtg ggtctggaac cgacttcact ctcacaatca 360
gcagcctgga gctgaagat tttgccgttt attactgcct gcagtggagt agtaaccctg 420
tcacattcgg tgggtgggacc aaggtggaga ttaaaccggac tgtggctgca ccatctgtct 480
tcattcttccc 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 tcgcccgctc caaagagctt caacagggga gagtgttagg 780
aattc

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1392 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

```

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaagggtg ccagtgtgaa 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtccct 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
ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 540
agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcaqcagc 600

```

```

gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 660
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 720
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc 780
ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggg 840
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 960
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1080
gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1260
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaa agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
ccgggtaaat ga 1392

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 702 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

```

atggaagccc cagctcagct tctcttcttc ctgctgctct ggctcccaga taccacogga 60
gaaattgttc tcaccagtc tccagcaacc ctgtctctgt ctccagggga gagggccacc 120
ctgtcctgca gtgccagctc aagtataaat tacatatact ggtaccagca gaagccagga 180
caggctccta gactcttgat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccotgcgcgc 240
ttcagtggca gtgggtctgg aaccgacttc actctcaca tcagcagcct ggagcctgaa 300
gattttgccc tttattactg cctgcagtgg agtagtaacc cgctcacatt cggtggtggg 360
accaaggtgg agattaaacg tacgggtggc gcaccatctg tcttcatctt ccgcgatct 420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgcgtgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgcccctc aatcgggtaa ctcccaggag 540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgag aagtcaccca tcagggcctg 660
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ga 702

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 702 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 15:

```

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctgctct ggctcccaga taccacccga 60
gaaattgttc tcaccagctc tccagcaacc ctgtctctgt ctccagggga gagggccacc 120
ctgtcctgca gtgccagctc aagtataaat tacatatact ggctccagca gaagccagga 180
caggctccta gaatcttgat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgcgcgc 240
ttcagtggca gtgggtctgg aaccgacttc actctcaca tcagcagcct ggagcctgaa 300
gatttttgccg tttattactg cctgcagtgg agtagtaacc cgctcacatt cgggtgggtggg 360
accaaggtgg agattaaacg tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgetgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
agctcgcgccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ga 702

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 9 568 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 16:

```

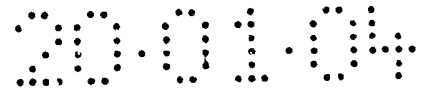
ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgsggtgt ggtgggttac cgcagcgtga 60
ccgctacact tgccagcgcc cttagcgccc ctcttttcgc tttcttcctc tcctttctcg 120
ccaagttcgc cggttttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttcgat 180
ttagtgtttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta ggggtgatggg tcacgtaggg 240
tcgcgacgta ccgggcccc cctcgattaa ttaatcgagc tactagcttt gcttctcaat 300
ttcttatttg cataatgaga aaaaaaggaa aattaatttt aacaccaatt cagtagttga 360
ttgagcaaat gcgttgccaa aaaggatgct ttagagacag tgttctctgc acagataagg 420

```

```

acaaacatta ttcagaggga gtaccacagag ctgagactcc taagccagtg agtggcacag 480
cattctaggg agaaatatgc ttgtcatcac cgaagcctga ttccgtagag ccacaccttg 540
gtaagggcca atctgctcac acaggataga gagggcagga gccagggcag agcatataag 600
gtgaggtagg atcagttgct cctcacattt gcttctgaca tagttgtgco agcatggagg 660
aatcgatcct ccatgcttga acaagatgga ttgcacgcag gttctccggc cgcttggttg 720
gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa cagacaatcg gctgctctga tgcgcgcgtg 780
ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccggtt ctatttctca agaccgacct gtccggtgcc 840
ctgaatgaac tgcaggtaag tgccggcgct ctaggcctcc aaaaaagcct cctcactact 900
tctggaatag ctcagaggcc gaggcggcct cggcctctgc ataaataaaa aaaattagtc 960
agccatgcat ggggcggaga atgggcggaa ctgggcggag ttaggggcgg gatgggcgga 1020
gttaggggag ggactatggt tgctgactaa ttgagatgca tgctttgcat acttctgcct 1080
gctgggggagc ctggggactt tccacacctg gttgctgact aattgagatg catgctttgc 1140
atacttctgc ctgctgggga gcctggggac tttccacacc ctaactgaca cacattccac 1200
agaattaatt cccctagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca 1260
tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc cgcttggttg accgcccaac 1320
gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact 1380
ttccattgac gtcaatgggt ggactattta cggtaaaactg ccacttggc agtacatcaa 1440
gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gccgccttg 1500
cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggcagtacat ctaogtatta 1560
gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tgatagcgg 1620
tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccactgacg tcaatgggag tttgttttgg 1680
caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaaacact ccgccccatt gacgcaaatg 1740
ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagtagag ctgggtacgt gaaccgtcag 1800
atcgccctgga gacgccatca cagatctctc accatggag cccagctca gcttctcttc 1860
ctcctgctgc tctggctccc agataccacc ggagaaattg ttctcaacca gtctccagca 1920
accctgtctc tgtctccagg ggagagggcc accctgtcct gcagtgccag ctcaagtata 1980
aattacatat actggtacca gcagaagcca agcactgtct ctagactctt gattttatct 2040
acatccaaac tggcttctgg agtccctgcg cgtttcagtg gcagtgggtc tggaaaccgac 2100
ttcactctca caatcagcag cctggagcct gaagattttg ccgtttatta ctgcctgcag 2160
tggagtagta acccgctcac attcgggtgg ggaaccaagg tggagattaa acgtacgggt 2220
gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc 2280
tctgttgtgt goctgctgaa taacttctat ccagagaggg ccaaagtaca gtggaaaggt 2340
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac 2400
agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa 2460
gtctacgcct gcgaagtca ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac 2520
aggggagagt gttgaattca gatccgttaa cggttaccaa ctacctagac tggattctgt 2580
acaacatgcg gcogtgatat ctacgtatga ctgtgccttc tagttgocag 2640
ccatctgttg tttgccccct ccccgctgct tccctgaccc tggaaaggtg cactcccact 2700
gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca togcattgtc tgagtaggtg tcattctatt 2760
ctgggggggt ggggtggggc ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat 2820
gctgggggat cgggtgggct tatggaacca gctgggacta gtagctttgc ttctcaattt 2880
cttattttgca taatgagaaa aaaaggaaaa ttaattttaa caaccaattc gtagttgatt 2940
gagcaaatgc gttgocaaaa aggatgcttt agagacagtg ttctctgcac agataaggac 3000
aaacattatt cagagggagt aoccagagct gagactccta agccagttag tggcacagca 3060
ttctagggag aaatatgctt gtcatcaccc aagcctgatt ccgtagagcc acaccttggt 3120
aagggccaat ctgctcacac aggatagaga ggcagagac cagggcagag catataaggt 3180
gaggtaggat cagttgctcc tcacatttgc tctgacata gttgtgttg gagcttggt 3240
agcttgagca gctcagggct gogatttgcg gccaaacttg acggcaatcc tagcgtgaag 3300
gctggtagga ttttatcccc gctgccatca tggttcgacc attgaaactg atcgtcgccg 3360
tgtcccaaaa tatggggatt ggcaagaacg gagacctacc ctggcctccg ctgaggaacg 3420
agttcaagta cttccaaaga atgaccacaa cctcttcagt ggaaggtaaa cagaatctgg 3480
tgattatggg taggaaaaac tggttctcca ttccctgaga gaatcgacct ttaaaggaca 3540
gaattaatat agttctcagt agagaactca aagaaccacc acgaggagct cattttcttg 3600
ccaaaagttt ggatgatgcc ttaagactta ttgaaccaac ggaattggca agtaaaagt 3660
acatgggttg gatagtggga ggcagttctg tttaccagga agccatgaat caaccaggcc 3720
accttagact ctttgtgaca aggaatttga aagtgcacag aggtgacacg ttttcccg 3780
aaattgattt ggggaaatat aaactctctc cagaataccc aggcgtcctc tctgaggctc 3840
aggaggaaaa aggcataaag tataagtttg aagtctacga gaagaaagac taacaggaag 3900
atgctttcaa gttctctgct cccctcctaa agctatgcat ttttataaga ccatgggact 3960
tttgctggct ttgatcagc ctogactgtg ccttctagtt gccagccatc tggtgtttgc 4020
ccctcccccg tgcttctctt gacccctgga ggtgccactc ccactgtcct ttccataata 4080
aatgaggaat ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggtgggtg 4140
gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcattgctg ggatgcggtg 4200
ggctctatgg aaccagctgg ggctcgaagc ggccgctccg gatattgccaa gtacgcccc 4260

```



tattgacgtc	aatgacggta	aatggccgcg	ctggcattat	gccagtaga	tgaccttatg	4320
ggactttcct	acttggcagt	acatctacgt	attagtcatc	gctattacca	tggtgatgcg	4380
gttttggcag	tacatcaatg	ggcgtggata	gcggtttgac	tcacggggat	ttccaagtct	4440
ccaccccatt	gaogtcaatg	ggagtttggt	ttggcaocaa	aatcaacggg	actttccaaa	4500
atgtcgtaac	aactccgccc	cattgacgca	aatgggcggg	aggcgtgtac	gggtgggagg	4560
ctatataagc	agagctgggt	acgtccctcac	attcagtgat	cagcactgaa	cacagaccgg	4620
tcgacatgga	gtttgggctg	agctggcttt	ttcttgtggc	tattttaaaa	ggtgtccagt	4680
gtgaagtgca	gctgggtggg	tctggggggg	gcttagtgaa	gocctggagg	tccttaagac	4740
tctcctgtgc	agcctctgga	ttcactttca	gtagctatga	catgtcttgg	gttcggccagg	4800
ctccggggaa	ggggctggag	tgggtctcaa	ccattagtag	tggtggtagt	tacacctact	4860
atctagacag	tataaagggc	cgattcacca	tctccagaga	caatgccaa	aactccctgt	4920
acctgcaaat	gaacagtctg	agggctgagg	acacggccgt	gtattactgt	gcaagacagg	4980
ggttggacta	ctggggctga	ggaaccttag	tcaccgtctc	ctcagctagc	accaaggggc	5040
catcgggtct	ccccctggca	ccctccctcca	agagcacctc	tgggggcaca	gcggccctgg	5100
ctgacctggg	caaggactac	ttccccgaac	cggtgacggt	gtcgtggaac	tcaggcgccc	5160
tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttccccggctg	tcctacagtc	ctcaggactc	tactccctca	5220
gcagcgtggg	gacgctgccc	tcagcagct	tgggcaccaca	gacctacatc	tgcaacgtga	5280
atcacaagcc	cagcaacacc	aaggtggaca	agaaagttag	gcccacatct	tgtgacaaaa	5340
ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aactccctggg	gggaccgtca	gtcttccctct	5400
tccccccaaa	acccaaggac	accctcatga	tctcccgga	ccttgagggtc	acatgcgtgg	5460
tggtggacgt	gagccacgaa	gaccctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	gacggcgtgg	5520
aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	agagcagta	caacagcacg	taccgtgtgg	5580
tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	aagtgcagg	5640
tctccaacaa	agccctccca	gccccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	aaagggcagc	5700
cccagagaacc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccgga	tgagctgacc	aagaaccagg	5760
tcagcctgac	ctgcctgggtc	aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	gagtgggaga	5820
gcaatgggca	gcgggagaa	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	tcggacggct	5880
ccttcttctc	ctacagcaag	ctcacctggg	acaagagcag	gtggcagcag	gggaacgtct	5940
tctcatgtct	cgtgatgcac	gaggtctctg	acaaccacta	cacgcagaag	agcctctccc	6000
tgtctccggg	taaatgagga	tcogttaacg	gttaccacac	acctagactg	gattcgtgac	6060
aacatgcggc	cgtgatctct	acgtatgatc	agcctcgaac	gtgccttcta	gttgccagcc	6120
atctgttgtt	tgccccctcc	cogtgccttc	cttgaccctg	gaaggtgcca	ctcccactgt	6180
ccttttctaa	taaaatgagg	aaattgcatc	gcattgtctg	agttaggtgtc	attctattct	6240
gggggggtgg	gtggggcagg	acagcaagg	ggaggattgg	gaagacaata	gcaggcatgc	6300
tgggggatgg	gtgggctcta	tggaaccagc	tggggctcga	cagcgctcgc	atcgccctga	6360
ggcgcctact	aactctctcc	tcctctcttt	ttcctgcagg	acgaggcagc	gcggctatcg	6420
tggtctggca	cgacgggggt	tccttgccga	gctgtgctcg	acgttgtcac	tgagcgggga	6480
agggactggc	tgctattggg	cgaagtgcgg	gggcaggatc	tcctgtcatc	tcaccttgct	6540
cctgcccaga	aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	6600
gctacctgcc	cattcgacca	ccaagcgaaa	catcgcatcg	agcagacacg	tactcggatg	6660
gaagccggct	ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgccgccagcc	6720
gaactgttgc	ccaggtctaa	ggcgccgcatg	cccgacggcg	aggatctcgt	cgtgacccat	6780
ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatgggt	gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	6840
tgtggccggc	tggtgtgtgc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggtctac	cogtgatatt	6900
gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	cgttccctcg	tgctttacgg	tatcgccgct	6960
cccgatctgc	agcgcatcgc	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	agcgggactc	7020
tggggttcga	aatgaccgac	caagcgacgc	ccaacotgcc	atcacgagat	ttcgattcca	7080
ccgcccgcct	ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	ggctggatga	7140
tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcccc	ccccacttg	tttattgcag	7200
cttataaatg	ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaatct	cacaaataaa	gcattttttt	7260
cactgcattc	tagttgtggt	ttgtccaaac	tcataaatct	atcttatcat	gtctggatcg	7320
ogggccggcc	caccggggtg	gagctttaat	taaggcgccg	cagctccagc	ttttgttccc	7380
tttagtgagg	gttaatttgc	agcttgccgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	7440
attgttatcc	gtccacaatt	ccacacacaa	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	7500
gggggtgcct	atgagtgagc	taactcacat	taattgggtt	gcgctcactg	cccgttttcc	7560
agtccggaaa	cctgtcgtgc	cagctgcatt	aatgaatogg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	7620
gtttgcgtat	tgggcgctct	tcogcttccct	cgtccactga	ctcgtcgcgc	tcggctcgtc	7680
ggctgcggcg	agcgttatca	gctcactcaa	aggcggtaat	acggttatcc	acagaatcag	7740
gggataacgc	aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	7800
aggccgcgtt	gctggcggtt	ttccataggc	tcogccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	7860
gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaaccoga	caggactata	aagataccag	gogtttcccc	7920
ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttaaccga	tacctgtccg	7980
cctttctccc	ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	8040
cgggtgtaggt	cgttcgcctc	aagctgggct	gtgtgcacga	accccccggt	cagcccagac	8100

