



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 38 979 T2** 2008.12.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 970 227 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 38 979.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/05453**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 912 977.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/041641**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.03.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.09.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.01.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.12.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/70** (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

41437 P 20.03.1997 US

(73) Patentinhaber:

**The Government of the United States of America
as represented by the Secretary, Department of
Health and Human Services, Rockville, Md., US**

(74) Vertreter:

**Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,
80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**FITZGERALD, David, Rockville, MD 20852, US;
PASTAN, Ira, Potomac, MD 20892-4255, US;
MANSFIELD, Elizabeth, Bethesda, MD 20814, US;
KREITMAN, Robert, Potomac, MD 20854, US**

(54) Bezeichnung: **REKOMBINANTE ANTIKÖRPER UND IMMUNKONJUGATE GEZIELT AUF CD22-TRAGENDE ZELLEN UND TUMOREN**

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

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

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung stellt Anti-CD22-Antikörper, Anti-CD22-Immunkonjugate, CD22-Assaymethoden als auch Methoden zum Hemmen des Wachstums von Zellen, die CD22 exprimieren, bereit.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Leukämien und Lymphome stellen attraktive Ziele für die Behandlung mit Immuntoxinen dar. Die Reaktion von Patienten mit B-Zell-Malignitäten ist in klinischen Studien der Phase I/II der Immuntoxin-Aktivität umfassend untersucht worden. Amlot et al., (1993), Blood 82, 2624-2633; Sausville et al., (1995) Blood 85, 3457-3465; Grossbard et al., (1993) Blood 81, 2263-2271; Grossbard et al., (1993) Clin. Oncol. 11, 726-737. Bisher sind einige Antitumor-Reaktionen festgestellt worden, doch verhinderte eine Immuntoxin-vermittelte Toxizität gegenüber normalem Gewebe oftmals Dosisescalationen auf therapeutische Mengen. Mehrere B-Zell-spezifische Antigene, wie etwa CD19, CD22 und CD40, sind mittels Immuntoxinen angezielt worden, die mit Pflanzentoxinen, wie etwa der Ricin A-Kette, und bakteriellen Toxinen, wie etwa Pseudomonas Exotoxin A (PE), erzeugt wurden. Uckun et al., (1992), Blood 79, 2201-2214; Ghetie et al., (1991), Cancer Res. 51, 5876-5880; Francisco et al., (1995), Cancer Res. 55, 3099-3104.

[0003] CD22, ein Abstammungslinien-beschränktes B-Zell-Antigen, das zu der Ig-Superfamilie gehört, wird an der Oberfläche vieler Typen von malignen B-Zellen exprimiert, einschließlich chronischer B-lymphozytischer Zellen (B-CLL), B-Lymphom-Zellen, wie etwa Burkitt-Lymphomen, und Haarzell-Leukämien, als auch auf normalen reifen B-Lymphozyten. CD22 ist auf der Zelloberfläche in frühen Stadien der B-Zellentwicklung nicht vorhanden und wird auf Stammzellen nicht exprimiert. Vaickus et al., (1991), Crit. Rev. Oncol/Hematol. 11, 267-297. Außerdem kann kein Shed-Antigen in normalem menschlichem Serum oder Serum von Patienten mit CLL nachgewiesen werden. Li et al., (1989), Cell. Immunol. 118, 85-99.

[0004] RFB4 IgG ist ein monoklonaler Anti-CD22-Antikörper. Dieser Antikörper ist sowohl an Ricin als auch an Pseudomonas Exotoxin A (PE) chemisch konjugiert worden und hat eine Aktivität gegen B-Zellen sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt; Ghetie et al., (1991), Cancer Res. 51, 5876-5880; Ghetie et al., (1988), Cancer Res. 48, 2610-2617. RFB4 ist für Zellen der B-Linie hoch spezifisch und zeigt keine nachweisbare Kreuzreaktivität mit irgendeinem anderen normalen Zelltyp auf. Li et al., (1989), Cell. Immunol. 118, 85-99. RFB4 IgG ist zuvor sowohl an die Ricin A-Kette als auch an eine verkürzte Form von PE, bezeichnet als PE35, kovalent gekoppelt worden. Diese Konjugat-Moleküle waren gegen experimentelle Lymphom-Xenograft-Modelle wirksam, und in dem klinischen Setting hat das Ricin-basierte Immuntoxin auch eine gewisse Wirksamkeit gegen Humanerkrankungen gezeigt. Amlot et al., (1993), Blood 82, 2624-2633; Sausville, (1995), Blood 85, 3457-3465.

[0005] Zwar sind chemische Konjugate oftmals sehr stabil und potent, doch sind sie groß und an ihren Verknüpfungsstellen vermutlich heterogen, was zu einer suboptimalen Aktivität führen kann. Die Anforderungen zur Herstellung großer Mengen an IgG und die chemische Konjugation setzen der Möglichkeit, den Arzneistoff herzustellen, ebenfalls gewisse Beschränkungen. Da die Fähigkeit, in Tumoren einzudringen, in umgekehrtem Bezug zu der Größe des eindringenden Moleküls steht, kann die große Größe von Antikörper-Toxin-Konjugaten ihre Fähigkeit beeinträchtigen, in Tumormassen einzudringen, wie sie etwa bei Lymphomen vorgefunden werden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0006] In einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung rekombinante Immunkonjugate und die Antikörper-Komponenten, die überraschenderweise sehr stabil und potent gegenüber Zellen sind, die das CD22-Antigen tragen, am typischsten maligne B-Zellen. Das Immunkonjugat umfasst ein therapeutisches Mittel oder ein nachweisbares Markerpeptid, das an ein rekombinantes Anti-CD22-Antikörper-Disulfid gebunden ist, stabilisiert durch ein Cystein, das an der Aminosäure-Position 44 der V_H platziert ist, und ein Cystein an der Aminosäure-Position 100 der V_L , und in Anspruch 1 definiert ist. Das therapeutische Agens kann ein Toxin sein, wie etwa ein Pseudomonas Exotoxin (PE) oder ein zytotoxisches Fragment davon (z. B. PE38). Der Anti-CD22-Antikörper ist ein RFB4-bindendes Fragment, welches eine variable schwere (V_H) Kette umfasst, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 2 ist, codiert durch SEQ ID NR: 3, und eine variable leichte (V_L) Kette, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 4 ist, codiert durch SEQ ID NR: 3. (Siehe auch [Fig. 1](#)). Die variable schwere Kette kann an den Carboxyl-Terminus des Toxins peptidgebunden sein. Wahlweise ist die V_H -Kette an die V_L -Kette durch ein Linkerpeptid, wie etwa das Linkerpeptid der SEQ ID NR: 5, peptidgebunden. Bei ei-

nigen Ausführungsformen ist die V_H -Kette an die V_L -Kette durch eine Cystein-Cystein-Disulfid-Bindung gebunden.

[0007] In einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Expressionskassette (siehe Anspruch 10), die das rekombinante Immunkonjugat codiert, und eine Wirtszelle, umfassend eine Expressionskassette, die die rekombinanten Immunkonjugate codiert. Der Anti-CD22-Antikörper umfasst eine variable schwere (V_H) Kette, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 2 ist, und eine variable leichte (V_L) Kette, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 4 ist.

