



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 31 224 T2** 2006.03.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 975 674 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 31 224.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/08983**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 920 171.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/050435**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.11.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.02.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **17.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.03.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 19/00 (2006.01)**
A61K 47/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

46895 02.05.1997 US

(73) Patentinhaber:

**The Government of the United States of America
as represented by the Secretary of the Department
of Health and Human Services, Bethesda, Md., US;
Immunomedics, Inc., Morris Plains, N.J., US**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**RYBAK, M., Susanna, Frederick, US; NEWTON, L.,
Dianne, Rockville, US; GOLDENBERG, M., David,
Mendham, US**

(54) Bezeichnung: **IMMUNTOXINE, DIE EIN ONC PROTEIN ENTHALTEN, GEGEN BÖSARTIGE ZELLEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

[0001] Toxische Enzyme aus Pflanzen und Bakterien wie Ricin, Diphtherietoxin und Pseudomonastoxin wurden an Antikörper oder Rezeptor-Bindungsliganden gebunden, um Zelltyp-spezifisch tötende Reagenzien zu bilden (Youle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5483 (1980); Gilliland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4539 (1980); Krolick et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5419 (1980)). Unabhängig von der Tatsache, dass die Zellerkennungs-Gruppierung nicht immer ein Antikörper ist, sind diese gerichteten Toxine im Allgemeinen als Immunotoxine bekannt. Diese Hybridproteine töten Zellen, die den Rezeptor oder den Zelloberflächenmarker exprimieren, den der Antikörper oder Ligandenabschnitt des Moleküls erkennt.

[0002] Unter geeigneten Bedingungen tritt das Toxin je nach bestimmtem Rezeptor oder Zelloberflächenmarker in das Cytosol ein, inaktiviert den Proteinsynthesemechanismus und verursacht den Tod der Targetzelle. Immunotoxine, die sich in Krebszellen, die in Zellkultur und in Tiermodellen wachsen, als hoch-toxisch erwiesen, zeigen das Potenzial dieser Reagenzien auf, in Blut und Lymphe entstehende bösartige Erkrankungen, die aufgrund ihrer Dissemination nicht durch herkömmliche chirurgische Praktiken zu behandeln sind, sowie feste Tumoren in begrenzten Kompartimenten wie zum Beispiel im intraperitonealen Hohlraum zu behandeln (beschrieben in Griffin et al., IMMUNOTOXINS, Boston/Dordrecht/Lancaster, Kluwer Academic Publishers, 433 (1988); Vitetta et al., Science 238, 1098 (1987); Fitzgerald et al., J. Natl. Cancer Inst. 81, 1455 (1989)). Herkömmliche Chemotherapien weisen, wenn sie auch zur Behandlung von manchen Krebsleiden wirksam sind, aufgrund der systemischen Toxizität der chemotherapeutischen Verbindungen unerwünschte Nebenwirkungen auf.

[0003] Ein idealer Kandidat für Krebstherapie wäre daher ein Immunotoxin, das gegenüber Krebszellen selektiv zytotoxisch ist, jedoch gegenüber nicht-kanzerösen Zellen des Patienten unschädlich bleibt. Die Verwendung von diesem Typ von Antitumor-Therapie wurde jedoch durch die Entwicklung von Immunantworten in Patienten auf fremde Proteine, die die Immunotoxine umfassen, vereitelt. Immunantworten gegen monoklonale Maus-Antikörper (Swaler et al., J. Immunol. 135, 1530 (1985); Schroff et al., Cancer Res. 45, 879 (1985)) und Anti-Toxin-Antikörper wurden sowohl in Tieren als auch in Menschen nachgewiesen, die mit Immunotoxinen behandelt wurden (Rybak et al., Immunol. and Allergy Clinics of North America 11(2), 359 (1991); Narkonen et al., Cancer Res. 47, 1377 (1987); A. Hertler, in: IMMUNOTOXINS, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/Lancaster, 475 (1988)). Fortschritte bei Humanisierungsverfahren erleichterten Immunogenität, die mit dem Antikörperabschnitt von Immunotoxinen assoziiert ist, in gewissem Maße (Bird et al., Science 242, 423 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879 (1988); Ward et al., Nature 341, 544 (1989); und Jones et al., Nature 314, 522 (1986)). Es wurde jedoch keine Lösung gefunden, um dem Problem der Immunogenität der toxischen Gruppierung anders zu begegnen als durch Immunsuppression der Patienten (Khazaeli et al., Proceedings of AACR 29, 418 (1988)). Somit gibt es einen stets aufrechten Bedarf an Verfahren und Zusammensetzungen, die die Immunogenität der toxischen Gruppierung von Immunotoxinen reduzieren würden und dennoch die Fähigkeit beibehalten, Zellen mit einem bestimmten Oberflächenmarker selektiv zu töten.

[0004] B-Zell-Lymphome fallen unter die allgemeine Rubrik der Nicht-Hodgkin-Lymphome und können entweder ein ausgebreiteter oder ein fester Tumor innerhalb des Lymphsystems sein. Radioaktiv markierte, humanisierte Maus-Antikörper, die gegen CD22 gezüchtet wurden, (LymphoCide™), ein Oberflächenmarker auf malignen B-Zellen, werden zur Zeit in klinischen Versuchen als eine Behandlung von B-Zell-Lymphomen untersucht (Immunomedics, Inc., Press Release, <http://www.immunomedic.com/thera1.html>). Siehe auch Amlot et al., Blood 82, 2624–2633 (1993); Sausville et al., Blood 85, 3457–3465 (1995); Grossbard et al., Blood 81, 2263–2271 (1993); Grossbard et al., Clin. Oncol. 11, 726–737 (1993). Bis heute wurden manche Antitumoreraktionen festgestellt, doch Immunotoxin-vermittelte Toxizität gegenüber normalem Gewebe vereitelte häufig Dosierungen in therapeutischen Konzentrationen. Zusätzlich zu CD22 waren mehrere B-Zell-spezifische Antigene wie z.B. CD19 und CD40 Ziele für Immunotoxine, die mit Pflanzentoxinen wie z.B. Ricin-A-Kette und bakteriellen Toxinen wie z.B. Pseudomonas-Exotoxin-A (PE) hergestellt wurden. Uckun et al., Blood 79, 2201–2214 (1992); Ghetie et al., Cancer Res. 51, 5876–5880 (1991); Francisco et al., Cancer Res. 55, 3099–3104 (1995).

[0005] Die Zytotoxizität von RNase A gegenüber Tumorzellen ist durch Studien, die in den 1960ern und 1970ern durchgeführt wurden, gut dokumentiert. Über frühe Untersuchungen ist in Roth, Cancer Res. 23, 657 (1963), berichtet. Die Bedeutung dieser frühen Studien wurde durch die Entdeckung unterstützt, dass ein Anti-Tumor-Protein aus Oozyten von Rana pipiens homolog zu Rinder-Pankreas-RNase A ist (Ardelt et al., J. Biol. Chem. 256, 245 (1991)). P-30-Protein (und hierin als onc-Protein bezeichnet) wurde aus Extrakten von frühen

Embryonen von *Rana pipiens*, basierend auf anti-proliferativen/zytotoxischen Wirkungen gegenüber Krebszellen in vitro (Darzynkiewicz et al., Cell Tissue Kinet. 21, 169 (1988); Mikulski et al., Cell Tissue Kinet. 23, 237 (1990)) und in Tiermodellen (Mikulski et al., J. Natl. Cancer Inst. 82, 151 (1990)), isoliert. Menschliche klinische Versuche der Phase III an onc-Proteinen in Patienten mit zahlreichen verschiedenen festen Tumoren sind zur Zeit im Gange.

[0006] Gesteigerte Zytotoxizität spezifisch für Targetzellen wurde durch Konjugieren des onc-Proteins und seiner Homologe, z.B. Rinder-Pankreas-RNase A, an Antikörper gegen Zelloberflächenmarker, die an Targetzellen vorhanden sind, erreicht. Rybak et al. (Drug Delivery 1, 3–10 (1993)) beispielsweise berichteten über verbesserte spezifische Zytotoxizität beim Targeting der menschlichen K562-Erythroleukämiezellen durch Immunokonjugate, die das onc-Protein und einen Antikörper gegen menschlichen Transferrinrezeptor enthalten. Zahlreiche verschiedene Zelloberflächen-Antikörper, insbesondere jene, die humanisiert wurden, um eine unerwünschte Immunantwort in einem Patienten zu minimieren, sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und zur Konstruktion von Immunokonjugaten zur Durchführung der vorliegenden Erfindung erhältlich. Die WO 96104925 beispielsweise beschreibt humanisierten monoklonalen LL2-Antikörper, der zur Bereitstellung spezifischer Zytotoxizität bei der Behandlung von B-Zell-Lymphomen und Leukämien nützlich ist.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft Immunotoxine, die zum Töten von malignen B-Zellen und anderen malignen Zellen nützlich sind und die auf einen Oberflächenmarker auf B-Zellen gerichtet sind, und die für die Immunotoxine kodierenden Nucleinsäurekonstrukte. Diese Reagenzien umfassen eine toxische Gruppierung, die von einem *Rana-pipiens*-Protein mit ribonucleolytischer Aktivität abstammt, die an einen Antikörper gebunden ist, der in der Lage ist, sich an eine ausgewählte Tumorzelle zu binden.

[0008] Die Erfinder haben erkannt, dass diese bestimmten Immunotoxine äußerst überraschende Eigenschaften aufwiesen, da sie bis zu 2.000-mal aktiver gegen maligne B-Zellen waren als ihre menschlichen RNase-Gegenstücke oder als das Toxin selbst. Weiters, wie nachstehend noch näher beschrieben wird, resultierte ihre Verwendung bei Verabreichung in vivo gegen ausgebreitete Tumoren in drastisch geringeren Nebenwirkungen. Diese äußerst wirksamen, jedoch augenscheinlich nicht-toxischen Immunotoxine, die gegen solche überall vorkommenden Erkrankungen wie B-Zell-Lymphome gerichtet sind, stellen eine neue und sehr interessante therapeutische Option für Patienten dar, die an solchen Erkrankungen leiden.

[0009] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist, zytotoxische RNase- (onc-Protein-) Immunotoxine bereitzustellen, die Zellen mit einem bestimmten Oberflächenmarker selektiv töten. Diese Immunotoxine sind minimal immunogen und bilden weniger systemische Toxizität als gegenwärtig bekannte Immunotoxine. Insbesondere ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, direkte Immunotoxine bereitzustellen, die Proteinfragmente mit ribonucleolytischer Aktivität umfassen, die an humanisierte Antikörper gebunden sind, welche spezifische Marker an Tumorzellen erkennen.

[0010] In einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Immunotoxin der vorliegenden Erfindung und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

[0011] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum selektiven Töten von Zellen. Das Verfahren umfasst das Kontaktieren der zu tötenden Tumorzellen mit einem selektiven Immunotoxin der vorliegenden Erfindung unter solchen Bedingungen, dass sich der monoklonale Antikörper an einen Oberflächenmarker an der Tumorzelle bindet und dadurch das toxische onc-Protein dazu veranlasst, die Zelle zu töten.

[0012] Verschiedene andere Ziele und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der Erfindung deutlich hervorgehen.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0013] **Fig. 1** zeigt, dass ONCONASE® gegenüber HUT-102-T-Zelllymphom-Zellen (die den durch LL2 erkannten Marker CD22 nicht tragen) stärker zytotoxisch ist als das Immunotoxin LL2-ONCONASE®.

[0014] **Fig. 2** zeigt die höhere Zytotoxizität von LL2-ONCONASE® gegenüber Burkitt-Lymphomzelllinien im Vergleich zu ONCONASE® allein.

[0015] [Fig. 3](#) zeigt, dass ONCONASE®, konjugiert an Antikörper, die gegen CD22 gerichtet sind, stärker inhibitorisch auf Proteinsynthese wirkt als EDN, konjugiert an Anti-CD22-Antikörper. EDN ist eine menschliche, nicht-toxische RNase wie im Text beschrieben.

[0016] [Fig. 4](#) zeigt, dass ONCONASE® im Vergleich zu menschlicher Pankreas-RNase stärker inhibitorisch auf Proteinsynthese wirkt, wenn sie an Antikörper konjugiert ist.

[0017] Die [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) zeigen, dass ¹²⁵I-markierte LL2-ONCONASE® durch die Lysosomen von Daudi-Zellen nicht so rasch abgebaut wird wie der LL2-Antikörper oder das LL2-EDN-Immunotoxin. [Fig. 5A](#) zeigt den Prozentsatz von RNase-Material, das in den Zellen zurückgehalten wird, und [Fig. 5B](#) zeigt den Prozentsatz von RNase-Material, das abgebaut und in den Überstand freigesetzt wird.

[0018] [Fig. 6](#) zeigt, dass LL2-Antikörper die zytotoxische Wirkung von LL2-ONCONASE® herabsetzt. Es wird angenommen, dass LL2 um Bindung an CD22 mit LL2-ONCONASE® konkurriert und dass es die Internalisierung von ONCONASE® unterbindet und dadurch Zytotoxizität reduziert.

[0019] [Fig. 7](#) ist ein Überlebensdiagramm, das durch LL2-ONCONASE® vor B-Zelllymphom geschützte SCID-Mäuse zeigt. 5×10^6 Daudi-Zellen wurden intraperitoneal in Mäuse implantiert. 24 Stunden später wurden die Mäuse intravenös mit 500 µg der angegebenen Verbindung behandelt.

[0020] [Fig. 8](#) ist ein Überlebensdiagramm, das zeigt, dass LL2-ONCONASE® SCID-Mäuse vor einer intraperitonealen Implantation von 2×10^6 Daudi-Zellen vollständig schützt. Die Mäuse wurden 24 Stunden nach Implantation mit 500 µg der angegebenen Verbindungen behandelt; 100 µg täglich 5 Tage lang.

[0021] [Fig. 9](#) zeigt die herabgesetzte Toxizität des LL2-ONCONASE®-Immunotoxins im Vergleich zu ONCONASE® alleine und IT-dgRTA (RFB4-deglykosylierte Ricin-A-Kette). Die Wirkstoffe wurden alle 2 Stunden verabreicht. 4× täglich 5 Tage lang. Die Pfeile bezeichnen die Tage, an denen die Mäuse mit der jeweiligen Behandlung tot vorgefunden wurden, d.h. die Mäuse, die mit 30 mg/kg ONCONASE® behandelt wurden, wurden an Tag 4 tot aufgefunden, und die Mäuse, die mit 50 mg/kg IT-dgRTA behandelt wurden, wurden an Tag 7 tot aufgefunden.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0022] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines RNase-Proteins, insbesondere einer RNase, die von *Rana pipiens* abstammt, als eine toxische Gruppierung in einem auf B-Zellen gerichteten Immunotoxin. Immunotoxische Reagenzien der vorliegenden Erfindung umfassen ein Protein und einen Antikörper, der sich spezifisch an einen ausgewählten Tumorzelloberflächenmarker bindet. In nachstehend näher beschriebenen Studien wird gezeigt, dass das onc-Protein den anderen Immunotoxinen, die gegen CD22 oder CD74 gerichtete Antikörper und eine menschliche, nichttoxische RNase umfassen, weitaus überlegen ist. Die auf onc-Protein basierenden Immunotoxine sind wirkungsvolle Mittel gegen maligne B-Zellen, wie beispielsweise B-Zell-lymphome und Leukämien und andere Malignitäten, wie z.B. Neuroblastom.

DEFINITIONEN

[0023] Die Bezeichnung "Antikörper" oder "Antikörperpeptid(e)" bezieht sich auf polyklonale und monoklonale Antikörper, ein ganzes Immunglobulin oder einen Antikörper oder jedes beliebige funktionelle Fragment eines Immunglobulinmoleküls, das sich an das Target-Antigen bindet und nachstehend definiert wird. Beispiele für solche funktionellen Einheiten umfassen komplette Antikörpermoleküle, Antikörperfragmente wie z.B. Fv, ein-kettiges Fv, komplementaritätsbestimmende Regionen (CDRs), V_L (variable Leichtkettenregion), V_H (variable Schwerekettenregion), Fab, F(ab)₂' und jede beliebige Kombination aus diesen oder jeden beliebigen anderen funktionellen Abschnitt eines Immunglobulinpeptids, der in der Lage ist, sich an das Targetantigen zu binden.

[0024] Antikörper bestehen z.B. als intakte Immunglobuline oder als eine Anzahl an gut charakterisierten Fragmenten, die durch Verdau mit verschiedenen Peptidasen hergestellt werden. Somit verdaut Pepsin beispielsweise einen Antikörper unter den Disulfidbindungen in der Gelenksregion, um F(ab)₂' zu produzieren, ein Dimer von Fab, das selbst eine Leichtkette darstellt, die durch eine Disulfidbindung an V_H-C_{H1} gebunden ist. Das F(ab)₂' kann unter milden Bedingungen reduziert werden, um die Disulfidbindung in der Gelenksregion aufzubrechen und dadurch das F(ab)₂'-Dimer zu einem Fab'-Monomer umzusetzen. Das Fab'-Monomer ist im Wesentlichen ein Fab mit einem Teil der Gelenksregion (siehe FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 3. Auflage, W.E. Paul (Hrsg.), Raven Press, N.Y. (1993)). Während verschiedene Antikörperfragmente in Bezug auf den

Verdau eines intakten Antikörpers definiert sind, wird Fachleuten bekannt sein, dass solche Fragmente entweder chemisch oder unter Verwendung von DNA-Rekombinationsverfahren de novo synthetisiert werden können. Somit umfasst die Bezeichnung Antikörper wie hierin verwendet auch Antikörperfragmente, die entweder durch Modifikation von ganzen Antikörpern oder unter Verwendung von DNA-Rekombinationsverfahren de novo synthetisiert wurden.

[0025] Für diese Erfindung ist ein Antikörper "reaktiv mit" oder "bindet sich an" ein(em) Antigen, wenn er mit dem Antigen wechselwirkt. Diese Wechselwirkung ist analog zu einer chemischen Reaktion, in der zwei Reaktanten zusammentreffen, um ein Produkt zu bilden. Im Fall der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung ist das Wechselwirkungsprodukt ein Antikörper-Antigen-Komplex. Die bevorzugten Antigene, die sich an Immunglobuline der Erfindung binden, sind der CD22- und der CD74-Zelloberflächenmarker.

[0026] Die Bezeichnungen "Bindungsspezifität", "sich spezifisch an einen Antikörper binden" oder "spezifisch immunoreaktiv mit", sofern sie sich auf ein Protein oder ein Kohlenhydrat beziehen, betreffen eine Bindungsreaktion, die für die Gegenwart eines Proteins oder Kohlenhydrats in der Gegenwart einer heterogenen Population von Proteinen oder anderen biologischen Elementen entscheidend ist. Somit binden sich also unter bestimmten Immuntest-Bedingungen die spezifizierten Antikörper an ein bestimmtes Protein oder Kohlenhydrat und binden sich nicht in signifikantem Ausmaß an andere Proteine oder Kohlenhydrate, die in der Probe vorhanden sind. Spezifische Bindung an einen Antikörper unter solchen Bedingungen kann einen Antikörper erfordern, der aufgrund seiner Spezifität gegenüber einem bestimmten Protein oder Kohlenhydrat ausgewählt wird. Antikörper beispielsweise, die gegen das CD22-Antigen gezüchtet wurden, können ausgewählt werden, um Antikörper bereitzustellen, die spezifisch immunoreaktiv mit CD22-Protein, jedoch nicht mit anderen Proteinen, sind. Zahlreiche Immuntest-Formate können verwendet werden, um Antikörper auszuwählen, die spezifisch immunoreaktiv mit einem bestimmten Protein oder Kohlenhydrat sind. Festphasen-ELISA-Immuntests werden beispielsweise routinemäßig verwendet, um Antikörper auszuwählen, die spezifisch immunoreaktiv mit einem Protein oder Kohlenhydrat sind. Siehe Harlow & Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Gold Spring Harbor Publication, New York (1988), für eine Beschreibung von Immuntest-Formaten und -Bedingungen, die verwendet werden können, um spezifische Immunoreaktivität zu bestimmen.

[0027] Die Bezeichnung "humanisiert" bezieht sich auf einen Antikörper, worin die konstanten Regionen zumindest etwa 80 % oder mehr Homologie zu menschlichem Immunglobulin aufweisen. Darüber hinaus können manche der nicht-menschlichen Aminosäurereste der variablen Region, wie z.B. von Mäusen, so modifiziert werden, dass sie Aminosäurereste von menschlichem Ursprung enthalten.

[0028] Humanisierte Antikörper wurden als "neu geformte" Antikörper bezeichnet. Manipulation der komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) ist ein Weg, humanisierte Antikörper zu gewinnen. Siehe beispielsweise Jones et al., Nature 321, 522 (1988), und Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988), die beide hierin durch Verweis aufgenommen sind. Ein Artikel, der einen Überblick bezüglich humanisierter Antikörper liefert, ist Winter & Milstein, Nature 349, 293 (1991), der hierin durch Verweis aufgenommen ist.

[0029] Die Bezeichnungen "isoliert" oder "im Wesentlichen gereinigt", sofern für eine Nucleinsäure oder für ein Protein verwendet, weist darauf hin, dass die Nucleinsäure oder das Protein im Wesentlichen frei von anderen zellulären Komponenten ist, mit denen sie/es in natürlichem Zustand assoziiert ist. Sie/Es befindet sich vorzugsweise in einem homogenen Zustand, obwohl sie/es entweder in einer trockenen oder einer wässrigen Lösung sein kann. Reinheit und Homogenität werden typischerweise unter Verwendung von analytischen Chemieverfahren wie z.B. Polyacrylamidgel-Elektrophorese oder Hochleistungsflüssigchromatographie bestimmt. Ein Protein, das die in einem Präparat überwiegend vorhandene Spezies darstellt, ist im Wesentlichen gereinigt.

[0030] Im Besonderen wird ein isoliertes onc-Proteingen aus offenen Leserastern abgetrennt, die das Gen flankieren und für Proteine kodieren, die nicht das onc-Protein sind. Die Bezeichnung "gereinigt" besagt, dass eine Nucleinsäure oder ein Protein im Wesentlichen eine Bande in einem Elektrophorese-Gel entstehen lässt. Insbesondere besagt es, dass die Nucleinsäure oder das Protein zumindest zu 85 % rein, noch bevorzugter zumindest zu 95 % rein und am meisten bevorzugt zumindest zu 99 % rein, ist. Die Bezeichnung "Nucleinsäure" bezieht sich auf ein Desoxyribonucleotid- oder Ribonucleotidpolymer entweder in einzel- oder in doppelsträngiger Form, und würde, außer anders eingeschränkt, bekannte Analoga von natürlichen Nucleotiden umfassen, die auf ähnliche Weise wie natürlich vorkommende Nucleotide funktionieren können.

[0031] Die Bezeichnung "gebunden" im Zusammenhang mit den Immunotoxinen dieser Erfindung umfasst die Bindung von Gruppierungen (typischerweise eines Antikörpers und eines Toxins) durch kovalente Bindung,

einschließlich Disulfidbindung; Wasserstoffbindung; elektrostatische Bindung; rekombinante Fusion; und Konformationsbindung, z.B. Antikörper-Antigen- und Biotin-Avidin-Assoziationen.

[0032] Die Bezeichnungen "messbare ribonucleolytische Aktivität" oder "signifikante ribonucleolytische Aktivität" bezieht sich auf ein Molekül, das eine IC_{50} von weniger als 40 ng/ml aufweist, wenn es einem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat zugesetzt wird, worin Proteinsynthese, gemessen durch die Inkorporation von [^{35}S]-Methionin in mit Säure ausfällbares Protein, gehemmt ist. IC_{50} ist die Konzentration von Protein, die erforderlich ist, um Proteinsynthese um 50 % im Test zu hemmen. Der Lysattest kann wie im Promega-Lysatset, das im Handel bei Promega Corporation, Madison, WI, erhältlich ist, beschrieben durchgeführt werden. Ribonucleolytische Aktivität unter Verwendung von hochmolekularer RNA und tRNA wird bei 37 °C durch die Bildung von in Perchlorsäure löslichen Nucleotiden gemäß den veröffentlichten Arbeitsvorschriften (D.L. Newton et al., *Biochemistry* 35, 545–553 (1996)) bestimmt. Bei Poly(A,C)-UpG und Poly-U wird ribonucleolytische Aktivität gemäß DePrisco et al. und Libonati & Floridi (R. DePrisco et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 788, 356–363 (1984); M. Libonati et al., *European J. Biochem.* 8, 81–87 (1969)) getestet. Aktivität wird durch Messen des Anstiegs der Absorption bei 260 nm im Lauf der Zeit getestet. Inkubationsgemische (1 ml von 10 mM Imidazol, 0,1 M NaCl, pH 6,5 oder pH 7) enthalten Substrat und geeignete Mengen an Enzymlösung bei 25 °C. Der In-vitro-Translationstest (D.K. St. Clair et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8330–8334 (1987)) und der Zellebensfähigkeitstest unter Verwendung von (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Thiazolylblau; MTT) (T. Mossman, *J. Immunol. Methods* 65, 55–63 (1983)) wurden wie zuvor beschrieben (J.W. Pearson et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 1386–1391 (1991)) durchgeführt.

[0033] Die Bezeichnung "Nucleinsäure, kodierend für" oder "Nucleinsäuresequenz, kodierend für" bezeichnet eine Nucleinsäure, die die Expression eines spezifischen Proteins oder Peptids steuert. Die Nucleinsäuresequenzen umfassen sowohl die DNA-Strangsequenz, die zu RNA transkribiert wird, und die RNA-Sequenz, die zu Protein translatiert wird. Die Nucleinsäuresequenzen umfassen sowohl Vollängen-Nucleinsäuresequenzen als auch kürzere Sequenzen, die von den Vollängen-Sequenzen abgeleitet sind. Es gilt zu verstehen, dass eine bestimmte Nucleinsäuresequenz die degenerierten Codons der Nativsequenz oder Sequenzen, die eingeführt werden können, um Codonpräferenz in einer spezifischen Wirtszelle bereitzustellen, umfasst. Die Nucleinsäure umfasst sowohl Sense- als auch Antisense-Stränge entweder als einzelne Stränge oder in Duplexform.

[0034] Die Bezeichnung "onc-Protein" bezieht sich auf eine RNase A, abgeleitet von *Rana pipiens*, die ursprünglich als P-30-Protein bezeichnet und das erste Mal von Darzynkiewicz et al., *Cell Tissue Kinet.* 21, 169 (1988), beschrieben wurde, wie z.B. das Protein mit der in Seq.-ID Nr. 1 gezeigten Sequenz. Eine Beschreibung dieses Proteins kann im US-Patent Nr. 5.559.212 gefunden werden. Die Bezeichnung "natives onc-Protein" bezieht sich auf das Protein in seiner nativen Form, gereinigt aus *Ranapipiens*-Oozyten. Die Bezeichnung "rekombinantes onc-Protein" bezieht sich auf das Protein, das durch rekombinante Mittel hergestellt wird. Bevorzugte Ausführungsformen dieser rekombinanten Proteine und ihrer Nucleinsequenzen werden in der PCT-Anmeldung Nr. PCT/US97/02588 beschrieben. Es gilt zu verstehen, dass onc-Proteine auch Modifikationen sowohl in den Nucleinsäure- als auch in den Aminosäuresequenzen umfassen, jedoch messbare ribonucleolytische Aktivität aufweisen.

[0035] Eine "von onc abstammende" Aminosäuresequenz umfasst eine, die zumindest einen Strang von sechs zusammenhängenden Aminosäuren enthält, die mit einer zusammenhängenden Sequenz von sechs Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen, die an den Aminosäurepositionen 1 (wobei Glu pyroGlu ersetzt), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 50, 52, 54, 56, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 86, 87, 91, 92, 93, 95 oder 96 der onc-Aminosäuresequenz (Seq.-ID Nr. 1) beginnen, identisch ist.

[0036] Die Bezeichnung "pharmazeutische Zusammensetzung" bezieht sich auf Formulierungen von verschiedenen Präparaten. Parenterale Formulierungen sind bekannt und werden zur Verwendung in der Erfindung bevorzugt. Die Formulierungen, die therapeutisch wirksame Mengen der Immunotoxine enthalten, sind entweder sterile flüssige Lösungen, flüssige Suspensionen oder lyophilisierte Versionen und enthalten gegebenenfalls Stabilisatoren oder Arzneimittelträger. Lyophilisierte Zusammensetzungen werden mit geeigneten Verdünnungsmitteln, z.B. Wasser für Injektion, Salzlösung, 0,3 % Glycin und dergleichen, bei einer Konzentration von etwa 0,01 mg/kg Wirtskörpergewicht bis 10 mg/kg oder mehr aufgelöst.

[0037] Typischerweise werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die die Immunotoxine enthalten, in einer therapeutisch wirksamen Dosis entweder über einen einzelnen Tag hinweg oder über mehrere Tage

durch tägliche intravenöse Infusionen verabreicht.

[0038] Die Immunotoxine dieser Erfindung können systemisch durch Injektion, am meisten bevorzugt intravenös, jedoch auch intramuskulär, subkutan, intrathekal, intraperitoneal, in Gefäßzwischenräume oder in Gelenke, z.B. mittels intraartikulärer Injektion, verabreicht werden. Die Dosis hängt von den Eigenschaften des verwendeten Immunotoxins ab, z.B. von seiner Aktivität und biologischen Halbwertszeit, der Konzentration des Immunotoxins in der Formulierung, dem Ort und der Häufigkeit der Dosierung, der klinischen Toleranz des betroffenen Patienten, dem Ausmaß des Krebs, an dem der Patient leidet, und dergleichen, was selbstverständlich in den Kompetenzbereich des behandelnden Arztes fällt.

[0039] Das Immunotoxin der vorliegenden Erfindung kann in Lösung verabreicht werden. Der pH der Lösung sollte im Bereich von pH 5 bis 9,5, vorzugsweise von pH 6,5 bis 7,5, liegen. Die Immunotoxine oder Derivate davon sollten in einer Lösung mit einem geeigneten, pharmazeutisch annehmbaren Puffer wie z.B. Phosphat, Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl oder Citrat und dergleichen vorliegen. Pufferkonzentrationen sollten im Bereich von 1 bis 100 mM liegen. Die Lösung des Immunglobulins kann auch ein Salz wie z.B. Natriumchlorid oder Kaliumchlorid in einer Konzentration von 50 bis 150 mM enthalten. Eine wirksame Menge eines stabilisierenden Mittels wie z.B. Albumin, ein Globulin, ein Detergens, eine Gelatine, ein Protamin oder ein Salz eines Protamins kann auch umfasst sein und kann einer Lösung, die das Immunotoxin enthält, oder der Zusammensetzung, aus der die Lösung hergestellt wird, zugesetzt werden. Systemische Verabreichung von Immunotoxin erfolgt typischerweise alle zwei bis drei Tage oder einmal die Woche, sofern eine humanisierte Form des Antikörpers verwendet wird. Alternativ dazu ist tägliche Verabreichung nützlich. Üblicherweise erfolgt Verabreichung entweder durch intramuskuläre Injektion oder intravaskuläre Infusion.

[0040] Verabreichung kann auch intranasal oder auf anderen nicht parenteralen Wegen erfolgen. Das Immunotoxin kann auch über Mikrokügelchen, Liposome oder andere Mikroteilchen-Zufuhrsysteme, die in bestimmte Gewebe einschließlich Blut platziert werden, verabreicht werden.

[0041] Das Immunotoxin kann auch durch Aerosol verabreicht werden, um lokalisierte Zufuhr in die Lungen zu erreichen. Dies erfolgt durch Herstellen eines wässrigen Aerosols, liposomale Präparate oder feste Teilchen enthaltend, oder von Derivaten davon. Eine nicht wässrige (z.B. Fluorkohlenstoff-Treibgas-) Suspension könnte verwendet werden. Schallzerstäuber werden vorzugsweise bei der Herstellung von Aerosolen verwendet. Schallzerstäuber minimieren die Aussetzung des Antikörpers oder der Derivate davon gegenüber Scheren, das zum Abbau von Immunotoxin führen kann.

[0042] Üblicherweise wird ein wässriges Aerosol durch Formulieren einer wässrigen Lösung oder Suspension von Immunotoxin zusammen mit herkömmlichen, pharmazeutisch annehmbaren Trägern und Stabilisatoren hergestellt. Die Träger und Stabilisatoren variieren je nach den Erfordernissen des bestimmten Immunotoxins, umfassen jedoch typischerweise nichtionische Tenside (TWEEN-20 oder -80®, PLURONIC-F128 OR -67® oder Polyethylenglykol), unschädliche Proteine wie z.B. Serumalbumin oder Sorbitanester, Oleinsäure, Lecithin, Aminosäuren wie z.B. Glycin, Puffer, Salze, Zucker oder Zuckeralkohole. Die Formulierungen sind steril. Aerosole werden im Allgemeinen aus isotonischen Lösungen hergestellt.

[0043] Die Bezeichnung "rekombinante DNA", "rekombinante Nucleinsäure" oder "rekombinant hergestellte DNA" bezieht sich auf DNA, die aus ihrer nativen oder endogenen Quelle isoliert und entweder chemisch oder enzymatisch durch Addieren, Deletion oder Änderung von natürlich vorkommenden flankierenden oder inneren Nucleotiden modifiziert wurde. Flankierende Nucleotide sind jene Nucleotide, die sich entweder stromauf oder stromab von der beschriebenen Sequenz oder Subsequenz von Nucleotiden befinden, während innere Nucleotide jene Nucleotide sind, die innerhalb der beschriebenen Sequenz oder Subsequenz auftreten.

[0044] Die Bezeichnung "rekombinante Mittel" bezieht sich auf Verfahren, worin Proteine isoliert werden, die für das Protein kodierende cDNA-Sequenz identifiziert und in einen Expressionsvektor inseriert wird. Der Vektor wird dann in eine Zelle eingeführt, und die Zelle exprimiert das Protein. Rekombinantes Mittel umfasst auch die Ligation von Kodier- oder Promotor-DNA aus verschiedenen Quellen in einen Vektor zur Expression eines Fusionsproteins, für konstitutive Expression eines Proteins oder induzierbare Expression eines Proteins.

[0045] Die Bezeichnungen "rekombinantes Protein", "rekombinant produziertes Protein" oder "rekombinant produziertes Immunotoxin" beziehen sich auf ein Peptid oder Protein, das unter Verwendung von nicht-nativen Zellen, die keine endogene Kopie von DNA aufweisen, die in der Lage ist, das Protein zu exprimieren, hergestellt wird. Die Zellen produzieren das Protein, da sie durch die Einführung der geeigneten Nucleinsäuresequenz gentechnisch verändert wurden. Das rekombinante Protein ist nicht in Verbindung mit Proteinen und an-

deren subzellulären Komponenten zu finden, die normalerweise mit den Zellen, die das Protein produzieren, assoziiert sind.

[0046] Die Bezeichnung "selektives zytotoxisches Reagens" bezieht sich auf eine Verbindung, die, wenn sie zu einer Population von verschiedenen Zellen zugesetzt wird, z.B. innerhalb eines Organismus, einen Zelltyp in der Population basierend auf gewissen physikalischen Eigenschaften der Zelle, d.h. eines Oberflächenliganden oder -markers, an den sich das zytotoxische Reagens bindet und dann internalisiert wird, tötet.

[0047] Die Bezeichnung "einkettiger Antikörper" bezieht sich auf einen Antikörper, worin die genetische Information, die für die funktionellen Fragmente des Antikörpers kodiert, in einer einzelnen zusammenhängenden Länge von DNA angeordnet ist. Eine ausführliche Beschreibung von einkettigen Antikörpern ist in Bire et al., Science 242, 423 (1988), und in Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879 (1988), zu finden.

[0048] Die Bezeichnung "Oberflächenmarker" bezieht sich auf ein Protein, Kohlenhydrat oder Glykoprotein, das an der Oberfläche einer Zelle vorhanden ist. Verschiedene Typen von Zellen exprimieren unterschiedliche Zelloberflächenmarker, und daher können Zellen durch die Gegenwart eines Zelloberflächenmarkers identifiziert werden. Maligne B-Zellen überexprimieren beispielsweise CD22. Somit identifiziert die Bindung eines Antikörpers, der CD22 erkennt, diese Zelle als eine B-Zelle. CD74, nachstehend beschrieben, ist ein Beispiel für einen Zelloberflächenmarker, der an B-Zellen und einer ausgewählten Gruppe an anderen malignen Zellen zu finden ist.

[0049] Zu den verschiedenen Verwendungen der Immunotoxine der vorliegenden Erfindung gehören zahlreiche verschiedene Erkrankungen, die durch spezifische menschliche Zellen verursacht und die durch die toxische Wirkung des Proteins eliminiert werden können. Eine bevorzugte Anwendung für die Immunokonjugate der Erfindung ist die Behandlung von malignen B-Zellen, die CD22 exprimieren. Ein Beispiel für maligne Erkrankungen von B-Zellen umfasst akute lymphozytische Leukämie (ALL), chronische lymphozytische Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL), chronische myelogene Leukämie, Burkitt-, AIDS-assoziierte und Follikel-Lymphome und Haarzellenleukämie. Die hierin beschriebenen Immunotoxine, die gegen CD74 gerichtet sind, sind zur Inhibition und Behandlung von Melanom-, Neuroblastom- und Myelomzellen nützlich.

[0050] Die bevorzugten zytotoxischen Reagenzien dieser Erfindung sind zumindest 100-mal, vorzugsweise zumindest 500-mal und am meisten bevorzugt zumindest 1.000-mal, stärker zytotoxisch gegenüber Targetzellen, die einen B-Zellmarker tragen, als ein Vergleichsreagens, das aus demselben Antikörper, gebunden an EDN, eine menschliche nicht-toxische RNase, besteht.

A. Antikörper gegen Zelloberflächenmarker

[0051] Antikörper beziehen sich auf Polypeptide, für die im Wesentlichen ein Immunglobulingen oder Immunglobulingene kodiert/kodieren, oder Fragmente davon, die spezifisch einen Analyt (Antigen) binden und erkennen. Die erkannten Immunglobulingene umfassen die kappa-, lambda-, alpha-, gamma-, delta-, epsilon- und my-Konstantregionen sowie die Vielzahl an Immunglobulingenen der variablen Region. Leichtketten werden entweder als kappa oder lambda klassifiziert. Schwerketten werden als gamma, my, alpha, delta oder epsilon klassifiziert, was wiederum die Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA, IgD bzw. IgE definiert.

[0052] Eine beispielhafte strukturelle Immunglobulin- (Antikörper-) Einheit umfasst ein Tetramer. Jedes Tetramer besteht aus zwei identischen Paaren an Polypeptidketten, wobei jeweils ein Paar eine "Leichtkette" (mit etwa 25 kD) und eine "Schwerkette" (mit etwa 50–70 kD) aufweist. Der N-Terminus von jeder Kette definiert eine variable Region von etwa 100 bis 110 oder mehr Aminosäuren, die primär für Antigenerkennung verantwortlich sind. Die Bezeichnungen variable Leichtkette (V_L) und variable Schwerkette (V_H) beziehen sich auf diese Leicht- bzw. Schwerketten.

[0053] Zahlreiche verschiedene Verfahren zur Produktion von monoklonalen Antikörpern sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Siehe z.B. Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES; PRINCIPLES AND PRACTICE, Academic Press, 2. Auflage (1986); und Harlow & Lane. Ein monoklonaler Antikörper, der gegen menschliche B-Zellen gerichtet ist oder mit diesen reaktionsfähig ist, wird unter Verwendung von Kombinationen von Immunogenen zur Immunisierung von Mäusen und durch Screening des Hybridomüberstands gegen Zellen, die das erwünschte Antigen exprimieren, oder durch einen Screeningtest, der für monoklonale Antikörper, die gegen das Antigen von Interesse gerichtet sind, spezifisch entworfen ist, gewonnen. Nützliche Zelllinien zum Screenen auf die Antikörper dieser Erfindung sind leicht erhältlich oder können leicht gewonnen werden. Solche Zellen umfassen die Burkitt-Lymphomzelllinien Daudi, CA-46 und Raji.

[0054] CD22, ein in seiner Abstammung eingeschränktes B-Zell-Antigen, das zur Ig-Überfamilie gehört, wird an der Oberfläche von zahlreichen Typen maligner B-Zellen exprimiert, einschließlich, jedoch nicht ausschließlich, akuter lymphozytischer Leukämie (B-ALL), chronischer B-lymphozytischer Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL), B-Lymphomzellen wie z.B. aus Burkitt-, AIDS-assoziierten und Follikel-Lymphomen und Haarzellen-Leukämien, sowie an normalen reifen B-Lymphozyten. CD22 wird nicht in frühen Phasen von B-Zell-Entwicklung exprimiert, noch ist es an der Oberfläche der Stammzellen oder in Plasmazellen im Endstadium zu finden. Vaickus et al., Crit. Rev. Oncol/Hematol. 11, 267–297 (1991). Darüber hinaus wird kein abgestoßenes Antigen in normalem menschlichem Serum oder in Serum aus Patienten mit CLL nachgewiesen. Li et al., Cell. Immunol. 118, 85–99 (1989).

[0055] CD74, auch bekannt als die mit MHC-Klasse-II-assoziierte Invariante Kette (Ii), ist an B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und anderen MHC-Klasse-II-positiven Zellen zu finden. Zusätzlich zu den malignen B-Zellen, die zuvor genannt wurden, wird CD74 auch an Neuroblastom-, Melanom- und Myelomzellen gefunden.

[0056] Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern, die z.B. gegen B-Zellen gerichtet sind, erfolgt durch: 1) Immunisierung mit menschlichen B-Zellen, gefolgt von Screenen der resultierenden Hybridome auf Reaktivität gegen eine nicht-menschliche Zelllinie, transfiziert mit menschlichen B-Zell-Antigenen, die auf eine ähnliche Weise konstruiert sind wie jene, die in Nishimura et al., Eur. J. Immunol. 18, 747 (1988), beschrieben werden, was hierin durch Verweis aufgenommen ist; 2) Immunisierung mit einer nicht-menschlichen Zelllinie (vorzugsweise autolog zu dem zu immunisierenden Tier), die mit menschlichen B-Zell-Antigenen transfiziert ist, gefolgt von Screenen der resultierenden Hybridome auf Reaktivität gegen eine menschliche B-Zelllinie; 3) Immunisierung mit menschlichen oder nicht-menschlichen Zelllinien, die menschliche B-Zell-Antigene exprimieren, gefolgt von Screenen der resultierenden Hybridome auf ihre Fähigkeit, Reaktivität von bestehenden monoklonalen Anti-B-Zell-Antikörpern mit einer menschlichen B-Zelllinie zu blockieren; 4) Immunisierung mit menschlichen oder nicht-menschlichen Zelllinien, die menschliche B-Zell-Antigene exprimieren, gefolgt von Screenen der resultierenden Hybridome auf Reaktivität mit gereinigten nativen oder rekombinanten B-Zell-Antigenen; und 5) Immunisierung mit einem rekombinanten Derivat von menschlichen B-Zell-Antigenen, gefolgt von Screenen der resultierenden Hybridome auf Reaktivität gegen eine menschliche B-Zelllinie. Auf Grundlage dieser Offenbarung werden für Fachleute auch andere Verfahren zum Züchten von Antikörpern, die in dieser Erfindung verwendet werden können, ersichtlich werden.

[0057] DNA-Rekombinationsverfahren werden verwendet, um die bevorzugten Antikörper dieser Erfindung zu synthetisieren. Beispielsweise ist ein bevorzugter Antikörperabschnitt eines Immunotoxins zur Verwendung bei Menschen ein "humanisierter" Antikörper gegen ein B-Zell-Antigen, das nur komplementaritätsbestimmende Maus-Regionen (CDRs), kombiniert mit menschlichen Variabelregionen-Gerüsten und menschlichen konstanten Regionen, enthält.

[0058] Humanisierungsverfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Siehe beispielsweise die PCT-Anmeldung mit der Veröffentlichungsnummer WO 87102671; das US-Patent Nr. 4.816.567; die EP-Patentanmeldung 0173494; Jones et al., Nature 321, 522 (1986); und Verhoeyen et al., Science 239, 1534 (1988). Manipulation der CDR ist ein Weg, humanisierte Antikörper zu gewinnen. Siehe beispielsweise Jones et al., Nature 321, 522 (1988), und Riechmann et al., Nature 332, 323 (1988). Ein Artikel, der bezüglich humanisierter Antikörper einen Überblick gibt, ist Winter & Milstein, Nature 349, 293 (1991).

[0059] Zusätzlich dazu, dass sie humanisiert sind, sind die Antikörpergruppierungen dieser Erfindung auch einkettige Antikörper. In einem Aspekt dieser Erfindung werden einkettige Antikörper aus den verwandten Hybridomzelllinien kloniert.

[0060] Die Fv-Regionen von monoklonalen Antikörpern werden unter Verwendung derselben allgemeinen Vorgehensweise kloniert. Typischerweise wird z.B. Poly(A)⁺-RNA, extrahiert aus Hybridomzellen, unter Verwendung von zufällig ausgewählten Hexameren als Primer revers transkribiert. Die V_H- und V_L-Domänen werden getrennt durch zwei Polymerasekettenreaktionen (PCR) amplifiziert. Schwerekettensequenzen werden unter Verwendung von 5'-Ende-Primern, die gemäß der Struktur der Aminoterminalen Proteinsequenzen der schweren Ketten gestaltet sind, und der 3'-Ende-Primer, die gemäß den Consensus-Immunglobulinsequenzen der konstanten Region gestaltet sind, amplifiziert (Kabat et al., SEQUENCE OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5. Auflage, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Leichtketten-Fv-Regionen werden unter Verwendung von 5'-Ende-Primern, die gemäß den Amino-terminalen Proteinsequenzen der Leichtketten gestaltet sind, und in Kombination mit dem Primer C-kappa amplifiziert. Fachleute werden erkennen, dass auch andere geeignete Primer verwendet werden können.

[0061] Die verunreinigten PCR-Produkte werden in geeignete Kloniervektoren subkloniert, die Fachleuten bekannt und im Handel erhältlich sind. Klone, die das DNA-Insert korrekter Größe enthaften, werden identifiziert, beispielsweise mittels Agarosegel-Elektrophorese. Die Nucleotidsequenz der Schwer- oder Leichtketten-Kodierregionen wird dann aus doppelsträngiger Plasmid-DNA unter Verwendung der Sequenzprimer, die zur Klonierstelle benachbart sind, bestimmt. Im Handel erhältliche Sets (z.B. das Sequenase® kit, United States Biochemical Corp., Cleveland, OH) werden verwendet, um das Sequenzieren der DNA zu erleichtern.