```

gctgcgccctt atccggtaac tatcgctcttg agtccaaccc ggtaagacac gactttatcgc 8160
cactgggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag 8220
agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg 8280
ctctgctgaa gccagttacc ttccgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa 8340
ccaccgctgg tagcggtggg ttttttgggt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag 8400
gatctcaaga agatcccttg atcttttcta cgggggtotga cgtcagtggt aacgaaaact 8460
cacgttaagg gatttttggt atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa 8520
attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt 8580
accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag 8640
ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca 8700
gtgctgcaat gataccgca gacccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc 8760
agccagccgg aaggggccgag cgcagaagt gtcttgcaac tttatccgcc tccatccagt 8820
ctattaattg ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg 8880
ttgttgccat tgctacaggc atcggtggtg cagcgtcgtc gtttggtatg gcttcattca 8940
gctccgggtc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttggtg aaaaaagcgg 9000
ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagt ggccgcagtg ttatcactca 9060
tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg 9120
tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcccga cagagtgtgt 9180
cttgcccgcc gtcaatacgg gataataccg cgcacatag cagaacttta aaagtgtc 9240
tcattggaaa acgttctctg gggcgaaaaa gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg 9360
gttcgatgta acccactcgt gcacccaact atgcccga aaaggggaata agggcgacac 9420
ttctggtgtg agcaaaaaa ctcttctctt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggt 9480
ggaaatgttg aatactcata ctcttctctt gtatttagaa aaataaaca ataggggttc 9540
tggtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc 9568
gcacatt tccccgaaaa gtgcacaa

```

(1) Informace o SEQ ID NO: 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 6414 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

- (A) Název/klíč: umělá sekvence

- (D) Jiné informace:

/poznámka="sekvence humanizované protilátky"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 17:

```

tcgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag 60
cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc 120
caacgacccc cgcgccattga cgtoataaat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg 180
gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta ttacggtaa actgccact tggcagtaca 240
tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggt aatggcccgc 300
ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggaactttct acttggcagt acatctacgt 360
attagtcacg gctattacca tgggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcggtgata 420
gcgggttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccat gacgtcaatg ggagtttgtt 480
ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtogtaac aactccgcc cattgaogca 540
aatggggcgt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctctct ggctaactag 600
agaaccact gcttaactgg cttatcgaaa ttaatacgac tcactatagg gagacccaag 660
cttctgcagg tcgacatcga tggatccggg acctcgagcg cgaattctct agaggatctt 720
tgtgaaggaa ccttacttct gtggtgtgac ataattggac aaactaccta cagagattta 780
aagctctaag gtaaatataa aatttttaag tgcataatgt gttaaactac tgattctaat 840

```

tggtttgtgta	tttttagattc	caacctatgg	aactgatgaa	tgggagcagt	ggtggaatgc	900
ctttaatgag	gaaaacctgt	tttgctcaga	agaaatgcca	tctagtgatg	atgaggctac	960
tgctgactct	caacattcta	ctcctccaaa	aaagaagaga	aaggtagaag	accccaagga	1020
ctttccttca	gaattgctaa	gttttttgag	tcatgctgtg	tttagtaata	gaactcttgc	1080
ttgcttttgc	atttacacca	caaaggaaaa	agctgcactg	ctatacaaga	aaattatgga	1140
aaaatatttg	atgtatagt	ccttgactag	agatcataat	cagccatacc	acattttgtag	1200
aggttttact	tgctttaaaa	aacctccac	acctcccoct	gaacctgaaa	cataaaatga	1260
atgcaattgt	tggtgttaac	ttgtttattg	cagcttataa	tgggtacaaa	taaagcaata	1320
gcatcacaaa	tttcacaaat	aaagcatttt	tttcaactgca	ttctagtgtg	ggtttgtcca	1380
aactcatcaa	tgtatcttat	catgtctgga	tcaattctga	gaaactagcc	ttaaagacag	1440
acagctttgt	tctagtccgc	caggcaagca	tatgtaaata	aagttcctca	gggaactgag	1500
gttaaaagat	gtatcctgga	cctgcccagac	ctggccattc	acgtaaacag	aagattccgc	1560
ctcaagttcc	ggttaacaac	aggaggcaac	gagatctcaa	atctattact	tctaactcgg	1620
taattaaaa	ctttcaacta	aaacacggac	ccacggatgt	caccaccttt	tccttccccc	1680
gctccgcct	tctcagtact	ccccaccatt	aggctcgcta	ctccacctcc	acttccgggc	1740
gcgacaccca	cgtgccctct	cccacccgac	gctaaccccg	cccctgcccc	tctgaccccc	1800
cccacacact	ggccccgccc	cgttgaggga	agaagaaacc	ccgggcagcc	gcagccaagg	1860
cggacgggta	gacgctgggg	gcgctgagga	tgctgcctct	accttctctg	ctggctcggc	1920
gggggacgcg	gtggatctca	ggcttcggga	agactggaag	aaccggctca	gaaccgcttg	1980
tctccgcggg	gcttggcggg	cggaagaatg	gccgctagac	gcggacttgg	tgcgaggcat	2040
cgcaggatgc	agaagagcaa	gcccgcgggg	agcgcggggc	tgtactacco	cgcgccctgga	2100
gcggccacgc	cggactgggc	ggggccggcc	tggtggaggc	ggagtctgac	ctcgtggagg	2160
cggggcctct	gatgttcaaa	taggatgcta	ggcttgttga	ggcgtggcct	ccgattcaca	2220
agtgggaagc	agcgccgggc	gactgcaatt	tcgcgccaaa	cttgggggaa	gcacagcgta	2280
caggctgcct	aggatgatcg	tgctgctgtc	atggttcgac	cgctgaactg	catcgtcgcc	2340
gtgtcccaga	atatgggcat	cggcaagaac	ggagaccttc	cctggccaat	gctcaggtag	2400
tggctggatt	gggttaggga	aaccgaggcg	gttcgctgaa	togggtcgag	cacttggcgg	2460
agacgcgcgg	gccaactact	tagggacagt	catgaggggt	aggcccgccg	gctgctgccc	2520
ttgcccatgc	ccgcgggtgat	ccccatgctg	tgccagcctt	tgcccagagg	cgctctagct	2580
gggagcaaa	g	gggcagcacc	accccccgga	cttgcatggg	tagccgctga	2640
gatggagcct	gagcacacgt	gacagggctc	ctgttaacgc	agtgtttctc	taactttcag	2700
gaacgagttc	aagtaacttc	aaagaatgac	caccacotcc	tcagtggaa	gtaaacagaa	2760
cctgggtgatt	atgggcccga	aaacctgggt	ctccattcct	gagaagaatc	gaocctttaa	2820
ggacagaatt	aatatagttc	tcagtagaga	gotcaaggaa	ccaccacaag	gagctcattt	2880
tcttgccaaa	agtctggacc	atgccttaaa	acttattgaa	caaccagagt	tagcagataa	2940
agtggacatg	gtttggatag	ttggaggcag	ttccgcttac	aaggaaagcca	tgaatcagcc	3000
aggccatctc	agactccttg	tgacaaggat	catgcaggaa	tttgaagtgt	acacgttctt	3060
cccagaaaat	gatttgagga	aatataaact	tctcccagag	tacccagggg	tcctttctga	3120
agtccaggag	gaaaaaggca	tcaagtataa	atttgaagtc	tatgagaaga	aaggctaaca	3180
gaaagatact	tgctgattga	cttcaagttc	tactgctttc	ctcctaaaa	tatgcatttt	3240
tacaagacca	tgggacttgt	gttggtctta	gatcctgtgc	atcctgggca	actggtgtac	3300
tctaagccac	tccccaaagt	catgccccag	ccccgtgata	attctaaaca	attagaatta	3360
ttttcatttt	cattagtcta	accagggttat	attaaatata	ctttaagaaa	caccatttgc	3420
cataaagtct	tcaatgcccc	tcccattgcag	cctcaagtgg	ctccccagca	gatgcatagg	3480
gtagtgtgtg	tacaagagac	cccaaagaca	tagagccoct	gagagcatga	gctgatattg	3540
gggctcatag	agataggagc	tagatgaata	agtacaaaag	gcagaaaatg	gttttaacca	3600
gcagagctag	aactcagact	ttaaagaaaa	ttagatcaaaa	gtagagactg	aattattctg	3660
cacatcagac	tctgagcaga	gttctgttca	ctcagacaga	aaatgggtaa	attgagagct	3720
ggctccattg	tgctccttag	agatggggagc	aggtggagga	ttatataagg	tctggaacat	3780
ttaactctct	cgtttctcat	cttcagtgtg	attccaaggg	atactacaat	tctgttgaat	3840
gtgtgtcagt	taggggtgtg	aaagtcccca	ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	3900
atgcattctca	attagtccgc	aaccagggtg	ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	3960
agtatgcaaa	gcattgcatt	caattagtca	gcaaccatag	tcccgcctcc	aactccgccc	4020
atcccgcctc	taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	actaatcttt	4080
tttattttat	cagaggccga	ggcgctctg	agctattcca	gaagtattga	ggaggctttt	4140
ttggagggct	aggctttttg	aaaaaagcta	attcagcctg	aatggcgaat	gggacgcgcc	4200
ctgtagcggc	gcattaaagc	cggcggtgtg	ggtgttaacg	cgcagcgtga	ccgctacact	4260
tgccagcgcc	ctagcgcccg	ctcctttcgc	tttcttccct	tcctttctcg	ccacgttcgc	4320
cggctttccc	cgtcaagctc	taaatcgggg	gctcccttta	gggttcogat	ttagtgtctt	4380
acgggcaccc	caccccaaaa	acttgattag	ggtgatgggt	cacgtagtgg	gccatcgccc	4440

tgatagacgg	tttttcgccc	tttgacgttg	gagtccacgt	tctttaatag	tggaactcttg	4500
ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	tccgtctatt	cttttgattt	ataagggatt	4560
ttgcggattt	cggcctattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	taacgcgaat	4620
tttaacaaaa	tattaacgtt	tacaatttca	ggtggcacct	ttcggggaaa	tgtgcgcgga	4680
acccctatct	gtttattttt	ctaaatacat	tcaaataatg	atccgctcat	gagacaataa	4740
ccctgataaa	tgcttcaata	atattgaaaa	aggaagagta	tgagtattca	acatttccgt	4800
gtcgccctta	ttcccttttt	tgccggcattt	tgccctccctg	tttttgctca	cccagaaacg	4860
ctggtgaaa	taaaagatgc	tgaagatcag	ttgggtgcac	gagtgggtta	catcgaaactg	4920
gatctcaaca	goggtaagat	ccttgagagt	tttcgccccg	aagaacgttt	tccaatgatg	4980
agcaactttta	aagtctctgt	atgtggcgcg	gtattatccc	gtattgacgc	cgggcaagag	5040
caactcggtc	gccgcataca	ctattctcag	aatgacttgg	ttgagtactc	accagtcaca	5100
gaaaagcctc	ttacggatgg	catgacagta	agagaattat	gcagtgtctg	cataaccatg	5160
agtgaataca	ctgcggccaa	cttactttctg	acaacgatcg	gaggaccgaa	ggagctaacc	5220
gctttttttg	acaacatggg	ggatcatgta	actcgccttg	atcgttgga	accggagctg	5280
aatgaagcca	taccaaacga	cgagcgtgac	accacgatgc	ctgtagcaat	ggcaacaacg	5340
ttgcgcaaac	tattaactgg	cgaactactt	actctagctt	cccggcaaca	attaatagac	5400
tggtatggag	cggataaagt	tgccaggacca	cttctgcgct	cggcccttcc	ggctggctgg	5460
tttatttgctg	ataaatctgg	agccgggtgag	cgtgggtctc	gcggtatcat	tgccagcactg	5520
gggccagatg	gtaagccctc	ccgtatcgta	gttatctaca	cgacggggag	tcaggcaact	5580
atggatgaac	gaaatagaca	gatcgctgag	ataggtgcct	cactgattaa	gcattggtaa	5640
ctgtcagacc	aagtttactc	atatatactt	tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	5700
aaaaggatct	aggtgaagat	cctttttgat	aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	5760
ttttcgttcc	actgagcgtc	agaccccgta	gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	5820
ttttttctgc	gcgtaatctg	ctgcttgcaa	acaaaaaaac	caccgctacc	agcgggtggtt	5880
tgttttgccg	atcaagagct	accaactctt	tttccgaagg	taactggctt	cagcagagcg	5940
cagataccaa	atactgtcct	tctagtgtag	ccgtagttag	gccaccactt	caagaactct	6000
gtagcacccg	ctacatacct	cgctctgcta	atcctgttac	cagtggctgc	tgccagtggc	6060
gataagtctg	gtcttaccgg	gttggactca	agacgatagt	taccggataa	ggcgcagcgg	6120
tcgggctgaa	cgggggggtt	gtgcacacag	cccagcttgg	agcgaacgac	ctacaccgaa	6180
ctgagatacc	tacagcgtga	gcattgagaa	agcgccacgc	ttcccgaagg	gagaaaggcg	6240
gacaggatc	cggtaagcgg	cagggtcgga	acaggagagc	gcacgagggg	gcttccaggg	6300
ggaaacgcct	ggtatcttta	tagtcctgtc	gggtttcgcc	acctctgaat	tgagcgtcga	6360
tttttgtgat	gctcgtcagg	ggggcgagc	ctatggaaaa	acgccagcaa	cgcc	6414

(1) Informace o SEQ ID NO: 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 6062 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(iii) HYPOTETICKÁ:

(iv) POZITIVNÍ:

(ix) ZNAKY:

(A) Název/klíč: umělá sekvence

(D) Jiné informace:

/poznámka="plazmid"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 18:

```

tcgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag 60
cccatatatg gagttccgcg ttacataaact taaggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc 120
caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatggt cccatagtaa cgccaatagg 180
gacttttccat tgacgtcaat ggttggaagta tttacggtaa actgccact tggcagtaca 240
tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgaagtc aatgaaggta aatggccgc 300
ctggcattat gccagtgaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt 360
attagtcacg gctattacca tggatgatgc gttttggcag tacatcaatg ggcgtagata 420
gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttggt 480
ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgcc cattgacgca 540
aatggggcgt aggcgtgtac gttgggaggt ctatataagc agagctcgt tagtgaaccg 600
tcagatcgcc tggagacgcc atccacgctg ttttgacctc catagaagac accgggaccg 660
atccagcctc cgcgcccggg aacggtgcac tggaaacggg attcccgtg ccaagagtca 720
ggtaagtacc gcctatagag aagactcttg ggtttctgat aggcactgac tctctctgcc 780
tattggtcta ttttccacc cttaggctgc tgggtgctta ctggcttacc gaaattaata 840
cgactcacta tagggagacc caagctctg caggtcgaca tcgatggatc cggtagctcg 900
agcgcgaatt ctctagagat atcttggtta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 960
atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttccat gcattctagt tgtgggttgt 1020
ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatcaattc tgaaaaacta gccttaaaga 1080
cagacagctt tgttctagtc agccaggcaa gcatatgtaa ataaagttcc tcagggaact 1140
gaggttaaaa gatgtatcct ggacctgcca gacctggcca ttacagtaaa cagaagattc 1200
cgctcaagt tccggttaac aacaggaggc aacagatctt caaatctatt acttctaate 1260
gggtaattaa aacctttcaa ctaaaacacg gaacacgga tgtcaccac ttttcttcc 1320
ccggtccgc ccttctcagt actccccacc attaggctcg ctactccacc tccacttccg 1380
ggcgcgacac ccacgtgccc tctccacccc gacgctaacc ccgcccctgc ccgtctgacc 1440
ccgcccacca cctggccccg ccccggttag gacagaagaa accccgggca gccgcagcca 1500
aggcggacgg gtagacgctg ggggcgctga ggagtcgtcc ttacattct ctgctggctc 1560
ggtgggggac gcggtggatc tcaggcttcc ggaagactgg aagaacggc tcagaacggc 1620
ttgtctccgc ggggcttggg cggcggaaga atggccgcta gacgcggaot tgggtgcgagg 1680
catcgagga tgcagaagag caagcccgc gggagcgcg ggtgtacta ccccgccct 1740
ggagcgggca cgccggactg ggcggggcgg gcctgggtga ggcggagtct gacctgtg 1800
aggcggggcc tctgatgttc aaataggatg ctaggcttgt tgaggcgtgg ctccgattc 1860
acaagtggga agcagcgccg ggcgactgca atttcggccc aaacttgggg gaagcacagc 1920
gtacaggctg cctaggtgat cgctgctgct gtcattggtt gaccgctgaa ctgcatcg 1980
gccgtgtccc agaatatggg catcggaag aacggagacc ttccctggcc aatgctcagg 2040
tactggctgg attgggttag ggaaacggag gcggttcgct gaatcggtc gagcacttg 2100
cggagacggc cgggccaaact acttagggac agtcatgagg ggtaggcccg ccggtgctg 2160
cccttgccca tgcccgcggt gatcccatg ctgtgccagc ctttgcccag aggcgctcta 2220
gctggggagca aagtcoggtc actgggcagc accaccccc ggacttgcac gggtagccgc 2280

```

tgagatggag	cctgagcaca	cgtgacaggg	tccctgttaa	cgagtggtt	ctctaacttt	2340
caggaacgag	ttcaagtact	tccaaagaat	gaccaccacc	tcctcagtg	aaggtaaa	2400
gaacctgggtg	attatgggcc	ggaaaacctg	gttctccatt	cctgagaaga	atcgaccttt	2460
aaaggacaga	attaatatag	ttctcagtag	agagctcaag	gaaccaccac	aaggagctca	2520
ttttcttgcc	aaaagtctgg	accatgcctt	aaaacttatt	gaacaaccag	agttagcaga	2580
taaagtggac	atggtttggg	tagttggagg	cagttccgtt	tacaagggaag	ccatgaatca	2640
gccaggccat	ctcagactct	ttgtgacaag	gatcatgcag	gaatttgaaa	gtgacacggt	2700
cttcccagaa	attgatttgg	agaaatataa	acttctccca	gagtaccag	gggtcccttc	2760
tgaagtccag	gaggaaaaag	gcatcaagta	taaatttgaa	gtctatgaga	agaaaggcta	2820
acagaaagat	aottgctgat	tgacttcaag	ttctactgct	ttcctcctaa	aattatgcat	2880
ttttacaaga	ccatgggact	tgtgttggct	ttagatccctg	tgcatccctg	gcaactgttg	2940
tactctaaag	cactccccaa	agtcattgccc	cagccctgtt	ataattctaa	acaattagaa	3000
ttattttcat	tttcatttagt	ctaaccagggt	tattattaaat	atactttaag	aaacaccatt	3060
tgccataaag	ttctcaatgc	ccctcccatg	cagcctcaag	tggtcccca	gcagatgcat	3120
agggtagtgt	gtgtacaaga	gaccccaaag	acatagagcc	cctgagagca	tgagctgata	3180
tgggggctca	tagagatagg	agctagatga	ataagtacaa	agggcagaaa	tggtttttaa	3240
ccagcagagc	tagaactcag	acttttaaaga	aaatttagatc	aaagtagaga	ctgaattatt	3300
ctgcacatca	gactctgagc	agagttctgt	tcactcagac	agaaaatggg	taaattgaga	3360
gctggctcca	ttgtgctcct	tagagatggg	agcaggtgga	ggattatata	aggtctggaa	3420
catttaactt	ctccgtttct	catcttcagt	gagattccaa	gggatactac	aattctgtgg	3480
aatgtgtgtc	agtttaggggt	tggaaggtcc	ccaggctccc	cagcaggcag	aagtatgcaa	3540
agcattgcac	tcaattagtc	agcaaccagg	tgtggaaagt	ccccaggctc	cccagcaggc	3600
agaagtatgc	aaagcatgca	tctcaattag	tcagcaacca	tagtcccgcc	cctaactccg	3660
cccatccgc	ccctaactcc	gcccagttcc	gcccattctc	cgccccatgg	ctgactaatt	3720
ttttttat	atgcagaggc	cgaggcgcc	ctgagctatt	ccagaagtag	tgaggaggct	3780
tttttggagg	cctaggcttt	tgcaaaaaag	ctaattcagc	ctgaatggcg	aatgggaaat	3840
tgtaaaogtt	aatattttgt	taaaattcgc	gttaaat	tgtaaatca	gtcattttt	3900
taaccaatag	gocgaaatcg	gcaaaatccc	ttataaatca	aaagaataga	ccgagatagg	3960
gtttgagtgt	gttccagttt	ggaacaagag	tcacactatta	aagaacgtgg	actccaacgt	4020
caaaggcgga	aaaacgctct	atcaggcgga	tggcccacta	cgtgaacat	cacccataatc	4080
aagtttttgg	ggtcgagggtg	ccgtaaagca	ctaaatcgga	accctaaagg	gagccccga	4140
tttagagctt	gacgggggaa	gcccggcgaa	gtggcgagaa	aggaaggga	gaaagcgaaa	4200
ggagcggggc	ctagggcgct	ggcaagtgt	gcccgtacgc	tgccggtaac	caccaccccc	4260
gcccgcctta	atgcgcgcgt	acaggcgcg	tcagggtgga	cttttcgggg	aaatgtgcgc	4320
ggaaccccta	tttgttttatt	tttctaaata	cattcaaata	tgtatccgct	catgagacaa	4380
taacccctgat	aaatgcttca	ataatattga	aaaagggaaga	gtatgagtat	tcaacatttc	4440
cgtgttcgccc	ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	ctgttttttc	tcaccacgaa	4500
aogctgttga	aagtataaaga	tgctgaagat	cagtcgggtg	cacgagtggg	ttacatcgaa	4560
ctggatctca	acagcggtaa	gatccttgag	agttctcgcc	cogaagaacg	ttttccaatg	4620
atgagcactt	ttaaagtctt	gctatgtggc	gcccgtattat	cccgtattga	cgccgggcaa	4680
gagcaactcg	gtgcgcgcgt	acactattct	cagaatgact	tggttgagta	ctcaccagtc	4740
acagaaaagc	atcttacgga	tggcatgaca	gtaagagaat	tatgcagtgc	tgccataaacc	4800
atgagtata	acactgccc	caacttactt	ctgacaacga	toggaggacc	gaaggagcta	4860
accgcttttt	tgcaacaacat	gggggatcat	gtaactcgcc	ttgatcgttg	ggaaccggag	4920
ctgaatgagc	ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	tgccgttagc	aatggcaaca	4980
acgttgcgga	aactattaac	tggcgaaacta	cttactctag	cttcccggca	acaatttaata	5040
gactggatgg	aggcggataa	agttgcagga	ccacttctgc	gctcggccct	tcgggctggc	5100
tggttttattg	ctgataaaatc	tggagccggt	gagcgtgggt	ctcgcggtat	cattgcagca	5160
ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgtatc	gtagtattct	acacgacggg	gagtcaggca	5220
actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagatagggtg	cctcactgat	taagcattgg	5280
taactgtcag	accaagttaa	ctcatatata	ctttagattg	atttaaaact	tcatttttaa	5340
tttaaaagga	tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	tgacaaaat	cccttaacgt	5400
gagtttttgt	tcactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	ttcttgagat	5460
cttttttttc	tgccgcta	ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	accagcgggtg	5520
gtttgtttgc	cggtatcaaga	gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	cttcagcaga	5580
gcccagatac	caaataactgt	ccttctagtg	tagccgtagt	taggccacca	cttcaagaac	5640
tctgtagcac	cgcctacata	cctcgctctg	ctaactcctgt	taccagtggc	tgctgccagt	5700
ggcgataagt	cgtgtcttac	cgggttgga	tcaagacgat	agttaccgga	taaggcgag	5760
cggctcgggt	gaacgggggg	ttcgtgcaca	cagccagct	tggagcgaac	gacctacacc	5820
gaactgagat	acctacagcg	tgagcattga	gaaagcgcca	cgcttccga	agggagaaa	5880
gcccagaggt	atccggtaag	cggcagggtc	ggaacaggag	agcgcacgag	ggagcttcca	5940
gygggaaacg	cctggtatct	ttatagtcct	gtcgggttcc	gccacctctg	acttgagcgt	6000
cgatttttgt	gatgctcgtc	agggggcg	agcctatgga	aaaacgccag	caacgcagct	6060
gc						6062

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Molekula protilátky obsahující variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovaná aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 1 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát.
2. Molekula protilátky, kde variabilní oblast těžkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizovaná aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1.
3. Molekula protilátky obsahující variabilní oblast lehkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 2 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát.
4. Molekula protilátky, kde variabilní oblast lehkého řetězce obsahuje aminokyseliny, jak charakterizuje aminokyselinová sekvence SEQ ID NO: 2.
5. Molekula protilátky obsahující variabilní oblast lehkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 3 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát.
6. Molekula protilátky, kde variabilní oblast lehkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 3.

7. Molekula protilátky podle nároků 1 a 3 obsahující variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 1 a dále obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 2 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát.
8. Molekula protilátky podle nároků 2 a 4, kde variabilní oblast těžkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1 a kde variabilní oblast lehkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 2.
9. Molekula protilátky podle nároků 1 a 5 obsahující variabilní oblast těžkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 1 a dále obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce charakterizovanou aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 3 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát.
10. Molekula protilátky podle nároků 2 a 6, kde variabilní oblast těžkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 1 a kde variabilní oblast lehkého řetězce obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 3.
11. Molekula protilátky obsahující variabilní oblast těžkého řetězce kódovaná nukleovou kyselinou definovanou v SEQ ID NO: 4 nebo její fragment, alelická varianta, funkční

varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleových kyselin, fúzní molekula nebo chemický derivát.

12. Molekula protilátky kde variabilní oblast těžkého řetězce je kódovaná sekvencí nukleové kyseliny, jak definuje SEQ ID NO: 4.
