



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20020769A A2

HR P20020769A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **C 12 N 15/13**

C 07 K 16/28

C 12 N 15/62

C 07 K 19/00

A 61 K 47/48

A 61 P 35/00

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: **24.09.2002.**

(43) Datum objave prijave patenta u HR: **31.12.2003.**

(86) Broj međunarodne prijave: **PCT/US01/05923**

Datum podnošenja međunarodne prijave **23.02.2001.**

(87) Broj međunarodne objave: **WO 01/62931**

Datum međunarodne objave **30.08.2001.**

(31) Broj prve prijave: 60/185,039

(32) Datum podnošenja prve prijave: 25.02.2000.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

The Government of the United States, as represented by The Secretary of the Department of Health and Human Services Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325, Rockville, 20852-3804 MD, US

(72) Izumitelji:

Duke University, Office of Science and Technology, Duke University Medical Center, Davison Bldg. Room 454, Durham, 27710 NC, US
Ira Pastan, 11710 Beall Mountain Road, Potomac, 20854, US
Richard Beers, 2827 28th Street NW, Washington DC, 20008, US
Partha, S. Chowdbury, 1001 Rockville Pike, Rockville, 29852, US
Darell Bigner, 5133 Corbett Ridge Road, Mebane, 27302, US

(74) Punomoćnik:

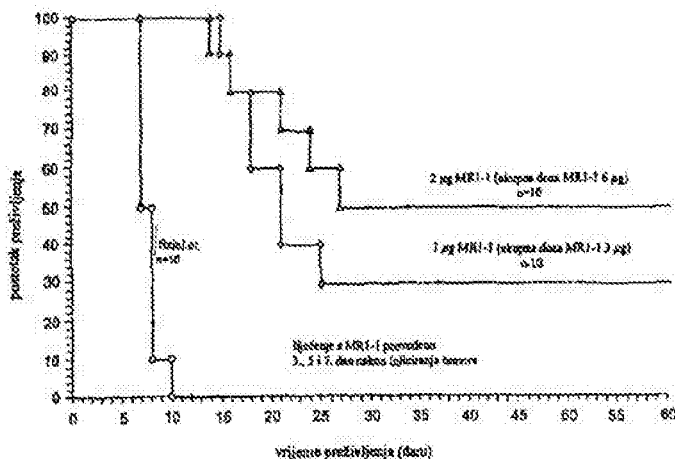
Mladen VUKMIR, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

PROTUGFRVIII SCFVS S POBOLJŠANOM CITOTOKSIČNOŠĆU I PRINOSOM, IMUNOTOKSINI TEMELJENI NA NJEMU, TE POSTUPCI ZA NJIHOVU UPORABU

(57) Sažetak: Izum opisuje protutijela za mutirani oblik receptora za epidermalni činitelj rasta poznat kao EGFRVIII. Ovaj se mutirani oblik nalazi isključivo ili primarno na površini stanica glioblastoma, te na stanicama karcinoma dojke, jajnika i ne-mikrocelularnog karcinoma pluća. Protutijela ovog izuma imaju višu sklonost za EGFRVIII i tvore imunotoksine s višom citotoksičnošću i prinosom od protutijela iz ranijih dostignuća, uključujući scFv označen kao MR1. Izum se posebice opisuje protutijelo, nazvano MR1-1, koje mutira MR1 u CDR3 VH i VL lanaca, čime nastaje protutijelo sa osobito dobrom citotoksičnošću. Izum opisuje i dodatna protutijela u kojima je MR1 mutiran u CDR1 i 2 VH i VL, ili oba, s boljim vezanjem na EGFRVIII u odnosu na roditeljsko MR1 protutijelo.

Liječenje U87MG/EGFRVIII neoplastičnog meningioma s MR1-1 imunotoksinom intratekalno



HR P20020769A A2

OPIS IZUMA

Uputa na srodne prijave

- 5 Ova prijava polaže pravo na SAD privremenu patentnu prijavu 60/185,039, podnesenu 25. veljače 2000., čiji je sadržaj sadržan u navodu.

Izjava o pravima na izum izrađen u okviru državno potpomognutih istraživanja i razvoja

- 10 Nije primjenjivo.

Područje tehnike

- 15 Mutirani oblik receptora za epidermalni činitelj rasta, označen kao "EGFRvIII", jako je izražen u nekih 50-60% glioblastoma a također je pokazano da je prisutan u nekih 70-80% karcinoma dojke i jajnika i u oko 16% ne-mikrocelularnih karcinoma pluća (Wikstrand i sur., *Cancer Res.* 55:3140-3148 (1995); Moscatello i sur., *Cancer Res.* 55:5536-5539 (1995)). Mutacija se sastoji od delecije unutar okvira, egzona 2-7 blizu amino kraja vanstanične domene koja dovodi do izražaja EGFR gRNK s delecijom 801 baze. Mutirani protein sadrži novi glicinski kodon na spoju reza (Moscatello i sur., *gore*). Mutirani receptor je izražen na površini stanice i oblikuje novi tumor specifični epitop stanične površine na spoju delecije. Receptor ima konstitutivnu aktivnost tirozin kinaze koja pojačava tumorigeničnost glioblastoma *in vivo* (Nishikawa i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci. SAD* 91:7727-7731 (1994)). Zbog tumor-specifičnog izvanstaničnog slijeda, mutirani receptor je privlačna potencijalna meta za terapiju raka, osobito putem imunotoksina.

- 25 Imunotoksini se tvore spajanjem ciljajućeg dijela, kao što je protutijelo ili dio protutijela, na proteinski toksin kao što je *Pseudomonas* egzotoksin.

- 30 Pokazano je da su imunotoksini aktivni protiv solidnih tumora u čovjeka, kao što je vidljivo iz Faze I kliničkog ispitivanja u kojem su imunotoksini, izrađeni s protutijelom specifičnim za Lewis Y-vezan antigen koji je prekomjerno izražen na brojnim tumorima, doveli do povlačenje tumora (Pai i sur., *Nat Med.* 2:350-353 (1996)). Imunotoksini, poput onog iz studije Paia i sur., koja je učinjena s potpunim mišjim monoklonalnim protutijelom, ipak imaju određene mane. Oni su relativno veliki, što ograničava prodiranje u tumor. Nadalje, često postoji heterogenost veza između protutijela i toksina, što otežava proizvodnju konjugata u velikim količinama. Slično tome, različita protutijela protiv EGFRvIII poznata u struci, kao što je prikazano u SAD patebtu br. 5,212,290, WO 96/16988 i Reist i sur., *Cancer Res.* 55:4375-4382 (1995), imaju ograničenja za tvorbu imunotoksina. Pokušaji prevladavanja ovih problema, izradom potpuno rekombinantnih imunotoksina u kojima se klonirani Fvs koriste za ciljanje, nisu uspjeli jer većina varijabilnih domena protutijela slabo djeluju kao Fvs ili zbog nestabilnosti zbog slabe V_H-V_L veze ili zbog slabog afiniteta vezanja.

- 40 MR1 je jednolančana varijabilna domena protutijela (scFv) koja se specifično veže za EGFRvIII. MR1 scFv je izoliran iz probirne banke protutijela faga (Lorimer i sur., *Proc Natl. Acad. Sci. SAD* 93:14815-14820 (1996)). Banka scFv koja sadrži MR1 pripremljena je od gRNK iz slezene miša imuniziranog s EGFRvIII specifičnim peptidom i izvanstaničnom domnom EGFRvIII, pročišćenom afinitetnom kromatografijom iz tumorskog kscnografa koji izražava EGFRvIII (Lorimer i sur., *Clin Cancer Res.* 1:859-864 (1995)). MR1 je razvijen kao primjer razvijanja terapijskog sredstva koje bi bilo specifično usmjereno na EGFRvIII-pozitivne tumorske stanice. Slijed za MR1 je pohranjen u GenBank pod Ulaznim Brojem U76382.

- 45 Imunotoksin MR1(Fv)-PE38 napravljen je spajanjem scFv od MR1 na nepotpuni oblik *Pseudomonas* endotoksina A, PE38, kojemu nedostaju sve domene Ia i aminokiseline 365-380 od domene Ib (Lorimer i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci. SAD* 93:14815-14820 (1996)). Nekoliko drugih rekombinantnih PE38 imunotoksina je trenutno u kliničkim ispitivanjima (Kreitman i sur., *Blood* 94(10):3340-48 (1999); Pai-Scherf i sur., *Clin. Cancer Res.* (u tisku) (1999); Pai i sur., *Clin. Application Immunotoxins* 234:83-96 (1998)). Općenito, geni scFv se udružuju s PE38 genom putem kratkog povezača i kloniraju u ekspresijski vektor temeljen na T7. Rekombinantni imunotoksini se izražavaju u *E. coli*, gdje se nakupljaju u inkluzijskim tjelešcima. Nakon što se inkluzijska tjelešca obilno isperu, otapaju se u gvanidin hidrokloridu a protein se renaturira i pročišćava pomoću kromatografije s ionskom izmjenom i filtracije na gelu. Dobivene molekule su aktivne i usmjerene na stanično specifičan antigen putem scFv. Smrt stanice je uzrokovana aktivnošću toksina.

- 55 Da bi bili korisni kao terapijska sredstva, imunotoksini trebaju imati visok afinitet za antigen, s posljedičnom visokom citotoksičnošću prema stanicama koje izražavaju antigen. Da bi se olakšala proizvodnja i pitanje troškova, prednost bi bila da se imunotoksini mogu proizvoditi u visokom prinosu. MR1(scFv)-PE38 ima najveći afinitet i najviše je citotoksičan imunotoksin dostupan protiv stanica koje izražavaju EGFRvIII, ali je daleko od idealnog. Ima K_d od 8nM a prinos manji od 3%. Prednost bi bila u razvijanju protutijela koja vezuju EGFRvIII s većim afinitetom i koja, vezana za PE38 ili drugi toksin, stvaraju imunotoksine s većom citotoksičnošću prema stanicama koje izražavaju EGFRvIII. Uz to, bilo bi korisno pronaći protutijela koja stvaraju imunotoksine u višem prinosu.

Nekoliko pokušaja, za razrješenje ovih problema razvijanjem dodatnih scFv iz monoklonalnih protu-EGFRvIII protutijela, je propalo. MR1 ostaje jedini scFv dostupan struci za ciljanje protu-EGFRvIII imunotoksina.

Sažetak izuma

S jednog stajališta, izum donosi protutijela s poboljšanim vezanjem za mutirani oblik receptora za epidermalni činitelj rasta poznat kao EGFRvIII. Osobito, izum donosi polipeptide s mutiranim varijabilnim (V_H) područjem teškog lanca ili mutiranim područjem lakog lanca (V_L) protutijela ili oboje, koji imaju Kd za EGFRvIII od 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3.5 nM, 3 nM ili niže, mutirani V_H ili V_L koji imaju slijed različit od roditeljskog V_H ili V_L u MR1 protutijelu, kako je navedeno, aminokiselinskom izmjenom najmanje jedne aminokiseline u području koje određuje komplementarnost (CDR), kodiranjem aminokiseline kodonom koji sadrži nukleotid koji pripada "hot spot" slogu odabranom između AGY ili RGYW, u kojem je R jednako A ili G, Y jednako C ili T i W jednako A ili T. U nekim oblicima, zamjena se može desiti u CDR3 V_H ili CDR3 V_L . U drugim oblicima, zamjene se mogu desiti u CDR1 V_H ili CDR2 V_H ili oboje ili u CDR1 V_L ili CDR2 V_L ili oboje ili u bilo kojoj kombinaciji CDR1, 2 i 3 V_H i V_L . Na primjer, u jednom obliku, zamjena se može desiti u CDR3 V_L , CDR2 V_L i CDR1 V_H .

U preporučljivom obliku, polipeptid ima zamjenu u CDR3 V_H najmanje jedne aminokiseline odabrane iz skupine koja se sastoji od S98 i T99. U drugim preporučljivim oblicima, zamjena se odabire između P98-Y99, P98-N99, P98-W99, P98-I99, P98-F99 i P98-V99. Nadalje, polipeptid može imati zamjenu u CDR3 V_L kod kojeg je W zamijenjen s F na poziciji 92. U osobito preporučljivom obliku, polipeptid ima zamjenu u teškom lancu od S98P-T99Y, a laki lanac sadrži zamjenu F92W (koja definira protutijelo označeno kao "MR1-1").

Ranije opisani polipeptidi mogu biti jednolančane varijabilne regije protutijela ("scFv"), Fv stabiliziran disulfidima, Fab, F(ab')₂ ili drugi dio protutijela koji zadržava sposobnost prepoznavanja i vezanja na antigen. Također mogu sadržavati površinski protein bakteriofaga.

U preporučljivim oblicima, ranije opisani polipeptidi imaju Kd za EGFRvIII najmanje 1 nM niži nego onaj od MR1. Polipeptidi mogu imati Kd od 7, 6, 5, 4, 3 ili niži.

Ranije opisani polipeptidi mogu se također udružiti, prihvatiti ili na drugi način vezati za djelatnu molekulu, terapijski dio ili vidljivi biljeg. Terapijski dio može biti toksin ili citotoksični dio toksina ("toksični dio"), koji, u sprezi s polipeptidom tvori imunotoksin. Toksični dio može biti toksin difterije ili njegov citotoksični dio, saporin, toksin iz kermesa, protuvirusni protein, ricin ili njegov citotoksični dio i briodin 1. U preporučljivim oblicima, toksin je *Pseudomonas* egzotoksin ("PE") ili citotoksični dio PE. U osobito preporučljivim oblicima, PE je PE38. Imunotoksini tvoreni kombinacijom polipeptida i toksičnog dijela mogu imati IC₅₀ od 7 ng/mL ili niže, 6 ng/mL ili niže, 5 ng/mL ili niže, 4 ng/mL ili niže ili od otprilike 3.5 ng/mL ili niže. Prinos imunotoksina, kad su rekombinantno izraženi, može biti barem 3%, a može biti 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% ili više.

Nadalje, izum donosi molekule nukleinske kiseline koje kodiraju polipeptide s mutiranim varijabilnim područjima teškog (V_H) lanca protutijela ili mutiranim područjima lakog lanca (V_L) ili oboje, koji imaju Kd za EGFRvIII od 7 nM ili niže, mutirani V_H ili V_L imaju slijed različit od roditeljskog V_H ili V_L u MR1 protutijelu, kako je navedeno, aminokiselinskom zamjenom barem jedne aminokiseline u području koje određuje komplementarnost (CDR), aminokiselinu kodiranu kodonom koji sadrži nukleotid koji pripada "hot spot" slogu odabranom između AGY ili RGYW, gdje je R jednako A ili G, Y jednako C ili T, a W jednako A ili T. U nekim oblicima, zamjena se može desiti u CDR3 V_H ili CDR3 V_L . U drugim oblicima, zamjena se može desiti u CDR1 V_H ili CDR2 V_H ili oboje ili u CDR1 V_L ili CDR2 V_L ili oboje ili u bilo kojoj kombinaciji CDR1, 2 i 3 V_H i V_L .

Na primjer, u jednom obliku, zamjena se može desiti u CDR3 V_L , CDR2 V_L i CDR1 V_H .

U preporučljivom obliku, molekula nukleinske kiseline kodira polipeptid s zamjenom u CDR3 V_H , u usporedbi s MR1, od barem jedne aminokiseline odabrane iz skupine koja se sastoji od S98 i T99. U drugim preporučljivim oblicima, zamjena se odabire između P98-Y99, P98-N99, P98-W99, P98-I99, P98-F99 i P98-V99. Molekula nukleinske kiseline također može kodirati polipeptid s zamjenom u CDR3 V_L , u usporedbi s MR1, koja sadrži W zamijenjen s F na poziciji 92.

Molekule nukleinske kiseline mogu kodirati polipeptide koji su jednolančana varijabilna područja protutijela ("scFv"), Fv stabilizirani disulfidom, Fab, F(ab')₂ ili drugi ulomak protutijela koji zadržava sposobnost prepoznavanja i vezanja na antigen. Polipeptidi mogu također sadržavati površinski protein bakteriofaga. Ranije opisane molekule nukleinskih kiselina mogu se učinkovito vezati za promotor.

U drugoj skupini oblika, izum donosi metode ubijanja stanice koja nosi antigen, koja sadrži dodir stanice s imunotoksinom koji sadrži toksični dio i ciljajući dio, ciljajući dio sadrži polipeptid s mutiranim varijabilnim područjem

teškog lanca (V_H) protutijela ili mutiranim područjem lakog lanca (V_L) ili oboje, čiji polipeptid ima Kd za EGFRvIII od 7 nM ili niže, mutirani V_H ili V_L imaju slijed različit od roditeljskog V_H ili V_L u MR1 protutijelu, kako je navedeno, aminokiselinskom zamjenom barem jedne aminokiseline u području koje određuje komplementarnost (CDR), aminokiselinu kodiranu kodonom koji sadrži nukleotide koji pripadaju "hot spot" slogu odabranom između AGY ili RGYW, gdje je R jednako A ili G, Y jednako C ili T, a W jednako A ili T. U nekim oblicima, zamjena se može desiti u CDR3 V_H ili CDR3 V_L . U drugim oblicima, zamjene se mogu desiti u CDR1 V_H ili CDR2 V_H ili oboje ili u CDR1 V_L ili CDR2 V_L ili oboje ili u bilo kojoj kombinaciji CDR1, 2 i 3 V_H i V_L .

U preporučljivom obliku, metoda sadrži ciljajući dio koji sadrži polipeptid s zamjenom u CDR3 V_H od barem jedne aminokiseline odabrane iz skupine koja se sastoji od S98 i T99. U drugim preporučljivim oblicima, ciljajući dio sadrži polipeptid koji sadrži zamjenu odabranu između P98-Y99, P98-N99, P98-W99, P98-I99, P98-F99 i P98-V99. U osobito preporučljivom obliku, ciljajući dio je MR1-1.

Ciljajući dio može biti jednolančano varijabilno područje protutijela ("scFv"), Fv stabiliziran disulfidom, Fab, $F(ab')_2$ ili drugi ulomak protutijela koji zadržava sposobnost prepoznavanja i vezivanja na antigen.

Stanica koja nosi antigen može biti maligna stanica, poput stanice glioma, stanice karcinoma dojke, stanice karcinoma pluća ili stanice karcinoma jajnika.

Kratak opis crteža

Slika 1. Slika 1 prikazuje strategiju za PCR izgradnju banke mutanata. A. pCANTAB5E-MR1 je korišten kao predložak za umnožavanje korištenjem uzvodne početnice, S1 i nizvodne početnice CDR3H b, d ili f, koji sadrži izmjene (NNS) u ciljanim područjima. B. pCANTAB5E-MR1 je korišten kao predložak za umnožavanje koristeći produkte reakcije iz koraka A kao uzvodne početnice i nizvodnu početnicu AMBN. C. Produkti iz reakcije B razgrađeni su i klonirani u pCANTAB5E.

Slika 2. Senzogram BIA jezgre MR1, MR1-1 i MR1 sa S98P-T99Y mutacijama u V_H CDR3.

Slika 3. Preživljenje atimičnih štakora s intrakranijalnim tumorima od humanih stanica glioblastoma koje su transficirane s EGFRvIII i liječenih s imunotoksinima usmjerenim na MR1-1. Os Y pokazuje postotak preživljenja životinja u zadanoj vremenskoj točki. Os X pokazuje vrijeme preživljenja u danima. Legenda: MR-1 predstavlja MR1-1-PE38 imunotoksin. Ispunjeni rombovi, životinje koje su dobivale 6 μ g MR1-1-PE38 imunotoksina kroz razdoblje od 7 dana putem 24-satne infuzije. Otvoreni trokut: životinje koje su dobivale 2 μ g MR1-1-PE38 imunotoksina prema istom rasporedu. Otvoreni krug: životinje koje su dobivale fiziološku otopinu kao kontrolu prema istom rasporedu.

Slika 4. Preživljenje atimičnih štakora s intrakranijalnim tumorima od humanih stanica glioblastoma transfeciranih s EGFRvIII i liječenih s imunotoksinima usmjerenim na MR1-1 ili fiziološkom otopinom kao kontrolom. Os Y pokazuje postotak preživljenja životinja u zadanoj vremenskoj točki. Os X pokazuje vrijeme preživljenja u danima. Legenda: MR1-1, predstavlja MR1-1-PE38 imunotoksin. Otvoreni rombovi, životinje koje su primale 0.2 μ g MR1-1-PE38 imunotoksina (u 200 μ L PBS-a s 0.2% HSA) kroz razdoblje od 7 dana putem 24-satne infuzije. Otvoreni trokut: životinje koje su primale 0.6 μ g MR1-1-PE38 imunotoksina na isti način. Otvoreni krug: životinje koje su primale 2.0 μ g MR1-1-PE38 imunotoksina na isti način. "X", životinje koje su na isti način primale kontrolnu fiziološku otopinu.

Slika 5. Preživljenje atimičnih štakora s neoplastičnim meningitisom nakon intratekalnog iniciranja humanih stanica glioblastoma transfeciranih s EGFRvIII i liječenih s imunotoksinom usmjerenim na MR1-1 ili kontrolnom fiziološkom otopinom. Os Y pokazuje postotak preživljenja životinja u zadanoj vremenskoj točki. Os X pokazuje vrijeme preživljenja u danima. Legenda: MR1-1 predstavlja MR1-1-PE38 imunotoksin. Trokuti: životinje koje su dobivale 2 μ g MR1-1-PE38 imunotoksina u 40 μ L PBS-a s 0.2 % HA na dane 3, 5 i 7 nakon inicijacije tumora. Rombovi: životinje koje su dobivale 1 μ g MR1-1-PE38 imunotoksina u 40 μ L PBS-a s 0.2 % HA na dane 3, 5 i 7 nakon inicijacije tumora, do ukupne doze od 3 μ g imunotoksina. Krugovi: životinje koje su dobivale 40 μ L PBS-a s 0.2 % HA na dane 3, 5 i 7 nakon inicijacije tumora, kao kontrolu.

Slika 6. Volumen tumora, kroz vremensko razdoblje, u atimičnih miševa iniciranih u desni bok sa stanicama humanog glioblastoma transficiranih s EGFRvIII i liječenih s imunotoksinom usmjerenim na MR1-1 ili fiziološkom otopinom kao kontrolom. Os Y pokazuje volumen tumora u mm^3 . Os X pokazuje vrijeme u danima od početka liječenja (životinjama su inicirane tumorske stanice 7 dana prije dana "0"). Legenda: MR1-1 predstavlja MR1-1-PE38 imunotoksin. Kvadrati: životinje koje su primale 1 μ g MR1-1-PE38 imunotoksina u bolus injekcijama od 20 μ L na dane 0, 2 i 4, do ukupne doze od 3 μ g. Obični trokuti: životinje koje su primale 2 μ g MR1-1-PE38 imunotoksina u bolus injekcijama u 20 μ L fiziološke na dane 0, 2 i 4, do ukupne doze od 6 μ g imunotoksina. Obrnuti trokuti: životinje koje su primale 3 μ g MR1-1-PE38 imunotoksina u bolus injekcijama u 20 μ L fiziološke na dane 0, 2 i 4, do ukupne doze od 9 μ g imunotoksina. Rombovi: životinje koje su primale bolus injekcije od 20 μ L fiziološke otopine na dane 0, 2 i 4, kao kontrolu.

Podrobniji opis**I.Uvod**

Ovaj izum opisuje scFv protutijela i druga protutijela s većim afinitetom za EGFRvIII nego što ima MR1. Nadalje, opisuje imunotoksine s većom citotoksičnošću za stanice koje izražavaju EGFRvIII, nego je imaju isti imunotoksini koji koriste MR1 kao ciljajući dio molekule. Protutijela se tvore od MR1, ali su mutirana u "hot spot" područjima njihovih područja koja određuju komplementarnost (CDR). Iznenadujuće, imunotoksini koji sadrže ove mutirane oblike MR1 kao ciljajuće dijelove, ne samo da imaju visok afinitet za EGFRvIII, nego se mogu i proizvesti u znatno višim prinosima nego slični imunotoksini koji koriste MR1 kao ciljajući ulomak molekule.

Ograničavajući činitelj u izradi banki protutijela s probranim CDR je velik broj ostataka koji sačinjavaju CDR. Radi nepostojanja rentgenskih struktura za većinu protutijela, obično nema niti pokušaja identifikacije nekolicine CDR ostataka gdje bi mutacije mogle dati oblike višeg afiniteta. Posljedično, nužno je izraditi iznimno velike probirne banke da bi se osiguralo izdvajanje oblika s višim afinitetom.

U probnim ispitivanjima, mutacije su učinjene u CDR3 varijabilnog područja teškog lanca (V_H) MR1. V_H CDR3 od MR1 ima jedanaest aminokiselinskih ostataka. Posljednja dva ostatka V_H područja, D101 i Y102, bili su isključeni iz ispitivanja mutageneze jer se nije smatralo vjerojatnim da bi sudjelovali u vezanju antigena, iz dva razloga. Prvo, ova dva ostatka obično leže na spoju s V_L lancem. Posljedica toga je da nisu izloženi. Drugo, ovim ostacima je pridodan J segment i slijede 3'-spojno područje V_H CDR2. Posljedično, oni su nešto bolje očuvani nego ostatak V_H CDR3.

Ostalih devet aminokiselina na svakom od mjesta u CDR3 V_H bile su zamijenjene sa svakom od drugih prirodnih aminokiselina. Ispitivanja su pokazala da samo mutacije u područjima poznatima kao «hot spots» (područja za koja se zna da hipermutiraju tijekom sazrijevanja afiniteta protutijela, najbolje obilježena sa slogovima RGYW i AGY gdje je R jednako A ili G, Y jednako C ili T i W jednako A ili T) dovode do stvaranja protutijela s citotoksičnošću višom od roditeljskog protutijela MR1. Također je nađeno da mutacije pospješuju prinos dobivenog imunotoksina, kada se ovi mutirani scFv ugrade u imunotoksine, u usporedbi sa sličnim imunotoksinima dobivenim s roditeljskim MR1 scFv. U daljnjim probnim ispitivanjima, mutacije su učinjene u MR1 CDR3 varijabilnog područja lakog lanca. U ovim ispitivanjima, mutacije su učinjene samo na aminokiselinama unutar «hot spot». I opet, mutacije su dale protutijela s višom citotoksičnošću i prinosom nego roditeljsko protutijelo MR1.

Prema ovim rezultatima, nije potrebno probirati svaki ostatak u CDR da bi se otkrili oni čije će mutacije dati varijantu višeg afiniteta. Za očekivati je da će mutacije u «hot spot» od V_H i V_L CDRa 1 i 2 također dati protutijela s poboljšanim afinitetom za EGFRvIII, poboljšanom citotoksičnošću prema stanicama koje izražavaju EGFRvIII kada se ugrade u imunotoksine i poboljšan prinos imunotoksina s ugrađenim takvim scFv u usporedbi s imunotoksinima temeljenim na MR1. S obzirom da su poboljšana svojstva nastala zbog zamjene aminokiselina, isti pozitivni učinci će se naći i kada se ovi mutirani oblici MR1 (uključujući one mutirane u V_H i V_L CDR3) ugrade u disulfidima stabilizirane Fvs (dsFvs) ili u Fab', F(ab')₂ ili Fab.

Povećana citotoksična aktivnost nije nužno povezana s povećanim afinitetom (Tablice 4 i 5, *gore*). Nema jasnog objašnjenja za ovaj nedostatak uzajamne povezanosti. Pored afiniteta vezanja, koji se obično mjeri na 22°C, ima više koraka u procesu toksičnosti koji mogu biti pogođeni «hot spot» mutacijama. Neki od tih koraka uključuju stabilnost na 37°C, brzinu ulaska u stanicu, proteolitičku razgradnju i premještanje u odjeljak potreban za translokaciju. Moguće je da su jedan ili više od ovih koraka pogođeni. Protutijela s višim afinitetom za EGFRvIII su, ipak, korisna u razne svrhe, osobito za dijagnostiku i *in vitro* testove za određivanje prisutnosti ili odsutnosti stanica koje izražavaju EGFRvIII, u uzorku. Na primjer, za *in vitro* uporabu, protutijela poput scFv s višim afinitetom za EGFRvIII mogu se vezati za radionuklide ili bilo koje druge vidljive biljege i koristiti se za otkrivanje prisutnosti stanica koje izražavaju EGFRvIII u biopsiji od bolesnika, da bi se odredilo ima li bolesnik karcinom obilježen prisutnošću takvih stanica ili da bi se odredilo da karcinom još nije potpuno uklonjen u bolesnika za kojeg je poznato da ima takav karcinom. Slično, za *in vivo* uporabu, scFv, dsFv ili druga protutijela ovog izuma, mogu se vezati za radionuklide ili druge vidljive biljege i koristiti se za otkrivanje prisutnosti stanica koje izražavaju EGFRvIII u bolesnika i tako opet dijagnosticirati ima li bolesnik karcinom obilježen prisutnošću takvih stanica ili da karcinom još nije potpuno uklonjen u bolesnika za kojeg je poznato da ima takav karcinom.

Napokon, jedna izrazita razlika opažena među CDR mutantama bila je krajnji prinos aktivnog monomernog proteina. Rekombinantni proteini nakupljaju se u inkluzijskim tjelešcima kao netopivi agregirani proteini (imunotoksini). Aktivni monomeri dobivaju se otapanjem inkluzijskih tjelešaca u 6M gvanidin HCl, nakon čega slijedi kontrolirana renaturacija u redoks sustavu i odvajanje monomera od multimera i agregata.

Ispitivanja su pokazala da mutacije u 1 ili 2 aminokiseline u CDR mogu znatno povećati prinos (Tablica 6) imunotoksina, kako je definirano i objašnjeno u nastavku. Prinos MR1(Fv)-PE38 je samo 2%, ali je izuzetno povećana

na 17% s mutacijama teškog lanca CDR3 S98-T99S. Može se pretpostaviti da ove mutacije imaju snažan učinak na put presavijanja. Općenito, svi mutanti teških lanaca izdvojeni u početnoj mutagenezi teškog lanca davali su veći prinos nego roditeljski MR1. Stoga je teški lanac CDR3 jako važan za pravilno presavijanje a ekspresijski sustav faga može, na neki način, odabrati proteine koji se učinkovitije presavijaju. Posljedično, fag, koji sadrži Fvs koji se bolje presavija, je, čini se, prisutan u većem broju i njegovo umnažanje prevladava tijekom oblaganja antigena.

Na temelju ovih rezultata, za očekivati je da se sadržaj faga može koristiti za odabir Fvs mutirane u CDR1 ili 2 V_H i V_L lanaca, koji također pokazuju povećan proizvedeni prinos u usporedbi s roditeljskim MR1 scFv.

In vivo testovi provedeni su da bi se odredio učinak probnih imunotoksina ciljanih s MR1-1 na životinjskim modelima humanih tumora. Da bi uspostavili tumore, atimični štakori i miševi inicirani su intrakranijalno, intratekalno ili supkutano sa stanicama humane stanične linije glioblastoma (U87MG) koja je transfecirana da bi izražavala EGFRvIII (transfecirana stanična linija koja izražava EGFRvIII nazvana je U87MG.ΔEGFRvIII i opisana je od strane Nishikawa i sur., *Proc Natl Acad Sci (USA)* 91(16):7727-7731 (1994)). Jednom kad su tumori uspostavljeni, štakori ili miševi su liječeni s bolus injekcijama ili kontinuiranim infuzijama različitih doza imunotoksina. Kao što je opisano u Primjerima u nastavku i Slikama 3-6, bez obzira na smještaj tumora i metodu primjene imunotoksina, životinje koje su dobivale imunotoksin u dozama od 1 ili 2 μg pokazale su značajno manji rast tumora i duže vrijeme preživljenja, nego životinje koje su dobivale kontrolnu fiziološku otopinu.

II. Definicije

Jedinice, prefiksi i simboli naznačeni su u svom obliku prihvaćenom od Međunarodnog sustava jedinica (SI). Numerički rasponi uključuju brojeve koji definiraju raspon. Ako nije drugačije naznačeno, nukleinske kiseline pisane su s lijeva na desno u smjeru od 5' prema 3'; slijedovi aminokiselina pisani su s lijeva na desno u smjeru od amino prema karboksi kraju. Ovdje izneseni naslovi nisu ograničenja različitih koraka ili oblika izuma, koji se mogu razlučiti upućivanjem na specifikaciju u cijelosti.

Prema tome, pojmovi definirani neposredno u nastavku bolje se definiraju upućivanjem na specifikaciju u cijelosti.

Ostaci mutirani u odnosu na poznati slijed označeni su dogovorno, navodeći, s jednom pisanom oznakom, ostatak koji se uobičajeno nalazi na određenom mjestu u slijedu, mjesto u slijedu mutiranog ostatka i ostatak koji zamjenjuje izvorni ostatak. Stoga, na primjeru MR1 CDR3 V_H, izraz «S98P» ukazuje da je serin, kojeg uobičajeno nalazimo na mjestu 98 normalnog teškog lanca CDR3 MR1, mutiranjem zamijenjen prolinom. Oznaka poput «S98» u kojoj iza broja ne slijedi oznaka ostatka odnosi se ili na ostatak koji se uobičajeno nalazi na tom mjestu u uobičajenom slijedu peptida ili da je taj specifični ostatak sada prisutan na tom mjestu (npr., da je navedeni ostatak zamijenjen s ostatkom kojeg uobičajeno nalazimo na tom mjestu). Značenje koje mu je ovdje namijenjeno biti će jasno iz konteksta. Ovdje korištene upute na određene numerirane aminokiselinske ostatke od MR1-1 odnose se na ostatke numerirane prema Kabat i sur., SEQUENCE OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, U.S. Department of Health and Human Services, (1987), prema nadopuni; ova uputa se u nastavku spominje kao «Kabat» (čiji je sadržaj ovdje citiran) kada se slijed scFv posloži i numerira prema Kabatovom sustavu.

«EGFRvIII» predstavlja mutirani oblik receptora za epidermalni činitelj rasta kojeg prepoznaje MR1 scFv i obilježen je s 801 parom baza u okvirnoj deleciji egzona 2-7 blizu amino kraja. Ovaj oblik receptora je poznat u struci, kako su pokazali Wickstrand i sur., Moscatello i sur. i Lorimer i sur. u navodima citiranim u Pozadini izuma. Radi promjene u nazivlju, EGFRvIII je početno označen kao Tip II mutacija u nekim ranijim radovima iz ovog područja, kako je pokazano u SAD patentu br. 5,212,290.

U ovdje korištenom značenju, «protutijelo» uključuje uputu na imunoglobulinsku molekulu imunološki reaktivnu s određenim antigenom, a gdje je prikladno, uključuje i poliklonalna i monoklonalna protutijela. Ovaj izraz također uključuje genetski izmijenjene oblike kao što su kimerična protutijela (npr., humanizirana mišićja protutijela), heterokonjugirana protutijela (npr., bispecifična protutijela). Ovaj izraz se, ovdje, osobito odnosi na rekombinantne jednolančane Fv ulomke (scFv), disulfidima stabilizirane (dsFv) Fv ulomke, (vidi, U.S.S.N. 08/077,252, ovdje navedene) ili pFv ulomke (vidi SAD privremene patentne prijave 60/042,350 i 60/048,848). Izraz «protutijelo» također uključuje oblike protutijela koje vezuju antigen, uključujući ulomke sa sposobnošću vezanja antigena (npr., Fab', F(ab')₂, Fab, Fv i rIgG. Vidi također, Pierce Katalog i Priručnik, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Vidi također, npr. Kuby, J., *Imunologija*, 3. izdanje, W.H. Freeman & Co., New York (1998). Na koje se značenje izraz odnosi vidjet će se iz konteksta.

Protutijelo koje je imunološki reaktivno s određenim antigenom može se proizvesti rekombinantnim metodama kao što su probir banki rekombinantnih protutijela u faga ili sličnih vektora, *vidi, npr.*, Huse i sur., *Science* 246:1275-1281 (1989); Ward i sur., *Nature* 341:544-546 (1989); i Vaughan i sur., *Nature Biotech.* 14:309-314 (1996) ili imunizacijom životinje s antigenom ili s DNA koja kodira antigen.

Uobičajeno, imunoglobulin ima teški i laki lanac. Svaki teški i laki lanac sadrži konstantno područje i varijabilno područje, (područja su još poznata i kao «domene»). Laki i teški lanac varijabilnog područja sadrže četiri «okvirna» područja isprekidana s tri hipervarijabilna područja, još nazvana «područjima koja određuju komplementarnost» ili «CDR». Rasponi okvirnih područja i CDRa već su definirani (*vidi*, Kabat, *gore*). Slijedovi okvirnih područja različitih lakih ili teških lanaca su relativno sačuvani unutar vrste. Okvirno područje protutijela, odnosno udružena okvirna područja pripadajućih lakih i teških lanaca, služi da smjesti i poreda CDR u trodimenzionalni prostor.

CDR su prije svega odgovorna za vezanje na epitop antigena. CDR pojedinog lanca se obično označuju kao CDR1, CDR2, CDR3, numerirani redom počevši od N-kraja i također se obično označuju prema lancu u kojem je određen CDR smješten. Stoga je V_H CDR3 smješten u varijabilnoj domeni teškog lanca protutijela u kojem je nađen, dok je V_L CDR1, CDR1 iz varijabilne domene lakog lanca protutijela u kojem je nađen.

Upute na « V_H » ili « VH » odnose se na varijabilna područja teškog lanca imunoglobulina, uključujući teški lanac od Fv, scFv, dsFv ili Fab. Upute na « V_L » ili « VL » odnose se na varijabilna područja lakog lanca imunoglobulina, uključujući lake lance od Fv, scFv, dsFv ili Fab.

Izraz «jednolančani Fv» ili «scFv» odnosi se na protutijelo u kojem su varijabilne domene teškog lanca i lakog lanca uobičajenog dvolančanog protutijela, udružene tako da tvore jedan lanac. Obično se, između dva lanca, umeće peptid povezač koji omogućuje pravilno presavijanje i stvaranje aktivnog veznog mjesta.

Izraz «peptid povezač» uključuje uputu na peptid s ulomkom koji vezuje antigen (npr., Fv ulomak) koji služi da neizravno poveže varijabilnu domenu teškog lanca s varijabilnom domenom lakog lanca.

Izraz «roditeljsko protutijelo» obično upućuje na protutijelo od interesa koje će biti mutirano ili izmijenjeno da bi se dobila protutijela ili njihovi ulomci koji se vežu na isti epitop kao i roditeljsko protutijelo. U ovdje korištenom značenju, izraz «roditeljsko protutijelo» odnosi se na scFv označen kao «MR1» (GenBank Pristupni Broj U76382) ukoliko nije drugačije navedeno ili vidljivo iz konteksta.

Izraz «hot spot» označava dio nukleotidnog slijeda CDRa ili okvirnog područja varijabilne domene koje je mjesto osobito visoke prirodne mutacije. Iako su CDR i sami smatrani hipervarijabilnim područjima, pokazano je da mutacije nisu ravnomjerno raspoređene kroz CDR. Posebna mjesta ili «hot spot», otkrivena su kao mjesta na kojima su koncentrirane mutacije. «Hot spots» obilježavaju brojne strukturne karakteristike i slijedovi. Ovi «hot spot» slogovi mogu se koristiti za otkrivanje tih mjesta. Dva dogovorna slijeda slogova, koji su osobito dobro opisani, su tetranukleotidni slijedovi RGYW i serinski slijed AGY, gdje je R jednako A ili G, Y jednako C ili T i W jednako A ili T.

«Ciljajući dio» ili «ciljajuća molekula» je dio imunokonjugata koji ima sposobnost usmjeriti imunokonjugat prema stanicama od interesa. Obično je ciljajući dio protutijelo, scFv, dsFv, Fab ili $F(ab')_2$ koje prepoznaje specifični antigen na stanicama od interesa.

«Toksični dio» je citotoksin ili dio citotoksina koji, kad je uklopljen u imunotoksin, čini imunotoksin citotoksičnim za stanice od interesa.

«Imunotoksin» je molekula koja se sastoji od ciljajuće molekule, kao što je scFv i toksičnog dijela, kao što je *Pseudomonas* egzotoksin («PE») ili njegovog citotoksičnog ulomka.

Ovdje spomenuti imunotoksini su obično izraženi kao inkluzijska tjelešca u *E. Coli*, nakon čega se inkluzijska tjelešca pročišćavaju, otapaju u 6 M gvanidin HCl i protein se ponovno presavija. U ovdje korištenom značenju, izraz «prinos» odnosi se na količinu pravilno savijenog monomernog imunotoksina sakupljenog tijekom ovog postupka. Izražava se kao postotak određen kao: miligrami proteina nakon MonoQ kromatografije s ionskom izmjenom/miligramima ponovno savijenog proteina iz inkluzijskih tjelešaca.

«Terapijski dio» je dio imunokonjugata koji bi trebao djelovati kao terapijsko sredstvo.

Izraz «terapijsko sredstvo» uključuje svaki sastojak trenutno poznat ili kasnije razvijen da djeluje kao protuneoplastično, protuupalno, citokin, protuinfektivno, enzimski aktivator ili inhibitor, alosterični modifikator, antibiotik ili drugo sredstvo koje se daje za poticanje željenog terapijskog učinka u bolesnika. Terapijsko sredstvo može također biti toksin ili radioizotop, kada je terapijsko sredstvo namijenjeno, na primjer, za ubijanje karcinomskih stanica.

«Vidljivi biljeg» označava, s obzirom na imunokonjugat, dio imunokonjugata koji ima svojstva koja mu omogućuju da se otkrije njegova prisutnost. Na primjer, imunokonjugat se može obilježiti s radioaktivnim izotopom koji dozvoljava da se stanice, u kojima je imunokonjugat prisutan, otkriju imunohistokemijskim testovima.

- 5 Izrazi «djelatni dio» i «djelatna molekula» označavaju dio imunokonjugata koji bi trebao imati učinak na stanice na koje ga je usmjerio ciljajući dio ili bi trebao otkriti prisutnost imunokonjugata. Stoga, djelatni dio može biti, primjerice, terapijski dio, toksin, radiobiljeg ili fluorescentni biljeg.

- 10 Izraz «imunokonjugat» označava kimeričnu molekulu koja sadržava ciljajuću molekulu (kao što je scFv) pričvršćenu izravno (na primjer, putem kovalentne veze) ili neizravno (na primjer, putem peptida povezača) na djelatnu molekulu. U podskupini imunokonjugata, djelatna molekula je toksin, pa se onda kimerična molekula približe naziva »imunotoksin».

- 15 Izrazi «djelatna doza» ili »doza djelotvorna za» ili «terapijski djelotvorna doza» uključuju uputu na doziranje terapijskog sredstva koje je dovoljno da se postigne željeni rezultat, kao što je inhibicija stanične sinteze proteina za barem 50% ili ubijanje stanice.

- 20 Izraz «toksin» uključuje uputu na abrin, ricin, Pseudomonas egzotoksin (PE), difterija toksin (DT), botulinski toksin ili njihove izmijenjeni oblici. Na primjer PE i DT su visoko toksični sastojci koji obično ubijaju putem jetrene toksičnosti. Ipak, PE i DT se mogu izmijeniti u oblik prikladan za korištenje kao imunotoksin uklanjanjem prvobitnog ciljajućeg dijela toksina (npr., domena Ia od PE ili B lanac od DT) i nadomještanjem s drugim ciljajućim dijelom, kao što je protutijelo.

- 25 Izraz «IC₅₀» odnosi se na koncentraciju toksina ili imunotoksina (izražena kao ng/mL) koja je potrebna za inhibiciju proteinske sinteze za 50%.

Izraz «dodirni» uključuje uputu na postavljanje u izravnu fizičku vezu.

- 30 «Plazmid za ekspresiju» sadrži slijed nukleotida koji kodira molekulu od interesa, koji je učinkovito vezan na promotor.

- U ovdje korištenom značenju «polipeptid», «peptid» i «protein» se međusobno izmjenjuju i uključuju uputu na polimer od aminokiselinskih ostataka. Izrazi se odnose na aminokiselinske polimere, u kojima je jedan ili više aminokiselinskih ostataka umjetni kemijski analog odgovarajuće prirodno prisutne amino kiseline, kao i na prirodno prisutne aminokiselinske polimere. Izrazi se odnose i na polimere koji sadrže takove konzervativne aminokiseline izmjene da protein ostaje djelatna.

- 40 Izraz «ostatak» ili «aminokiselinski ostatak» ili «aminokiselina» uključuje uputu na aminokiselinu koja je ugrađena u protein, polipeptid ili peptid (zajednički «peptid»). Aminokiselina može biti prirodno prisutna aminokiselina i, ako nije drugačije određeno, može obuhvatiti poznate analoge prirodnih aminokiselina koji mogu djelovati na sličan način kao prirodno prisutne aminokiseline.

Aminokiseline i analozi na koje se ovdje upućuje opisani su kraticama prema Tablici 1:

Tablica 1: Nomenklatura aminokiselina

Naziv	3 slova	1 slovo
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspatska kiselina	Asp	D
50 Cistein	Cys	C
Glutaminska kiselina	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glicin	Gly	G
Histidin	His	H
55 Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
60 Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T

Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V

- 5 «Konzervativna izmjena», kada se opisuje, protein odnosi se na promjenu aminokiselinskog sastava proteina koja ne mijenja značajno njegovu aktivnost.

Stoga se "konzervativno izmijenjeni oblici" određenog aminokiselinskog slijeda odnose na aminokiselinske izmjene onih aminokiselina koje nisu ključne za aktivnost proteina ili zamjenu aminokiselina s drugim aminokiselinama koje imaju slična svojstva (npr., kiselost, lužnatost, pozitivan ili negativan naboj, ionizirane ili ne-ionizirane, itd.) tako da čak niti izmjena ključnih aminokiselina ne mijenja značajno aktivnost. Tablice konzervativnih izmjena, koje prikazuju funkcijski slične aminokiseline, dobro su poznate u struci. Svaka od šest skupina prikazanih u Tablici 2 koja slijedi, sadrži aminokiseline koje su uobičajene konzervativne zamjene jedna za drugu:

15 Tablica 2

- 1) Alanin (A), Serin (S), Treonin (T);
 2) Aspartatska kiselina (D), Glutaminska kiselina (E);
 3) Asparagin (N), Glutamin (Q);
 4) Arginin (R), Lizin (K);
 20 5) Izoleucin (I), Leucin (L), Metionin (M), Valin (V); i
 6) Fenilalanin (F), Tirozin (Y), Triptofan (W).

Vidi također, Creighton, Proteins, W.H.Freeman and Company, New York (1984). Ipak, mora se naglasiti da, dok se fenilalanin i triptofan općenito smatraju za međusobne konzervativne zamjene, izmjena triptofana s fenilalaninom u "hot spot" V_L CDR3 od scFv MR1 stvorila je imunotoksin koji je bio aktivniji nego roditeljski scFv. Prema tome, iako se ove dvije aminokiseline smatraju konzervativnim zamjenama za dijelove protutijela izvan CDR, u kontekstu ovog izuma, ove dvije aminokiseline nisu konzervativne zamjene jedna drugoj, unutar "hot spot". Na temelju ovih rezultata, niti jedna izmjena aminokiselina unutar "hot spot" ne može se smatrati konzervativnom, osim ako nije testirana s, na primjer, ovdje prikazanim testovima, da se odredi utječu li na afinitet dobivene molekule, prinos imunotoksina dobivenog korištenjem te molekule kao ciljajućeg dijela ili oboje.

Izraz "značajno istovjetan" u kontekstu peptida ukazuje da peptid sadrži slijed s najmanje 90%, a preporučljivo barem 95% istovjetnosti sa osnovnim slijedom u okviru usporedbe od 10-20 aminokiselina. Postotak istovjetnosti slijeda određuje se usporedbom dva prikladno smještena slijeda kroz okvir usporedbe, gdje dio polinukleotidnog slijeda u okviru usporedbe može sadržavati dodatke ili delecije (npr., prekide) u usporedbi s osnovnim slijedom (koji ne sadrži dodatke i delecije) radi prikladnog smještanja oba slijeda. Postotak se izračunava određivanjem broja mjesta na kojima se, u oba slijeda, javljaju istovjetne baze nukleinskih kiselina ili aminokiselinski ostaci, da se dobije broj podudarnih mjesta, te dijeljenjem broja podudarnih mjesta s ukupnim brojem mjesta u okviru usporedbe i množenjem rezultata sa 100 da se dobije postotak istovjetnosti slijeda.

Izraz "disulfidna veza" ili "cistein-cistein disulfidna veza" odnosi se na kovalentnu vezu između dva cisteina u koji sulfidni atomi cisteina oksidiraju i stvaraju disulfidnu vezu. prosječna energija disulfidne veze je oko 60 kcal/mol u usporedbi s 1-2 kcal/mol za vodikovu vezu. U kontekstu ovog izuma, cisteini koji stvaraju disulfidnu vezu nalaze unutar okvirnih područja jednolančanih protutijela i služe za stabilizaciju konformacije protutijela.

Izrazi "konjugiranje", "udruživanje", "spajanje" ili "povezivanje" odnose se na tvorbu jedne cjelovite polipeptidne molekule iz dva polipeptida. U kontekstu ovog izuma, izrazi uključuju uputu na udruživanje dijela protutijela s djelatnom molekulom (EM). Povezivanje može biti ili kemijskim ili rekombinantnim putem. Kemijski put se odnosi na reakciju između dijela protutijela i djelatne molekule koja dovodi do stvaranja kovalentne veze između molekula da bi se nastala jedna molekula.

U ovdje korištenom značenju, "rekombinantno" uključuje uputu na protein dobiven korištenjem stanica koje u svom prvobitnom stanju nemaju vlastitu kopiju DNA koja je sposobna dati protein. Stanice proizvode rekombinantni protein jer su genetski izmijenjene unošenjem prikladnog izdvojenog slijeda nukleinske kiseline. Izraz također uključuje uputu na stanicu ili nukleinsku kiselinu ili vektor, koji su izmijenjeni unošenjem heterologne nukleinske kiseline ili izmjenom prvobitne nukleinske kiseline u oblik koji nije osnovni toj stanici ili da je stanica dobivena iz tako izmijenjene stanice. Tako, na primjer, rekombinantne stanice izražavaju gene koji se ne nalaze u prvobitnim (ne-rekombinantnim) oblicima stanice, izražavaju mutirane gene koji se ne nalaze u prvobitnom obliku ili izražavaju prvobitne gene koji su inače poremećeno izraženi, slabije izraženi ili uopće nisu izraženi.

U ovdje korištenom značenju, "nukleinska kiselina" ili "slijed nukleinske kiseline" uključuje uputu na deoksiribonukleotid ili ribonukleotidni polimer u jednostrukoj ili dvostrukoj uzvojnici, i, ako nije drugačije naznačeno,

obuhvaća poznate analoge prirodnih nukleotida koji se hibridiziraju na nukleinske kiseline na način sličan nukleotidima koji se prirodno pojavljuju. Ako nije drugačije naznačeno, određeni slijed nukleinske kiseline uključuje njegov podudarni slijed kao i konzervativne varijante, npr. nukleinske kiseline prisutne na pomičnim mjestima kodona i varijante koje, kada se prevedu u protein, rezultiraju konzervativnom izmjenom aminokiselina.

U ovdje korištenom značenju, "kodiranje" u odnosu na određenu aminokiselinu, uključuje uputu na nukleinske kiseline koje sadrže podatke za prevođenje u određeni protein. Podatak je određen putem kodona. Obično je aminokiselinski slijed kodiran s nukleinskim kiselinama korištenjem "univerzalnog" genetskog koda. Ipak, oblici univerzalnog koda, kao što nalazimo kod nekih biljaka, životinja i gljivičnih mitohondrija, bakterije *Mycoplasma capricolum* (*Proc. Natl. Acad. Sci. SAD* 82:2306-2309 (1985)) ili trepetiljkavca *Macromucleus*, mogu se koristiti kada se nukleinska kiselina izražava korištenjem mehanizama za prevođenje ovih organizama.

Izraz "uklapanje u okvir" odnosi se na udruživanje dva ili više slijedova nukleinskih kiselina koji kodiraju polipeptide tako da se udruženi slijedovi nukleinskih kiselina prevedu u jednolančani protein koji sadrži osnovne polipeptidne lance.

U ovdje korištenom značenju, "izražen" uključuje uputu na prevođenje nukleinske kiseline u protein. Proteini mogu biti izraženi i zadržani unutar stanice, postati dijelom opne stanične površine ili biti izlučeni u izvanstanični matriks ili medij.

Pod "stanicom domaćinom", misli se na stanicu koja može podržavati umnožavanje ili izražaj vektora za izražaj. Stanice domaćini mogu biti prokariotske stanice poput *E. coli* ili eukariotske stanice poput stanica kvasca, insekta, amfibija ili sisavaca.

Izraz "probirna banka faga" odnosi se na populaciju bakteriofaga, od kojih svaki sadrži stranu cDNK rekombinantno uklopljenu u okvir na protein površine. Nakon umnažanja u bakterijskom domaćinu, obično *E. coli*, fag koji sadrži stranu cDNK od interesa izdvaja se izražavanjem stranog proteina na površini faga.

Izrazi "istovjetan" ili postotak "istovjetnosti", u kontekstu dvaju ili više nukleinskih kiselina ili polipeptidna slijeda, odnosi se na dva ili više slijeda ili podslijeda koji su istovjetni ili imaju određeni postotak aminokiselinskih ostataka ili nukleotida koji su istovjetni, kada su uspoređeni i poredani za najvišu podudarnost, mjereno korištenjem jednog od slijedećih algoritama usporedbe slijedova ili vizualnim pregledom.

Izraz "značajno istovjetan", u kontekstu dvaju nukleinskih kiselina ili polipeptida, odnosi se na dva ili više slijeda ili podslijeda koji imaju barem 60%, preporučljivo 80%, najpreporučljivije 90-95 % istovjetnosti nukleotida ili aminokiselinskih ostataka, kada su uspoređeni i poredani za najvišu podudarnost, mjereno korištenjem jednog od slijedećih algoritama usporedbe slijedova ili vizualnim pregledom. Preporučljivo, značajna istovjetnost postoji kroz područje slijeda koje je dužine od barem 50 ostataka, preporučljivije kroz područje od barem 100 ostataka, a najpreporučljivije je da su slijedovi značajno istovjetni kroz barem 150 ostataka. U najpreporučljivijem obliku, slijedovi su značajno istovjetni cijelom dužinom kodirajućeg područja.

Za usporedbu slijedova, obično jedan slijed služi kao osnovni slijed, sa kojim se testirani slijedovi uspoređuju. Kada se koristi algoritam usporedbe slijedova, testirani i osnovni slijedovi unose se u računalo, izrađuju se koordinate podslijeda, ukoliko je potrebno i određuju se programske vrijednosti algoritma slijeda. Potom algoritam za usporedbu slijedova izračunava postotak istovjetnosti slijeda za testirane slijedove, u odnosu na osnovni slijed, na temelju određenih programskih vrijednosti. U struci je poznato više programa za takova izračunavanja.

Daljnji pokazatelj značajne istovjetnosti dvaju slijedova nukleinskih kiselina ili polipeptida je taj da je polipeptid kodiran prvom nukleinskom kiselinom, imunološki unakrsno reaktivan s polipeptidom kodiranim s drugom nukleinskom kiselinom, kako je opisano u nastavku. Stoga, polipeptid je obično značajno istovjetan s drugim polipeptidom, na primjer, kada se dva polipeptida razlikuju samo u konzervativnim izmjenama. Drugi pokazatelj značajne istovjetnosti dva nukleokiselinska slijeda, jest hibridizacija dvaju molekula pod strogim uvjetima, kako je opisano u nastavku.

Izraz "*in vivo*" uključuje uputu na unutrašnjost tijela organizma od kojeg je uzeta stanica. "*Ex vivo*" i "*in vitro*" znače izvan tijela organizma od kojeg je uzeta stanica.

Izraz "maligna stanica" ili "malignom" odnosi se na tumore ili tumorske stanice koje su invazivne i/ili imaju sposobnost metastaziranja, npr. stanica karcinoma.

U ovdje korištenom značenju, "stanica sisavca" uključuje uputu na stanice dobivene od sisavaca uključujući ljude, štakore, miševe, zamorce, čimpanze ili makaka-majmuna. Stanice se mogu uzgajati *in vivo* ili *in vitro*.

Izraz "selektivno reaktivan" odnosi se, s obzirom na antigen, na prevladavajuće vezanje protutijela, u cijelosti ili dijelom, na stanice ili tkiva koja nose taj antigen a ne na stanice ili tkiva koje ga nemaju. Naravno, uvažava se i mogućnost da se mogu desiti i određena nespecifična međudjelovanja između molekule i neciljanih stanica ili tkiva. Ipak, za selektivnu reaktivnost može se razlučiti da je posredovana specifičnim prepoznavanjem antigena. Iako selektivno reaktivna protutijela vezuju antigen, to mogu činiti s niskim afinitetom. S druge strane, specifično vezanje donosi puno jaču vezu između protutijela i stanica koje nose antigen nego između vezanog protutijela i stanica koje nemaju antigen. Specifično vezanje obično donosi, veće od dvostrukog, preporučljivo veće od peterostrukog, preporučljivije veće od deseterostrukog i najpreporučljivije veće od stotrukog, povećanje količine vezanog protutijela (u vremenskoj jedinici) na stanicu ili tkivo koje nosi EGFRvIII u usporedbi sa stanicom ili tkivom koje nema EGFRvIII. Specifično vezanje na protein pod takovim uvjetima zahtjeva protutijelo koje je izabrano radi svoje specifičnosti za određeni protein. Različite vrste imunotestova su prikladni za odabir protutijela specifično reaktivnih s određenim proteinom. Na primjer, ELISA imunotest na krutoj podlozi rutinski se koristi za odabir monoklonalnih protutijela specifično imunoreaktivnih s proteinom. Vidi Harlow & Lane: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Publications, New York (1988), za opis vrste imunotestova i uvjeta koji se mogu koristiti u određivanju specifične imunoreaktivnosti.

Izraz "uvjeti imunološke reakcije" uključuje uputu na uvjete koji omogućuju protutijelu izrađenom za određeni epitop da se veže na taj epitop u vidljivo većem stupnju nego, i/ili značajne iznimke, vezivanjem za gotovo sve druge epitope. Uvjeti imunološke reakcije ovise o vrsti reakcije vezanja protutijela i obično su oni korišteni u protokolima imunotestova ili oni uvjeti koji se susreću *in vivo*. Vidi Harlow & Lane, *gore*, za opis vrste imunotestova i uvjeta. Preporučljivo, uvjeti imunološke reakcije korišteni u metodama ovog izuma jesu "fiziološki uvjeti" koji uključuju uputu o uvjetima (npr., temperatura, osmolarnost, pH) koji su obično u živom sisavcu ili stanici sisavca. I dok se zna da su neki organi izloženi ekstremnim uvjetima, okoliš unutar organizma i unutar stanice obično je oko pH 7 (npr., od pH 6.0 do pH 8.0, češće pH 6.5 do 7.5), sadrži vodu kao prevladavajuće otapalo i živi na temperaturi iznad 0°C i ispod 50°C. Osmolarnost je unutar raspona koji podržava vijabilnost i rast stanica.

III. Stvaranje protutijela većeg afiniteta za EGFRvIII nego MR1

Protutijela se vežu na antigene putem ostataka u njihovim CDR-ovima. Zato se mutageneza CDR-ova općenito upotrebljava kako bi se poboljšao afinitet Fab i Fv ulomaka protutijela. Postoji velik broj različitih pristupa CDR mutagenizi. Većina njih, kao što su mutageneza kodona (Yelton *i sur.*, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)), CDR *walking* (Barbas *i sur.*, *Trends Biotech.* 14:230-234 (1996); Yang *i sur.*, *J. Mol. Biol.* 254:392-403(1995)), replikacija sklona greškama (Low *i sur.*, *J. Mol. Biol.* 260:359-368 (1996)) i umjetno stvaranje CDR (de Kruijff *i sur.*, *J. Mol. Biol.* 248:97-105 (1995)), zahtijevaju stvaranje velikih knjižnica koje je tehnički teško napraviti, te s njima baratati. Razvoj afiniteta protutijela usmjeren je k izdvajanju visoko afinitetnih vezača iz knjižnica razmjerno manje veličine (Pini *i sur.*, *J. Biol. Chem.* 273:21769-21776 (1998); Wu *i sur.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. SAD* 95:6037-6042 (1998); Chowdhury *i sur.*, *Nature Biotechnol.* 17:568-572 (1999)). Svi ovi pristupi uključuju stvaranje ekspresijskih knjižnica protutijela s mutacijama u CDR-ovima i odabir boljih vezača.

Tehnologija prezentacije faga (*Phage display technology*) postala je koristan alat za probiranje velikih peptidnih ili proteinskih knjižnica (Winter *i sur.*, *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994); McCafferty, J., *Nature* 348:552-554 (1990); Barbas *i sur.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. SAD* 88:7978-7982 (1991)). Jednostruki Fv lanci mogu se eksprimirati na fagnim česticama tako da su stopljeni s M13 proteinom gena 3 u fagemidnom vektoru. Stopljeni proteini se eksprimiraju u *E. coli* i, u prisutnosti faga pomagača, očituju se na vrhovima M13 faga koji se mogu sakupiti iz medija kulture. Fagi koji prezentiraju scFv stopljene proteine koji se vežu na specifični antigen odabiru se pretraživanjem (*panning*) fagnih knjižnica na stanicama koje eksprimiraju antigen ili na površini na koju je antigen vezan, kao što su magnetske kuglice. Fagi koji se ne vežu ispiru se, a vezani fagi se eluiraju i umnožavaju reinfekcijom *E. coli*. Nekoliko krugova pretraživanja rezultira u obogaćivanju sa specifičnim vezačima. Postavljanjem striktnijih uvjeta pretraživanja, bolji vezači mogu se učinkovitije odvojiti od loših vezača.

Tehnologija prezentacije faga može se iskoristiti u razvoju protutijela koja se vežu na EGFRvIII većim afinitetom nego MR1. Kao što je u struci dobro poznato, neoštećeno protutijelo obuhvaća dva teška lanca i dva laka lanca; svaki lanac ima tri CDR-a, označena s 1, 2, odnosno 3. Za svaki CDR zna se da doprinosi u vezanju antigena, ali oni to ne čine jednako. *Vidjeti općenito*, Kubly, J., *Immunology*, W. H. Freeman & Co., New York (3. izd. 1998). Iako aminokiseline bilo kojeg CDR-a mogu biti mutirane kako bi se pronašle mutacije koje u prosjeku povećavaju afinitet, CDR3 svakog lanca više pridonosi vezanju antigena nego što to čine CDR1 ili CDR2 tog lanca. *Vidjeti općenito*, Kubly, iznad, na stranici 117. Stoga, mutacije CDR3 V_H i V_L lanaca mogu biti od osobite prednosti. Osim toga, CDR3 V_H u MR1 je razmjerno dug za miši CDR3, što dijelom može doprinijeti razmjernoj stabilnosti MR1 scFv u odnosu na druge scFv-ove.

Nakon isključivanja posljednjih dviju aminokiselina iz V_H CDR3 koje najvjerojatnije ne doprinose vezanju antigena iz razloga raspravljenih u Uvodu, preostalih devet ostataka u V_H CDR3 zamjenjuju se sa svakom od 19 drugih prirodnih

aminokiselina. Samo mutacije serina i treonina na aminokiselinskim mjestima 98 odnosno 99 rezultiraju poboljšanom citotoksičnošću ishodnog imunotoksina (aminokiselinski slijed V_H i V_L CDR3 prikazani su dalje ispod jednoslovnim kodom u Tablicama 5, 6 i 7. Dalje prikazani slijed V_H ne prikazuje dva ostatka, D101 i Y102, za koje se smatra da najvjerojatnije ne doprinose vezanju antigena). Preporučljive supstitucije u V_H CDR3 su P98-Y99, koje daju IC_{50} u PE38 imunotoksinu 3.5 ng/mL, P98-N99, P98-W99 i P98-I99, sve one imaju IC_{50} 4.5 ng, P98-F99 s IC_{50} 6 ng i P98-V99 koja ima IC_{50} 6.5 ng. Četiri klona, P98-S99, W98-V99, S98-W99 i P98-T99 imaju IC_{50} jednak prvotnom klonu. (Po dogovoru, izraz kao što je "P98-Y99" označava da se aminokiselina prolin pojavljuje na 98. mjestu određenog polipeptida, u ovom slučaju MR1 V_H CDR3, te da se tirozin pojavljuje na 99. mjestu, ali da je ostatak molekule od normalnog polipeptida, u ovom slučaju, prvotnog MR1 protutijela).

Što se tiče mutacije V_L CDR3, samo jedna mutacija, F92W, daje aktivniji imunotoksin od prvotnog. Njegov IC_{50} je 1.3 ng/mL. U ovom slučaju, "prvotna" molekula je MR1 sa supstitucijama P98-Y99 u V_H CDR3, koje bez pridružene supstitucije u V_L CDR3 imaju IC_{50} 3.5 ng/mL. Ovaj mutirani MR1 koji združuje mutacije u CDR3 oba V_H i V_L lanca, (V_H S98P-T99Y- V_L F92W), najcitotoksičniji je ispitivani oblik kada se primijenjuje kao usmjeravajući dio imunotoksina, te se sada označuje kao "MR1-1".

Ovi rezultati pokazuju da mutacije u različitim CDR-ovima mogu imati dodatni učinak i mogu povećati citotoksičnost ishodnog imunotoksina. S obzirom na ove rezultate, mutacije aminokiselina u žarućim mjestima CDR-ova 1 i 2 V_H i V_L lanaca MR1 također će rezultirati protutijelima s daljnjim poboljšanjem afiniteta za EGFRvIII, te imunotoksinima s daljnjim poboljšanjem citotoksičnosti u usporedbi s MR1.

Najbolje vrijeme za ispitivanje klonova je u početku postupka. Pretraživanje, nakon što su se postigle najviše točke obogaćivanja, može biti pogubno zbog rizika gubitka klonova. Moguće je preferencijalno obogaćivanje s Fv-ovima niskog afiniteta, ali visoke ekspresije dok su dobri vezači izgubljeni. Dokaz koji ovo podupire opažen je za vrijeme pretraživanja CDR3 knjižnica lakih lanaca: mutante F92S s niskim afinitetom (K_d 22 nM) pronađene su u 7 od 10 klonova ispitivanih nakon trećeg kruga, dok je najbolji vezač, F92W, bio prisutan samo jedanput. Nasuprot tomu, u drugom krugu F92S pronađen je samo u 2 od 17 klonova, dok je F92W bio prisutan u 6 od 17 klonova.

IV. Protu-EGFRvIII protutijela

Ovaj izum opisuje protutijela koja se vežu na EGFRvIII većim afinitetom nego od ranije poznata protutijela i koja selektivno reagiraju s EGFRvIII. Osobito, izum opisuje protutijela koja imaju niži K_d s obzirom na EGFRvIII nego MR1, najbolji prijašnji poznati scFv usmjeren na ovaj antigen. Osim toga, ova protutijela čine imunotoksine koji imaju veću citotoksičnost za EGFRvIII-ekspimirajuće stanice nego što to imaju isti imunotoksini napravljeni s MR1. Izum nadalje opisuje postupak za stvaranje protutijela s većim afinitetom i većom citotoksičnošću na EGFRvIII nego što ima MR1. U nastavku prikazani imunokonjugati usmjereni su na EGFRvIII uporabom protutijela ovog izuma. Ova protutijela su selektivno reaktivna pod imunološkim uvjetima na one determinante EGFRvIII očitovane na površini stanica sisavaca i dostupne protutijelu iz izvanstaničnog miljea.

U preporučljivim oblicima ovog izuma, protu-EGFRvIII protutijelo je rekombinantno protutijelo kao što je scFv ili disulfidno stabilizirano Fv protutijelo. Fv protutijela su obično veličine oko 25 kDa i sadrže potpuno antigen-vežuće mjesto s 3 CDR-a na oba teška i laka lanca. Ako se V_H i V_L lanac ekspimiraju nezavisno, lanci Fv protutijela se obično drže zajedno nekovalentnim međudjelovanjima. Međutim, ovi lanci su skloni disociirati nakon razrjeđivanja, tako da su razvijeni postupci kako bi se lanci poprečno povezali pomoću glutaraldehida, intermolekulskih disulfida ili peptidnih povezivača. Disulfidno stabilizirani Fv-ovi prikazani su, na primjer, u SAD patentu br. 5 747 654.

U osobito preporučljivom obliku, protutijelo je jednostruki lanac Fv (scFv). V_H i V_L područja scFv protutijela obuhvaćaju jedan lanac koji je smotan tako da stvara antigen vežuće mjesto slično onom pronađenom u dva lanca protutijela. Jednom kada je smotan, nekovalentna međudjelovanja stabiliziraju jednostruki lanac protutijela. U preporučljivijem obliku, scFv se proizvodi rekombinantno. Stručnjak će uočiti da se mogu napraviti konzervativne inačice protutijela. Takve konzervativne inačice primijenjene u scFv ulomcima zadržavaju kritične aminokiselinske ostatke neophodne za pravilno smatanje i stabiliziranje između V_H i V_L područja.

U nekim oblicima ovog izuma, scFv protutijelo je izravno vezano za efektorsku molekulu (EM) preko lakog lanca. Međutim, scFv protutijela mogu biti vezana na EM putem svojeg amino ili karboksilnog kraja.

Dok se V_H i V_L područja nekih oblika protutijela mogu izravno povezati zajedno, stručnjak će uvidjeti da se područja mogu razdvojiti peptidnim povezivačem sastavljenim od jedne ili više aminokiselina. Peptidni povezivači i njihova uporaba u struci su dobro poznati. Vidjeti, *na pr.*, Huston i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci.* SAD 8:5879 (1988); Bird i sur., *Science* 242:4236 (1988); Glockshuber i sur., *Biochemistry* 29:1362 (1990); SAD patent br. 4946778, SAD patent br. 5132405 i Stemmer i sur., *Biotechniques* 14:256-265 (1993), svi radovi su ovdje obuhvaćeni referencom. Općenito peptidni povezivač neće imati neku drugu specifičnu biološku aktivnost osim povezivanja područja ili očuvanja neke

najmanje udaljenosti ili drugog prostornog odnosa između V_H i V_L . Međutim, aminokiseline od kojih je peptidni povezičav sastavljen mogu se odabrati tako da utječu na neka svojstva molekule kao što je smatanje, ukupni naboj ili hidrofobnost. Jednostruki lanci Fv (scFv) protutijela neobavezno ukljuuju peptidni povezičav od ne više od 50 aminokiselina, općenito ne više od 40 aminokiselina, preporučljivo ne više od 30 aminokiselina, te preporučljivije ne više od 20 aminokiselina u duljini. U nekim oblicima, peptidni povezičav je konkatamer slijeda Gly- Gly- Gly- Gly-Ser, preporučljivo 2, 3, 4, 5 ili 6 takvih slijedova. Međutim, može se uvidjeti da se mogu napraviti neke supstitucije aminokiselina unutar povezičava. Na primjer, valin se može zamijeniti za glicin.

Proizvodnja scFv-ova

Kako je gore opisano, u preporučljivim oblicima, protutijelo (na primjer, usmjeravajući dio imunotoksina) je scFv. Opisani su postupci za proizvodnju scFv protutijela. Vidjeti, Huse *i sur.*, gore; Ward *i sur.*, *Nature* 341:544-546 (1989); i Vaughan *i sur.*, gore. Ukratko, izdvaja se mRNA iz B-stanica, te se pripravlja cDNA.

cDNA se umnaža dobro poznatim tehnikama, kao što je PCR, s početnicama specifičnim za varijabilna područja teških i lakih lanaca imunoglobulina. PCR proizvodi se pročišćavaju, na primjer, agaroznom gel elektroforezom, te se slijedovi nukleinskih kiselina spajaju. Ako se traži peptidni povezičav, slijedovi nukleinskih kiselina koji kodiraju peptid umeću se između slijedova nukleinskih kiselina teškog i lakog lanca. Slijedovi se mogu spojiti tehnikama poznatim u struci, kao što je spajanje slijepih krajeva, umetanje restriksijskih mjesta na krajeve PCR proizvoda ili cijepanje preklapajućih produžetaka (Chowdhury *i sur.*, *Mol. Immunol.* 34:9 (1997)). Nakon umnažanja, nukleinska kiselina koja kodira svFv umeće se u vektor, opet u struci dobro poznatim tehnikama. Preporučljivo, vektor je sposoban replicirati se u prokariotima i eksprimirati se i u eukariotima i u prokariotima. U preporučljivom obliku, scFv geni se spajaju s PE38 genom kratkim povezičavem i kloniraju se u T7-temeljen ekspresijski vektor. U posebno preporučljivim oblicima, scFv se eksprimira pod kontrolom T7 promotora u *E. coli* BL21 (λ DE3).

Kao što je zabilježeno u slijedećim odlomcima, scFv koji se specifično veže na EGFRvIII pronađeni su pretraživanjem. Pretraživanje se može izvesti bilo kojim od nekoliko postupaka. U preporučljivom postupku s obzirom na ovaj izum, pretraživanje se može uobičajeno provesti uporabom stanica koje eksprimiraju EGFRvIII na svojoj površini. Protokol za izvođenje pretraživanja uporabom stanica prikazan je dalje ispod u Primjerima. Pretraživanje se također može izvesti na čvrstoj površini presvlačenjem čvrste površine s EGFRvIII i inkubiranjem faga na površini kroz prikladno vrijeme u prikladnim uvjetima. Uobičajeno, površina može biti magnetska kuglica. Nevezani fagi se ispiru sa čvrste površine, a vezani fagi eluiraju.

Pronalaženje protutijela s najvećim afinitetom određeno je učinkovitošću odabranog postupka i ovisi o broju klonova koji se mogu probrati, te striktnosti kojom se to provodi. Obično, veća striktnost odgovara selektivnijem pretraživanju. Ako su uvjeti prestrogi, međutim, fag se neće vezati. Nakon jednog kruga pretraživanja, fag koji se veže na pločice presvučene EGFRvIII ili na stanice koje eksprimiraju EGFRvIII na svojoj površini umnažaju se u *E. coli* i podvrgavaju drugom krugu pretraživanja. Na taj način, višestruko obogaćivanje postiže se u 3 kruga pretraživanja. Tako, čak i kad je obogaćivanje u svakom krugu slabo, višestruki krugovi pretraživanja vode izdvajanju rijetkih faga i genetskog materijala kojeg sadrži, a koji kodira scFv najvećeg afiniteta ili onog koji je bolje eksprimiran na fagu.

S obzirom na odabrani postupak pretraživanja, fizička veza između genotipa i fenotipa prezentirana fagom čini mogućim ispitivanje svakog člana cDNA knjižnice za vezanje na antigen, čak s velikim knjižnicama klonova.

B. Vežući afinitet protutijela

Protutijela ovog izuma se vežu na epitop EGFRvIII s Kd najmanje 1nM nižom nego od prvotnog MR1protutijela. Vežući afinitet za ciljni antigen se uobičajeno mjeri ili određuje standardnim protutijelo-antigen testovima, kao što su kompetitivni testovi, testovi zasićenja ili imunotestovi kao što su ELISA ili RIA.

Takvi testovi se mogu uporabiti u određivanju disocijacijske konstante protutijela. Fraza "disocijacijska konstanta" odnosi se na mjeru afiniteta protutijela za antigen. Specifičnost vezanja između protutijela i antigena postoji ako je disocijacijska konstanta ($K_d=1/K$, gdje je K konstanta afiniteta) protutijela u mikromolarnom rasponu, preporučljivo < 100 nM, te najpreporučljivije < 0.1 nM. Molekule protutijela imat će obično Kd u nižem rasponu. $K_d = [At-Ag] / [At][Ag]$ gdje je [At] koncentracija protutijela u ravnoteži, [Ag] je koncentracija antigena u ravnoteži i [At-Ag] je koncentracija kompleksa protutijelo-antigen u ravnoteži. Uobičajeno, vežuća međudjelovanja između antigena i protutijela obuhvaćaju reverzibilna nekovalentna povezivanja kao što je elektrostatsko privlačenje, Van der Waalsove sile i vodikove veze. Ovaj postupak utvrđivanja vežuće specifičnosti primijenjuje se na jednostruke teške i/ili lake lance, CDR-ove, stopljene proteine ili ulomke teških i/ili lakih lanaca koji su specifični za EGFRvIII.

C. Imunotestovi

Protutijela se mogu odrediti i/ili kvantificirati uporabom bilo kojeg od brojnih dobro poznatih imunoloških vežućih testova (*vidjeti, na pr.,* SAD patente br. 4 366 241; 4 376 110; 4 517 288; i 4 837 168). Za općeniti pregled imunotestova, vidi također *METHODS IN CELL BIOLOGY, VOL. 37*, Asai, ur., Academic Press, Inc. New York (1993); *BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 7. izd.*, Stites & Terr, ur. (1991). Imunološki vežući testovi (ili imunotestovi) obično koriste ligand (*na pr.,* EGFRvIII) kako bi specifično vezali i često imobilizirali protutijelo. Protutijela primijenjena u imunotestovima ovog izuma gore su potanko raspravljena.

Imunotestovi također često koriste obilježavajuće sredstvo kako bi specifično vezao i obilježio vežući kompleks stvoren ligandom i protutijelom. Obilježavajuće sredstvo može samo biti jedno od dijelova koji čine kompleks protutijela/analita, tj. protu-EGFRvIII protutijelo. Prema izboru, obilježavajuće sredstvo može biti treći dio, kao što je drugo protutijelo koje se specifično veže na kompleks protutijelo/EGFRvIII protein.

U jednom vidu, kompetitivni test se razmatra gdje je obilježavajuće sredstvo drugo protu-EGFRvIII protutijelo koje nosi biljeg. Dva protutijela se tada natječu za vezanje na imobilizirani EGFRvIII. U oblicima gdje je pitanje na koje se mora odgovoriti usporedba afiniteta prvog protutijela s onim od MR1, drugo protutijelo može biti MR1. Prema izboru, u nekompetitivnom obliku, EGFRvIII protutijelu manjka biljeg, ali drugo protutijelo specifično za protutijela vrsta iz kojih je protu-EGFRvIII protutijelo dobiveno, *na pr.,* mišje, a koje veže protu-EGFRvIII protutijelo, je obilježeno.

Drugi proteini koji su u stanju specifično vezati imunoglobulinska konstantna područja, kao što su protein A ili protein G također se mogu uporabiti kao obilježavajuće sredstvo. Ti proteini su normalni sastavni dijelovi staničnih zidova stafilokoknih bakterija. Oni pokazuju jaku neimunogensku reaktivnost s imunoglobulinskim konstantnim područjima iz različitih vrsta (*vidi općenito, Kronval i sur., J. Immunol. 111:1401-1406 (1973); i Akerstrom i sur., J. Immunol. 135:2589-2542 (1985).*

Tijekom izvođenja testova, koraci inkubacije i/ili ispiranja mogu biti potrebni nakon svake kombinacije reagenasa. Inkubacijski koraci mogu varirati od oko 5 sekundi do nekoliko sati, preporučljivo oko 5 minuta do oko 24 sata. Međutim, inkubacijsko vrijeme ovisit će o formatu testa, protutijelu, volumenu otopine, koncentracijama i slično. Obično se testovi izvode na sobnoj temperaturi, iako se mogu provoditi kroz raspon temperatura, od 4°C do 40°C.

Dok potankosti imunotestova ovog izuma mogu varirati s određenim formatom koji je primijenjen, postupak određivanja protu-EGFRvIII protutijela u uzorku koji sadrži protutijela općenito obuhvaća korake stupanja u vezu uzorka s protutijelom koje specifično reagira, pod imunološki reaktivnim uvjetima, u kompleks EGFRvIII/protutijela.

V. Proizvodnja imunokonjugata

Protu-EGFRvIII protutijela stvorena u ovom izumu mogu biti vezana na efektorske molekule (EM) putem EM karboksilnog kraja, EM amino kraja, putem unutrašnjeg aminokiselinskog ostatka efektorske molekule (EM) kao što je cistein ili bilo koja njihova kombinacija. Slično, EM se može izravno vezati na teška, laka, Fc (konstantno područje) područja ili okosnicu protutijela. Vezanje se može dogoditi putem amino ili karboksilnih krajeva protutijela ili putem unutarnjeg aminokiselinskog ostatka. Ako je PE ili njihov citotoksični ulomak uporabljen kao EM, vezanja na ili u blizini karboksilnog kraja bi trebala biti napravljena na način da se očuva ili doda (ako je vezanje na C-kraju) slijed koji djeluje kao signalni slijed usmjeravajući molekulu u citosol. Odgovarajući signalni aminokiselinski slijedovi kao što su REDLK (slijed nativnog PE, u jednoslovnom kodu), KDEL, RDEL i ponavljanja KDEL-a, poznata su u struci. Vidi, *na pr.,* WO 91/18099. Nadalje, višestruke EM molekule (*na pr.,* bilo koja od 2-10) mogu se vezati na protu-EGFRvIII protutijelo i/ili višestruka protutijela (*na pr.,* bilo koji od 2-5) mogu se vezati na EM. U posebno preporučljivom obliku, KDEL je slijed na C-kraju. Molekula stvorena vezanjem efektorske molekule na protutijelo poznata je kao imunokonjugat.

Terapijsko sredstvo je sredstvo s određenom biološkom aktivnošću usmjerenom protiv određene ciljane molekule ili stanice koja nosi ciljnu molekulu. Stručnjak će uvidjeti da terapijska sredstva mogu uključivati različite lijekove kao što su vinblastin, daunomicin i slično, citotoksine kao što je nativni ili preinačen egzotoksin pseudomonasa ili toksin difterije, inkapsulirana sredstva, (*na pr.,* liposomi) koji sami sadrže farmakološke pripravke, radioaktivna sredstva kao ¹²⁵I, ³²P, ¹⁴C, ³H i ³⁵S i druge biljege, ciljane dijelove i ligande.

Izbor određenog terapijskog sredstva ovisi o određenoj ciljnoj molekuli ili stanici i biološkom učinku koji se želi postići. Tako, na primjer, terapijsko sredstvo može biti citotoksin koji se uporablja kao bi se prouzročila smrt određene ciljane stanice. Nasuprot tomu, tamo gdje se želi postići samo nesmrtonosni biološki odgovor, terapijsko sredstvo može biti konjugirano s nesmrtonosnim farmakološkim sredstvom ili liposomom koji sadrži nesmrtonosno farmakološko sredstvo.

S ovdje opisanim terapijskim sredstvima i protutijelima, stručnjak može lako stvoriti različite klonove koji sadrže funkcionalno jednake nukleinske kiseline, kao što su nukleinske kiseline koje se razlikuju u slijedu, ali koje kodiraju isti

slijed EM ili protutijela. Tako, ovaj izum opisuje nukleinske kiseline koje kodiraju protutijela i konjugate, te njihove stopljne proteine.

A. Rekombinantni postupci

Slijedovi nukleinskih kiselina ovog izuma mogu se pripremiti bilo kojim prikladnim postupkom uključujući, na primjer, kloniranje odgovarajućih slijedova ili izravnom kemijskom sintezom postupcima kao što su fosfortriesterski postupak opisan od Naranga *i sur.*, *Meth. Enzymol.* 68:90-99 (1979); fosfodiesterski postupak opisan od Brown *i sur.*, *Meth. Enzymol.* 68:109-151 (1979); dietilfosforamiditni postupak opisan od Beaucage *i sur.*, *Tetra. Lett.* 22:1859-1862 (1981); fosforamidit triesterski postupak na čvrstoj fazi opisan od Beaucage & Caruthers, *Tetra. Letts.* 22(20):1859-1862 (1981), *na pr.*, uporabom automatiziranog aparata za sintezu kao što je opisano u, na primjer, Needham-VanDevanter *i sur.*, *Nucl. Acids Res.* 12:6159-6168 (1984); i postupak na čvrstom nosaču, SAD patent br. 4 458 066. Kemijska sinteza proizvodi jednolančane oligonukleotide. Oni se mogu prevesti u dvostruku DNA hibridizacijom s komplementarnim slijedom ili polimerizacijom s DNA polimerazom uporabom jednog lanca kao kalupa. Stručnjak će prepoznati da je kemijska sinteza DNA ograničena na slijedove od oko 100 baza, te da se duži slijedovi mogu dobiti spajanjem kraćih slijedova.

U preporučljivom obliku, slijedovi nukleinskih kiselina ovog izuma mogu se pripremiti tehnikama kloniranja. Primjeri prikladnih tehnika kloniranja i sekvencioniranja, te uputstva dovoljna da usmjere stručnjake u mnogim primjenama kloniranja mogu se pronaći u Sambrook *i sur.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (2. IZ.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), Berger i Kimmel (izd), *GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES*, Academic Press, Inc., San Diego CA (1987)) ili Ausubel *i sur.*, (ur.), *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing i Wiley-Interscience, NY (1987). Obavijesti o proizvodima od proizvođača bioloških reagenasa i eksperimentalne opreme također osiguravaju korisne informacije. Takve proizvođače uključuju SIGMA Chemical Company (Saint Luis, MO), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemica Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Švicarska), Invitrogen (San Diego, CA) i PE Applied Biosystems (Foster City, CA) kao i mnoge druge tržišne izvore poznate u struci.

Nukleinske kiseline koje kodiraju native efektorske molekule (EM) ili protu-EGFRvIII protutijela mogu biti preinačene tako da stvaraju EM, protutijela ili imunokonjugate ovog izuma. U struci je dobro poznata preinaka usmjerenom mutagenezom.

Nukleinske kiseline koje kodiraju EM ili protu-EGFRvIII protutijela mogu se umnožiti *in vitro* postupcima. Postupci umnožavanja uključuju lančanu reakciju polimeraze (PCR, od engl. *Polymerase chain reaction*), lančanu reakciju ligaze (LCR, od engl. *ligase chain reaction*), transkripcijski sustav umnažanja (TAS, od engl. *transcription-based amplification system*) i samoodržavajući sustav replikacije slijeda (3SR). Čitav niz postupaka kloniranja, stanica domaćina i metodologija *in vitro* umnažanja stručnjacima su dobro poznate.

U preporučljivom obliku, imunokonjugati se pripremaju umetanjem cDNA koja kodira protu-EGFRvIII scFv protutijelo u vektor koji sadrži cDNA koja kodira EM. Umetanje je napravljeno tako da se scFv i EM čitaju u okviru, odnosno u jedan neprekinuti polipeptid koji sadrži funkcionalno Fv područje i funkcionalno EM područje. U posebno preporučljivom obliku, cDNA koja kodira ulomak toksina *Diphtherie* veže se na scFv tako da je toksin smješten na amino kraj scFv-a. U najpreporučljivijem obliku, cDNA koja kodira PE ili njegov citotoksični ulomak veže se na scFv tako da je toksin smješten na scFv karboksilni kraj. U najpreporučljivijem obliku, citotoksični ulomak je PE38.

Jedanput kada su nukleinske kiseline koje kodiraju EM, protu-EGFRvIII protutijelo ili imunokonjugat ovog izuma izdvojene i klonirane, željeni protein se može eksprimirati u rekombinantno promijenjenoj stanici kao što su stanice bakterija, biljaka, kvasaca, kukaca ili sisavaca. Za očekivati je da su stručnjaci upoznati s brojnim ekspresijskim sustavima dostupnim za ekspresiju proteina uključujući *E. coli*, druge bakterijske domaćine, kvasce i različite više eukariotske stanice kao što su COS, CHO, HeLa i stanične linije mijeloma. Različiti postupci poznati za ekspresiju proteina u prokariotima ili eukariotima neće biti detaljnije opisani. Ukratko, ekspresija prirodnih ili sintetskih nukleinskih kiselina koje kodiraju izdvojene proteine izuma, uobičajeno će biti postignuta operabilnim vezanjem DNA ili cDNA na promotor (koji je ili konstitutivni ili inducibilni), nakon čega slijedi uklapanje u ekspresijsku kazetu. Kazete mogu biti prikladne za replikaciju i integraciju bilo u prokariotima ili eukariotima. Uobičajene ekspresijske kazete sadrže transkripcijske i translacijske terminatore, inicijacijske slijedove i promotore korisne za upravljanje ekspresijom DNA koja kodira protein. Prikladno, kazete mogu biti smještene u plazmide koji također sadrže jedan ili više gena za rezistenciju na antibiotike. Kako bi se dobila visoka razina ekspresije kloniranog gena, poželjno je stvoriti ekspresijske kazete koje sadrže, najmanje, jaki promotor koji upravlja transkripcijom, ribosomsko vežuće mjesto za početak translacije i transkripcijski/translacijski terminator. Za *E. coli* ovo uključuje promotor kao što je T7, trp, lac ili lambda promotore, ribosomsko vežuće mjesto i preporučljivo transkripcijski terminacijski signal. Za eukariotske stanice,

kontrolni slijedovi mogu uključivati promotor i preporučljivo pojačivač dobiven iz imunoglobulinskih gena, SV40, citomegalovirusa, te poliadetilacijski slijed, te može uključivati slijedove donora i akceptore cijepanja. Kazete izuma mogu se prenijeti u odabrane stanice domaćina dobro poznatim postupcima kao što je kalcij kloridna transformacija ili elektroporacija za *E. coli* i obrada kalcij fosfatom, elektroporacija ili lipofekcija stanica sisavaca. Stanice u koje su prenijete kazete mogu se odabrati rezistencijom na antibiotike prenijetom genima za rezistenciju sadržanih u kazetama kao što su *amp*, *kan*, *grp*, *neo* i *hyg* geni. Rezistencija na kanomicin i ampicilin su preporučljivi oblici za rad s fagima.

Stručnjak će uočiti da mogu biti učinjene preinake u nukleinskoj kiselini koja kodira polipeptid ovog izuma (*tj.*, protu-EGFRvIII protutijelo, PE ili imunokonjugat stvoren njihovim kombinacijama) bez umanjivanja njegove biološke aktivnosti. Neke se preinake mogu učiniti kako bi se olakšalo kloniranje, ekspresija ili uklapanje usmjeravajuće molekule u stopljeni protein. Takve preinake su stručnjacima dobro poznate i uključuju, na primjer, dodavanje metionina na amino kraj kako bi se osiguralo inicijacijsko mjesto ili dodatne aminokiseline (*na pr.*, poli His) smještene na bilo koji kraj kako bi se stvorila prikladno smještena restriksijska mjesta ili terminacijski kodoni ili slijedovi za pročišćavanje.

Pored rekombinantnih postupaka, imunokonjugati, EM i protutijela ovog izuma mogu se također stvoriti u potpunosti ili djelomično uporabom standardne sinteze peptida. Sinteza na čvrstoj fazi polipeptida ovog izuma manjih od 50 aminokiselina duljine može se postići pričvršćivanjem C-kraja aminokiselinskog slijeda na netopiv nosač nakon čega slijedi postupno dodavanje preostalih aminokiselina u slijedu. Tehnike za sintezu na čvrstoj fazi opisali su Barany & Merrifield, *THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY. VOL. 2: SPECIAL METHODS IN PEPTIDE SYNTHESIS, PART A*. Str. 3-284; Merrifield i sur. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156 (1963) i Stewart i sur., *SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS*, 2. izdanje, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Proteini veće duljine mogu se sintetizirati kondenzacijom amino i karboksilnog kraja kraćih ulomaka. Stručnjacima su poznati postupci stvaranja peptidnih veza aktivacijom karboksilnog kraja (*na pr.*, uporabom vežućeg reagensa N, N'-dicikloheksilkarbodiimida).

B. Pročišćavanje

Kad su eksprimirani, rekombinantni imunokonjugati, protutijela i/ili efektorske molekule ovog izuma mogu se pročititi prema standardnim postupcima struke, uključujući precipitaciju amonij sulfatom, afinitetne kolone, ionske izmjenjske i gel filtracijske kolone, te serijsku kromatografiju i slično (*vidjeti*, općenito, R. Scopes, *PROTEIN PURIFICATION*, Springer-Verlag, N. Y. (1982)). Preporučljivi su znatno pročišćeni pripravci od najmanje 90 do 95% homogenosti, a za farmaceutske uporabe najpreporučljiviji su od 98 do 99% ili više homogenosti. Kad se pročiste, djelomično ili do željene homogenosti, ako se terapijski upotrebljavaju, polipeptidi trebaju biti pouzdano oslobođeni od endotoksina.

Postupci za ekspresiju jednog lanca protutijela i/ili ponovnog smatanja u prikladni aktivni oblik, uključujući jednolančana protutijela, iz bakterija kao što su *E. coli* opisani su i dobro poznati, te su primijenjivi za protutijela ovog izuma. *Vidjeti*, Buchner i sur., *Anal. Biochem.* 205:263-270 (1992); Pluckthun, *Biotechnology* 9:545 (1991); Huse i sur., *Science* 246:1275 (1989) i Ward i sur., *Nature* 341:544 (1989), svi su obuhvaćeni ovdje referencom.

Često se funkcionalni heterologni proteini iz *E. coli* i drugih bakterija izdvajaju iz inkluzijskih tijela i zahtijevaju otapanje uporabom jakih denaturanata, nakon čega slijedi ponovno smatanje. Za vrijeme koraka otapanja, kao što je u struci dobro poznato, mora biti prisutno reducirajuće sredstvo kako bi se disulfidni mostovi reducirali. Primjeran pufer s reducirajućim sredstvom je: 0.1 M Tris pH 8, 6 M gvanidin, 2 mM EDTA, 0.3 M DTE (ditioeritritol). Reoksidacija disulfidnih mostova može se dogoditi u prisutnosti tiolnih reagenasa niske molekulske težine u reducirajućem ili oksidirajućem obliku, kako su opisali Saxena i sur., *Biochemistry* 9:5015-5021 (1970), ovdje obuhvaćeni referencom, te posebno opisali Buchner i sur., *gore*.

Renaturacija se obično postiže razrjeđivanjem (*na pr.*, 100 puta) denaturiranog i reduciranog proteina u puferu za ponovno smatanje. Primjeran pufer je 0.1 M Tris, pH 8.0, 0.5 M L-arginin, 8 mM oksidirani glutation (GSSG) i 2 mM EDTA.

Kao preinaka protokola za pročišćavanje dvolančanih protutijela, područja teškog i lakog lanca se zasebno otapaju i reduciraju, te se spajaju u otopini za ponovno smatanje. Preporučljiva količina se dobiva kada se ova dva proteina miješaju u molarnom omjeru tako da se ne prede 5 puta molarni suvišak jednog proteina nad drugim. Poželjno je dodati suvišak oksidiranog glutationa ili drugih oksidirajućih tvari niske molekulske težine otopini za ponovno smatanje nakon što je obavljen redoks pomak.

VI. Toksin *Pseudomonasa* i drugi toksini

Toksini se mogu primijenjivati s protutijelima ovog izuma kako bi se proizveli imunotoksini. Primjerni toksini uključuju ricin, abrin, toksin difterije i njihove podjedinice, kao i botulinske toksine A do F. Ovi su toksini na tržištu lako dostupni (*na pr.*, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Toksin difterije izdvojen je iz *Corynebacterium diphtheriae*. Ricin je lektin RCA60 iz *Ricinus communis* (ricinovo zrno). Izraz se također odnosi na njihove toksične inačice. Na primjer,

vidjeti SAD patent br. 5 079 163 i 4 689 401. *Ricinus communis* aglutinin (RCA) pojavljuje se u dva oblika označena kao RCA₆₀ i RCA₁₂₀ prema njihovim molekulskim težinama od približno 65, odnosno 120 kD (Nickolson & Blaustein, J. *Biochim. Biophys. Acta* 266:543 (1972)). Lanac A je odgovoran za inaktiviranje proteinske sinteze i usmrćivanje stanica. Lanac B veže ricin za ostatke galaktoze na staničnoj površini i olakšava transport A lanca u citosol (Olsnes i sur., *Nature* 249:627-631 (1974) i SAD patent br. 3 060 165).

Abrin uključuje toksične lektine iz *Abrus precatorius*. Izvori toksičnosti, abrin a, b, c i d imaju molekulsku težinu od oko 63 i 67 kD, te su sastavljeni od dva disulfidno povezana polipeptidna lanca A i B. Lanac A inhibira proteinsku sintezu; lanac B (abrin b) veže se na ostatke D-galaktoze (vidjeti, Funatsu i sur., *Agr. Biol. Chem* 52:1095 (1988); i Olsnes, *Methods Enzymol.* 50:330-335 (1978)).

U preporučljivim oblicima ovog izuma, toksin je egzotoksin A *Pseudomonasa* (PE). Nativni PE je izuzetno aktivan monomerni protein (molekulske težine 66 kD), kojeg izlučuje *Pseudomonas aeruginosa*, a inhibira proteinsku sintezu u eukariotskim stanicama. Slijed nativnog PE opisan je u SAD patentu br. 5 602 095, koji je ovdje obuhvaćen referencom. Način djelovanja je inaktivacija elongacijskog faktora 2 (EF-2) ADP ribozilacijom. Egzotoksin sadrži tri strukturne domene koje složeno djeluju kako bi prouzrokovale citotoksičnost. Domena Ia (aminokiseline 1-252) posreduje u staničnom vezanju. Domena II (aminokiseline 253-364) je odgovorna za premještanje u citosol, a domena III (aminokiseline 400-613) posreduje u ADP ribozilaciji elongacijskog faktora 2. Funkcija domene Ib (aminokiseline 365-399) ostaje neodređena, iako jedan njen velik dio, aminokiseline 365-380, može biti uklonjen bez gubitka citotoksičnosti.

Izraz "egzotoksin *Pseudomonasa*" kao što se ovdje koristi, odnosi se na nativni slijed, citotoksične ulomke nativnog slijeda i konzervativno preinačene inačice nativnog PE-a, te njegove citotoksične ulomke. U preporučljivim oblicima, PE molekula je preinačena na način da je uklonjena domena Ia, kako bi se smanjilo ili uklonilo nespecifično vezanje toksina. Citotoksični ulomci PE-a uključuju one koji su citotoksični s ili bez kasnije proteolitičke ili druge dorade u ciljnoj stanici (*na pr.*, kao protein ili preprotein). Citotoksični ulomci PE-a uključuju PE40, PE38 i PE35. PE40 je krnji mutirani derivat PE-a kao što je u struci prije opisano. Vidjeti, Pai i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci.* SAD 88:3358-62 (1991); i Kondo i sur., *J. Biol. Chem.* 263:9470-9475 (1988). PE35 je ulomak od 35 kD s karboksilnog kraja PE-a kojeg čine met na mjestu 280, te aminokiseline 253-364 i 381-613 nativnog PE-a. PE38 je krnji mutirani PE proprotein sačinjen od aminokiselina 253-364 i 381-613 PE-a. PE38 se aktivira u svoj citotoksični oblik nakon dorade unutar stanice (vidjeti SAD patent br. 5 608 039, obuhvaćen ovdje referencom).

U posebno preporučljivim oblicima, PE38 je toksični dio imunotoksina ovog izuma. Citotoksični ulomci PE35 i PE40, međutim, također se mogu uporabiti; ovi ulomci su prikazani u SAD patentima br. 5 602 095 i 4 892 827, svaki od njih je ovdje obuhvaćen referencom. Na temelju rada izvedenog s imunotoksinima temeljenim na MR1, KDEL je preporučljiva preinaka slijeda na C-kraju (vidjeti Lorimar i sur., *Proc. Natl. Acad. Sci.* SAD 93:14815-14820 na 14818 (1996)).

Konzervativno preinačene inačice PE-a

Konzervativno preinačene inačice PE-a ili njihovi citotoksični ulomci imaju najmanje 80% sličnosti u slijedu, preporučljivo najmanje 85% sličnosti u slijedu, preporučljivije najmanje 90% sličnosti u slijedu i najpreporučljivije najmanje 95% sličnosti u slijedu na razini aminokiselina, s PE-om od interesa, kao što je PE38.

Izraz "konzervativno preinačene inačice" primijenjuje se na aminokiselinske slijedove i slijedove nukleinskih kiselina. S obzirom na određene slijedove nukleinskih kiselina, konzervativno preinačene inačice odnose se na one slijedove nukleinskih kiselina koji kodiraju jednake ili esencijalno jednake aminokiselinske slijedove ili ako nukleinska kiselina ne kodira aminokiselinski slijed, na esencijalno jednake slijedove nukleinskih kiselina. Zbog ponavljanja (degeneracije) genetskog koda, velik broj funkcionalno jednakih nukleinskih kiselina kodira bilo koji dani polipeptid. Na primjer, kodoni GCA, GCC, GCG i GCU svi kodiraju aminokiselinu alanin. Stoga, na svakom mjestu gdje je alanin određen kodonom, kodon može biti promijenjen u bilo koje opisane odgovarajuće kodone bez promjene kodiranog peptida. Takve inačice nukleinskih kiselina su "tihe inačice", koje su jedna vrsta konzervativno preinačenih inačica. Svaki slijed nukleinskih kiselina koji kodira polipeptid također opisuje svaku moguću tihu inačicu nukleinske kiseline. Stručnjak će prepoznati da svaki kodon u nukleinskoj kiselini (osim AUG, koji je uobičajeno jedini kodon za metionin, i UGG, koji je jedini kodon za triptofan) može biti preinačen kako bi se dobila funkcionalno jednaka molekula. Zato je svaka tiha inačica nukleinske kiseline koja kodira polipeptid podrazumijevana u svakom opisanom slijedu.

U pogledu aminokiselinskih slijedova, stručnjak će prepoznati da pojedinačne supstitucije, delecije ili adicije slijeda nukleinske kiseline, peptida, polipeptida ili proteina koji mijenjaju, dodaju ili uklanjaju jednu aminokiselinu ili mali postotak aminokiselina u kodirajućem slijedu je "konzervativno preinačena inačica" gdje promjena rezultira supstitucijom aminokiseline s kemijski sličnom aminokiselinom.

Testiranje citotoksičnosti PE-a

Željena razina citotoksičnosti egzotoksina *Pseudomonasa* primijenjenih u izumu može biti testirana stručnjacima dobro poznatim testovima. Na primjer, citotoksičnost se često mjeri uporabom inhibicije proteinske sinteze egzotoksinom *Pseudomonasa* kao zamjenske mjere. Vidjeti, na pr., Lorimer *i sur.*, *Proc Natl. Acad. Sci.* SAD 93:14815-14820 (1996) na 14818. Prikladno, ovo se može učiniti mjerenjem nakupljanja radioaktivno označene aminokiseline (kako su prikazali Prior *i sur.*, *Cell* 64:1017-1023 (1991)) u stanice koje normalno ne ekspimiraju EGFRvIII, ali su transficirane s EGFRvIII cDNA. U Primjerima ispod, nakupljanje leucina obilježenog tricijem mjereno je u NR6M stanicama (Swiss 3T3 stanice odabrane zbog nedostatka ekspresije mišjeg EGFR i transficirane humanom EGFRvIII cDNA). Tako PE citotoksični ulomci i konzervativno preinačene inačice takvih ulomaka mogu biti lako testirane na citotoksičnost.

Velik broj PE potencijalnih molekula mogu istovremeno biti testirani na citotoksičnost u struci dobro poznatim postupcima. Na primjer, podskupine potencijalnih molekula mogu biti testirane na citotoksičnost. Podskupine potencijalnih molekula koje pozitivno reagiraju mogu se još dalje dijeliti i ponovno testirati sve dok se ne utvrdi željeni citotoksični ulomak (ulomci). Takvi postupci dopuštaju brzo probiranje velikog broja citotoksičnih ulomaka ili konzervativnih inačica PE-a.

Drugi terapijski dijelovi

Protutijela ovog izuma se također mogu uporabiti u usmjeravanju bilo kojeg broja različitih dijagnostičkih i terapijskih tvari u stanice koje na svojoj površini ekspimiraju EGFRvIII. Stoga protutijelo ovog izuma, kao što je protu-EGFRvIII scFv, može biti pričvršćeno izravno ili preko povezača na lijek koji se mora dostaviti izravno u stanice koje nose EGFRvIII. Terapijska sredstva uključuju takve spojeve kao što su nukleinske kiseline, proteini, peptidi, aminokiseline ili derivati, glikoproteini, radioizotopi, lipidi, ugljikohidrati ili rekombinantni virusi. Terapijski i dijagnostički dijelovi nukleinskih kiselina uključuju *antisense* nukleinske kiseline, izvedene oligonukleotide za kovalentno poprečno vezanje s jednostrukom ili dvostrukom DNA i oligonukleotide koji stvaraju trostruke lance.

Pored toga, molekula vezana na protu-EGFRvIII protutijelo može biti kapsulirani sustav, kao što je liposom ili micela koja sadrži terapijske pripravke kao što su lijek, nukleinska kiselina (*na pr.*, *antisense* nukleinska kiselina) ili drugi terapijski dio koji je preporučljivo zaštićen od izravnog izlaganja cirkulacijskom sustavu. Načini pripreme liposoma pričvršćenih na protutijela dobro su poznati stručnjacima. Vidjeti, na primjer, SAD patent br. 4 957 735; i Connor *i sur.*, *Pharm. Ther.* 28:341-365 (1985).

Određivi biljezi

Protutijela ovog izuma mogu se po izboru kovalentno ili nekovalentno vezati na određiv biljeg. Određivi biljezi prikladni za takvu uporabu uključuju bilo koji pripravak koji se može odrediti na spektroskopski, fotokemijski, biokemijski, imunokemijski, električki, optički ili kemijski način. Korisni biljezi u ovom izumu uključuju magnetske kuglice (*na pr.* DYNABEADS), fluorescentne boje (*na pr.*, fluorescein izotiocijanat, Texas red, rodamin, zeleni fluorescentni protein i slično), radioaktivne biljege (*na pr.*, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C ili ^{32}P), enzime (*na pr.*, peroksidaza iz hrena, alkalna fosfataza, luciferaza i druge koji se obično upotrebljavaju u *ELISA*-i) i kolorimetrijske biljege kao što su koloidne zlatne ili obojane staklene ili plastične (*na pr.*, polistiren, polipropilen, lateks, itd.) kuglice.

Stručnjacima su dobro poznati načini određivanja takvih biljega. Tako se, na primjer, mogu odrediti radioaktivni biljezi uporabom fotografskog filma ili scintilacijskih brojača, fluorescentni biljezi mogu se odrediti uporabom fotodetektora kako bi se odredila emitirana svjetlost. Enzimski biljezi uobičajeno se određuju pripremom enzima sa supstratom i određivanjem reakcijskog proizvoda koji je proizveden djelovanjem enzima na supstrat, te kolorimetrijski biljezi koji se određuju jednostavno vizualizacijom obojanog biljega.

Konjugacija na protutijela

U nerekombinantnom obliku izuma, efektorske molekule, *na pr.*, terapijski, dijagnostički i detekcijski dijelovi, vežu se na protu-EGFRvIII protutijela ovog izuma uporabom bilo kojeg načina poznatog stručnjacima. Oba, kovalentni i nekovalentni načini pričvršćivanja mogu se uporabiti s protu-EGFRvIII protutijelima ovog izuma.

Postupci povezivanja efektorske molekule na protutijelo razlikovat će se ovisno o kemijskom sastavu EM. Polipeptidi obično sadrže različite funkcionalne skupine; *na pr.*, karboksilne kisele (COOH), slobodne amino ($-\text{NH}_2$) ili sulfhidrilne ($-\text{SH}$) skupine, koje su na raspolaganju za reakciju s prikladnim funkcionalnim skupinama na protutijelu što rezultira vezanjem efektorske molekule.

Po izboru, protutijelo se derivatizira kako bi se izložile ili pričvrstile dodatne reaktivne funkcionalne skupine. Derivatizacija može uključivati pričvršćivanje bilo koje od brojnih molekula povezača kao što su one dostupne od Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

- 5 "Povezač", kao što se ovdje koristi, je molekula uporabljena u spajanju protutijela na efektorsku molekulu. Povezač je sposoban stvarati kovalentne mostove na protutijelu i efektorskoj molekuli. Prikadni povezači su stručnjacima dobro poznati i uključuju, bez ograničenja, ugljične povezače ravnih ili razgranatih lanaca, heterocikličke ugljične povezače ili peptidne povezače. Tamo gdje su protutijelo i efektorska molekula polipeptidi, povezači se mogu spojiti na sastavne aminokiseline putem njihovih postraničnih skupina (*na pr.*, preko disulfidne veze na cistein).
- 10 Međutim, u preporučljivom obliku, povezači će biti spojeni na alfa ugljik amino i karboksilnih skupina krajnjih aminokiselina.

U nekim okolnostima, kada je imunokonjugat dostigao svoje ciljno mjesto poželjno je osloboditi efektorsku molekulu od protutijela. Stoga, u ovim okolnostima, imunokonjugati će obuhvaćati veze koje se mogu raskinuti u blizini ciljnog

15 mjesta. Odvajanje povezača kako bi se oslobodila efektorska molekula od protutijela može se potaknuti enzimatskom aktivnošću ili uvjetima kojima je imunokonjugat podvrgnut bilo unutar ciljne stanice ili u blizini ciljnog mjesta. Kada je ciljno mjesto tumor, može se uporabiti povezač koji se može raskinuti pod uvjetima prisutnim na mjestu tumora (*na pr.*, kada su izloženi tumorskim enzimima ili kiselom pH).

- 20 U pogledu velikog broja postupaka koji su opisani za pričvršćivanje različitih radiodijagnostičkih spojeva, radioterapijskih spojeva, lijekova, toksina i drugih sredstava na protutijela, stručnjak će biti u stanju odrediti prikladni postupak za pričvršćivanje datog sredstva na protutijelo ili drugi polipeptid.

VII. Farmaceutski pripravci i primjena

- 25 Pripravci protutijela i/ili imunokonjugata ovog izuma (*tj.*, PE vezan na protutijelo s Kd za EGFRvIII epitop najmanje 1 nM nižom nego od MR1), korisni su za primjenu u mozgu. Nedavno je napravljen pregled uporabe imunotoksina u terapiji tumora mozga od Oldfield, E. i Youle, R., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 234:97-114 (1998). Mali polipeptidi prolaze krvno moždanu barijeru. Za duže polipeptide koji ne prolaze krvno moždanu barijeru, dobro su poznati postupci primjene proteina u mozgu. Na primjer, proteini, polipeptidi, drugi spojevi i stanice mogu se dostaviti mozgu sisavaca intracerebroventrikularnim (ICV) ubrizgavanjem ili putem kanile (*vidjeti, na pr.*, Motta & Martini, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 168:62-64 (1981); Peterson *i sur.*, *Biochem. Pharmacol.* 31:2807-2710 (1982); Rzepeczynski *i sur.*, *Metab. Brain Dis.* 3:211-216 (1988); Leibowitz *i sur.*, *Brain Res. Bull.* 21:905-912 (1988); Sramka *i sur.*, *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 58:79-83 (1992); Peng *i sur.*, *Brain Res.* 632:57-67 (1993); Chem *i sur.*, *Exp. Neurol.* 125:72-81 (1994); Nikkiah *i sur.*, *Neuroscience* 63:57-72 (1994); Anderson *i sur.*, *J. Comp. Neurol.* 357:296-317 (1995); i Brecknell & Fawcett, *Exp. Neurol.* 138:338-344 (1996)).
- 35

Tako se, na primjer, glioblastom može liječiti lokaliziranom dostavom kanilom ili iglom u tkivo koje okružuje tumor ili uobičajenije unutar odijeljka središnjeg živčanog sustava ICV-om. Pored toga, imunokonjugati se mogu sustavno primijeniti tamo gdje je, na primjer, bolesnikov glioblastom ošteti epitelne stanice dovoljno da se omogući prodiranje

40 kroz krvno moždanu barijeru.

Protutijelo ili imunokonjugati izuma također se mogu primijenjivati lokalno ili sustavno u liječenju karcinoma dojke, jajnika i pluća. Na primjer, ove zloćudne bolesti se mogu liječiti izravnim ubrizgavanjem u tumore koji se ne mogu kirurški odstraniti. Ovi se karcinomi također mogu liječiti parenteralnom primjenom imunokonjugata kako bi se, na primjer, odredio položaj i uništile bilo kakve metastatske stanice koje još nisu stvorile tumore dovoljne veličine koji bi se liječili zračenjem ili kirurški ili koji bi se zaista lako mogli odrediti.

45

Pripravci za primjenu obično sadrže otopinu protutijela i/ili imunokonjugata rastopljenih u farmaceutski prihvatljivom nosaču, preporučljivo vodenom nosaču. Mogu se uporabiti različiti vođeni nosači, *na pr.*, puferirana fiziološka otopina i slično. Ove su otopine sterilne i općenito bez neželjenih tvari. Ti se pripravci mogu sterilizirati konvencionalnim, dobro poznatim tehnikama sterilizacije. Pripravci mogu sadržavati farmaceutski prihvatljive pomoćne tvari potrebne za postizanje fizioloških uvjeta kao što je namještanje pH i puferirajuće tvari, tvari za namještanje toksičnosti i slično, na primjer, natrij acetat, natrij klorid, kalij klorid, kalcij klorid, natrij laktat i slično. Koncentracija stopljenog proteina u ovim formulacijama može se izrazito razlikovati i bit će odabrana provotno na osnovu volumena tekućina, viskoziteta, tjelesne težine i slično u skladu s određenim načinom odabrane primjene i bolesnikovih potreba.

50

55

Tako, uobičajeni farmaceutski imunotoksinski pripravak ovog izuma za primjenu u mozgu bio bi oko 1.2 do 1200 µg dnevno. Uobičajen pripravak za intravensku primjenu u liječenju karcinoma dojke, jajnika ili pluća je oko 0.1 do 10 mg po bolesniku dnevno. Mogu se uporabiti doze od 0.1 do oko 100 mg po bolesniku dnevno, posebno ako se lijek primjenjuje u odijeljeno mjesto, a ne u cirkulacijski ili limfni sustav, kao u tjelesnu šuplinu ili u lumen organa. Sadašnji postupci pripreme primijenjivih pripravaka poznati su ili očit stručnjacima i podrobnije su opisani u

60

publikacijama kao što je *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE*, 19. izdanje, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1995).

5 Pripravci ovog izuma se mogu primijeniti za terapijsko liječenje. U terapijskim upotrebama, pripravci se primjenjuju u bolesnika koji boluje od bolesti kao što su glioblastom, karcinom dojke, karcinom jajnika ili karcinom pluća, u količini dovoljnoj da barem uspori ili djelomično zaustavi bolest i njene komplikacije. Primjerena količina kojom se ovo postiže je određena kao "terapijski učinkovita doza". Količine učinkovite za ovu uporabu ovisit će o težini bolesti i o općenitom stanju bolesnikova zdravlja. Učinkovita doza spoja je ona koja osigurava bilo subjektivno olakšanje simptoma (simptomā) ili objektivno određivo poboljšanje opaženo od liječnika ili drugog kvalificiranog promatrača.

10 Jednostruke ili višestruke primjene pripravaka primjenjuju se ovisno o dozi i učestalosti potrebnih i toleriranih od bolesnika. U svakom slučaju, pripravak mora osigurati dovoljnu količinu proteina ovog izuma kako bi liječenje bolesnika bilo učinkovito. Preporučljivo, doza se primjenjuje jedanput, ali može biti primijenjena periodično dok se ne postigne terapijski rezultat ili sve dok neželjeni učinci ne opravdaju prekid terapije. Općenito, doza je dovoljna kako bi se liječili ili poboljšali simptomi ili znakovi bolesti bez stvaranja neprihvatljive toksičnosti bolesniku.

20 Kontrolirano oslobađanje parenteralnih formulacija imunokonjugatnih pripravaka ovog izuma može se napraviti u obliku implanata, uljastih injekcija ili kao posebnih sustava. Za širi pregled proteinskih sustava dostave vidjeti, Banga, A. J., *THERAPEUTIC PEPTIDES AND PROTEINS: FORMULATION, PROCESSING, AND DELIVERY SYSTEMS*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995), ovdje obuhvaćen referencom. Posebni sustavi uključuju mikrosfere, mikročestice, mikrokapsule, nanokapsule, nanosfere i nanočestice. Mikrokapsule sadrže terapijski protein kao središnju srž. U mikrosferama terapijski protein je raspršen kroz česticu. Čestice, mikrosfere i mikrokapsule manje od oko 1 µm općenito se odnose na nanopartikle, nanosfere, odnosno nanokapsule. Kapilare imaju promjer od približno 5 µm, stoga se samo nanočestice primjenjuju intravenski. Mikročestice su obično veličine 100 µm u promjeru i primjenjuju se podkožno ili intramuskularno. Vidjeti, na pr., Kreuter, J., *COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS*, J. Kreuter, ur., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, str. 219-342 (1994); i Tice & Tabibi, *TREATISE ON CONTROLLED DRUG DELIVERY*, A. Kydonieus, ur., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, str. 315-339 (1992), oba su obuhvaćena ovdje referencom.

30 Polimeri se mogu uporabiti za ionski kontrolirano otpuštanje imunokonjugatnih pripravaka ovog izuma. Različite razgrađive i nerazgrađive polimerne matrice za uporabu u kontroliranoj dostavi lijeka poznate su u struci (Langer, R., *Accounts Chem. Res.* 26:537-542 (1993)). Na primjer, blokirajući kopolimer, polaksamer 407 na niskim temperaturama postoji kao viskozna još pokretna tekućina, ali stvara polučvrsti gel na tjelesnoj temperaturi. Za njega je pokazano da je učinkovit prenosilac za formulacije i potpomognutu dostavu rekombinantnog interleukina-2 i ureaze (Johnston i sur., *Pharm. Res.* 9:425-434 (1992); i Pec i sur., *J. Parent. Sci. Tech.* 44(2):58-65 (1990)). Po izboru, koristi se hidroksiapatit kao mikronosač za kontrolirano otpuštanje proteina (Ijntema i sur., *Int. J. Pharm.* 112:215-224 (1994)). U još jednom drugom vidu, upotrebljavaju se liposomi za kontrolirano otpuštanje kao i usmjeravanje lipidnog kapsuliranog lijeka (Betageri i sur., *LIPOSOME DRUG DELIVERY SYSTEMS*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Poznati su brojni dodatni sustavi za kontroliranu dostavu terapijskih proteina. Vidjeti, na pr. SAD patent br. 5 055 303, 5 188 837, 4 235 871, 4 501 728, 4 837 028, 4 957 735 i 5 019 369, 5 055 303; 5 514 670; 5 413 797; 5 268 164; 5 004 697; 4 902 505; 5 506 206, 5 271 961; 5 254 342 i 5 534 496, svaki je ovdje obuhvaćen referencom.

45 Među različitim upotrebama imunotoksina ovog izuma uključena su bolesna stanja uzrokovana specifičnim humanim stanicama koje ekspimiraju EGFRvIII, a mogu se ukloniti toksičnim djelovanjem imunokonjugata. Jedna preporučljiva primjena imunotoksina izuma je liječenje zloćudnih stanica koje ekspimiraju EGFRvIII. Primjerne zloćudne stanice uključuju stanice glioblastoma, karcinoma dojke, karcinoma jajnika i karcinoma pluća.

VIII. Dijagnostički kitovi i *in vitro* uporaba

50 U drugom obliku, ovaj izum opisuje kitove za određivanje EGFRvIII u biološkom uzorku. "Biološki uzorak", kako je ovdje uporabljeno, je uzorak biološkog tkiva ili tekućine koji sadrži EGFRvIII. Takvi uzorci uključuju, bez ograničenja, tkivo iz biopsije, sputum, amnionsku tekućinu, krv i stanice krvi (na pr., bijele stanice). Uzorci tekućine mogu biti od interesa, ali općenito ovdje nisu preporučljivi jer se određive koncentracije EGFRvIII rijetko nađu u takvom uzorku. Biološki uzorci također uključuju tkivne rezove, kao što su smrznuti rezovi uzeti u histološke svrhe. Biološki uzorak se uobičajeno dobiva od višestaničnog eukariota, preporučljivo sisavca kao što je štakor, miš, krava, pas, morsko prase ili kunić, te preporučljivije od primata, kao što su makake, čimpanze. Najpreporučljivije, biološki uzorak je iz čovjeka.

Kitovi obično obuhvaćaju protu-EGFRvIII scFv ovog izuma, koji ima veći afinitet za EGFRvIII nego što ima M1 scFv.

60 Pored toga kitovi obično uključuju materijale uputstava koji opisuju načine uporabe protutijela ovog izuma (na pr., za određivanje stanica koje sadrže EGFRvIII u uzorku). Kitovi također mogu uključivati dodatne sastavne dijelove kako bi se olakšala određena primjena za koju je kit namijenjen. Tako, na primjer, kit može dodatno sadržavati sredstva za

određivanje biljega (*na pr.*, enzimске supstrate za enzimске biljege, setove filtera za određivanje fluorescentnih biljega, odgovarajuće sekundarne biljege kao što su ovčji protu-mišji-HRP ili slično). Kitovi mogu pored toga sadržavati pufere i druge reagentse uobičajeno uporabljene u izvođenju određenog postupka. Takvi kitovi i odgovarajući sadržaji stručnjacima su dobro poznati.

U jednom obliku ovog izuma, dijagnostički kit obuhvaća imunotestove. Kao što je gore opisano, iako se potankosti imunotestova ovog izuma mogu razlikovati s određenim primijenjenim oblikom, postupak određivanja EGFRvIII u biološkom uzorku općenito obuhvaća korake stupanja u vezu biološkog uzorka s protutijelom koje specifično reagira, pod imunološki reaktivnim uvjetima, s EGFRvIII-om većeg afiniteta za EGFRvIII nego MR1 scFv. Dopušta se da se protutijelo veže na EGFRvIII pod imunološki reaktivnim uvjetima, a prisutnost vezanog protutijela se određuje izravno ili neizravno.

Zbog povećanog afiniteta protutijela razvijenih ovdje opisanim postupcima, i posebno zbog scFv označenog MR1-1, ovdje opisana protutijela bit će osobito korisna kao dijagnostička sredstva, te u *in vitro* testovima u određivanju prisustva EGFRvIII u biološkim uzorcima. Na primjer, MR1-1, i druga protutijela napravljena ovdje opisanim postupcima, mogu se uporabiti kao usmjeravajući dijelovi imunokonjugata u imunohistokemijskim testovima kako bi se odredilo da li uzorak sadrži stanice koje ekspiriraju EGFRvIII. Ako je uzorak uzet iz tkiva bolesnika koje normalno ne bi trebalo ekspirirati EGFRvIII, određivanje EGFRvIII upućivat će ili da bolesnik ima rak kojem je svojstvena prisutnost EGFRvIII-ekspirirajućih stanica ili da liječenje takvog raka još nije uspješno u njegovom uništavanju. Stručnjaci će također zamijetiti da se protu-EGFRvIII protutijela izuma, združena s prikladnim biljgom, mogu jednako tako uporabiti *in vivo* u određivanju prisustva EGFRvIII ekspirirajućih stanica, pri tom upućujući ili da bolesnik ima rak kojem je svojstvena prisutnost EGFRvIII-ekspirirajućih stanica ili da liječenje takvog raka još nije uspješno u njegovom uništavanju.

PRIMJERI

Primjer 1

Strategija razvoja protutijela s boljim vezanjem nego MR1.

U otkrivanju protutijela koja se bolje vežu na EGFRvIII nego MR1, napravljena je knjižnica prezentacije faga s MR1 scFv. Nasumične mutacije uvedene su u područje 3 koje određuje komplementarnost teškog lanca (V_H CDR3), područje koje ima glavnu ulogu u vezanju protutijela (MacCallum *i sur.*, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996)). Pretraživanje stanica koje ekspiriraju EGFRvIII proizvelo je nekoliko mutanti koje su, kad su uporabljene u stvaranju imunotoksina, imale poboljšani afinitet, citotoksičnost i prinos. Ispitivanje ovih inačica otkrilo je da sve imaju mutacije smještene u području V_H CDR3 koje je označeno kao žarišno mjesto hipermutacija (Neuberger *i sur.*, *Curr. Opin. Immunol.* 7:248-254 (1995); Jolly, C. J., *Semin. Immunol.* 8:159-168 (1996); Neuberger *i sur.*, *Immunological Rev.* 62:107-116 (1998)). Žarišna mjesta određena su uzastopnim slijedom G/A-G-T/C-A/T ili A-G-C/T. Posljednji sadrže serinske kodone nadene u promijenjivim domenama gena protutijela (Goyenechea *i sur.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. SAD* 93:13979-13984 (1996)). Žarišna mjesta su područja koja učestalo mutiraju za vrijeme nastajanja protutijela. Pretraživanje V_H CDR3 knjižnice nije dalo nikakve klonove koji sadrže mutacije izvan žarišnih mjesta. Ovi rezultati potvrđuju nedavna otkrića da nasumične mutacije žarišnih mjesta vjerojatnije proizvode mutante poboljšanog afiniteta (Chowdhury *i sur.*, *Nature Biotechnol.* 17:568-572 (1999)). Najbolji vezač dobiven pretraživanjem V_H CDR3 knjižnice uporabljen je kako bi se napravila knjižnica prezentacije faga stvaranjem nasumičnih mutacija u žarišnom mjestu lakog lanca CDR3. Pretraživanje ove knjižnice proizvelo je još nekoliko mutantnih klonova sa čak poželjnijim svojstvima.

Primjer 2

Stvaranje knjižnice V_H mutanti.

V_H CDR3 u MR1 sastoji se od jedanaest aminokiselina. Kao što je spomenuto u Uvodu, za dvije od ovih aminokiselina smatra se da vjerojatno ne sudjeluju u vezanju antigena. Drugih devet aminokiselina u V_H bilo je mutirano zamjenjivanjem sa svim drugim prirodnim aminokiselinama kako slijedi za aminokiselinske ostatak koji se normalno javljaju na određenom mjestu. Osmišljeni su DNA oligomeri kako bi se stvorile tri knjižnice, svaka s nasumičnim mutacijama devet nukleotida, (tri aminokiseline u nizu). MR1 fagemid uporabljen je kao kalup kako bi se uvele tri aminokiselinske nasumične mutacije u CDR3 teškog lanca u 3 odvojene lančane reakcije polimeraze (*PCR*) sastavljene od dva koraka (Slika 1). Uporabljene su sljedeći oligomeri:

CDR3Hb (5'-CTTGGCCCCASNNNSNNAGAGGTACTAGAAATAGCCTCTTGTGCA-3'),
 CDR3Hd (5'-CTTGGCCCCACATAGCATASNNNSNNAGAAATAGCCTCTTGTGCA-3'),
 CDR3Hf (5'-CTTGGCCCCACATAGCATAAGAGGTACTSNNNSNNNTCTTGTGCA-3'),
 S1 (5'-CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC-3'),
 AMBN (5'-GCTAAACAACCTTCAACAGTCTATGCGGGCAC-3')

U prvom PCR-u, 50 pg fagemida pCANTAB 5 E-MR1 korišteno je kao kalup u tri odvojene reakcije uporabom 20 pmol DNA oligomera S1 zajedno s 20 pmol DNA oligomera CDR3Hb, CDR3Hd ili CDR3Hf. Kalup i oligomeri pomiješani su s 2 *Ready-To-Go PCR* kuglice (Pharmacia) u volumenu od 50 μ L i podvrgnuti ciklusima kako slijedi: 1 ciklus na 95°C 5 minuta, nakon čega je slijedilo 30 ciklusa na 94°C 1 minutu, 55°C 1 minutu i 72°C 1 minutu. Ove reakcije su stvorile proizvod od 407 parova baza koji je sadržavao mutacije. Proizvodi stvoreni u prvom koraku uporabljeni su tada kao početnice u tri odvojene reakcije s AMBN početnicom uporabom MR1 fagemida kao kalupa. U ovim reakcijama, 1 μ L proizvoda iz prve reakcije korišteno je s 20 pmol DNA oligomerom AMBN s 50 pg fagemidom PCANTAB 5 E-MR1 kao kalupom. Početnice i kalup pomiješani su s 2 PCR kuglice u 50 μ L volumena i podvrgnuti ciklusima na gore opisan način. Svaka reakcija stvorila je knjižnicu od 876 parova baza. PCR proizvodi pocijepani su restriksijskim enzimima Sfi I i Not I, te pročišćeni. 150 ng pročišćenih PCR proizvoda spojeno je s 250 ng fagnog prezentirajućeg vektora DNA pCANTAB5E (prethodno cijepani po uputstvu Pharmacie). Ligacijska smjesa je odsoljena, te je 40 ng svakog spajanja uporabljeno u transformaciji *E. coli* TG1. Svaka transformacija rezultirala je u otprilike 1.5×10^6 klonova. Knjižnice faga tada su oslobođene od transformiranih bakterija. Stanice iz svake transformacije uzgajane su u 10 mL 2xYT (16 g bacto-tripton, 10 g ekstrakt bacto-kvasca, 5 g NaCl po litri H₂O) koji sadrži 2% glukozu na 37°C uz miješanje na 250 RPM. Nakon jednog sata dodani su ampicilin (100 μ g/mL konačne koncentracije) i 1×10^{10} plak stvarajućih jedinica (pfu) M13KO7 pomagačkog faga. Kulture su uzgajane 1 sat, istaložene, resuspendirane u 10 mL 2xYT uz ampicilin (100 μ g/mL) i kanamicin (50 μ g/mL), te uzgajane 16 sati na 37°C, uz miješanje na 250 RPM. Bakterije su istaložene centrifugiranjem u Sorval SS34 rotoru na 8000 RPM tijekom 20 minuta. Supernatanti koji su sadržavali fage filtrirani su uporabom filterske jedinice s iglom od 0.45 mikrona. Fagi su tada precipitirani dodavanjem 2 mL PEG, NaCl (20% PEG8000 u 2.5 M NaCl w/v), te inkubirani na ledu 30 minuta. Precipitirani fagi tada su istaloženi centrifugiranjem u Sorvall SS34 rotoru na 10K RPM 20 minuta, te resuspendiran u 1 mL NTE (100 mM NaCl, 10 mM TRIS pH 7.5, 1 mM EDTA). Oslobođene knjižnice faga bile su titrirane i pohranjene na 4°C.

Pretraživanje V_HCDR3 knjižnice.

NR6M stanice uzgajane u DMEM koji sadrži 10% fetalnog govedeg seruma sa 750 μ g/mL G418 skupljene su uporabom 0.02% EDTA (Sigma # E-8008). 2×10^7 stanica istaloženo je i resuspendirano u 10 mL hladnog blokirajućeg pufera (2% BSA, 0.02% NaN₃ u DPBS) i polako okretano 1 sat na 4°C. Stanice su istaložene i resuspendirane u 5 mL hladnog blokirajućeg pufera. 1×10^9 faga iz svake knjižnice CDR3 teških lanaca dodano je u suspenziju stanica, te je smjesa polako okretana na 4°C tijekom 2 sata. Stanice su isprane dva puta s 10 mL hladnog blokirajućeg pufera i resuspendirane u 5 mL hladnog blokirajućeg pufera. MR1dsFvPE38 dodan je (2 μ M konačna koncentracija) kao kompetitivni inhibitor, te je suspenzija polako okretana na 4°C tijekom 2 sata. Stanice su isprane tri puta s 10 mL hladnog blokirajućeg pufera. Vezani fagi eluirani su resuspendiranjem ispranih stanica u 1.5 mL hladne 50 mM HCl, te inkubirani na ledu 10 minuta. NR6M stanice istaložene su, te su eluirani fagi prebačeni u nove kušalice koje su sadržavale 200 μ L 1 M Tris pH 8.0. Eliurani fagi su titrirani kako bi se odredio broj zadržanih faga. Tada je 0.5 mL eluiranih faga umnoženo reinficiranjem *E. coli* TG1 za uporabu u slijedećem krugu pretraživanja.

Stvaranje knjižnice V_L mutanti.

Mutanta CDR3 teškog lanca (S98P-T99Y) uporabljena je kao kalup u PCR-u sastavljenom od dva koraka čime su se uvele nasumične mutacije u žarišna mjesta smještena na CDR3 lakom lancu. U prvoj reakciji, 50 pg fagemida koji sadrži mutantu teškog lanca (S98P-T99Y) pomiješano je s 20 pmol DNA oligomera VLMUT (5'-GATTACTACTGTTTGAANNSNNSAACGTGCCTCTTACA-3') i AMBN u 50 μ L volumena. Ova smjesa podvrgnuta je istim ciklusima korištenim u stvaranju knjižnice CDR3 teškog lanca. U reakcijama su nastali proizvodi od 150 parova baza koji su sadržavali nasumičnu mutaciju "žarišnog mjesta" u CDR3 lakom lancu. Nakon pročišćavanja, 1 μ L reakcijskog proizvoda nastalog u prvom PCR-u uporabljeno je s 20 pmol DNA oligomera S1 u drugom PCR-u s 50 pg fagemidne DNA koja sadrži mutantu teškog lanca (S98P-T99Y) kao kalup. Kalup i početnice pomiješane su s 2 PCR kuglice u 50 μ L volumena i podvrgnuti ciklusima prema gornjem obrascu. U reakcijama je nastala knjižnica od 876 parova baza koja sadrži V_HCDR3 mutaciju (S98P-T99Y) i nasumičnu mutaciju žarišnog mjesta u CDR3L. PCR proizvodi pocijepani su restriksijskim enzimima Sfi I i Not I, pročišćeni i spojeni s pCANTAB5E vektorom kao s knjižnicama CDR3 teškog lanca. Ligacijska smjesa je bila odsoljena, te je jedna desetina (40 ng) reakcije uporabljena u transformaciji *E. coli* TG1. Knjižnice faga koje su sadržavale 3×10^5 klonova oslobođene su kao što je opisano u stvaranju CDR3 teških lanaca. Jedna njena četvrtina umnožena je i uporabljena u prvom krugu pretraživanja.

Pretraživanje V_LCDR3 knjižnice.

NR6M stanice skupljene su kao i u postupku pretraživanja V_HCDR3. Svi koraci i ispiranja učinjeni su u hladnom blokirajućem puferu osim gdje je zabilježeno drugačije. 5×10^6 stanica resuspendirano je u 1 mL blokirajućeg pufera i okretano 1 sat. Stanice su istaložene i resuspendirane, dodana je oslobođena knjižnica faga, te je suspenzija polako okretana na 4°C tijekom 2 sata. Stanice su isprane 3 puta, resuspendirane u blokirajućem puferu koji sadrži 2 pM MR1 mutanti teškog lanca (S98P-T99Y) scFv-PE38, te okretane polako na 4°C tijekom 2 sata. Stanice su isprane 3 puta, a

vezani fagi eluirani su i neutralizirani kao i kod knjižnice CDR3 teških lanaca. Eluirani fagi titrirani su i oslobođeni za slijedeći krug pretraživanja.

Oslobađanje faga.

Fagi zadržani nakon svakog kruga pretraživanja umnoženi su za uporabu u slijedećem krugu pretraživanja. Za oslobađanje, *E. coli* TG1 uzgajana je u 10 mL 2xYT koji sadrži 2% glukoze inkubiranog na 37°C, 250 RPM. Kada je OD₆₀₀ dosegla 0.3, 0.5 mL zadržanih faga dodano je u kulturu, te je inkubacija nastavljena. Nakon jednog sata dodan je ampicilin (100 µg/mL konačno) i 1x10¹⁰ pfu M13KO7 pomagačkog faga, te je inkubacija nastavljena jedan sat. Kultura je tada centrifugirana, a istaložene bakterije resuspendirane u 10 mL svježeg 2xTY medija koji sadrži ampicilin (100 µg/mL) i kanamicin (50 µg/mL), te inkubirane na 37°C, 250 RPM tijekom 16 sati. Bakterije su istaložene centrifugiranjem u Sorvall SS34 rotoru na 8K RPM tijekom 20 minuta. Supernatanti koji su sadržavali fage filtrirani su uporabom filterske jedinice s iglom od 0.45 mikrona. Fagi su tada precipitirani dodavanjem 2 mL PEG/NaCl (20% PEG8000 u 2.5 M NaCl w/v) i inkubirani na ledu 30 minuta. Precipitirani fagi istaloženi su centrifugiranjem u Sorvall SS34 rotoru na 10K RPM 20 minuta, te resuspendirani u 1 mL NTE (100 mM NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 7.4). Oslobođena knjižnica faga titrirana je i pohranjena na 4°C.

Određivanje pozitivnih klonova.

Nakon trećeg kruga pretraživanja, 48 klonova iz knjižnice CDR3 teških lanaca ispitivano je na vezanje s EGFRvIII peptidom (LEEKKGNYVVTDHSGGK-biotin) uporabom *ELISA*-c. Dvadeset dva klona koji su dali najjači signal podvrgnuti su DNA sekvencioniranju, te su dalje ispitivani. Nakon četvrtog kruga pretraživanja, 48 klonova ispitivano je *ELISA*-om, te je određen slijed DNA u 10 klonova s najjačim *ELISA* signalom. Za knjižnicu lakih lanaca, nakon drugog kruga pretraživanja 48 klonova je ispitivano *ELISA*-om, a 17 s najjačim signalom je sekvencionirano. Nakon trećeg kruga, 20 klonova je ispitivano i 10 klonova s najvišim *ELISA* signalima je podvrgnuto DNA sekvencioniranju. Kako bi se fagi oslobodili od pojedinačnih klonova, jednostruke kolonije uzete su s konačne pretraživane titrirane ploče i inokulirane u 150 µL 2xYT s 2% glukoze i 100 µg/mL ampicilina na pločici za kulturu s 96 jažica. Pločica je inkubirana na 37°C, 150 RPM. Nakon 3 sata, 20 µL kulture prenešeno je u jažice druge pločice koje su sadržavale 100 µL 2xYT s 2% glukozom i 100 µg/mL ampicilina s 1x10⁸ M13KO7 pomagačkog faga, te inkubirano 2 sata. Kulture su istaložene i resuspendirane u svježem 2xYT s ampicilinom i kanamicinom, te uzgajane 16 sati. Stanice su istaložene, te je 50 do 100 µL supernatanata koji su sadržavali fage testirano *ELISA*-om. Fagna *ELISA* učinjena je kako je opisano (Lorimer *i sur.*, *Proc. Natl. Acad. Sci SAD* 93:14185-14820 (1996)) osim što je uporabljeno 100 µL 3,3', 5,5'-tetrametil benzidina (BM blue, Boehringer Mannheim) kao supstrat za određivanje. Nakon što se razvila plava/zelena boja, 100 µL 2 M H₂SO₄ dodano je kako bi se zaustavilo razvijanje boje. Apsorpcija je mjerena na 450 nm.

Sekvencioniranje DNA.

Sekvencioniranje DNA izvedeno je uporabom PE Applied Biosystems (Foster City, CA) Rhodamine Terminator Cycle Sequencing kita. Uzorci su obrađivani i ispitivani na PE Applied Biosystems Model 310 automatiziranom sekvenceru.

Stvaranje scFv imunotoksinskog plazmida, ekspresija i pročišćavanje.

ScFv iz odabranih fagemidnih klonova umnoženi su *PCR*-om uporabom početnica koje su uvele NdeI i HindIII restrikcijska mjesta. Proizvodi su tada pocijepani i klonirani u T7 temeljeni ekspresijski vektor u kojem je scFv spojen s krnjim mutiranim oblikom egzotoksina A *Pseudomonasa*. Plazmidi su transformirani u ekspresijski domaćin BL21 (λDE3). MR1 mutantni imunotoksini ekspimirani su i pripravljeni kao što je prethodno opisano (Buchner *i sur.*, *Anal. Biochem.* 205:263-270 (1992)).

Površinska rezonanca plazmona.

Kinetike vezanja mjerene su uporabom BIAcore 2000 Biosensor (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). Streptavidin je vezan na CMS gradiрани senzorski čip za istraživanje uporabom amin vežućeg reagenasa osiguranih od BIAcore. Biotinizirani EGFRvIII peptid vezan je na streptavidin ubrizgavanjem 10 µL 10 nM otopine peptida preko čipa. Imunotoksini su razrijeđeni na 25 µg/mL u fiziološkoj otopini puferiranoj hepesom (HBS od engl. *hepes buffered saline*). Brzine su mjerene ubrizgavanjem 50 µL razrijeđenog imunotoksina preko površine čipa, 10 µL/minuti, te puštanjem da se vezana tvar diasocira tijekom 5 minuta ili više. Preostala vezana tvar uklonjena je s EGFRvIII peptida ubrizgavanjem 5 µL 100 mM fosforne kiseline. Kinetike vezanja ispitivane su uporabom BIAevaluation 2.1 softvera.

Stanična kultura i testovi citotoksičnosti.

NR6M stanice kultivirane su u DMEM uz 10% fetalnog govedeg seruma nadopunjenog sa 750 µg/mL G418. Testovi citotoksičnosti mjerili su inhibiciju ugradnje [³H]-leucina kako je prethodno opisano (Prior *i sur.*, *Cell* 64:1017-1023, 1991).

5 Bakterije i stanične linije.

E. coli TG1; K12Δ (lac-pro), supE, thi, hsd Δ 5/F'[traD36, proAB, lacI^q, lacZ Δ M15]. *E. coli* BL21(λDE3); F⁺ *ompT*[lon] *hsdS_B* (r_B⁻ m_B⁻; *E. coli* B soj) s DE3, λ profagom koji nosi gen za T7 RNA polimerazu. NR6 je Swiss 3T3 inačica mišje fibroblastne stanične linije bez mjerljivog EGFR. NR6M je NR6 stanična linija transficirana s cDNA za mutantni EGFRvIII receptor pod kontrolom β-aktinskog promotora. Podrijetlo NR6 i NR6M prethodno je opisano (Lorimer *i sur.*, *Clin. Cancer. Res.* 1:859-864 (1995)).

Primjer 3

Stvaranje V_HCDR3 knjižnice.

Kako bi se povisio afinitet MR1(Fv) i aktivnost odgovarajućeg imunotoksina MR1(FV)-PE38, mutirali smo V_HCDR3 i V_LCDR3 jer ovi dijelovi protutijela čine značajne kontakte s antigenom (MacCallum *i sur.*, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996)). Prvih devet od jedanaest aminokiselina V_HCDR3 prikazani su u Tablici 5 (zadnje dvije, D101 i Y102 isključene su jer se smatra da one najvjerojatnije ne doprinose vezanju antigena). S obzirom da bi potpuna knjižnica u kojoj je devet aminokiselinskih ostataka nasumično mutirano zahtijevala više od 5x10¹¹ pojedinačnih klonova, umjesto toga pripremili smo tri različite knjižnice koje su pokrivala ostatke 95-97, 98-100 i 101A-101C kako je i opisano u Primjeru 1. Knjižnica H-CDR3 95-97 sadržavala je 1.6 x 10⁶ klonova, knjižnica H-CDR3 98-100 sadržavala je 4 x 10⁵ klonova, a knjižnica H-CDR3, 100A-100C sadržavala je 1 x 10⁶ klonova. Kako bi bili sigurni da su knjižnice ispravno napravljene, pet klonova iz svake knjižnice je sekvencionirano. Kao što je i očekivano, svaki klon je imao različite kombinacije aminokiselina u području u kojem su mutacije bile usmjerene. S obzirom da potpuno različita knjižnica u kojoj su nasumično mutirane 3 aminokiseline zahtijeva samo 8 x 10³ pojedinačnih klonova, veličina knjižnice osigurava da su svi mogući DNA slijedovi dobro zastupljeni.

Pretraživanje V_HCDR3 knjižnice i ispitivanje odabranih klonova.

S obzirom da je konačna namjena poboljšanih MR1 mutanti usmjeravanje toksina u EGFRvIII-pozitivne stanice raka, uporabili smo EGFRvIII pozitivne NR6M stanice za pretraživanje. Pretraživanje je učinjeno u prisustvu imunotoksina MR1(Fv)-PE38, za koji se očekivalo da djeluje kao kompetitor u odabiru divljeg tipa MR1 Fv u knjižnici. Oslobođeni su fagi iz svake knjižnice, te su ujedinjene jednake količine faga (1 x 10⁹) iz svake knjižnice čime je započet prvi krug pretraživanja. Eluirani fagi su titirani i oslobođeni za slijedeći krug pretraživanja. Naredna pretraživanja učinjena su bez određivanja titra oslobođenih faga sve do nakon provedenog pretraživanja. Ovo je učinjeno kako bi se uštedilo vrijeme, te kako bi se smanjila mogućnost gubitka nestabilnih vezača tijekom 24 sata potrebnih za titriranje oslobođenih faga. Uobičajeno oslobađanja su proizvela 1 x 10¹² cfu/mL. Tablica 3 sažima broj zadržanih faga za vrijeme svakog od 4 kruga pretraživanja. Obogaćenje je doseglo vrhunac u trećem krugu, te se smanjilo u četvrtom krugu.

Početno smo ispitivali fage odabrane nakon četvrtog kruga pretraživanja. Četrdeset osam klonova ispitivano je na vezanje u fagnoj *ELISA*, te je određen slijed DNA deset klonova s najjačim signalom. Kao što je prikazano u Tablici 6, jedine ponovno dobivene mutacije bile su na mjestima 98 i 99. Ispitivanje slijeda DNA pokazalo je da klonovi pripadaju u pet različitih skupina: prvotna S98-T99; i mutante P98-N99; P98-Y99; P98-F99 i P98-W99. Također smo ispitivali fage odabrane nakon trećeg kruga kako bi vidjeli da li su dobri vezači izgubljeni između 3. i 4. kruga. Ispitivali smo 48 pojedinačnih klonova na vezanje za EGFRvIII peptid *ELISA*-om, te je 22 od njih koji su dali najjači signal podvrgnuto DNA sekvencioniranju. Ponovno, jedine ponovno dobivene mutacije bile su na mjestima 98 i 99 (Tablica 6). Različite aminokiseline su ponovno dobivene na ovim mjestima. Najučestalije su bile S98-T99 (divlji tip) zatim P98-S99; P98-Y99; P98-N99 i A98-D99. Četvrti krug pretraživanja rezultirao je obogaćenjem klonovima P98-N99 i P98-Y99 više od divljeg tipa (S98-T99), gubitkom nekoliko klonova, te također stvaranjem novog klona koji je sadržavao P98-F99.

Citotoksičnost i afinitet V_HCDR3 mutanti.

Svaka od 12 mutanti dobivenih pretraživanjem MR1 V_HCDR3 knjižnice uporabljena je u pravljenju imunotoksina. Svaki imunotoksin stvoren je *PCR* umnožavanjem Fv-ova iz fagnog prezentirajućeg vektora i njihovim subkloniranjem u imunotoksinški ekspresijski vektor. Svi su imunotoksini (osim koji je sadržavao A98-D99 mutaciju u V_HCDR3) izrazito pročišćeni do više od 90-95% homogenosti. Pročišćeni imunotoksini uporabljeni su u određivanju njihove citotoksičnosti na NR6M stanicama. Afiniteti vezanja mjereni su Biacore postupkom koji rabi ili peptid imobiliziran na čip (ili mutirani oblik izvanstanične domene EGFR pričvršćene na čip). Rezultati jedne skupine pokusa prikazani su u Tablici 6; u usporedbi s prvotnim klonom (S98-T99) koji je imao IC₅₀ od 8 ng/mL, bilo je šest klonova koji su bili citotoksičniji. To su P98-Y99 koji je imao IC₅₀ od 3.5 ng/mL, zatim P98-N99, P98-W99, P98-I99 koji su imali IC₅₀ od

4.5 ng, P98-F99 s IC_{50} od 6 ng/mL i P98-V99 s IC_{50} od 6.5 ng/mL. Četiri klona, P98-S99, W98-F99, S98-W99 i P98-T99 imali su IC_{50} jednake prvotnom klonu.

Stvaranje V_L CDR3 knjižnice.

Sve ponovno dobivene mutacije nakon pretraživanja V_L CDR3 knjižnica bile su smještene na mjestima 98 i 99. Slijed DNA ovih dvaju ostataka sačinjava žarišno mjesto koje je područje koje podliježe mutacijama za vrijeme *in vivo* razvoja afiniteta protutijela. Uporabljena je mutanta s najvišom citotoksičnom aktivnošću iz V_H knjižnice i podvrgnuta mutagenezi usmjerenoj samo na žarišna mjesta u V_L CDR3. Slijed V_L CDR3 prikazan je u Tablici 3. Knjižnica je uvela nasumične mutacije u žarišnim mjestima koja kodiraju ostatke 91 i 92. V_L CDR3 fagna knjižnica stvorena je kako je opisano u Primjeru 1 i sadržavala je 3×10^5 klonova. S obzirom da je samo 400 klonova potrebno da bi se postigle sve aminokiselinske kombinacije na dva mjesta izabrana za mutaciju, može se pretpostaviti da su svi mogući DNA slijedovi bili zastupljeni u ovoj knjižnici.

Pretraživanje V_L CDR3 knjižnice i ispitivanje odabranih klonova.

Provedena su tri kruga pretraživanja, a fagi zadržani kod svakog koraka prikazani su u Tablici 3. Za ovu knjižnicu dobili smo veće obogaćenje u drugom krugu pretraživanja nego u trećem krugu. Nakon drugog kruga pretraživanja 48 pojedinačnih klonova je oslobođeno, vezanje na peptid mjereno je *ELISA*-om, te je određen slijed DNA od sedamnaest klonova koji su dali najjači signal. Kako je prikazano u Tablici 7, dobiveno je pet različitih mutanti. Svi su zadržali divlji tip serinskog ostatka na mjestu 91 i imali mutacije na 92. ostatku. Najučestaliji je bio F92W (6 od 17), zatim F92R (3 od 17), F92S (2 od 17), F92L (1 od 17) i F92M (1 od 17). Od njih 17 ispitivanih, za 4 je utvrđeno da su prvotnog tipa.

Također su ispitivana svojstva klonova izdvojenih nakon trećeg kruga pretraživanja (Tablica 7). Nasumično je odabrano dvadeset klonova, oslobođeni su fagi, te su provjeravani na vezanje za peptid *ELISA*-om. Deset klonova koji su dali najjači signal izabrano je za ispitivanje DNA slijeda. DNA slijed je pokazao da su bila prisutna 3 različita klona, svi koji su bili zastupljeni u 3 krugu. Osim jednog prvotnog klona, ti su klonovi bili F92S (7 od 10), F92W (1 od 10) i F92R (1 od 10). Nisu pronađene nove mutante, te nismo pronašli F92L i F92M mutante.

Citotoksičnost i vežuća svojstva V_L CDR3 mutanti.

Različiti dobiveni Fv-i uporabljeni su kako bi se proizveli imunotoksini, a njihove citotoksične aktivnosti i vežući afiniteti mjereni su uporabom pročišćenih rekombiniranih proteina. Samo jedna mutanta, F92W je dala imunotoksin veće aktivnosti nego što je bio prvotni. Njezin IC_{50} bio je 1.3 ng/mL u usporedbi s 3.5 ng/mL prvotnog (Tablica 7). Druge mutante imale su niže aktivnosti. Podaci u Tablici 7 također pokazuju da je F92W imao veći afinitet (K_d 3 nM) nego prvotni klon F92 (K_d 6 nM). Jedna druga mutanta, F92L, imala je blago povišen afinitet (K_d 4 nM), ali ne i porast u citotoksičnosti. Slika 2 prikazuje BIAcore senzorogram na kojem su uspoređena vežuća svojstva prvotnog klona s najaktivnijim imunotoksinom proizvedenim iz Fv koji je dobiven iz V_H CDR3 knjižnice (V_H S98P-T99Y) i najaktivnijim klonom dobivenim iz V_L CDR3 knjižnice (V_H S98P-T99Y- V_L F92W), koji je sada nazvan MR1-1. Slika prikazuje da dvije mutante imaju manju brzinu disocijacije nego prvotni Fv. Ispitivanje imunotoksina (MR1-1-(Fv)-PE38) s obe V_H i V_L mutacije pokazalo je da je imao pad u k_{off} i blagi porast u k_{on} rezultirajući s K_d od 3 nM.

Tablica 4 prikazuje dva pokusa u kojima su citotoksične aktivnosti MR1(Fv)-PE38 uspoređivane s dvije poboljšane inačice: MR1(Fv)(V_H S98P-T99Y)-PE38 i MR1-1(Fv)-PE38. U oba je pokusa MR1(Fv)-PE38 bio najmanje aktivan, a MR1-1(Fv)-PE38 najaktivniji.

Primjer 4

Prinos imunotoksina.

Značajan porast u prinosu različitih mutiranih imunotoksina zamijećen je za vrijeme postupka pročišćavanja. Nakon ponovnog smatanja, proteini su dijalizirani i kromatografski pročišćeni (Buchner *i sur.*, *Anal. Biochem.* 205:263-270 (1992)). Protein je prvo serijski pročišćen na Q-Sepharose anionskoj izmjenjskoj smoli koja uklanja grube proteinske agregate, nukleinske kiseline i druga onečišćenja. Dalje se eluirani protein nanosi na MonoQ kolonu, te se proteini eluiraju stalnim gradijentom 0-0.3 M NaCl. Ovaj korak uklanja manje agregate. Ispravno smotan monomerni imunotoksin eluira se s MonoQ kod svojstvene koncentracije NaCl od 280 mM. Čistoća skupljenih MonoQ frakcija potvrđena je uočavanjem jednog monomernog vrha eluiranog s TSK G3000SW ekskluzijske kolone, te SDS-PAGE-om. Prinos svakog mutiranog imunotoksina MR1(Fv)-PE38 izračunat je na temelju količine proteina skupljenog iz vršnih MonoQ frakcija i prisutnosti jednog vrha na ekskluzijskom kromatogramu na osnovu veličine (TSK 3000). Tablice 6 i 7 prikazuju prinose kada je 100 mg inkluzijskog tjelesnog proteina podvrgnuto pročišćavanju. Očito je da je prinos imunotoksina u velikoj mjeri pod utjecajem mutacija u CDR-ovima, te je povećan od 2% s prvotnim MR1(Fv)-PE38 do 10-17% s mnogim mutantama.

Primjer 5

EGFRvIII unutarlubanjski tumori potaknuti su u atimičnih štakora ubrizgavanjem 10^5 U87MG.ΔEGFRvIII stanica (stanična linija humanog glioblastoma stvorena transficiranjem U87MG stanica s EGFRvIII, vidjeti, Nishikawa *i sur.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (SAD)* 91:7727-7730 (1994)) kroz kateter smješten 1 mm ispred i 4 mm bočno od bregme. Tumori su tretirani infuzijom MR1-1-PE38 imunotoksina ili kontrolne fiziološke otopine kroz kateter izravno u tumor. Imunotoksin je primijenjivan u dozama od 2 ili 6 μg u 200 μL fiziološke otopine puferirane fosfatom ("PBS") s 0.2% humanog serumskog albumina ("HSA") tijekom 7 dana, uporabom Alzet® 2Ml osmotske pumpe (Durect Corp., Cupertino, CA), na kontrolnim životinjama primijenjivano je 200 μL PBS-HSA otopine. Liječenje je započeto 3 dana nakon tumorskog ucjepljivanja. Kako je prikazano na Slici 3, sve životinje koje su primale kontrolnu fiziološku otopinu bile su mrtve do 20 dana. Deset posto životinja koje su primale 6 μg doze još je bilo živo do 160 dana. Preko trideset posto životinja tretiranih s 2 μg doze još je bilo živo do 160 dana. Razlika u preživljenju između 2 μg i 6 μg doze ukazuje da u unutarlubanjskom okruženju, koncentracija imunotoksina od 6 μg može biti dovoljno visoka prouzrokujući znatnu nespecifičnu toksičnost moždanom tkivu koje je bilo smanjeno ili nije bilo prisutno kod doze od 2 μg, ali kod obe doze imunotoksin je produžio preživljenje.

Primjer 6

EGFRvIII unutarlubanjski tumori potaknuti su u atimičnih štakora ubrizgavanjem 10^5 U87MG.ΔEGFRvIII stanica kroz kateter smješten 1 mm ispred i 4 mm bočno od bregme. Tumori su tretirani infuzijom MR1-1-PE38 imunotoksina ili kontrolne fiziološke otopine kroz kateter izravno u tumor. Imunotoksin (0.2, 0.6 i 2.0 μg) je dostavljan u 200 μL PBS-a s HSA-om tijekom 7 dana uporabom Alzet® osmotske pumpe kao što je opisano u prethodnom Primjeru. Liječenje je započeto 3 dana nakon tumorskog ucjepljivanja.

Kao što je prikazano na Slici 4, samo je nekih deset posto životinja koje su dobivale 0.2 ili 0.6 μg doze imunotoksina preživjelo protekli 25 dan, dok je preživjelo oko 22% životinja koje su primale kontrolnu fiziološku otopinu. Nasuprot tomu, od životinja koje su primale 2 μg doze, oko 55% je preživjelo, što je dvostrukro veći postotak preživljenja nego u životinja koje su primale kontrolnu fiziološku otopinu. Rezultati upućuju da su doze od 0.2 i 0.6 μg preniske da bi utjecale na preživljenje, dok je 2.0 μg imunotoksina značajno produžilo preživljenje.

Primjer 7

EGFRvIII neoplastični meningitis potaknut je u atimičnih štakora ubrizgavanjem 5×10^6 U87MG.ΔEGFRvIII stanica u 40 μL PBS-HSA otopine kroz unutrašnji intratekalni kateter. Liječenje svih životinja koje su nosile tumor započelo je 3 dana nakon ucjepljivanja tumora. MR1-1-PE38 imunotoksin dan je u 40 μL PBS-HSA 3., 5. i 7. dan nakon tumorske inicijacije. Na kontrolnim životinjama primijenjivano je 40 μL PBS-HSA u iste dane.

Kao što je prikazano na Slici 5, sve životinje koje su primale kontrolnu fiziološku otopinu bile su mrtve do 10. dana. Nasuprot tomu, sve životinje koje su primale imunotoksin imale su produženo preživljenje najmanje do 14. dana, s 30% životinja koje su primale 1 μg doze, te 50% životinja koje su primale 2 μg doze preživjele su do 60. dana.

Primjer 8

Tumori su potaknuti u atimičnih miševa ubrizgavanjem 50 μL U87MG.ΔEGFRvIII tumorskog staničnog homogenata sedam dana prije početka liječenja (početak liječenja je označen kao "0" za ovo ispitivanje). Tumori su tretirani s tri 20 μL intratumorska bolusna ubrizgavanja MR1-1-PE38 imunotoksina u dozama 1, 2 ili 3 μg ili kontrolne fiziološke otopine (otopina PSA-HSA opisana u prethodnim Primjerima) na 0., 2., i 4. dan. Tumori su imali prosječni volumen od 600 mm³ na početku liječenja 0. dana.

Kao što je prikazano na Slici 6, veličina tumora životinja koje su obrađivane s bilo kojom dozom imunotoksina ostale su približno iste kao što je izmjereno 2. dan nakon prvog tretmana, učinkovito zaustavljajući rast tumora. Nasuprot tomu, kod životinja koje su tretirane samo s kontrolnom fiziološkom otopinom pokazano je brzo povećanje tumorske mase, s povećanjem tumorskog volumena do 7500 mm³ 7. dana.

Sve publikacije i patentni spomenuti u ovoj specifikaciji obuhvaćeni su ovdje referencom u specifikaciji u istoj mjeri kao što su svaka pojedinačna publikacija ili patent specifično i pojedinačno zahtijevani da budu ovdje obuhvaćeni referencom.

Tablica 3

Obogaćivanje faga tijekom pretraživanja

ciklus pretraživanja	ulaz faga	ispiranje faga
V_H CDR3		
1	3×10^9	1.5×10^5
2	3×10^{11}	1.0×10^6
3	5×10^{11}	1.5×10^8
4	5×10^{11}	2.0×10^7
V_L CDR3		
1	1×10^{10}	2.4×10^5
2	1×10^{10}	5.5×10^6
3	1×10^{10}	2.0×10^7

Tablica 4

imunotoksin	pokus 1	pokus 2
MR1(Fv)-PE38	IC ₅₀	IC ₅₀
MR1(Fv)(V _H S98P-T99Y)-PE38	9.2±2.1	6.6±.2
MR1-1(Fv)-PE38	6.0±.39	4.6±.7
	2.6±6.2	2.0±1

Usporedba citotoksične aktivnosti MR1(Fv)-PE38 s dvama mutantima uvećanog afiniteta za EGFRvIII. Vrijednosti IC₅₀ izračunate su iz testova uz pomoć različitih količina imunotoksina. Vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost ±S.D. P vrijednosti su <.01 pri usporedbi MR1(Fv)-PE38 i MR1-1(Fv)-PE38, te MR1(Fv)(V_HS98P-T99Y)-PE38 i MR1-1(Fv)-PE38 u pokusu 1, te pri usporedbi MR1(Fv)-PE38 i MR1(Fv)(V_HS98P-T99Y)-PE38 i MR1(Fv)(V_HS98P-T99Y)-PE38 i MR1-1(Fv)-PE38 u pokusu 2.

Tablica 5

DNA i aminokiselinski slijed teškog lanca CDR3 i lakog lanca CDR3 MR1 Fv*

MR1 CDR3H	GGC	TAT	TCT	AGT	ACC	TCT	TAT	GCT	ATG
položaj	G	Y	S	S	T	S	Y	A	M
	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C
MR1 CDR3L	TTG	CAA	AGT	TTT	AAC	GTG	CCT	CTT	ACA
položaj	L	Q	S	F	N	V	P	L	T
	89	90	91	92	93	94	95	96	97

*Hot spots koje imaju slijed Pu G Py A/T su potcrtane.

Tablica 6

Slijedovi i svojstva mutantnog faga izolirani iz knjižnice teškog lanca CDR3, te imunotoksina pripremljenog s mutantnim scFv-ovima

položaj	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	# od 22	IC50 ng/mL	KD nM	prinos %
izvorne	G	Y	S	S	T	S	Y	A	M		8.0	8.0	2.0
aminokis.													
ostaci u 3.				S	T*					5	8.0	8.0	2.0
krugu				P	S					4	8.0	N.O.	17.5
				P	Y					3	3.5	6.0	7.0
				P	N					2	4.5	11.0	10.0
				P	W					2	4.5	4.0	10.0
				A	D**					2	N.O.	N.O.	N.O.
				P	I					1	4.5	5.0	10.0
				W	F					1	8.0	N.O.	10.0
				P	V					1	6.5	N.O.	7.0
					W					1	8.0	N.O.	5.0
				P						1	8.0	8.0	?
										# od 10			
ostaci u 4.				S	T*					1	8.0	8.0	2.0
krugu													

P	N	3	4.5	11.0	10.0
P	Y	3	3.5	6.0	7.0
P	F	2	6.0	20.0	3.0
P	W	1	4.5	4.0	10.0

* divlji tip

** imunotoksin nije pripravljen

5 Tablica 7

Slijedovi i svojstva mutantnog faga izolirani iz knjižnice lakog lanca CDR3, te imunotoksina pripravljenog s mutantnim scFv-ovima

položaj	89	90	91	92	93	94	95	96	97	# od 17	IC50 ng/mL	KD nM	prinos %
izvorne aminokis.	L	Q	S	F	N	V	P	L	T		3.5	6	7
ostaci u 2. krugu			S	F						4	3.5	6	7
			S	W						6	1.3	3	7
			S	R						3	6.0	9	8
			S	S						2	15.0	22	16
			S	L						1	5.5	4	8
			S	M						1	9.0	6	2
										# od 10			
			S	F							3.5	6	7
ostaci u 3. krugu										1			
			S	S						7	15.0	22	16
			S	W						1	1.3	3	7
			S	R						1	6.0	9	8

10

PATENTNI ZAHTJEVI

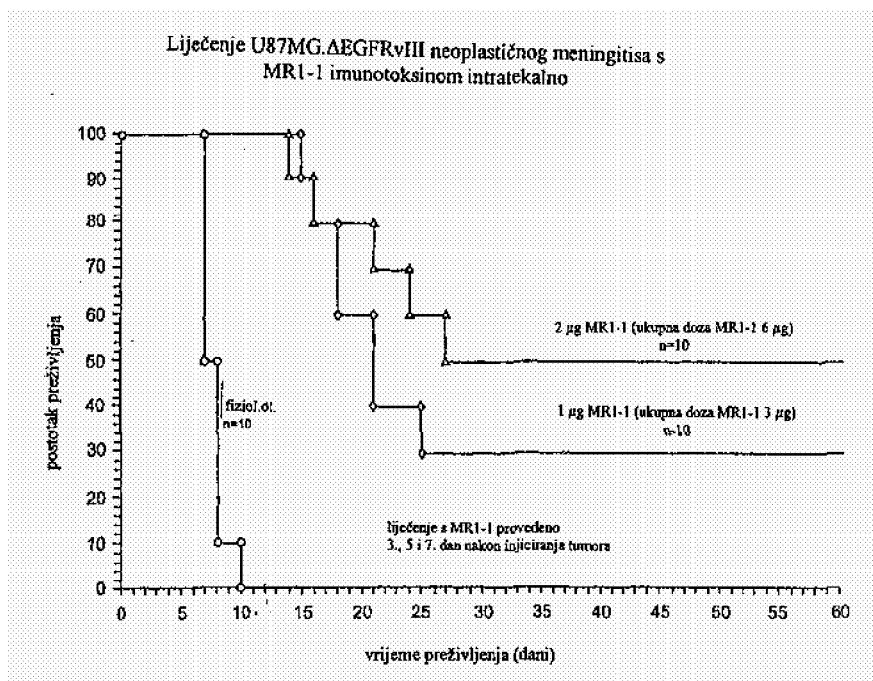
1. Polipeptid, **naznačen time**, što sadrži mutirano varijabilno (V_H) područje teškog lanca ili mutirano varijabilno područje lakog lanca (V_L), a taj polipeptid ima K_d za EGFRvIII 7 nM ili nižu, mutirani V_H ili mutirani V_L imaju slijed koji se razlikuje od roditeljskog V_H odnosno V_L u MR1 protutijelu, po aminokiselinskoj izmjeni najmanje jedne aminokiseline u području koje određuje komplementarnost (CDR), a aminokiselinu kodira kodon koji sadrži nukleotid koji pripada "hot spot" slogu odabranom između AGY ili RGYW, u kojem je R jednako A ili G, Y jednako C ili T, a W jednako A ili T.
2. Polipeptid iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što se zamjena dešava u CDR3 varijabilnog područja teškog lanca.
3. Polipeptid iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što se zamjena dešava u CDR3 varijabilnog područja lakog lanca.
4. Polipeptid iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što se zamjena dešava u CDR1 ili CDR2 varijabilnog područja lakog lanca.
5. Polipeptid iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što se zamjena dešava u CDR1 ili CDR2 varijabilnog područja teškog lanca.
6. Polipeptid iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što su oba lanca, V_H i V_L , mutirani aminokiselinskom zamjenom najmanje jedne aminokiseline u CDR.
7. Polipeptid iz zahtjeva 2, **naznačen time**, što mutirani V_H ima slijed koji se razlikuje od MR1 protutijela po aminokiselinskoj zamjeni najmanje jedne aminokiseline odabrane iz skupine koja se sastoji od S98 i T99.
8. Polipeptid iz zahtjeva 7, **naznačen time**, što su zamjene odabrane iz skupine koja se sastoji od P98-Y99, P98-N99, P98-W99, P98-I99, P98-F99 i P98-V99.
9. Polipeptid iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što je spomenuti polipeptid scFv.
10. Polipeptid iz zahtjeva 7, **naznačen time**, što je spomenuti polipeptid scFv.
11. Polipeptid iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što je spomenuti polipeptid dsFv, Fab ili $F(ab')_2$.
12. Polipeptid iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što su zamjene u teškom lancu S98P-T99Y, a zamjena u lakom lancu je F92W (MR1-1).
13. Polipeptid iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što dalje sadrži djelatnu molekulu, terapijski dio ili vidljivi biljeg.
14. Polipeptid iz zahtjeva 13, **naznačen time**, što je terapijski dio toksični dio.
15. Polipeptid iz zahtjeva 14, **naznačen time**, što je toksični dio egzotoksin pseudomonasa ili njegov citotoksični ulomak.
16. Polipeptid iz zahtjeva 14, **naznačen time**, što je toksični dio citotoksični ulomak, a to je PE38.
17. Polipeptid iz zahtjeva 15, **naznačen time**, što spomenuti polipeptid ima IC_{50} 7 ng/mL ili nižu.
18. Polipeptid iz zahtjeva 15, **naznačen time**, što spomenuti polipeptid ima IC_{50} 5 ng/mL ili nižu.
19. Polipeptid iz zahtjeva 15, **naznačen time**, što spomenuti polipeptid ima IC_{50} od oko 3.5 ng/mL.

20. Polipeptid iz zahtjeva 15, **naznačen time**, što spomenuti polipeptid ima najmanje jednu aminokiselinsku zamjenu u V_H, pri čemu je spomenuta zamjena odabrana iz skupine koja se sastoji od: P98-S99, W98-V99, S98-W99 i P98-T99.
21. Polipeptid iz zahtjeva 15, **naznačen time**, što spomenuti polipeptid ima prinos od najmanje 3%.
- 5 22. Polipeptid iz zahtjeva 15, **naznačen time**, što spomenuti polipeptid ima prinos od oko 7%.
23. Polipeptid iz zahtjeva 14, **naznačen time**, što je toksični dio odabran iz skupine koja se sastoji od toksina difterije ili njegovog citotoksičnog ulomka, saporina ili njegovog citotoksičnog ulomka, protuvirusnog toksina kermesa ili njegovog citotoksičnog ulomka, ricina ili njegovog citotoksičnog ulomka i briodina 1 ili njegovog citotoksičnog ulomka.
- 10 24. Polipeptid iz zahtjeva 15, **naznačen time**, što su zamjene u teškom lancu S98P-T99Y, a zamjena u lakom lancu je F92W (MR1-1).
25. Polipeptid iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što dalje sadrži površinski protein bakteriofaga.
26. Molekula nukleinske kiseline, **naznačena time**, što sadrži nukleotidni slijed koji kodira polipeptid koji sadrži mutirano varijabilno područje teškog lanca protutijela ili mutirano područje lakog lanca, polipeptid ima Kd za EGFRvIII 6 ili manje, polipeptid ima slijed koji se razlikuje od MR1 po aminokiselinskoj zamjeni barem jedne aminokiseline u području koje određuje komplementarnost (CDR), a aminokiselina je kodirana kodonom koji sadrži nukleotid koji pripada "hot spot" slogu odabranom između AGY ili RGYW, pri čemu je R jednako A ili G, Y jednako C ili T, a W jednako A ili T.
- 15 27. Molekula nukleinske kiseline iz zahtjeva 26, **naznačena time**, što polipeptid ima slijed koji se razlikuje od MR1 scFv po aminokiselinskoj zamjeni barem jedne aminokiseline u CDR1 ili CDR2 mutiranog varijabilnog područja teškog lanca ili mutiranog varijabilnog područja lakog lanca.
- 20 28. Molekula nukleinske kiseline iz zahtjeva 26, **naznačena time**, što polipeptid ima slijed koji se razlikuje od MR1 scFv po aminokiselinskoj zamjeni barem jedne aminokiseline odabrane između S98 i T99 V_H lanca CDR3 područja ili zamjeni F92 V_L CDR3 područja.
- 25 29. Molekula nukleinske kiseline iz zahtjeva 28, **naznačena time**, što su zamjene u V_H lancu odabrane između S98P-T99Y, S98P-T99W, S98P-T99I i S98P-T99V.
30. Molekula nukleinske kiseline iz zahtjeva 28, **naznačena time**, što su zamjene u teškom lancu S98P-T99Y, a zamjena u lakom lancu je F92W (MR1-1).
31. Molekula nukleinske kiseline iz zahtjeva 26, **naznačena time**, što je operabilno vezana za promotor.
- 30 32. Molekula nukleinske kiseline iz zahtjeva 27, **naznačena time**, što je operabilno vezana za promotor.
33. Molekula nukleinske kiseline iz zahtjeva 28, **naznačena time**, što je operabilno vezana za promotor.
34. Molekula nukleinske kiseline iz zahtjeva 29, **naznačena time**, što je operabilno vezana za promotor.
35. Molekula nukleinske kiseline iz zahtjeva 30, **naznačena time**, što je operabilno vezana za promotor.
36. Postupak za ubijanje stanica koje nose antigen, **naznačen time**, što obuhvaća dovođenje u dodir stanice s imunotoksinom koji sadrži toksični dio i ciljajući dio, ciljajući dio sadrži polipeptid s mutiranim varijabilnim područjem teškog lanca protutijela ili mutiranim područjem lakog lanca, polipeptid ima Kd za EGFRvIII 7 nM ili niže, polipeptid ima slijed koji se razlikuje od MR1 po zamjeni najmanje jedne aminokiseline u području koje određuje komplementarnost (CDR), aminokiselina je kodirana kodonom koji sadrži nukleotide koji pripadaju "hot spot" slogu odabranom između AGY ili RGYW, gdje je R jednako A ili G, Y jednako C ili T, a W jednako A ili T.
- 35 37. Postupak iz zahtjeva 36, **naznačen time**, što je najmanje jedna aminokiselina zamijenjena u CDR1 ili CDR2 mutiranog varijabilnog područja teškog lanca ili u CDR1 ili CDR2 mutiranog varijabilnog područja lakog lanca.
- 40 38. Postupak iz zahtjeva 36, **naznačen time**, što CDR3 mutirano varijabilno područje teškog lanca sadrži aminokiselinsku zamjenu odabranu iz skupine koja se sastoji od: P98-Y99, P98-N99, P98-W99, P98-I99, P98-F99 i P98-V99.
- 45 39. Postupak iz zahtjeva 36, **naznačen time**, što CDR3 mutirano varijabilno područje lakog lanca sadrži triptofan koji zamjenjuje fenilalanin na položaju 92.
40. Postupak iz zahtjeva 36, **naznačen time**, što je ciljajući dio MR1-1.
41. Postupak iz zahtjeva 36, **naznačen time**, što je stanica zloćudna stanica.
42. Postupak iz zahtjeva 36, **naznačen time**, što je zloćudna stanica stanica glioma.
- 50 43. Postupak iz zahtjeva 36, **naznačen time**, što je zloćudna stanica stanica karcinoma dojke.
44. Postupak iz zahtjeva 36, **naznačen time**, što je zloćudna stanica stanica karcinoma pluća.
45. Postupak iz zahtjeva 36, **naznačen time**, što je zloćudna stanica stanica karcinoma jajnika.

55

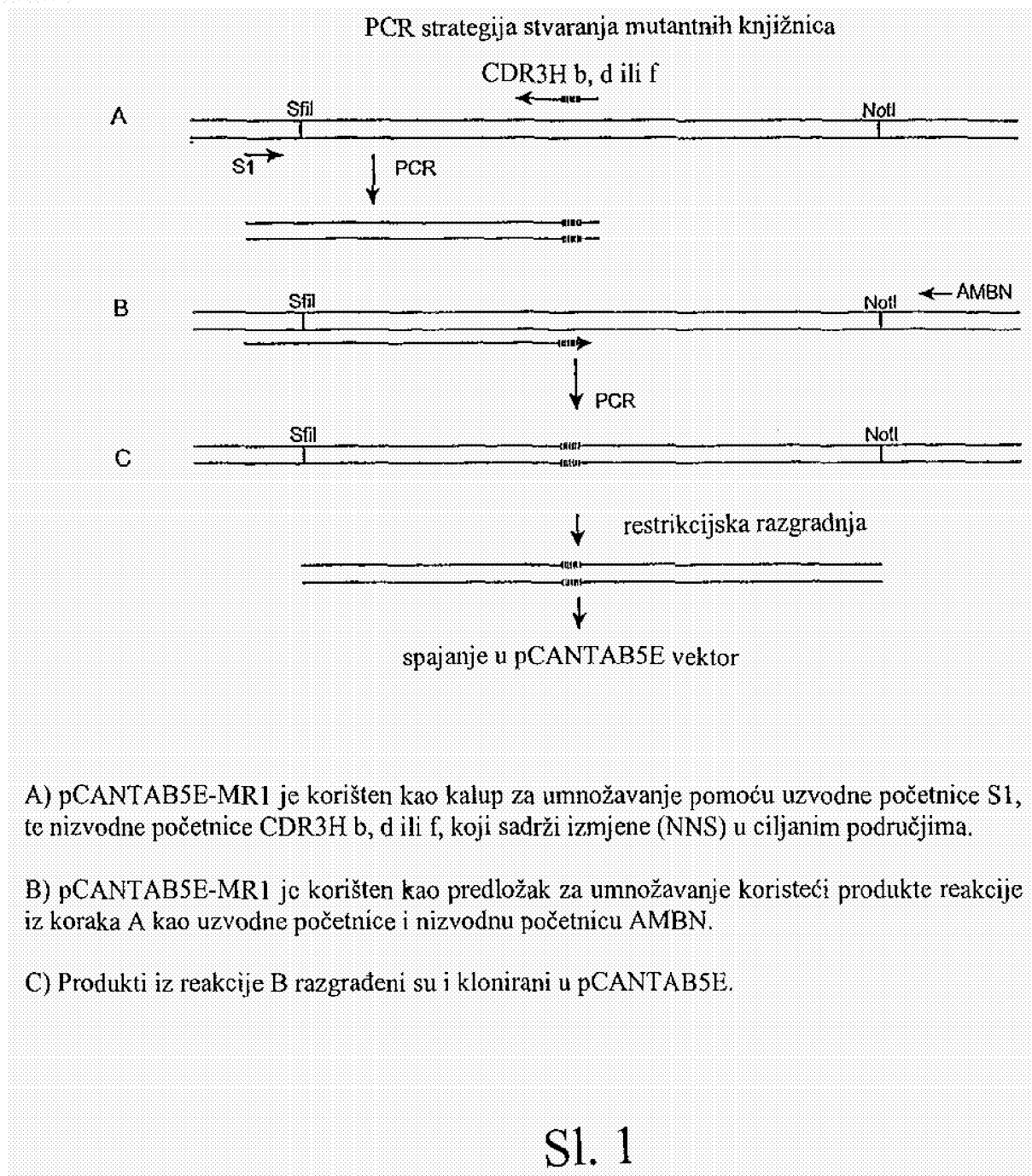
60

SAŽETAK

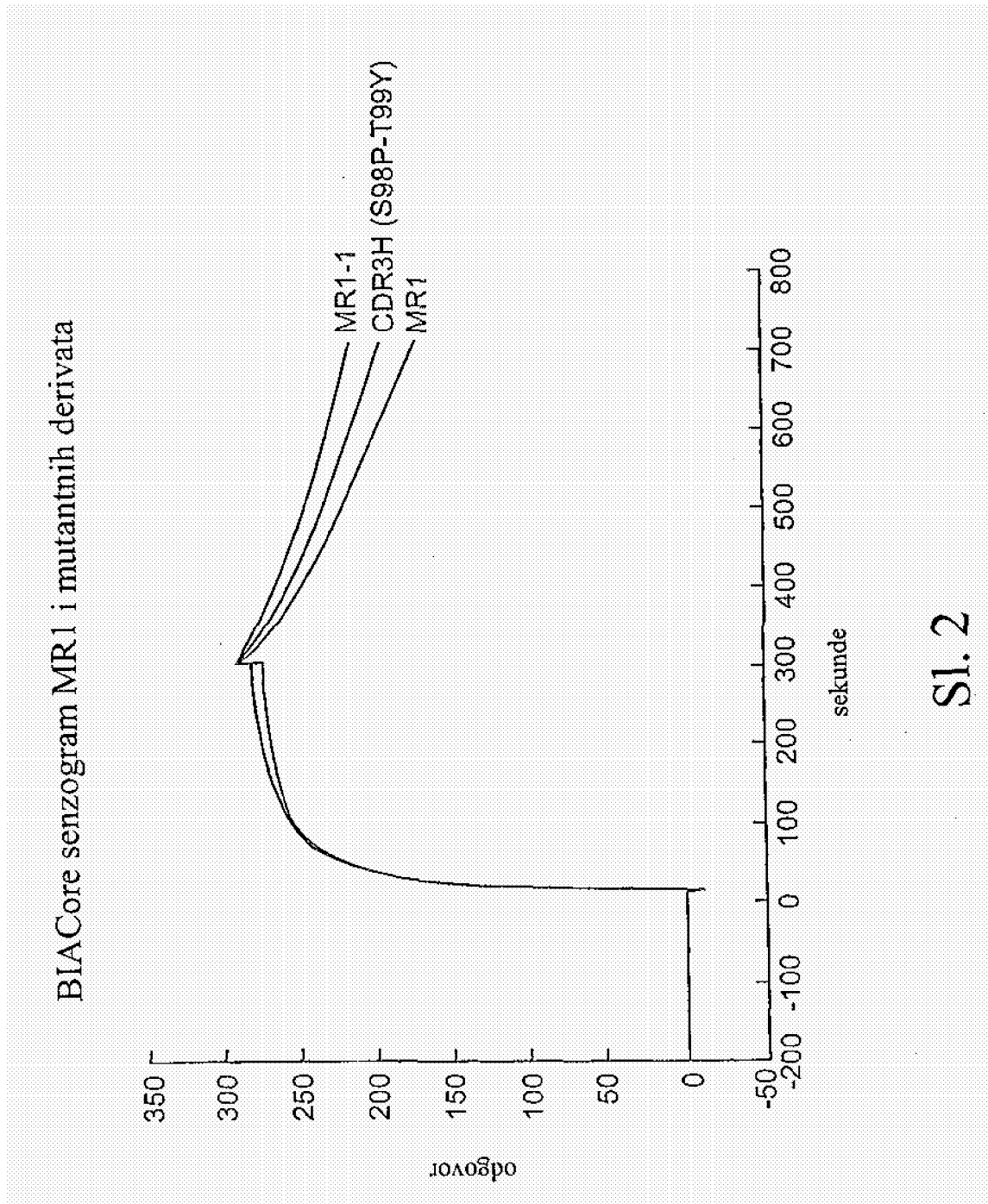


- 5 Izum opisuje protutijela za mutirani oblik receptora za epidermalni činitelj rasta poznat kao EGFRvIII. Ovaj se mutirani oblik nalazi isključivo ili primarno na površini stanica glioblastoma, te na stanicama karcinoma dojke, jajnika i ne-mikrocelularnog karcinoma pluća. Protutijela ovog izuma imaju višu sklonost za EGFRvIII i tvore imunotoksine s višom citotoksičnošću i prinosom od protutijela iz ranijih dostignuća, uključujući scFv označen kao MR1. Izum se posebice opisuje protutijelo, nazvano MR1-1, koje mutira MR1 u CDR3 VH i VL lanaca, čime nastaje protutijelo sa osobito dobrom citotoksičnošću. Izum opisuje i dodatna protutijela u kojima je MR1 mutiran u CDR1 i 2 VH i VL, ili oba, s boljim vezanjem na EGFRvIII u odnosu na roditeljsko MR1 protutijelo.
- 10

Slika 1

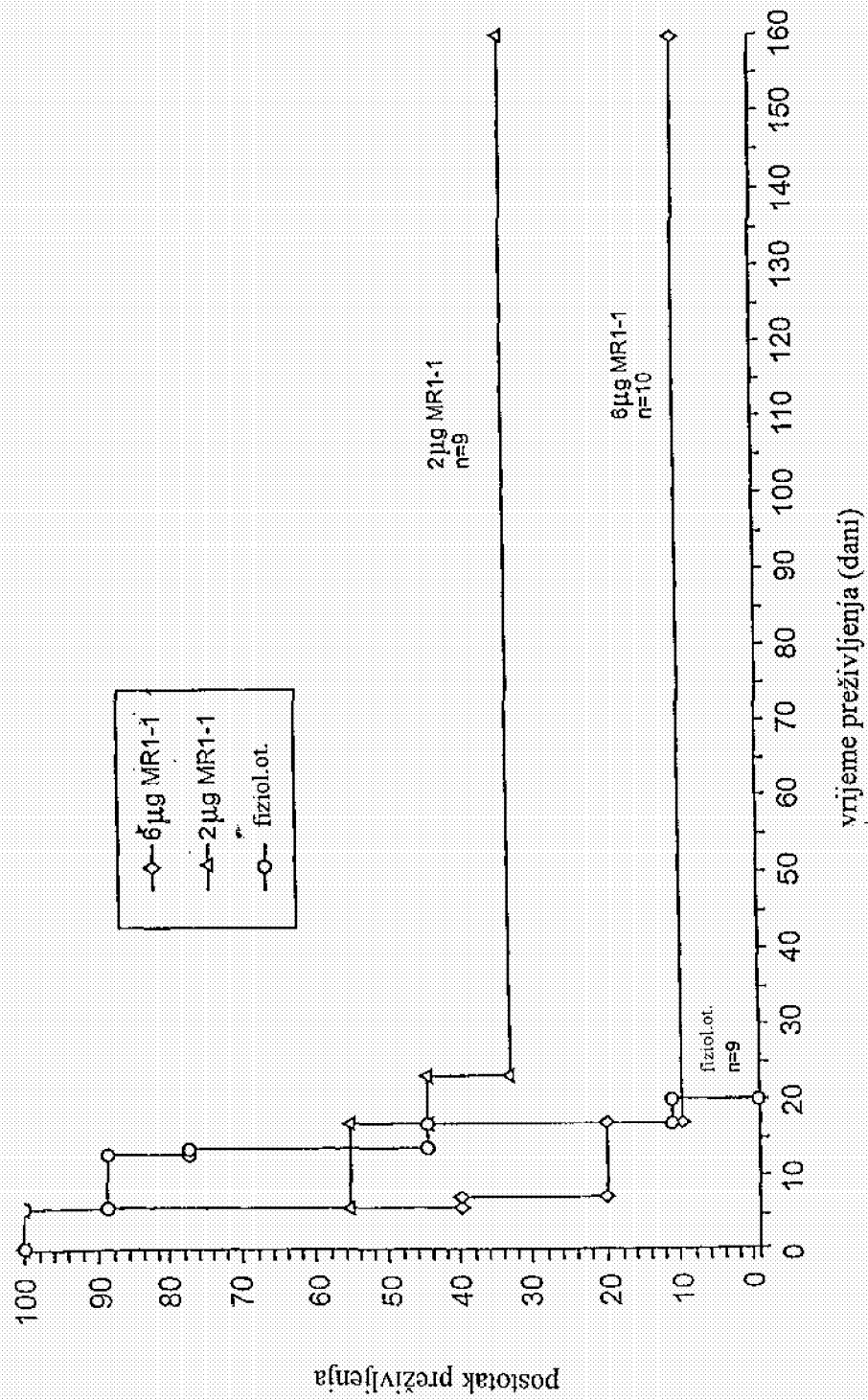


SLIKA 2



ATTKA 2

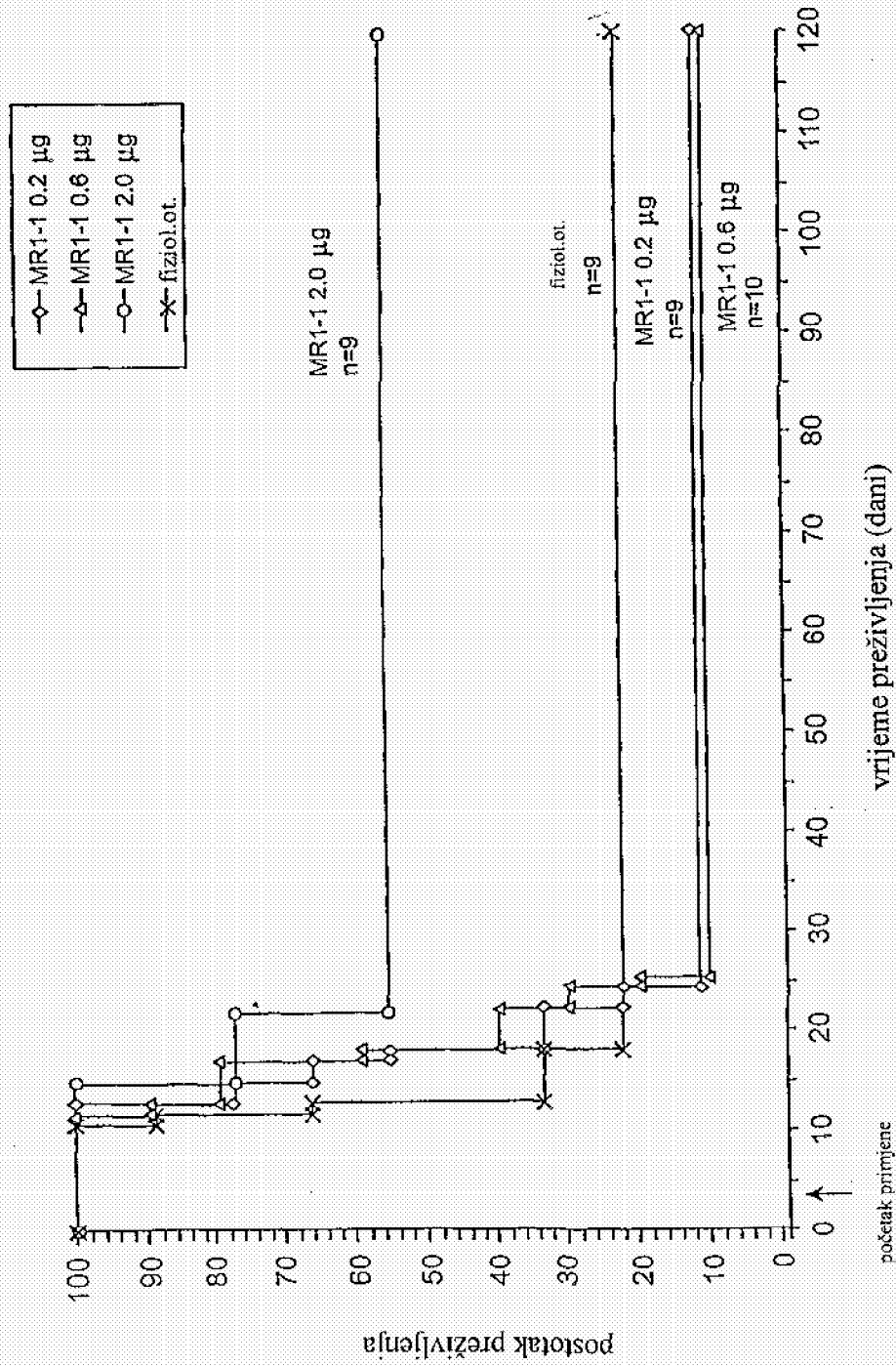
Liječenje U87MG. Δ EGFR^{III} intrakranijalnog tumora s 200 μ L
MR1-1 intratumorski u 24-satnoj infuziji



Sl. 3

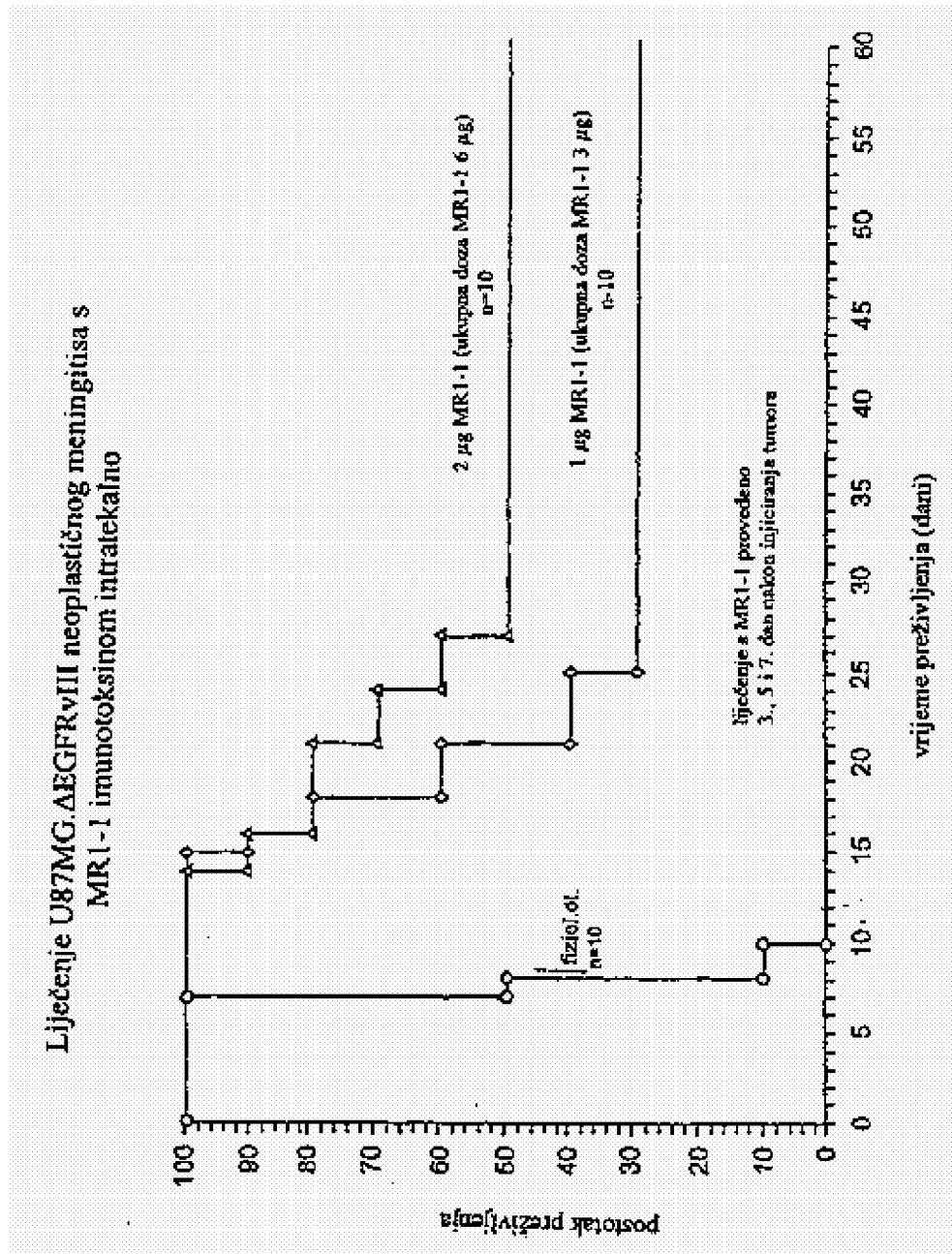
Slika 4

Liječenje intrakranijalnog U87MG.ΔEGFRvIII koji eksprimira EGFRvIII s 200 μ L MR1-1 intratumorski u 24-satnoj infuziji



Sl. 4

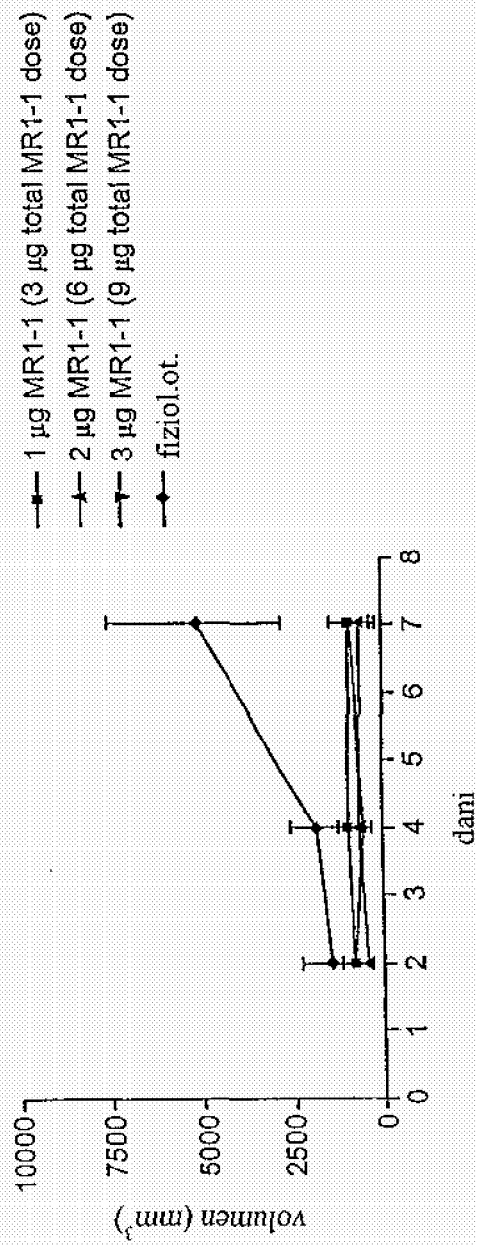
Slika 5



Sl. 5

Slika 6

Volumen U87MGEGFR^{vIII} tumora
liječnog intratekalnim injiciranjem MR1-1



miševi su tretirani 0, 2. i 4. dan s 20 µL MR1-1 u intramuralnim injiciranjem

S1. 6