[0062] Fachleuten wird bekannt sein, dass unter Verwendung der aus den Fv-Regionen bereitgestellten Sequenzinformation Nucleinsäuren, die für diese Sequenzen kodieren, mittels zahlreicher verschiedener Verfahren, die Fachleuten bekannt sind, gewonnen werden. Somit wird DNA, die für die Fv-Regionen kodiert, durch jedes beliebige geeignete Verfahren hergestellt, umfassend beispielsweise Amplifikationsverfahren wie Ligationsekettenreaktion (LCR) (siehe Wu & Wallace, *Genomics* 4, 560 (1989), Landegren et al., *Science* 241, 1077 (1988), und Barringer et al., *Gene* 89, 117 (1990)), Transkriptionsamplifikation (siehe Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1173 (1989)) und selbständige Sequenzreplikation (siehe Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1874 (1990)), Klonieren und Restriktion von geeigneten Sequenzen oder direkte chemische Synthese durch Verfahren wie beispielsweise das Phosphodiesterverfahren von Narang et al., *Meth. Enzymol.* 68, 90 (1979); das Phosphodiesterverfahren von Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68, 109 (1979); das Diethylphosphoramiditverfahren von Beaucage et al., *Tetra. Lett.* 22, 1859 (1981); und das Festträger-Verfahren aus dem US-Patent Nr. 4.458.066.

[0063] Die Nucleinsäuresequenzen, die für einkettige Antikörper kodieren, werden durch auf dem Gebiet der Erfindung bekannte Verfahren identifiziert (siehe Sambrook et al.). Kurz zusammengefasst werden die zuvor beschriebenen DNA-Produkte an einem Elektrophoresegel getrennt. Die Inhalte des Gels werden auf eine geeignete Membran (z.B. Hybond-N®, Amersham) übertragen und an eine geeignete Sonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die Sonde sollte eine Nucleinsäuresequenz eines Fragments, das innerhalb der erwünschten Sequenz eingekapselt ist, umfassen.

[0064] Wird die DNA-Sequenz chemisch synthetisiert, so ist ein einzelsträngiges Oligonucleotid das Resultat. Dieses kann durch Hybridisierung an eine komplementäre Sequenz oder durch Polymerisation mit einer DNA-Polymerase unter Verwendung des Einzelstrangs als Matrize zu doppelsträngiger DNA umgesetzt werden. Während es möglich ist, eine ganze einkettige Fv-Region chemisch zu synthetisieren, wird bevorzugt, eine gewisse Anzahl an kürzeren Sequenzen (mit etwa 100 bis 150 Basen) zu synthetisieren, die später aneinander ligiert werden.

[0065] Alternativ dazu können Subsequenzen kloniert und die geeigneten Subsequenzen unter Verwendung von geeigneten Restriktionsenzymen gespaltet werden. Die Fragmente können dann ligiert werden, um die erwünschte DNA-Sequenz zu produzieren.

[0066] Nachdem die variable Fv-Leicht- und -Schwerketten-DNA gewonnen wurde, können die Sequenzen aneinander ligiert werden, und dies entweder direkt oder durch eine DNA-Sequenz, die für einen Peptidlinker kodiert, unter Verwendung von Fachleuten bekannten Verfahren. Somit kodiert die gesamte Sequenz für die Fv-Domäne in Form eines einkettigen Antikörpers.

[0067] Alternativ dazu sind Antikörper, die gegen B-Zellen gerichtet sind, im Handel bei beispielsweise Lieferanten von immunologischen Reagenzien erhältlich (z.B. Ancell Corp., Bayport, MN (RFB4); Becton Dickinson, San Jose, CA; The Binding Site, Inc., San Diego, CA; CalTag Laboratories, South San Francisco, CA; Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN; Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; und Zymed, Foster City, CA). RFB4 ist ein bevorzugter Antikörper dieser Erfindung, der im Vergleich mit anderen Antikörpern eine überraschende Wirksamkeit aufweist. Er wird in einer PCT-Patentanmeldung, die am 19. März 1998 eingereicht wurde und den folgenden Titel trägt: FitzGerald et al., "Recombinant RFB4 Immunotoxins Exhibit Potent Cytotoxic Activity for CD-22 Bearing Cells and Tumors" und in Mansfield et al., *Bioconj. Chem.* 7, 557 (1996); Mansfield et al., *Biochem. Soc. Trans.* 25, 709 (1997); und Mansfield et al., *Blood* 90, 2020 (1997), die in dieser Offenbarung in ihrer Gesamtheit aufgenommen sind, charakterisiert und beschrieben.

B. Zytotoxisches Onc-Protein

[0068] Diese Anmeldung offenbart eine neue Verwendung des onc-Proteins aus *Rana pipiens*. Das *Rana pipiens*-onc-Protein ist ein im Wesentlichen reines Protein, das aus den Eiern und/oder den Embryonen von *Rana pipiens* abstammt und ein Molekulargewicht von etwa 12.000 Daltons, gemessen durch Massenspektrometrie, und einen isoelektrischen Punkt zwischen 9,5 und 10,5 aufweist. Ein Beispiel hierfür ist auch ein Pro-

dukt, das an gewissen Stellen hierin mit dem Handelsnamen ONCONASE® bezeichnet wird, das bei Alfacell Corporation, Bloomfield, NJ, erhältlich ist.

[0069] Vorzugsweise für diese Erfindung sind die onc-Proteine Proteine mit der in Seq.-ID Nr. 1 gezeigten Aminosäuresequenz.

[0070] Das in dieser Erfindung verwendete onc-Protein ist im Vergleich zu anderen RNasen, die zur Immunotoxin-Konstruktion verwendet werden, einzigartig, da es ein monomeres Mitglied der Pankreas-RNase-Familie ist und gegenüber bestimmten Krebszellen ohne einen internalisierenden Liganden toxisch ist (siehe das US-Patent Nr. 5.559.212). Nun ist es eine Entdeckung dieser Erfindung, dass, sofern an einen Antikörper, der gegen eine B-Zelle gerichtet ist, konjugiert, die Zytotoxizität des onc-Proteins drastisch bis zu einem 2.000fachen Wert ansteigt. Trotz der Zytotoxizität gegenüber Krebszellen werden Patienten-Toxizität und -Immunogenität aufgrund der Wirksamkeit dieses bestimmten Immunotoxins und der geringen Größe des Toxins auf einem niedrigen Niveau erwartet.

[0071] Fachleuten wird bekannt sein, dass Seq.-ID Nr. 1 auf eine Weise verändert werden kann, die die funktionellen Vorteile der hierin bereitgestellten Sequenz nicht wesentlich beeinflusst. Beispielsweise werden Glycin und Alanin typischerweise als untereinander austauschbare Elemente erachtet, wie es auch Asparaginsäure und Glutaminsäure und Asparagin und Glutamin sind. Jegliche Modifikation dieser Art, in der die funktionellen Vorteile der Sequenz aufrechterhalten werden, soll durch die in Seq.-ID Nr. 1 gezeigte Sequenz abgedeckt sein.

[0072] Ein beispielhaftes rekombinantes onc-Protein, das hierin beschrieben und beansprucht wird, ist als eines definiert, das die Seq.-ID Nr. 3 umfasst. Die rekombinanten onc-Proteine dieser Erfindung weisen im Vergleich zu nativem onc-Protein ähnliche messbare ribonucleolytische Aktivität auf. Fachleute werden jedoch erkennen, dass zahlreiche verschiedene Variationen von onc-Sequenzen für onc-Proteine mit im Großen und Ganzen derselben messbaren ribonucleolytischen Aktivität, wie sie natives onc-Protein aufweist, kodieren.

[0073] Eine Beschreibung von bevorzugten rekombinanten onc-Proteinen, Varianten von rekombinanten onc-Proteinen und Verfahren zum Synthetisieren von rekombinanten onc-Proteinen ist in der PCT-Anmeldung Nr. PCT/US97/02588 zu finden, die hierin durch Verweis aufgenommen ist

C. Immunotoxine

[0074] Die toxische Gruppierung und der Antikörper können durch chemische oder durch rekombinante Mittel konjugiert werden (siehe Rybak et al., Tumor Targeting 1, 141 (1995)). Chemische Modifikationen umfassen beispielsweise Derivatisierung, um die Gruppierungen, entweder direkt oder durch eine bindende Verbindung, mittels Verfahren, die auf dem Gebiet der Proteinchemie bekannt sind, aneinander zu binden. In der vorliegenden bevorzugten chemischen Konjugationsausführungsform umfasst das Mittel zum Binden der toxischen Gruppierung und der Erkennungsgruppierung ein heterobifunktionelles Bindungsreagens, das schließlich zur Bildung einer intermolekularen Disulfidbindung zwischen den zwei Gruppierungen beiträgt. Andere Typen von Bindungsreagenzien, die in dieser Funktion für die vorliegende Erfindung nützlich sind, werden beispielsweise im US-Patent Nr. 4.545.985 beschrieben. Alternativ dazu kann ein intermolekulares Disulfid gut zwischen Cysteinen in jeder Gruppierung gebildet werden, die natürlich auftreten oder durch gentechnische Veränderung inseriert sind. Bei der Bindung von Gruppierungen können auch Thioetherbindungen zwischen heterobifunktionellen Vernetzern oder spezifische, bei niedrigem pH spaltbare Vernetzer oder spezifische spaltbare Protease-Linker oder andere spaltbare oder nicht spaltbare chemische Bindungen verwendet werden. Das Mittel der Bindung von Gruppierungen der Immunotoxine kann auch eine Peptidylbindung umfassen, die zwischen Gruppierungen gebildet wird, die getrennt voneinander mittels herkömmlicher Peptidsynthesechemie oder rekombinanter Mittel synthetisiert werden.

[0075] Mögliche chemische Modifikationen der Proteingruppierungen der vorliegenden Erfindung können Derivatisierung mit Polyethylenglykol (PEG) umfassen, um gemäß bekannten Verfahren die Aufenthaltsdauer im Blutkreislaufsystem zu verlängern und Immunogenität zu reduzieren (siehe z.B. Lisi et al., Applied Biochem. 4, 19 (1982); Beauchamp et al., Anal. Biochem. 131, 25 (1982); und Goodson et al., Bio/Technology 8, 343 (1990)).

[0076] Mögliche gentechnische Veränderungen der Proteine der Immunotoxine umfassen Kombination der einzelnen relevanten funktionellen Domänen zu einem einkettigen, multifunktionellen, biosynthetischen Protein, das aus einem einzelnen Gen exprimiert wird, welches durch DNA-Rekombinationstechniken hergeleitet

wurde (siehe z.B. die veröffentlichte PCT-Anmeldung WO/88/09344). Weiters können DNA-Rekombinationsverfahren verwendet werden, um das rekombinante onc-Protein und den Antikörper zu verbinden. Demgemäß kann das Immunotoxin ein fusioniertes Protein umfassen, das an einem Ende mit dem onc-Protein beginnt und mit dem Antikörper endet.

[0077] Verfahren zur Herstellung rekombinanter Fusionsproteine sind Fachleuten bekannt. So beschreiben beispielsweise Chaudhary et al., Nature 339, 394 (1989); Batra et al., J. Biol. Chem. 265, 15198 (1990); Batra et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8545 (1989); Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1066 (1990), die alle hierin durch Verweis aufgenommen sind, die Herstellung von verschiedenen einkettigen Antikörper-Toxin-Fusionsproteinen.

[0078] Im Allgemeinen umfasst die Herstellung von Immunotoxin-Fusionsproteinen das getrennte Herstellen der Fv-Leicht- und -Schwerketten und der DNA, die für das zu verwendende onc-Protein kodiert. Die zwei Sequenzen werden in einem Plasmid oder einem anderen Vektor kombiniert, um ein Konstrukt zu bilden, das für das bestimmte erwünschte Fusionsprotein kodiert. Ein einfacherer Ansatz umfasst das Insertieren der für die bestimmte Fv-Region kodierenden DNA in ein Konstrukt, das bereits für das erwünschte onc-Protein kodiert.

[0079] So wird beispielsweise DNA, die für Anti-B-Zell-Einkettenantikörper/onc-Protein-Immunotoxine kodiert, äußerst leicht durch Insertieren der DNA, die für die Antikörper-V_H- und -V_L-Ketten (Fv-Region) kodiert, in Konstrukte, die bereits DNA enthalten, die für das erwünschte onc-Protein kodiert, oder umgekehrt, hergestellt werden. Die für die Fv-Region kodierende DNA-Sequenz wird unter Verwendung von Verfahren, die Fachleuten bekannt sind, in das Konstrukt insertiert.

[0080] Säugetierzellen wurden verwendet, um Hybridmoleküle wie z.B. Antikörper-Cytokine (Hoogenboom et al., Biochem. Biophys. Acta 1096, 345 (1991); Hoogenboom et al., Mol. Immunol. 28, 1027 (1991)) und Antikörper-Enzym (Casadei et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2047 (1990); Williams et al., Gene 43, 319 (1986)) zu exprimieren und sekretieren. Teilweise ist Immunogenität von fremden Proteinen auf fehlerhafte Glykosylierungsmuster zurückzuführen, die an rekombinanten Proteinen vorhanden sind. Daher werden eukaryotische Zelllinien gegenüber prokaryotischen Zellen bevorzugt, da die exprimierten Proteine glykosyliert werden. Von Menschen abstammende Zelllinien werden besonders bevorzugt, da diese Zellen eine Sialsäure als terminales Glycosid inkorporieren. Zelllinien wie beispielsweise Hamster-CHO und -BHK sowie die menschliche HEK-293-Fibroblastenlinie wurden bereits verwendet, um rekombinante menschliche Proteine zu exprimieren.

[0081] Andere gentechnische Veränderungen der Proteingruppierungen der Immunotoxine dieser Erfindung umfassen Deletionen von funktionell unnötigen Domänen, um die Größe des Proteins zu reduzieren oder andere Parameter zu modifizieren, die die Herstellung oder Nützlichkeit verbessern, wie z.B. Sequenzveränderungen, um Löslichkeit (z.B. Cystein zu Serin) oder Glykosylierungsstellen zu beeinflussen. Fachleute werden erkennen, dass zahlreiche zusätzliche, gut bekannte chemische und genetische Modifizierungen von Proteinen an jedem beliebigen Protein, das wie das vorliegende zytotoxische Reagens zur parenteralen Verabreichung beabsichtigt ist, mit positiven Auswirkungen durchgeführt werden können.

[0082] Bevorzugte Immunotoxine der vorliegenden Erfindung sind Fusionsproteine, die als die toxische Gruppierung ein Protein, das die in Seq.-ID Nr. 1 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist, und einen humanisierten Antikörper, der sich an einen spezifischen Zelloberflächenmarker an der Zelle von Interesse (bevorzugter gegen B-Zellen) bindet, enthalten. Die Konstruktion von dieser einzigartigen genetischen Bindung des Fusionsproteins zwischen dem onc-Protein und dem Antikörper eliminiert die Heterogenität von chemisch gebundenen Antikörper/onc-Protein-Konjugaten. Dies, so wird angenommen, kann zu gesteigerter Potenz und herabgesetzter Immunogenität des Immunotoxins beitragen.

[0083] Die Erfindung umfasst Nucleinsäurekonstrukte, die für die neuen, hierin beschriebenen Proteine kodieren. Ein Nucleinsäurekonstrukt ist eines, das, wenn es in einen geeigneten Vektor inkorporiert wird, in der Lage ist, in einem Wirt zu replizieren. Die Konstrukte können an andere Sequenzen gebunden werden, die in der Lage sind, die Expression des Konstrukts, wie z.B. Promotoren und Enhancer, zu beeinflussen.

[0084] Das Immunotoxin der vorliegenden Erfindung kann zum selektiven Töten von Tumorzellen verwendet werden. Dieses Verfahren basiert auf der geeigneten Selektion eines Antikörpers, der sich an Zelloberflächenmarker bindet, die insbesondere oder vorwiegend am Zelltyp zu finden sind, der selektiv getötet werden soll. Beispielsweise umfasst das Immunotoxin dieser Erfindung jene, die einen Antikörper umfassen, der sich an einen Tumorzellen-spezifischen Oberflächenmarker bindet, von denen zahlreiche auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. In der bevorzugten Ausführungsform für eine Anwendung an Menschen ist der Antikörper

ein humanisiertes einkettiges Protein oder eine modifizierte Form davon, das vorzugsweise B-Zellen bindet, wodurch Malignität aufgezeigt wird.

D. Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0085] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die Immunotoxine der vorliegenden Erfindung in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst. In therapeutischen Anwendungen werden Zusammensetzungen einem Patienten, der an einer Erkrankung leidet, in einer ausreichenden Menge verabreicht, um die Erkrankung und die damit einhergehenden Beschwerden zu heilen oder zumindest teilweise einzustellen. Eine Menge, die angemessen ist, um dies zu erreichen, ist als eine therapeutisch wirksame Dosis definiert. Wirksame Mengen für diese Verwendung hängen vom Ausmaß der Erkrankung und vom allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten ab.

[0086] Vorteilhafterweise ist die pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung geeignet. Die Immunotoxine der vorliegenden Erfindung können durch verschiedene Mittel, die für verschiedene Zwecke geeignet sind, beispielsweise zur Behandlung von Tumoren in verschiedenen Körperteilen, gemäß den auf dem Gebiet der Erfindung für andere Immunotoxine bekannten Verfahren verabreicht werden. (Siehe beispielsweise Rybak et al., Human Cancer Immunology, in: IMMUNOLOGY AND ALLERGY CLINICS OF AMERICA, W. B. Saunders (1990), und die darin zitierten Verweise.) Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die ein Immunotoxin dieser Erfindung und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfassen, insbesondere solche Zusammensetzungen, die für die zuvor genannten Mittel zur Verabreichung geeignet sind.

[0087] Einzel- oder Vielfach-Verabreichungen der Zusammensetzungen können je nach Dosierung und Häufigkeit, wie sie vom Patienten benötigt und toleriert werden, verabreicht werden. In jedem Fall sollte die Zusammensetzung eine ausreichende Menge an Proteinen dieser Erfindung bereitstellen, um den Patienten wirksam zu behandeln.

[0088] Vorzugsweise umfassen die Zusammensetzungen zur Verabreichung üblicherweise eine Lösung des Fusionsproteins, umfassend den einkettigen Antikörper und das onc-Protein aufgelöst in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger, vorzugsweise in einem wässrigen Träger. Zahlreiche verschiedene wässrige Träger können verwendet werden, z.B. gepufferte Salzlösung und dergleichen. Diese Lösungen sind steril und im Allgemeinen frei von unerwünschten Bestandteilen. Diese Zusammensetzungen können durch herkömmliche, gut bekannte Sterilisationsverfahren sterilisiert werden. Die Zusammensetzungen können, sofern dies erforderlich ist, um physiologischen Bedingungen näherzukommen, pharmazeutisch annehmbare Hilfssubstanzen enthalten, wie z.B. pH-einstellende und puffernde Mittel, Toxizitätseinstellende Mittel und dergleichen, z.B. Natriumacetat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, Natriumlactat und dergleichen. Die Konzentration von Fusionsprotein in diesen Formulierungen kann stark variieren und wird primär auf Basis von Flüssigkeitsvolumen, Viskosität, Körpergewicht und dergleichen in Abstimmung mit der bestimmten ausgewählten Art der Verabreichung und den Bedürfnissen des Patienten ausgewählt.

[0089] Somit beläuft sich eine typische pharmazeutische Zusammensetzung zur intravenösen Verabreichung auf etwa 0,01 bis 100 mg pro Patient pro Tag. Dosierungen von 0,1 bis zu etwa 1.000 mg pro Patient pro Tag können verwendet werden, insbesondere, wenn der Wirkstoff an eine festgelegte Stelle und nicht in den Blutkreislauf verabreicht wird, wie beispielsweise in einen Tumor oder in ein Organ, in dem ein Tumor liegt. Gängige Verfahren zur Herstellung von parenteral verabreichbaren Zusammensetzungen sind Fachleuten bekannt oder zugänglich und werden näher in Publikationen wie beispielsweise REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 15. Auflage, Mack Publishing Co., Easton, PA (1980), beschrieben.

[0090] Weiters betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum selektiven Töten von Zellen unter Verwendung eines selektiven Immunotoxins der vorliegenden Erfindung mit einem Antikörper, der für ein Target an der Oberfläche der unter Bedingungen, die Bindung des Antikörpers ermöglichen, zu tötenden Zellen spezifisch ist. Bindung des Antikörpers an den Oberflächenmarker an einer Zelle bringt das onc-Protein des Reagens dazu, die Zelle selektiv zu töten. Dieses Verfahren der vorliegenden Erfindung kann zur Zelltrennung in vitro durch selektives Töten von unerwünschten Zelltypen, beispielsweise im Knochenmark vor der Transplantation in einen Patienten, der einer Knochenmarksablation durch Bestrahlung unterzogen wird, verwendet werden.

BEISPIELE

[0091] In den folgenden Beispielen, die keine Einschränkung darstellen, wird die vorliegende Erfindung durch

ein Immunotoxin beispielhaft präsentiert, in dem die toxische Gruppierung ONCONASE® ist und die Antikörper Tumorzellen, insbesondere B-Zellen, erkennen.

Beispiel 1: Herstellung von nativem und rekombinantem onc-Protein aus *Rana pipiens*

A. Isolierung und Reinigung von nativem onc-Protein

[0092] Verfahren, die das Isolieren von Oozyten aus *Rana pipiens*, In-vitro-Befruchtung der Eier und das Isolieren und Reinigen von nativem onc-Protein aus Froschembryonen beschreiben, sind ausgezeichnet in den US-Patenten Nr. 5.559.212 und 5.728.805 beschrieben, die hierin durch Verweis aufgenommen sind.

B. Herstellung und Testen von rekombinantem onc-Protein

[0093] Die Herstellung von rekombinantem onc-Protein erfolgte wie in der PCT-Anmeldung PCT/US97/02588 beschrieben. Ribonucleolytische Aktivität unter Verwendung von hochmolekularer RNA und tRNA wurde gemäß den veröffentlichten Arbeitsvorschriften von Newton et al., J. Neurosci. 14, 538 (1994), bei 37 °C durch die Bildung von in Perchlorsäure löslichen Nucleotiden (siehe Newton et al., Biochem. 35, 545 (1996)) bestimmt. Mit poly(A,C), UpG und poly-U wurde Ribonuclease-Aktivität spektralphotometrisch gemäß Libonati et al., Biochim. et Biophys. Acta 788, 356 (1984), und Libonati & Floridi, Eur. J. Biochem. 8, 81 (1969), getestet. Kurz zusammengefasst wurde Aktivität durch Messen der Steigerung von Absorption bei 260 nm getestet. Inkubationsgemische (1 ml von 10 mM Imidazol, 0,1 M NaCl, pH 6,5 oder pH 7) enthielten Substrat und geeignete Mengen an Enzymlösung bei 25 °C. Der In-vitro-Translationstest (St. Clair et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8330 (1987)) und die Tests zur Zelllebensfähigkeit (Pearson et al., J. Natl. Cancer Inst. 83, 1386 (1991)) unter Verwendung des MTT-Verfahrens von Mossman wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Beispiel 2: Chemische Analyse und Zusammensetzung von onc-Proteinen

[0094] Das zuvor beschriebene native onc-Protein wurde chemisch gut charakterisiert. Um so vollständig funktionell zu sein wie das native onc-Protein, sollte das rekombinante onc-Protein, so wird angenommen, die nachstehend beschriebenen Chemie und Struktur aufweisen.

[0095] Das native onc-Protein wurde bis zur Homogenität (bestätigt durch Standardtests, die verwendet werden, um die Homogenität von Proteinen zu testen) gereinigt. Durch Elektrophorese wurde das Molekulargewicht des nativen onc-Proteins mit etwa 14.500 Dalton bestimmt. Berechnung des Molekulargewichts basierend auf der aufgelisteten Aminosäuresequenz (siehe unten) ergab, dass sich das Molekulargewicht von nativem onc-Protein auf 11.860 Dalton belaufen sollte. Da sich jedoch Metallionen an das Protein trotz aller Bemühungen, sie zu entfernen, gebunden haben können und da verschiedene Isotope eingebunden sein können, betrug das Molekulargewicht des nativen onc-Proteins, bestimmt durch Massenspektrometrie, 12.430 Dalton. Hinsichtlich dieser Diskrepanz wurde das Molekulargewicht des Pharmazeutikums, bestimmt durch Massenspektrometrie, auf etwa 12.000 Dalton festgelegt. Der isoelektrische Punkt (pI) von nativem onc-Protein wurde durch isoelektrisches Fokussieren bei zwischen etwa 9,5 und 10,5 bestimmt. Die Amino-terminale Gruppe von nativem onc-Protein war blockiert und wurde als im Wesentlichen frei von Kohlenhydraten (bestimmt durch Anthron- und Orcinol-Verfahren) erkannt.

[0096] Tabelle 1 gibt die Aminosäurezusammensetzung des nativen onc-Proteins an.

Tabelle 1: Aminosäureanalyse von nativem onc-Protein

AMINOSÄUREREST	% MOL (24 STUNDEN SÄUREHYDROLYSE)
Asparaginsäure / Asparagin	13,99
Threonin	9,30 (Anm. 1)
Serin	7,78
Glutaminsäure / Glutamin	6,10
Prolin	4,36
Glycin	3,09
Alanin	3,09
Cystein/2	6,92 (Anm. 1)
Valin	8,20
Methionin	0,85 (Anm. 1)
Isoleucin	4,86 (Anm. 2)
Leucin	5,22
Tyrosin	2,96
Phenylalanin	6,05
Histidin	2,88
Lysin	11,62
Arginin	2,70
Tryptophan	Nicht bestimmt (Anm. 3)
Ungefährer Gesamtwert	99,7 %

Anm. 1: Threonin, Cystein/2 und Methionin werden während Hydrolyse teilweise zerstört, und dieser Wert ist für solche teilweisen Zerstörungen nicht korrigiert

Anm. 2: Dieser Wert ist für nicht vollständige Hydrolyse nicht korrigiert.

Anm. 3: Tryptophan kann in Säurehydrolyse von Proteinen nicht nachgewiesen werden, da es zerstört wird, und wird folglich als "Nicht bestimmt" angezeigt. Dennoch zeigte eine Analyse des ultravioletten Spektrums die Gegenwart eines Tryptophanrests pro Molekül auf.

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung (berechnet aus der Aminosäuresequenz)

AMINOSÄURE	UNGEFÄHRE ANZAHL AN RESTEN (PRO MOLEKÜL VON NATIVEM ONC-PROTEIN)
Asparaginsäure	6
Asparagin	8
Threonin	10
Serin	8
Glutaminsäure	3
Pyroglutaminsäure	1
Glutamin	2
Prolin	4
Glycin	3
Alanin	3
Cystein/2	8
Valin	8
Methionin	1
Isoleucin	6
Leucin	5
Tyrosin	3
Phenylalanin	6
Histidin	3
Lysin	12
Arginin	3
Tryptophan	1
Ungefährer Gesamtwert	104

[0097] Das native onc-Protein wurde sequenziert. Der N-Terminus des nativen Proteins ist Pyroglutaminsäure (<Glu). Dies ist ein zyklisiertes Derivat von Glutaminsäure, das frei von der freien Aminosäuregruppe ist, die zum direkten Sequenzieren erforderlich ist, und das daher den N-Terminus des Proteins "blockiert". Der Amino-Terminus des Moleküls wurde geändert, um rekombinante Produktion des Moleküls wie in der zuvor zitierten PCT/US97/02588 beschrieben zu erleichtern. Die bevorzugte Aminosäuresequenz der zytotoxischen RNase ist in der Seq.-ID Nr. 1 gezeigt.

Beispiel 3: ANTI-CD22-ONCONASE®-IMMUNOTOXIN

A. MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0098] ONCONASE® (zuvor als P-30 bezeichnet) wurde von Alfacell Corp. in Form eines lyophilisierten Proteins geliefert und wurde in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) aufgelöst. Stammlösungen von zumindest 1 mg/ml wurden bei -20 °C in gefrorenem Zustand beibehalten, bis Verdünnungen für Tests hergestellt wurden. Alle anderen Reagenzien wurden bei bereits oben genannten Quellen erworben (Rybak et al., J. Biol. Chem. 266, 21202 (1991); Newton et al., J. Biol. Chem. 267, 19572 (1992); Mikulski et al., Cell Tissue Kinet. 23, 237 (1990)), die hierin durch Verweis aufgenommen sind.

[0099] LL2 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, der CD22 an menschlichen B-Zellen erkennt und spezifisch bindet. Der LL2-Antikörper wurde von Immunomedics, Inc. (Morris Plains, NJ) bereitgestellt. RFB4 ist auch ein monoklonaler Maus-Antikörper, der sich an CD22 bindet. Dieser Antikörper ist aus zahlreichen Quellen, ein-

schließlich Ancell Corp., erhältlich.

[0100] Drei Burkitt-Lymphom-Zelllinien (Daudi (ATCC CCL 213), CA 46 (ATCC CRL 1648) und Raji (ATCC CCL 86)) wurden in RPMI-1640-Medium, das 10 % fötales Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 10 µg/ml Gentamicin enthielt, gezüchtet. HUT 102, eine menschliche kutane T-Zelllymphom-Zelllinie (ATCC TIB 162) wurde auch in ergänztem RPMI-Medium gezüchtet. Alle Zellen wurden bei 37 °C in einer angefeuchteten 5%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert.

B. HERSTELLUNG VON LL2-ONCONASE®-IMMUNOTOXINEN

[0101] Disulfid-gebundene Konjugate wurden wie in Newton et al., J. Biol. Chem. 267, 19572 (1992), beschrieben mit den folgenden Modifikationen hergestellt. Antikörper (12,5 nmol) wurde mit 250 nmol 2-Iminoethanol und 2,5 mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in 100 mM Natriumborat, pH 8,5, bei Raumtemperatur 1 Stunde lang in einem Endvolumen von ≤ 0,5 ml inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine PD-10®-Säule (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), äquilibriert mit Puffer A (0,1 M NaPO₄, pH 7,5, der 0,1 M NaCl enthielt), aufgetragen.

[0102] SPDP-modifizierte ONCONASE® (0,9–1,2 mol N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP)/mol ONCONASE®) wurde wie in Newton et al. (1992), s.o., beschrieben hergestellt. Die SPDS-modifizierte ONCONASE® (340 nM) wurde 1 Stunde lang bei Raumtemperatur mit Dithiothreitol (DTT) bei einer End-DTT-Konzentration von 2 mM reduziert und an einer PD-10®-Säule, äquilibriert mit Puffer A, zur Entfernung von überschüssigem DTT Gel-filtriert. Die modifizierte ONCONASE® wurde zu dem modifizierten Antikörper zugesetzt, und die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die ONCONASE® war in zumindest einem 10fachen molaren Überschuss gegenüber dem Antikörper vorhanden.

[0103] Thioether-gebundene Konjugate wurden gemäß Rybak et al., Drug Delivery 1, 3 (1993), und Newton et al., Int. J. Oncology 8, 1095 (1996), unter Verwendung von m-Maleinimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimides (MBS) hergestellt. Kurz zusammengefasst wurde LL2-Antikörper (2 mg) mit einem 5fachen molaren Überschuss von MBS (Stammlösung, 30 mM in DMF) 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsinhalte wurden auf eine PD-10®-Säule, äquilibriert mit Puffer A, aufgetragen. Peak-Fractionen (1,5 ml) wurden gesammelt. Die SPDP-modifizierte ONCONASE® wurde gegen 0,1 M Natriumacetat, pH 4,5, das 0,1 M NaCl enthielt, dialysiert, woraufhin Inkubation mit 25 mM DTT (Endkonzentration) 30 min lang bei Raumtemperatur folgte. Die Reaktionsinhalte wurden auf eine PD-10®-Säule, äquilibriert mit Puffer A, aufgetragen, und Peak-Fractionen wurden gesammelt und zum MBS-Antikörper zugesetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die ONCONASE® war in einem ≥ 10fachen molaren Überschuss gegenüber Antikörper vorhanden. Die Konjugate wurden von nicht umgesetzter ONCONASE® durch Gelfiltration an einer TSK-3000®-HPLC-Säule (Toso-Haas) getrennt.

[0104] Die Menge an Protein, das in den Präparaten vorhanden war, wurde durch UV-Spektroskopie gemäß dem Lambert-Beer-Gesetz: $[A = \epsilon(\text{Konz.})]$ mit den folgenden Extinktionskoeffizienten bei 277 nm bestimmt: ONCONASE®, $\epsilon(1 \%) = 7,3$; und Immunotoxine, $\epsilon(1 \%) = 10$.

[0105] Die Molanzahl von ONCONASE®, konjugiert an Antikörper, wurde durch Gelelektrophorese der reduzierten Immunotoxine zusammen mit Standards von ONCONASE® und Antikörper bestimmt. Das Gel wurde unter Verwendung von Image (NIH, öffentlich zugängliche Software) analysiert.

[0106] Die Analyse von ONCONASE®-Immunotoxinen durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen zeigte, dass die einzelnen Proteine nach Reduktion neu gebildet wurden. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen bestanden die Antikörper-Konjugate aus zahlreichen hochmolekularen Formen. Die Reaktivität der Vernetzerguppen in der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion kann die Heterogenität des Konjugats erklären. Die Immunotoxine enthielten 1–2 mol ONCONASE®/mol Antikörper. Die gereinigten Immunotoxine schienen, wie Gelelektrophorese zeigte, keine signifikanten Mengen an freiem Antikörper zu enthalten, vermutlich, weil der ≥ 10fache molare Überschuss an ONCONASE® im Wesentlichen alle Immunotoxine und keine freien Antikörper hervorbrachte.

C. HERSTELLUNG VON RFB4-ONCONASE®-IMMUNOTOXINEN

[0107] RFB-4-ONCONASE®-Immunotoxine werden wie zuvor beschrieben hergestellt. Da RFB4 CD22 erkennt, sind Immunotoxine, die RFB4 enthalten, auch gegenüber malignen B-Zellen zytotoxisch. Somit können die nachstehend beschriebenen Versuche ebenfalls mit RFB4-ONCONASE® durchgeführt werden.

Beispiel 4: STUDIEN ZUR IN-VITRO-ZELLEBENSFÄHIGKEIT

[0108] Proteinsynthese wurde wie in Rybak et al., J. Biol. Chem. 266, 21202 (1991), beschrieben gemessen. Dieselbe Arbeitsvorschrift wurde verwendet, um RNA-Synthese zu messen, außer, dass die Zellen mit 3 μCi von [^3H]Uridin gepulst wurden. Die Zellanzahl wurde durch eine direkte Zählung mittels eines Hämocytopeters bestimmt. Eine Allquote an Zellen wurde 5 min lang mit einem gleichen Volumen an 0,5%igem Trypan-Blau-Ausschlussfarbstoff inkubiert, und lebensfähige Zellen wurden gezählt. Der kolorimetrische MTT-Test (T. Mossman, J. Immunol. Methods 65, 55 (1983)) wurde wie beschrieben (Mikulski et al., Cell Tissue Kinet. 23, 237 (1990)) durchgeführt.

[0109] Die IC_{50} für Proteinsyntheseinhibition in Burkitt-Lymphomzellen durch ONCONASE®-Immunotoxine ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Proteinsyntheseinhibition durch ONCONASE®-Immunotoxine

Zelllinie	IC_{50}	
	ONCONASE®	LL2-ONCONASE®
Daudi	> 200 nM	100 pM
CA 46	> 200 nM	800 pM
Raji	> 200 nM	800 pM
HUT 102	30 nM	> 100 nM

[0110] Die Konzentrationen von Immunotoxin, die erforderlich sind, um Proteinsynthese zu 50 % in B-Zellen nach 24 Stunden zu hemmen, liegen im picomolaren Bereich, im Vergleich zum nanomolaren Bereich im Fall von nicht-konjugierter ONCONASE®. HUT-102-Zellen, die CD22 nicht exprimieren, waren auf das LL2-ONCONASE®-Immunotoxin nicht empfindlich, waren jedoch auf die nicht-konjugierte ONCONASE® empfindlicher als die B-Zelllinien. Siehe [Fig. 1](#).

[0111] Wie aus [Fig. 2](#) ersichtlich ist, war ONCONASE® allein, im Vergleich zu ONCONASE®, die an den LL2-Antikörper konjugiert war, gegenüber B-Lymphomzellen nach 24 h nicht-toxisch. Somit war ONCONASE®, die an Antikörper konjugiert war und zu Internalisierung in der Lage war, stärker wirksam als die nicht-konjugierte ONCONASE®.

[0112] Zusätzlich zu dieser höheren Wirksamkeit als ONCONASE® alleine zeigen die [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#), dass ONCONASE®-Immunotoxine sehr viel wirksamer waren als Immunotoxine, in denen die toxische Gruppierung entweder eine menschliche, nicht-toxische RNase, ein Eosinophiler-abgeleitetes Neurotoxin (EDN) ([Fig. 3](#)) oder eine menschliche Pankreas-RNase ([Fig. 4](#)) war.

[0113] In [Fig. 5](#) wurden LL2- oder LL1-Antikörper an EDN wie zuvor beschrieben konjugiert und an Daudi- oder CA-46-Burkitt-Lymphomzellen getestet. Es wird angenommen, dass LL1- und LL2-Immunotoxine zu den Lysosomen zugeführt werden, wo das Immunotoxin zu den Antikörper- und RNase-Gruppierungen abgebaut wird. Die RNase lässt das Lysosom zurück und tritt in das Cytosol ein, wo sie ribosomale Aktivität stört. In Betrachtung der in [Fig. 5](#) gezeigten Daten wird angenommen, dass ONCONASE® etwa 2.000fach aktiver als EDN ist, da ONCONASE® durch Abbau durch das Lysosom nicht deaktiviert wird. Daher ist das Protein, das in das Cytosol eintritt, ein intaktes Cytotoxin.

[0114] In [Fig. 4](#) wurde LL2-ONCONASE® mit LL2-Pankreas-RNase verglichen. Wiederum blockierte LL2-ONCONASE® bei Konzentrationen von etwa 1 nM Proteinsynthese vollständig. Bei derselben Konzentration waren durch den Zusatz von LL2-Pankreas-RNase nur etwa 75 % der Proteinsynthese blockiert worden.

[0115] Um die Annahme zu testen, dass ONCONASE® durch die Lysosomen nicht abgebaut wurde, was zu gesteigerter Inhibition von Proteinsynthese und Zytotoxizität führte, wurden ^{125}I -markierte(s) LL2 und LL2-Immunotoxine zu den Daudi-Zellen zugesetzt. Wie in [Fig. 5](#) ersichtlich ist, enthielten, nach der angegebenen Zeitspanne, Zellen, die mit LL2-ONCONASE® behandelt worden waren, mehr ^{125}I -markiertes Protein in ihren Lysaten, was darauf hindeutet, dass das Immunotoxin langsamer abgebaut wurde als LL2-EDN und LL2 alleine. Somit könnte angenommen werden, dass ONCONASE® in den Lysosomen nicht abgebaut wird.

[0116] Um die Annahme zu testen, dass CD22 die Toxizität von ONCONASE®-Immunotoxinen über Bindung des Antikörper-Abschnitts des Hybridproteins vermittelt, wurden die Immunotoxine in Gegenwart von überschüssigem LL2-Antikörper ([Fig. 4](#)) getestet. Die in Daudi-Zellen nach 24 h beobachtete Zytotoxizität in Gegenwart von ONCONASE®-Immunotoxinen wurde durch eine äquimolare Menge an LL2 umgekehrt. Diese Daten zeigen, dass CD22 ONCONASE®-Zytotoxizität gegenüber Burkitt-Lymphomzellen vermitteln kann.

Beispiel 5: IN-VIVO-WIRKSAMKEIT VON LL2-ONCONASE®-IMMUNOTOXINEN

[0117] Um die Wirkung von LL2-ONCONASE® in vivo zu testen, wurden Daudi-Zellen in SCID-Mäuse implantiert. Einen Tag später wurden die Mäuse mit ONCONASE® und LL2-ONCONASE®, LL2-Pseudomonas-Exotoxin und LL2-Doxorubicin-Immunotoxinen behandelt.

[0118] Wie in Tabelle 5 ersichtlich ist, verursachte LL2-ONCONASE® keine zytotoxischen Nebenwirkungen (Tod) bei Mäusen. Vergleichsweise wurden die Mäuse auch mit LL2, konjugiert an eine Mutante von Domäne II aus Pseudomonas-Exotoxin, behandelt. Wie ersichtlich ist, war dieses Immunotoxin tödlich. Somit scheint es, dass ONCONASE® als die toxische Gruppierung eines Immunotoxins gegenüber den behandelten Tieren nicht toxisch ist und daher als Therapeutikum besser toleriert werden würde.

Tabelle 5: In-vivo-Zytotoxizität von LL2-ONCONASE-Immunotoxinen

Dosierungsplan	Toxizität in Mäusen	
	Gesamt-Dosis (µg)	Tod / Gesamt
LL2-PE38KDEL *		
80 µg i.p. x 1	80	2/2
35 µg i.p. QD x 4	140	2/2
LL2-ONCONASE		
100 µg i.p. x 1	100	0/3
100 µg i.p. QOD x 5	500	0/3
100 µg i.p. QD x 5	500	0/3
500 µg i.p. x 1	500	0/3

* Kreitman et al., Cancer Res. 53, 819 (1993)

QD = täglich

QOD = jeden zweiten Tag

[0119] Tabelle 6 zeigt die Wirkungen von LL2-ONCONASE® und LL2-Doxorubicin auf Daudi-implantierte SCID-Mäuse. Den Mäusen wurden 5×10^6 Daudi-Zellen intravenös implantiert. 24 Stunden später begann die Behandlung mit 5 gleichen Dosen täglich. Das Doxorubicin-Immunotoxin wurde intravenös injiziert, und das ONCONASE®-Immunotoxin wurde intraperitoneal injiziert. Wie anhand des Gewichts ersichtlich ist, steigerte beinahe die halbe Menge von LL2-ONCONASE® das Überleben der Mäuse im Vergleich zu Doxorubicin, einem systemischen chemotherapeutischen Reagens, signifikant.

Tabelle 6: Behandlung von SCID-Mäusen mit ausgebreitetem Daudi-Lymphom

Immunotoxin	Gesamtdosis	% Mäuse mit gesteigerter Überlebensrate in Bezug auf Antikörper alleine
LL2-Doxorubicin	9.000 µg	0
LL2-ONCONASE®	500 µg	40 %

[0120] In SCID-Mäusen, denen intravenös 5×10^6 Daudi-B-Lymphomzellen implantiert worden waren, erwies sich, dass LL2-ONCONASE®, die intraperitoneal injiziert wurde, die Leben der Mäuse im Vergleich zu den

Mäusen, die mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) oder mit monoklonalem Antikörper LL2 alleine behandelt worden waren, verlängerte. [Fig. 7](#) zeigt, dass alle Tiere, die mit PBS behandelt worden waren, schwerwiegende B-Zelllymphome entwickelten und an Tag 35 getötet wurden. Alle Tiere, die mit LL2 behandelt wurden, wurden an Tag 37 aufgrund von Lymphomen getötet. Andererseits überlebten alle Tiere, die mit dem Immunotoxin behandelt wurden, bis zum Tag 37. Das letzte Tier, das mit Immunotoxin behandelt wurde, wurde am Tag 46 getötet.

[0121] [Fig. 8](#) zeigt, dass SCiD-Mäuse, denen intraperitoneal 2×10^6 Daudi-Zellen implantiert und die dann mit 500 µg LL2-ONCONASE®, 100 µg pro Dosis pro Tag, intraperitoneal behandelt worden waren, länger als 100 Tage überlebten. Die Gruppe von Tieren, die mit PBS und mit nicht-konjugiertem LL2 und ONCONASE® behandelt worden waren, zeigten innerhalb dieser Zeitspanne gewisse Anzeichen der Erkrankung. Die mittlere Überlebensdauer für die PBS-Kontrollgruppe betrug 71 Tage, in der Gruppe LL2 + ONCONASE® betrug die mittlere Überlebensdauer 80 Tage, und die mit LL2-ONCONASE® behandelten Mäuse überlebten länger als 112 Tage.

[0122] Schließlich zeigt [Fig. 9](#), dass LL2-ONCONASE® weniger toxisch ist als ONCONASE® alleine oder RFB4-deglykosylierte Ricin-A-Kette. Im Vergleich zur tödlichen Dosis von 30 mg/kg ONCONASE® überlebten die Mäuse, die mit 300 mg/kg LL2-ONCONASE® behandelt wurden, nicht nur, sondern nahmen während der Versuchsdauer auch an Gewicht zu. RFB4, sofern konjugiert an ein Pseudomonas-Exotoxin-Fragment, wies eine LD₅₀ von 1 mg/kg in einem Mausmodell auf, wobei das Immunotoxin nur einmal pro Tag verabreicht wurde (Mansfield et al., Bioconj. Chem. 7, 557 (1996)).

[0123] Diese In-vivo-Resultate weisen darauf hin, dass LL2-ONCONASE® ein im Vergleich zu ONCONASE® allein, LL2 allein und Immunotoxinen von LL2-Pseudomonas-Exotoxin und LL2-Doxorubicin überlegenes B-Zell-Toxin ist. Die Toxizitätsstudien zeigen, dass LL2-ONCONASE® unter Auftreten von geringen bis gar keinen Nebenwirkungen gut toleriert wird.

[0124] Alle hierin zitierten Veröffentlichungen einschließlich Patenten und Patentanmeldungen sind hierin durch Verweis aufgenommen.

[0125] Die obige Erfindung wurde im Sinne der Verständlichkeit und Klarheit recht ausführlich beschrieben. Es wird jedoch auch verstanden werden, dass verschiedene Kombinationen von Formen und Details vorgenommen werden können, ohne den Schutzzumfang der Erfindung zu überschreiten.

Seq.-ID Nr. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<Glu-Asp-Trp-Leu-Thr-Phe-Gln-Lys-Lys-His-									
11									20
Ile-Thr-Asn-Thr-Arg-Asp-Val-Asp-Cys-Asp-									
21									30
Asn-Ile-Met-Ser-Thr-Asn-Leu-Phe-His-Cys-									
31									40
Lys-Asp-Lys-Asn-Thr-Phe-Ile-Tyr-Ser-Arg-									
41									50
Pro-Glu-Pro-Val-Lys-Ala-Ile-Cys-Lys-Gly-									
51									60
Ile-Ile-Ala-Ser-Lys-Asn-Val-Leu-Thr-Thr-									
61									70
Ser-Glu-Phe-Tyr-Leu-Ser-Asp-Cys-Asn-Val-									
71									80
Thr-Ser-Arg-Pro-Cys-Lys-Tyr-Lys-Leu-Lys-									
81									90
Lys-Ser-Thr-Asn-Lys-Phe-Cys-Val-Thr-Cys-									
91									100
Glu-Asn-Gln-Ala-Pro-Val-His-Phe-Val-Gly-									
101	104								
Val-Gly-Ser-Cys									

Seq.-ID Nr. 2

GATGTTGATT GTGATAATAT CATGTCAACA AACTTGTTCC ACTGCAAGGA 50
 CAAGAACACT TTTATCTATT CACGTCCTGA GCCAGTGAAG GCCATCTGTA 100
 AAGGAATTAT AGCCTCCAAA AATGTGTTAA CTACCTCTGA GTTTTATCTC 150
 TCTGATTGCA ATGTAACAAG CAGGCCTTGC AAGTATAAAT TAAAGAAATC 200
 AACTAATAAA TTTTGTGTAA CTTGTGAAAA TCAGGCACCA GTTCATTTT 249

Seq.-ID Nr. 3

1 10
 Asp-Val-Asp-Cys-Asp-Asn-Ile-Met-Ser-Thr-
 11 20
 Asn-Leu-Phe-His-Cys-Lys-Asp-Lys-Asn-Thr-
 21 30
 Phe-Ile-Tyr-Ser-Arg-Pro-Glu-Pro-Val-Lys-
 31 40
 Ala-Ile-Cys-Lys-Gly-Ile-Ile-Ala-Ser-Lys-
 41 50
 Asn-Val-Leu-Thr-Thr-Ser-Glu-Phe-Tyr-Leu-
 51 60
 Ser-Asp-Cys-Asn-Val-Thr-Ser-Arg-Pro-Cys-
 61 70
 Lys-Tyr-Lys-Leu-Lys-Lys-Ser-Thr-Asn-Lys-
 71 80
 Phe-Cys-Val-Thr-Cys-Glu-Asn-Gln-Ala-Pro-
 81 83
 Val-His-Phe

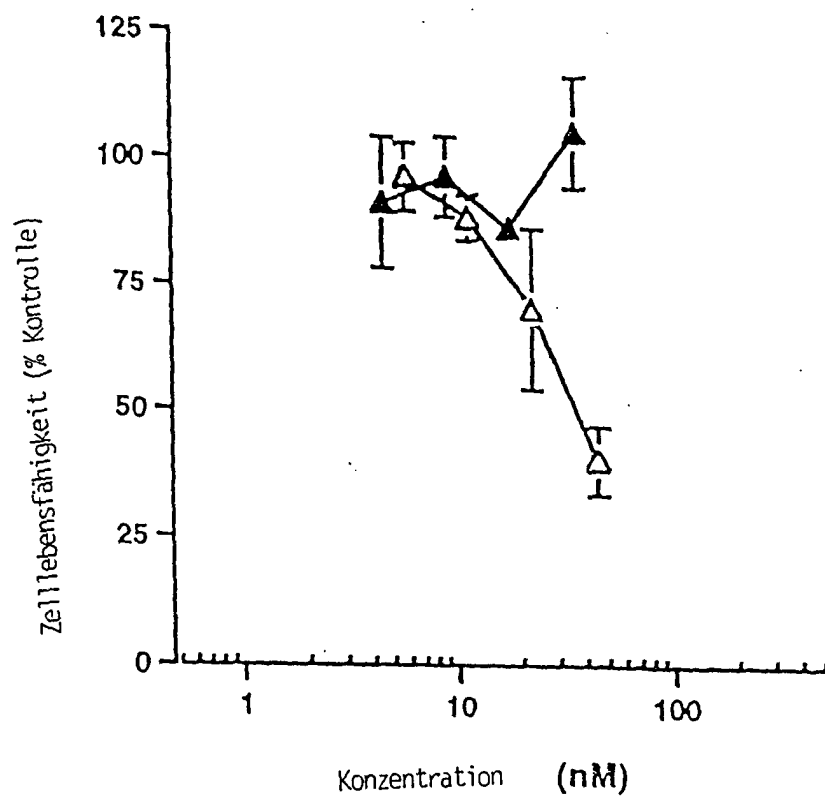
Patentansprüche

1. Selektives zytotoxisches Reagens, umfassend ein onc-Protein mit messbarer ribonucleolytischer Aktivität, das an einen Antikörper gebunden ist, der gegen einen für eine B-Zelle spezifischen Oberflächenmarker gerichtet ist.
2. Reagens nach Anspruch 1, worin das onc-Protein die Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 1 aufweist.
3. Reagens nach Anspruch 1, worin das onc-Protein auf rekombinante Weise hergestellt wird.
4. Reagens nach Anspruch 3, worin das onc-Protein die Aminosäuresequenz von Seq.-ID Nr. 3 aufweist.
5. Reagens nach Anspruch 3, worin für das onc-Protein das als Seq.-ID Nr. 2 bezeichnete Nucleinsäuremolekül kodiert.
6. Reagens nach Anspruch 1, worin der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.
7. Reagens nach Anspruch 6, worin der monoklonale Antikörper humanisiert ist.

8. Reagens nach Anspruch 7, worin der monoklonale Antikörper ein einkettiger Antikörper ist.
9. Reagens nach Anspruch 1, worin der Antikörper für B-Zelllymphome spezifisch ist.
10. Reagens nach Anspruch 9, worin der Antikörper RFB4 ist.
11. Reagens nach Anspruch 9, worin der Antikörper LL2 ist.
12. Reagens nach Anspruch 1, worin der Oberflächenmarker CD22 ist
13. Reagens nach Anspruch 1, worin der Oberflächenmarker CD74 ist.
14. Reagens nach Anspruch 13, worin der Antikörper LL1 ist.
15. Reagens nach Anspruch 1, worin das onc-Protein durch rekombinante Fusion an den Antikörper konjugiert ist.
16. Nucleinsäuresequenz, die für ein Reagens nach Anspruch 1 kodiert.
17. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein selektives zytotoxisches Reagens nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder Anspruch 15 zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 17 in Abhängigkeit von Anspruch 9, worin der Antikörper LL1 ist.
19. Zytotoxisches Reagens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder Anspruch 12 zur Verwendung in einem Verfahren zur Abtötung von malignen B-Zellen.
20. Selektives, rekombinantes, zytotoxisches Reagens, umfassend ein onc-Protein mit messbarer ribonucleolytischer Aktivität, das an einen gegen CD74 gerichteten Antikörper gebunden ist, zur Verwendung in einem Verfahren zur Abtötung von malignen Zellen, die einen CD74-Zelloberflächenmarker tragen.
21. Zytotoxisches Reagens nach Anspruch 20, worin die Zellen, die abgetötet werden sollen, aus der aus Neuroblastomen, Melanomen und Myelomen bestehenden Gruppe ausgewählt sind.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

FIG. 1.



—△— Onconase, Hut-102

—▲— LL2-Onconase, Hut-102

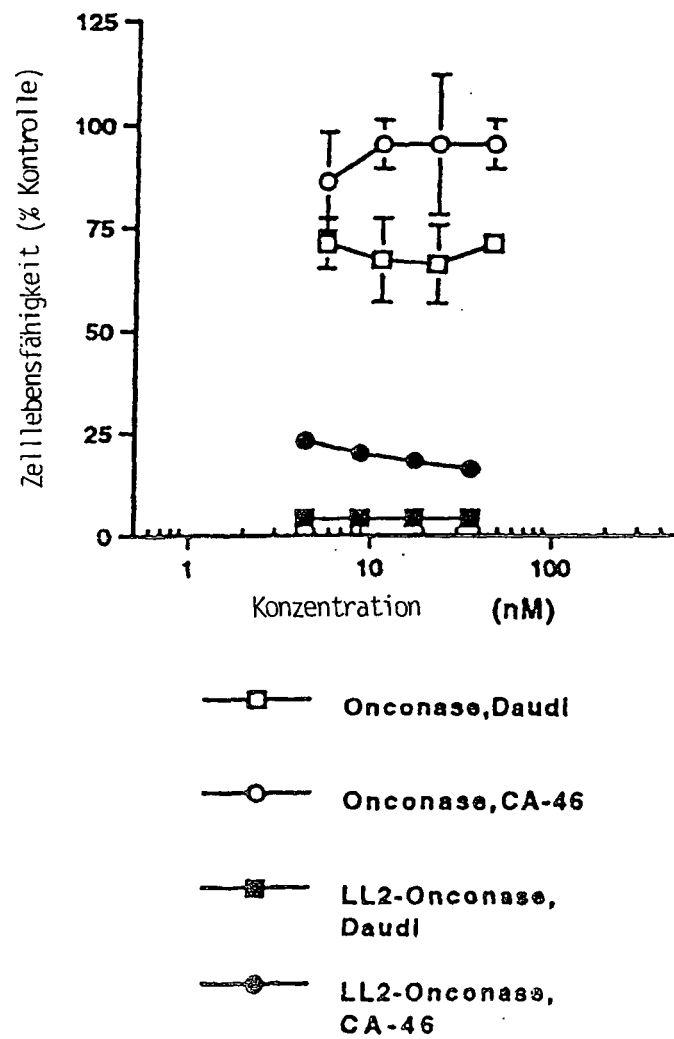


Fig. 2

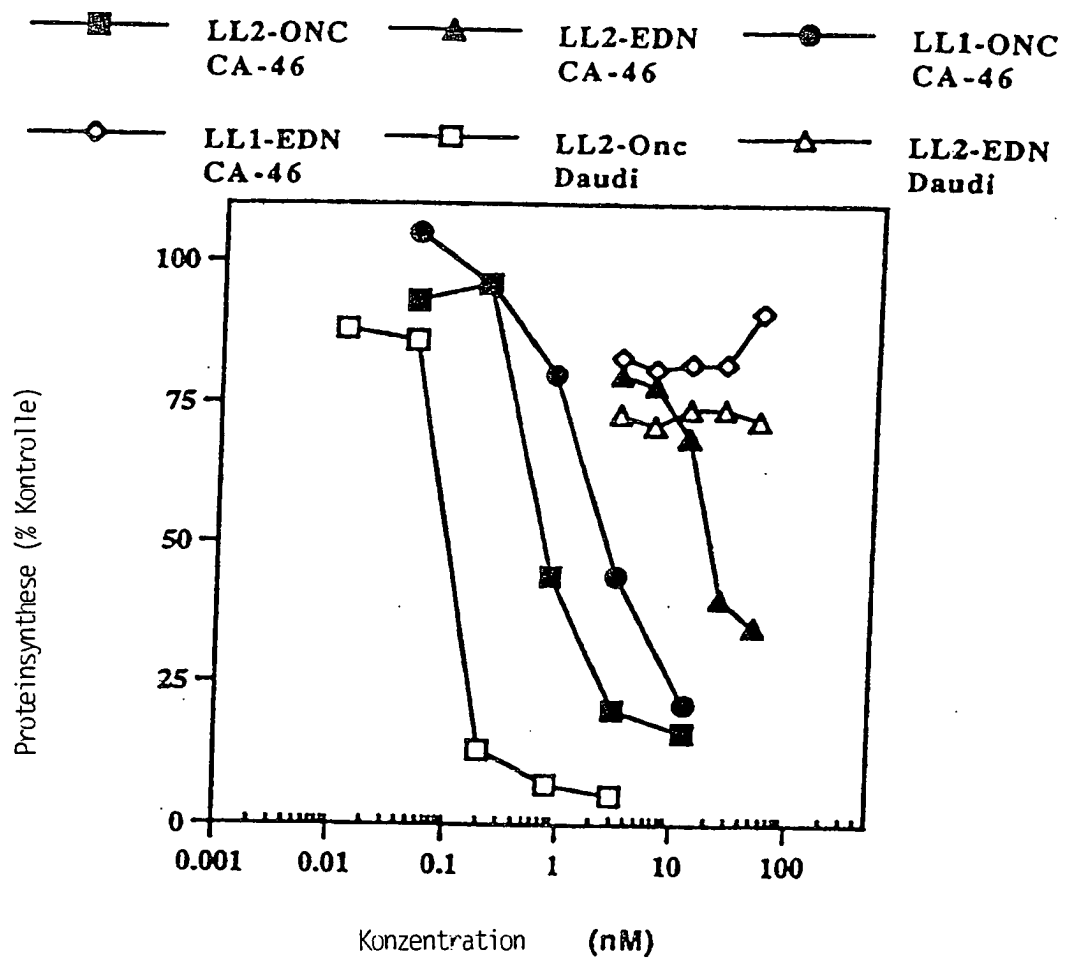


Fig. 3

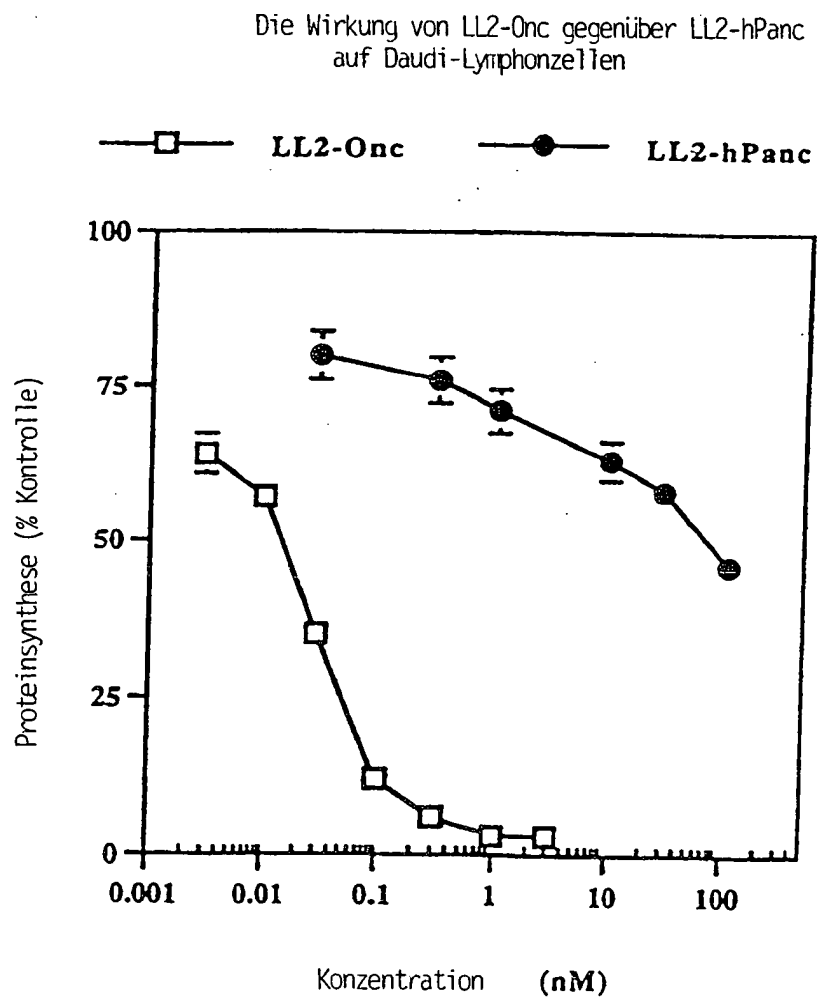


Fig. 4

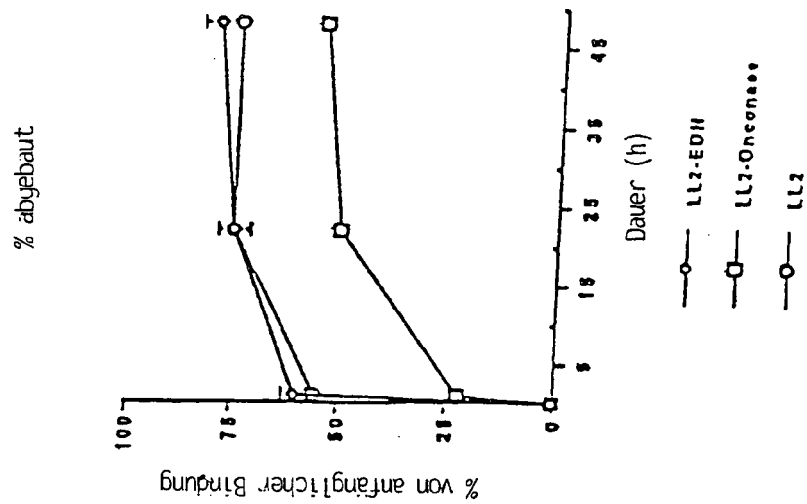


Fig. 5B

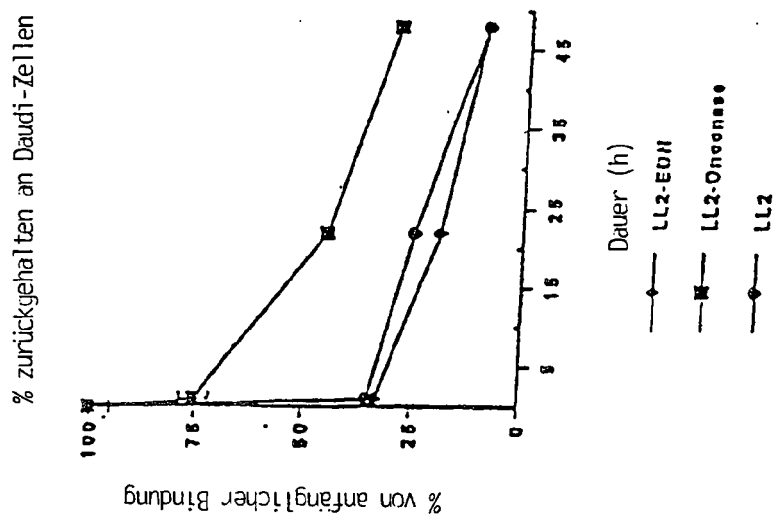
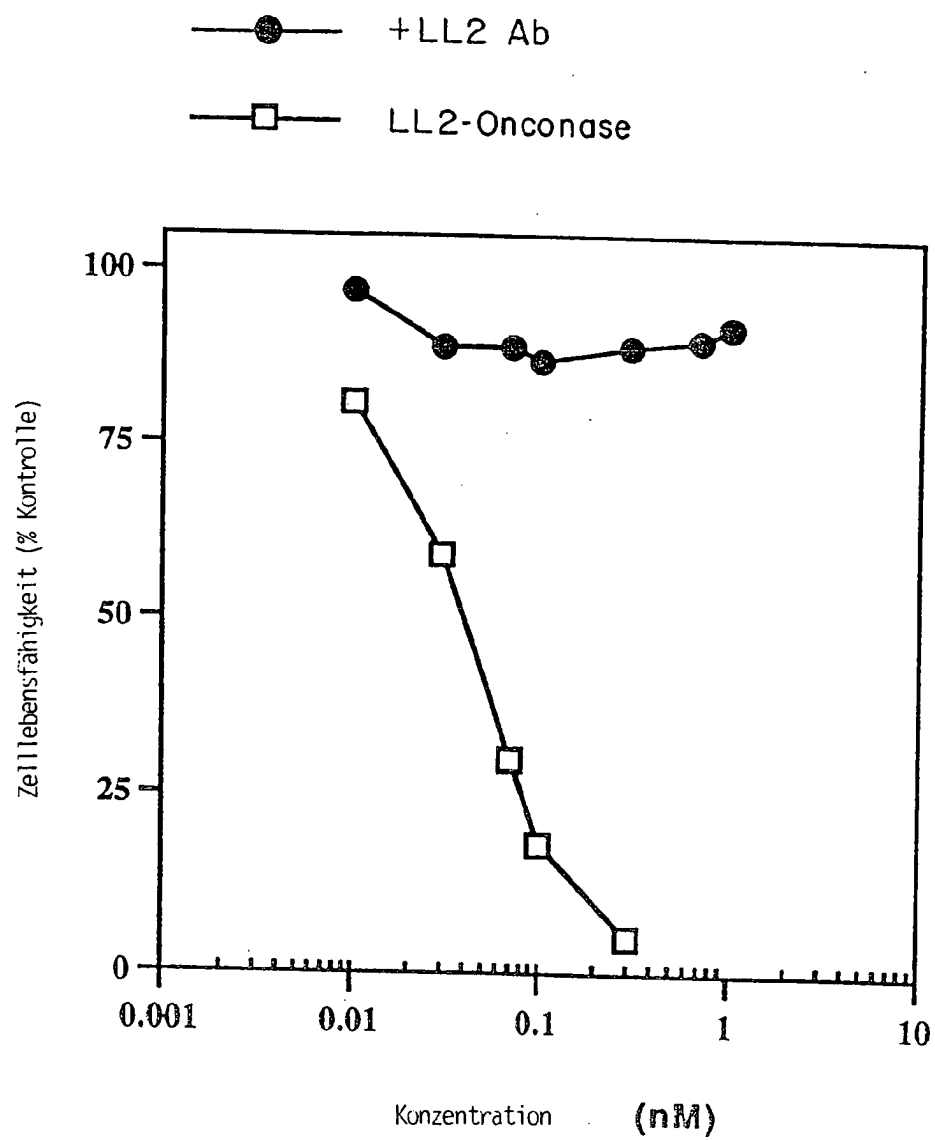


Fig. 5A

FIG. 6.



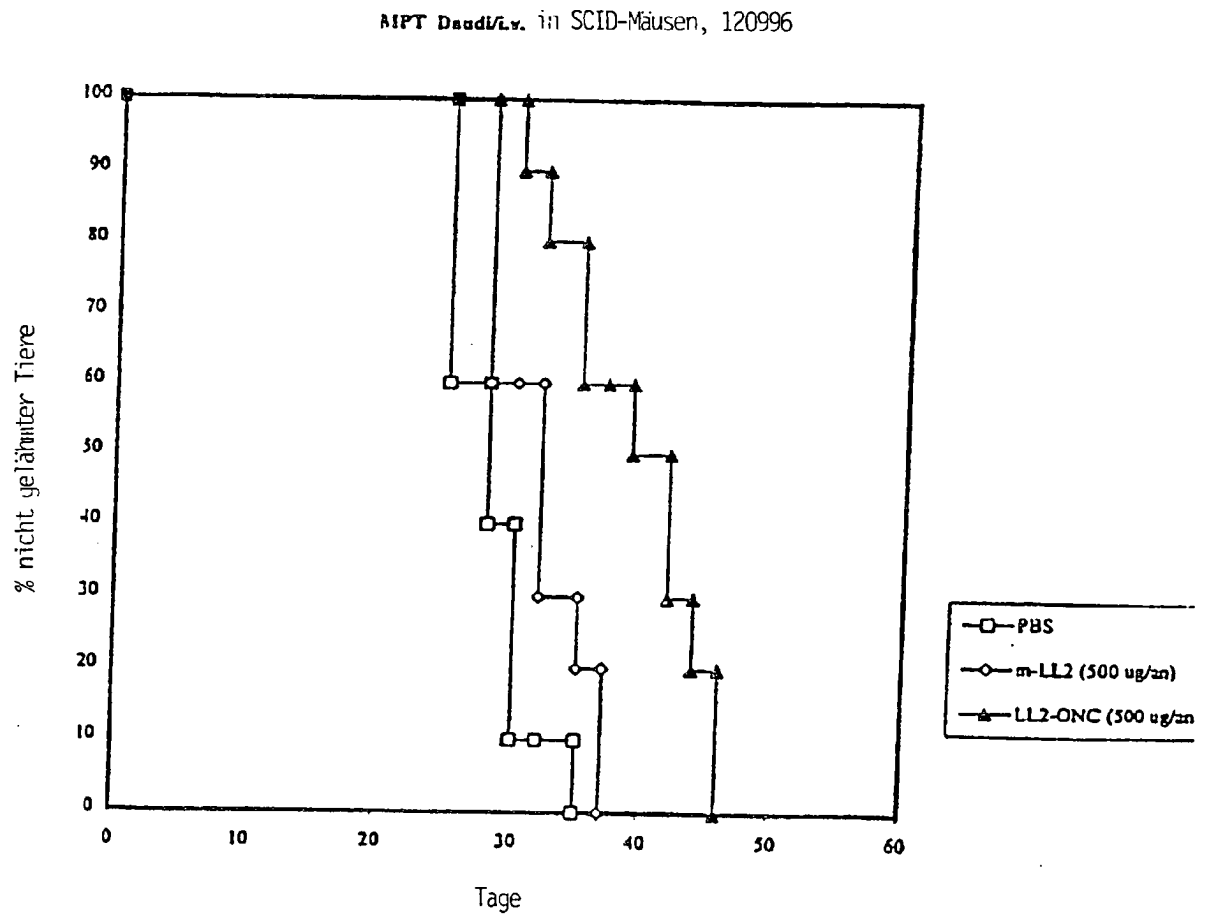


Fig. 7

FIG. 8.

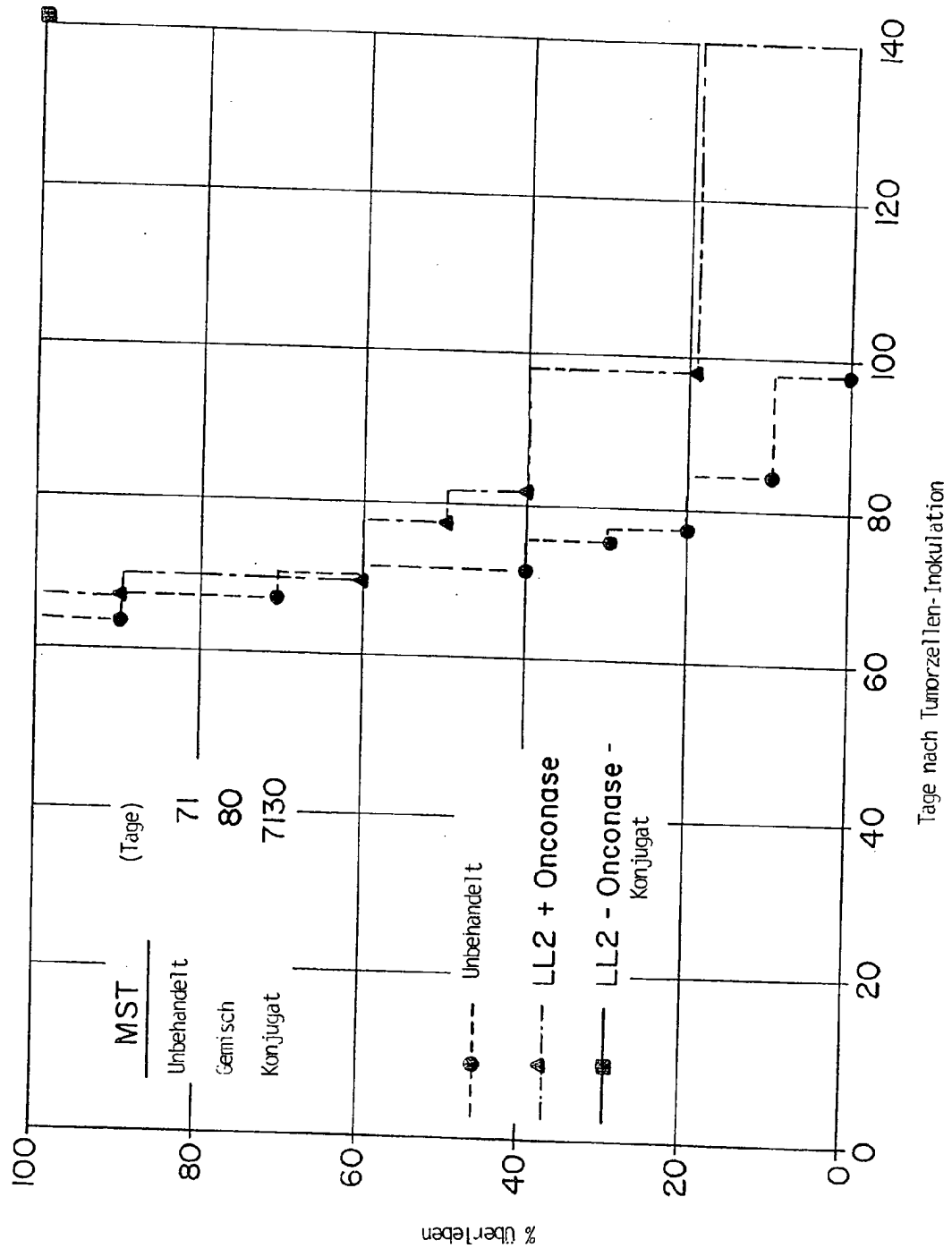
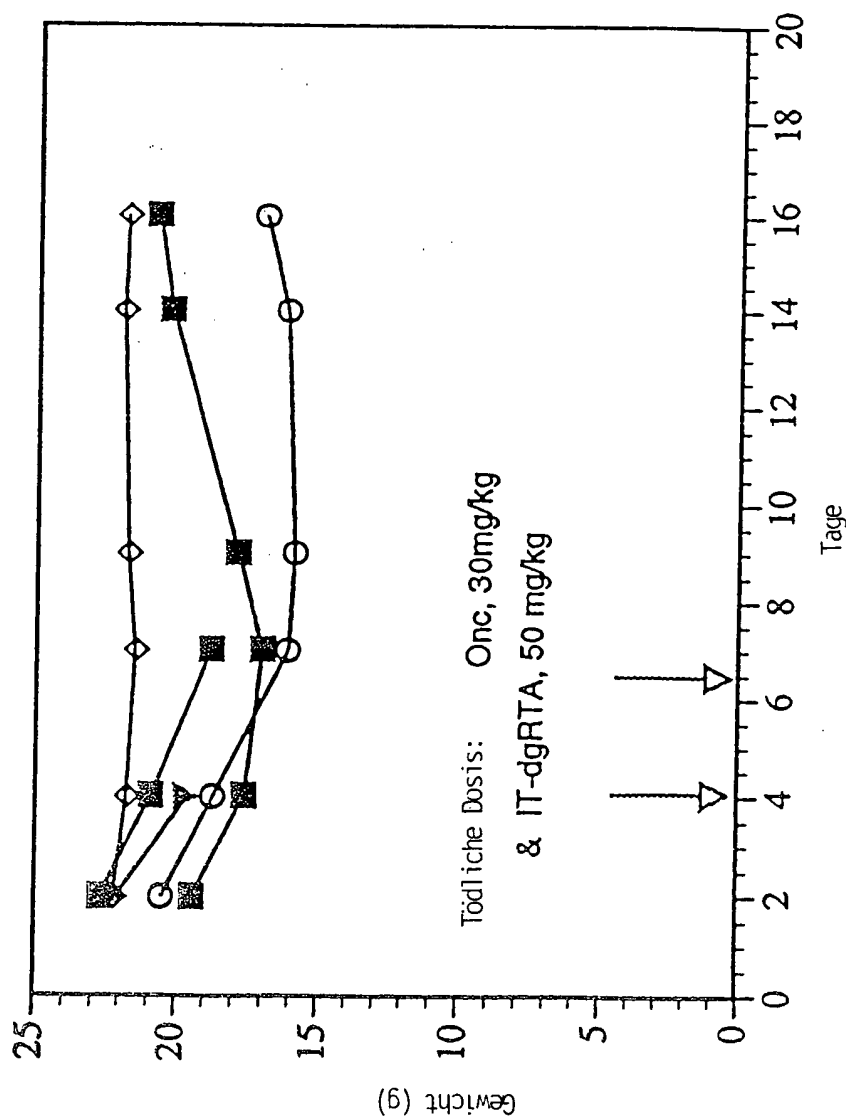


FIG. 9.



Die Wirkstoffe wurden alle 2 h
4x/Tag 5 Tage lang verabreicht.
Die Pfeile bezeichnen die Tage,
an denen die Mäuse mit der jeweiligen
Behandlung tot aufgefunden wurden.

RFB4-PE35KDEL, 1 x/Tag 4 Tage lang: LD50 1 mg/kg