[0008] In noch einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Methode zur Hemmung des Wachstums einer malignen B-Zelle (siehe Anspruch 15). Die Methode umfasst die Schritte des Kontaktierens der malignen B-Zelle mit einer wirksamen Menge eines rekombinanten Immunkonjugats, umfassend ein Toxinpeptid, das an einen Anti-CD22-Antikörper gebunden ist. Das Toxin kann ein Pseudomonas Exotoxin (PE) oder ein zytotoxisches Fragment davon sein, wie etwa PE38. Bei einigen Ausführungsformen wird die maligne B-Zelle mit dem Immunkonjugat in vivo kontaktiert. Die maligne B-Zelle kann eine Nager-B-Zelle, eine Hunde-B-Zelle oder eine Primaten-B-Zelle (z. B. humane B-Zelle) sein.

[0009] Die vorliegende Erfindung fasst ein Anti-CD22-Fv-Fragment ins Auge, umfassend eine variable schwere (V_H) Kette, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 2 ist, und eine variable leichte (V_L) Kette, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 4 ist. Das Fv-Fragment kann ein dsFv-Fragment sein. Bei einigen Ausführungsformen ist das Fv-Fragment nachweisbar markiert, bei anderen ist das Fv-Fragment an ein therapeutisches Mittel konjugiert. Das therapeutische Mittel kann ein Pseudomonas Exotoxin (PE) oder ein zytotoxisches Fragment davon sein.

[0010] Die vorliegende Erfindung kann bei einer Methode zum Nachweisen des Vorhandenseins von CD22-Protein in einer biologischen Probe verwendet werden. Die Methode umfasst den Schritt des Kontaktierens der biologischen Probe mit einem Anti-CD22-Antikörper, umfassend eine variable schwere (V_H) Kette, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 2 ist, und eine variable leichte (V_L) Kette, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 4 ist, und des Ermöglichens der Bindung des Antikörpers an das CD22-Protein unter immunologisch reaktiven Bedingungen, wobei der Nachweis des gebundenen Antikörpers das Vorhandensein des CD22-Proteins anzeigt. Bei einigen Ausführungsformen ist der Antikörper ein dsFv-Fragment. Der bei der Methode verwendete Antikörper kann nachweisbar markiert sein. Bei einigen Ausführungsformen wird die Methode in vivo in einem Säuger vorgenommen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0011] [Fig. 1](#): Hergeleitete Aminosäuresequenz der variablen Region der RFB4-Leichtkette (SEQ ID NR: 4; Nukleotide = SEQ ID NR: 3) und der RFB4-Schwerkette (SEQ ID NR: 2; Nukleotide = SEQ ID NR: 1). Die fett gedruckt gezeigten Aminosäuren wurden durch N-terminale Proteinsequenz-Analyse bestimmt.

[0012] [Fig. 2A](#): Konstruktion des Plasmids (pEM9), das für ein einzelkettiges Immuntoxin codiert, zusammengesetzt aus den variablen leichten und schweren Ketten von RFB4, fusioniert an PE38.

[0013] [Fig. 2B](#): Konstruktion der Plasmide pEM15 und pEM16, die für die variable leichte Kette-Cys 100 und die variable schwere Kette-Cys 44, fusioniert an PE38, von RFB4 codieren.

[0014] [Fig. 3](#): Zytotoxizität von RFB4(dsFv)PE38 für verschiedene Zelllinien nach 24-stündiger Inkubation. Der [3 H]Leucin-Einbau ist als ein Prozentsatz von cpm ausgedrückt, der durch Kontrollzellen inkorporiert wird, die ohne Immuntoxin inkubiert sind. Leere Kreise CA46; leere Dreiecke, JD-38; Kreuze Raji; schwarze Quadrate Namalwa; schwarze Kreise Daudi; schwarze Dreiecke HUT102.

[0015] [Fig. 4](#): Die relative Bindungsaktivität von RFB4-Immuntoxinen, verglichen zu nativem Antikörper, an CA46-Zellen. Vollantikörper und rekombinante Immuntoxine wurden zum Konkurrieren um die Bindung von Spuren Mengen von 125I-markiertem RFB4 IgG verwendet. Die konkurrierten Zählungen sind als der prozentuale Anteil an Zählungen von Zellen ausgedrückt, die ohne irgendeinen Kompetitor inkubiert wurden. Leere Quadrate RFB4 IgG; schwarze Kreise RFB4(scFv)PE38; schwarze Dreiecke RFB4(dsFv)PE38.

[0016] [Fig. 5](#): Stabilität von RFB4(dsFv)PE38. RFB4(dsFv)PE38 wurde bei 37°C für die angegebene Zahl von Tagen inkubiert, und die Zytotoxizität wurde zu einer Probe verglichen, die nicht bei 37°C inkubiert war. Leere Kreise 7 Tage; leere Dreiecke 5 Tage; schwarze Kreise 3 Tage; schwarze Dreiecke 1 Tag; schwarze

Quadrate 0 Tage.

[0017] Fig. 6A: Anti-Tumorwuchs-Aktivität von RFB4(dsFv)PE38. Athymische Nacktmäuse, die am Tag 4 bestrahlt wurden, wurden mit 5×10^6 CA46-Zellen am Tag 0 beimpft. Beginnend am Tag 1 wurden Injektionen von 5, 3 oder 1 μg RFB4(dsFv)PE38 oder PBS/0,2% BSA-Verdünnungsmittel täglich für vier Dosen gegeben. Das Tumorwachstum wurde durch Messen des Tumolvolumens überwacht und ist als das mittlere Tumolvolumen jeder Gruppe ausgedrückt. Leere Quadrate 5 μg ; schwarze Dreiecke 3 μg ; leere Kreise 1 μg ; schwarze Quadrate PBS/0,2% BSA-Verdünnungsmittel-Kontrolle.

[0018] Fig. 6B: Anti-Tumorwuchs-Aktivität von RFB4(dsFv)PE38. Athymische Nacktmäuse, die am Tag 3 bestrahlt wurden, wurden mit 10^7 CA46-Zellen am Tag 0 beimpft. Beginnend am Tag 1 wurden Injektionen von 5, 2 oder 1 μg RFB4(dsFv)PE38 oder PBS/0,2% BSA täglich für vier Dosen gegeben. Das Tumorwachstum wurde durch Messen des Tumolvolumens überwacht und ist als das mittlere Tumolvolumen jeder Gruppe ausgedrückt. Leere Quadrate 5 μg ; schwarze Dreiecke 2 μg ; leere Kreise 1 μg ; schwarze Quadrate PBS/0,2% BSA-Verdünnungsmittel-Kontrolle.

[0019] Fig. 7A: Antitumor-Aktivität von RFB4(dsFv)PE38 gegen CA46-Tumoren. Athymische Nacktmäuse wurden am Tag 3 bestrahlt und mit 10^7 CA46-Zellen am Tag 0 beimpft. Beginnend am Tag 4 wurden Mäuse mit Tumorgrößen von durchschnittlich 50 mm^3 mit 8, 5 oder 3 μg RFB4(dsFv)PE38 oder mit PBS/0,2% BSA-Verdünnungsmittel an jedem zweiten Tag für drei Dosen behandelt. Die Tumorgröße wurde durch Messen des Tumolvolumens überwacht und ist als das mittlere Tumolvolumen jeder Gruppe ausgedrückt. 3/5 Mäuse, die 8 μg an RFB4(dsFv)PE38 erhielten, starben während der Behandlung, und 1/5, die 5 μg erhielten, starben. Leere Quadrate 8 μg ; schwarze Dreiecke 5 μg ; leere Kreise 3 μg ; schwarze Quadrate PBS/0,2% BSA-Verdünnungsmittel-Kontrolle.

[0020] Fig. 7B: Antitumor-Aktivität von RFB4(dsFv)PE38 gegen CA46-Tumoren. Athymische Nacktmäuse wurden am Tag 3 bestrahlt und mit 10^7 CA46-Zellen am Tag 0 beimpft. Beginnend am Tag 4 wurden Mäuse mit Tumorgrößen von durchschnittlich 50 mm^3 mit 8, 5 oder 1 μg RFB4(dsFv)PE38 oder mit 30 μg RFB4 IgG oder mit PBS/0,2% BSA-Verdünnungsmittel an Tagen 4, 6, 7 oder 8 behandelt. Die Tumorgröße wurde durch Messen des Tumolvolumens überwacht und ist als das mittlere Tumolvolumen jeder Gruppe ausgedrückt. 3/5 Mäuse, die 8 μg an RFB4(dsFv)PE38 erhielten, starben während der Behandlung, und 2/5, die 5 μg erhielten, starben. Schwarze Kreise 8 μg ; leere Quadrate 5 μg ; leere Kreise 3 μg ; Kreuze 30 μg RFB4 IgG; schwarze Quadrate PBS/0,2% BSA-Verdünnungsmittel-Kontrolle.

[0021] Fig. 8A und Fig. 8B: Antitumor-Aktivität von RFB4(dsFv)PE38 in Mäusen. Weibliche Nacktmäuse wurden an Tag 3 bestrahlt (3 Gy) und wurden an Tag 0 subkutan mit 10 CA46-Zellen injiziert. Die Tumoren bildeten sich bis zum Tag 4, und die Mäuse wurden an jedem zweiten Tag für 3 Dosen der angegebenen Toxine und Dosierungen behandelt. Die Reaktionen waren dosisabhängig und wurden mit den negativen Kontroll-Molekülen Anti-Tac(Fv)PE38 und RFB4-IgG nicht erhalten.

[0022] Fig. 9A und Fig. 9B: Pharmakokinetiken von RFB4(dsFv)PE38. Mäuse in Gruppen von 3 wurden mit RFB4(dsFv)PE38 injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Blut entnommen. Zwei Cynomolgus-Affen wurden jeweils mit der angegebenen Dosis behandelt. Die Plasmaspiegel wurden mittels eines Zytotoxizitäts-Assays bestimmt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Überblick

[0023] Die vorliegende Erfindung stellt rekombinante Antikörper und Immunkonjugate bereit, die für CD22 hoch spezifisch sind. Ein exemplarisches Molekül verwendete ein *Pseudomonas* Exotoxin (PE), das an einen Anti-CD22-Disulfid-stabilisierten Antikörper, vorzugsweise ein Fv(dsFv)-Fragment, genetisch fusioniert war. Ziemlich unerwarteter Weise erwies sich das rekombinante PE-dsFv-Immuntoxin als nahezu 10-mal zytotoxischer als das einzelkettige Fv(scFv)-Fragment. Das dsFv wurde durch Mutieren der Nukleinsäuren bei Aminosäure-Position 44 der V_H und der Aminosäure-Position 100 der V_L , um für ein Cystein zu codieren, produziert.

[0024] Viele der rekombinanten Moleküle, die aus Konstrukten der vorliegenden Erfindung produziert sind, betragen ein Drittel der Größe der chemischen IgG-Toxin-Konjugate und sind von homogener Zusammensetzung. Eine kleine Größe wird die Eindringung des Wirkstoffs in feste Tumoren verbessern, wohingegen die Eliminierung des konstanten Abschnitts des IgG-Moleküls zu einer schnelleren Ausscheidung aus dem Kreislauf

von experimentellen Tieren und Patienten führt. Zusammengenommen werden diese Eigenschaften die Nebenwirkungen vermindern, indem sie die Zeit herabsetzen, in der das Immuntoxin (IT) mit Nicht-Zielgeweben und Geweben, die sehr geringe Mengen an Antigen exprimieren, interagieren kann. Außerdem können homogene Präparate der rekombinanten Immuntoxine ohne weiteres in großen Mengen erzeugt werden.

[0025] Die überraschend höhere Aktivität und die einzigartigen pharmakologischen Eigenschaften, die durch die Anti-CD22-Disulfid-stabilisierten Immunkonjugate der vorliegenden Erfindung erbracht werden, macht sie zu hochgradig wirksamen therapeutischen Mitteln für die Behandlung von B-Zell-Malignitäten oder als Nachweisagenzien solcher Malignitäten.

Definitionen

[0026] Einheiten, Präfixe und Symbole können mit ihrer SI-akzeptierten Form bezeichnet werden. Die Zahlenbereiche verstehen sich einschließlich der Zahlen, die den Bereich definieren. Sofern nicht anderweitig angegeben, sind die Nukleinsäuren von links nach rechts in der 5' nach 3'-Orientierung aufgeschrieben; die Aminosäuresequenzen sind von links nach rechts in der Amino nach -Orientierung aufgeschrieben. Die hierin angegebenen Überschriften stellen keine Beschränkungen der verschiedenen Aspekte der Ausführungsformen der Erfindung dar, die unter Bezugnahme auf die Beschreibung im gesamten vorgenommen werden können. Demgemäß sind die unmittelbar nachstehend definierten Begriffe unter Bezugnahme auf die Beschreibung in ihrer Gesamtheit umfassender definiert.

[0027] Der Begriff "CD22" umfasst die Bezugnahme auf ein CD22-Antigen, das auf der Oberfläche der B-Zellen von Säugern, wie etwa Ratten, Mäusen und Primaten, insbesondere Menschen, vorhanden ist. Siehe z. B. Wilson et al., J. Exp. Med. 173(1): 137-146 (1991); Wilson et al., J. Immunol, 150 (11): 5013-5024 (1993). Der Begriff "CD22-Protein" umfasst die Bezugnahme sowohl auf CD22- als auch RFB4-immunreaktive Fragmente von CD22. Solche CD22-immunreaktiven Fragmente weisen eine Affinität für ein RFB4-bindendes Fragment auf (siehe z. B. Beispiel 1), die um das wenigstens 5-fache größer ist als die eines Nicht-CD22-Kontrollproteins. Ein Beispiel eines Assays für die Bindungsaffinität ist in Beispiel 2 beschrieben.

[0028] Der Begriff "zytotoxisches Fragment" im Hinblick auf Pseudomonas Exotoxin (PE) umfasst die Bezugnahme auf eine angrenzende Subsequenz von nativem PE, oder natives PE, dem ein oder mehrere benachbarte Subsequenzen fehlen, die in dem nativen Molekül vorhanden sind, oder die eine konservativ modifizierte Variante solcher Fragmente ist. Das zytotoxische Fragmente behält zumindest 50%, vorzugsweise 75%, bevorzugter zumindest 90% und am bevorzugtesten 95% der Zytotoxizität des nativen PE bei. Die native PE-Sequenz ist veröffentlicht. Exemplarische zytotoxische PE-Fragmente von PE35, PE38 und PE40 sind beschrieben in US-Patenten Nrn. 5,602,095, 5,608,039 und 4,892,827.

[0029] "Biologische Probe", wie hierin verwendet, ist eine Probe von biologischem Gewebe oder Flüssigkeit, die CD22 oder ein CD22-Protein enthält. Zu solchen Proben zählen, ohne darauf beschränkt zu sein, Sputum, amniotische Flüssigkeit, Blut, Blutzellen (z. B. weiße Zellen) oder Gewebe. Biologische Proben können auch Sektionen von Geweben umfassen, wie etwa für histologische Zwecke entnommene eingefrorene Sektionen. Zu Beispielen der biologischen Proben zählen eine Zellprobe von dem Immunsystem (z. B. B-Zellen). Eine biologische Probe wird typischerweise von einer multizellulären Eukaryote erhalten, vorzugsweise einem Säuger, wie z. B. Ratte, Maus, Kuh, Hund, Meerschweinchen oder Kaninchen, und am bevorzugtesten von einem Primaten, wie etwa Makakaffen, Schimpansen oder Menschen.

[0030] Wie hierin verwendet, umfasst "rekombinant" die Bezugnahme auf ein Protein, das unter Verwendung von Zellen produziert wurde, die in ihrer nativen Form keine endogene Kopie der DNA aufweisen, die zum Expressieren des Proteins fähig wäre. Die Zellen produzieren das rekombinante Protein, da sie durch die Einführung der entsprechenden isolierten Nukleinsäuresequenz genetisch verändert worden sind. Der Begriff umfasst auch die Bezugnahme auf eine Zelle oder Nukleinsäure oder Vektor, die/der durch die Einführung einer heterologen Nukleinsäure oder die Veränderung einer nativen Nukleinsäure zu einer Form, die für jene Zelle nicht nativ ist, modifiziert worden ist, oder auf eine Zelle, die von einer derart modifizierten Zelle abgeleitet ist. So exprimieren rekombinante Zellen beispielsweise Gene, die innerhalb der nativen (nicht-rekombinanten) Form der Zelle nicht gefunden werden, oder exprimieren native Gene, die anderweitig abnormal exprimiert, unterexprimiert oder überhaupt nicht exprimiert sind.

[0031] Der Begriff "therapeutisches Mittel" umfasst eine beliebige Anzahl an Peptidverbindungen, die derzeit bekannt sind oder später entwickelt werden, um als Entzündungshemmer, Zytokine, Infektionshemmer, Enzymaktivatoren oder -inhibitoren, allosterische Modifikatoren oder Antibiotika zu dienen, oder solche mit ande-

ren therapeutischen Wirkungen.

[0032] Die Begriffe "wirksame Menge" oder "Menge, die darin wirksam ist" oder "therapeutisch wirksame Menge" umfassen die Bezugnahme auf eine ausreichende Dosierung, um ein gewünschtes Ergebnis zu erzielen, wie etwa die Hemmung der Zellproteinsynthese um mindestens 50% oder die Abtötung der Zelle.

[0033] Der Begriff "in vivo" umfasst die Bezugnahme auf das Innere des Körpers des Organismus, von dem die Zelle erhalten wurde. "Ex vivo" meint außerhalb des Körpers des Organismus, von dem die Zelle erhalten wurde.

[0034] Der Begriff "Immunkonjugat" umfasst die Bezugnahme auf eine kovalente Bindung eines therapeutischen Mittels oder einer nachweisbaren Markierung an einen Antikörper, wie etwa ein Antikörper-bindendes Fragment. Die Verknüpfung kann direkt oder indirekt durch ein Linkerpeptid erfolgen.

[0035] Der Begriff "Markierung" oder "nachweisbare Markierung" umfasst die Bezugnahme auf irgendeine Zusammensetzung, die mittels spektroskopischer, photochemischer, biochemischer, immunchemischer, elektrischer, optischer oder chemischer Methoden nachweisbar ist.

[0036] Der Begriff "Toxin" umfasst die Bezugnahme auf Abrin, Ricin, Pseudomonas Exotoxin (PE), Diphtherietoxin (DT), Botulinumtoxin oder modifizierte Toxine davon. Zum Beispiel sind PE und DT hochgradig toxische Verbindungen, die typischerweise durch Lebertoxizität zum Tode führen. PE und DT können jedoch zu einer Form zur Verwendung als ein Immuntoxin modifiziert werden, indem die native Targeting-Komponente des Toxins (z. B. Domäne Ia von PE und die B-Kette von DT) entfernt und durch eine unterschiedliche Antikörper-Targeting-Komponente ersetzt wird.

[0037] Wie hierin verwendet, umfasst "Säugerzellen" die Bezugnahme auf Zellen, die von Säugern, einschließlich Menschen, Ratten, Mäusen, Meerschweinchen, Schimpansen oder Makakaffen, abgeleitet sind. Die Zellen können ex vivo gezüchtet werden.

[0038] Wie hierin verwendet, umfasst "exprimiert" die Bezugnahme auf die Translation einer Nukleinsäure zu einem Protein.

[0039] Wie hierin verwendet, umfasst "Nukleinsäure" die Bezugnahme auf ein Desoxyribonukleotid- oder Ribonukleotid-Polymer in entweder einzel- oder doppelsträngiger Form, und umfasst, sofern nicht anders angegeben, bekannte Analoga von natürlichen Nukleotiden, die an Nukleinsäuren in einer Weise ähnlich der der natürlich vorkommenden Nukleotide hybridisieren. Sofern nicht anders angegeben, umfasst eine bestimmte Nukleinsäuresequenz die dazu komplementäre Sequenz.

[0040] Wie hierin verwendet, umfasst "codierend" bezüglich einer spezifizierten Nukleinsäure die Bezugnahme auf Nukleinsäuren, die die Information für die Translation zu dem spezifischen Protein umfassen. Die Information wird durch die Verwendung von Codons spezifiziert. Typischerweise wird die Aminosäuresequenz durch die Nukleinsäure unter Anwendung der "universellen" genetischen Codes codiert. Varianten des universellen Codes, wie sie z. B. in einigen pflanzlichen, tierischen und fungalen Mitochondrien, dem Bakterium *Mycoplasma Capricolum* (Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 2306-2309 (1985)) oder dem Wimperntierchen *Macronucleus* vorliegen, können verwendet werden, wenn die Nukleinsäure unter Verwendung der Translationsmaschinerie dieser Organismen exprimiert wird.

[0041] Wie hierin verwendet, umfasst "Antikörper" die Bezugnahme auf ein Immunglobulin-Molekül, das durch in vitro- oder in vivo-Generierung der humoralen Reaktion erhalten wird, und umfasst sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper. Der Begriff umfasst auch gentechnisch erzeugte Formen, wie etwa chimäre Antikörper (z. B. humanisierte murine Antikörper), Heterokonjugat-Antikörper (z. B. bispezifische Antikörper) und rekombinante Einzelketten-Fv-Fragmente (scFv) oder Disulfidstabilisierte (dsFv) Fv-Fragmente (siehe U.S.S.N. 08/077,252). Der Begriff "Antikörper" umfasst außerdem Antigen-bindende Formen von Antikörpern (z. B. Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG und invertiertes IgG). Siehe auch Pierce Katalog und Handbuch, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Ein mit einem bestimmten Antigen immunologisch reaktiver Antikörper kann in vivo oder mittels rekombinanter Methoden erzeugt werden, wie etwa der Auswahl von Bibliotheken von rekombinanten Antikörpern in Phagen oder ähnlichen Vektoren. Siehe z. B. Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; und Ward, et al. (1989) Nature 341: 544-546; und Vaughan et al. (1996) Nature Biotechnology, 14: 309-314.

[0042] Der Begriff "Bindungsfragment" bezüglich eines Antikörpers bezieht sich auf einen Antikörper, dem im Wesentlichen die gesamte Fc-Region eines in vivo generierten Antikörpers fehlt. Zu Beispielen der Antikörper-bindenden Fragmente zählen scFv, dsFv, Fab und (Fab')₂-Fragmente.

[0043] Der Begriff "immunologisch reaktive Bedingungen" umfasst die Bezugnahme auf Bedingungen, die einem zu einem bestimmten Epitop generierten Antikörper die Bindung an jenes Epitop in einem nachweislich höheren Maße und/oder den wesentlichen Ausschluss der Bindung an im Wesentlichen alle anderen Epitope erlaubt. Immunologisch reaktive Bedingungen hängen vom Format der Antikörper-bindenden Reaktion ab und sind typischerweise solche, die in Immunoassay-Protokollen angewendet werden, oder solche Bedingungen, die in vivo anzutreffen sind. Siehe Harlow und Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, für eine Beschreibung der Immunoassay-Formate und Bedingungen.

[0044] Wie hierin verwendet, werden "Polypeptid", "Peptid" und "Protein" austauschbar verwendet und umfassen die Bezugnahme auf ein Polymer von Aminosäureresten. Die Begriffe gelten für Aminosäure-Polymere, in denen ein oder mehrere Aminosäurereste ein künstliches chemisches Analogon einer entsprechenden natürlich vorkommenden Aminosäure darstellen, als auch für natürlich vorkommende Aminosäure-Polymere.

[0045] Der Begriff "Rest" oder "Aminosäurerest" oder "Aminosäure" umfasst die Bezugnahme auf eine Aminosäure, die in ein Protein, Polypeptid oder Peptid (kollektiv als "Peptid" bezeichnet) inkorporiert ist. Die Aminosäure kann eine natürlich vorkommende Aminosäure sein und kann, sofern nicht anders angegeben, bekannte Analoga der natürlichen Aminosäuren umfassen, die in einer ähnlichen Weise wie natürlich vorkommende Aminosäuren fungieren können.

[0046] Die Aminosäuren und Analoga, auf die hierin Bezug genommen wird, werden manchmal mit abkürzenden Bezeichnungen wie folgt beschrieben:

Aminosäure-Nomenklatur

Name	3-buchstabig	1-buchstabig
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartinsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Homoserin	Hse	-
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Methioninsulfoxid	Met (O)	-
Methioninmethylsulfonium	Met (S-Me)	
Norleucin	Nie	-
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

[0047] Eine "konservative Substitution" bezieht sich bei der Beschreibung eines Proteins auf eine Veränderung in der Aminosäure-Zusammensetzung des Proteins, die die Aktivität des Proteins nicht wesentlich verändert. Somit bezieht sich "konservativ modifizierte Variationen" einer bestimmten Aminosäuresequenz auf Aminosäure-Substitutionen solcher Aminosäuren, die für die Protein-Aktivität nicht entscheidend sind, oder auf die Substitution von Aminosäuren durch andere Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften (z. B. sauer, basisch, positiv oder negativ geladen, polar oder nicht-polar etc.), so dass Substitutionen selbst entscheidender Aminosäuren die Aktivität nicht wesentlich verändern. Konservative Substitutionstabellen, die funktionell ähnliche Aminosäuren wiedergeben, sind im Fachgebiet wohl bekannt. Die folgenden sechs Gruppen enthalten jeweils Aminosäuren, die konservative Substitutionen füreinander sind:

- 1) Alanin (A), Serin (S), Threonin (T);
 - 2) Aspartinsäure (D), Glutaminsäure (E);
 - 3) Asparagin (N), Glutamin (Q);
 - 4) Arginin (R), Lysin (K);
 - 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Valin (V); und
 - 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W).
- Siehe auch Creighton (1984) Proteins W. H. Freeman and Company

[0048] Der Begriff "im Wesentlichen ähnlich" im Zusammenhang mit einem Peptid gibt an, dass ein Peptid eine Sequenz mit mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 95% Sequenzidentität zu der Referenzsequenz über ein Vergleichsfenster von 10-20 Aminosäuren umfasst. Der Prozentsatz der Sequenzidentität wird durch Vergleichen zweier optimal angeordneter Sequenzen über ein Vergleichsfenster bestimmt, wobei der Abschnitt der Polynukleotidsequenz in dem Vergleichsfenster Additionen oder Deletionen (d. h. Lücken) im Vergleich zu der Referenzsequenz (die keine Additionen oder Deletionen umfasst) für das optimale Alignment der beiden

Sequenzen umfasst. Der Prozentsatz wird durch Bestimmen der Anzahl der Positionen errechnet, an denen der/die identische Nukleinsäurebase oder Aminosäurerest in beiden Sequenzen vorkommt, um die Anzahl der gepaarten Positionen zu erhalten, Teilen der Anzahl der gepaarten Positionen durch die Gesamtanzahl an Positionen in dem Vergleichsfenster und Multiplizieren des Ergebnisses mit 100, um den prozentualen Anteil der Sequenzidentität zu erhalten.

[0049] Dagegen umfasst "Sequenzidentität" im Zusammenhang mit zwei Nukleinsäure- oder Polypeptidsequenzen die Bezugnahme auf die Nukleotide (oder Reste) in den beiden Sequenzen, die gleich sind, wenn auf die maximale Entsprechung über ein spezifiziertes Vergleichsfenster angeordnet. Wird der Prozentsatz der Sequenzidentität in Bezug auf Proteine verwendet, so wird festgestellt, dass Restepositionen, die nicht identisch sind, oftmals um konservative Aminosäure-Substitutionen abweichen, wobei Aminosäurereste durch andere Aminosäurereste mit ähnlichen chemischen Eigenschaften (z. B. Ladung oder Hydrophobizität) ersetzt sind und daher die funktionellen Eigenschaften des Moleküls nicht verändert werden. Wo Sequenzen in konservativen Substitutionen abweichen, kann die prozentuale Sequenzidentität nach oben korrigiert werden, um für die konservative Natur der Substitution zu korrigieren. Due Methoden zum Vornehmen dieser Anpassung sind den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt. Typischerweise bezieht dies das Bewerten einer konservativen Substitution als einer partiellen und nicht einer vollständigen Fehlpaarung ein, was die prozentuale Sequenzidentität erhöht. Wo zum Beispiel einer identischen Aminosäure ein Punktwert von 1 zugeordnet wird und einer nicht-konservativen Substitution ein Wert von Null zugeordnet wird, erhält eine konservative Substitution einen Wert zwischen Null und 1. Die Punktebewertung der konservativen Substitutionen wird z. B. gemäß dem Algorithmus von Meyers and Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.*, 4: 11-17 (1988), wie z. B. in dem Programm PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, USA) implementiert, berechnet. Ein Hinweis darauf, dass zwei Peptidsequenzen im Wesentlichen ähnlich sind, ist der, dass ein Peptid immunologisch reaktiv mit Antikörpern ist, die gegen das zweite Peptid gezüchtet sind. Somit ist ein Peptid im Wesentlichen ähnlich zu einem zweiten Peptid zum Beispiel dort, wo die beiden Peptide um lediglich eine konservative Substitution abweichen.

[0050] Nukleinsäure-Sequenzen sind "im Wesentlichen ähnlich", wenn sie im Wesentlichen ähnliche Peptide codieren.

[0051] Ein "Vergleichsfenster", wie hierin verwendet, umfasst die Bezugnahme auf ein Segment von etwa 10-20 Resten, in welchem eine Sequenz zu einer Referenzsequenz derselben Anzahl an benachbarten Positionen verglichen werden kann, nachdem die beiden Sequenzen optimal angeordnet worden sind. Methoden für das Alignment von Sequenzen für den Vergleich sind im Fachgebiet wohl bekannt. Das optimale Alignment von Sequenzen für den Vergleich kann vorgenommen werden mittels des lokalen Homologie-Algorithmus von Smith und Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482; mittels des Homologie-Alignment-Algorithmus von Needleman und Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443; mittels der Suchmethode nach Ähnlichkeit von Pearson und Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad.*; durch computerisierte Implementierungen dieser Algorithmen (einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf CLUSTAL im PC/Gene-Programm von Intelligenetics, Mountain View, California, GAP, BESTFIT, BLAST, FASIA und TFASTA in dem Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, USA); das CLUSTAL-Programm ist gut beschrieben bei Higgins und Sharp (1988) *Gene*, 73: 237-244 und Higgins und Sharp (1989) *CABIOS* 5: 151-153; Corpet, et al. (1988) *Nucleic Acids Research* 16, 10881-90; Huang, et al. (1992) *Computer Applications in the Biosciences* 8, 155-65, und Pearson, et al. (1994) *Methods in Molecular Biology* 24, 307-31.

[0052] Der Begriff "Kontaktieren" umfasst die Bezugnahme auf die Platzierung in direkter physischer Beziehung.

[0053] Der Begriff "maligne B-Zelle" umfasst die Bezugnahme auf transformierte B-Zellen, wie etwa, jedoch nicht beschränkt auf, chronische B-lymphozytische Zellen (B-CLL), B-Lymphomzellen, wie etwa Burkitt-Lymphome, und Haarzell-Leukämien, als auch auf normale reife B-Lymphozyten. Die B-Zellen sind Säuger B-Zellen, wie etwa von Ratten, Mäusen und Primaten, insbesondere humane B-Zellen. Maligne B-Zellen exprimieren CD22, als ganzes oder als Teil, auf ihrer Oberfläche, so dass Anti-CD22-Antikörper maligne B-Zellen bei einer wenigstens 5 mal größeren, und bevorzugter mindestens 10 mal größeren Bindungsaffinität, unter Anwendung eines standardmäßigen Bindungsassays, erkennen und binden als eine B-Zelle, die CD22 nicht trägt. Ein Beispiel eines Bindungsassays ist hierin in Beispiel 2 beschrieben.

[0054] Der Begriff "Expressionsvektor" umfasst die Bezugnahme auf ein Nukleinsäure-Konstrukt, das rekombinant oder synthetisch generiert ist, mit einer Reihe spezifizierter Nukleinsäure-Elemente, welche die Transkription einer bestimmten Nukleinsäure in einer Wirtszelle zulassen. Der Expressionsvektor kann ein Teil eines

Plasmids, Virus oder Nukleinsäure-Fragments sein. Typischerweise umfasst der Expressionsvektor eine zu transkribierende Nukleinsäure und einen Promotor.

[0055] Der Begriff "Linkerpeptid" umfasst die Bezugnahme auf ein Peptid innerhalb eines Antikörper-bindenden Fragments (z. B. Fv-Fragment), welches zur indirekten Bindung der variablen schweren Kette an die variable leichte Kette dient.

[0056] Mit "Wirtszelle" ist eine Zelle gemeint, die die Replikation oder Expression des Expressionsvektors fördern kann. Wirtszellen können prokaryotische Zellen sein, wie etwa E. coli, oder eukaryotische Zellen, wie etwa Hefe, Insekten, Amphibien oder Säugerzellen.

[0057] Wie hierin verwendet, umfasst der Begriff "Anti-CD22" bezüglich eines Antikörpers oder eines Fv-Fragments, welches für CD22 spezifisch ist, die Bezugnahme auf einen Antikörper, der zu CD22, insbesondere einem extrazellulären Epitop von CD22, generiert ist. Bei bevorzugten Ausführungsformen ist das CD22 ein Primaten-CD22, wie z. B. humanes CD22. Quellen des CD22 sind wohl bekannt.

[0058] Der Begriff "RFB4-Bindungsfragment" umfasst die Bezugnahme auf einen Antikörper, der an dasselbe Epitop wie ein RFB4 dsFv bindet und mindestens 70%, bevorzugter mindestens 80% und am bevorzugtesten mindestens 90% der Bindungsaffinität eines RFB4 dsFv-Fragments aufweist, wie hierin z. B. in Beispiel 1 beschrieben. Ein Beispiel eines Assays für die Bindungsaffinität ist in Beispiel 2 beschrieben.

A. Konservativ modifizierte Varianten von PE

[0059] Konservativ modifizierte Varianten von PE oder zytotoxischen Fragmenten davon weisen zumindest 80% Sequenzähnlichkeit, vorzugsweise zumindest 85% Sequenzähnlichkeit, bevorzugter zumindest 90% Sequenzähnlichkeit und am bevorzugtesten zumindest 95% Sequenzähnlichkeit auf der Aminosäure-Ebene auf.

[0060] Der Begriff "konservativ modifizierte Varianten" gilt sowohl für Aminosäure- als auch Nukleinsäuresequenzen. Bezüglich bestimmter Nukleinsäuresequenzen bezieht sich konservativ modifizierte Varianten auf solche Nukleinsäuren, die identische oder im Wesentlichen identische Aminosäuresequenzen codieren, oder dort, wo die Nukleinsäure keine Aminosäuresequenz codiert, auf im Wesentlichen identische Sequenzen.

[0061] Aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes codiert eine große Anzahl an funktionell identischen Nukleinsäuren für irgendein gegebenes Polypeptid. Zum Beispiel codieren die Codons GCA, GCC, GCG und GCU allesamt die Aminosäure Alanin. Somit kann an jeder Position, an der ein Alanin durch ein Codon spezifiziert ist, das Codon zu irgendeinem der beschriebenen entsprechenden Codons verändert werden, ohne das codierte Polypeptid zu verändern. Solche Nukleinsäure-Variationen sind "stumme Variationen", welche eine Spezies der konservativ modifizierten Variationen darstellen. Jede hierin genannte Nukleinsäuresequenz, die ein Polypeptid codiert, beschreibt auch jede mögliche stumme Variation der Nukleinsäure. Ein Fachmann wird erkennen, dass jedes Codon in einer Nukleinsäure (mit Ausnahme von AUG, welches normalerweise das einzige Codon für Methionin ist) modifiziert werden kann, um ein funktionell identisches Molekül zu ergeben. Demgemäß ist jede stumme Variation einer Nukleinsäure, die für ein Polypeptid codiert, in jeder beschriebenen Sequenz inbegriffen.

[0062] Bezüglich der Aminosäuresequenzen wird ein Fachmann erkennen, dass individuelle Substitutionen, Deletionen oder Additionen an einer Nukleinsäure-, Peptid-, Polypeptid- oder Proteinsequenz, die eine einzelne Aminosäure oder einen kleinen prozentualen Anteil der Aminosäuren in der codierten Sequenz verändert, addiert oder deletiert, eine "konservativ modifizierte Variante" ist, bei der die Veränderung zu der Substitution einer Aminosäure mit einer chemisch ähnlichen Aminosäure führt.

B. Untersuchen auf die Zytotoxizität von PE

[0063] Die in der Erfindung verwendeten Pseudomonas Exotosine können auf den gewünschten Grad der Zytotoxizität mittels Assays untersucht werden, die den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt sind. Beispiele der Toxizitätsassays sind hierin z. B. in Beispiel 4 beschrieben. So können zytotoxische Fragmente von PE und konservativ modifizierte Varianten solcher Fragmente ohne weiteres auf die Zytotoxizität untersucht werden. Eine große Anzahl von Kandidaten-PE-Molekülen kann gleichzeitig auf die Zytotoxizität mittels im Fachgebiet wohl bekannter Methoden untersucht werden. Zum Beispiel können Untergruppen der Kandidaten-Moleküle auf die Zytotoxizität untersucht werden. Positiv reagierende Untergruppen der Kandidaten-Moleküle können kontinuierlich nochmals unterteilt und nochmals untersucht werden, bis das/die gewünschte zytotoxische Frag-

ment(e) identifiziert ist/sind. Solche Methoden erlauben ein schnelles Screening großer Anzahlen an zytotoxischen Fragmenten oder konservativer Varianten von PE.

Anti-CD22-Antikörper

[0064] Die vorliegende Erfindung stellt Antikörper bereit, die auf extrazelluläre Determinanten von CD22 gerichtet sind. CD22 ist ein auf B-Zellen vorhandenes Antigen. Die hierin beschriebenen Immunkonjugate werden auf CD22 unter Verwendung der Antikörper der vorliegenden Erfindung gerichtet. Diese Antikörper sind unter immunologischen Bedingungen selektiv reaktiv für jene Determinanten von CD22, die an der Oberfläche von B-Zellen präsentiert werden und für den Antikörper aus dem extrazellulären Milieu zugänglich sind. Bei bevorzugten Ausführungsformen ist der in Immunkonjugat-Zusammensetzungen verwendete Antikörper ein RFB4-Bindungsfragment.

[0065] Der Begriff "selektiv reaktiv" oder "spezifisch für" umfasst die Bezugnahme auf die präferenzielle Assoziation eines Antikörpers, als ein Ganzes oder als Teil, mit einer Zelle oder Gewebe, die das CD22-Targeting-Molekül trägt, und nicht mit Zellen oder Geweben, denen das Targeting-Molekül fehlt. Es ist selbstverständlich erkannt, dass ein gewisser Grad an nicht-spezifischer Interaktion zwischen einem Molekül und einer Nicht-Zielzelle oder -Gewebe erfolgen kann. Nichts desto trotz kann die spezifische Bindung als durch die spezifische Erkennung des Targeting-CD22-Moleküls vermittelt unterschieden werden. Typischerweise führt die spezifische Bindung zu einer viel stärkeren Assoziation zwischen dem verabreichten Molekül und Zellen, die CD22 tragen, als zwischen dem gebundenen Molekül und Zellen, denen CD22 fehlt. Die spezifische Bindung führt typischerweise zu einer größer als 2-fachen, vorzugsweise größer als 5-fachen, noch bevorzugter größer als 10-fachen und am bevorzugtesten größer als 100-fachen Zunahme der Menge an gebundenem Liganden (pro Einheit Zeit) an eine Zelle oder Gewebe, die CD22 tragen, im Vergleich zu einer Zelle oder Gewebe, denen CD22 fehlt. Die spezifische Bindung an ein Protein unter solchen Bedingungen erfordert einen Antikörper, der auf seine Spezifität für ein bestimmtes Protein ausgewählt ist. Eine Vielfalt von Immunoassay-Formaten ist zur Auswahl von Antikörpern geeignet, die mit einem bestimmten Protein spezifisch immunreaktiv sind. Zum Beispiel werden Festphasen-ELISA-Immunoassays routinemäßig zur Auswahl monoklonaler Antikörper eingesetzt, die mit einem Protein spezifisch immunreaktiv sind. Siehe Harlow und Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, für eine Beschreibung der Immunoassay-Formate und Bedingungen, die zur Bestimmung der spezifischen Immunreaktivität angewendet werden können.

[0066] Vorzugsweise sind die bei den Methoden der vorliegenden Erfindung angewendeten immunologisch reaktiven Bedingungen "physiologische Bedingungen", die die Bezugnahme auf Bedingungen umfassen (z. B. Temperatur, Osmolarität, pH), die im Inneren eines lebenden Säugers oder einer Säugerzelle typisch sind. Zwar ist erkannt, dass einige Organe extremen Bedingungen unterliegen, doch variiert das intraorganistische und intrazelluläre Milieu normalerweise um pH 7 (d. h. von pH 6,0 bis pH 8,0, typischerweise von pH 6,5 bis pH 7,5), enthält Wasser als dem vorwiegenden Lösungsmittel und existiert bei einer Temperatur von oberhalb 0°C bis unterhalb 50°C. Die Osmolarität liegt innerhalb des Bereichs, der die Zellebensfähigkeit und Vermehrung fördert.

[0067] Der bei der vorliegenden Erfindung verwendete Anti-CD22-Antikörper kann an Pseudomonas Exotoxin (PE) durch den PE-Carboxyl-Terminus, den PE-Amino-Terminus, durch einen inneren Aminosäurerest von PE, wie etwa Cystein, oder irgendeine Kombination davon gebunden werden. In ähnlicher Weise kann PE direkt durch die schwere, leichte oder FC-Region des Antikörpers gebunden werden. Die Bindung kann durch die Amino- oder Carboxyl-Termini des Antikörpers oder durch einen inneren Aminosäurerest erfolgen. Außerdem können multiple PE-Moleküle (z. B. beliebige von 2-10) an den Anti-CD22-Antikörper gebunden werden, und/oder multiple Antikörper (z. B. beliebige von 2-5) können an ein PE-Molekül gebunden werden. Die in einer multivalenten Immunkonjugat-Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung verwendeten Antikörper können die zu demselben oder einem unterschiedlichen CD22-Epitop sein.

[0068] Bei bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist der Anti-CD22-Antikörper ein Antikörper-bindendes Fragment, wie zum Beispiel ein scFv- oder dsFv-Antikörper, wie etwa ein RFB4 dsFv. Fv-Fragmente betragen typischerweise etwa 25 kDa und enthalten eine vollständige Antigen-Bindungsstelle. Die V_H und V_L -Ketten der Fv-Fragmente werden durch nicht-kovalente Interaktionen zusammengehalten. Diese Ketten neigen auf Verdünnung hin zum Dissoziieren, weshalb Methoden entwickelt worden sind, um die Ketten durch Glutaraldehyd, intermolekulare Disulfide oder einen Peptidlinker zu vernetzen. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen weist das Fv-Antikörper-bindende Fragment eine variable schwere RFB4-Kette auf, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 2 ist, oder eine konservativ modifizierte Variante davon, und/oder eine variable leichte RFB4-Kette, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 4 ist, oder eine kon-

servativ modifizierte Variante davon. Solche in den dsFv-Fragmenten verwendeten konservativen Varianten werden die Cysteinreste beibehalten, die für Disulfidbindungen zwischen den Ketten genützt werden. Konservativ modifizierte Varianten der Prototyp-Sequenz der SEQ ID NR: 2 und/oder der Prototyp-Sequenz der SEQ ID NR: 4 weisen wenigstens 80% Sequenzähnlichkeit, vorzugsweise wenigstens 85% Sequenzähnlichkeit, noch bevorzugter wenigstens 90% Sequenzähnlichkeit und am bevorzugtesten wenigstens 95% Sequenzähnlichkeit auf der Aminosäure-Ebene zu ihrer Prototypsequenz auf.

[0069] Bei einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden die Antikörper-bindenden Fragmente direkt an PE durch die leichte Kette gebunden. Bei anderen Ausführungsformen werden die Antikörper-bindenden Fragmente direkt an PE durch die schwere Kette gebunden. Die Fv-Fragmente können an PE über ihre Amino- oder Carboxyl-Termini gebunden werden. Bei bevorzugten Ausführungsformen ist das PE das PE38.

[0070] Die variablen schweren und leichten Ketten (V_H und V_L) der Disulfid-stabilisierten Fv-Fragmente werden über eine Disulfid-Bindung zwischen den Cysteinresten, die in jeder der beiden Ketten vorhanden sind, kovalent gebunden. Ein Disulfid-stabilisiertes Fv(dsFv)-Fragment ist ein solches, in welchem die native Fv-Sequenz an einer spezifischen Position mutiert worden ist, um einen Cysteinrest zu ergeben, der eine zusätzliche Disulfidbindung liefern wird, wenn das resultierende Antikörper-Molekül gebildet wird. Die Paare der auszuwählenden Aminosäuren sind in der Reihenfolge der absteigenden Präferenz die folgenden:

V_H44-V_L100 ,
 V_H105-V_L43 ,
 V_H105-V_L42 ,
 V_H44-V_L101 ,
 V_H106-V_L43 ,
 V_H104-V_L43 ,
 V_H44-V_L99 ,
 V_H45-V_L98 ,
 V_H46-V_L98 ,
 V_H103-V_L43 ,
 V_H103-V_L44 ,
 V_H103-V_L45 .

[0071] Am bevorzugtesten werden Substitutionen des Cysteins an den folgenden Positionen vorgenommen:

V_H44-V_L100 ; oder
 V_H105-V_L43 .

[0072] (Die Schreibweise V_H44-V_L100 beispielsweise bezieht sich auf ein Polypeptid mit einer V_H , die ein Cystein an Position 44 aufweist, und einer V_L , die ein Cystein an Position 100 aufweist; wobei die Positionen entsprechend der Nummerierung in "Sequences of Proteins of Immunological interest," E. Kabat, et al., U.S. Government Printing Office, NIH Publication No. 91-3242 (1991), angegeben sind; V_H und V_L werden im Fachgebiet bekannt identifiziert, einschließlich Kabat und Wu. Die hierin angegebenen Aminosäure-Positionen von V_H oder V_L sind unter Bezugnahme auf Kabat und Wu angegeben. Die dsFv-Fragmente umfassen mindestens eine Disulfidbindung, können aber auch 2, 3, 4, 5 oder mehr Bindungen, je nach Wunsch, umfassen.

[0073] Zwar können die beiden V_H - und V_L -Ketten einiger Antikörper-Ausführungsformen direkt miteinander verbunden werden, doch wird ein Fachmann erkennen, dass die Moleküle durch einen Peptidlinker getrennt sein können, der aus ein oder mehreren Aminosäuren besteht. Generell wird der Peptidlinker keine andere spezifische biologische Aktivität als der besitzen, die Proteine zu verbinden oder einen bestimmten minimalen Abstand oder eine andere räumliche Beziehung zwischen ihnen aufrecht zu erhalten. Allerdings können die Aminosäure-Bestandteile des Peptidlinkers so gewählt werden, dass sie irgendeine Eigenschaft des Moleküls beeinflussen, wie etwa die Faltung, Nettoladung oder Hydrophobizität. Einzelketten-Fv(scFv)-Antikörper umfassen optional einen Peptidlinker von nicht mehr als 50 Aminosäuren, generell nicht mehr als 40 Aminosäuren, vorzugsweise nicht mehr als 30 Aminosäuren und noch bevorzugter nicht mehr als 20 Aminosäuren in der Länge. Bei einigen Ausführungsformen ist der Peptidlinker ein Concatamer der Sequenz Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NR: 5), vorzugsweise von 2, 3, 4, 5 oder 6 solcher Sequenzen. Peptidlinker und ihre Anwendung sind im Fachgebiet wohl bekannt. Siehe z. B. Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, supra; Bird et al., Science, supra; Glockshuber et al., supra; US-Patent Nr. 4,946,778, US-Patent Nr. 5,132,405 und aus allerjüngster Zeit bei Stemmer et al., Biotechniques 14: 256-265 (1993).

Produktion von rekombinantem Antikörper

[0074] Der Antikörper ist ein rekombinanter Antikörper, typischerweise ein scFv oder dsFv. Methoden zur Herstellung von Fv-Antikörpern sind beschrieben worden. Siehe Huse et al. *Science* 246: 1275-1281 (1989); und Ward, et al. *Nature* 341: 544-546 (1989); und Vaughan et al. (1996) *Nature Biotechnology*, 14: 309-314. Im allgemeinen werden geeignete Antikörper üblicherweise mit einer Affinitätskonstante von mindestens 10^{-7} M, vorzugsweise mindestens 10^{-8} M, bevorzugt mindestens 10^{-9} M, noch bevorzugter mindestens 10^{-10} M, am bevorzugtesten mindestens 10^{-11} M, binden.

Bindungsaffinität der Antikörper

[0075] Die Antikörper dieser Erfindung sind zur spezifischen Bindung eines extrazellulären Epitops von CD22 fähig. Ein Anti-CD22-Antikörper weist eine Bindungsaffinität für CD22 auf, wenn der Antikörper CD22 bindet oder zur Bindung daran fähig ist, wie mittels standardmäßiger Antikörper-Antigen-Assays, kompetitiven Assays, Sättigungsassays oder standardmäßigen Immunoassays, wie etwa ELISA oder RIA, gemessen oder bestimmt. Diese Definition der Spezifität gilt für einzelne schwere und/oder leichte Ketten, CDRs, Fusionsproteine oder Fragmente von schweren und/oder leichten Ketten, die für CD22 spezifisch sind, wenn sie CD22 alleine oder in Kombination binden.

[0076] In Wettbewerbsassays wird die Fähigkeit eines Antikörpers, einen Liganden zu binden, durch Nachweisen der Fähigkeit des Antikörpers bestimmt, um die Bindung an eine Verbindung, die den Liganden bekanntermaßen bindet, zu konkurrieren. Zahlreiche Typen von kompetitiven Assays sind bekannt und werden hierin erörtert. Alternativ können auch Assays, die die Bindung einer Testverbindung in der Abwesenheit eines Inhibitors messen, verwendet werden. Zum Beispiel kann die Fähigkeit eines Moleküls oder einer anderen Verbindung, CD22 zu binden, durch direktes Markieren des Moleküls von Interesse nachgewiesen werden, oder aber kann das Molekül unmarkiert bleiben und indirekt unter Verwendung verschiedener Sandwich-Assayformate nachgewiesen werden. Zahlreiche Typen von Bindungsassays, wie etwa kompetitive Bindungsassays, sind bekannt (siehe z. B. US-Patente Nrn. 3,376,110, 4,016,043, und Harlow und Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, N. Y. (1988)). Assays zur Messung der Bindung einer Testverbindung an eine Komponente alleine anstelle der Verwendung eines Wettbewerbsassays stehen ebenfalls zur Verfügung. Zum Beispiel können Antikörper zum Identifizieren des Vorhandenseins des Liganden verwendet werden. Standardmäßige Verfahrensweisen für monoklonale Antikörper-Assays, wie etwa ELISA, können angewendet werden (siehe Harlow und Lane, *supra*). Für einen Überblick über verschiedene Signal-produzierende Systeme, die angewendet werden können, siehe US-Patent Nr. 4,391,904.

Produktion der Immunkonjugate

A. Immunttoxine

[0077] Toxine können mit Antikörpern der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um Immunttoxine zu erhalten. Zu Beispielen der Toxine zählen Ricin, Abrin, Diphtherietoxin und Untereinheiten davon, als auch Botulinumtoxine A bis F. Diese Toxine sind von kommerziellen Quellen ohne weiteres beziehbar (z. B. Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Das Diphtherietoxin wird aus *Corynebacterium diphtheriae* isoliert. Ricin ist das Lectin RCA60 von *Ricinus communis* (Castorbohne). Der Begriff bezieht sich auch auf toxische Varianten davon. Siehe US-Patent Nrn. 5,079,163 und 4,689,401. *Ricinus communis*-Agglutinin (RCA) kommt in zwei Formen vor, bezeichnet als RCA₈₀ und RCA₁₂₀ entsprechend ihren Molekulargewichten von etwa 65.000 bzw. 120.000. Nicholson und Blaustein, *J. Biochim. Biophys. Acta*, 266: 543 (1972). