



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 24 428 T3 2009.07.23

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) EP 0 909 277 B2

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 24 428.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/10074

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 931 103.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/046589

(86) PCT-Anmeldetag: 06.06.1997

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: 11.12.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 21.04.1999

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 27.08.2003

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: 24.12.2008

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 23.07.2009

(51) Int Cl.⁸: C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

660362 07.06.1996 US

(73) Patentinhaber:

Poniard Pharmaceuticals, Inc., Seattle, Wash., US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

GRAVES, S., Scott, Monroe, US; RENO, M., John,
Brier, US; MALLET, W., Robert, Everett, US;
HYLARIDES, D., Mark, Stanwood, US; SEARLE,
Stephen M.J., Sittingbourne, Kent ME7 0PL, GB;
HENRY, H., Andrew, ABINGTON, GB; PEDERSEN,
T., Jan, Gaithersburg, US; REES, R., Anthony,
Freshford, Bath BA3 6DA, GB

(54) Bezeichnung: HUMANISIERTE ANTIKÖRPER DIE AN DAS GLEICHE ANTIGEN WIE ANTIKÖRPER NR-LU-13
BINDEN UND DEREN VERWENDUNG IN "PRETARGETING" VERFAHREN

Beschreibung**TECHNISCHER BEREICH**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft humanisierte Antikörper, die von dem chimären Antikörper NR-LU-13 oder anderen Antikörpern abgeleitet sind die dieselbe oder ein ähnliche Bindungsspezifität aufweisen, Fragmente (einschließlich, z. B. variablen Regionen und scFvs), Konjugate (einschließlich Fusionsproteinen), die solche humanisierten Antikörper oder Fragmente davon enthalten und die Verwendung von solchen humanisierten Antikörpern oder Fragmenten in diagnostischen und therapeutischen Pretargeting-Verfahren und Zusammensetzungen. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung von solchen humanisierten Antikörpern in herkömmlichen immuntherapeutischen und immundiagnostischen Verfahren und Zusammensetzungen, z. B. für die Tumorbehandlung und -Darstellung.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Ein bestimmter Antikörper, der bereits als eine effektive Targeting-Gruppe beschrieben wurde, ist NR-LU-10, ein Maus-monoklonaler Antikörper, der gegen ein menschliches Krebsantigen hergestellt wurde. NR-LU-10 ist ein nominaler 150 kD Molekulargewichts-Maus-IgG_{2b} Pankarzinom monoklonaler Antikörper, der ein ungefähr 40 Kilodalton Glycoprotein-Antigen erkennt, das auf den meisten Karzinomen exprimiert wird. NR-LU-10 wurde an Hunderte von Patienten in menschlichen klinischen Studien sicher verabreicht. Jedoch ist sein Nachteil, daß er ein Maus-abgeleiteter monoklonaler Antikörper ist. Dies ist nachteilhaft, da die Immunogenität möglicherweise die Targeting-Effizienz verringert, falls der Antikörper wiederholt verabreicht wird. Während die therapeutische Effizienz erhalten werden kann, indem eine einzige Verabreichung verwendet wird, werden im Augenblick mehrfache Verabreichungsprotokolle bevorzugt.

[0003] Als ein Mittel zur Verringerung der Immunogenität von Maus-Antikörpern wurden in der Literatur verschiedenen Verfahren berichtet. Solche Verfahren schließen die Herstellung von chimären Antikörpern ein, die Maus-variable Regionen und menschliche konstante Regionen enthalten, die Herstellung von Single-Chain-Antikörpern, die variable Bindungssequenzen umfassen die von Maus-Antikörpern abgeleitet sind, die Herstellung von Antigen-bindenden Fragmenten von Maus-Antikörpern, die aufgrund ihrer kleineren Größe möglicherweise weniger immunogen sind, die Herstellung von menschlichen monoklonalen Antikörpern und die Herstellung von „humanisierten“ Antikörpern.

[0004] Maus-monoklonale Antikörper können, z. B. durch genetisches Rekombinieren der Nukleotidsequenz, die die Maus-Fv-Region kodiert (d. h. die Antigen bindenden Stellen enthält) oder der die Komplimentarität bestimmenden Regionen davon mit Nukleotidsequenzen, die für die menschliche konstante Regionen kodieren (die von der Fc-Region des Antikörpers umfaßt sind) human-ähnlicher gemacht werden. Diese Antikörper werden normalerweise als chimäre Antikörper bezeichnet.

[0005] In dieser Hinsicht wurde ein chimärer Antikörper, der von NR-LU-10 abgeleitet wurde, bezeichnet als NR-LU-13, früher beschrieben. Dieser Antikörper enthält die Maus-Fv-Region von NR-LU-10 und umfaßt daher dieselbe Bindungsspezifität, wie NR-LU-10. Daher bindet dieser chimäre Antikörper an das NR-LU-10-Antigen.

[0006] Weiden et al. (J. Nucl. Med. 34: 2111–2119, 1993) beschreiben einen Maus-humanen chimären monoklonalen Antikörper (NR-LU-13) und seine Verwendung, wenn Radiomarkiert mit einem bifunktionellen Chelat. Leung et al. (Molec. Immun. 32: 1413–1427, 1995) beschreiben einen Anti-B-Lymphoma monoklonalen Antikörper (LL2), in dem die Glycosylierung entweder durch enzymatische Behandlung oder durch Orts-gerichtete Mutagenese eliminiert wurde.

[0007] Die Humanisierung stellt idealerweise einen Antikörper zur Verfügung, der nicht-immunogen ist und mit einer vollständigen Beibehaltung der Antigen-bindenden Eigenschaften des parenteralen nicht-humanen Antikörper-Moleküls. Die Nicht-Immunogenität ermöglicht die Verabreichung von multiplen Dosierungen ohne nachteilhafte immunogen Reaktion. Verschiedene Verfahren zur Herstellung von humanisierten Antikörpern wurden in der Literatur berichtet. Zum Beispiel können humanisierte Antikörper potentiell hergestellt werden: (a) durch Graften der nicht-humanen CDRs auf ein menschliches Gerüst und konstante Regionen (Jones et al., Nature 321: 522–25 (1986); Verhoeven et al., Science 239: 1534–1536 (1988)); oder (b) durch Transplantieren der gesamten nicht-humanen variablen Domänen (um die Liganden-bindenden Eigenschaften zu erhalten), jedoch ein „Bedecken“ dieser mit einer human-ähnlichen Oberfläche durch Ersetzen von exponierten Resten, um die Immunogenität zu verringern (auch als „veeered“ Antikörper bezeichnet) (Padlan, Molec.

Immun. 28: 489–498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31(3): 169–217 (1994)).

[0008] Die Beibehaltung von Maus-Resten zusammen mit humanen variable Region-Gerüst-Domänen hilft berichteter Weise dabei, die geeignete Bindungsfunktion des erhaltenen humanisierten Antikörpers beizubehalten. Von humanisierten Antikörpern wurde berichtet, daß sie potentiell die Immunogenität in einem Wirtsempfänger verringern oder eliminieren, wodurch ein Anstieg in der Bioverfügbarkeit und eine Verringerung in der Möglichkeit von nachteilhaften Immunreaktionen ermöglicht wird, was daher potentiell die mehrfache Antikörper-Verabreichungen ermöglicht. Auch umfaßt die Synthese von scFv und Antikörper-Fragmenten, wie zum Beispiel Fv-, Fd-, Fab-, Fab'-, und F(ab)'₂-Fragmenten, abgeleitet von Antikörpern, die eine gewünschte Bindungsspezifität aufweisen, ein anderes bekanntes Mittel zur Herstellung von Targeting-Gruppen, die weniger Immunogenität aufweisen, als intakte Antikörper. Im wesentlichen könnten Single-Chain-Antikörper und Antikörper-Fragmente aufgrund ihrer kleineren Größe weniger immunogen sein, als intakte Antikörper.

[0009] Es ist auch bekannt, daß rekombinante Proteine, zum Beispiel Antikörper, in verschiedenen Wirtszellen, die für die Expression verwendet werden, verschieden glycosyliert werden. Im wesentlichen haben verschiedene Wirtszellen eine charakteristische Weise mit der sie spezifische Stellen auf Proteinen glycosylieren, die als Glycosylierungsstellen oder Glycosylierungsmotive bezeichnet werden.

[0010] Zum Beispiel glycosylieren Pflanzenzellen Proteine hauptsächlich durch O-verbundene Glycosylierung, wohingegen tierische Zellen Proteine typischerweise durch N-verbundene und O-verbundene Glycosylierung glycosylieren. Auch variieren die spezifischen Kohlenhydrate und die Glycosylierungsmuster in Abhängigkeit von den bestimmten Wirtszellen.

[0011] Es wurde in der Literatur berichtet, daß Oligosaccharide insofern signifikant sein können, wie es das Targeting von Proteinen an bestimmte Stellen betrifft. Darüber hinaus ist es auch bekannt, daß Kohlenhydrate eine immunogene Antwort hervorrufen können. Demzufolge besteht die Möglichkeit, daß in fremden Wirtszellen exprimierte Proteine eine immunogene Antwort aufgrund der Kohlenhydratreste hervorrufen können, die durch die Wirtszelle eingeführt werden, die für die Expression verwendet wird. Dies ist besonders problematisch, falls die fremden Wirtszellen sehr unterschiedlich vom Menschen glycosylieren. Zum Beispiel besteht die Möglichkeit, daß Säugerproteine, die in Pflanzenzellen exprimiert werden, immunogen sein können, da Pflanzen Proteine sehr unterschiedlich zu Säugerzellen glycosylieren.

[0012] Aufgrund der mit der Immunogenität von Maus- oder chimären Antikörpern, die an das durch den Antikörper NR-LU-13 gebundene Antigen binden, verbundenen Schwierigkeiten besteht ein Bedarf im Stand der Technik für verbesserte Zusammensetzungen und Verfahren. Die vorliegende Erfindung erfüllt diesen Bedarf und stellt weiterhin damit zusammenhängende Vorteile zur Verfügung.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Es ist eine Aufgabe der Erfindung humanisierte Antikörper zur Verfügung zu stellen, die von NR-LU-13 (oder von anderen nicht-humanen Antikörpern, die das durch NR-LU-13 gebundene Antigen binden) abgeleitet sind zur Verfügung zu stellen oder Fragmente von solchen humanisierten Antikörpern, die eine verringerte Immunogenität oder Toxizität in Menschen zeigen, jedoch ihre Fähigkeit beibehalten, das NR-LU-13-Antigen zu binden.

[0014] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Konjugate zur Verfügung zu stellen, die von NR-LU-13 abgeleitete Antikörper enthalten oder von anderen nicht-humanen Fragmenten davon, die das durch NR-LU-13 gebundene Antigen binden.

[0015] Es ist noch eine weitere Aufgabe der Erfindung, verbesserte zwei-Schritt-Pretargeting-Verfahren zur Verfügung zu stellen, wobei die Verbesserung die Verwendung eines humanisierten Antikörpers als die Targeting-Gruppe umfaßt, der von NR-LU-13 abgeleitet ist oder von einem anderen nicht-humanen Antikörper oder Fragmenten davon, die das durch NR-LU-13 gebundene Antigen binden.

[0016] Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, verbesserte drei-Schritt-Targeting-Verfahren zur Verfügung zu stellen, wobei die Verbesserung die Verwendung eines humanisierten Antikörpers als die Targeting-Gruppe umfaßt, der von NR-LU-13 abgeleitet ist oder von einem anderen nicht-humanen Antikörper oder Fragmenten davon, die das durch NR-LU-13 gebundene Antigen binden.

[0017] Es ist noch eine weitere Erfindung der vorliegenden Erfindung, Zusammensetzungen zur Behandlung

oder der Diagnose zur Verfügung zu stellen, die Konjugate enthalten, die humanisierte Antikörper umfassen, die von NR-LU-13 abgeleitet sind oder von anderen nicht-humanen Antikörpern oder Fragmenten davon, die das durch NR-LU-13 gebundene Antigen binden.

[0018] Es ist eine genauere Aufgabe der Erfindung, Konjugate zur Verfügung zu stellen, die einen humanisierten Antikörper umfassen, der von NR-LU-13 abgeleitet ist oder ein Fragment davon, das in der Lage ist, das durch NR-LU-13 gebundene Antigen zu binden, der/das direkt oder indirekt angebracht ist an ein Mitglied eines Liganden- oder Anti-Liganden-Partners, bevorzugterweise Avidin oder Streptavidin oder ein Fragment oder ein Derivat davon, das in der Lage ist, Biotin zu binden.

[0019] Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein Konjugat zur Verfügung zu stellen, das einen von NR-LU-13 abgeleiteten humanisierten Antikörper umfaßt oder ein Fragment davon, das das durch NR-LU-13 gebundene Antigen bindet, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung oder der Diagnose von Krebs.

[0020] Es ist eine noch genauere spezifische Aufgabe der Erfindung, spezifische humanisierte variable schwere und leichte Kettensequenzen abgeleitet von NR-LU-13 herzustellen, die hier als humanisierte NRX451 bezeichnet werden, oder Fragmente davon, die an das durch NR-LU-13 gebundene Antigen binden.

[0021] Es ist eine weitere spezifische Aufgabe der Erfindung, Zusammensetzungen zur Behandlung oder der Diagnose von Krebs zur Verfügung zu stellen, unter der Verwendung von humanisiertem NRX451 oder Fragmenten davon, die das durch NR-LU-13 gebundene Antigen binden.

[0022] Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, Antikörper herzustellen, insbesondere Maus-, chimäre oder humanisierte Antikörper, die mutiert wurden, um so eine oder mehrere potentielle Glycosylierungsstellen zu eliminieren und dadurch die Immunogenizität oder Toxizität zu verringern.

[0023] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Antikörper in Pretargeting-Verfahren und der herkömmlichen Antikörper-Therapie zu verwenden, bevorzugterweise humanisierte Antikörper, die mutiert wurden, um die N-verbundene Glycosylierung zu eliminieren oder modifiziert wurden, um die N-verbundene Glycosylierung zu verringern.

[0024] Daher stellt die vorliegende Erfindung, wie beansprucht, einen humanisierten Antikörper oder Antigen-bindendes humanisiertes Antikörper-Fragment zur Verfügung, wobei der Antikörper oder das Antikörper-Fragment spezifisch an das durch den Antikörper NR-LU-13 gebundene Antigen bindet, und wobei der Antikörper oder das Antikörper-Fragment entweder keine N-verbundene Glycosylierung besitzt oder seine N-verbundene Glycosylierung nach der Expression modifiziert wurde, um die Immunogenizität oder Toxizität zu verringern. Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Verringerung der Immunogenizität oder Toxizität eines Antikörpers oder eines Antigen-bindenden Antikörper-Fragments der IgG-Klasse zur Verfügung, umfassend die Schritte von (a) Auswählen eines Pflanzen-Wirtssystems auf die Eigenschaft hin, daß das System einen humanisierten Antikörper oder Antikörper-Fragment nicht N-verbunden glycosyliert; und (b) Expressieren einer Nukleotidsequenz, die Nukleinsäuren umfaßt (z. B. DNA oder RNA oder funktionelle Äquivalente) die für einen humanisierten IgG-Antikörper oder Antigen-bindendes Antikörper-Fragment kodiert in dem Pflanzen-Wirtssystem. Die vorliegende Offenbarung stellt weiterhin ein Verfahren zur Eliminierung N-verbundener Glycosylierung in einem Antikörper oder einem Antigenbindenden Antikörper-Fragment der IgG-Klasse zur Verfügung, um die Immunogenizität oder Toxizität zu verringern, umfassend Expressieren in einem Wirtssystem einer Nukleotidsequenz, die Nukleinsäuren (z. B. DNA oder RNA oder funktionelle Äquivalente) umfaßt, die für einen IgG-Antikörper oder ein Antigen-bindendes Antikörper-Fragment kodiert, wobei das Wirtssystem den Antikörper oder das Antikörper-Fragment nicht N-verbunden glycosyliert. Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin ein Verfahren zur Modifikation der N-verbundenen Glycosylierung eines Antikörpers oder Antigen-bindenden Antikörper-Fragments der IgG-Klasse (z. B. um die Immunogenizität oder Toxizität zu verringern) zur Verfügung, umfassend Unterziehen des Antikörpers oder Antikörper-Fragments einer post-Expressionsmodifikations, die die N-verbundene Glycosylierung modifiziert, wobei die N-verbundene Glycosylierung chemisch modifiziert wird.

[0025] Konjugate werden zur Verfügung gestellt, umfassend einen humanisierten Antikörper oder Antikörper-Fragment der vorliegenden Erfindung, der direkt oder indirekt an einen Liganden, einen Anti-Liganden, ein diagnostisches Mittel oder therapeutisches Mittel angebracht ist. Pharmazeutische Zusammensetzungen werden zur Verfügung gestellt, umfassend einen Antikörper oder Antikörper-Fragment oder Konjugat der vorliegenden Erfindung in Kombination mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Verdünnungsmittel. Ein Antikörper oder Antikörper-Fragment oder Konjugat oder Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird

zur Verwendung als ein Diagnostikum oder Medikament zur Verfügung gestellt; zur Verwendung in diagnostischen oder therapeutischen Pretargeting-Verfahren; und zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Krebs oder als Medikament zur Behandlung von Krebs.

[0026] Diese und andere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden nach Bezug auf die vorliegende genaue Beschreibung und die beigefügten Zeichnungen ersichtlich werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0027] [Fig. 1](#) stellt schematisch die Sequenzanalyse und das Computermodeling dar, die dazu verwendet wurden, um humanisierte Antikörper von NR-LU-13 zu synthetisieren.

[0028] [Fig. 2](#) enthält die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von NR-LU-13 leichte Kette NR-LU-13 und schwere Kette variablen Regionen.

[0029] [Fig. 3](#) enthält die Aminosäuresequenz der bevorzugten humanisierten variablen leichten Sequenz, abgeleitet von NR-LU-13, bezeichnet als humanisierte NRX451-leicht.

[0030] [Fig. 4](#) enthält die Aminosäuresequenz der bevorzugten humanisierten variablen schweren Sequenz, abgeleitet von NR-LU-13, bezeichnet als humanisierte NRX451-schwer.

[0031] [Fig. 5](#) zeigt einen Vergleich der schweren und leichten Kette Regionen von NR-LU-13 und den davon abgeleiteten humanisierten leichten und schweren variablen Regionen, die als NRX451 schwer und NRX451 leicht bezeichnet werden.

[0032] [Fig. 6a](#) und [6b](#) enthalten Molekularmodelle von (a) dem Fv von chimärem NR-LU-13 Antikörper und (b) einem davon abgeleiteten humanisierten Fv (NRX451).

[0033] [Fig. 7a–Fig. 7e](#) enthalten Aminosäuresequenzen für bestimmte Positionen von menschlichen Antikörperssequenzen.

[0034] [Fig. 8](#) stellt ein Plasmid pcDNA3 dar, das ein Intermediat für pNRX451-C ist, einem Plasmid, das dazu verwendet wurde, um NRX451 zu exprimieren.

[0035] [Fig. 9](#) stellt das Plasmid pNRX451-C dar, das dazu verwendet wurde, um NRX451 zu exprimieren.

[0036] [Fig. 10](#) enthält Ergebnisse von kappa und gamma ELISAs für spezifische NRX451 humanisierter Antikörper produzierende Klone.

[0037] [Fig. 11](#) vergleicht die Immunreaktivität von humanisiertem NRX451-Antikörper mit intaktem NR-LU-10-Antikörper durch kompetitive Immunreaktivität.

[0038] [Fig. 12](#) vergleicht die Gewebe-Bioverteilung von verschiedenen Radio-markierten Antikörpern, einschließlich humanisierten Antikörpern, die gemäß der Erfindung hergestellt wurden.

[0039] [Fig. 13](#) vergleicht die Bioverteilung von humanisiertem NR-LU-13 (NRX451), exprimiert in CHO-Zellen, Pflanzenzellen und Insektenlarven mit Maus-NR-LU-10, hergestellt in Maus-Hybridomzellen.

[0040] [Fig. 14](#) vergleicht die Lectin Bindungsprofile des oxidierten/reduzierten und nicht-oxidierten reduzierten NRX451.

[0041] [Fig. 15a–Fig. 15c](#) zeigen die Komplement vermittelte Cytotoxizitäts-(C'MC)-Aktivität in nicht-modifizierten und modifizierten NRX451.

[0042] [Fig. 15d](#) zeigt die Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizitäts-(ADCC)-Aktivität in nicht-modifizierten und modifizierten NRX451.

[0043] [Fig. 16a–Fig. 16c](#) vergleichen die Bioverteilung einer 50/50 Koinjektion von markiertem NRX451 und oxidiertem/reduziertem NRX451 in einem Maus-Modell.

[0044] [Fig. 17](#) vergleicht die Blutentfernung von NRX451 und oxidiertem/reduziertem NRX451 in menschlichen Krebspatienten.

[0045] [Fig. 18](#) zeigt die Komplement vermittelte Cytotoxizität von MCF-7-Zellen, die gegenüber Log-10-Verdünnungen von CHO-exprimiertem NRX451 (-o-), Mais-exprimiertem NRX451 (-□-) und der in Mais exprimierten Asn zu Gln Mutante von NRX451 (-Δ-) ausgesetzt wurden. Menschliches Serum bei einer finalen Verdünnung von 10% war die Quelle von Komplement. Die Ergebnisse sind als Prozent Cytotoxizität angegeben.

[0046] [Fig. 19](#) zeigt MCF-7-Zellen, die gegenüber Log-10-Verdünnungen von CHO-exprimiertem NRX451 (o-), Mais-exprimiertem NRX 451 (-□-) und der in Mais exprimierten Asn zu Gln Mutante von NRX451 (-Δ-) ausgesetzt wurden. Menschliche periphere mononukleare Zellen wurden auch bei einem Effektor zu Ziel-Zell-Verhältnis von 25:1 hinzugefügt. Die Ergebnisse sind als Prozent Cytotoxizität angegeben.

[0047] [Fig. 20](#) vergleicht das Entfernen aus Blut von NRX451 und dem Maus-IgG-Analogon, NR-LU-10, in Mäusen.

[0048] [Fig. 21a–Fig. 21b](#) vergleichen die Bioverteilung von NRX451 und dem Maus-IgG-Analogon, NR-LU-10 in Tumor-tragenden athymischen Mäusen.

[0049] [Fig. 22](#) zeigt die Bioverteilung von N-verbundenem glycosyliertem Mutanten-NRX451, die chemisch an Streptavidin konjugiert wurde (SA), exprimiert in Maissamen, in Tumortragenden athymischen Mäusen.

[0050] [Fig. 23](#) zeigt Ergebnisse der Entfernung aus Blut des radiomarkierten Mais-exprimierten N-verbunden glycosylierten Mutanten NRX451/SA-Konjugats mit und ohne die Verwendung eines synthetischen Entfernungsmittels in Mäusen.

[0051] [Fig. 24a–Fig. 24b](#) enthalten die Bioverteilung in Tumor-tragenden athymischen Mäusen von dem radiomarkiertem in Mais exprimierten N-verbunden glycosylierten Mutanten NRX451/SA-Konjugat und anschließend verabreichtem ¹¹¹DOTA-Biotin unter der Verwendung von Pretargeting-Verfahren.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0052] Vor der weiteren Beschreibung der Erfindung kann es für Verständnis davon hilfreich sein, Definitionen von bestimmten Ausdrücken anzugeben, die hier im folgenden verwendet werden sollen.

[0053] Antikörper – Wie hier verwendet, schließt sowohl polyklonale und monoklonale Antikörper ein und kann ein intaktes Molekül, ein Fragment davon (wie zum Beispiel Fv-, Fd-, Fab-, Fab'- und F(ab)'₂-Fragmente oder Multimere oder Aggregate von intakten Molekülen und/oder Fragmenten sein, und kann natürlich auftreten oder hergestellt sein, z. B. durch Immunisierung, Synthese oder genetisches Engineering.

[0054] Protein – Wie hier verwendet, schließt Proteine, Polypeptide und Peptide ein und kann ein intaktes Molekül, ein Fragment davon oder Multimere oder Aggregate von intakten Molekülen und/oder Fragmenten sein und kann natürlich auftreten oder hergestellt sein, z. B. durch Synthese (einschließlich chemischer und/oder enzymatischer) oder genetischem Engineering.

[0055] Humanisierter Antikörper – Dies betrifft einen Antikörper, der von einem nicht-menschlichen Antikörper abgeleitet ist (typischerweise Maus) oder von einem chimären Antikörper abgeleitet ist, der die Antigen-bindenden Eigenschaften des parenteralen Antikörpers beibehält oder im wesentlichen beibehält, der jedoch im Menschen wenig immunogen ist. Dies kann durch verschiedenen Verfahren erreicht werden, einschließlich beispielhaft: (a) Grafting nur der nicht-menschlichen CDRs auf ein menschliches Gerüst und konstanten Regionen (Humanisierung) oder (b) Transplantieren der gesamten nicht-menschlichen variablen Domänen, jedoch „Verhüllen“ dieser mit einer Menschen-ähnlichen Oberfläche durch Ersetzen von Oberflächenresten („Veneering“). Solche Verfahren sind zum Beispiel beschrieben in Jones et al., Nature 321: 522–525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851–6855 (1984); Morrison und Oi, Adv. Immunol. 44: 65–92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534–1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28: 489–498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31(3): 169–217 (1994). In der vorliegenden Erfindung werden humanisierte Antikörper „humanisierte“ und „veened“ Antikörper einschließen, schließen jedoch chimäre Antikörper aus. Ein bevorzugtes Verfahren der Humanisierung umfasst ein Abgleichen der nicht-menschlichen schweren und leichten Kettensequenzen mit menschlichen schweren und leichten Kettensequenzen, Auswahl und Ersatz des nicht-menschlichen Gerüsts mit einem menschlichen Gerüst, basierend auf einem solchen Abgleich, molekulares Modeling, um die Kon-

formation der humanisierten Sequenz vorherzusagen, und Vergleich mit der Konformation des parenteralen Antikörpers, gefolgt von wiederholter Mutation von Resten in der CDR-Region, die die Struktur der CDRs stören, bis die vorhergesagte Konformation des humanisierten Sequenzmodells der Konformation der nicht-menschlichen CDRs des parenteralen nicht-menschlichen Antikörpers eng angenähert ist. Dieses Verfahren der Humanisierung wird schematisch in [Fig. 1](#) dargestellt. Auch können solche humanisierten Antikörper weiter derivatisiert werden, um die Aufnahme und Ausscheidung zu erleichtern, z. B. über Ashwell-Rezeptoren oder andere Rezeptor-vermittelte Ausscheidungsmechanismen, wie zum Beispiel durch die Inkorporation von Galactoserenresten oder anderen Hexosen (z. B. U.S.-Patent-Nrn. 5,530,101 und 5,585,089).

[0056] Humanisiertes Antikörper-Fragment – Dies betrifft Fragmente, die von einem humanisierten Antikörper abgeleitet sind, die Antigen binden und die derivatisiert werden können, um strukturelle Merkmale aufzuweisen, die die Ausscheidung und die Aufnahme erleichtern, z. B. durch die Inkorporation von Galactoserenresten. Dies schließt zum Beispiel F(ab), F(ab)², ScFv, leichte Kette variable Region, schwere Kette variable Region und Kombinationen davon ein.

[0057] Komplementaritäts-bestimmende Region oder CDR – Der Ausdruck CDR, wie hier verwendet, betrifft Aminosäuresequenzen, die zusammen die Bindungsaaffinität und – Spezifität der natürlichen Fv-Region einer nativen Immunglobulinbindungsstelle definieren (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901–917 (1987); Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services NIH Publication Nr. 91–3242 (1991)).

[0058] Gerüstregion oder FR – Der Ausdruck FR, wie hier verwendet, betrifft Aminosäuresequenzen, die zwischen CDRs zwischengelagert sind. Eine Funktion dieser Teile des Antikörpers ist es, die CDRs in einer geeigneten Orientierung zu halten (es den CDRs zu ermöglichen, das Antigen zu binden).

[0059] Konstante Region oder CR – Der Ausdruck CR, wie hier verwendet, betrifft den Teil des Antikörpermonoleküls, der die Effektorfunktionen überträgt. In der vorliegenden Erfindung werden Maus-konstante Regionen durch menschliche konstante Regionen ersetzt. Die konstanten Regionen der hier betroffenen humanisierten Antikörper sind von menschlichen Immunglobulinen abgeleitet. Die schwere Kette konstante Region kann von jeder der fünf Isotypen ausgewählt sein: alpha, delta, epsilon, gamma oder mu. Weiterhin sind schwere Ketten von verschiedenen Unterklassen (sowie den IgG-Unterklassen der schweren Ketten) für die verschiedenen Effektorfunktionen verantwortlich, und daher können durch Auswählen der gewünschten schweren Kette konstante Regionen chimäre Antikörper mit gewünschter Effektorfunktion hergestellt werden. Bevorzugte humane konstante Regionen sind gamma 1 (IgG1), gamma (IgG2), gamma 3 (IgG3) und gamma 4 (IgG4). Bevorzugt ist eine Fc-Region des gamma 1 (IgG1)-Isotyps. Die leichte Kette konstante Region kann vom kappa- oder lambda-Typ sein und ist bevorzugterweise vom kappa-Typ.

[0060] Chimärer Antikörper – Dies ist ein Antikörper, der Sequenzen enthält, die von zwei verschiedenen Antikörpern abgeleitet sind (z. B. U.S.-Patent-Nr. 4,816,567), die typischerweise von zwei verschiedenen Spezies stammen. Die meisten typischen chimären Antikörper umfassen menschliche und Maus-Antikörperfragmente, im allgemeinen menschliche konstante und Maus-variable Regionen.

[0061] NR-LU-10 – Ein Maus-monoklonaler Antikörper des IgG2b-Isotyps, der ein ungefähr 40 Kilodalton Glycoprotein-Antigen erkennt, das auf einer großen Vielzahl von Karzinomen exprimiert wird. Dieser Antikörper ist ein Pankarzinom-Antikörper, der in menschlichen klinischen Studien sicher verabreicht wurde. Das durch NR-LU-10 gebundene Antigen wird durch Krebsarten, einschließlich zum Beispiel kleine-Zelle-Lungen, nicht-kleine-Zelle-Lungen, Colon-, Brust-, Nieren-, Eierstock- und Pankreas-, unter anderen Karzinomgeweben, exprimiert. Dieser Antikörper wurde früher als eine Targeting-Gruppe in zwei-Schritt und drei-Schritt-Targeting-Verfahren verwendet.

[0062] NR-LU-13 – Ein chimärer monoklonaler Antikörper, der die variablen leichten und schweren Regionen von NR-LU-10 und menschliche konstante Regionen enthält. Dieser Antikörper bindet dasselbe Antigen, wie NR-LU-10.

[0063] NR-LU-10 oder NR-LU-13 Antigen – Diese Begriffe werden austauschbar verwendet und betreffen das Antigen, das durch NR-LU-10 oder NR-LU-13 gebunden wird, das ein ungefähr 40 Kilodalton Glycoprotein-Antigen ist, das durch viele Karzinome und nicht-Krebsgewebe exprimiert wird.

[0064] Humanisiertes NRX451 oder humanisierte NRX451-leicht oder humanisierte NRX451-schwer – Diese Begriffe betreffen spezifische humanisierte variable Domänensequenzen, die von dem Fv von NR-LU-13 abgeleitet sind.

[0065] Humanisierte Antikörper oder humanisiertes Antikörper-Fragment oder humanisierte Antikörper-Fragment-Konjugate – Konjugate, die humanisierten Antikörper oder humanisierte Antikörper-Fragmente der Erfindung enthalten. Diese Konjugate können einen Liganden oder einen Anti-Liganden und/oder ein aktives Mittel, wie infra definiert, einschließen. Der Ligand, Anti-Ligand oder das aktive Mittel können direkt oder indirekt an den humanisierten Antikörper oder das humanisierte Antikörper-Fragment, z. B. über die Verwendung von bekannten Linker, angebracht sein. Diese Konjugate können strukturelle Merkmale aufweisen oder derivatisiert werden, um die Merkmale aufzuweisen, die eine Aufnahme und Entfernung davon vermitteln, z. B. durch Inkorporation von Hexosen, wie zum Beispiel Galactose, die die Leberaufnahme über eine Ashwell-Rezeptor-vermittelte Entfernung vermitteln.

[0066] Pretargeting – Wie hier definiert, schließt Pretargeting die Targetstellen-Lokalisierung einer Targeting-Gruppe ein, die mit einem Mitglied eines Ligand-/Anti-Ligand-Paars konjugiert ist; nach einer Zeitdauer die, für eine optimale Target-zu-nicht-Target-Anreicherung dieses Targeting-Gruppen-Konjugats ausreichend ist, wird aktives Mittel, das an das gegenüberliegende Mittel des Liganden-/Anti-Liganden-Paars konjugiert ist, verabreicht und wird (direkt oder indirekt) an das Targeting-Gruppe-Konjugat an der Targetstelle gebunden. Das Pretargeting schließt gegebenenfalls auch einen weiteren Schritt der Verabreichung eines Entfernungsmittels ein.

[0067] Targeting-Gruppe – Ein Molekül, das eine definierte Population von Zellen bindet. Die Targeting-Gruppe kann jedes Target binden, wie zum Beispiel einen Rezeptor, ein Oligonukleotid, ein enzymatisches Substrat, eine antigene Determinante oder andere Bindungsstelle, die auf oder in der Target-Zell-Population vorhanden ist. Die Targeting-Gruppe kann ein Protein, Peptid, Antikörper und Antikörper-Fragmente, Fusionsproteine und ähnliches sein. Ein Antikörper wird in der Beschreibung als ein prototypisches Beispiel einer Targeting-Gruppe verwendet. Ein Tumor wird als ein prototypisches Beispiel eines Targets verwendet.

[0068] Ligand-/Anti-Ligand-Paar – Ein komplementäres/anti-komplementäres Set von Molekülen, die eine spezifische Bindung zeigen, im allgemeinen von relativ hoher Affinität. Beispielhafte Liganden-/Anti-Liganden-Paare schließen Zink-Finger-Proteine/dsDNA-Fragment, Enzym/Inhibitor, Hapten/Antikörper, Lectin/Kohlenhydrat, Ligand/Rezeptor und Biotin/Avidin oder Streptavidin ein. Biotin/Avidin oder Streptavidin werden innerhalb der Beschreibung als ein prototypisches Beispiel eines Ligand-/Anti-Ligand-Paars verwendet.

[0069] Ligand – Wie hier definiert, ist ein „Ligand“ ein relativ kleines lösliches Molekül, das eine schnelle Serum, Blut- und/oder Gesamtkörper-Entfernung zeigt, wenn intravenös an ein Tier oder einen Menschen verabreicht. Biotin und Biotin-Analoga werden als der prototypische Ligand verwendet. Analoga von Biotin, die eine verringerte oder verstärkte Bindungsaffinität gegenüber Avidin oder Streptavidin aufweisen, sind im Stand der Technik gut bekannt.

[0070] Anti-Ligand – Wie hier definiert, zeigt ein „Anti-Ligand“ eine hohe Affinität und bevorzugterweise eine multivalente Bindung des komplementären Liganden. Bevorzugterweise ist der Anti-Ligand, wenn an eine Targeting-Gruppe konjugiert, groß genug, um eine schnelle Nierenentfernung zu vermeiden und enthält ausreichend Multivalenzen, um eine Kreuzvernetzung und Aggregation von Targeting-Gruppen-Liganden-Konjugaten zu erreichen. Univalente Anti-Liganden werden auch durch die vorliegende Erfindung vorgesehen. Die Anti-Liganden der vorliegenden Erfindung können strukturelle Merkmale aufweisen oder derivatisiert werden, um die strukturellen Merkmale aufzuweisen, die die Aufnahme davon vermitteln, z. B. durch die Inkorporation von Hexoseresten, die die Leber-Aufnahme vermitteln. Avidin und Streptavidin sind hier als prototypische Anti-Liganden verwendet.

[0071] Avidin – Wie hier definiert, schließt „Avidin“ Avidin, Streptavidin und Derivate und Analoga davon ein, die zu einer Hochaffinitäts-, multivalenten oder univalenten Bindung von Biotin in der Lage sind. Beispielhafte Streptavidinmoleküle sind in den U.S.-Patenten Nrn. 5,168,049 und 5,272,254 beschrieben.

[0072] Entfernungsmittel – Ein Mittel, das in der Lage ist mit einer verabreichten Gruppe (z. B. Targeting-Gruppe-Ligand, Targeting-Gruppe-Anti-Ligand oder Anti-Ligand alleine) zu binden, zu komplexieren oder sich auf andere Weise zu assoziieren, die im Kreislauf des Empfängers vorhanden ist, wodurch die Entfernung der zirkulierenden Gruppe aus dem Körper des Empfängers beschleunigt wird, ein Entfernen aus dem Blutkreislauf oder eine Inaktivierung des selben Kreislauf. Das Entfernungsmittel ist bevorzugterweise durch physikalische Eigenschaften charakterisiert, wie zum Beispiel Größe, Ladung, Konfiguration oder eine Kombination davon, die einen Zugang des Entfernungsmittels zur Population von Ziel-Zellen, die durch eine Targeting-Gruppe erkannt werden und in demselben Behandlungsprotokoll wie das Entfernungsmittel verwendet werden, begrenzen.

[0073] Aktives Mittel – Ein diagnostisches oder therapeutisches Mittel, einschließlich Radionuklide, Wirkstoffe, Anti-Tumor-Mittel, Cytokine, Hormone, Toxine und ähnliches. Radionuklid therapeutische Mittel sind prototypische aktive Mittel.

[0074] Target-Ziel-Rückhalt – Die Zeitdauer, die ein Radionuklid oder ein anderes therapeutisches Mittel auf der Target-Zelloberfläche oder innerhalb der Target-Zelle verbleibt. Der Katabolismus von Konjugaten oder Molekülen, die solche therapeutischen Mittel enthalten, scheint hauptsächlich für den Verlust der Ziel-Zell-Rückhaltung verantwortlich zu sein.

[0075] Konjugat – Ein Konjugat ist ein Molekül, das die Kombination von zwei oder mehreren Molekülen ist (oder Teilen von einem oder allen), die direkt (z. B. kovalent oder nicht-kovalent) oder indirekt (z. B. inkorporiert oder indirekt gebunden) miteinander assoziiert sind. Ein Konjugat schließt chemische Konjugate (kovalent oder nicht-kovalent gebunden), Fusionsproteine und ähnliches ein. Konjugate können einen Liganden oder Anti-Liganden und/oder aktives Mittel besitzen.

[0076] Immunogenizität – Ein Maß der Fähigkeit eines Targeting-Proteins oder therapeutischen Gruppe, eine Immunantwort hervorzurufen (humoral oder zellulär), wenn an einen Empfänger verabreicht. Die vorliegende Erfindung betrifft die Immunogenizität von Konjugaten und deren Komponententeilen.

[0077] Aglycosylierter Antikörper oder aglycosylierter humanisierter Antikörper – Diese Ausdrücke betreffen Antikörper oder humanisierte Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon, die durch Orts-spezifische Mutagenese mutagenisiert wurden, um die Aminosäurereste an Stellen zu modifizieren, die ansonsten potentiell glycosyliert werden, um so die Glycosylierung zu verringern oder zu beseitigen.

[0078] Humanisierter Antikörper von verringelter Immunogenizität – Dies betrifft einen humanisierten Antikörper, der eine verringerte Immunogenizität relativ zu dem parenteralen Antikörper zeigt, z. B. ein humanisierter Antikörper, der in Bezug auf NR-LU-13 humanisierte NRX451-schwere und humanisierte NRX451-leichte Sequenzen enthält.

[0079] Humanisierter Antikörper, der im wesentlichen die Bindungseigenschaften des parenteralen Antikörpers beibehält – Dies betrifft einen humanisierten Antikörper, der die Fähigkeit beibehält, spezifisch das Antigen zu binden, das durch den parenteralen Antikörper erkannt wird, der dazu verwendet wurde, um solch einen humanisierten Antikörper herzustellen. Zum Beispiel binden humanisierte Antikörper, die im wesentlichen die Bindungseigenschaften von NR-LU-13 beibehalten, spezifisch an ein ungefähr 40 Kilodalton Protein, das durch viele Karzinome exprimiert wird, und weiter bevorzugt an dasselbe Epitop, wie NR-LU-13. Bevorzugterweise wird der humanisierte Antikörper dieselbe oder im wesentlichen dieselbe Antigen-bindende Affinität aufweisen, wie der parenterale Antikörper. Im allgemeinen wird die Affinität innerhalb derselben Größenordnung liegen, wie die Affinität des parenteralen Antikörpers. Verfahren zur Bestimmung der Antigen-bindenden Affinität sind im Stand der Technik gut bekannt und schließen halb-maximale Bindungstests, Kompetitionstests und Scatchard-Analysen ein.

[0080] Wo anwendbar, schließen die angegebenen Definitionen funktionelle Äquivalente ein, d. h. Moleküle die in ihrer Länge, Struktur, Komponenten usw. unterschiedlich sind, die jedoch in der Lage sind, eine oder mehrere der Funktionen der definierten Moleküle durchzuführen oder zu erreichen. Funktionelle Äquivalente der oben genannten definierten Moleküle schließen funktionelle Äquivalente von Antikörpern oder Antikörper-Fragmenten der vorliegenden Erfindung ein. Ein funktionelles Äquivalent ist eine „mimetische“ Verbindung, d. h. ein organisches chemisches Konstrukt, das so aufgebaut ist, um die geeignete Konfiguration und/oder Orientierung zur Antigen-Bindung nachzuahmen. Ein anderes funktionelles Äquivalent ist ein kurzes Polypeptid, das als ein „minimales“ Polypeptid bezeichnet wird, das unter der Verwendung von Computer-unterstütztem molekularen Modeling konstruiert wurde und Mutanten, die eine veränderte Bindungsaffinität aufweisen, wobei minimale Polypeptide die Antigen-bindende Affinität des Antikörpers zeigen.

[0081] Wie oben angegeben, ist die vorliegende Erfindung in Richtung auf die Herstellung von humanisierten Antikörpern und Antigen-bindenden Fragmenten davon, die von NR-LU-13 oder anderen nicht-menschlichen Antikörpern abgeleitet sind, die das durch NR-LU-13 erkannte Antigen binden (an demselben oder verschiedenen Epitopen), und deren Verwendung, insbesondere in zwei-Schritt- und drei-Schritt-Pretargeting-Verfahren, gerichtet. Darüber hinaus, unter der Annahme, daß die betroffenen humanisierten Antikörper typischerweise menschliche konstante Regionen enthalten werden, können sie auch als therapeutische Antikörper verwendet werden. Spezifisch rufen humanisierte Antikörper, die humanen konstanten Regionen enthalten, typischerweise menschliche Effektor-Funktionen hervor, z. B. eine Komplement-vermittelte Cytotoxizitäts-(C'MC)-

und Antikörper-vermittelte Zell-Cytotoxizitäts-(ADCC)-Aktivität. Solche Aktivität kann zur direkten Tumorzell-Lyse durch Komplementproteine oder durch ADCC-Effektorzellen, NK-polymorphonuklearen Zellen und Monozyten führen. Auch kann solch eine Aktivität zu der Induktion einer entzündlichen Antwort (ihren, wie durch die Infiltration von inflammatorischen Effektorzellen, Makrophagen und polymorphonuklearen Leukozyten typisiert. Daher können diese humanisierten Antikörper eine Tumorzell-Lyse ohne den Bedarf für die Anbringung an ein anderes aktives Mittel, z. B. ein Radionuklid oder ein Toxin, verstärken.

[0082] Alternativ können humanisierte Antikörper und Antigen-bindende Fragmente mit oder ohne Effektorsequenzen an aktive Mittel angebracht werden, um eine gewünschte therapeutische Funktion zu bewirken.

[0083] Wie vorher beschrieben, ist NR-LU-13 ein chimärer Antikörper, der Maus-Fv-Sequenzen und menschliche konstante Domänensequenzen enthält. NR-LU-13 ist ein Antikörper, der das NR-LU-13-Antigen an demselben Epitop wie NR-LU-10 bindet. NR-LU-10 ist ein Pankarzinom-Antikörper, der ein Maus-monoklonaler Antikörper des IgG2b-Isotyps ist, der ein Molekulargewicht von 150 Kilodalton aufweist. Wie diskutiert, wurde dieser monoklonale Antikörper, sowie das Fab-Fragment davon, in klinischen Versuchen an viele hundert Menschen sicher verabreicht.

[0084] Radioimmuntests, Immunpräzipitation und Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sorting(FACS)-Analyse wurde dazu verwendet, um Reaktivitätsprofile von NR-LU-10 zu bestimmen. Das NR-LU-10-Target-Antigen ist entweder auf fixierten Kulturzellen oder in Detergenzextrakten von verschiedenen Typen von Krebszellen vorhanden. Zum Beispiel wird das NR-LU-10-Antigen durch kleine-Zellen-Lungen-, nicht-kleine-Zellen-Lungen-, Colon-, Brust-, Nieren-, Eierstock-, Pankreas- und anderen Karzinomgeweben exprimiert. Die Tumorreakтивität des NR-LU-10-Antikörpers wird in Tabelle A angegeben, während die NR-LU-10-Reaktivität mit normalen Geweben in Tabelle B angegeben ist. Die Werte in Tabelle B wurden wie im folgenden beschrieben erhalten. Positive NR-LU-10 Gewebereaktivität zeigt die NR-LU-10-Antigen-Expression durch das Gewebe an. Das NR-LU-10-Antigen wurde durch Varki et al., „Antigens Associated with a Human Lung Adenocarcinoma Defined by Monoclonal Antibodies“, Cancer Research 44: 681–687 (1984), und Okabe et al., „Monoclonal Antibodies to Surface Antigens of Small Cell Carcinoma of the Lung,“ Cancer Research 44: 5273–5278 (1984) genauer beschrieben.

[0085] Die Gewebeproben wurden in Übereinstimmung mit drei Reaktivitätsparametern bewertet: (1) der Intensität der Reaktion; (2) der Gleichmäßigkeit der Reaktion innerhalb des Zelltyps und (3) dem Prozentsatz von Zellen, die mit dem Antikörper reaktiv waren. Diese drei Werte wurden in einem einzigen gewichteten Vergleichswert zwischen 0 und 500 kombiniert, wobei 500 die intensivste Reaktivität ist. Dieser Vergleichswert erleichtert den Vergleich von verschiedenen Geweben. Tabelle B schließt einen zusammengefaßten Reaktivitätswert, die Zahl von untersuchten Gewebeproben und die Zahl von Proben ein, die mit NR-LU-10 positiv reagierten.

[0086] Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, die an Epitope des NR-LU-10-Antigens binden, sind ebenfalls bekannt und sind in U.S.-Patent Nr. 5,084,396 beschrieben. Kurz gesagt, können solche Antikörper durch das folgende Verfahren hergestellt werden:

- Absorbieren eines ersten monoklonalen Antikörpers, der gegen ein erstes Epitop eines polyvalenten Antigens gerichtet ist auf einer inerten unlöslichen Matrix, die in der Lage ist, Immunglobulin zu binden, wodurch ein Immunsorbt gebildet wird;
- Kombinieren des Immunsorbents mit einem Extrakt, der polyvalentes NR-LU-10-Antigen enthält, Bilden eines ungelösten Immunkomplexes, worin das erste Epitop durch den ersten monoklonalen Antikörper maskiert wird;
- Immunisieren eines Tiers mit dem unlöslichen Immunkomplex;
- Fusionieren von Milzzellen aus dem immunisierten Tier mit Myelomzellen, um ein Hybridom zu bilden, das in der Lage ist, einen zweiten monoklonalen Antikörper herzustellen, der gegen ein zweites Epitop des polyvalenten Antigens gerichtet ist;
- Kultivieren des Hybridoms, um den zweiten monoklonalen Antikörper herzustellen; und
- Sammeln des zweiten monoklonalen Antikörpers als ein Produkt des Hybridoms.

[0087] Monoklonale Antikörper NR-LU-01, NR-LU-02, NR-LU-03 und NR-LU-06, die in Übereinstimmung mit den in dem oben genannten Patent beschrieben Verfahren hergestellt wurden, sind beispielhafte Antikörper, die dasselbe Krebsantigen binden, wie NR-LU-10, die zur Verwendung in Pretargeting-Verfahren geeignet sind.

[0088] Zusätzliche Antikörper, die mit dem NR-LU-10-Antigen reaktiv sind, können auch durch Standardhy-

ridomproduktion und Screening-Verfahren präpariert werden. Jeder so produzierte und indentifizierte Hybride domklon kann wie oben beschrieben weiter gescreent werden, um die Antigen- und Gewebereaktivität zu verifizieren.

TABELLE A

Organ-/Zelltyp-Tumor	#Pos/Untersucht	Intensität Durchschnittlicher Bereich		Prozent Durchschnittlicher Bereich		Gleichmäßigkeit Durchschnittlicher Bereich	
Pankreaskarzinom	6/6	3	3	100	100	2,3	2,3
Prostatakarzinom	9/9	2,8	2,3	95	80–100	2	1,3
Lungenadenokarzinom	8/8	3	3	100	100	2,2	1,3
Lunge-kleine-Zelle-Karzinom	2/2	3	3	100	100	2	2
Lunge-squamöse-Zell-Karzinom	8/8	2,3	2,3	73	5–100	1,8	1,3
Nierenkarzinom	8/9	2,2	2,3	83	75–100	1	1
Brustadenokarzinom	23/23	2,9	2,3	97	75–100	2,8	1,3
Colonkarzinom	12/12	2,9	2,3	98	95–100	2,9	2,3
Malignes Melanom Auge	0/2	0	0	0	0	0	0
Malignes Melanom	0/11	0	0	0	0	0	0
Eierstockkarzinom	35/35	2,9	2,3	100	100	2,2	1,3
Nicht-differenziertes Karzinom	1/1	2	2	90	90	2	2
Osteosarcom	1/1	2	2	20	20	1	1
Synoviales Sarkom	0/1	0	0	0	0	0	0
Lymphom	0/2	0	0	0	0	0	0
Liposarkom	0/2	0	0	0	0	0	0
Uterines Leiomyosarkom	0/1	0	0	0	0	0	0

TABELLE B

Organzelltyp	#Pos/Untersucht	Zusammengefaßte Reaktivität
Adenoid		
Epithel	3/3	433
Lymphoid-Follikel-zentral	0/3	0
Lymphoid-Follikel-peripher	0/3	0
Schleimhautdrüse	2/2	400
Adiposes Gewebe		
Fettzellen	0/3	0
Adrenal		
Zona Fasciculata Cortex	0/3	0
Zona Glomerulosa Cortex	0/3	0
Zona Reticularis Cortex	0/3	0

Medulla	0/3	0
Aorta		
Endothel	0/3	0
Elastisches Inneres	0/3	0
Tunica Adventitia	0/3	0
Tunica Media	0/3	0
Hirn-Zerebellum		
Axone, myelinisiert	0/3	0
Microglia	0/3	0
Neurone	0/3	0
Purkenjes Zellen	0/3	0
Hirn-Zerebrum		
Axone, myelinisiert	0/3	0
Microglia	0/3	0
Neurone	0/3	0
Hirn-Mittelhirn		
Axone, myelinisiert	0/3	0
Microglia	0/3	0
Neurone	0/3	0
Colon		
Mucosa Epithel	3/3	500
Muskuläres Äußeres	0/3	0
Muskuläre Mucosa	0/3	0
Nervenganglien	0/3	0
Serosa	0/1	0
Duodenum		
Mucosa Epithel	3/3	500
Muskuläre Mucosa	0/3	0
Epididymis		
Epithel	3/3	419
Glatter Muskel	0/3	0
Spermatozoe	0/1	0
Speiseröhre		
Epithel	3/3	86
Schleimhautdrüse	2/2	450
Glatter Muskel	0/3	0
Gallenblase		
Schleimhaut-Epithel	0/3	467
Glatter Muskel	0/3	0
Herz		
Myocard	0/3	0
Serosa	0/1	0
Ileum		
Lymphknoten	0/2	0
Schleimhaut-Epithel	0/2	0

Muskuläres Äußeres	0/1	0
Muskuläre Mucosa	0/2	0
Nervenganglien	0/1	0
Serosa	0/1	0
Jejunum		
Lymphknoten	0/1	0
Schleimhaut-Epithel	2/2	400
Muskuläres Äußeres	0/2	0
Muskuläre Mucosa	0/2	0
Nervenganglien	0/2	0
Serosa	0/1	0
Niere		
Sammelröhren	2/3	160
Distale Konvolutröhren	3/3	500
Glomerulares Epithel	0/3	0
Mesangium	0/3	0
Proximale Konvolutröhren	3/3	500
Leber		
Gallengang	3/3	500
Zentrale lobuläre Hepatozyten	1/3	4
Periportale Hepatozyten	1/3	40
Kupffer-Zellen	0/3	0
Lunge		
Alveolare Macrophagen	0/3	0
Bronchialepithel	0/2	0
Bronchialer glatter Muskel	0/2	0
Pneumozyte Typ I	3/3	354
Pneumozyte Typ II	3/3	387
Lymphknoten		
Lymphoid-Follikel-zentral	0/3	0
Lymphoid-Follikel-peripher	0/3	0
Brustdrüse		
Alveolares Epithel	3/3	500
Gang-Epithel	3/3	500
Myoepithel	0/3	0
Skelettmuskel		
Muskelfaser	0/3	0
Nerven		
Axon, myelinisiert	0/2	0
Endoneuronium	0/2	0
Neurolemma	0/2	0
Neuron	0/2	0
Perineurium	0/2	0
Eierstock		
Corpus Luteum	0/3	0

Epithel	1/1	270
Granulosa	1/3	400
Serosa	0/3	0
Theca	0/3	0
Oviduct		
Epithel	1/1	500
Glatter Muskel	0/3	0
Pankreas		
Acinuszelle	3/3	500
Gang-Epithel	3/3	500
Insel-Zelle	3/3	500
Peritoneum		
Mesothel	0/1	0
Pituitär		
Adenohypophyse	2/2	500
Neurohypophyse	0/2	0
Plazenta		
Trophoblasten	0/3	0
Prostata		
Konkretionen	0/3	0
Drüsen-Epithel	3/3	400
Glatter Muskel	0/3	0
Rektum		
Lymphknoten	0/2	0
Schleimhaut-Epithel	0/2	0
Muskuläres Äußeres	0/1	0
Muskuläre Mucosa	0/3	0
Nervenganglien	0/3	0
Speicheldrüse		
Acinares Epithel	3/3	500
Gang-Epithel	3/3	500
Haut		
Apocrine Drüsen	3/3	280
Basallage	3/3	33
Epithel	1/3	10
Follikel	1/1	190
Hornhaut	0/3	0
Rückenmark		
Myelinierte Axone	0/2	0
Microglia	0/2	0
Neurone	0/2	0
Milz		
Lymphoid-Follikel-zentral	0/3	0
Lymphoid-Follikel-peripher	0/3	0
Trabecularer glatter Muskel	0/3	0

Magen		
Kochzellen	3/3	290
Schleimhaut-Epithel	3/3	367
Muskuläre Mucosa/Äußeres	0/3	0
Parietale Zellen	3/3	290
Glatter Muskel	0/3	0
Stromagewebe		
Adipos	0/63	0
Arteriolarer glatter Muskel	0/120	0
Endothel	0/120	0
Fibröses Bindegewebe	0/120	0
Macrophagen	0/117	0
Mastzellen/Eosinophile	0/86	0
Testis		
Interstizielle Zellen	0/3	0
Sertoli-Zellen	3/3	93
Thymus		
Hassals Epithel	3/3	147
Hassals Keratin	3/3	333
Lymphoid Cortex	0/3	0
Lymphoid Medulla	3/3	167
Thyroid		
C-Zellen	0/3	0
Colloid	0/3	0
Follikuläres Epithel	3/3	500
Tonsilien		
Epithel	1/3	500
Lymphoid-Follikel-zentral	0/3	0
Lymphoid-Follikel-peripher	0/3	0
Schleimdrüse	1/1	300
Stria-Muskel	0/3	0
Nabelschnur		
Epithel	0/3	0
Harnblase		
Schleimhaut-Epithel	3/3	433
Serosa	0/1	0
Glatter Muskel	0/3	0
Uterus		
Endometrielles Epithel	3/3	500
Endometrielle Drüsen	3/3	500
Glatter Muskel	0/3	0
Vagina/Cervix		
Epitheldrüsen	1/1	500
Glatter Muskel	0/2	0
Squamöses Epithel	1/1	200

[0089] Jedoch, während der NR-LU-13-Antikörper und andere Antikörper nicht-menschlichen Ursprungs, die das NR-LU-10-Antigen binden, eine therapeutische und diagnostische Verwendung insbesondere als Targeting-Gruppen in Pretargeting-Verfahren besitzen, leiden sie an einem potentiellen Nachteil. Besonders weil sie nicht-menschliche (z. B. Maus-)Sequenzen enthalten, können sie in Menschen immunogen sein. Dies ist nachteilhaft, da diese Immunogenizität die Targeting-Effizienz nach wiederholter Verabreichung von Antikörper verringern kann.

[0090] Daher stellt die vorliegende Erfindung Targeting-Gruppen zur Verfügung, die im wesentlichen dieselbe Antigen-bindenden Eigenschaften wie NR-LU-13 aufweisen, die jedoch eine verringerte Immunogenizität aufweisen. Genauer gesagt, stellt die vorliegende Erfindung humanisierte Antikörper und Antigen-bindende humanisierte Antikörper-Fragmente zur Verfügung, die von NR-LU-13 oder anderen nicht-menschlichen Antikörpern abgeleitet sind, die spezifisch dasselbe durch NR-LU-13 erkannte Krebsantigen und weiter bevorzugt dasselbe Epitop binden. Wie hier verwendet, bedeutet ein humanisierter Antikörper oder humanisiertes Antikörper-Fragment das an das durch den Antikörper NR-LU-13 gebundene Antigen „spezifisch bindet“, daß der Antikörper oder das Antikörper-Fragment eine Bindungsaffinität von mindestens ungefähr 10^4 mol^{-1} aufweist. Bevorzugterweise ist die Bindungsaffinität mindestens ungefähr 10^6 M^{-1} und weiter bevorzugt mindestens ungefähr 10^8 M^{-1} .

[0091] Wie diskutiert, wurde in der Literatur berichtet, daß humanisierte Antikörper möglicherweise von Maus-Antikörpern abgeleitet werden können, die dieselben oder im wesentlichen einige Antigen-bindende Eigenschaften zeigen, die jedoch eine verringerte Immunogenizität zeigen.

[0092] Humanisierte Antikörper können durch eine Vielzahl von Verfahren hergestellt werden. Diese Humanisierungsverfahren schließen ein: (a) Graften von nur nicht-menschlichen CDRs auf menschliches Gerüst und konstante Regionen (z. B., Jones et al., *Nature* 321: 522–525 (1986) (herkömmliche humanisierte Antikörper) Verhoeven et al., *Science* 239: 1534–1536 (1988); und (b) Transplantieren der gesamten nicht-menschlichen variablen Domänen, jedoch Verdecken (Veneering) dieser Domänen durch Ersetzen von exponierten Resten (um die Immunogenizität zu verringern) (z. B., Padlan, *Molec. Immun.* 28: 489–498 (1991) (veneered Antikörper). Wie supra angegeben, schließen humanisierte Antikörper wie hier definiert sowohl herkömmliche "humanisierte" als auch "veeneered" Antikörper ein.

[0093] Innerhalb der vorliegenden Erfindung wurde die Auswahl getroffen, NR-LU-13 unter der Verwendung eines Humanisierungsprotokolls zu humanisieren, das eine Serie von Sequenzanalyse- und Molecular-Modeling-Schritten einschließt. Diese Protokoll ist schematisch in [Fig. 1](#) dargestellt. Im wesentlichen umfaßt es den Vergleich der Sequenzen der Maus schweren und leichten variablen Kette mit einer Datenbank von Sequenzen der menschlichen schweren und leichten variablen Region; Auswahl der am meisten ähnlichen menschlichen Gerüstsequenzen; Ersetzen von ausgewählten Gerüstresten, basierend auf der Sequenzähnlichkeit; Erzeugung von molekularen Modellen, die den parenteralen Maus- und putativen humanisierten Sequenzen entsprechen; Rückmutieren, um die Reste zu modifizieren von denen angenommen wird, daß sie die Konformation von Komplementarität bestimmenden Regionen (CDRs) stören, durch Vergleich mit dem molekularen Modell, das der parenteralen Aussequenz entspricht; Konstruieren eines molekularen Modells, basierend auf der modifizierten Sequenz und Vergleich dieses Modells mit der parenteralen Maussequenz. Diese Analyse wird fortgeführt, bis die Konformation der CDRs in den humanisierten Modell eng mit der CDR-Konformation in dem parenteralen Mausmodell übereinstimmt. Dieses Protokoll kann auch dazu verwendet werden, um andere nicht-menschliche (z. B. Maus) Antikörper zu humanisieren, die für das durch NR-LU-13 gebundene Antigen spezifisch sind und weiter bevorzugt Antikörper, die dasselbe Epitop wie NR-LU-13 binden.

[0094] Wie genauer zur Humanisierung von NR-LU-13 ausgeführt wird, wurden DNA-Fragmente, die für den NR-LU-13 Antikörper kodieren kloniert und diese DNA-Fragmente wurden durch bekannte Verfahren sequenziert, wobei die gesamten variablen schweren und leichten Domänen eingeschlossen wurden, die die Komplementarität bestimmenden Regionen (CDRs) und die Gerüstregionen (FRs) einschließen. Die Aminosäuresequenzen, die die Maus variablen schweren und leichten Sequenzen kodieren, wurden mit einer Datenbank von menschlichen Sequenzpaaren (Immunglobulin leichten und schweren Ketten, die von demselben Klon abstammten) verglichen. Die DNA-Sequenzen und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der klonierten schweren und leichten Kette variablen Regionen von NR-LU-13 ist in [Fig. 2](#) dargestellt. Die für einen solchen Vergleich verwendeten Immunglobulin-Sequenzdaten wurden von Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," U. S. Dept. Health and Human Services, Fifth Ed. 1991, erhalten. Die strukturellen Daten wurden von Bernstein et al., "The Protein databank: A computer based archival file for macromolecular structures, J. Mol.

Biol. 112: 535–542 (1977), erhalten.

[0095] Nach dem Sequenzvergleich wurde die am meisten identische menschliche Antikörpersequenz ausgewählt, um das Ausgangsgerüst für den "grafted" Antikörper zur Verfügung zu stellen. Als das am meisten identische Sequenzpaar wurde dasjenige des Klons R3.5H5G'CL (Manheimer-Lory et al., J. Exp. Med., 174 (Dez. 1991) 1639–1642) gefunden. Die Sequenz der Ausgangs-Maus-CDRs abgeleitet von NR-LU-13 wurden dann in die ausgewählte menschliche Gerüststruktur transferiert. Dieses Verfahren führte zu einer anfänglichen putativ humanisierten Fv-Sequenz. Die anfängliche putativ humanisierte Sequenz wurde einer Serie von Mutationen unterzogen, wie vorher beschrieben.

[0096] Die anfängliche putativ humanisierte Sequenz wurde dann durch Testen der Sequenz in dreidimensionalen Modellen "verfeinert". Ein molekulares Modell wurde von der Ausgangs-Maussequenz und der anfänglichen humanisierten Sequenz erstellt. Äquivalente Restpositionen in Mausmodell und dem humanisierten Modell wurden verglichen. Die Reste in dem humanisierten Modell, von denen vorhergesagt wurde, daß sie die Struktur der CDRs stören würden, wurden "zurückmutiert". Ein molekulares Modell wurde dann von der modifizierten putativ humanisierten Sequenz erstellt und nochmals mit dem Maus molkularen Modell verglichen. Dieser Zyklus von putativ humanisierter Sequenz molekularem Modeling und "Rückmutation", gefolgt durch Vergleich des sich ergebenden modifizierten humanisierten Sequenzmodells mit dem Mausmodell wird wiederholt, bis die Konformation der CDRs in dem humanisierten Modell eng mit der CDR-Konformation des Mausmodells übereinstimmten. Das Humanisierungsprotokoll ist schematisch in [Fig. 1](#) dargestellt.

[0097] Unter der Verwendung dieser Methodologie mit variablen schweren und leichten Sequenzen, abgeleitet von NR-LU-13 (bezeichnet als NRX451-leichte und NRX451-schwere Sequenzen), wurden humanisierte NRX451 schwere und leichte Sequenzen erhalten. Diese humanisierten leichten und schweren Sequenzen sind jeweils in [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) angegeben. In beiden dieser Figuren sind die variablen schweren oder leichten Gerüstreste, die sich von den parenteralen NRX451 schweren und leichten Sequenzresten unterscheiden, in fetten Buchstaben angegeben.

[0098] Es kann nach einer Betrachtung der [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) gesehen werden, daß die humanisierten variablen schweren und leichten Sequenzen (bezeichnet als NRX451-schwere und NRX451-leichte Sequenzen) sich von den parenteralen Mausantikörper variablen Sequenzen hauptsächlich an der Basis der Fv-Domäne in Richtung des C-Teils des Fab-Fragmentes unterscheiden. Die Numerierung der jeweiligen NRX451-Maus und humanisierten Sequenzen entspricht der UDB-Numerierung. Von diesen humanisierten variablen schweren und leichten Sequenzen wird vorgesehen, daß sie zu humanisierten Antikörpern führen, die weniger Immuno-Genitität aufweisen, als NR-LU-13.

[0099] Während es vorgesehen ist, daß die NRX451-Sequenzen (unter Berücksichtigung ihrer Sequenzähnlichkeit zu menschlichen Immunglobulinen), die in [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) dargestellt sind, zu Antikörpern führen, die eine verringerte Immungenitität in Menschen (verglichen zu Maus-NR-LU-10 oder chimärem NR-LU-13) hervorrufen und darüber hinaus eine verbesserte Serumhalbwertszeit zeigen können, liegen andere Modifikationen der oben angegebenen NRX451-Sequenzen innerhalb des Bereichs der vorliegenden Erfindung. Zum Beispiel können diese humanisierten Sequenzen weiter durch Deletions-, Additions- oder Substitutionsmutation verändert werden. Insbesondere können sie durch die Substitution von einen oder mehreren exponierten Gerüstresten gemäß des Verfahrens von Padlan, Molec. Immunol. 28: 489–498 (1991), auf das hier Bezug genommen wird, modifiziert werden. Zum Beispiel ist ein für die Substitution vorgesehener besonderer Aminosäurerest das Cystein an Position 60 der schweren Kette durch eine andere Aminosäure, zum Beispiel Serin.

[0100] Insbesondere umfaßt die Erfindung Substitutionsmodifikationen, die die Antigenbindung nicht wesentlich negativ beeinträchtigen. Zum Beispiel schließt dies konservative Aminosäuresubstitutionen ein, z. B. die Substitution einer sauren Aminosäure durch eine andere saure Aminosäure. Konservative Aminosäure-Substitutionsmutationen sind im Stand der Technik gut bekannt.

[0101] Darüber hinaus umfaßt die Erfindung spezifisch NRX451-schwere und NRX451-leichte Sequenzen und Fragmente davon, die in pNRX451 enthalten sind, das ein Plasmid ist. Ein Plasmid von NRX451 (pNRX451) ist ein Säugerexpressionsvektor, abgeleitet von pcDNA3 (Invitrogen), der eine cDNA enthält, die für humanisierte schwere und leichte Ketten kodiert.

[0102] Auch können diese durch die Deletion von einer oder mehreren Aminosäureresten verkürzt werden, um funktionelle (Antigen-bindende) humanisierten Sequenzen herzustellen. Zum Beispiel wurde während der Expression der betreffenden humanisierten Antikörper in CHO- und Insektenzellen beobachtet, daß Fragmen-

te (die offensichtlich aufgrund eines zellulären Spaltmechanismus oder des Aufreinigungsverfahrens hergestellt wurden), denen Reste der betroffenen humanisierten NRX451-Sequenzen fehlen, funktionell sind, d. h. sie binden immer noch das NR-LU-13-Antigen. Insbesondere wird beobachtet, daß humanisierte Fv-Sequenzen, die die oben genannten humanisierten Sequenzen enthalten, denen jedoch die ersten sieben N-terminalen Reste NRX451 humanisierter schwere Kettensequenz fehlen, funktionell sind. Basierend auf diesen Ergebnissen wird erwartet, daß andere Deletionen, z. B. andere N-terminale und C-terminale Deletionen der betroffenen humanisierten NRX451 auch funktionell sein sollten (Antigen binden). Funktionelle Deletionen können durch die aufeinander folgende Expression von verschiedenen Deletionen und Screenen der sich ergebenden Deletion, um deren Fähigkeit zu bestimmen, das NR-LU-13-Antigen zu binden, identifiziert werden. Wie unten beschrieben, können mutierte Antikörpersequenzen in jeder einer Vielzahl von Wirtssystemen exprimiert werden, z. B. Säugerzellen (wie zum Beispiel CHO-Zellen, Insekten, Pflanzenzellen, transgenen Pflanzen und transgenen Tieren). Wie oben angegeben, betrifft die vorliegende Erfindung weiterhin die Modifikation von Antikörpern (insbesondere der IgG-Klasse), um die N-verbundene Glycosylierung zu eliminieren (d. h. prä-Expressionsmodifikation von Antikörpern, um die N-verbundene Glycosylierung zu verhindern) oder die N-verbundene Glycosylierung zu modifizieren (d. h. post-Expressionsmodifikation von N-verbundener Glycosylierung von Antikörpern). Wie hier beschrieben, weist die Eliminierung oder Modifikation von N-verbundene Glycosylierung die vorteilhafte Eigenschaft der Verringerung der Immunogenität und/oder Toxizität auf. Antikörper sind Glycoproteine, die an charakteristischen Stellen in Abhängigkeit von ihrem Isotyp glycosyliert werden. Zum Beispiel werden die IgGs als ein biantennärer Komplex an dem Asn-Xaa-Ser(Thr)-Motiv in jeder der C_H2-Domänen (wobei in diesem Motiv Xaa jede Aminosäure ist und Ser und Thr austauschbar sind) N-verbunden glycosyliert. Die Glycosylierung tritt als ein posttranskriptionales Ereignis auf, wenn Oligosaccharide, die in ihrer Größe von 8 bis 90 Sacchariden reichen, an das Motiv am Asn-Rest (297) N-verbunden werden.

[0103] Die Effekte der Glycosylierung auf die Tertiärstruktur von Antikörpern und insbesondere der Fe-Region davon ist als strukturell signifikant bekannt. Zum Beispiel wurde eine solche Signifikanz durch NMR-Untersuchungen aufgezeigt (siehe, R. A. Dwek et al. J. Anat. 187: 279–292 (1995), "Glycobiology: The function of sugar in the IgG molecule"). Darüberhinaus ist die Glycosylierung signifikant, da die Clq-Bindung und die Antikörperbindung an Monocyten in glycosylierten monoklonalen Antikörpern signifikant verringert ist.

[0104] Auch wurde von der Modifikation von Glycosylierungsmustern in IgG berichtet, daß diese mit vielen Erkrankungen assoziiert sind, einschließlich rheumatoider Arthritis, Alterung und Schwangerschaft (siehe, Dwek et al., Ibid). Konsequenterweise führte die Glycosylierung bei der kommerziellen Herstellung von monoklonalen Antikörpern kürzlich zu Bedenken. Genauer gesagt, führten ungeeignete Glycosylierungsmuster zu Bedenken, da sich die monoklonale Antikörperproduktion auf den Einschluß von neuen Organismen ausdehnte, von denen viele Proteine im Vergleich zu menschlichen Zellen unterschiedlich glycosylieren. Früher wurden monoklonale Antikörper nur in Säugerzellen exprimiert. Jedoch können aufgrund der Entwicklung von neuen und verbesserten Vektorsystemen, Proteinreinigung und Kulturverfahren Antikörper, z. B. Maus, chimäre und humanisierte Antikörper in vielen Wirten und Wirtszellsystemen exprimiert werden, z. B. Säugetier-, Hefe-, Insekten- und Pflanzenzellen. Während dies signifikante Vorteile bietet, z. B. stellen Insekten typischerweise eine hohe Expression von rekombinanten Proteinen zur Verfügung, besteht mindestens ein potentielles Problem bei der Expression von Proteinen in verschiedenen Wirten. Genauer gesagt, während die Genauigkeit der Proteinexpression in verschiedenen Wirten gut kontrolliert wird, ist die posttranskriptionale Modifikation eine inhärente Eigenschaft der einschlägigen Zelllinie. Im allgemeinen glycosylieren Wirtszellen Proteine auf eine charakteristische Weise, d. h. einem Glycosylierungsmuster.

[0105] Von dem posttranskriptionalen Verfahren der Glycosylierung in neuen Expressionssystemen wurde geglaubt, daß sie besonders problematisch sind, da sie die Bioverteilung des sich ergebenden Glycoproteins aufgrund von veränderter Kohlenhydraterkennung beeinträchtigen könnten. In dieser Hinsicht ist weit akzeptiert, daß Oligosaccharide als Erkennungselemente fungieren. Zum Beispiel weisen viele tierische Proteine, die aus Zellen und Geweben isoliert wurden, Sequenzmotive auf, die Kohlenhydratdomänen erkennen. Daher würde von der Modifikation von Glycosylierungsstellen erwartet, daß sie die Bioverteilung eines Proteins verändern.

[0106] Darüber hinaus, weil die Oligosaccharide die Antikörperstruktur verändern, kann von der Modifikation von Glycosylierungsstellen möglicherweise erwartet werden, daß sie potentiell die Struktur und die Bindungskonformation des Antikörpermoleküls negativ beeinträchtigen.

[0107] Jedoch, wie in der Beschreibung der vorliegenden Erfindung gezeigt, wurde es entdeckt, daß die Be seitigung oder Modifikation der Kohlenhydratgruppen von Antikörpern (insbesondere humanisierten Antikörpern gegen das NR-LU-13-Antigen) eher vorteilhafte als nachteilhafte Effekte aufwies.

[0108] Um die Immunogenität oder Toxizität von IgG-Klasse Antikörpern zu verringern oder zu beseitigen, stellt die vorliegende Erfindung eine prä-Expressions- oder post-Expressionsmodifikation von Antikörpern zur Verfügung, um eine N-verbundene Glycosylierung zu verhindern oder zu modifizieren. Die Beseitigung von potentiellen Glycosylierungsstellen in monoklonalen Antikörpern, z. B. chimären und humanisierten Antikörpern und Fragmenten davon, kann durch Orts-spezifische Mutagenese erreicht werden. Genauer gesagt, schließt die vorliegende Erfindung eine Orts-spezifische Mutagenisierung von DNA-Sequenzen ein, die für Antikörper oder Antikörperfragmente kodieren, bevorzugterweise humanisierte Antikörper oder humanisierte variable Sequenzen, die Substitutionsmutationen in oder nahe einer oder mehrere Glycosylierungsstellen einführt.

[0109] Dies wird durch Orts-spezifische Mutagenese eines Kodons in einer DNA erreicht, die für eine Immunglobulinsequenz kodiert, die einem Aminosäurerest entspricht, der innerhalb einer Glycosylierungsstelle enthalten ist oder der ausreichend nahe dazu ist, so daß die Modifikation einer solchen Aminosäure zur Beseitigung der Glycosylierung an der Glycosylierungsstelle führt. Im allgemeinen wird dies eine Orts-spezifische Mutagenese der Asn-Xaa-Ser(Thr)-Glycosylierungsmotive einschließen, die im Immunglobulin vorhanden sind. Zum Beispiel ist von solchen Asn-Xaa-Ser(Thr)-Motiven bekannt, daß sie in der C_H2-Domäne von IgGs an konservierten Stellen in dem Antikörpermolekül vorhanden sind.

[0110] Die Beseitigung der Glycosylierung an solchen Stellen/solcher Stelle wird durch Orts-spezifische Mutagenese einer Glycosylierungsstelle erreicht, die in einer Antikörpersequenz enthalten ist, um eine oder mehrere der Aminosäuren, die darin enthalten sind, zu verändern (zu substituieren oder zu deletieren) und dadurch die Glycosylierung an solcher Stelle zu verhindern. Verfahren zur Einführung von Orts-spezifischen Mutationen in DNA-Sequenzen an einer gewünschten Stelle sind im Stand der Technik gut bekannt.

[0111] Im allgemeinen wird daher das Verfahren das Klonieren einer DNA-Sequenz, die für einen gewünschten Antikörper kodiert, umfassen, Identifizieren der darin enthaltenen Glycosylierungsmotive und Modifizieren eines oder mehrerer Kodons in den Glycosylierungsmotiven um so eine Aminosäuresubstitutionsmutation einzuführen, so daß nach der Expression einer solchen DNA in einer ausgewählten Wirtszelle der erhaltene Antikörper nicht an der Stelle glycosyliert ist.

[0112] Wie angegeben, sind Verfahren zur Orts-spezifischen Mutagenese im Stand der Technik gut bekannt. Bei der Orts-gerichteten Mutagenese wird die Substitution durch die chemische Synthese eines Oligonukleotids, das den gewünschten Basenaustausch enthält, hybridisieren des Oligonukleotids an die DNA, die für die zu ändernde Sequenz kodiert und Verlängern des falsch gepaarten Primers mit einer DNA-Polymerase um die neue Gensequenz zu erzeugen, erreicht. Das mutierte Gen kann anschließend in einen geeigneten Wirtsorganismus oder Expressionssystem eingeführt werden, um die Mutanten-DNA oder -RNA zu ergeben oder das veränderte Proteinprodukt herzustellen. Typischerweise wird eine solche Modifikation den Asparaginrest in einem Glycosylierungsmotiv durch eine andere Aminosäure substituieren.

[0113] Alternativ kann ein Glycosylierungsmotiv durch Deletion des DNA-Kodons für entweder Asparagin oder Serin/Threonin in der Sequenz Asn-Xaa-Ser/Thr verändert werden, was ein Auftreten der Glycosylierung an dieser Stelle verhindern würde. Zum Beispiel können DNA-Sequenzen zwischen zwei einmalig auftretenden Restriktionsstellen, die die Glycosylierungsstelle flankieren, ohne das Asparaginkodon chemisch synthetisiert werden. Die Ausgangs-Wildtyp-DNA-Sequenz kann dann durch die veränderte Sequenz in dem Plasmidkonstrukt unter der Verwendung der zwei Restriktionsstellen ersetzt werden.

[0114] Zum Beispiel umfaßt ein Mittel die Synthese von zwei verschiedenen Oligonukleotiden, die die Zielsequenz überlappen, die modifiziert werden soll, d. h. den Teil der DNA, der für das Asn-Xaa-Ser(Thr)-Motiv kodiert, von denen eine die Mutation enthält, die eingeführt werden soll; Durchführen von zwei getrennten Polymerase-Kettenreaktionen, wobei in der ersten Reaktion das Mutanten-Oligonukleotid amplifiziert wird; und Durchführen einer zweiten Polymerase-Kettenreaktion, wobei eine PCR "Nähreaktion" durchgeführt wird. Dies führt im wesentlichen zur Kombination des mutierten Oligonukleotids mit dem zweiten Oligonukleotidprimer, um eine einzige Mutanten cDNA zu erzeugen, die die gewünschte Mutation enthält. Die amplifizierte cDNA, die die Mutation enthält, wird dann in die geeignete Insertionsstelle in einen Vektor eingeführt, der die Ausgangs-(nicht-mutierte)-Antikörper-DNA-Sequenz enthält. Die erhaltenen Klone werden dann sequenziert, um sicherzustellen, daß die Mutation an der geeigneten Stelle eingeführt wurde.

[0115] Mutationen von Glycosylierungsstellen können in jede klonierte Antikörpersequenz, z. B. Maus-Antikörpersequenzen, chimäre Antikörpersequenzen und humanisierte Antikörpersequenzen eingeführt werden. Die erhaltenen mutierten Antikörper-DNA-Sequenzen werden dann in einem gewünschten Expressionssystem exprimiert, um Antikörper zu erhalten, die eine verringerte oder keine Glycosylierung aufweisen.

[0116] Alternativ kann die N-verbundene Glycosylierung (gegebenenfalls die O-verbundene Glycosylierung) eines IgG-Antikörpers post-Expression modifiziert werden. Es liegt weiter innerhalb des Bereichs der vorliegenden Erfindung, einen Antikörper (oder Fragment) sowohl prä-Expression und post-Expression zu modifizieren. Die Modifikation post-Expression bedeutet ein Beseitigen oder Modifizieren (z. B. ein Verringern) der N-verbundenen Glycosylierung post-Expression. Post-Expressionsmodifikationen schließen ein: die Expression von Antikörpersequenzen in Wirtssystemen (Expressionssystem) die einen Antikörper oder ein Antikörperfragment nicht N-verbunden Glycosylieren; chemische Modifikation und enzymatische Modifikation. Wirtssysteme werden genauer unten diskutiert. Die Glycosylierungsstellen auf einem Antikörper können enzymatisch entfernt werden. Es gibt eine Zahl von Glycosidasen, die in der Lage sind, die Kohlenhydrate auf Proteinmolekülen abzuspalten. Beispiele von solchen N-Glycosidasen, die herkömmlich für die Deglycosylierung von N-verbundenen Kohlenhydraten verwendet werden, schließen ein: N-Glycosidase H, die Hoch-Mannosetyl- und Hybridoligosaccharidketten spaltet; Endoglycosidase F, die biantennäre Komplextyp-Oligosaccharide spaltet und Peptid N-Glycosidase F, die tri- und tetraantennäre Komplextypketten sowie andere spaltet, die durch die oben beschriebenen N-Glycosidasen gespalten werden. O-verbundene Kohlenwasserstoffe können auch enzymatisch unter der Verwendung von O-Glycanase und ähnlichen entfernt werden. Glycosidasen sind käuflich erhältlich (z. B. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Diese Enzyme und andere, die dem Fachmann im Stand der Technik bekannt sind, sind in der Lage, einige der angegebenen Kohlenhydrate unter der Verwendung von milden Reaktionsbedingungen zwischen pH 4,0 und 9,0 zu entfernen. Zum Beispiel ist PNGase F am meisten aktiv bei pH 8,0, wird jedoch geeignet bei \pm einem pH-Wert funktionieren.

[0117] Die chemische Modifikationsmethodologie der vorliegenden Erfindung zur Modifizierung von Antikörpern um so die Immunogenität und/oder Toxizität zu verringern, ist eine Oxidation, die gegebenenfalls von einem Reduktionsschritt gefolgt werden kann. Die Oxidation von Kohlenhydraten auf dem Antikörper erzeugt Aldehydgruppen, die zu ihren entsprechenden Alkoholen reduziert werden können. Das Verfahren schließt die Verwendung eines mild oxidierenden Mittels, wie zum Beispiel Natriummetaperjodat, gefolgt von Reduktion mit einem mild reduzierenden Mittel, wie zum Beispiel Natriumborhydrid ein. In dem Oxidationsverfahren können Thioether oder Thioether-enthaltende Verbindungen, wie zum Beispiel Methionin gegebenenfalls zu dem Reaktionsgemisch hinzugefügt werden, um Oxidations-sensitive Aminosäuren in der Komplement-bestimmenden Region des Antikörpers zu schützen. Andere wasserlösliche Thioester könnten auch für denselben Zweck verwendet werden. Es wird für einen Fachmann im Stand der Technik ersichtlich sein, daß die Verwendung solch einer Verbindung für den bestimmten Antikörper, der oxidiert wird, optimiert werden kann. Auch kann die Molarität der Oxidations- und Reduktionsmittel sowie andere Reaktionsparameter, die in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden, für jeden Antikörper optimiert werden.

[0118] Andere Verfahren können bei der Handhabung (z. B. Stabilisierung) der reaktiven Aldehyde, die durch oxidierende Mittel erzeugt werden, verwendet werden. Zum Beispiel, wenn der Reduktionsschritt nach der Oxidation ausgelassen wird, könnten Aldehyde zu den entsprechenden Carbonsäuren oxidiert werden. Diese Überführung ist eine einfache Reaktion und kann in dieser Verwendung einer Vielzahl von milden Oxidationsmitteln, zum Beispiel Sauerstoff, Wasserstoffperoxid, N-Bromsuccinimid, Silberoxid, Natriumpermanganat und ähnlichen erreicht werden. Eine noch andere Methodologie schließt die Schätzung von Aldehyden ein, um sie inaktiv gegenüber allen anderen Funktionalitäten zu machen, die innerhalb des Antikörpers vorhanden sind. Schützende Mittel schließen Hydroxylamine, wie zum Beispiel Carbomethoxyamin oder Hydraziderivate wie zum Beispiel Essighydrazid und Methylhydrazino-Carboxylat ein. Die Reaktion von jeder dieser zwei Klassen von schützenden Mitteln führt zur Bildung von stabilen Addukten. Ein anderes Verfahren schließt die Überführung des Aldehyds zu einem stabilen Amin durch reduktive Alkylierung mit einem primären Amin (z. B. Glyzin) und Natriumcyanoborhydrid ein. Alle der oben angegebenen Mittel sind käuflich erhältlich (z. B. Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI und Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), und Verfahren zu deren Verwendung sind dem Fachmann bekannt.

[0119] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung inaktivierte die Oxidation der Kohlenhydrate auf NRX451 unter der Verwendung von Natriummetaperjodat (NaJO_4), gefolgt von der Reduktion mit Natriumborhydrid (NaBH_4) erfolgreich die Komplementvermittelte Cytotoxizitäts-(C'MC)-Aktivität des Antikörpers, ohne eine Beeinträchtigung der Antikörper-abhängigen zellulären Cytotoxizitäts-(ADCC)-Aktivität. Zum Beispiel wird N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNac) zwischen Kohlenstoffen 3 und 4 zu entsprechenden Aldehydgruppen oxidiert. In dieser Ausführungsform wurde Methionin zu dem Reaktionsgemisch hinzugefügt, um Oxidations-empfindliche Aminosäuren in der Komplement-bestimmenden Region des Antikörpers zu schützen. Es wurde früher in der Literatur berichtet (Awwad et al., Cancer Immunol. Immunother. 38: 23–30 (1994)), daß die Oxidation mit NaJO_4 nicht die C'MC-Aktivität eines monoklonalen Antikörpers verändert. Jedoch wurde überraschenderweise und vorteilhafterweise wie hier beschrieben entdeckt, daß das Oxidations-/Reduktionsverfahren der vorliegenden Erfindung die C'MC-Aktivität verändert, ohne die ADCC-Aktivität zu beeinträchtigen. Das Ausmaß

der Kohlenhydratmodifikation wurde durch Lectin-Eindungs-ELISA verfolgt. Die C'MC- und ADCC-Aktivität wurde unter der Verwendung von in vitro ^{51}Cr -Freisetzung-Cytotoxizitätstests gemessen, die gut im Stand der Technik bekannt sind.

[0120] Der in CHO-Zellen produzierte Antikörper NRX451 zeigte eine Toxizität, wenn an menschliche Patienten in einem Phase I klinischen Versuch verabreicht. Es wurde in in vitro-Analysen bestimmt, daß der bestimmte Antikörper ADCC und C'MC-Aktivität aufwies. Auch war dieser monoklonale Antikörper mit Antigenen, die im Darm von Menschen lokalisiert sind kreuzreaktiv, was der Grund der Toxizität sein kann, zusätzlich zur Reaktivität an Tumorstellen. Daher beschreibt die vorliegende Erfindung die chemische Modifikation der Kohlenhydrate, die eine C'MC-Aktivität und die in Patienten gezeigte Toxizität entfernt. Die Ergebnisse von klinischen Untersuchungen, aus der Verwendung des chemisch modifizierten NRX451 führte zu keinen toxischen Effekten in Patienten. Daten von sieben Patienten, die mit dem oxidierten/reduzierten humanisierten Antikörper NRX451 untersucht wurden, zeigen, daß der Antikörper sicher verabreicht werden kann.

[0121] Unter der Verwendung der oben beschriebenen Methodologie oder anderen Humanisierungsverfahren, die hier angegeben sind, können humanisierte Sequenzen von anderen Antikörpern abgeleitet werden, die gegen das Krebsantigen hergestellt wurden, das durch NR-LU-13 gebunden wird. Solche Antikörper werden in dem hier erwähnten U.S. Patent Nr. 5,084,396 beispielhaft dargestellt. Diese Antikörper schließen NR-LU-01, NR-LU-02, NR-LU-03 und NR-LU-06 und Fragmente davon ein.

[0122] Nachdem die humanisierten variablen Sequenzen identifiziert sind, werden die entsprechenden DNA-Sequenzen synthetisiert und zur Herstellung von humanisierten Antikörpern verwendet. Wie supra diskutiert, werden diese humanisierten Antikörper bevorzugterweise eine Antigen-bindende Affinität für das durch NR-LU-13 gebundene Antigen aufweisen. Im allgemeinen wird die Bindungsaffinität von mindestens ungefähr 10^4 M^{-1} sein; bevorzugterweise mindestens ungefähr 10^6 M^{-1} und weiter bevorzugt mindestens ungefähr 10^8 M^{-1} . Tests zur Bestimmung der Affinität von Antikörpern für ein Antigen sind im Stand der Technik gut bekannt und schließen beispielhaft halb-optimale Bindungstests, Kompetitionstests und Scatchard-Analysen ein.

[0123] Die humanisierten Antikörper werden durch die Expression der humanisierten variablen schweren und leichten Ketten in einem geeigneten Wirtssystem erhalten. Im wesentlichen, wie hier verwendet, betrifft ein geeignetes "Wirtssystem" jedes Expressionssystem, einschließlich Wirtszellgewebe oder multizellulären Organismus und Vektor oder Vektoren, die Nukleinsäuresequenzen enthalten, die für die vorliegenden humanisierten Antikörper oder Fragmente kodieren, die in Kombination eine Expression von funktionellen Antikörpern zur Verfügung stellen, d. h. die die humanisierten schweren und leichten Ketten assoziiert, um die charakteristische Antigen-bindende Struktur herzustellen.

[0124] Die folgenden Referenzen sind für Verfahren und Wirtssysteme beispielhaft, die für die Expression von rekombinanten Immunoglobulinen geeignet sind: Weidle et al., Gene 51: 21–29 (1987); Dorai et al., J. Immunol. 13(12): 4232–4241 (1987); De Waele et al., Eur. J. Biochem. 176: 287–295 (1988); Colcher et al., Cancer Res. 49: 1738–1745 (1989); Wood et al., J. Immunol. 145(a): 3011–3016 (1990); Bulens et al., Eur. J. Biochem. 195: 235–242 (1991); Begginton et al., Biol. Technology 10: 169 (1992); King et al., Biochem. J. 281: 317–323 (1992); Page et al., Biol. Technology 9: 64 (1991); King et al., Biochem. J. 290: 723–729 (1993); Chaudary et al., Nature 339: 394–397 (1989); Jones et al., Nature 321: 522–525 (1986); Morrison and Oi, Adv. Immunol. 44: 65–92 (1988); Benhar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12051–12055 (1994); Singer et al., J. Immunol. 150: 2844–2857 (1993); Cooto et al., Hybridoma 13(3): 215–219 (1994); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029–10033 (1989); Caron et al., Cancer Res. 32: 6761–6767 (1992); Cotoma et al., J. Immunol. Meth. 152: 89–109 (1992).

[0125] Expressionswirtssysteme, einschließlich Vektoren, Wirtszellen, Geweben und Organismen, die in der Lage sind, funktionelle rekombinante Antikörper herzustellen, und insbesondere humanisierte und chimäre Antikörper, sind im Stand der Technik gut bekannt. Darüber hinaus sind die für die Expression von rekombinanten Antikörpern geeignete Wirtssysteme käuflich erhältlich.

[0126] Wirtszellen, von denen bekannt ist, das sie in der Lage sind Immunglobuline oder Antikörperfragmente zu exprimieren, schließen beispielhaft Säugerzellen, wie zum Beispiel Chinese Hamster Ovary(CHO)-Zellen, COS-Zellen, Myelomzellen; Bakterien, wie zum Beispiel Escherichia coli; Hefezellen wie zum Beispiel Saccharomyces cerevisiae; Insektenzellen, wie zum Beispiel Spodoptera frugiperda neben anderen Wirtszellen ein. CHO-Zellen werden von vielen Forschern aufgrund ihrer Fähigkeit verwendet, Immunglobuline effektiv zu exprimieren und zu sekretieren. Auch sind Insektenzellen wünschenswert, da sie zu einer hohen Expression von rekombinanten Proteinen in der Lage sind.

[0127] Die Expression in Insektenzellen oder Insekten wird bevorzugterweise unter der Verwendung eines rekombinanten Baculovirusvektors bewirkt, der in der Lage ist, heterologe Proteine (hier humanisierte Immunoglobulinsequenzen) unter der transkriptionellen Kontrolle eines Baculovirus Polyhydron-Promotors zu exprimieren. (z. B. U.S. Patent Nr. 4,745,051, das ein Baculovirus/Insektenzell-Expressionssystem betrifft). Polyhydron ist ein hoch-exprimiertes Protein, weshalb sein Promotor eine effiziente heterologe Proteinproduktion zur Verfügung stellt. Der bevorzugte Baculovirus ist *Autographa californica* (ACMNPV). Geeignete Baculovirusvektoren sind von Invitrogen käuflich erhältlich.

[0128] Im wesentlichen werden diese Vektoren modifiziert, z. B. durch homologe Rekombination, um rekombinanten Baculovirus herzustellen, der humanisierte NR-LU-13 variable schwere und leichte Sequenzen enthält, die operativ mit dem Polyhydronpromotor verbunden sind. Insekten oder Insektenzellen werden dann mit dem rekombinanten Baculovirus infiziert. Bevorzugterweise wird der Baculovirus in die Zellen der Wand des Insektdarms eindringen, zum Kern dieser Zellen wandern und sich replizieren, was zu Ausschlußkörperchen führt, die sich in infizierten Zellen und Geweben ansammeln, die letztendlich das Insekt lysieren. Die exprimierten humanisierten Antikörper werden dann von dem Insekt oder den Insektenresten erhalten.

[0129] Auch können die betreffenden humanisierten Antikörper in transgenen Pflanzen oder Tieren exprimiert werden. Die betreffenden humanisierten Antikörpersequenzen können operativ mit einem Promotor verbunden werden, der spezifisch in Säugergewebe aktiviert wird, wie zum Beispiel einem Milch-spezifischen Promotor. Solche Verfahren sind in U.S. Patent Nr. 4,873,316 und U.S. Patent Nr. 5,304,498 beschrieben.

[0130] Typischerweise werden solche Verfahren einen Vektor verwenden, der ein Signalpeptid enthält, das die Sekretion einer operativ verbundenen Polypeptidsequenz ermöglicht, einen Milch-spezifischen Promotor, wie zum Beispiel den Caseinpromotor, eine Enhancer-Sequenz und humanisierte Immunoglobulinsequenzen spezifisch für das NR-LU-10-Antigen, z. B. humanisierte Sequenzen, abgeleitet von NR-LU-13.

[0131] Dieser Vektor wird in einen geeigneten Wirt eingeführt, z. B. Rinder-, Schaf-, Schwein-, Kaninchen-, Ratte-, Frosch- oder Mausembryo, typischerweise durch Mikroinjektion unter Bedingungen, bei denen der Expressionsvektor in das Genom des bestimmten Embryos integriert. Der erhaltene transgene Embryo wird dann in eine Leihmutter transferiert und die Nachkommen werden gescreent, um diejenigen Transgene zu identifizieren, die die humanisierten Antikörper in ihrer Milch enthalten und exprimieren. Transgene, die die Antikörpersequenzen enthalten und/oder exprimieren, können z. B. durch Southern Blot- oder Western Blot-Analyse identifiziert werden. Die von solchen transgenen Tieren produzierte Milch wird dann gesammelt und daraus humanisierte Antikörper isoliert. Wie angegeben, sind solche Verfahren genau in U.S. Patent Nrn. 4,873,316 und 5,304,498 beschrieben.

[0132] Die entsprechenden humanisierten Antikörpersequenzen können auch in Pflanzen exprimiert werden, z. B. transgenen Pflanzen, Pflanzengeweben, Pflanzensamen und Pflanzenzellen. Solche Verfahren sind zum Beispiel in U.S. Patent Nr. 5,202,422 beschrieben.

[0133] Für die Transformation von Pflanzen, Pflanzengeweben und Pflanzenzellen geeignete Expressionsvektoren sind im Stand der Technik bekannt. Im allgemeinen schließen solche Vektoren die DNA von Interesse (hier humanisierte Antikörpersequenzen), einen geeigneten Promotor (typischerweise Pflanzen-, bakterieller oder viral Promotor) und einen Pflanzen- oder Pflanzenzellen-funktionellen selektierbaren Marker ein. Verfahren zur Einführung von gewünschten DNAs in Pflanzen und Pflanzenzellen schließen beispielhaft Agrobakteriumvermittelte Transformation, Protoplastentransformation, Gentransfer in Pollen, Injektion in reproduktive Organe und die Injektion in unreife Embryos ein.

[0134] Die transformierten Embryos oder Pflanzen werden dann dazu verwendet, um Nachkommen durch herkömmliche Verfahren, z. B. Kreuzung, Rückkreuzung, usw. herzustellen. Nachkommen, die den humanisierten Antikörper exprimieren, werden dann z. B. durch Western Blotting, Zellbindungstests usw. identifiziert. Diese Nachkommen werden dann kultiviert und geerntet und zur Ausbeute von Antikörpern verwendet. Solche Verfahren sind genau in U.S. Patent Nr. 5,202,422 und U.S. Patent Nr. 5,004,863 beschrieben. Für die Expression von heterologen Proteinen geeignete Pflanzen sind gut bekannt und schließen beispielhaft Tomaten-, Tabak-, Mais-, Sojabohnen- und Baumwollpflanzen ein. Zum Beispiel werden die betreffenden humanisierten Antikörper, die gegebenenfalls weiter mutiert werden um Glycosylierungsstellen zu entfernen, in Pflanzenzellen exprimiert, die Antikörper und Antikörperfragmente nicht N-verbunden Glycosylieren und/oder O-verbunden Glycosylieren.

[0135] Die rekombinante Expression von funktionellen humanisierten Antikörpern kann durch eines von zwei

allgemeinen Verfahren bewirkt werden. Im ersten Verfahren werden der Wirt oder die Wirtszellen mit einem einzelnen Vektor transfiziert, der die Expression von sowohl schweren und leichten variablen Sequenzen zur Verfügung stellt, die an geeignete konstante Regionen fusioniert sind. Im zweiten Verfahren werden Wirtszellen mit zwei Vektoren transfiziert, die jeweils die Expressionen von entweder der variablen schweren oder leichten Sequenz, fusioniert an eine geeignete konstante Region, zur Verfügung stellen. Die vorliegenden humanisierten Sequenzen, abgeleitet von NR-LU-13, werden in geeigneten Wirtszellen unter Bedingungen exprimiert, so daß ein funktionelles Antikörperfragment (z. B. Fv) oder gesamter Antikörper erhalten wird. Bevorzugterweise werden solche Sequenzen an geeignete menschliche konstante Sequenzen, z. B. menschliche schwere oder leichte konstante Sequenzen fusioniert. Die menschlichen konstanten Sequenzen sind gut bekannt und wurden in der Literatur beschrieben. Zum Beispiel enthält Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed., U. S. Dept. Health & Human Services (1991) solche Sequenzen. Bekannte menschliche konstante Sequenzen, die für die Produktion von humanisierten Antikörpern verwendet werden, schließen beispielhaft menschliches Gamma 1, Gamma 3 und Gamma 4 (menschliche schwere konstante Sequenzen) und Kappa und Lambda (menschliche leichte konstante Sequenzen) ein. Die ausgewählte menschliche konstante Sequenz beeinträchtigt die Effektorfunktion des humanisierten Antikörpers.

[0136] Bei der Expression von rekombinanten Antikörpern in Zellkultur, z. B. in CHO-Zellen oder Insektenzellen, ist es bevorzugt, die Sekretion des Antikörpers durch die Wirtszelle zur Verfügung zu stellen. Dies schließt ein operatives Verbinden der DNAs, die für die humanisierten schweren und leichten Kettensequenzen kodieren, an geeignete Signalpeptidsequenzen ein, d. h. diejenigen, die durch die bestimmte Wirtszelle erkannt und prozessiert werden. Signalpeptide sind gut bekannt und erhältlich. Typischerweise wird ein Signalpeptid ausgewählt, das mit der Wirtszelle oder dem exprimierten Protein homolog ist. Zum Beispiel können die endogenen Signalpeptide von Maus NR-LU-10 verwendet werden. Das Expressionssystem (z. B. der Expressionsvektor) wird bevorzugterweise Sequenzen enthalten, die die Selektion von Transfektanten und die Expression von humanisierten Antikörpern zur Verfügung stellen werden. Daher wird bevorzugterweise der Vektor oder die Vektoren Gene enthalten, die eine Selektion ermöglichen, z. B. Antibiotika-(oder Wirkstoff-)Resistenzgene. Auch wird der Vektor bevorzugterweise Promotoren enthalten, die eine effiziente Expression der schweren und leichten Ketten zur Verfügung stellen, sowie andere regulatorische Sequenzen, z. B. Polyadenylierungsregionen, Enhancer-Regionen, usw. Der Aufbau von Systemen, die für die Expression von rekombinanten Antikörpern geeignet sind, ist gut bekannt und liegt innerhalb des Bereichs des Durchschnittsfachmanns, wie durch die oben angegebenen Referenzen belegt, die sich auf die Expression von rekombinanten Immunglobulinen beziehen.

[0137] Ein gut bekanntes Beispiel von für die Expression von Immunglobulinen geeigneten Wirtszellen sind CHO-Zellen. Bei der Expression von Immunglobulinen in CHO-Zellen oder anderen Säugerzellen ist es wünschenswert, eine Sequenz einzuschließen, die eine Amplifikation zur Verfügung stellt, um so die Vektorkopienzahl zu erhöhen und die Antikörperausbeute zu erhöhen. Solche Sequenzen schließen beispielhaft dominante selektierbare Marker, wie zum Beispiel unter anderem Dihydrofolatreduktase (DHFR), Neomycinphosphotransferase (NEO), Glutaminsynthase (GS), Adenosindeaminase (ADA) ein.

[0138] Beispiele für geeignete Promotoren, die für die Expression von Proteinen in Säugetierzellen brauchbar sind, schließen beispielhaft virale Promotoren, wie zum Beispiel den menschlichen Cytomegalovirus (CMV) frühen Promotor, SV40 frühe und späte Promotoren und den RSV-Promotor und -Enhancer ein. Auch können Säugetierpromotoren verwendet werden, z. B. Immunglobulinpromotoren, Wachstumshormonpromotoren, wie zum Beispiel Rinderwachstumshormonpromotor, usw. Es ist bevorzugt, einen starken Promotor auzuwählen, d. h. einen, der hohe Transkriptionsspiegel zur Verfügung stellt.

[0139] Auch wird der Vektor bevorzugterweise Polyadenylierungssequenzen (polyA) Sequenzen enthalten, die eine Polyadenylierung von mRNA zur Verfügung stellen, die dazu beiträgt, um die mRNA-Stabilität zu verbessern und dadurch die Proteinproduktion zu verstärken. Beispiele von geeigneten polyA-Sequenzen schließen beispielhaft unter anderem SV40 polyA-Sequenzen und Rinderwachstumshormonpromotor (BGH) polyA-Sequenzen ein.

[0140] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wurde ausgewählt, die entsprechenden humanisierten Sequenzen in CHO(dhfr)-Zellen zu exprimieren, wobei die Zellen mit einem Vektor transfiziert wurden, der von einem käuflich erhältlichen Vektor abgeleitet wurde, der jedoch modifiziert wurde.

[0141] Der Plasmidvektor pcDNA3 wurde von Invitrogen Corp. (San Diego, CA) erhalten. Dieser Vektor enthält zur Zielgenexpression den menschlichen Cytomegalovirus(hCMV)-Promotor und -Enhancer (Boshart et al., Cell 41: 521–530 (1985)), ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion in Säugerzellen und einen prokaryon-

tischen Origin-of-Replication und das Beta-Lactamase-Gen zur Vervielfältigung und Selektion in E. coli. Der Vektor pcDNA3 wurde modifiziert, um einen zweiten hCMV-Promotor und -Enhancer zu enthalten, auch ein DHFR-Gen für die Genamplifikation und zusätzliche Restriktionsstellen, um die Antikörnergene aufzunehmen.

[0142] In einer Ausführungsform wurde es ausgewählt, die schweren und leichten NXR451 humanisierten variablen Sequenzen an menschliche $\gamma 1$ und K konstante Regionen zu fusionieren. Jedoch können andere menschliche konstante Regionen dafür ersetzt werden. Die genauen Verfahren, die verwendet wurden, sind im Detail in den Beispielen beschrieben. Darüber hinaus wird erwartet, daß humanisierte Antikörper, die die vorliegenden NXR451 humanisierten schweren und leichten Sequenzen enthalten, unter der Verwendung von anderen konstanten Regionen oder anderen Wirtssystemen exprimiert werden können, die in der Lage sind, funktionelle rekombinante Antikörper zu exprimieren. Insbesondere wird erwartet, daß die vorliegenden humanisierten Antikörper in transgenen Pflanzen oder Tieren oder in Insekten, wie oben beschrieben, exprimiert werden können.

[0143] Nachdem die humanisierten Antikörper exprimiert werden, werden sie gereinigt und dann auf ihre Fähigkeit hin getestet, Antigen zu binden. Verfahren zur Reinigung von rekombinanten Immunglobulinen sind gut bekannt und sind in den hier aufgenommenen Referenzen beschrieben, die sich auf die Produktion von rekombinanten Antikörpern beziehen. Zum Beispiel schließt ein gut bekanntes Verfahren zur Reinigung von Antikörpern eine Protein A-Reinigung ein, aufgrund der Neigung von Protein A, an die Fc-Region von Antikörpern zu binden.

[0144] Die Fähigkeit der vorliegenden humanisierten Antikörper, Antigen zu binden, wird durch jedes einer Vielzahl von bekannten Verfahren zum Testen auf Antigen-Antikörper-Affinität bestimmt. Wie diskutiert, bindet der parenterale Mausantikörper NR-LU-13 ein ungefähr 40 Kilodalton Glycoprotein, das auf zahlreichen Karzinomen exprimiert wird. Dieses Antigen wurde in Varki et al., Cancer Res. 44: 681–687 (1984); Okabe et al., Cancer Res. 44: 5273–5278 (1989) charakterisiert, auf das hier Bezug genommen wird. Daher ist es Routine, die Fähigkeit von humanisierten Antikörpern die gemäß der Erfindung hergestellt wurden zu testen, das NR-LU-13-Antigen zu binden. Darüber hinaus sind Verfahren zur Evaluierung der Fähigkeit von Antikörpern, an Epitope dieses Antigens zu binden, bekannt.

[0145] In einem Aspekt der Erfindung wären die humanisierten Antikörper (oder Fragmente davon) der vorliegenden Erfindung brauchbare Werkzeuge in Verfahren zur medizinischen Diagnostik und therapeutischen Zwecken. Ein diagnostisches Verfahren oder therapeutisches Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Zielstelle innerhalb eines Säugetierwirts wird beschrieben. Bei der Bestimmung der Kriterien zur Anwendung von humanisierten Antikörpern oder Antikörperkonjugaten für die in vivo-Verabreichung für therapeutische Zwecke ist es wünschenswert, daß das allgemein erreichbare Zielverhältnis hoch ist und das die absolute Dosis von therapeutischem Mittel, das dem Tumor zugeführt wird ausreichend ist, um eine signifikante Tumorantwort hervorzurufen. Verfahren zur Verwendung der humanisierten Antikörper, die in der vorliegenden Erfindung beschrieben werden, können zum Beispiel in den U.S. Patenten Nrn. 4,877,868, 5,175,343, 5,213,787, 5,120,526 und 5,202,169 gefunden werden.

[0146] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein Antikörperkonjugat oder eine Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung in Pretargeting-Verfahren verwendet. Im wesentlichen sind solche Pretargeting-Verfahren durch ein verbessertes Zielverhältnis oder eine erhöhte absolute Dosis an den Zielzellstellen im Vergleich zu herkömmlicher Krebsdiagnose oder -therapie gekennzeichnet. Eine allgemeine Beschreibung von Pretargeting-Verfahren kann in U.S. Patent Nr. 4,863,713, 5,578,287 und 5,630,996 gefunden werden. Darüber hinaus sind typische Pretargeting-Ansätze unten zusammengefaßt.

[0147] Pretargeting-Verfahren bestehen aus zwei allgemeinen Typen: Drei-Schritt-Pretargeting-Verfahren und Zwei-Schritt-Pretargeting-Verfahren.

[0148] Das Drei-Schritt-Pretargeting-Protokoll schließt die Verabreichung eines Targeting-Gruppe-Ligandenkonjugates ein, dem es ermöglicht wird, sich an einer Zielstelle anzusammeln und im Kreislauf verdünnt zu werden. Dies wird von der Verabreichung eines anti-Liganden gefolgt, der an das Targeting-Gruppe-Ligandenkonjugat bindet und ungebundenes Targeting-Gruppe-Ligandenkonjugat aus dem Blut entfernt, sowie an Targeting-Gruppe-Ligandenkonjugat an der Zielstelle bindet. Daher erfüllt der anti-Ligand eine zweifache Funktion bei der Entfernung von Target-Gruppe-Ligandenkonjugat, das nicht an der Zielstelle gebunden ist, sowie die Anbindung an die Zielstelle, um einen Targeting-Gruppe-Liganden:anti-Ligandenkomplex zu bilden. Zuletzt wird ein diagnostisches oder therapeutisches aktives Mittel-Ligandenkonjugat, das eine schnelle Gesamtkörper-Entfernung aufweist, verabreicht.

[0149] Wenn das aktive Mittel-Ligandenkonjugat im Kreislauf in die Nähe des an die Zielstelle gebundenen Targeting-Gruppe-Liganden:anti-Ligandenkomplex kommt, bindet der anti-Ligandteil des Komplexes an den Ligandenteil des zirkulierenden aktiven Mittel-Ligandenkonjugats, was ein Targeting-Gruppe-Ligand:anti-Ligand:Ligand-aktives Mittel "Sandwich" an der Zielstelle bildet. Weiterhin, da das nicht-gebundene diagnostische therapeutische aktive Mittel an einen schnell entfernenden Liganden angebracht ist (anders als eine langsam entfernte Targeting-Gruppe, wie zum Beispiel Antikörper, Antikörperfragment) stellt diese Technik eine verringerte nicht-Target-Aussetzung gegenüber dem aktiven Mittel zur Verfügung.

[0150] Alternativ beseitigen die Zwei-Schritt-Pretargeting-Verfahren den Schritt der Verabreichung des oben angegebenen anti-Liganden. Diese "Zwei-Schritt"-Verfahren umfassen die Verabreichung von Targeting-Gruppe-Ligand oder Targeting-Gruppe-anti-Ligand, gefolgt von der Verabreichung von aktivem Mittel, konjugiert an das gegenüberliegende Mitglied des Ligand/anti-Ligand-Paares.

[0151] Als ein optionaler Schritt in den Zwei-Schritt-Pretargeting-Verfahren der vorliegenden Erfindung wird Ligand oder anti-Ligand, der spezifisch so aufgebaut wurde, um eine Entfernung-Funktion zur Verfügung zu stellen, verabreicht, um die Entfernung von zirkulierenden Targeting-Gruppe-Ligand oder Targeting-Gruppe-anti-Ligand zu beschleunigen. Daher wird in dem Zwei-Schritt-Pretargetingansatz das Entfernungsmittel nicht entweder direkt oder durch das vorher verabreichte Zielzell-gebundene Targeting-Gruppe-anti-Ligand oder Targeting-Gruppe-Ligandenkonjugat an die Zielzellpopulation gebunden.

[0152] Eine Targeting-Gruppe in den Pretargeting-Verfahren der vorliegenden Erfindung wiest die funktionelle Eigenschaft auf, daß sie an eine definierte Zielzellpopulation bindet, wie zum Beispiel Tumorzellen. Bevorzugte Targeting-Gruppen, die in dieser Hinsicht brauchbar sind, sind Antikörper (polyklonal oder monoklonal, wie zum Beispiel menschliche monoklonale Antikörper oder "humanisierte" Maus- oder chimäre Antikörper, die auch als Targeting-Gruppen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung brauchbar sind. Einige Beispiele von humanisierten Antikörpern schließen diejenigen ein, die CHO produziert sind, in Wirtszellen wie zum Beispiel Pflanzen (z. B. Mais, Sojabohne, Tabak und ähnliches), Insekten, Säugern, Hefen und Bakterien. Die humanisierten Antikörper können diejenigen sein, die an das durch den Antikörper NR-LU-13 gebundene Antigen binden. Bevorzugterweise kann der humanisierte Antikörper keine N-verbundene Glycosylierung besitzen oder seine N-verbundene Glycosylierung wurde post-Expression modifiziert, um die Immunogenität oder Toxizität zu verringern.

[0153] Die vorliegenden humanisierten Antikörper können potentiell anti-Tumoraktivität aufweisen, auch ohne die Anbringung an andere diagnostische oder therapeutische aktive Mittel, aufgrund der Anwesenheit von menschlichen konstanten Sequenzen, die menschliche Effektorfunktionen zur Verfügung stellen können. Jedoch, während Antikörper(therapeutische oder diagnostische Mittel)-Konjugate eine allein in der Therapie und Diagnostik bekannte Anwendung aufweisen, werden in den bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung humanisierte Antikörper in den Pretargeting-Verfahren als prototypische Targeting-Gruppen verwendet werden.

[0154] Ligand/anti-Ligand-Paare, geeignet zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung schließen Biotin/Avidin oder Streptavidin, Haptene und Epitope/Antikörper, Fragmente oder Analoga davon, einschließlich Mimetika, Lectine/Kohlenhydrate, Zinkfingerproteine/dsDNA-Fragmente, Enzyminhibitoren/Enzyme und Analoga und Derivate davon ein. Bevorzugte Liganden und anti-Liganden binden mit einer Affinität von mindestens ungefähr $K_A \geq 10^9 M^{-1}$ oder $K_D \leq 10^{-9} M$ aneinander. Biotin/Avidin oder Streptavidin ist ein bevorzugtes Ligand/anti-Ligand-Paar.

[0155] Im allgemeinen werden solche Pretargeting-Verfahren bevorzugterweise die Verabreichung eines anti-Liganden einschließen, der eine Entfernung-Funktion zur Verfügung stellt. Diese Entfernung kann möglicherweise der Kreuz-Vernetzung und/oder Aggregation von Konjugaten zugeordnet werden, die im Blut zirkulieren, was zu einer Komplex/Aggregatentfernung durch das RES (Reticuloendothelial-System) des Empfängers führt. In einer Ausführungsform der Erfindung wird die anti-Ligand-Entfernung dieses Typs bevorzugterweise mit einem multivalennten Molekül erreicht. Jedoch kann ein univalentes Molekül von ausreichender Größe, daß es durch das RES selber entfernt wird, ebenfalls verwendet werden.

[0156] Alternativ können Rezeptor-basierte Entfernungsmechanismen, z. B. Ashwell-Rezeptor oder andere Rezeptoren durch Hinzugabe von Hexoseresten, wie zum Beispiel Galactose- oder Mannoseresten ausgenutzt werden, um eine Entfernung des anti-Liganden, anti-Ligandenkonjugates oder humanisierten Antikörpers über die Leber zur Verfügung stellen. Solche Entfernungsmechanismen sind weniger von der Valenz des Entfernungsmittels abhängig als die oben beschriebenen RES-Komplex/Aggregat-Entfernungsmechanismen.

[0157] Zum Beispiel, falls der Targeting-Gruppe-Ligand oder Targeting-Gruppe-anti-Ligand derivatisiert wurde, um eine Entfernung zur Verfügung zu stellen (d. h. Hinzufügung eines Hexoserests) sollte ein Entfernungsmitel nicht erforderlich sein. Bevorzugte Entfernungsmitel sind in U.S. Patenten Nrn. 5,624,896 und 5,616,690 sowie der PCT-Anmeldung Veröffentlichungsnummer WO 95/15978 beschrieben.

[0158] Diagnostische und therapeutische aktive Mittel der vorliegenden Erfindung schließen anti-Tumormittel, wie zum Beispiel Radionuklide, Zytokine, Wirkstoffe und Toxine ein.

[0159] Innerhalb der vorliegenden Erfindung brauchbare Radionuklide schließen Gamma-Emitter, Positronen-Emitter, Auger-Elektronen-Emitter, Röntgenemitter und Fluoreszenzemerter ein, wobei beta- und alpha-Emitter für die therapeutische Verwendung bevorzugt sind. Radionuklide sind im Stand der Technik gut bekannt und schließen ^{123}J , ^{125}J , ^{130}J , ^{131}J , ^{133}J , ^{135}J , ^{47}Sc , ^{72}As , ^{72}Se , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{97}Ru , ^{100}Pd , $^{101\text{m}}\text{Rd}$, ^{119}Sb , ^{128}Ba , ^{197}Hg , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{153}Sm , ^{169}Eu , ^{212}Pb , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{166}Ho und ^{18}F ein. Bevorzugte therapeutische Radionuklide schließen ^{188}Re , ^{186}Re , ^{203}Pb , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{109}Pd , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}J , ^{131}J , ^{77}Br , ^{211}At , ^{97}Ru , ^{105}Rh , ^{198}Au , ^{166}Ho und ^{199}Ag oder ^{177}Lu ein.

[0160] Andere anti-Tumormittel, z. B. Mittel, die gegen sich teilende Zellen aktiv sind, sind in der vorliegenden Erfindung brauchbar. Beispielhafte anti-Tumormittel schließen Cytokine, wie zum Beispiel IL-2, IL-12, Interferon α , β oder γ , Tumornekrosefaktor oder ähnliches, Lectinentzündliche Antwortpromotoren (Selektine) wie zum Beispiel L-Selektin, E-Selektin, P-Selektin und ähnliche Moleküle ein.

[0161] Zur Verwendung hier geeignete Wirkstoffe schließen herkömmliche chemo-Therapeutika, wie zum Beispiel Vinblastin, Doxorubicin, Bleomycin, Methotrexat, 5-Fluoruracil, 6-Thioguanin, Cytarabin, Zyklophosphamid und Cisplatin sowie andere herkömmliche chemo-Therapeutika wie Beschrieben in Cancer: Principles and Practice of Oncology, 2d ed., V. T. DeVita, Jr., S. Hellman, S. A. Rosenberg, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, 1985, Chapter 14 ein. Ein innerhalb der vorliegenden Erfindung bevorzugter Wirkstoff ist ein Trichothezen. Andere bevorzugte Wirkstoffe, die zur Verwendung hier als ein diagnostisches oder therapeutisches aktives Mittel bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung geeignet sind, schließen experimentelle Wirkstoffe, wie in NCI Investigational Drugs, Pharmaceutical Data 1987, NIH Publication No. 88-2141, Revised November 1987 beschrieben, ein.

[0162] Verschiedene der innerhalb der vorliegenden Erfindung brauchbaren potenteren Toxine bestehen aus einer A- und einer B-Kette. Die A-Kette ist der cytotoxische Teil und die B-Kette ist der Rezeptor-bindende Teil des intakten Toxinmoleküls (Holotoxin). In dieser Hinsicht bevorzugte Toxine schließen Holotoxine, wie zum Beispiel Abrin, Ricin, Modeccin, Pseudomonas Exotoxin A, Diphtheria Toxin, Pertussistoxin und Shiga-Toxin; und A-Ketten oder "A-Ketten-ähnliche" Moleküle ein.

[0163] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Targeting-Gruppe in den Pretargeting-Verfahren einen humanisierten Antikörper oder ein humanisiertes Antikörperkonjugat der vorliegenden Erfindung umfassen, das Ligand/anti-Ligand-bindende Paar wird Biotin/Avidin (z. B. Streptavidin) sein und das aktive Mittel wird ein Radionuklid sein. Das besonders bevorzugte Pretargeting-Verfahren ist das Zwei-Schritt-Verfahren und die Verwendung eines Entfernungsmitels. Die bevorzugte humanisierte Antikörper-Targeting-Gruppe ist ein Antikörper, der spezifisch an das durch NR-LU-13 gebundene Antigen bindet und der humanisierte Antikörper besitzt keine Glycosylierung oder seine Glycosylierung wurde chemisch modifiziert.

[0164] Der Fachmann im Stand der Technik kann leicht auf Basis der Lehren dieser Anmeldung und den hier genannten Anmeldungen eine effektive diagnostische oder therapeutische Dosis und ein Behandlungsprotokoll bestimmen. Dies wird von Faktoren wie zum Beispiel dem bestimmten ausgewählten therapeutischen oder diagnostischen Mittel, der Zuführroute, dem Typ von Target-Stellen, der Affinität der Targeting-Gruppe für die Target-Stelle von Interesse, jeglicher Kreuzreakтивität der Targeting-Gruppe mit normalem Gewebe und dem Zustand des Patienten abhängen, ob die Behandlung neben anderen Faktoren allein oder in Kombination mit anderen Behandlungen durchgeführt wird.

[0165] Zum Beispiel wird im Fall von humanisiertem Antikörper-Avidin- oder Streptavidinkonjugaten in Pretargeting-Strategien eine geeignete Dosis von ungefähr 10 bis ungefähr 2500 mg, weiter bevorzugt von ungefähr 50 bis 1500 mg und am meisten bevorzugt von ungefähr 100 bis 800 mg reichen. Die Dosierung des Ligand-aktiven Mittelkonjugats, zum Beispiel einem Radionuklid – Biotin-enthaltenden Konjugat wird im allgemeinen von ungefähr 0,001 bis ungefähr 10 mg und weiter bevorzugt von ungefähr 0,1 bis 2 mg reichen. Zum Beispiel reicht eine geeignete Dosierung von Ligand-aktivem Mittel, Y-90-DOTA-Biotin, von ungefähr 10 bis 300 mCi in 0,1 bis 2,0 mg. Auch kann In^{111} bei 1–10 mCi allein oder in Kombination mit Y^{90} verwendet werden.

Die Radioaktivitätsbereiche hängen von dem verwendeten Isotop ab.

[0166] Im allgemeinen werden solche Pretargeting-Verfahren die Verabreichung eines Entfernungsmittels einschließen. Die Dosierung des Entfernungsmittels wird eine Menge sein, die ausreichend ist, um das vorher verabreichte Konjugat aus dem Kreislauf wesentlich zu entfernen, d. h. mindestens ungefähr 50%, weiter bevorzugt mindestens ungefähr 90% und am meisten bevorzugt annähernd oder 100%. Im allgemeinen wird dies mehrere Tage nach der Verabreichung des humanisierten Antikörper – Streptavidinkonjugats verabreicht, bevorzugterweise 1 bis 5 Tage danach, weiter bevorzugt mindestens 1 bis 2 Tage danach. Im allgemeinen hängt die Bestimmung, wann man das entfernende Mittel verabreicht, von der Targetaufnahme und dem endogenen Entfernen des Targeting-Gruppen-Konjugats ab. Besonders bevorzugte Entfernungsmittel sind diejenigen, die eine Ashwell-Rezeptor-vermittelte Entfernung zur Verfügung stellen, wie zum Beispiel galactosyierte Proteine, z. B. galactosyierte biotinyliertes humanes Serumalbumin (HSA) und kleine Moleküle-Entfernungsmittel, die Galactose und Biotin enthalten. Im Fall von HSA-basierten Entfernungsmitteln wird eine typische Dosierung des Entfernungsmittels im Bereich von ungefähr 100 bis 1000 mg und weiter bevorzugt ungefähr 200–500 mg liegen.

[0167] Falls ein Entfernungsmittel verabreicht wird, wird das Ligand-aktive Mittelkonjugat bevorzugterweise ungefähr 2 bis 12 Stunden danach verabreicht.

[0168] Die Konjugate können durch bekannte Verfahren der Verabreichung verabreicht werden. Bekannte Verfahren der Verabreichung schließen beispielhaft unter anderem intraperitoneale Injektion, intravenöse Injektion, intramuskuläre Injektion, intranasale Verabreichung ein. Die intravenöse Verabreichung ist im allgemeinen bevorzugt.

[0169] Die vorliegende Erfindung wird weiterhin durch die Präsentation der folgenden Beispiele beschrieben. Diese Beispiele werden zur Verdeutlichung und nicht zur Begrenzung angeboten.

Beispiele

BEISPIEL 1

HUMANISIERTE SEQUENZEN VON NRX451

[0170] Im wesentlichen wurde die cDNA-Sequenz, die für die variablen Regionen von NR-LU-13-Antikörper (das Hybridom, daß den Antikörper herstellte, wurde bei der American Type Culture Collection als ATCC Zugangsnummer SD3273, umgewandelt zu ATCC Zugangsnummer CRL-12360 hinterlegt) durch bekannte Verfahren kloniert und sequenziert. Die cDNA-Sequenzen der klonierten leichten und schweren Sequenz von NR-LU-13 sind in [Fig. 2](#) enthalten. Unter der Verwendung dieser Sequenzen wurde die Aminosäuresequenz der Fv-Region von NR-LU-13, die die gesamte variable leichte und schwere Region enthielt, aufgeklärt.

A. Humanisierungsprotokoll

[0171] Kurz gesagt, umfaßt das Humanisierungsprotokoll einen Zyklus von Sequenzanalyse und molekularem-Modeling, wie in [Fig. 1](#) dargestellt wird. Sequenz-humane Ab-Daten wurden aus der Immunglobulin-Sequenzdatenbank erhalten (E. A. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, Fifth Edition, 1991) und strukturelle Daten wurden aus der Brookhaven-Datenbank erhalten (F. C. Bernstein et al., J. Molec. Biol. 112: 535–42, (1977)).

[0172] Die Antikörper schwere und leichte Kettensequenzen von NR-LU-13 wurden mit einer Datenbank von menschlichen Sequenzpaaren (Immunglobulin leichte und schwere Ketten, die von demselben Klon abstammten) verglichen. Basierend auf diesem Vergleich wurde die ähnlichste menschliche Sequenz ausgewählt, um das Gerüst für den grafted-Antikörper zur Verfügung zu stellen. Die Sequenzen der Maus Komplementarität-bestimmenden Regionen (CDRs) von NR-LU-13 wurden dann auf das ausgewählte menschliche Gerüst übertragen. Dieses Verfahren ergab die "anfängliche" humanisierte Fv-Sequenz.

[0173] Diese anfängliche humanisierte Sequenz wurde dann durch Testen von Sequenzen in dreidimensionalen Modellen verfeinert. Ein Modell der Ausgangs-Maussequenz und der Ausgangs-putativen humanisierten Sequenz wurde konstruiert. Äquivalente Restpositionen in den Mausmodell und dem humanisierten Modell wurden verglichen. Reste in dem humanisierten Modell, von denen vorhergesagt wurde, daß sie die Struktur der CDRs stören würden, wurden "rückmutiert", d. h. die Mausgerüstreste wurden wieder hergestellt. Die Mo-

delle wurden dann unter der Verwendung der modifizierten Sequenzen konstruiert und wurden nochmals mit dem Maus-Fv-Modell verglichen. Dieser Zyklus von Modellierung einer "Rückmutation" und Vergleichen derselben mit dem Mausmodell wurde fortgeführt, bis die Konformation der CDRs in dem humanisierten Modell eng mit den CDR-Konformationen in dem parenteralen Mausmodell übereinstimmten. Das spezifische schrittweise Verfahren, das zu den vorliegenden humanisierten schweren und leichten Sequenzen abgeleitet von NR-LU-13 führte, ist in [Fig. 1](#) enthalten.

B. Sequenzanalyse

[0174] Die variablen Sequenzen des NR-LU-13-Antikörpers wurden mit 58 Paaren von K-schwere Kettenpaaren verglichen, die bekannte CDR sind, die als funktionelle Antikörper zusammen exprimiert werden. Das am meisten identische Sequenzpaar wurde als dasjenige des menschlichen Antikörperklons R3.5H5G'CL gefunden (A. Manheimer-Lory et al., J. Exp. Med. 174: 1639–52, (1991)). Der NR-LU-13-Antikörper enthält ein KV/hIIC-Kettenpaar. Der R3.5H5G'CL-Antikörper ist ein Kl/IhI-Kettenpaar. Daher wurden beide leichte und schwere Ketten aus den am meisten homologen menschlichen Klassen ausgewählt.

[0175] Die NR-LU-13 leichte und schwere Kettensequenzen wurden mit einer Datenbank von Immunglobulin-Sequenzen verglichen, um abnormale Sequenzpositionen zu identifizieren. Die jeweilige Sequenz für jede Restposition zeigte, daß die schwere Kette-Gerüstregion 3 (HFR3) die am meisten abnormale Region innerhalb der NR-LU-13-Antikörpersequenz war, und insbesondere war Position Cys 181 abnormal. In den meisten untersuchten Sequenzen (90%) wurde diese Position durch einen Tyr-Rest besetzt, der einen integralen Teil der V_L/V_H -Schnittstelle bildete. Die Restfrequenzen innerhalb von ausgewählten Positionen sind in [Fig. 7a–7f](#) dargestellt.

C. Modell-Konstruktion

i. Modell-Protokoll

[0176] Die Modelle wurden unter der Verwendung des vorher durch Martina et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 9268–72 (1989) und Pedersen et al., Immunomethods 1: 126–36 (1992) beschriebenen kombinierten Algorithmus konstruiert.

[0177] Wenn immer möglich, wurden die CDRs aus kanonischen Schleifen (Chothia et al., Nature 342: 877–83 (1989)) modelliert. Die verbleibenden Schleifen wurden unter der Verwendung einer Kombination von Datenbanksuchen und ab initio-Verfahren unter der Verwendung des konformationellen Suchprogramms CONGEN von R. E. Brucolari und M. Karplus, Biopolymers 26: 137–68 (1987) modelliert. Im Fall von NRX451 wurden die CDRs L1, L2, L3, H1 und H2 aus kanonischen Schleifen gebildet. Die CDR H3 wurde unter der Verwendung einer Datenbanksuche an der Basis der CDR und einer ab initio-Fragmenterzeugung für den zentralen Teil der Schleife konstruiert, um zu versuchen, den konformationellen Raum zu füllen. Die CDR H3 wurde auf eine kombinierende Stelle aufgebaut, die nur die Rückgradatome der kanonischen Schleifen und alle Atome aus den Gerüstresten enthielt. Alle CDR-Seitenketten wurden unter der Verwendung von CONGEN rekonstruiert.

[0178] Die Modelle wurden Energie-minimiert. Bei der Minimierung wurde das Rückgrad des Gerüstes fixiert, obwohl es den Rückgrad-Seiteketten und den CDRs erlaubt wurde, sich zu bewegen.

ii. Überblick über "Rückmutationen"

[0179] Anfängliche "Rückmutationen" (Ersetzen von Mausgerüstresten) von CDR-grafted NRX451 (der "anfänglichen" nominalen Sequenz) wurden identifiziert, wo die kanonische Klassifizierung der CDRs durch die Veränderung in der Gerüstsequenz verändert wurde. Nur eine solche Position wurde identifiziert – Arg 193 (R3.5H5G'CL)/Ala 193 (NRX451). Diese Position ist eine kanonische Determinante für CDR H2 (die in Graft 2 und danach inkorporiert wurde). Jede Restposition innerhalb 5A eines CDR-Rests, der einen veränderten Resttyp in der R3.5H5G'CL-Gerüstsequenz aufwies, wurde "zurückmutiert", falls die Seitenketten oder Rückgradkonformation signifikant zwischen dem NRX451 und R3.5H5G'CL-Modell verändert wurde. Auf diese Weise wurden Restpositionen Ser 55, Thr 141, Tyr 181, Ala 182, Met 191, Ser 198 und Ala 218 "zurückmutiert" (inkorporiert in Graft 4 und danach).

[0180] Zuletzt wurden alle Restunterschiede zwischen dem R3.5H5G'CL-Gerüst und dem NRX451-Gerüst visuell inspiriert. Zwei weitere Restpositionen nahe den CDRs wurden identifiziert (Thr 75 und Phe 77) und "zurückmutiert".

iii. Humanisiertes Modell

[0181] In den finalen NRX451/R3.5H5G'CL-Modellen liegen die Reste der leichten und schweren Kette variable Regionen, die sich zwischen NR-LU-13 und NRX451-humanisierten Sequenzen unterscheiden, hauptsächlich an der Basis der Fv-Domäne in Richtung des C-Teils des Fab-Fragments (siehe [Fig. 5](#)). Die Modelle wurden unter der Verwendung von ProCheck (v.2.1) (R. A. Laskowski et al., Instruction Manual, "Procheck v.2.1: Programs to check the stereochemical quality of Protein studies", Oxford Molecular Ltd. (1993)) analysiert. Die [Fig. 6](#) enthält molekulare Modelle von NR-LU-13 und dem ersten humanisierten Fv abgeleitet davon, NRX451.

4. Humanisierte Sequenz

[0182] Die humanisierten leichten und schweren Sequenzen sind jeweils von NR-LU-13 abgeleitet, bezeichnet als NRX451 schwere und leichte Ketten und sind in [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) dargestellt. Die variablen Sequenzen von NR-LU-13 und humanisiertem NRX451 sind in [Fig. 5](#) verglichen. Die Ketten sind getrennt numeriert.

[0183] Daher wurden basierend auf diesen Sequenzen DNAs synthetisiert, die für solche humanisierten variablen Regionen kodierten.

BEISPIEL 2

ALLGEMEINE METHODOLOGIE ZUR KONSTRUKTION VON HUMANISIERTEN VARIABLEN REGIONEN

Synthese variabler Regionen

[0184] Die humanisierten variablen Regionen wurden als eine Serie von überlappenden Oligonukleotiden synthetisiert. Jede vollständige variable Region war 400 bis 450 Basen lang.

[0185] Ungefähr 16 Oligonukleotide (Oligos) wurden synthetisiert, um sowohl die schweren und leichten Ketten abzudecken. Die Oligos erreichten in ihrer Größe von 40 bis 88 Basen. Die anhybridisierten Genfragmente wurden durch PCR amplifiziert und kloniert. Jede variable Region schloß Restriktionsstellen ein, um eine Klonierung zu erleichtern, eine Leadersequenz, um die Sekretion aus eukaryontischen Zellen zu steuern und eine Splice-Donor-Stelle, um eine präzise Zusammenfügung mit der konstanten Region zu ermöglichen.

Eukaryontischer Expressionsvektor

[0186] Ein Vektor wurde konstruiert der in der Lage war, stabil eukaryontische Zellen zu transfizieren und hohe Expressionsspiegel der Antikörperketten zu vermitteln. Ein käuflich erhältlicher Vektor, der den CMV-Promotor und -Enhancer und das Neomycin-Resistenzgen enthielt wurde modifiziert, um einen zweiten CMV-Promotor und -Enhancer, Immunglobulin-konstante Regionen und ein DHFR-Gen zu enthalten.

[0187] Der Vektor pCDNA3 wurde von Invitrogen Corp. (San Diego, CA) erworben. Dieser Vektor ist in [Fig. 8](#) dargestellt. Das Neomycin-Resistenzgen von pCDNA3 ermöglicht die Selektion von G418 resistenten Transfektanten in eukaryontischen Zellen. Dieser Vektor enthält prokaryontische Elemente, die eine Selektion und Vermehrung in E. coli ermöglichen.

[0188] Ein zweiter CMV-Promotor und eine Enhancer-Region wurden unter der Verwendung PCR, um die existierenden CMV-Elemente zu kopieren, gefolgt von Einfügung in pCDNA3, hinzugefügt. Genauer gesagt, wurden Oligonukleotide NX62 (CCTGACGAATTCGTTGACATTGATTATTGAC), und NX63 (CCTGACGCCGC-CGCTTCGATAAGCCAGTAAGC) synthetisiert, um an jeweils die 5'- und 3'-Ende von CMV zu hybridisieren. NX62 und NX63 wurden synthetisiert, um jeweils EcoRI- und NotI-Restriktionsstellen einzuführen. Die PCR-Verfahren wurde durch Standardverfahren durchgeführt, und das sich ergebende Fragment wurde mit EcoRI- und NotI-Restriktionsstellen verdaut. Plasmid pCDNA3 wurde ebenfalls verdaut, und das Fragment wurde durch Standardverfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde als pCMV4 bezeichnet.

[0189] Die kappa-konstante Region und das vorhergehende Intron wurden aus menschlicher peripherer Blutzymphozyten-DNA durch PCR isoliert. Die Oligonukleotide NX64 (GTTTGGCTCGAGCACAGCTAGCAT-TATCTGGGATAAGCATGCTG) und NX65 (GTTTACGGGGCCCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAG) wurden synthetisiert, um jeweils an das Intron, das dem konstanten Region Exon voranging und dem 3'-Ende der kon-

stanten Region, zu hybridisieren. NX64 enthielt sowohl Xhol- und Nhel-Restriktionsstellen. NX65 enthielt eine Apal-Restriktionsstelle, im Anschluß an das konstante Region Stocodon. PCR wurde durch Standardverfahren durchgeführt. Die Fragmente wurden durch Xhol und Apal verdaut und in pCMV4 durch Standardverfahren eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde als pC4-CK3 bezeichnet.

[0190] Die menschliche gamma 1-konstante Region, einschließlich dem vorhergehenden Intron und der anschließenden Polyadenylierungsstelle wurde aus menschlichem Plasmacytom (MC/CAR, ATCC CRL 8083) DNA durch PCR isoliert. Die Oligonukleotide NX66 (GTACGCCGGATCCCAGACACTGGACGCTG) und NX67 (CATTCTCGGAATTCGAACCATCACAGTCTCGC) wurden synthetisiert, um jeweils an das vorhergehende Intron und die Polyadenylierungsstelle zu hybridisieren. NX66 enthielt eine BamHI-Stelle. NX67 enthielt eine EcoRI-Stelle im Anschluß an die Polyadenylierungsstelle. Die PCR wurde durch Standardverfahren durchgeführt. Das Fragment wurde in pCDNA3 durch Standardverfahren eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde pGamma 1–4 genannt.

[0191] Die humanisierten variablen Regionen der schweren und leichten Ketten wurden auf ähnliche Weise synthetisiert. Eine Serie von acht überlappenden Oligonukleotiden wurden für jede variable Region plus native Maus-Leader-Sequenz synthetisiert. Die internen 6 Oligonukleotiden reichten von 79 bis 88 Basen in der Länge mit Überlappungen von 19 bis 26 Basenpaaren. Die Außerhalb-Oligonukleotide waren 40 bis 44 Basen in der Länge, und schlossen Restriktionsstellen ein (Vh; HindIII und BamHI, Vk; NotI und Nhel). Die 3'-Außerhalb-Oligonukleotide schlossen auch Intron-Splice-Donorstellen ein. Die PCRs enthielten jeweils ein pmol der internen Oligonukleotide und 30 pmol jedes der Außerhalb-Primer. Das Temperaturprofil der Reaktion war wie folgt: 1 Zyklus von 5 min bei 94°C, und 1 Zyklus von 5 min bei 72°C. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit den geeigneten Enzymen Restriktions-verdaut und in pC4-CK3 (Vk) oder pGamma 1–4 (Vh) eingefügt, um Plasmide pVKE und p4gammaB jeweils entstehen zu lassen. Beide Plasmide wurde mit BgIII und EcoRI-Restriktionsendonuklease gespalten. Ein 6 Kilobasen(kb)-Fragment aus pVKE und 3,2 kb-Fragment von p4gammaB wurden zusammengefügt, um pWE1A2 zu bilden. Das Plasmid pWE1A2 enthielt die vollständigen humanisierten schweren und leichten Ketten in im wesentlichen genomischer (Intron-enthaltender) Form. Die Antikörperexpression von COS- und CHO-Zellen, transfiziert mit pWE1A2, war sehr schlecht.

[0192] Das Plasmid wurde modifiziert, um die Antikörnergene in cDNA-Form zu enthalten. Eine zusätzliche BGH-Polyadenylierungsregion wurde hinzugefügt, um sich an die schwere Kette cDNA anzuschließen. Das DHFR-Gen und Kontrolelemente wurden hinzugefügt.

[0193] Die BGH-Polyadenylierungsregion wurde aus pCDNA3 unter der Verwendung von PCR kopiert und in pWE1A2 als ein BamHI-/EcoRI-Fragment eingefügt. Dem erhaltenen Plasmid fehlte die gamma-konstante Region, es konnte jedoch nun die cDNA-gamma-Kette als ein XbaI-/BamHI-Fragment aufnehmen.

[0194] RNA wurde von pWE1A2 transfizierten CHO-(dhfr)Zellen mit einem käuflich erhältlichem RNA-Extraktionskit (Glass Max, Gibco BRL) extrahiert. Eine reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde, wie durch den Hersteller angegeben, durchgeführt (Perkin Elmer Cetus). In diesem Verfahren wurde NX109 (GCTGACG-AATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAG), der an den 3'-Terminus der gamma-Kette konstanten Region anhybridisierte, verwendet, um spezifisch eine reverse Transkriptase-Reaktion zu primen, in der die gamma-Ketten-Messenger-RNA in cDNA kopiert wurde. NX109 und NX110 (CCGTCTATTACTGTTCTAGAGAGGGTC), die innerhalb der schwere Kette variablen Region anhybridisierten wurden verwendet, um die in der reversen Transkriptions-Reaktion erzeugte cDNA zu amplifizieren. Die PCR-Primer enthielten BamHI-(NX109) und XbaI-(NX110) Restriktionsstellen, um eine Klonierung zu erleichtern. Das verdaute PCR-Produkt wurde in das Plasmid eingefügt, um p1A2.C1 zu bilden.

[0195] Eine DHFR-Gen-Transkriptionseinheit wurde zu dem Plasmid hinzugefügt, um eine Genamplifikation in eukaryontischen Zellen zu ermöglichen. Vor der DHFR-kodierenden Sequenz befand sich ein SV40-Promotor und danach folgte ein SV40-Polyadenylierungssignal. Die DNA, die für DHFR und die Kontrollelemente kodierte, wurde durch PCR erzeugt und in p1A2.C1 eingefügt, um Plasmid p6.1.1 zu bilden.

[0196] Die leichte Ketten-Gene wurden in cDNA durch den identischen Prozess, der für die schwere Kette verwendet wurde, überführt. Oligonukleotid NX65 (GTTACGGGGCCCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAG), das an das 3'-Ende der kappa-konstanten Region anhybridisiert, wurde für die reverse Transkription verwendet und dann wurden NX65 und NXK1 (CAGCGTGCAGCGCACCAGGACATCAGGGCTCCTGCTCAG) zur PCR-Amplifikation des gesamten kappa-Ketten-Gens verwendet. Das PCR-Produkt wurde in p61.1 eingefügt, um pNRX451 zu bilden. Dieses Plasmid ist in [Fig. 9](#) dargestellt.

BEISPIEL 3

EXPRESSION UND ISOLIERUNG VON FINALEM KLON NRX451
c2-451c4-100NM HP-2 µM HP-161E13-50 µM-12G4-3E7

[0197] CHO(dhfr-)(ATCC CRL 9096)-Zellen wurden in 6-Well Platten unter der Verwendung von Lipofecta ce™ (Gibco) mit linearisiertem pNRX451-Plasmid transfiziert. Den transfizierten Zellen wurde es ermöglicht, sich in Iscoves modifizierten Dulbeccos Medium (IMDM) (Gibco), enthaltend 10% dialysiertes fötales Rinder-serum (dFBS) (Sigma) und einmal Hypoxanthin und Thymidin (Gibco), zu erholen. Nach 2 Tagen Erholung wurden die transfizierten Zellen anfangs in IMDM selektiert, das 10% dFBS und 800 µg/ml Geneticin® (Gibco) enthielt, dem jedoch Hypoxanthin und Thymidin fehlte.

[0198] Die überlebenden Zellen wurden einer Genamplifikation bei 1.000 Zellen/Napf in 96-Well Platten in IMDM, enthaltend 10% dFBS und 100 nm Methotrexat (Sigma) unterzogen. Vierzehn Tage-Überstände wurden in gamma/kappa ELISA auf Antikörper-Produktion getestet. Die am höchsten produzierenden Wells wurden ausgewählt vereinigt und als C2-451C4-100 nm HP bezeichnet.

[0199] Diese Zellen wurden auf 100 Zellen/Well in 96-Well Platten in IMDM, enthaltend 10% dFBS und 2 µM Methotrexat, amplifiziert. Vierzehn Tage-Überstände wurden in gamma/kappa ELISA getestet. Die am höchsten produzierenden Wells wurden ausgewählt und vereinigt und als C2-451C4-100 nm HP-2 µM HP bezeichnet.

[0200] Dieser Pool wurde bei 1 Zelle/Napf in 96-Well Platten in IMDM, enthaltend 10% dFBS und 2 µM Methotrexat, kloniert. Vierzehn-Einundzwanzig Tage-Überstände wurden in gamma/kappa ELISA getestet. Die höchsten produzierenden Klonen wurden in IMDM, enthaltend 10% dFBS und 2 µM Methotrexat, gehalten und in IMDM, enthaltend 10% dFBS und 10, 50 oder 200 µM Methotrexat, passiert.

[0201] Der am höchsten produzierende Klon wurde ausgewählt (C2-451C4-100 nm HP-2 µM HP-161E12-50 µM) und 2 Runden von begrenzter Verdünnungsklonierung in 96-well Platten in IMDM, enthaltend 10% dFBS und 50 µM Methotrexat, vor der Zellbank unterzogen. Der finale Klon wurde als C2-451C4-100 nm HP-2 µM HP-161E12-50 µM-12G4-3E7 bezeichnet.

BEISPIEL 4

IMMUNREAKTIVITÄT VON NRX451

[0202] Von dem humanisierten NRX451-Antikörper wurde gezeigt, daß er eine Immunreaktivität zeigte, wie durch kompetitiven Immunreaktivitäts-ELISA unter der Verwendung des Maus-NR-LU-10 als einem Vergleich. Diese Ergebnisse sind in [Fig. 11](#) gezeigt. Diese Ergebnisse zeigen, daß der humanisierte Antikörper mehr als 65% der Immunreaktivität von NR-LU-10 zeigte.

[0203] Das Protokoll für den kompetitiven Immunreaktivitäts-ELISA ist im folgenden angegeben.

Kompetitiver Immunreaktivitäts-ELISA

[0204] Die Immunreaktivität wird in einem kompetitiven Bindungs-ELISA ermittelt, wo es Standard Maus-NR-LU-10 und Testantikörper ermöglicht wird, mit Peroxidase-markiertem Maus NR-LU-10 um die Bindung an einen NP40(Sigma)-Extrakt der KSA-Antigen-positiven LS174 Zelllinie kompetitiv zu sein.

Plattenherstellung:	Beschichtet 96-Well Platte mit 100 µl/w11 optimierter Verdünnung von NP40-Extrakt von LS174. Inkubiere auf Trocknung über Nacht bei 37°C.
Reagenzherstellung: Verdünnungsmittel: Standard- und Testanti-körper:	PBS + 5% Hühnerserum (Sigma) + 0,5% Tween 20 (Sigma) (PCT)
	Verdünnen Standard- und Testantikörper auf 12 µg/ml in PCT. Führe 9 log2-Verdünnungen in PCT durch.
Peroxidase-NRLU-10:	Verdünnen auf optimierte Konzentration in PCT.

[0205] Füge 100 µl Peroxidase-NR-LU-10 zu 500 µl von jeder Verdünnung von Standard- und Testantikörper für finale Konzentrationen von 10 µg/ml (66,67 nm) auf 0,2 µg/ml hinzu.

- Test: Wasche Platte in PBS + 0,5% Tween 20 unter der Verwendung eines automatisierten Plattenwaschgeräts.
Füge 100 µl Verdünnung in zweifachen Ansätzen zur Platte hinzu. Inkubiere bei Raumtemperatur für 60 Minuten. Wasche wie oben. Füge 100 µl Substrat-Puffer zu jedem Well hinzu. Inkubiere bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Ablesen auf automatisiertem Plattenlesegerät.
- Berechnungen:
Unter der Verfolgung einer log-logit-Transformation der Daten, wo Kurven an die selbe Steigung angepaßt werden, wird die Konzentration des nicht-markierten Kompetitor-Antikörpers, die für 50% Inhibition (k) benötigt, bestimmt.
 $k_{\text{Standard}}/k_{\text{Test}} \times 100 = \% \text{ Immunreakтивität}$

BEISPIEL 5

[0206] Einige Variabilität in der Gewebeaufnahme von radiomarkierten Antikörpern von Untersuchung zu Untersuchung wird beobachtet. Das beste Verfahren für einen in vivo-Vergleich von zwei verschiedenen Antikörper-Konstrukten schließt eine Markierung jedes mit verschiedenen Isotopen (z. B. I-131 und I-125) und Koinjizieren eines äquimolaren Gemisches der Antikörper in Tumor-tragende Nacktmäuse ein. Experimentell entfernt dies ein Ausmaß von Inter-Tier-Variabilität aus den Bioverteilungsdaten. Dies wurde zum Vergleich von CHO-produzierten humanisiertem NR-LU-13 („NRX451“) und Hybridomproduziertem Maus-NR-LU-10 durchgeführt. Da dies zwei vollständig verschiedene Proteine sind, wurden einige Unterschiede in den absoluten Pharmakokinetiken erwartet und beobachtet. Jedoch, wenn auf die verschiedenen Blut-Pool-Konzentrationen, die in jedem Gewebe vorhanden waren, korrigiert, wurde von diesen beiden Proteinen gefunden, daß sie zu jedem Zeitpunkt analoge Profile an Bioverteilung zeigten. Dies kann aus [Fig. 12](#) entnommen werden. Der in [Fig. 12](#) gezeigte Wert sind die Verhältnisse, definiert durch Nehmen (% injizierte Dosis/Gramm Gewebe), geteilt durch die (% injizierte Dosis/Gramm an Blut) für jedes Antikörper-Konstrukt. Gewebeproben waren Blut, Schwanz (die Stelle der Injektion), Haut, Muskel, Knochen, Lunge, Leber, Milz, Magen, Niere, Intestine und Tumor (subkutaner SW-1222 Colonkarzinom-Xenografie). Mit einer Ausnahme blieben die durchschnittlichen Werte jeder Gewebe alle unterhalb 1,0 für alle hauptsächlichen Organe und Gewebe, was von wenig spezifischer Rückhaltung von radiomarkiertem Antikörper außerhalb des Blutstammenden Beitrags an Radioaktivität anzeigen war. Die Ausnahme ist Tumor, wo beide Konstrukte übereinstimmende zunehmende spezifische Lokalisierung über die Zeit von nahezu identischer Größenordnung zeigen. Diese Daten unterstützen die in vitro-Vermittlung, so daß eine volle Immunreaktivität durch das humanisierte Konstrukt zurückerhalten wurde und so daß wenig Störung in der insgesamten Nicht-Zielgewebe-Verteilung durch den Humanisierungsprozess ausgeübt wurde.

[0207] Trotz der Tatsache, daß weder der CHO- noch der Larven-NRX451 in GMP-Reinheit hergestellt wurde, wurde eine vorläufige zweifach Marker Coinjektionsstudie in dem selben Xenograft-Modell wie oben durchgeführt. Die Ergebnisse der Bioverteilungen, die zu 4, 24, 48 und 168 Stunden nach der Koinjektion der Proteine durchgeführt wurde, zeigte, daß sie bemerkenswert ähnliche gesamte Lokalisierungsmuster besitzen. Auch durch Flußzytometrie gab es keine nachweisbare Bindung von irgendwelchem NR-LU-10 an rote Blutzellen, Granulozyten, Monozyten oder Lymphozyten.

[0208] Die Pharmacokinetik und Bioverteilungsanalysen jeder Form von NRX451 wurden in Nacktmäusen durchgeführt, die einen menschlichen Colonkarzinom-Xenograft (SW1222) trugen. [Fig. 13](#) zeigt die Bioverteilung von NRX451 hergestellt in CHO-Zellen, Tabakpflanzenzellen und Insektenlarven. Der Antikörper wurde in jedem Fall mit ¹²⁵I radiomarkiert. Vier Mäuse pro Gruppe wurden in die Schwanzvene mit 50 oder 100 µg Antikörper injiziert. Die Verteilung der Radioaktivität in Blut, Schwanz, Lunge, Leber, Milz, Magen, Niere, Intestine und Tumor wurde bei 4, 24, 48, 120 und 168 Stunden bestimmt.

[0209] Das Gesamt muster zeigte eine übereinstimmend abnehmende Konzentration von Antikörper in Blut und in allen Weichgeweben zu aufeinanderfolgenden Zeitpunkten. Die in vivo-Immunreaktivität wird durch das positive Verhältnis von Tumor zu Blutzählungen zu jeden Zeitpunkten 24–168 Stunden und durch die Zunahme in Tumor-Counts über die 0–48 Stunden-Periode hinweg gezeigt. Kein signifikanter Nicht-Target-Rückhalt von Radiomarker war außerhalb der Blutpool-Aktivität in jedem Organ ersichtlich.

BEISPIEL 6

CHEMISCHE MODIFIKATION VON NRX 451

[0210] Das für die chemische Modifikation von NRX451, hergestellt gemäß Beispiel 1 bis 3, verwendete Oxidations-/Reduktionsverfahren wird beschrieben. In diesem Beispiel wurden 50 mg CHO-produziertem NRX451 auf 5,0 mg/ml mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) in einer 50 ml Erlenmeyerflasche verdünnt. Die Lösung wurde konstant während des Verfahrens bei 150 U/min unter der Verwendung einer Magnetrührplatte gerührt. Zu der Antikörperlösung wurden 1,0 ml (10% v/v) von 0,4 M Natriumphosphat, pH 7,0 hinzugefügt, was den pH der finalen Lösung auf 7,0 einstellte. Methionin (8,2 mg) wurde dann zu dem Reaktionsgemisch hinzugefügt, so daß die finale Konzentration 5,0 mM ist. Für den Oxidationsschritt wurden 117,6 mg von Natriummetaperiodat (NaJO_4) zu der gerührten Antikörperlösung hinzugefügt, um eine finale Konzentration von 50 mM zu erhalten. Der Oxidationsreaktion wurde es ermöglicht, für 20 Minuten bei 25°C zu röhren und dann wurde das Reaktionsgemisch mit 310 µl Ethylenglycol gelöscht. Nach weiteren 20 Minuten wurde das Reaktionsgemisch dann mit 2,0 mg/ml mit 0,5 M kaltem Natriumborat bei pH 9,0 (25% des finalen Volumens) und 7,44 ml PBS-Verdünnung.

[0211] Für den Reduktionsschritt wurde die Lösung auf 4°C in einem Eisbad gekühlt gefolgt von einer Zugabe von 94,6 mg Natriumborhydrid (NaBH_4), um eine finale Konzentration von 100 mM zu erhalten. Nach Röhren bei 4°C für 3 Stunden wurde das Gemisch mit Natriumtetrathionat behandelt und die oxidierte/reduzierte Antikörperlösung wurde dann in PBS-Puffer ausgetauscht, einem geeignetem Lagerpuffer.

[0212] Die Lectin-Bindungsprofile des oxidierten/reduzierten CHO-produzierten NRX451 und nicht-oxidiertem CHO-produziertem NRX451 wurden verglichen, um das Ausmaß der Kohlenhydrat-Modifikation zu bestimmen. Es gibt eine besondere Veränderung in den Lectin-Bindungsprofilen von NRX451 und oxidiertem/reduziertem NRX451, wie in [Fig. 14](#) gesehen werden kann. Das terminal-verbundene Sialinsäure alpha (2-) an Galactose oder N-Acetylgalactosamin und ein Galactose-B (1-40-N Acetylglucosamin, das auf dem nicht-oxidierten NRX451 vorhanden ist, wurden verändert. Beide dieser Kohlenhydrate sind gegenüber der Oxidation durch Perjodat empfindlich und scheinen verändert worden zu sein.

[0213] Die C'MC- und ADCC-Tests wurden an zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt, MCF-7, ATCC Nr. HTB 22 und SW1222, die das mit NRX451 reaktive Antigen exprimieren. [Fig. 15a](#) und [Fig. 15b](#) zeigen, daß sehr wenig C'MC-Aktivität mit dem oxidierten/reduzierten NRX451 assoziiert ist. Jedoch weist nicht behandeltes NRX451 hohe Spiegel von C'MC-Aktivität auf. [Fig. 15c](#) zeigt zwei Kontrollen von NRX451, Eine, die unter der Verwendung von N-Glycosidase F (PNGnase F) deglycosyliert wurde, einem Enzym, von dem bekannt ist, daß es alle Typen von Asparagin-gebundenen N-Glycane hydrolysiert. Die andere Kontrolle ist NRX451, welches in der Anwesenheit von Tunicamycin, einem bekannten Glycosylierungsinhibitor, kultiviert wurde. Beide der Kontrollen zeigen eine verringerte C'MC-Aktivität in den in vitro-Tests. [Fig. 15d](#) zeigt, daß die ADCC-Aktivität in allen der Kontrollen sowie in dem oxidierten/reduzierten NRX451 intakt bleibt. Wenn NRX451 und oxidiertes/reduziertes NRX451 in ein Maus-Model injiziert wurden, war die Bioverteilung identisch, wie in [Fig. 16a](#), b und c gezeigt.

[0214] NRX451 und oxidiertes/reduziertes NRX451 wurden gemäß GMP hergestellt und eine geeignete Dosismenge im Anschluß an die Pretargeting-Methodologie wurde an Patienten mit Krebs verabreicht, um die Blutentfernung zu beobachten und zu vergleichen. [Fig. 17](#) zeigt, daß die Blutentfernung der zwei Typen von NRX451 bis 24 Stunden nach der Injektion äquivalent war.

BEISPIEL 7

KLINISCHE AKTIVITÄT VON CHO-EXPRIMIERTEM NRX451

[0215] In einem Beispiel dieser Methodologie werden Maiszellen mit einem geeigneten Vektor transfiziert (z. B. U.S.-Patente Nm. 5,120,657; 5,015,580; 5,149,655; 5,405,779; 5,503,998; 5,506,125; 5,525,510 oder 5,584,807), der die Gene für NRX451 und der deglycosylierten Mutante von NRX451 enthält. Die deglycosyierte Mutante von NRX451 wurde durch Herstellen einer Punkt-Mutation an Position 297 (dem Ende der C_H2-Domäne) auf der schweren Kette eines Asn zu Gln hergestellt, wodurch die N-verbundene Glycosylierungsstelle beseitigt wurde. Die Antikörper wurden exprimiert und gereinigt und auf ADCC und C'MC gegen die menschliche Brust-Andenkarzinom-Zelllinie MCF-7 (HTB 22 ATCC Lagerstätte) getestet.

[0216] Für die C'MC-Studien wurden MCF-7-Zellen (2×10^6) mit ^{51}Cr für 2 Stunden bei 37°C markiert. Nach

mehrfachen Waschungen in Kulturmedium (DMEM/F12, 10% fötales Kälberserum) wurden die Zellen zu 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatten bei 10^4 Zellen pro Well hinzugefügt. NRX451-Antikörper, hergestellt in CHO-Zellen (Säugetier), hergestellt in Mais und die deglycosyierte Mutante, auch in Mais hergestellt, wurde in log₁₀-Verdünnungen, beginnend bei 5 µg/ml, hinzugefügt. Zusätzlich wurde menschliches Serum als eine Quelle an Komplement bei einer finalen Konzentration von 10% hinzugefügt. Die Volumen der Wells wurden auf 200 µl eingestellt. Nach einer 3,5 ständigen Inkubationsperiode bei 37°C wurden die Platten zentrifugiert und 100 µl Volumen wurden von jedem Well gesammelt und in einem Packard-Gamma-Zähler gezählt. Zusätzlich zu der durch den Antikörper und Komplement induzierten spezifischen Freisetzung wurde die spontane Freisetzung von ⁵¹Cr durch Sammeln von Überständen aus Wells, die die Zellen alleine enthielten, bestimmt. Die Gesamtfreisetzung wurde durch Hinzufügen von 0,1% zu NP40 zu den Wells und Sammeln von 100 µl Volumen, wie oben, bestimmt. Die spezifische Freisetzung wurde durch Subtrahieren der spontanen Freisetzung aus jeder Testprobe und der gesamt möglichen Freisetzung und Teilen der eingestellten Testfreisetzung durch die eingestellte Gesamtfreisetzung (Prozent Cytoxität) berechnet. Alle Proben wurden in dreifachen Ansätzen gesammelt und die Daten als ein Mittel und der Standard-Abweichung dieser Werte präsentiert.

[0217] Im Fall der ADCC-Analyse wurden dieselben Verfahren verwendet, wie für C'MC beschrieben, mit der Ausnahme, daß anstelle von 10% menschlichem Serum menschliche periphere Blut-Lymphozyten-Effektorzellen bei einem Effektor zu Targetzellen Verhältnis von 25:1 hinzugefügt wurden. Die Platte wurde vor dem 3,5 ständigen Inkubationstest zentrifugiert, um eine Effektor- und Zielzellbindung zu erleichtern.

[0218] Die Ergebnisse, gezeigt in [Fig. 18](#) und [Fig. 19](#), zeigen, daß der NRX451-Antikörper, hergestellt in CHO-Zellen, effizient C'MC und ADCC vermittelt. Zusätzlich vermittelt in Maiszellen produzierter NRX451 ADCC, jedoch nicht C'MC. Zuletzt war die in Maiszellen hergestellte Asn zu Gln Mutante vollständig ineffektiv bei der Vermittlung von sowohl C'-MC oder ADCC.

[0219] Diese Ergebnisse zeigen, daß ein Fachmann IgG1 humanisierte Antikörper herstellen kann, die nicht in der Lage sind, aufgrund von post-translationalen Modifikationsunterschieden zwischen der Pflanzen- und Säugetierzell-Expression C'-MC zu vermitteln. Zusätzlich führt eine Mutation eines Asn zu Gln zu der Beseitigung von ADCC durch die Unterbrechung einer Glycosylierungsstelle. Zusammen zeigen diese Daten, daß man einen Antikörper auf eine Effektorfunktion, basierend auf der Auswahl des Expressionssystems oder einer Kombination von einzelnen Stellenmutationen für die N-verbundene Glycosylierung und die Auswahl eines Pflanzenexpressionssystems, zuschneiden kann.

BEISPIEL 8

ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE VON NRX451

[0220] Die N-Glycosylierungsstelle in der CH₂-Domäne der menschlichen Immunglobulin schweren Kette wurde ortsspezifisch durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mutagenisiert. Die Oligonukleotide NX156 (5' AGCAGTAC CAA AGC ACG TAC CGG GTG 3') und NX157 (5' TACGTGCTTTG GTA CTG CTC CTC 3') wurden synthetisiert (DNAgency, Malvern, PA), um an die kodierenden (NX156) und nicht-kodierenden (NX157) Strände des menschlichen schwere Kette Gens über die Region hinweg, die die N-Glycosylierungsstelle enthält (Asn-Ser-Thr), zu hybridisieren. Beide Oligonukleotide enthielten eine zwei-Basen-Fehlpaarung, die so aufgebaut war, um ein Codon von AAC (Asparagin) zu CAA (Glutamin) zu mutieren. In der ersten Runde an PCR wurde in getrennten Reaktionen NX156 mit einem Stromabwärtsprimer NX113 (5' GCTGACGGAT CCT-CATTAC CGGGAGACAG GGAG 3') gepaart und NX157 wurde mit einem Stromaufwärtsprimer NX110 (5' CCGTCTATTA CTGTTCTAGA GAGGTC 3') gepaart und Verwendung von Plasmid pNRX451 als einem Templat und Ultma-DNA-Polymerase gemäß den Angaben des Herstellers (Perkin Elmer, Branchburg, NJ). Die erhaltenen PCR-Produkte waren 476 Basenpaare für die NX110/NX157-Primer und 634 Basenpaare für das NX156/NX113-Primerpaar und umfaßten Teile der schweren Kette, die sich stromaufwärts und stromabwärts jeweils von der Mutation erstreckten. Diese PCR-Produkte wurden aus Agarosegelen über Geneclean (Biolol, Vista, CA) gereinigt und zu einem kontinuierlichem Fragment in einer zweiten PCR unter der Verwendung von Primern NX110 und NX113 kombiniert. Das erhaltene PCR-Produkt war 1190 Basenpaare und enthielt die gewünschte Mutation. Das Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen SstII und BamHI verdaut, um ein 471 Basenpaar-Fragment zu erzeugen, was in den Expressionsvektro pNRX451 kloniert wurde, wobei es das N-Glycosylierungsstellen-enthaltende Wildtyp-Genfragment ersetzte.

BEISPIEL 9

IN VIVO EVALUIERUNG VON NRX451 GESAMTEM ANTIKÖRPER HERGESTELLT IN MAISSAMEN

[0221] Gereinigter NRX451 gesamter Antikörper aus Maissamen wurde mit ^{125}J radiomarkiert und mit dem CHO-Zell produzierten Maus-NR-LU-10 Gesamtantikörper, radiomarkiert mit ^{131}J verglichen. Ein äquimolares Gemisch der zwei Antikörper (25 µg/25 µg) wurde intravenös in Nacktmäuse (20–25 g) injiziert, die subkutane SW-1222 Kolonkarzino-Xenografts trugen, und die Blutentfernung wurde im Anschluß an die i. v.-Injektion des selben Gemisches in nicht-tumortragende Mäuse ermittelt.

Studie #1:

[0222] $T = 0$, i. v.-Injektion eines Gemisches von 25 µg ^{131}J -Maus-NR-LU-10 Gesamtantikörper (muLU-10) und 25 µg ^{125}J -Mais-hergestelltem NRX451-Gesamtantikörper in Nacktmäusen (20–25 g), die subkutane SW-1222-Colonkarzinon-Xenografts trugen. Die Tiere wurden 4, 24, 48, 120 und 168 Stunden nach der Verabreichung getötet und präpariert. Tumor und Nich-Zielgewebe wurden gewogen und zum Nachweis von ^{131}J und ^{125}J gezählt. Eine getrennte Gruppe von nicht-tumortragenden Balb/c-Mäusen wurde mit demselben Gemisch injiziert und serielle Blutproben wurden genommen, um die Rate des Entfernens der Radioaktivität aus dem Blut zu vergleichen.

Ergebnisse:

[0223] Wie in [Fig. 20](#) gezeigt, wurden beide Isotopen in nahezu identischen Proben aus dem Blut entfernt, sowohl in der frühen (α -Phase) Verteilung, und der kurzfristigen späteren Eliminierung-dominierten (β -Phase) Phase. Die Eliminierungshalbwertszeiten wurden als 77,0 Stunden für den humanisierten NR-LU-13-Antikörper (huLu-13) gegenüber 74,3 für die co-injizierte Mausform berechnet. Im Hinblick auf Blutverweilszeit gibt es keinen erkennbaren Unterschied zwischen NRX451-Gesamt-Antikörper und Maus-NR-LU-10.

[0224] Die Bioverteilung der co-injizierten Konstrukte war ebenfalls sehr ähnlich. Gezeigt in [Fig. 21a](#) und [Fig. 21b](#) sind die Blut-, Weichgewebs- und Tumorkonzentrationen von Radioaktivität in tumortragenden Nacktmäusen zu fortschreitenden Zeiten nach der Verabreichung. Beide Konstrukte zeigen ähnliche Abnahmekonzentrationen in allen Weichgeweben, die dem Zeitverlauf der Eliminierung aus dem Blut folgt. Es gibt wenige Hinweise von nichtspezifischer Rückhaltung von Radioaktivität in irgendeinem Gewebe, mit der Ausnahme von Tumor. Das Tumoraufnahmeprofil zeigt eine Zunahme in der Konzentration von Radioaktivität nach 48 Stunden, wobei die % i. d./g-Werte bei 120 Stunden aufgrund des fortlaufenden Tumorwachstums verschwunden waren (die aktuelle Menge, %i. d., von beiden Isotopen in Tumor bei 120 Stunden ist fast doppelt von derjenigen zu irgendeinem vorhergehenden Zeitpunkt). Beide Maus- und humanisierte Antikörper zeigten quantitativ ähnliche Tumoraufnahmeprofile im Hinblick auf Rate, Ausmaß und Rückerhalt der Aufnahme. In der in vivo-Evaluierung von jedem Gesamt-Antikörper gibt es keine nennenswerten Unterschiede zwischen hu-NR-LU-13-Gesamt-Antikörper (exprimiert in Maissamen) und der Mausform (Hybridomzellen).

Studie #2:

Aufbau:

[0225] $T = 0$, i. v.-Injektion von 50 µg ^{125}J -NRX451 chemisch konjugiert an Streptavidin (NRX451/SA) in Nacktmäuse (20–25 g), die subkutane SW-1222 Colonkarzinom-Xenografts trugen. Die Tiere wurden bei 4, 24, 48, 120 und 168 Stunden nach der Verabreichung getötet und präpariert. Tumor und Nicht-Zielgewebe wurden gewogen und zum Nachweis von ^{125}J gezählt.

Ergebnisse:

[0226] Die Evaluierung des gereinigten NRX451-Gesamtantikörpers aus Maissamen, fortgesetzt mit der chemischen Konjugation dieses Materials an Streptavidin, und der anschließenden Verwendung von „pre-Targeter“-Tumorzuführung. Zuerst wurde jedoch eine Evaluierung des Streptavidinkonjugats alleine durchgeführt. In [Fig. 22](#) gezeigt sind die Blut-, Weichgewebs- und Tumorkonzentrationen von Radioaktivität in tumortragenden Nacktmäusen zu fortschreitenden Zeiten nach der Verabreichung. Es gibt wenig Hinweise auf nicht-spezifische Rückhaltung von Radioaktivität in irgendeinem Gewebe, mit der Ausnahme von Tumor. Das Tumoraufnahmeprofil zeigt eine Zunahme in der Konzentration von Radioaktivität bis zu 120 Stunden. Das gesamte Muster zeigt eine übereinstimmende abnehmende Konzentration von Antikörper im Blut und allen weichen Ge-

weben zu fortschreitenden Zeitpunkten. Die in vivo-Immunreaktivität wird durch das positive Verhältnis von Tumor-zu-Blut-Konzentrationen zu allen Zeitpunkten von 24–168 Stunden und durch die Zunahme in der Tumorkontrolle über die 0–48 ständige Periode hinweg gezeigt. Der höchste Wert der Tumoraufnahme bei 40–50% ID/g ist ähnlich zu dem mit muNR-LU-10/SA beobachteten, sowie mit dem wie oben beschriebenen nicht-konjugierten Antikörper. Der Tumorrückhalt über die Zeit hinweg ist ähnlich zu den historischen Kontrollen von muNR-LU-10/SA. Wenig signifikante Nicht-Ziel-Retention von Radiomarker ist oberhalb der Blut-Pool-Aktivität in jedem Organ zu dem Zeitpunkt 24–168 Stunden ersichtlich. Hohe Werte in allen gut durchspülten Geweben bei 4 Stunden können mit der hohen Blut-Pool-Aktivität zu diesem Zeitpunkt zusammenhängen.

Studie #2 (Fortsetzung):

Aufbau:

[0227] T = 0, i. v.-Injektion von 400 µg ¹²⁵J-NRX451-Gesamtantikörper (Maissamen) chemisch konjugierte an Streptavidin (NRX451/SA) in Nacktmäuse (20–25 g), die subkutane SW-1222 Colonkarzinom-Xenografts tragen. t = 20 Stunden, i. v.-Injektion von 100 µg von synthetischem Ausscheidungsmittel (GN16LCBT). t = 26 Stunden, i. v.-Injektion von 1,0 µg ¹¹¹In-DOTA-Biotin. Die Tiere wurden bei 2, 24, 48 und 120 Stunden nach der Verabreichung von ¹¹¹In-DOTA-Biotin (28, 50, 74 und 144 Stunden von t = 0) getötet und präpariert. Tumor und Nicht-Zielgewebe wurden gewogen und für den Nachweis von ¹²⁵J und ¹¹¹J gezählt. Getrennte Gruppen von nicht-Tumour tragenden Balb/c-Mäusen wurden mit 400 µg ¹²⁵J-NRX451/SA injiziert, gefolgt von 24 Stunden mit Kochsalzlösung oder 100 µg synthetischem Entfernungsmittel (GN16LCBT), und serielle Blutproben wurden genommen, um die Rate des Entfernens der Radioaktivität aus dem Blut zu vergleichen.

Ergebnisse:

[0228] Wie in [Fig. 23](#) gezeigt, wurde die Radioaktivität langsam aus dem Blut auf eine Weise eliminiert, die ähnlich zu dem nicht-konjugierten Antikörper ist, sowohl in der frühen (α -Phase) Verteilung und der späteren Eliminierungs-dominierten (β -Phase) Phase. Die Injektion von synthetischem Entfernungsmittel bei 24 Stunden, ergab eine schnelle Abnahme der Blutradioaktivität auf Spiegel < 10% der Ausgangskonzentration. Ein leichter Anstieg in der Blutradioaktivitäts-Konzentration (< 1%) wird von 24–48 gesehen, übereinstimmend mit historischen Ergebnissen, die mit dem muLU-10/SA-Konjugat erzielt wurden. Der Nadir in der Serumkonzentration war ausreichend, um einen verringerten Hintergrund für die Pretargeting-Experimente herzustellen.

[0229] Die Evaluierung von NRX451/SA in dem vollen Pretargeting-Modus wurde durch Befolgen des oben aufgelisteten Dosierungsschemata erreicht. In [Fig. 24A](#) gezeigt sind die Blut-, Weichgewebe- und Tumorkonzentrationen von ¹²⁵J-Radioaktivität, die mit dem NRX451/SA-Konjugat assoziiert ist, zu den Zeitpunkten im Anschluß an die Entfernungsmittel und DOTA-Biotin-Verabreichung. Die Blutspiegel sind relativ gering, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Studien in den nicht-tumortragenden Mäusen und die Radioaktivität, die gewöhnlich im Blut vorhanden ist, wurde auf die Leber lokalisiert, übereinstimmend mit der Rezeptor-vermittelten Ausscheidung, die mit der Verwendung des GN16LCBT-Entfernungsmittel assoziiert ist. Die Tumoraufnahme, während offensichtlich geringer als die in [Fig. 22](#), ist aktuell größer in stöchiometrischen Mengen von NRX451/SA, unter der Berücksichtigung daß die Daten in [Fig. 22](#) aus der Verabreichung von 50 µg von NRX451/SA gegenüber 400 µg von NRX451/SA in [Fig. 24A](#) Daten abstammten. Der Tumorrückhalt über die Zeit hinweg ist ähnlich zu historischen Kontrollen von muNR-LU-10/SA, verwendet in dem selben Dosierungsformat. Wenig signifikante Nicht-Ziel-Rückhalt von Radiomarker ist oberhalb der Blut-Pool-Aktivität in jedem Organ und dem durch die Leber verarbeiteten Material ersichtlich.

[0230] [Fig. 24B](#) zeigt die entsprechenden Blut-, Weichgewebe- und Tumorkonzentrationen von ¹¹¹In-Radioaktivität, die mit der DOTA-Biotin-Verabreichung assoziiert ist. Niedrige Konzentrationen in allen Geweben, außer dem Tumor, werden gesehen, wobei die Rate, das Ausmaß und der Rückhalt von Tumor-assozierter Radioaktivität zu allen Zeitpunkten mit derjenigen übereinstimmt, die unter der Verwendung des muLU-10/SA als einem Targeting-Mittel beobachtet wurde. In der Voll-Pretargeting-Anwendung, unter der Verwendung von chemischen Konjugaten an Streptavidin, gibt es keine wesentlichen Unterschiede zwischen NRX451-Gesamtantikörper (exprimiert in Maissamen) und der Maus-Form (Hybridomaexprimiert).

[0231] Aus dem vorangehendem wird es ersichtlich sein, daß, obwohl spezifische Ausführungsformen der Erfindung hier zum Zwecke der Verdeutlichung beschrieben wurden, verschiedene Modifikationen gemacht werden können ohne sich von dem Geist und dem Bereich der Erfindung zu entfernen.

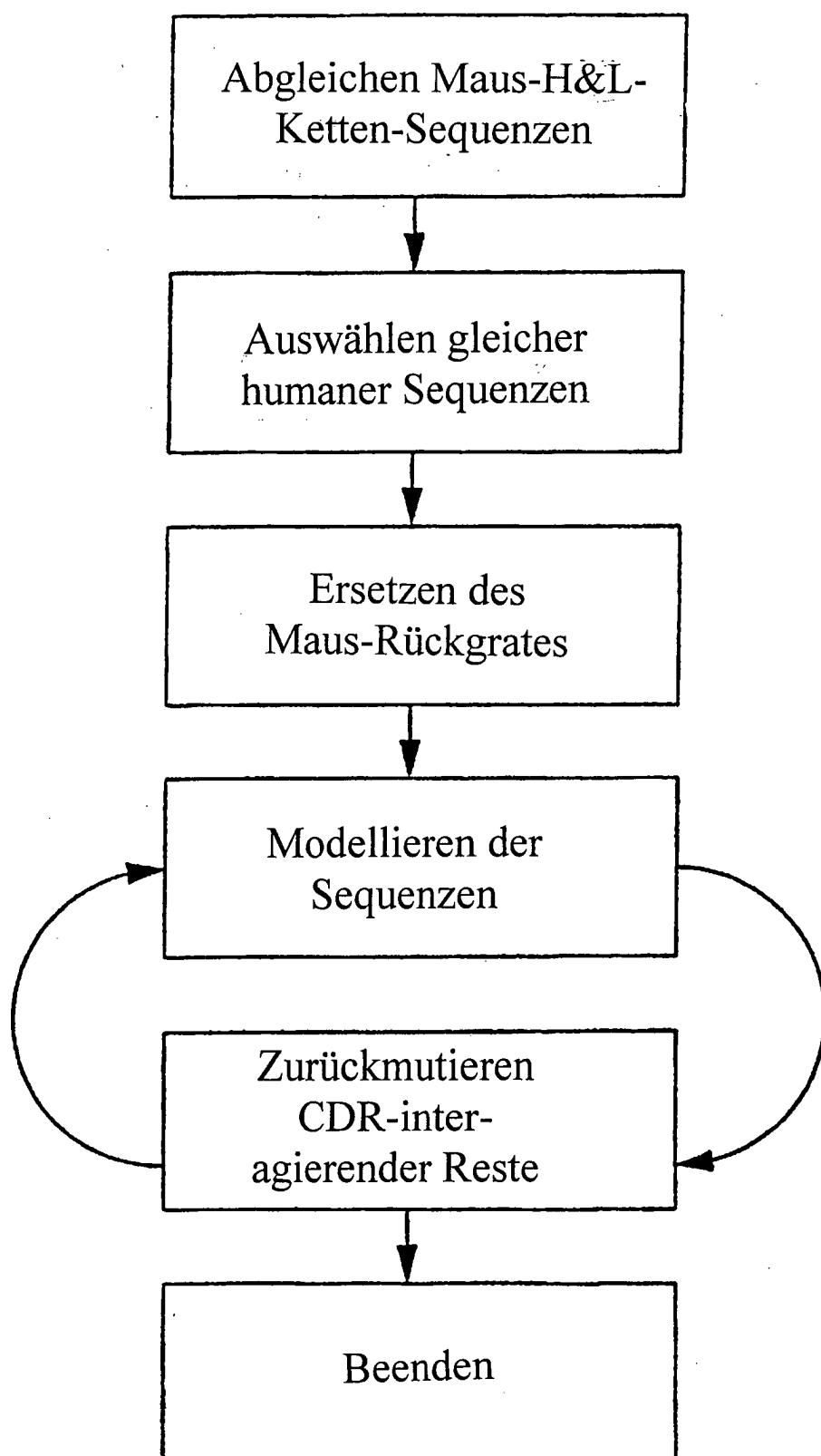
Patentansprüche

1. Humanisierter Antikörper oder Antigen-bindendes humanisiertes Antikörperfragment, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment spezifisch an das Antigen bindet, das durch Antikörper NR-LU-13 (ATCC CRL-12360) gebunden wird, und wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment entweder keine N-gekoppelte Glycosylierung besitzt oder seine N-gekoppelte Glycosylierung post Expression modifiziert wurde, um die Immunogenität oder Toxizität zu verringern.
2. Humanisierter Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 1, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment keine N-gekoppelte Glycosylierung besitzt.
3. Humanisierter Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment mutiert wurde, um eine N-gekoppelte Glycosylierung zu verhindern.
4. Humanisierter Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 1, wobei die N-gekoppelte Glycosylierung des Antikörpers oder Antikörperfragments post Expression modifiziert wurde, um die Immunogenität oder Toxizität zu verringern.
5. Humanisierter Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 4, wobei die N-gekoppelte Glycosylierung chemisch modifiziert wurde.
6. Humanisierter Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 5, wobei die N-gekoppelte Glycosylierung durch Oxidation modifiziert wurde.
7. Humanisierter Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 6, wobei die N-gekoppelte Glycosylierung durch Oxidation modifiziert wurde, gefolgt von Stabilisierung der Aldehyde, die durch die Oxidation erzeugt wurden.
8. Humanisierter Antikörper oder Antikörperfragment nach Anspruch 7, wobei die N-gekoppelte Glycosylierung durch Oxidation, gefolgt von Reduktion, modifiziert wurde.
9. Humanisierter Antikörper oder Antikörperfragment nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei eine O-gekoppelte Glycosylierung des Antikörpers oder Antikörperfragments reduziert oder eliminiert wurde.
10. Verfahren zur Reduktion der Immunogenität oder Toxizität eines Antikörpers oder eines Antigen-bindenden Antikörperfragments der IgG-Klasse, umfassend: Exprimieren in einem Pflanzen-Wirtssystem einer Nukleotid-Sequenz, die Nukleinsäuren umfaßt, die für einen humanisierten IgG-Antikörper oder ein Antigen-bindenden Antikörperfragment kodieren, wobei das Wirtssystem den humanisierten Antikörper oder das Antikörperfragment nicht N-gekoppelt glycosyliert.
11. Verfahren nach Anspruch 10, umfassend, vor dem Schritt der Expression, den Schritt von Auswählen eines Wirtssystems auf die Eigenschaft hin, daß das System einen Antikörper oder ein Antikörperfragment nicht N-gekoppelt glycosyliert.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei das Wirtssystem zusätzlich den Antikörper oder das Antikörperfragment nicht O-gekoppelt glycosyliert.
13. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei der humanisierte Antikörper oder das Antikörperfragment spezifisch an das Antigen bindet, das durch den Antikörper NR-LU-13 (ATCC CRL-12360) gebunden wird.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10, 11, 12 oder 13, wobei die Nukleinsäuren mutiert wurden, um eine N-gekoppelte Glycosylierung zu verhindern.
15. Verfahren nach Anspruch 10, 11, 12, 13 oder 14, wobei das Pflanzen-Wirtssystem aus Mais stammt.
16. Verfahren zur Modifizierung der N-gekoppelten Glycosylierung eines Antikörpers oder eines Antigen-bindenden Antikörperfragments der IgG-Klasse, umfassend Unterziehen des Antikörpers oder Antikörperfragments einer post Expression Modifikation, die die N-gekoppelte Glycosylierung modifiziert, wobei die N-gekoppelte Glycosylierung chemisch modifiziert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die N-gekoppelte Glycosylierung durch Oxidation modifiziert wird.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die N-gekoppelte Glycosylierung durch Oxidation, gefolgt von Stabilisierung der durch die Oxidatins erzeugten Aldehyde, modifiziert wird.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die N-gekoppelte Glycosylierung durch Oxidation, gefolgt von Reduktion, modifiziert wird.
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Oxidation mit NaJO_4 erfolgt, und die Reduktion mit NaBH_4 erfolgt.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 16, 17, 18, 19 oder 20, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment humanisiert ist.
22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei der humanisierte Antikörper oder das Antikörperfragment spezifisch an das Antigen bindet, das durch Antikörper NR-LU-13 (ATCC CRL-12360) gebunden wird.
23. Konjugat, umfassend einen humanisierten Antikörper oder ein Antikörperfragment nach einem der Ansprüche 1 bis 9, direkt oder indirekt angebracht an einen Liganden oder Antiliganden, ein diagnostisches Mittel oder ein therapeutisches Mittel.
24. Konjugat nach Anspruch 23, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment in Insektenzellen, Säengerzellen, bakteriellen Zellen, Hefe- oder Pflanzenzellen exprimiert wurde oder durch Oxidation, gefolgt von Reduktion, reduziert wurde oder mutiert wurde, um eine N-gekoppelte Glycosylierung zu verhindern, oder Kombinationen davon.
25. Konjugat nach einem der Ansprüche 23 oder 24, wobei der Ligand oder Antiligand Biotin, Avidin oder Streptavidin ist.
26. Konjugat nach Anspruch 25, wobei der Ligand oder Antiligand Streptavidin ist und wobei der Antikörper NRX451 ist oder das Antikörperfragment von NRX451 abgeleitet ist und wobei die leichte-Kette-variable Region von NRX451 gemäß [Fig. 3](#) ist und die schwere-Kette-variable Region von NRX451 gemäß [Fig. 4](#) ist.
27. Antikörper oder Antikörperfragment oder Verfahren oder Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 26, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment spezifisch an das selbe Epitop bindet, wie Antikörper NR-LU-13 (ATCC CRL-12360).
28. Antikörper oder Antikörperfragment oder Verfahren oder Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 26, wobei der Antikörper NRX451 ist oder das Antikörperfragment abgeleitet von NRX451 ist, wobei die leichte-Kette-variable Region von NRX451 gemäß [Fig. 3](#) ist und die schwere-Kette-variable Region von NRX451 gemäß [Fig. 4](#) ist.
29. Humanisierter Antikörper NRX451 oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, wobei die leichte-Kette-variable Region NRX451 gemäß [Fig. 3](#) ist und die schwere-Kette-variable Region von NRX451 gemäß [Fig. 4](#) ist.
30. Humanisierter Antikörper oder Antikörperfragment nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der Antikörper oder das Antikörperfragment NRX451 ist oder ein Antigen-bindendes Fragment davon, wobei die leichte-Kette-variable Region von NRX451 gemäß [Fig. 3](#) ist und die schwere-Kette-variable Region von NRX451 gemäß [Fig. 4](#) ist.
31. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Antikörper oder Antikörperfragment oder Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder 23 bis 30, in Kombination mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Verdünnungsmittel.
32. Antikörper oder Antikörperfragment oder Konjugat oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder 23 bis 30, zur Verwendung als Diagnostikum oder als ein Medikament.
33. Antikörper oder Antikörperfragment oder Konjugat oder Zusammensetzung nach Anspruch 32, zur Verwendung in diagnostischen oder therapeutischen Prä-Targeting-Verfahren.

34. Verwendung eines Antikörpers oder Antikörperfragments oder Konjugats oder Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder 23 bis 30 zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose von Krebs oder eines Medikaments zur Behandlung von Krebs.

Es folgen 35 Blatt Zeichnungen



Figur 1

NR-LU-13 Sequenzen der variablen Region der schweren Kette

GAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AAG CCA GGG GCC TCA GTC Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val	18
<hr/>	
CDR1	
AGG TTG TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC ACC TAT ATG CAC TGG Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His Trp	36
<hr/>	
CDR2	
GTG ATA GAG AGG CCT GAA CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA AGG ATT GAT CCT GCG Val Ile Glu Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala	54
<hr/>	
AAT GGT AAT ACT AAA TGT GAC CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATA ACA GCA Asn Gly Asn Thr Lys Cys Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala	72
<hr/>	
GAC ACA TCC TCC AAC ACA GCC TAC CTG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp	90
<hr/>	
CDR3	
ACT GCC GTC TAT TAC TGT TCT AGA GAG GTC CTA ACT GGG ACG TGG TCT TTG GAC Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Glu Val Leu Thr Gly Thr Trp Ser Leu Asp	108
<hr/>	
TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	120

NR-LU-13 Sequenzen der variablen Region der leichten Kette

GAC ATC CAG ATG ATT CAG TCT CCA TCG TCC ATG TTT GCC TCT CTG GGA GAC AGA Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Met Phe Ala Ser Leu Gly Asp Arg	18
<hr/>	
CDR1	
GTC AGT CTC TCT TGT CGG GCT AGT CAG GGC ATT AGA GGT AAT TTA GAC TGG TAT Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Gly Asn Leu Asp Trp Tyr	36
<hr/>	
CDR2	
CAG CAG AAA CCA GGT GGA ACT ATT AAA CTC CTG ATC TAC TCC ACA TCC AAT TTA Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu	54
<hr/>	
AAT TCT GGT GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG TCA GAT TAT TCT Asn Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Ser	72
<hr/>	
CDR3	
CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAC TCT GAA GAT TTT GCA GAC TAT TAC TGT CTA CAG Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln	90
<hr/>	
CGT AAT GCG TAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA Arg Asn Ala Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	107

Figur 2

Leichte Kette

1 ASP	ILE	GLN	MET	5 THR	GLN	SER	PRO	SER	10 SER
11 LEU	SER	ALA	SER	15 VAL	GLY	ASP	ARG	VAL	20 THR
21 ILE	THR	CYS	ARG	25 ALA	SER	GLN	GLY	ILE	30 ARG
31 GLY	ASN	LEU	ASP	35 TRP	TYR	GLN	GLN	LYS	40 PRO
41 GLY	LYS	GLY	PRO	45 LYS	LEU	LEU	ILE	TYR	50 SER
51 THR	SER	ASN	LEU	55 ASN	SER	GLY	VAL	PRO	60 SER
61 ARG	PHE	SER	GLY	65 SER	GLY	SER	GLY	SER	70 ASP
71 TYR	THR	LEU	THR	75 ILE	SER	SER	LEU	GLN	80 PRO
81 GLU	ASP	PHE	ALA	85 THR	TYR	TYR	CYS	LEU	90 GLN
91 ARG	ASN	ALA	TYR	95 PRO	TYR	THR	PHE	GLY	100 GLN
101 GLY	THR	LYS	LEU	105 GLU	ILE	LYS			

Die humanisierte Sequenz der NRX451-leichten Kette, Positionen der Reste, die zwischen NR-LU-13 und NRX451-humanisiert unterscheiden, sind mit Fettdruck markiert.

Figur 3

Schwere Kette

1 GLN	VAL	GLN	LEU	5 VAL	GLN	SER	GLY	ALA	10 GLU
11 VAL	LYS	LYS	PRO	15 GLY	ALA	SER	VAL	LYS	20 VAL
21 SER	CYS	LYS	ALA	25 SER	GLY	PHE	ASN	ILE	LYS
31 ASP	THR	TYR	MET	HIS	TRP	VAL	ARG	GLN	ALA
41 PRO	GLY	GLN	GLY	45 LEU	GLN	TRP	MET	GLY	50 ARG
51 ILE	ASP	PRO	ALA	ASN	GLY	ASN	THR	LYS	CYS
61 ASP	LEU	SER	PHE	65 GLN	GLY	ARG	VAL	THR	70 ILE
71 THR	ALA	ASP	THR	75 SER	ILE	ASN	THR	ALA	80 TYR
81 MET	GLU	LEU	SER	85 SER	LEU	ARG	SER	ASP	90 ASP
91 THR	ALA	VAL	TYR	95 TYR	CYS	SER	ARG	GLU	100 VAL
101 LEU	THR	GLY	THR	105 TRP	SER	LEU	ASP	TYR	110 TRP
111 GLY	GLN	GLY	THR	115 LEU	VAL	THR	VAL	SER	120 Ser

Die humanisierte Sequenz der NRX451-leichten Kette, Positionen der Reste, die zwischen NR-LU-13 und NRX451-humanisiert unterscheiden, sind mit Fettdruck markiert.

Figur 4

Abgleich der variablen Regionen der leichten Kette von NR-LU-13 (oben) und humanisiertem NRX451 (unten).

```

DIQMISSPSSMFASLGDRVSLSC RASOGIRGNLD WYQQKPGGTIKLLIY STSNLNS
..... . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RASOGIRGNLD WYQQKPGKGPKLLIY STSNLNS
                          CDR1                                  CDR2

GVPSRFSGSGSGSDYSLTISSEDFADYYC LORNAYPYTY GGGTXLEIK
..... . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
GVPSRFSGSGSGSDYTLTISLQPEDPATYYC LORNAYPYTY GGGTXLEIK
                                  CDR3

```

Abgleich der variablen Regionen der schweren Kette von NR-LU-13 (oben) und humanisiertem NRX451 (unten).

```

EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTASGFNIK DTYME WVIERPEQGLEWIG
..... . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
QVQLVQSGAEVKKPGASVKSCKASGFNIK DTYME WVRQAPGQGLQWMG
                                  CDR1

RIDPANGNTK CDPKFQGKATITADTSSNTAYIQLSSLTSED TAVYYCS
..... . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
RIDPANGNTK CDLSFQGRVTITADTSINTAYMELSSIRSDD TAVYYCS
                          CDR2

REVLTGTVSLDY WGQGTSVTVSS
..... . . . . . . . . . . . . . .
REVLTGTVSLDY WGQGTLVTVSS
                          CDR3

```

Figur 5

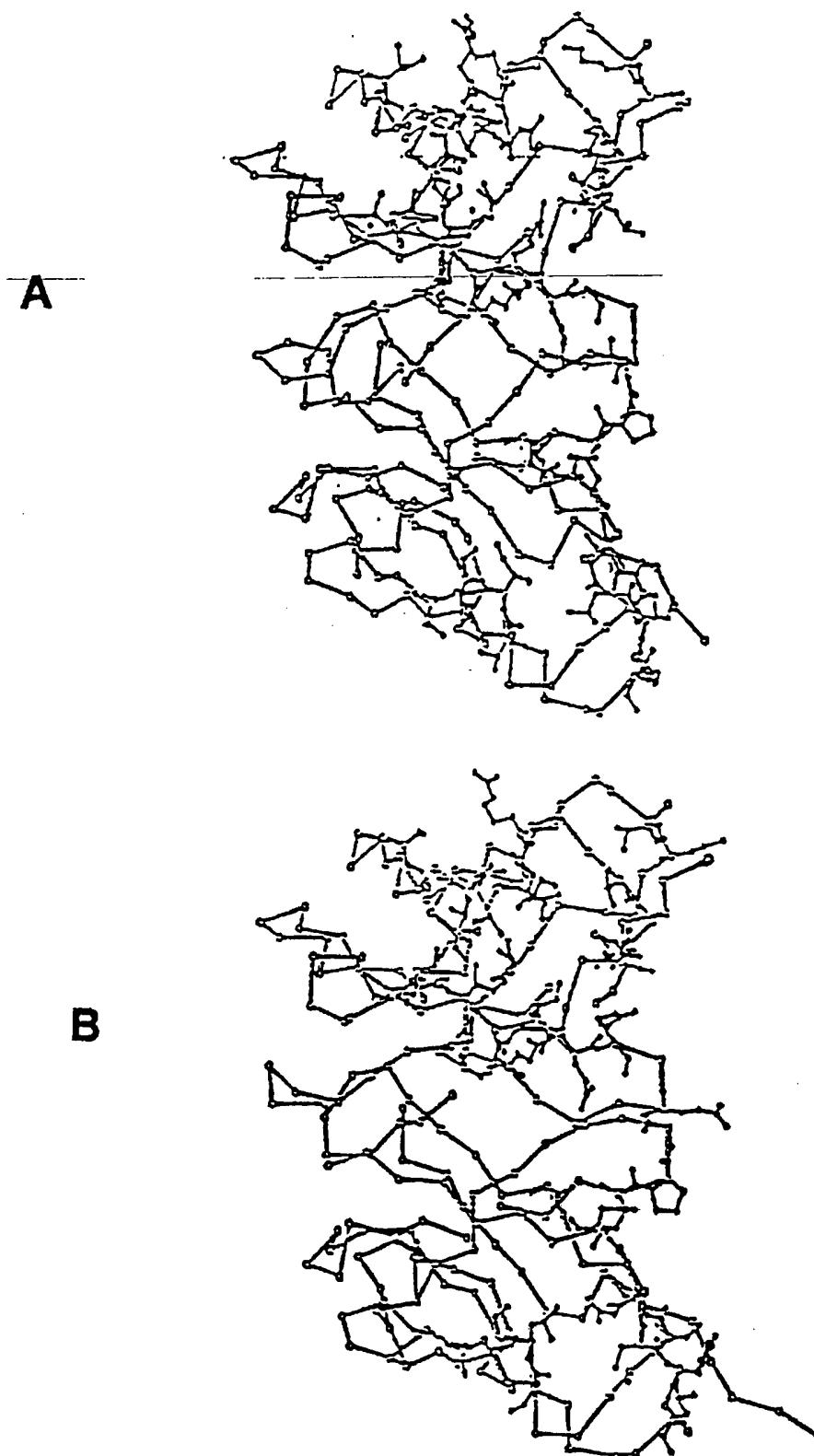


Figure 6

Gleiche Häufigkeiten aber passend zu humanen Sequenzen. Nur ein Auftreten von Asp in Position 182 wurde gefunden und kein Auftreten von Cys in Position 181.

RES	181	182
A	-	0.48
R	-	0.02
N	0.01	0.18
D	0.00	0.00
C	0.00	0.00
Q	0.00	-
E	-	-
G	0.00	0.01
H	0.00	-
I	-	0.00
L	-	0.00
K	0.00	0.00
M	-	-
F	0.03	-
P	0.00	0.01
S	0.01	0.23
T	-	0.02
W	0.00	-
Y	0.91	-
V	0.00	0.02
X	0.01	0.02
O	-	-
-	-	-
Z	-	-
B	-	0.00
Total	1.00	1.00

Figur 7A

Sequenzpositionen 50 und 183 sind Strukturmutationen innerhalb 5 Å der CDRs. Die Häufigkeit der Typen der Reste in diesen Positionen sind identisch.

Position 50 (153 humane lambda-Sequenzen)

RES	50
A	-
R	-
N	-
D	-
C	-
Q	-
E	-
G	-
H	-
I	0.00
L	-
K	-
M	0.00
F	-
P	0.93
S	-
T	-
W	-
Y	-
V	-
X	0.06
O	-
-	-
Z	-
B	-
Total	1.00

Figur 7B

Position 50 (279 humane kappa-Sequenzen)

RES	50
A	0.00
R	-
N	-
D	-
C	-
Q	-
E	-
G	-
H	-
I	0.00
L	0.00
K	-
M	-
F	-
P	0.96
S	-
T	-
W	-
Y	-
V	-
X	0.03
O	-
-	-
Z	-
B	-
Total	1.00

Figur 7C

Position 50 ist hoch konserviert in allen Sequenzen, aber Prolin kann gegen Ile oder Leu ausgetauscht sein. Das Gerüst, das für die leichte Kette (6fab) benutzt wurde, hat ein Ile in dieser Position. Wenn man diese Position mit anderen vergleicht, dann sind die Rückgrat-Torsionen die selben für Strukturen mit einem Pro oder Ile in dieser Position.

Position 183 (561 humane Sequenzen)

RES	183
A	0.06
R	-
N	0.00
D	0.21
C	-
Q	0.15
E	0.01
G	0.01
H	-
I	0.00
L	0.00
K	0.00
M	-
F	0.00
P	0.40
S	0.01
T	0.01
W	-
Y	0.00
V	0.08
X	0.02
O	-
-	-
Z	-
B	0.00
Total	1.00

Figur 7D

Position 183 (1210 Maus-Sequenzen)

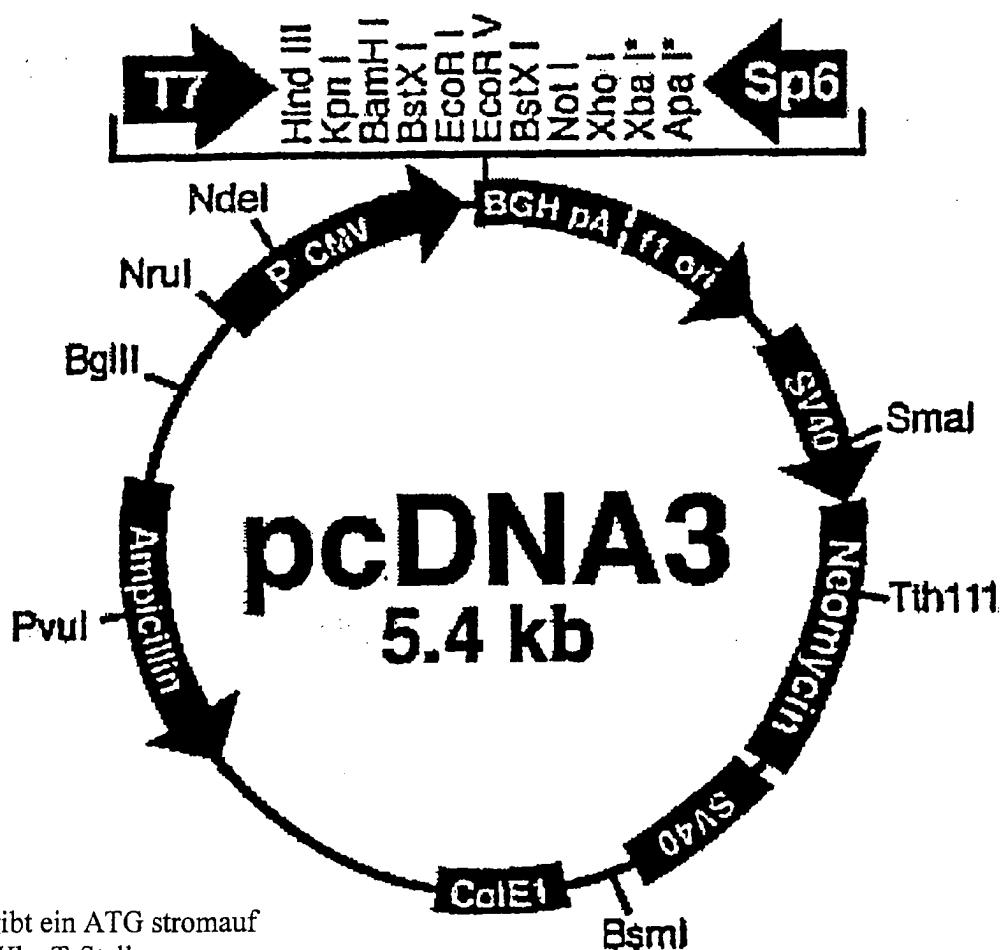
RES	183
A	0.16
R	0.00
N	0.00
D	0.13
C	-
Q	0.16
E	0.25
G	0.02
H	0.00
I	-
L	-
K	0.00
M	-
F	-
P	0.17
S	0.08
T	0.00
W	-
Y	-
V	0.00
X	0.02
O	-
-	-
Z	-
B	-
Total	1.00

Leu wird in humanen Sequenzen in dieser Position gesehen, aber niemals in Maus-Sequenzen, für humane und Maus-Sequenzen zugleich ist Pro der am häufigsten vorkommende Rest in Position 183.

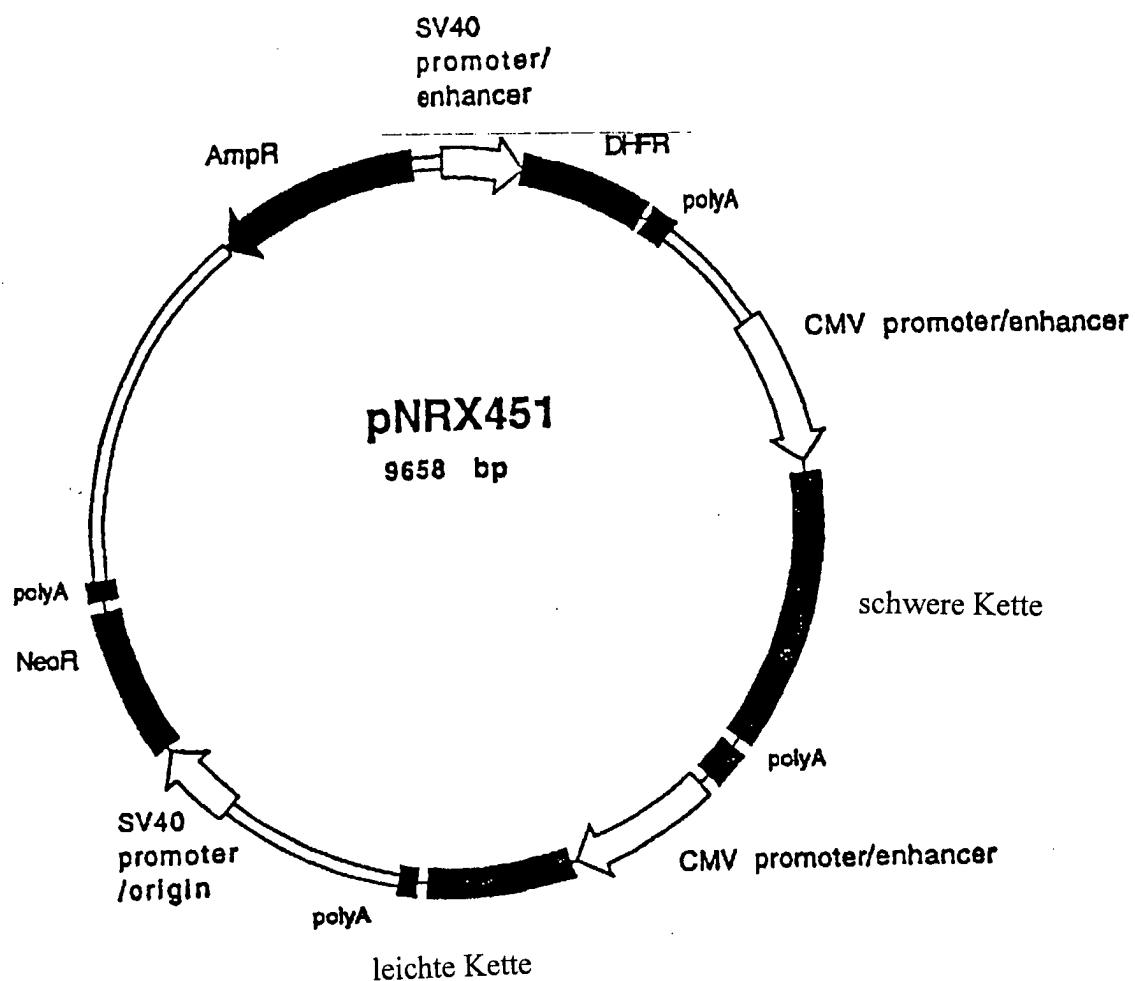
Figure 7E

Kommentare für pcDNA3:
5446 Nukleotide

CMV Promotor: Basen 209 - 863
 T7 Promotor: Basen 864 - 882
 Polylinker: Basen 889 - 994
 Sp6 Promotor: Basen 999 - 1016
 BGH poly A: Basen 1018 - 1249
 SV40 Promotor: Basen 1790 - 2115
 SV40 Replikationsursprung: Basen 1984 - 2089
 Neomycin ORF: Basen 2151 - 2945
 SV40 poly A: Basen 3000 - 3372
 ColE1 Ursprung: Basen 3882 - 4305
 Ampicillin ORF: Basen 4450 - 5310



Figur 8



Figur 9

POOL oder KLON

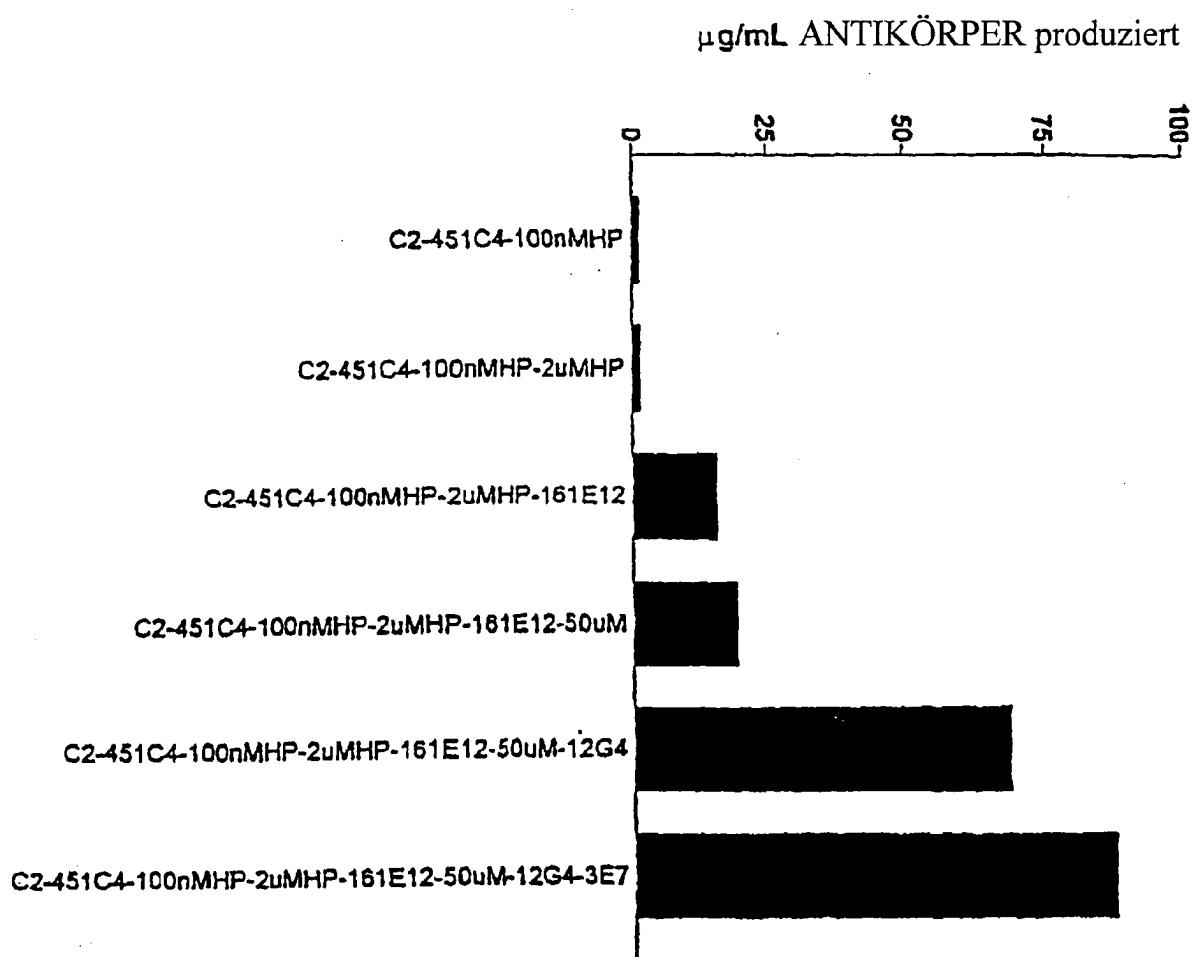
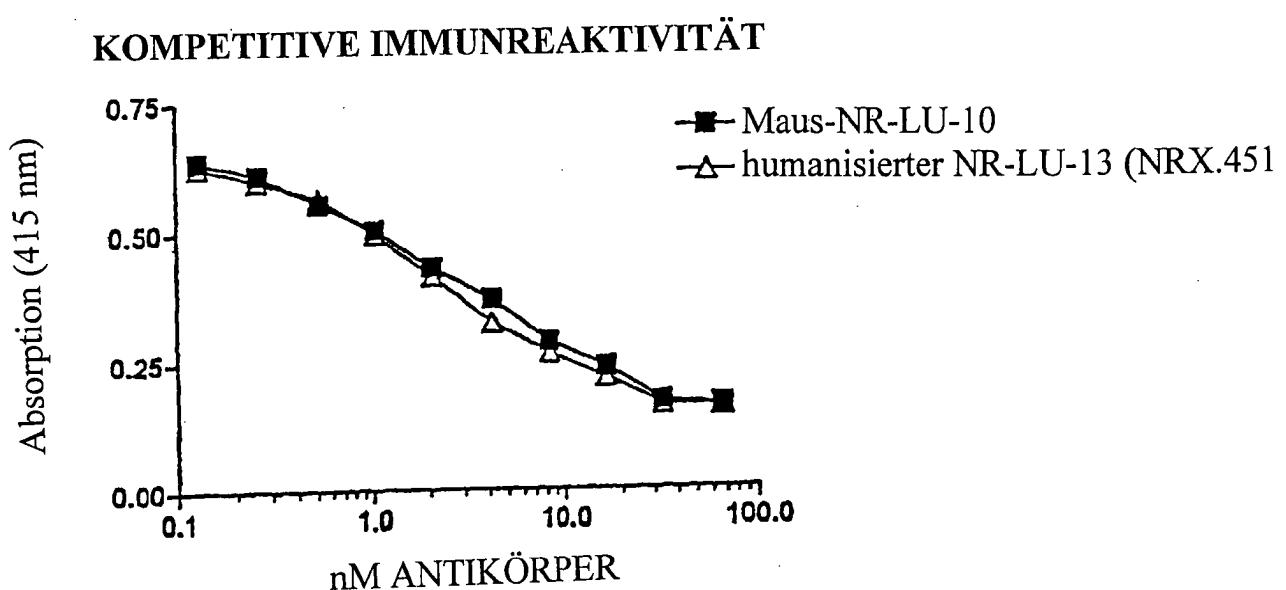
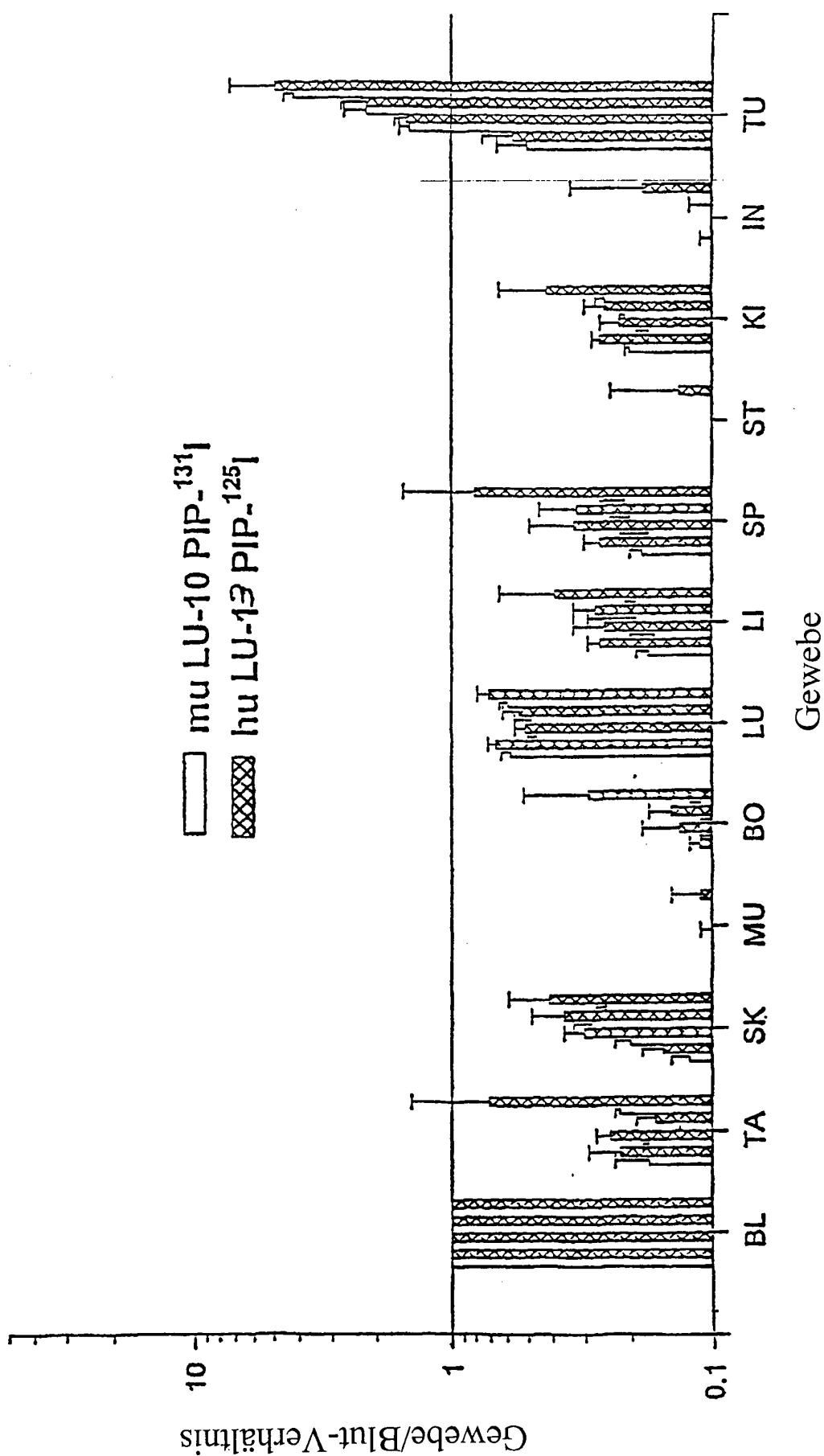


Figure 10



Figur 11



Figur 12

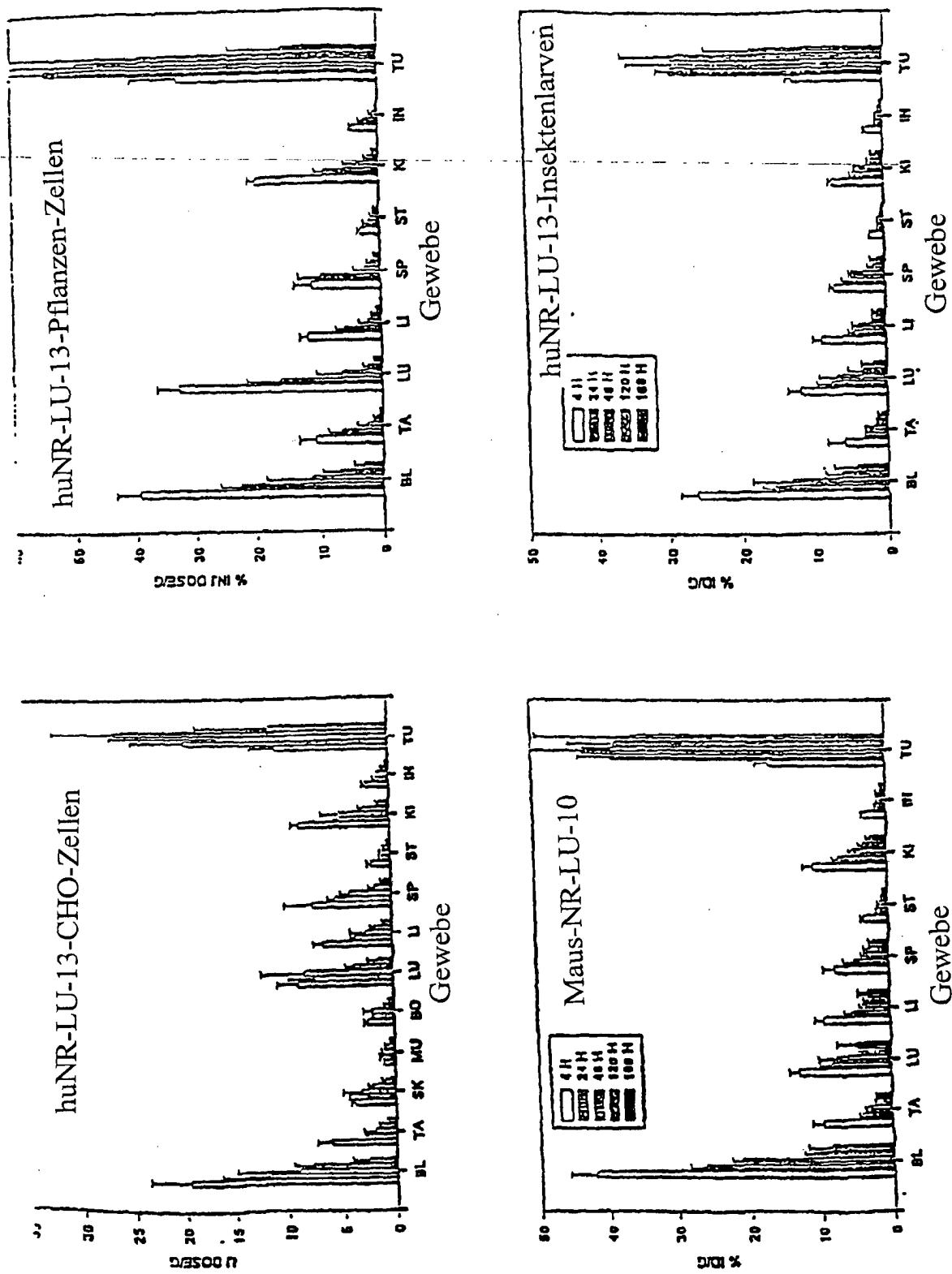
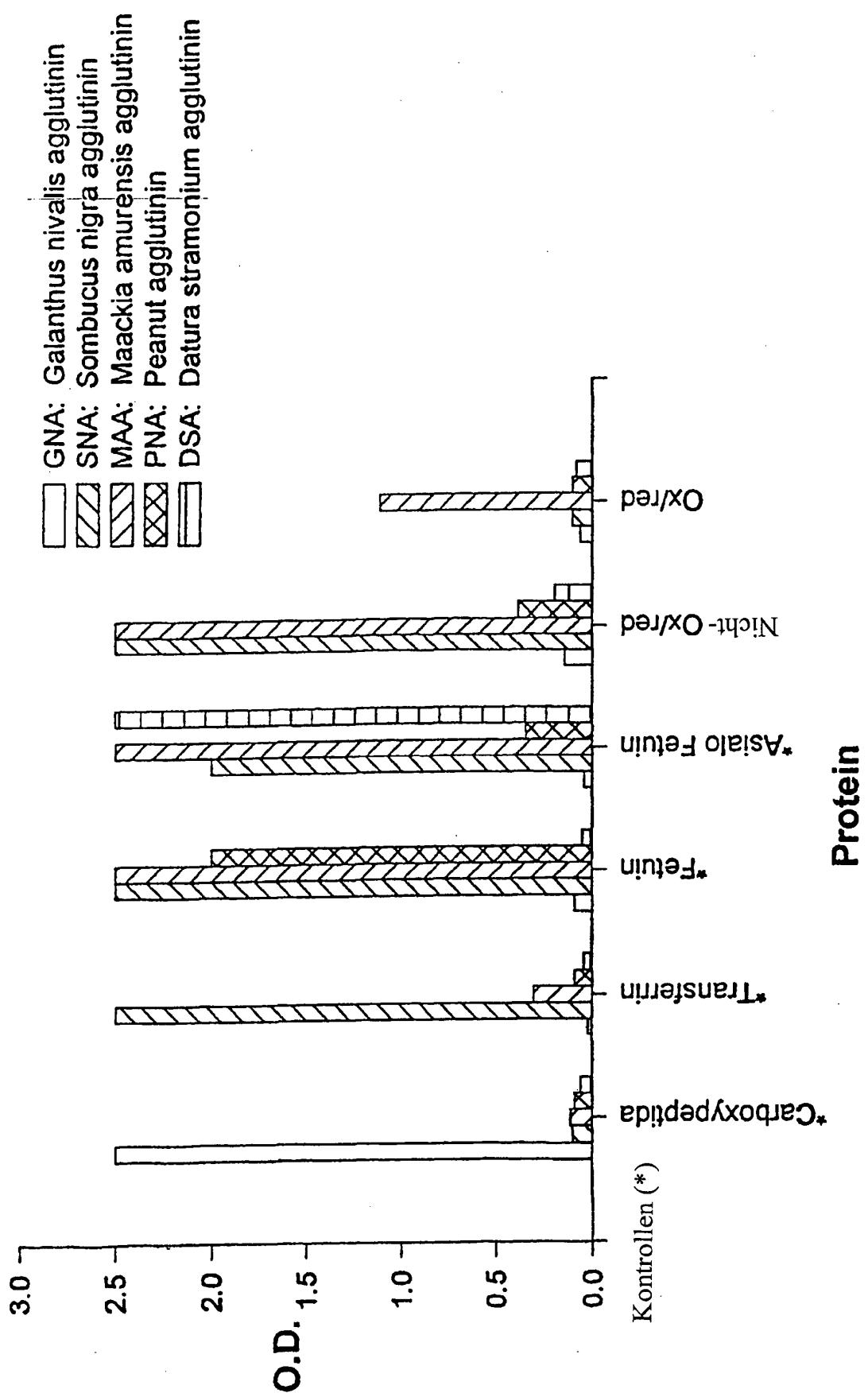
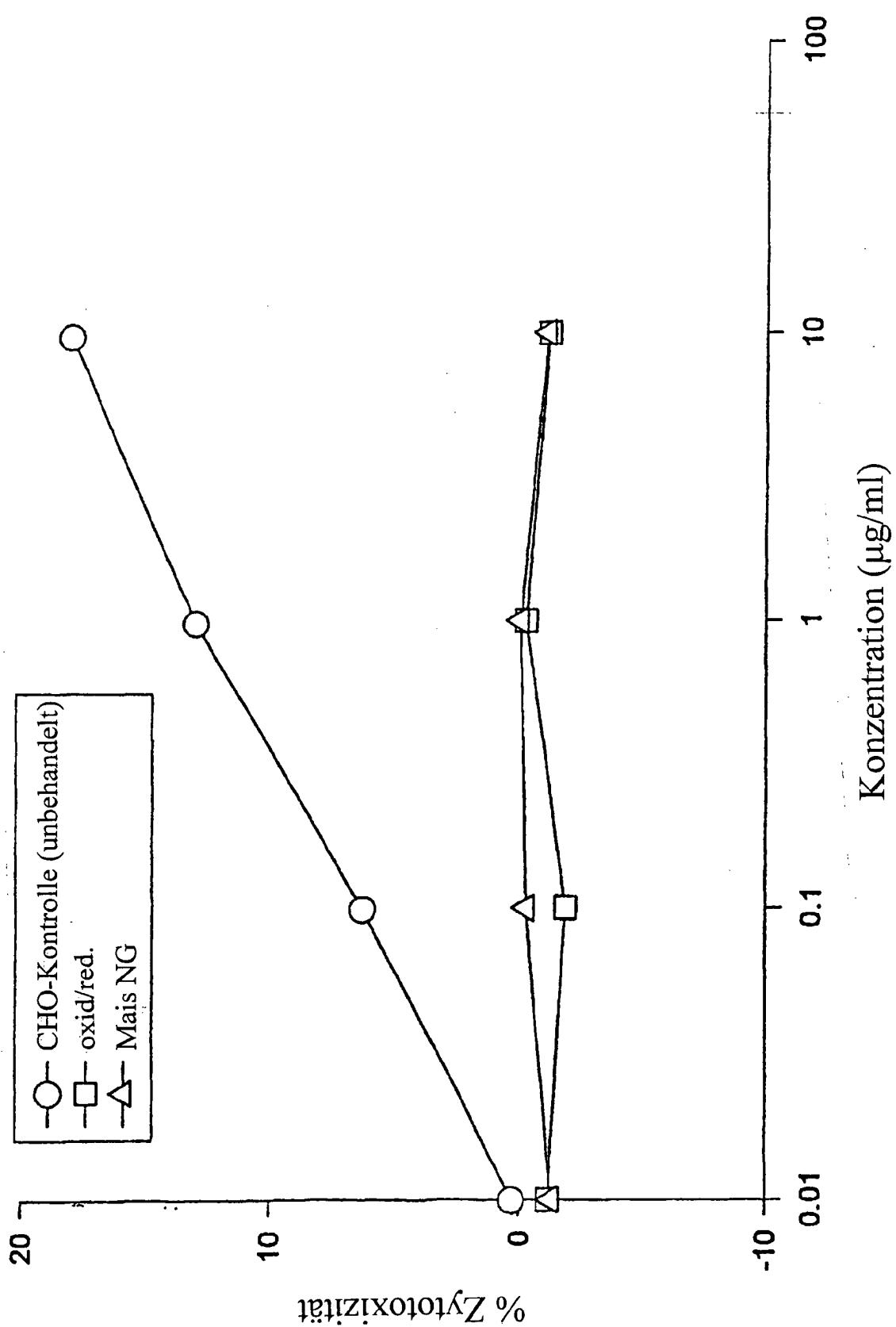


Figure 13



Figur 14



Figur 15a

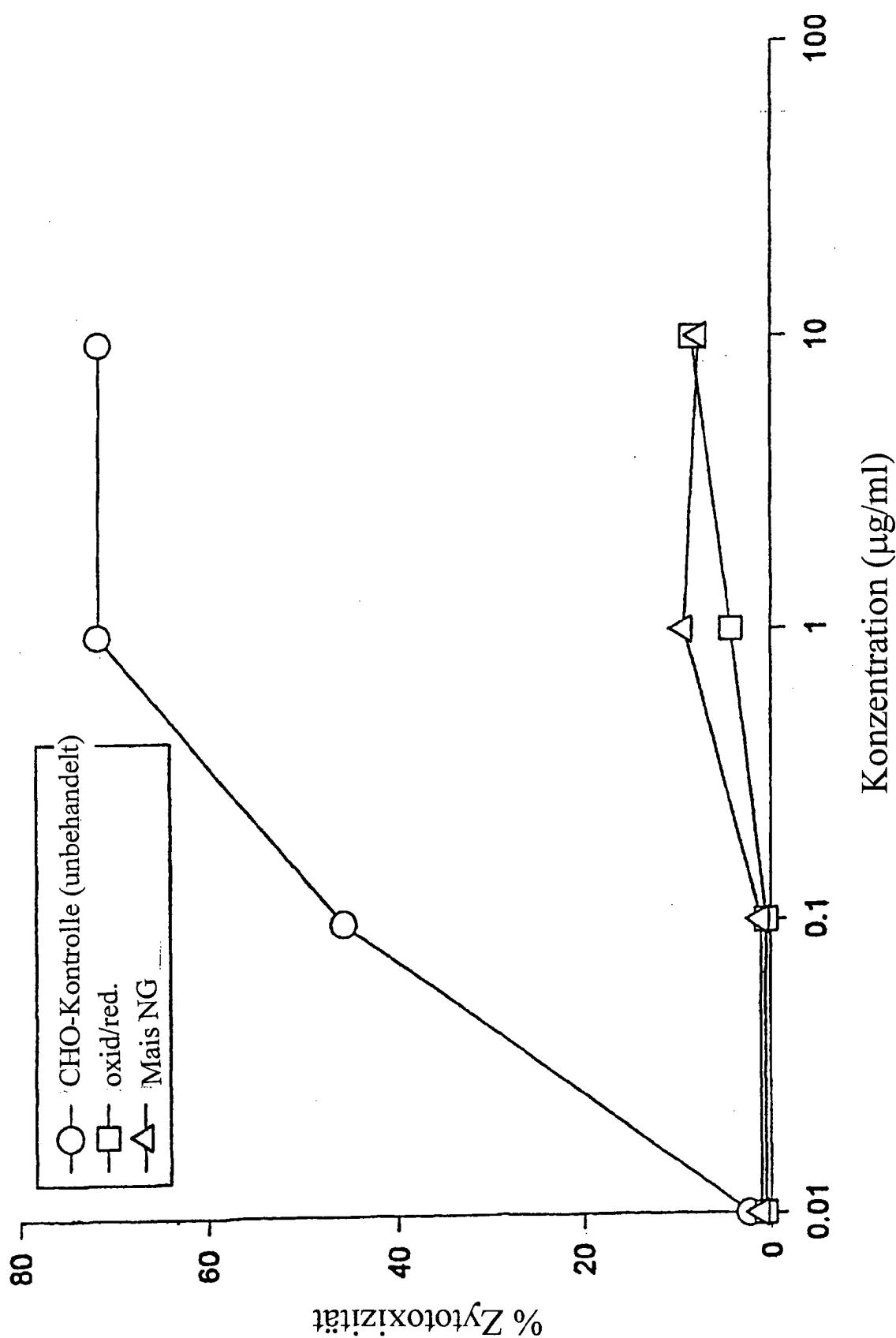
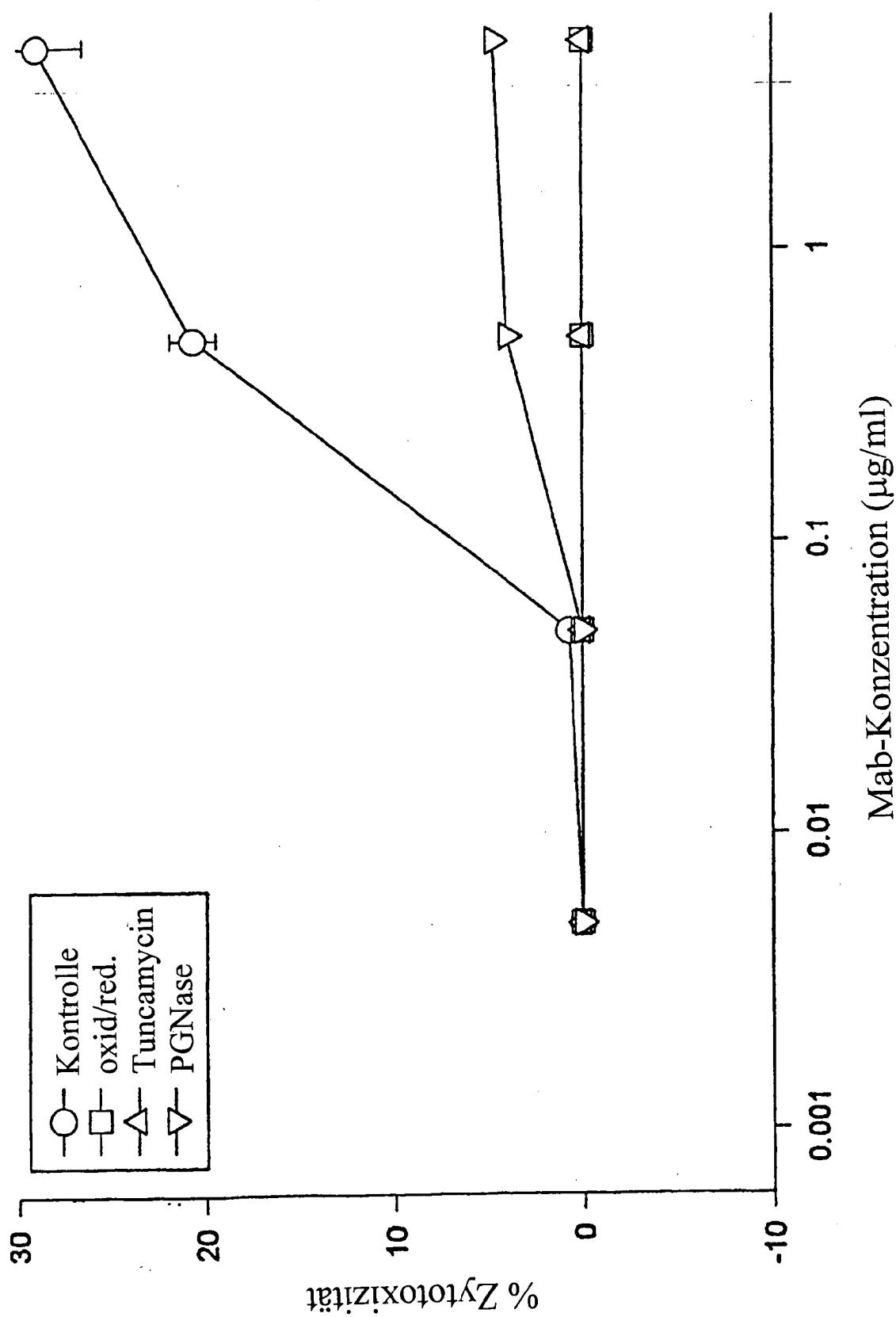


Figure 15b



Figur 15c

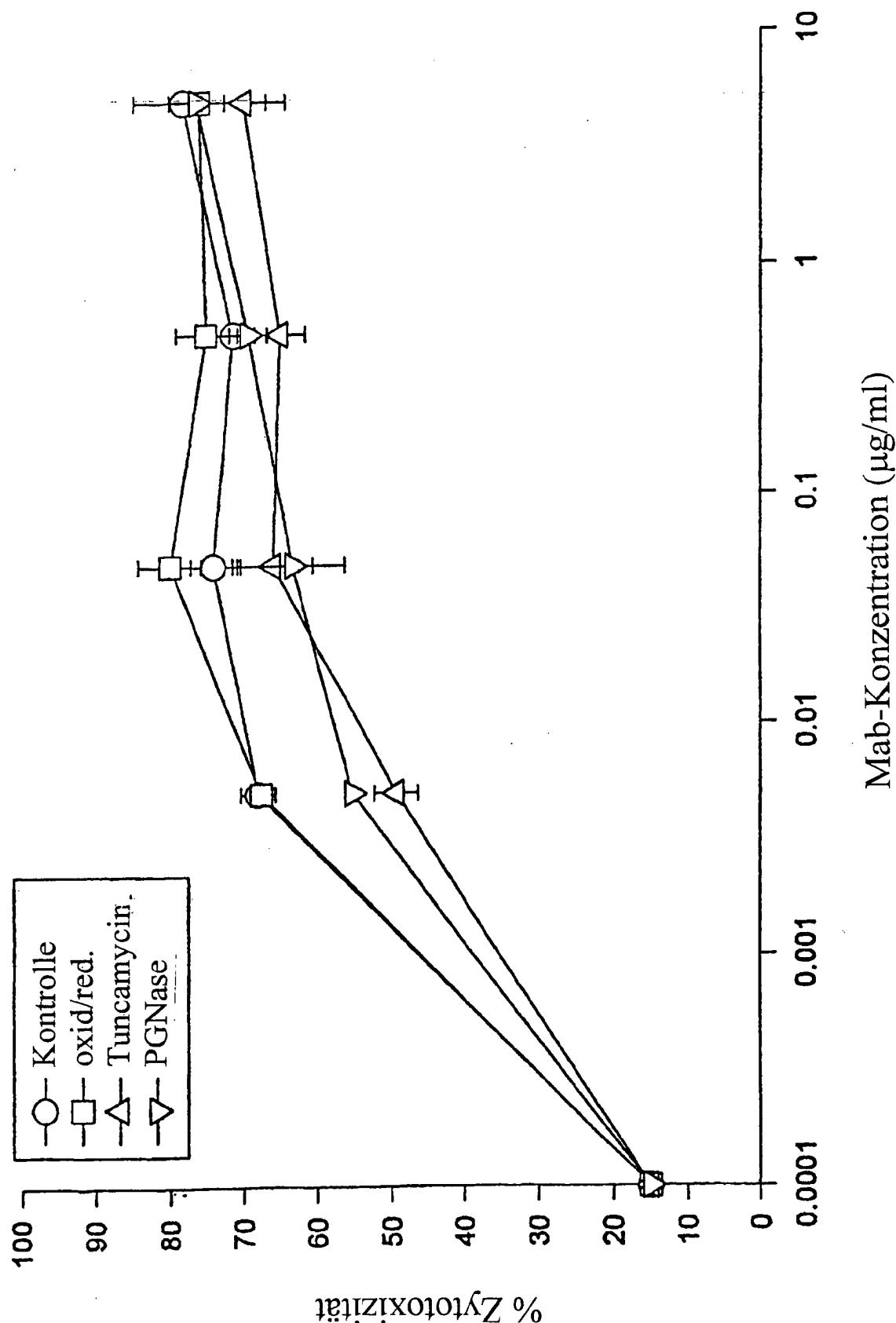


Figure 15d

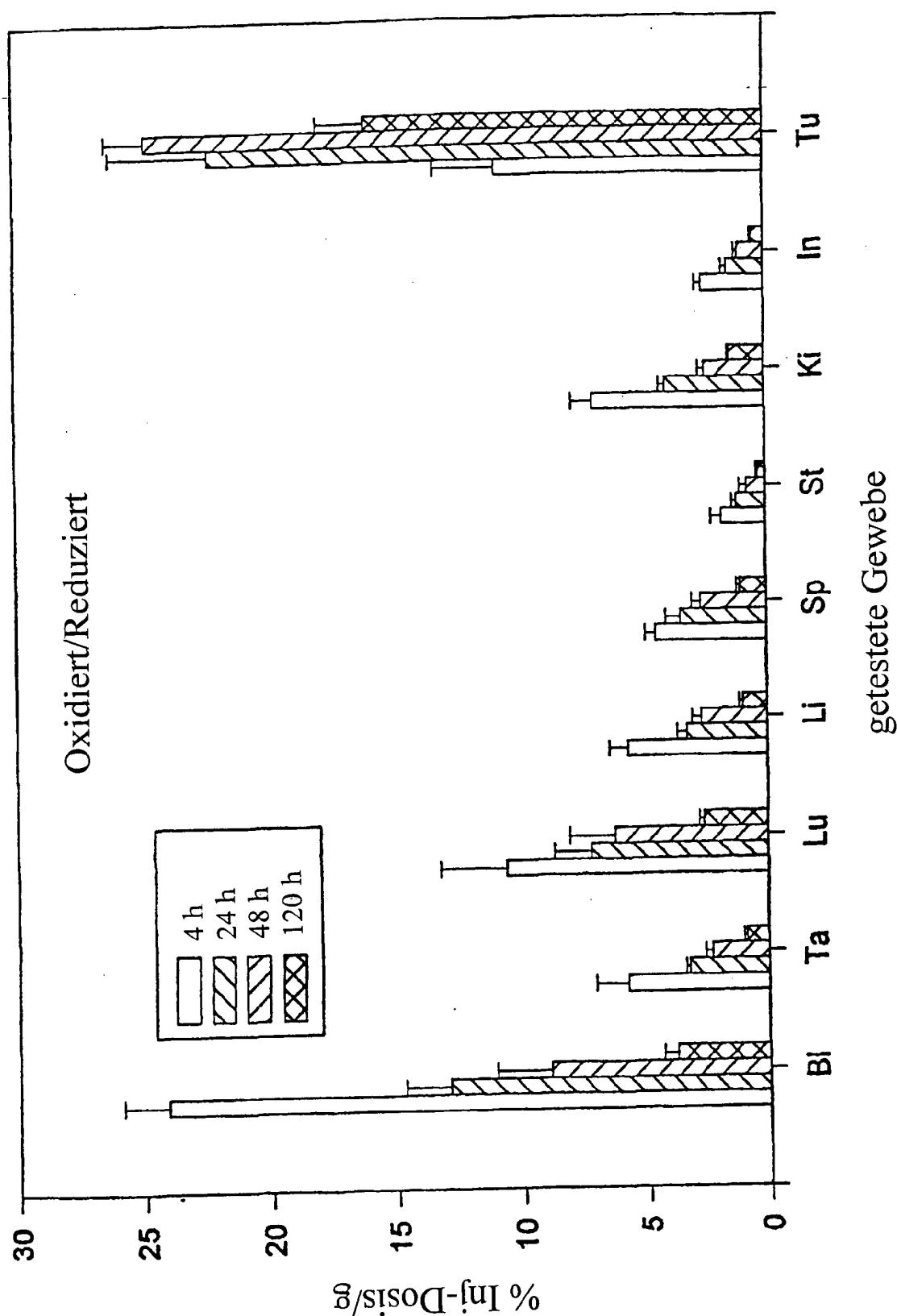
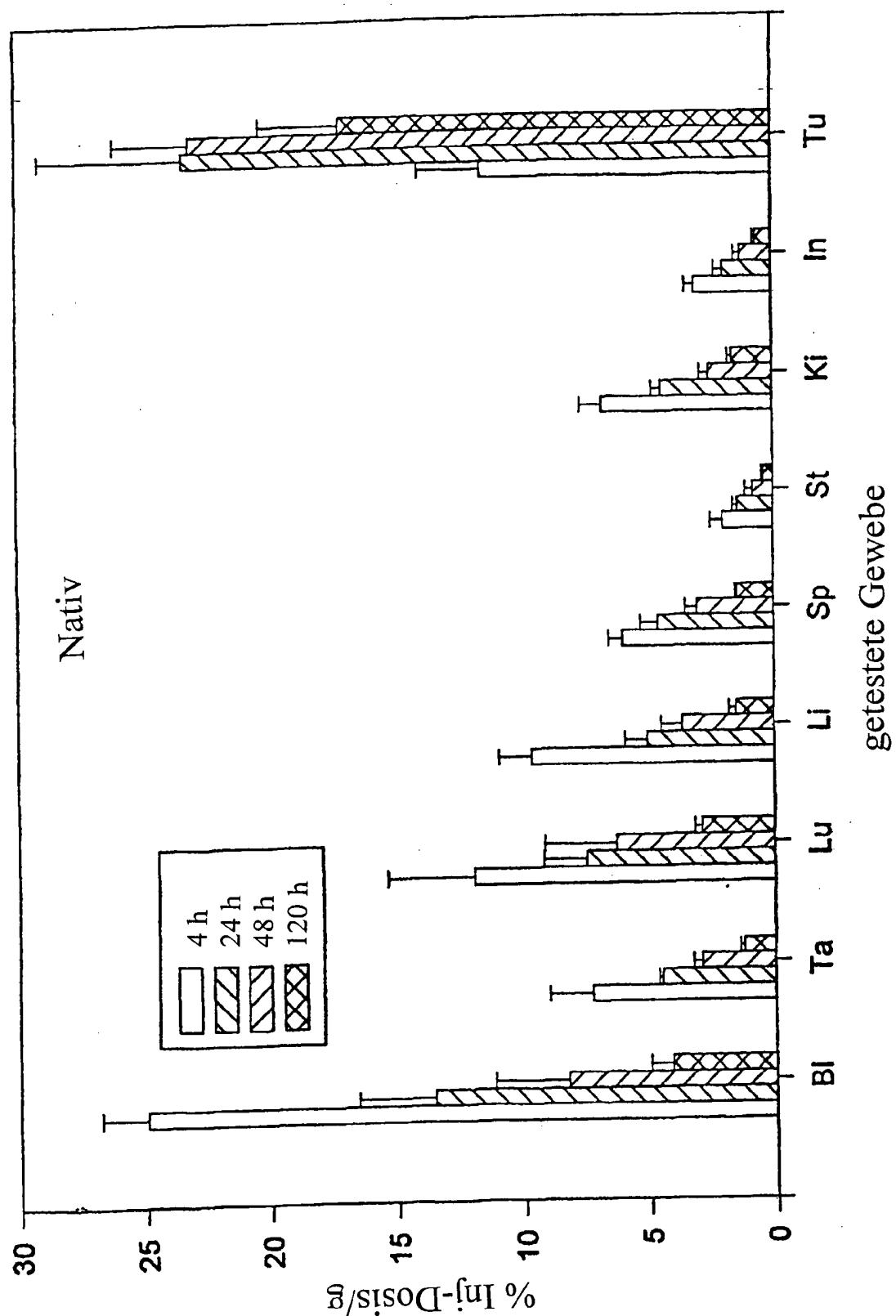
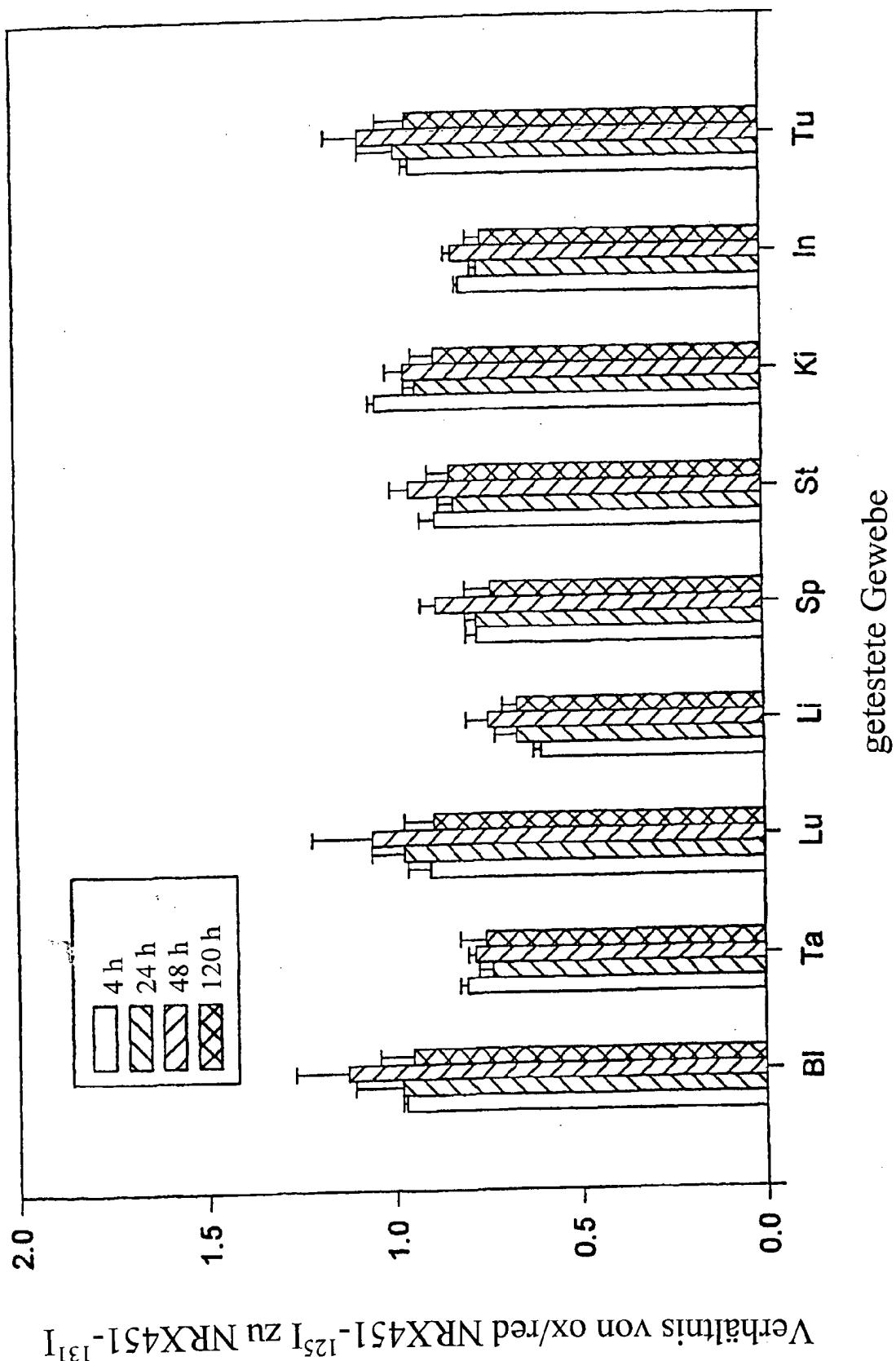


Figure 16a



Figur 16b



Figur 16c

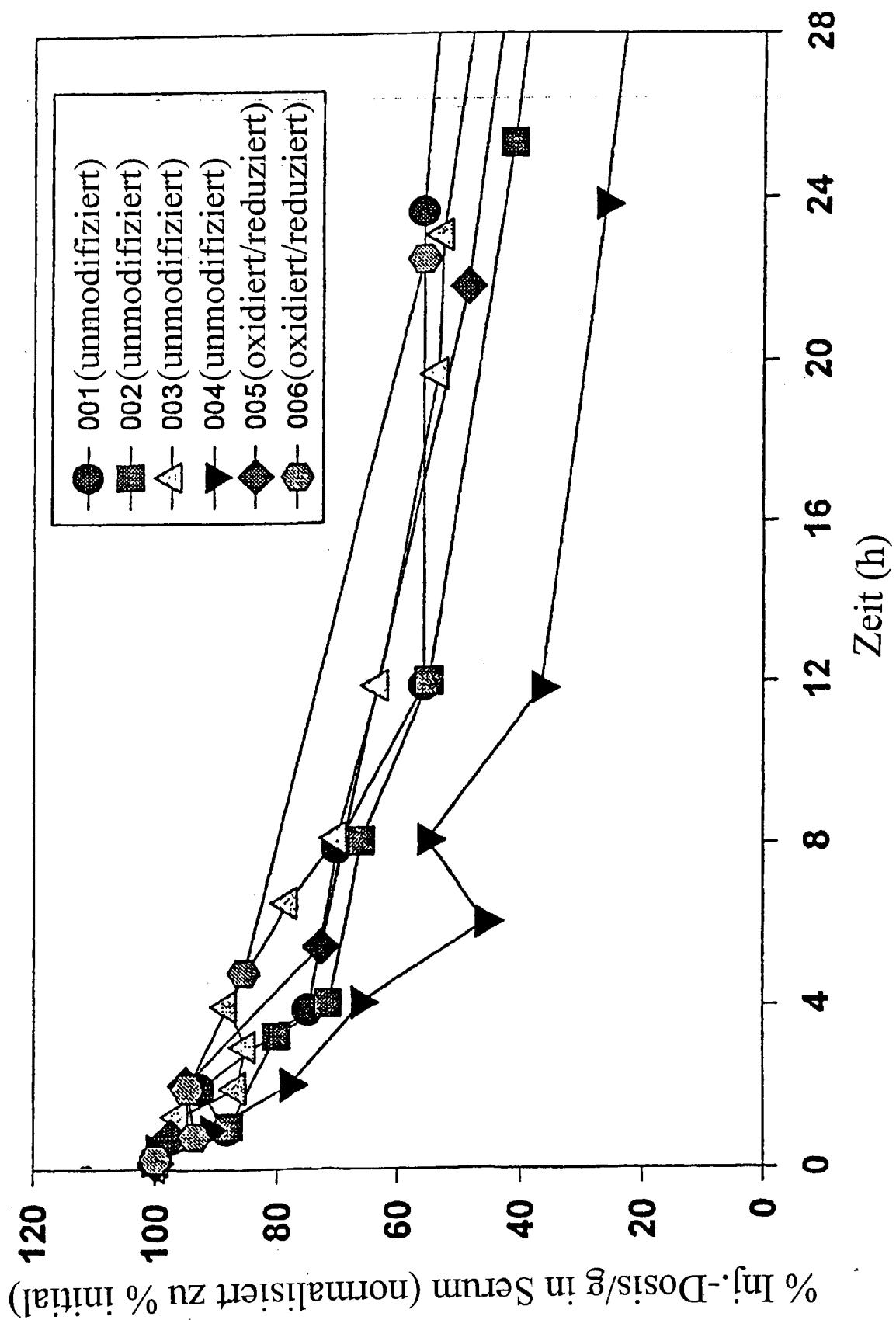
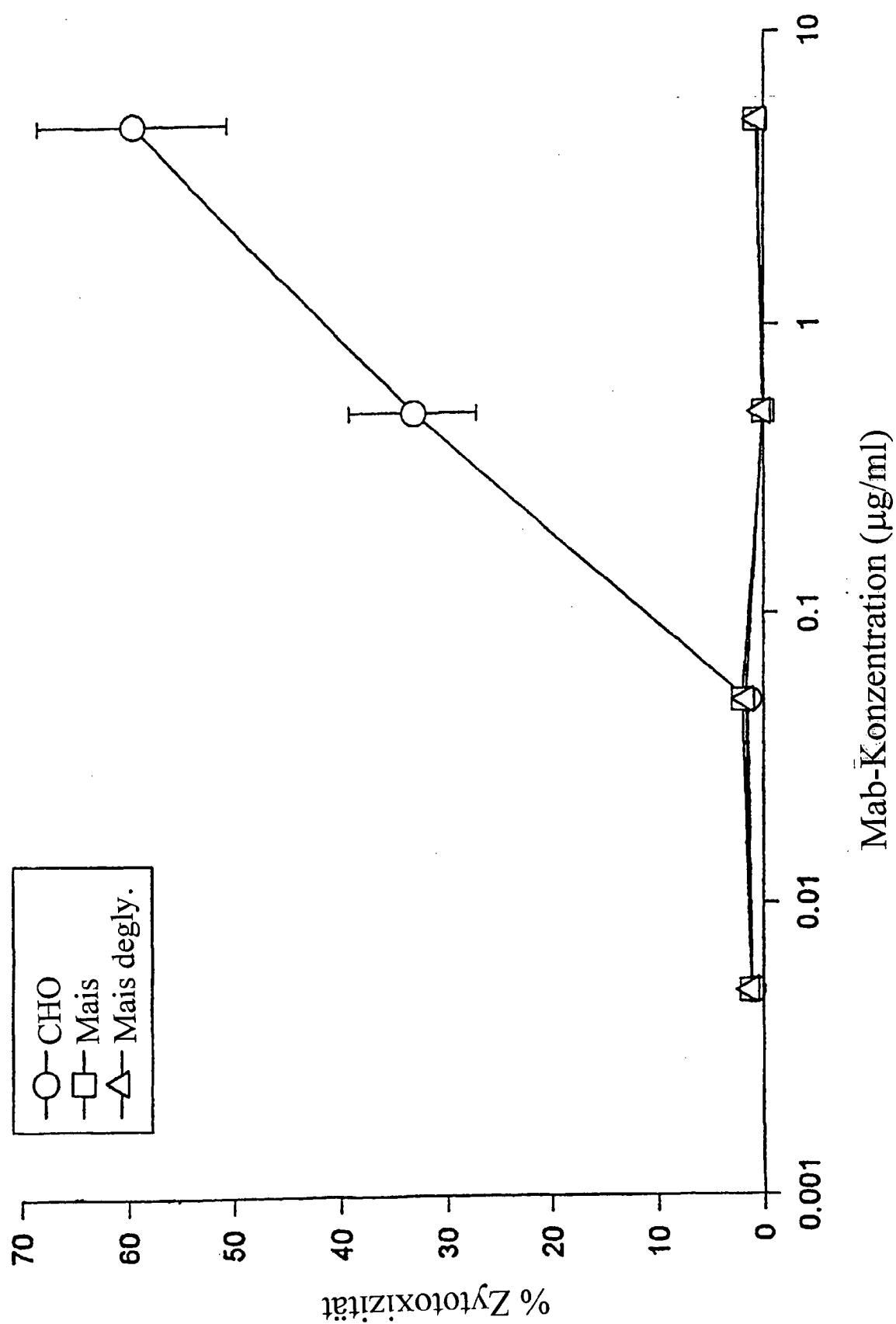
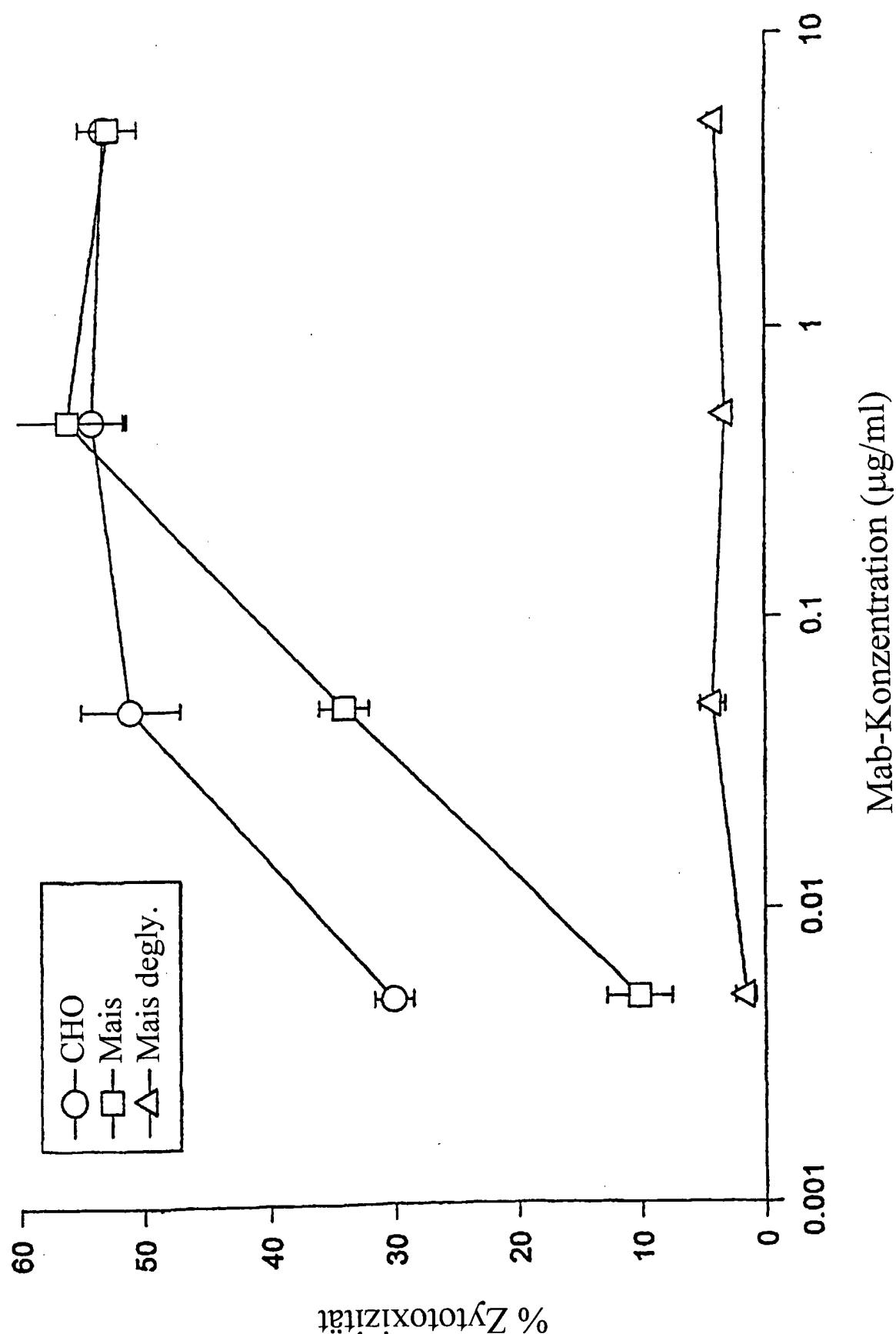


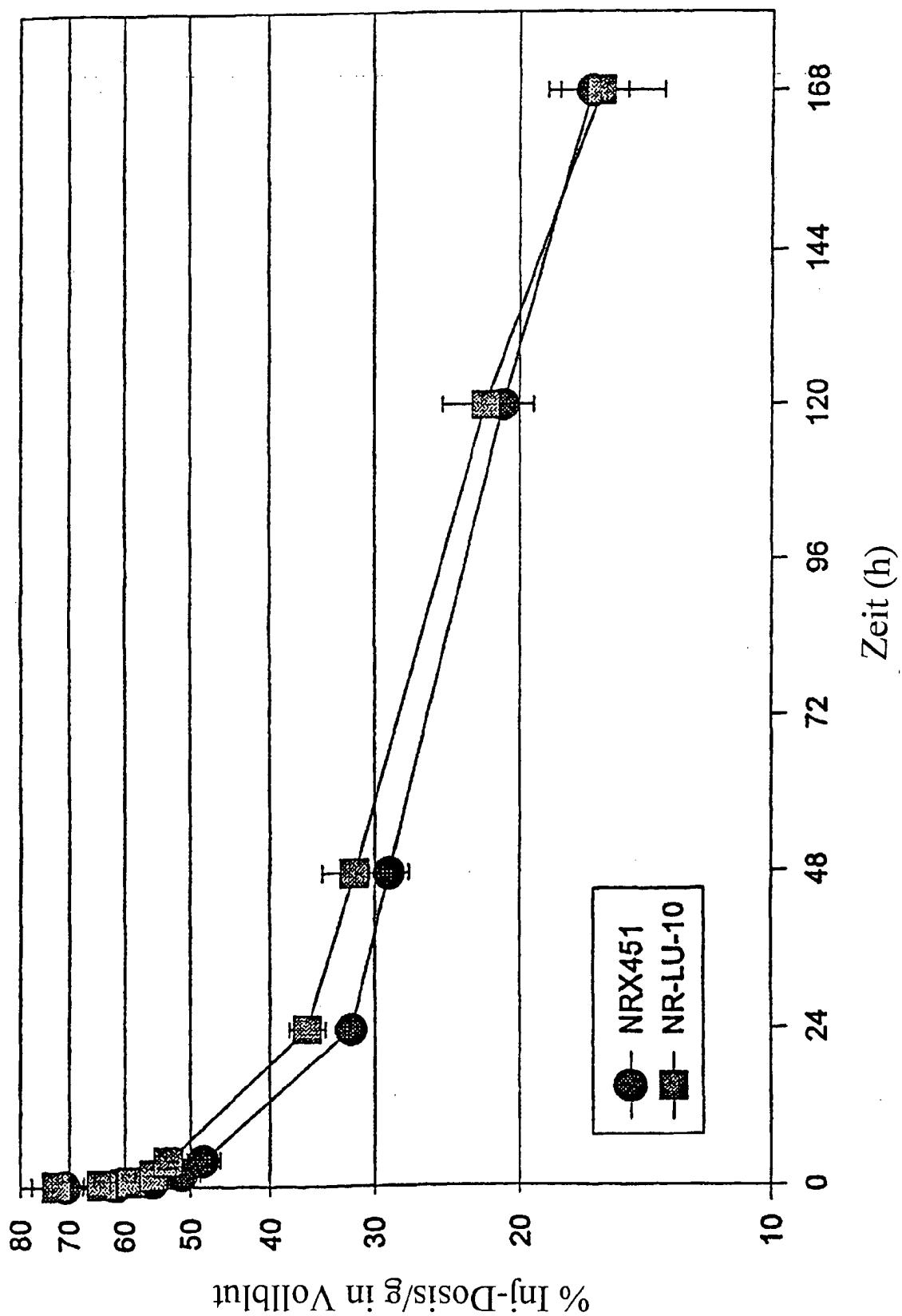
Figure 17



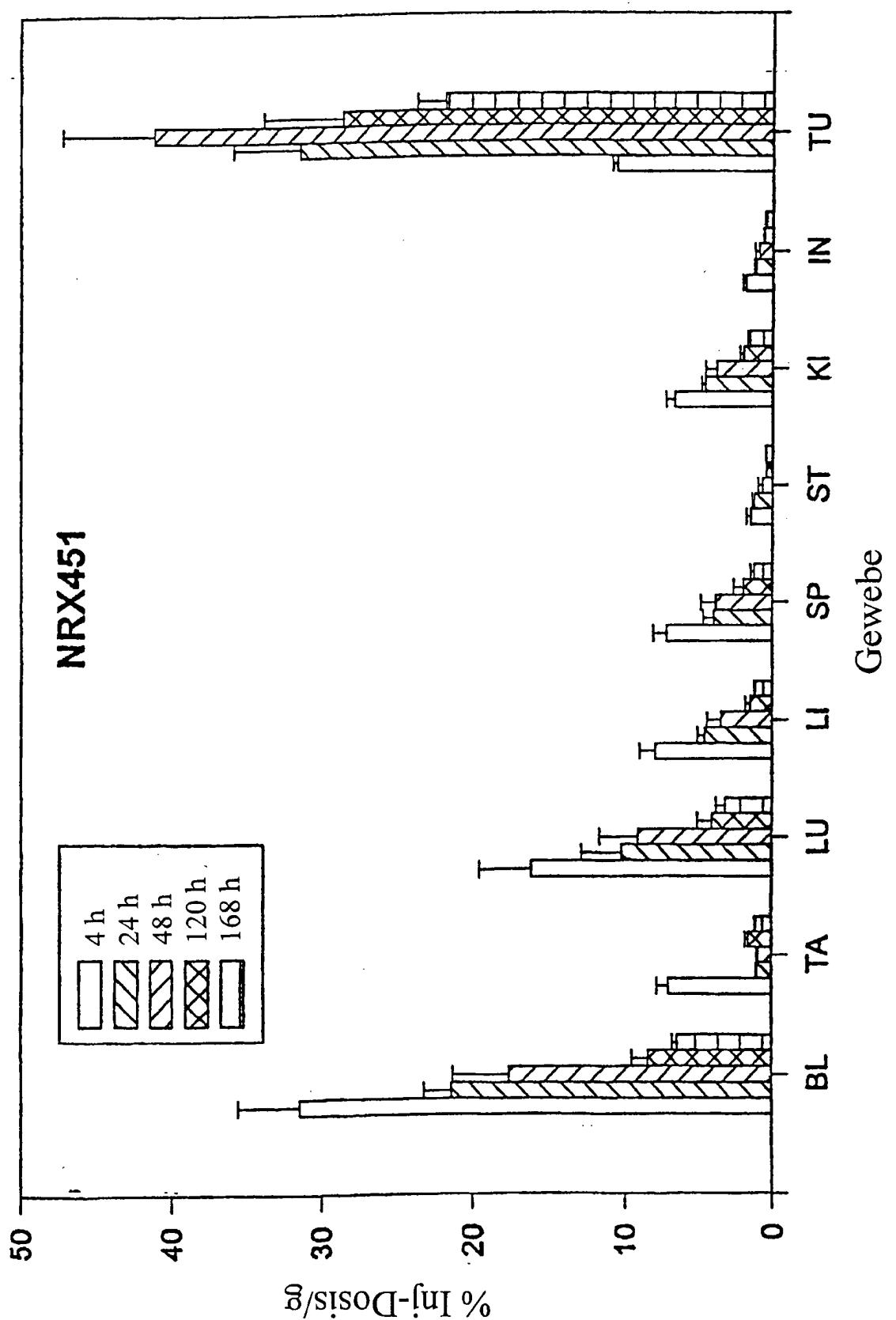
Figur 18



Figur 19



Figur 20



Figur 21a

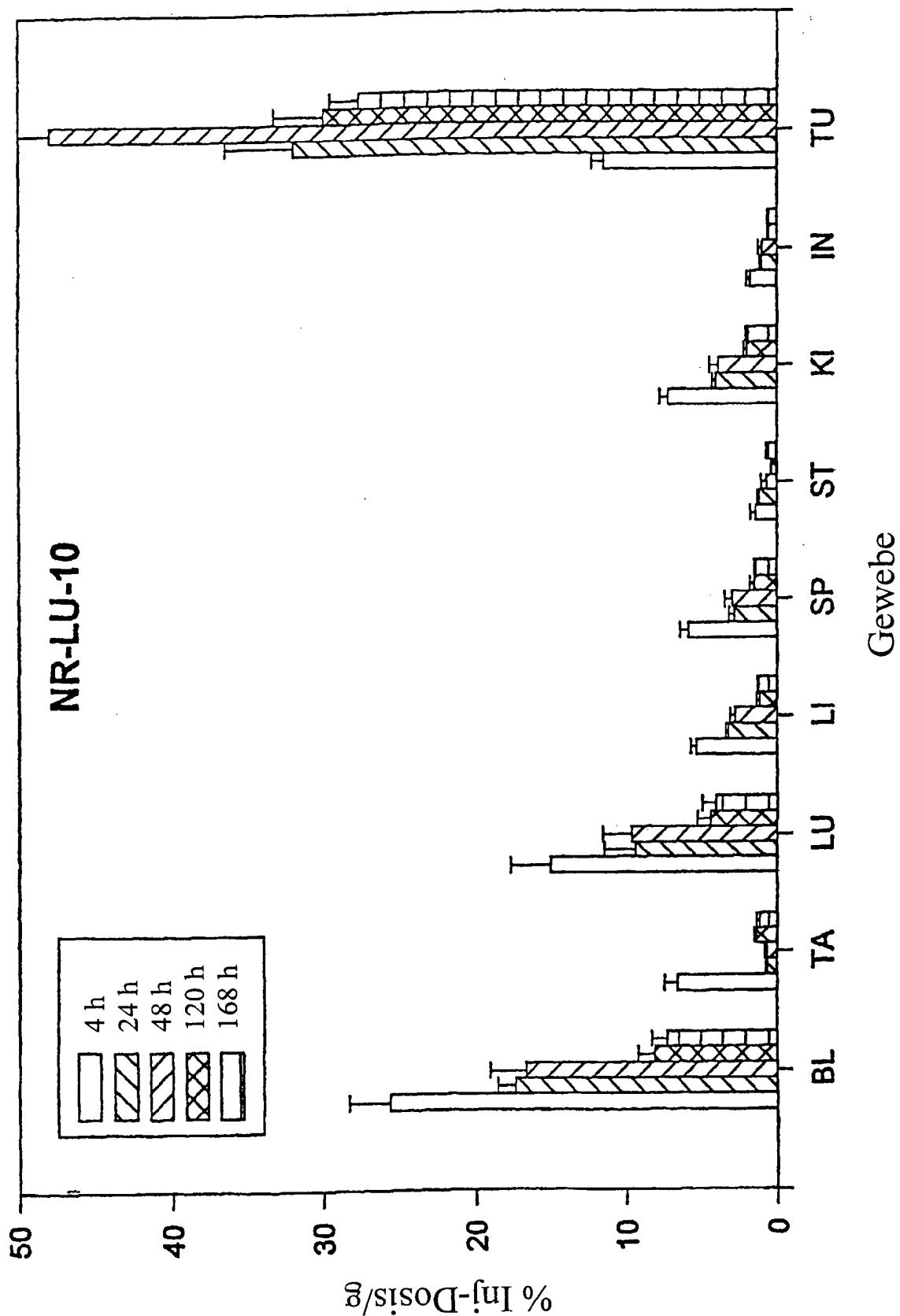


Figure 21b

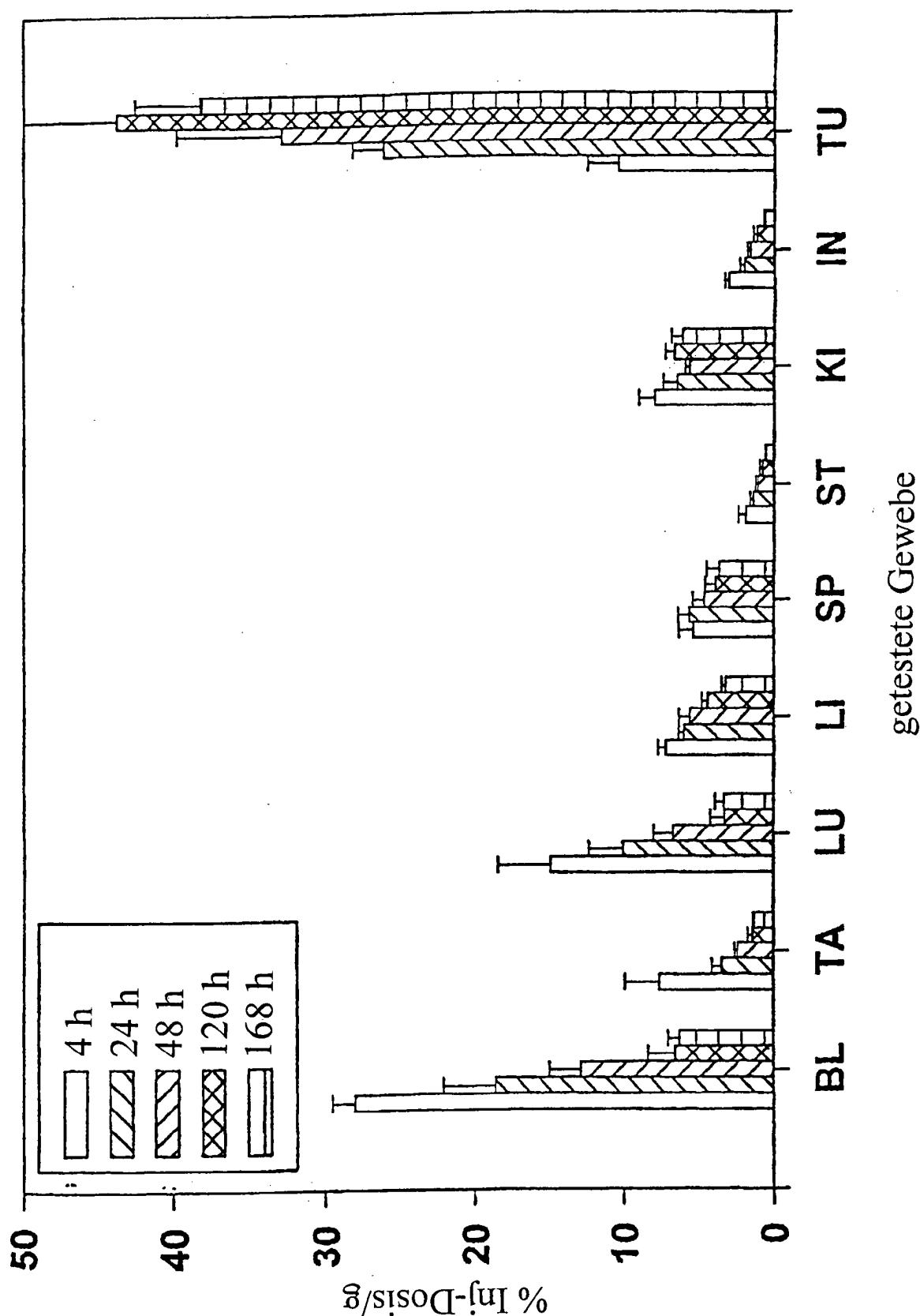
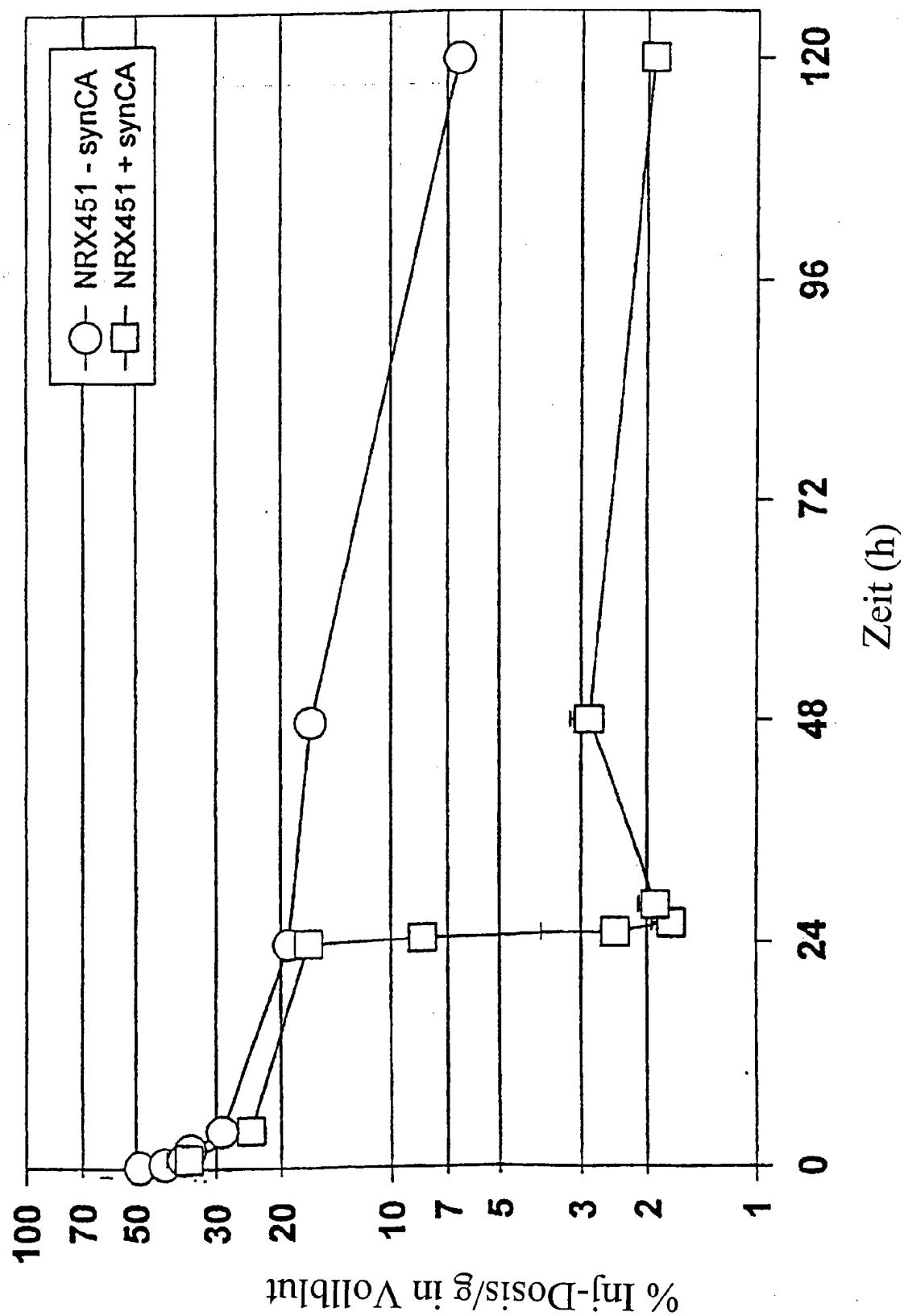


Figure 22



Figur 23

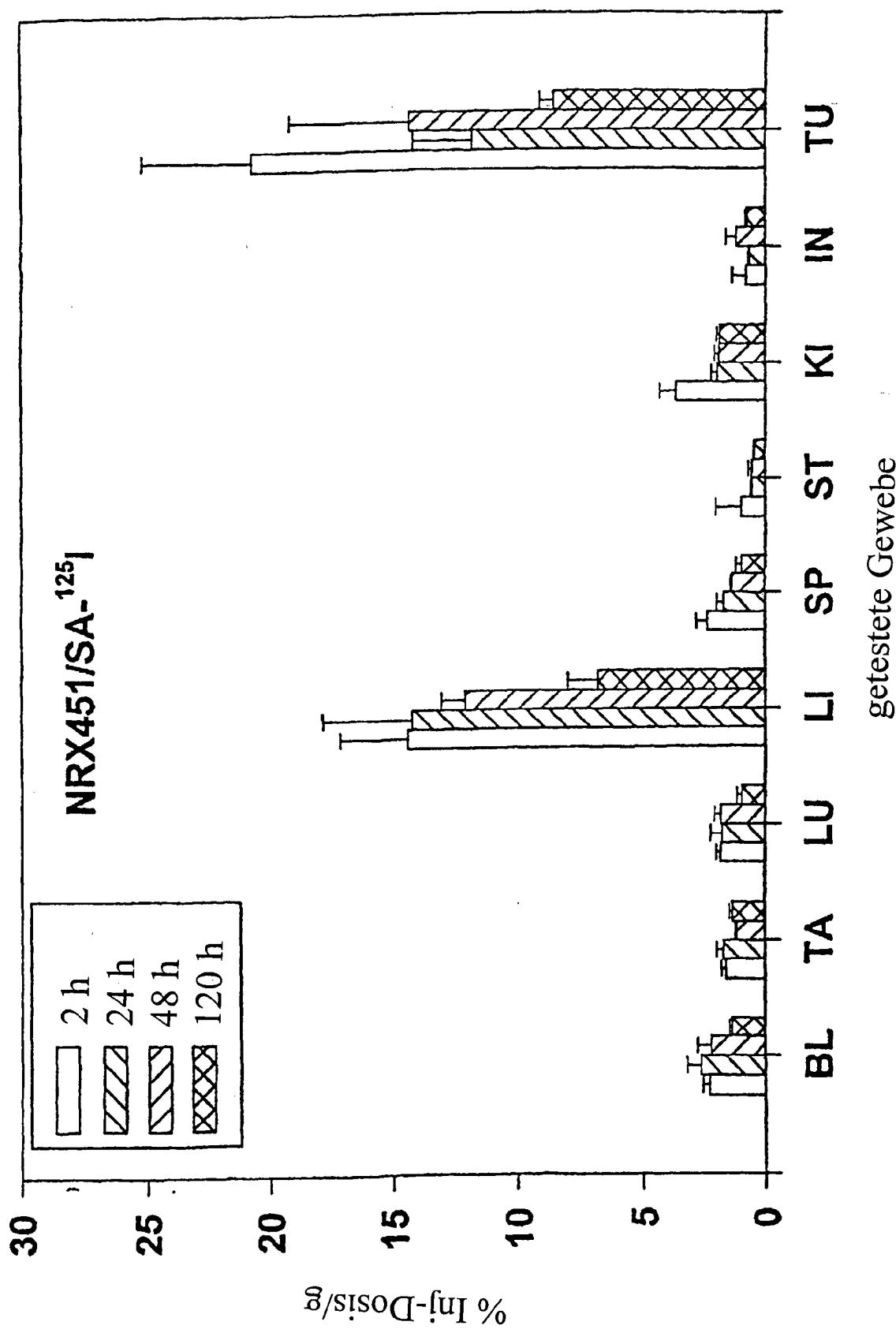
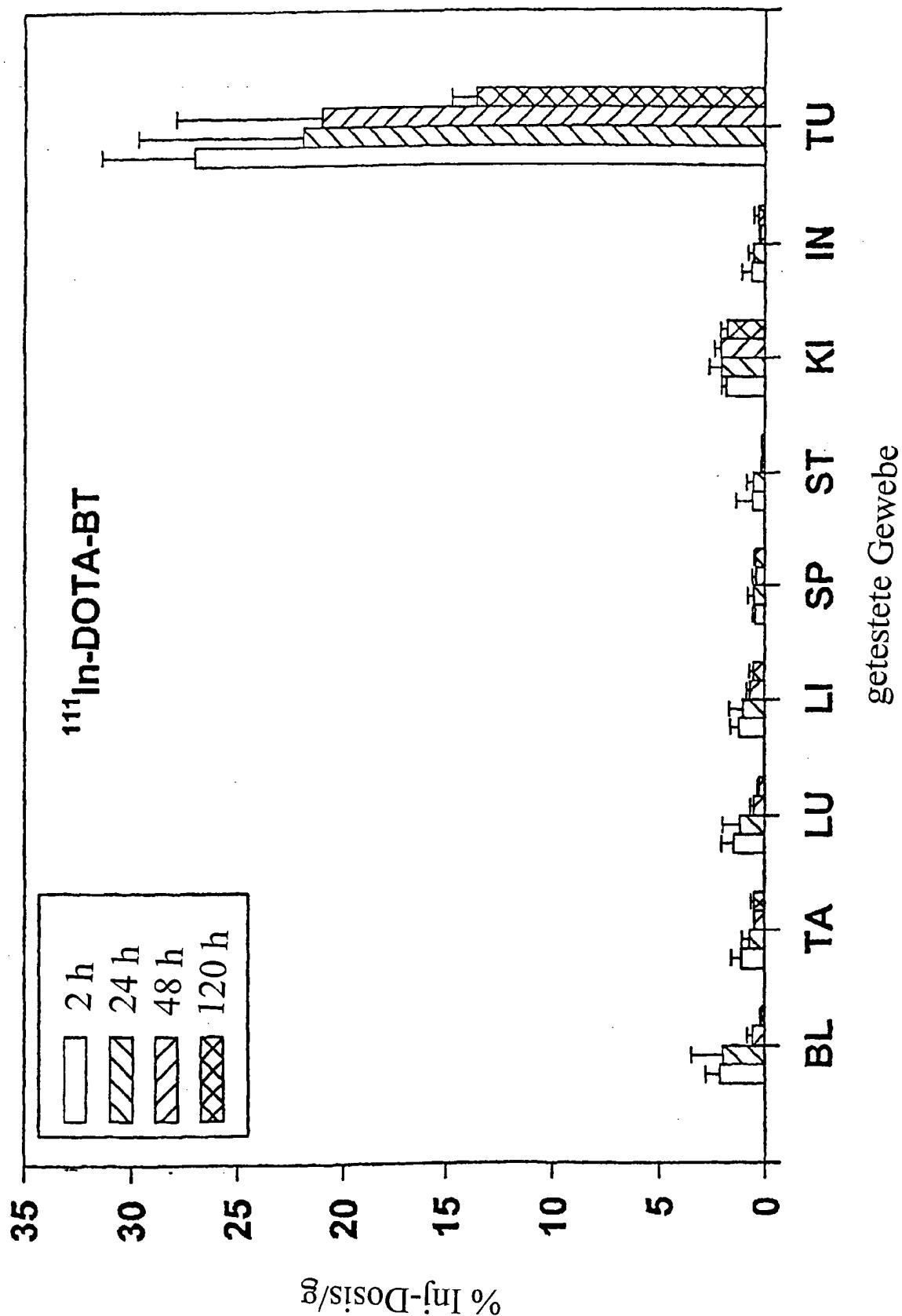


Figure 24a



Figur 24b