13. Molekula protilátky obsahující variabilní oblast lehkého řetězce kódovaná sekvencí nukleové kyseliny, jak definuje SEQ ID NO: 5 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleových kyselin, fúzní molekula nebo chemický derivát.
14. Molekula protilátky, kde variabilní oblast lehkého řetězce je kódovaná sekvencí nukleové kyseliny, jak definuje SEQ ID NO: 5.
15. Molekula protilátky obsahující variabilní oblast lehkého řetězce kódovanou sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 6 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleových kyselin, fúzní molekula nebo chemický derivát.
16. Molekula protilátky kde variabilní oblast lehkého řetězce je kódovaná sekvencí nukleové kyseliny, jak definuje SEQ ID NO: 6.
17. Molekula protilátky podle nároků 11 a 13 obsahující variabilní oblast těžkého řetězce kódovanou sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 4 a dále obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce kódovanou sekvencí nukleové kyseliny, jak definuje SEQ ID NO: 5 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleových kyselin, fúzní molekula nebo chemický derivát.

18. Molekula protilátky podle nároků 12 a 14, kde variabilní oblast těžkého řetězce je kódovaná sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 4 a variabilní oblast lehkého řetězce je kódovaná sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 5.
19. Molekula protilátky podle nároků 11 a 15 obsahující variabilní oblast těžkého řetězce kódovanou sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 4 a dále obsahuje variabilní oblast lehkého řetězce kódovanou sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 6 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleových kyselin, fúzní molekula nebo chemický derivát.
20. Molekula protilátky podle nároků 12 a 16, kde variabilní oblast těžkého řetězce je kódovaná sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 4 a variabilní oblast lehkého řetězce je kódovaná sekvencí nukleové kyseliny definovanou v SEQ ID NO: 6.
21. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 20 charakterizovaná tím, že každá z uvedených variabilních oblastí lehkého a těžkého řetězce je samostatně spojena s lidskou konstantní oblastí.
22. Molekula protilátky podle nároku 21, kde uvedenou lidskou konstantní oblastí lehkého řetězce je konstantní oblast lidského řetězce kappa.
23. Molekula protilátky podle nároku 21 nebo 22, kde uvedenou lidskou konstantní oblastí těžkého řetězce je konstantní oblast lidského IgG1.
24. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 23 obsahující těžký řetězce charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 7 a dále obsahuje lehký

řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 8 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát.

25. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 24, kde těžký řetězec obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 7 a kde lehký řetězec obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 8.
26. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 25 obsahující těžký řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 7 a obsahující lehký řetězec charakterizovaný aminokyselinovou sekvencí definovanou v SEQ ID NO: 9 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, glykosylační varianta, fúzní molekula nebo chemický derivát.
27. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 26, kde těžký řetězec obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 7 a kde lehký řetězec obsahuje aminokyseliny charakterizované aminokyselinovou sekvencí SEQ ID NO: 9.
28. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 27 obsahující těžký řetězec kódovaný sekvencí nukleových kyselin definovanou v SEQ ID NO: 10 a obsahující lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleových kyselin definovanou v SEQ ID NO: 11 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleových kyselin, fúzní molekula nebo chemický derivát.
29. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 28, kde těžký řetězec je kódován sekvencí nukleových kyselin SEQ

ID NO: 10 a kde lehký řetězec je kódován sekvencí nukleových kyselin SEQ ID NO: 11.

30. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 29 obsahující těžký řetězec kódovaný sekvencí nukleových kyselin definovanou v SEQ ID NO: 10 a obsahující lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleových kyselin definovanou v SEQ ID NO: 12 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleových kyselin, fúzní molekula nebo chemický derivát.
31. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 30, kde těžký řetězec je kódován sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 10 a kde lehký řetězec je kódován sekvencí nukleových kyselin SEQ ID NO: 12.
32. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 31 obsahující těžký řetězec kódovaný sekvencí nukleových kyselin definovanou v SEQ ID NO: 13 a obsahující lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleových kyselin definovanou v SEQ ID NO: 14 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleových kyselin, fúzní molekula nebo chemický derivát.
33. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 32, kde těžký řetězec je kódován sekvencí nukleových kyselin SEQ ID NO: 13 a kde lehký řetězec je kódován sekvencí nukleových kyselin SEQ ID NO: 14.
34. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 33 obsahující těžký řetězec kódovaný sekvencí nukleových kyselin definovanou v SEQ ID NO: 13 a dále obsahuje lehký řetězec charakterizovaný sekvencí nukleových kyselin definovanou v SEQ ID NO: 15 nebo její fragment, alelická

varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleových kyselin, fúzní molekula nebo chemický derivát.

35. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 34, kde těžký řetězec je kódován sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 13 a kde lehký řetězec je kódován sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: 15.
36. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 35 obsahující těžký a lehký řetězec kódovaný sekvencí nukleových kyselin definovanou v SEQ ID NO: 16 nebo její fragment, alelická varianta, funkční varianta, varianta založená na degenerovaném kódu nukleových kyselin, fúzní molekula nebo chemický derivát.
37. Molekula protilátky podle libovolného z nároků 1 až 36, kde těžký a lehký řetězec je kódován sekvencí nukleových kyselin SEQ ID NO: 16.
38. Protein protilátky podle libovolného z nároků 1 až 37, který je konjugován s terapeutickým činidlem.
39. Protein protilátky podle nároku 38, kde uvedené terapeutické činidlo se vybralo ze skupiny zahrnující radioizotopy, toxiny, toxoidy, zánětlivá činidla a chemoterapeutická činidla.
40. Protein protilátky podle nároku 39, kde uvedené terapeutické činidlo je spojené s protilátkovým proteinem prostřednictvím linkeru vybraného ze skupiny MAG-3 GABA, MAG-2 GABA a N2S2.
41. Protein protilátky podle nároku 40, kde uvedené terapeutické činidlo je spojené s protilátkovým proteinem prostřednictvím MAG-2 GABA.

42. Protein protilátky podle libovolného z nároků 38 až 41, kde uvedený radioizotop je radioizotop emitující beta záření.
43. Protein protilátky podle nároku 42, kde uvedený radioizotop se vybral ze skupiny zahrnující $^{186}\text{rhenium}$, $^{188}\text{rhenium}$, $^{131}\text{jód}$ a $^{90}\text{yttrium}$.
44. Protein protilátky podle nároku 43, kde uvedený radioizotop je $^{186}\text{rhenium}$.
45. Protein protilátky podle libovolného z nároků 39 až 44, který vykazuje specifickou aktivitu od přibližně 0,5 do 15 mCi/mg nebo od přibližně 0,5 do 14 mCi/mg, s výhodou přibližně 1 až 10 mCi/mg, s výhodou přibližně 1 až 5 mCi/mg a nejvýhodněji 2 až 6 mCi/mg nebo 1 až 3 mCi/mg.
46. Protein protilátky podle libovolného z nároků 1° až 37 charakterizovaný tím, že je značen.
47. Protein protilátky podle nároku 46, kde uvedené značení je detekovatelný marker.
48. Protein protilátku podle nároku 47, kde detekovatelný marker se vybral ze skupiny obsahující enzymy, barviva, radioizotopy, digoxigenin a biotin.
49. Protein protilátky podle libovolného z nároků 1 až 37 konjugovaný se zobrazovacím činidlem.
50. Protein protilátky podle nároku 49, kde zobrazovacím činidlem je radioizotop.
51. Protein protilátky podle nároku 50, kde uvedeným radioizotopem je radioizotop emitující gama záření.
52. Protein protilátky podle nároku 51, kde uvedeným radioizotopem je ^{125}I .

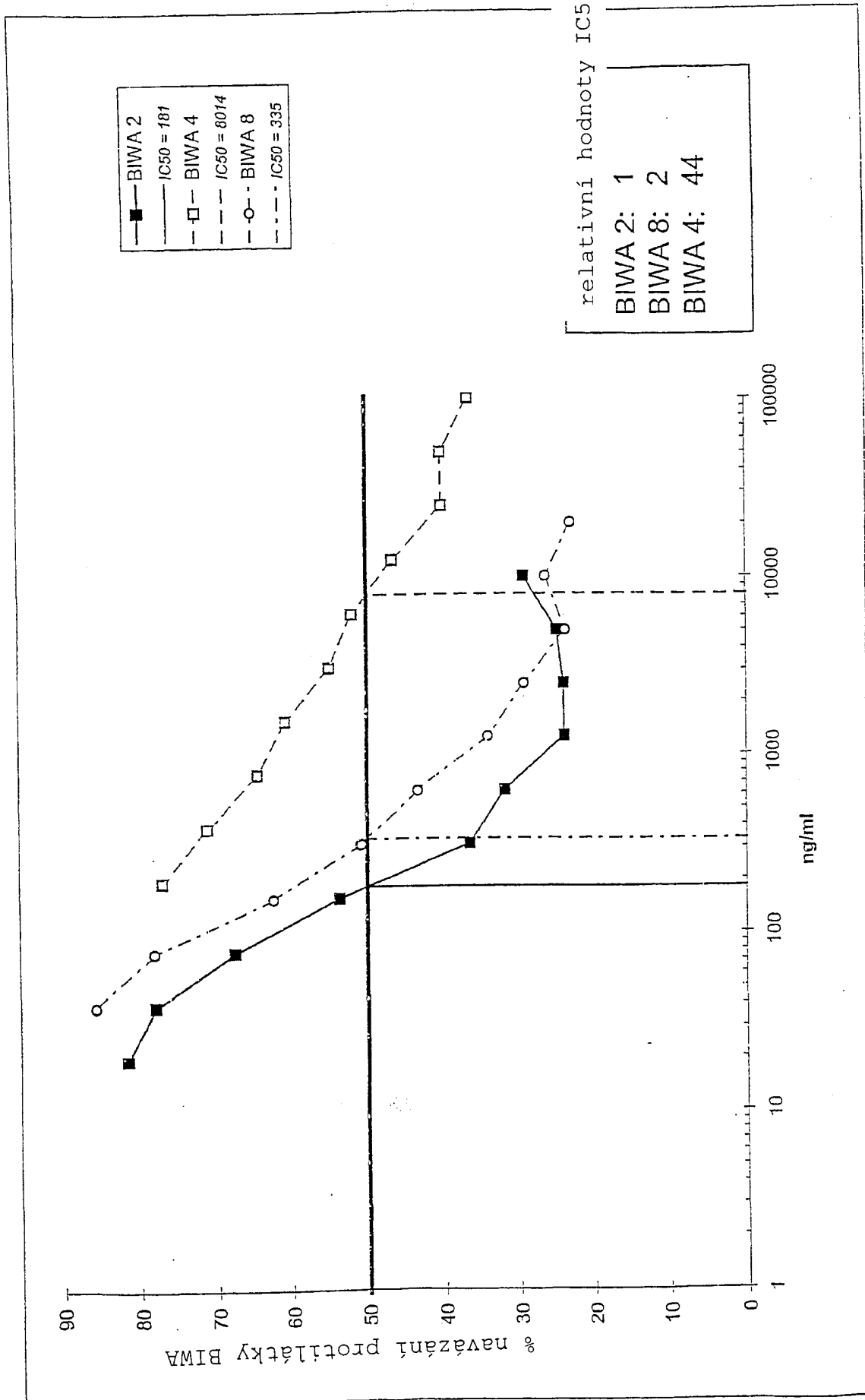
53. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje protein protilátky podle libovolného z nároků 1 až 45 a farmaceuticky přijatelný nosič a pomocnou látku.
54. Farmaceutický prostředek podle nároku 53, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e protein protilátky je konjugován s radioizotopem podle libovolného z nároků 39 až 44 a vykazuje specifickou aktivitu od přibližně 0,5 do 15 mCi/mg nebo od přibližně 0,5 do 14 mCi/mg, s výhodou přibližně 1 až 10 mCi/mg, s výhodou přibližně 1 až 5 mCi/mg a nejvýhodněji 2 až 6 mCi/mg nebo 1 až 3 mCi/mg.
55. Farmaceutický prostředek podle nároku 53 nebo 54, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e množství radioaktivně značené protilátky ve farmaceutickém prostředku, který bude aplikován pacientovi, je 10, 20, 30, 40, 50 nebo 60 mCi/m².
56. Farmaceutický prostředek podle libovolného z nároků 53 až 55, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e množství radioaktivně značené protilátky ve farmaceutickém prostředku, který bude aplikován pacientovi, je 50 mCi/m².
57. Farmaceutický prostředek podle libovolného z nároků 53 až 56, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje jeden nebo více ochranných prostředků radioaktivního značení vybraného ze skupiny zahrnující kyselinu askorbovou, kyselinu gentisovou, kyselinu „reductic“, kyselinu „erythrorbic“, p-aminobenzoovou kyselinu, 4-hydroxybenzoovou kyselinu, kyselinu nikotinovou, nikotinamid, 2,5-dihydroxy-1,4-benzendisulfonovou kyselinu, povidon, inositol a/nebo citrát.

58. Farmaceutický prostředek podle libovolného z nároků 53 až 57, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e ochranným prostředkem radioaktivního značení je kyselina askorbová.
59. Farmaceutický prostředek podle libovolného z nároků 53 až 58, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený protein protilátky obsahuje molekulu protilátky vybranou ze skupiny molekul protilátky podle nároků 8, 10, 18, 20, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 36, 37 spojenou s ^{186}Re prostřednictvím MAG-2 GABA a dále obsahuje ochranný prostředek radioaktivního značení kyselinu askorbovou.
60. Použití proteinu protilátky podle libovolného z nároků 1 až 45 při výrobě léčebného prostředku pro léčbu zhoubného bujení.
61. Použití proteinu protilátky podle nároku 60, kde uvedené zhoubné bujení se vybralo ze skupiny zahrnující kolorektální karcinom, karcinom plic, který není karcinomem z malých buněk, karcinom prsu, karcinom oblasti hlavy a krku, karcinom vaječníků, karcinom plic, karcinom močového měchýře, karcinom pankreasu a metastatické karcinomy mozku.
62. Použití proteinu protilátky podle libovolného z nároků 60 nebo 61, který je konjugován s radioizotopem podle libovolného z nároků 39 až 44 a vykazuje specifickou aktivitu od přibližně 0,5 do 15 mCi/mg nebo od přibližně 0,5 do 14 mCi/mg, s výhodou přibližně 1 až 10 mCi/mg, s výhodou přibližně 1 až 5 mCi/mg a nejvýhodněji 2 až 6 mCi/mg nebo 1 až 3 mCi/mg.
63. Použití proteinu protilátky podle nároku 62, kde množství radioaktivně značené protilátky ve farmaceutickém prostředku, které bude aplikováno pacientovi, je 10, 20, 30, 40, 50 nebo 60 mCi/m².

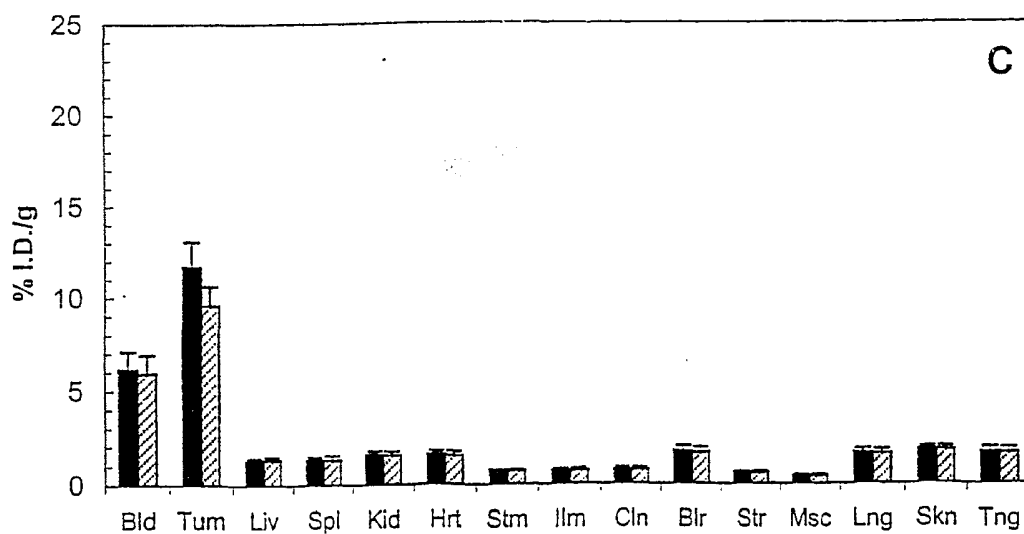
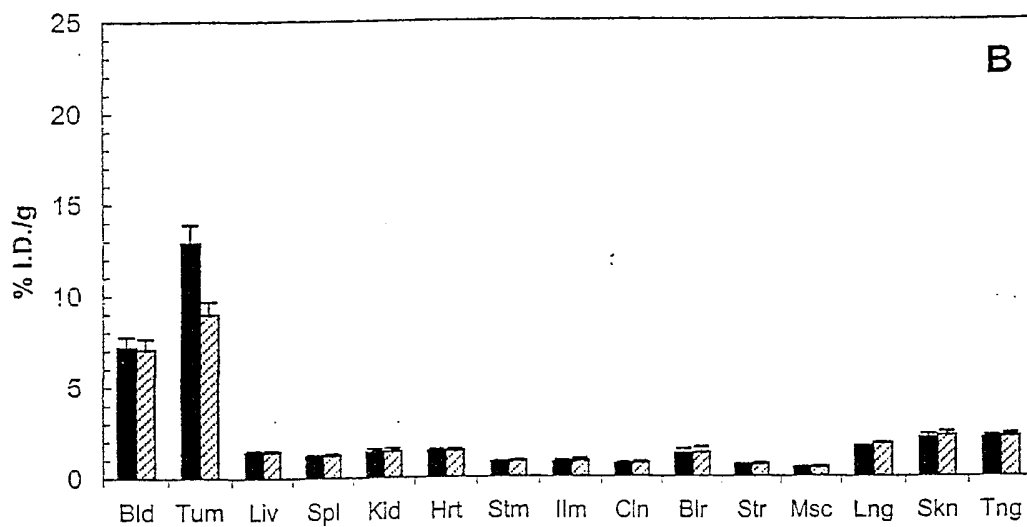
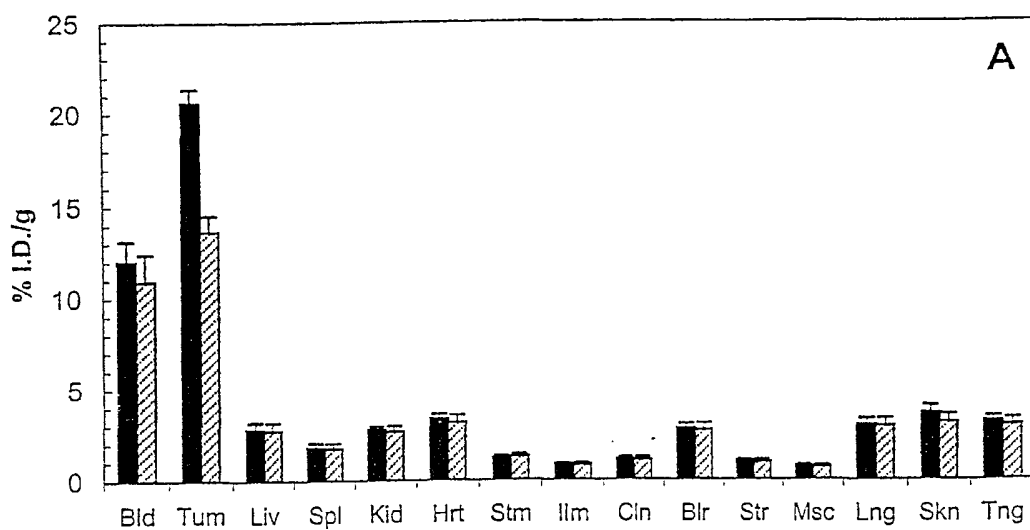
64. Použití proteinu protilátky podle nároku 62, kde množství radioaktivně značené protilátky ve farmaceutickém prostředku, které bude aplikováno pacientovi, je 50 mCi/m^2 .
65. Způsob léčby zhoubného bujení, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e protein protilátky podle libovolného z nároků 1 až 45 je aplikován jednou nebo několikrát jedinci, který to potřebuje, přičemž uvedený protein protilátky se selektivně váže na CD44v6, poškozuje nádorové buňky prostřednictvím s ním spojeného terapeutického činidla a sleduje se úspěch léčby.
66. Způsob podle nároku 65, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e nádor se vybral ze skupiny zahrnující kolorektální karcinomy, karcinomy plic, který není karcinomem z malých buněk, karcinomy prsu, karcinomy oblasti hlavy a krku, karcinomy vaječníků, karcinomy plic, karcinomy močového měchýře, karcinomy pankreatu a metastatické karcinomy mozku.
67. Nukleová kyselina charakterizovaná tím, že kóduje protein protilátky podle libovolného z nároků 1 až 37.
68. Rekombinantní DNA vektor charakterizovaný tím, že obsahuje nukleovou kyselinu podle nároku 67.
69. Rekombinantní DNA vektor podle nároku 68 charakterizovaný tím, že je expresivním vektorem.
70. Rekombinantní DNA vektor podle nároku 68 nebo 69 charakterizovaný tím, že je vektorem pAD-CMV nebo jeho funkčním derivátem.
71. Rekombinantní DNA vektor podle libovolného z nároků 68 až 70 charakterizovaný tím, že je vektorem N5KG1Val nebo jeho funkčním derivátem.

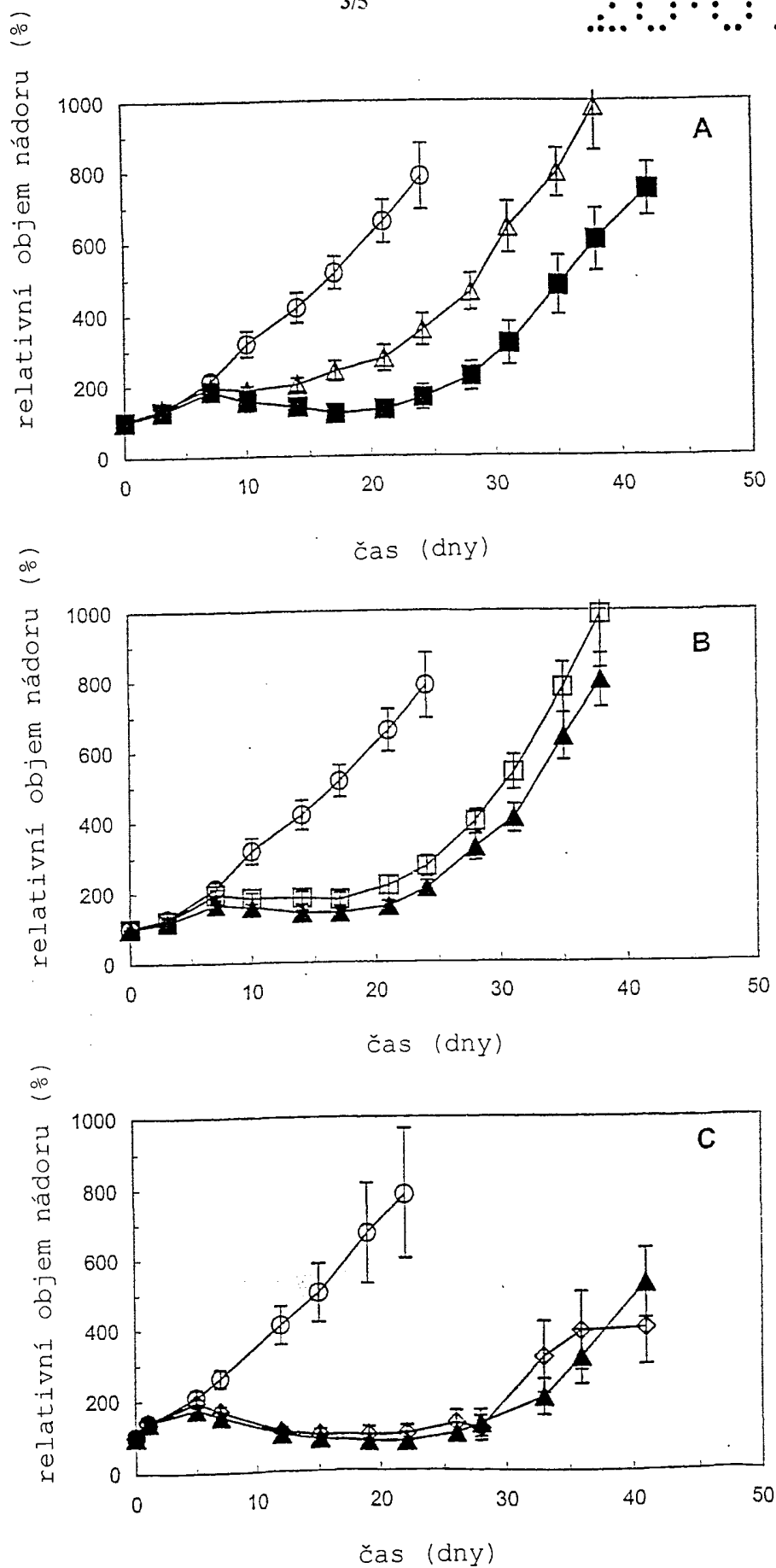
72. Hostitel charakterizovaný tím, že obsahuje vektor podle libovolného z nároků 68 až 71.
73. Hostitel podle nároku 72 charakterizovaný tím, že je eukaryontní hostitelskou buňkou.
74. Hostitel podle nároku 72 nebo 73 charakterizovaný tím, že je savčí buňkou.
75. Hostitel podle libovolného z nároků 72 až 74 charakterizovaný tím, že je buňkou BHK, CHO nebo COS.
76. Hostitel podle nároku 72 chrakterizovaný tím, že je bakteriofágem.
77. Hostitel podle nároku 72 charakterizovaný tím, že je prokaryontní hostitelskou buňkou.
78. Způsob přípravy proteinu protilátky podle libovolného z nároků 1 až 37, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje kultivaci hostitele podle libovolného z nároků 72 až 77 za podmínek, při kterých dochází k expresi uvedeného proteinu protilátky uvedenou hostitelskou buňkou, a izolaci uvedeného proteinu protilátky.
79. Způsob podle nároku 78, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedeným hostitelem je savčí buňka s výhodou buňka CHO nebo COS.
80. Způsob podle nároku 78 nebo 79, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená hostitelská buňka je transfekována společně dvěma plazmidy, které nesou expresivní jednotky pro lehký a těžký řetězec.

20.01.04
DJW053-3476

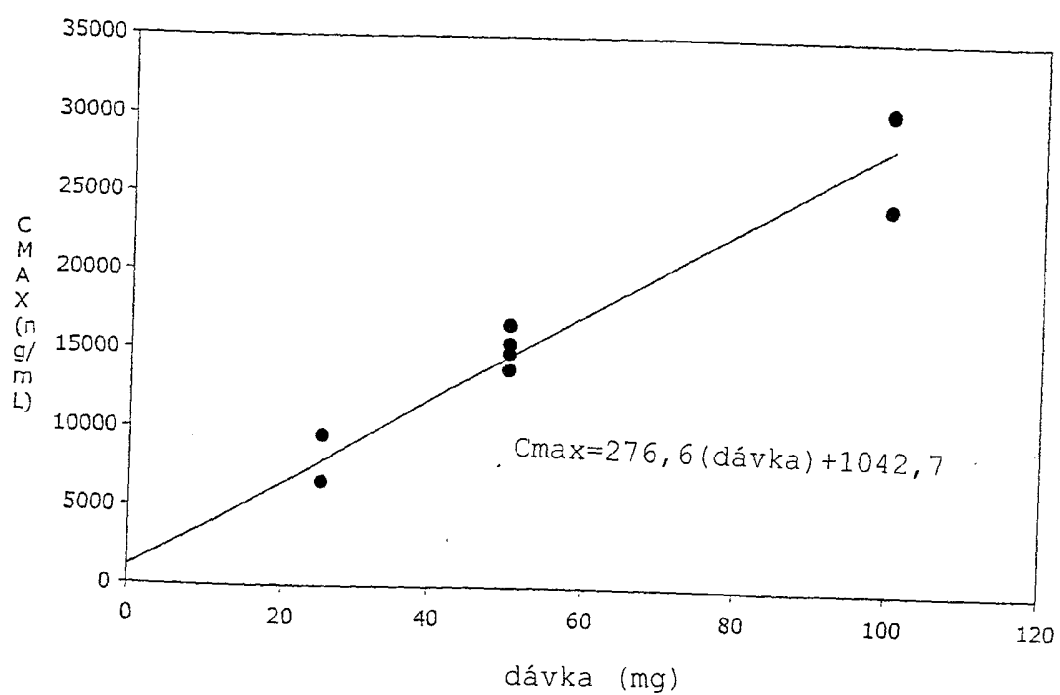


Obr. 1

20.01.04
2003-3476

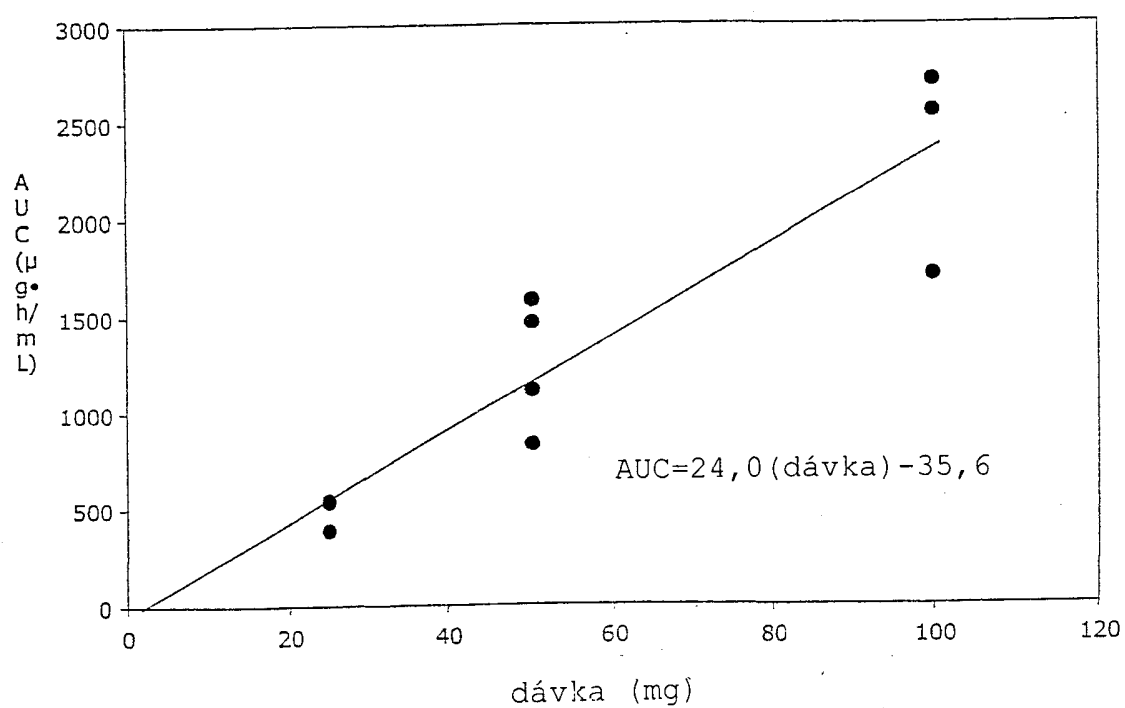
20.01.04
JN 2053-3476

Obr. 3

1170.1 Část A Hodnocení úměrnosti hodnot C_{max}

Obr. 4

1170.1 Část A Hodnocení úměrnosti hodnot AUC



Obr. 5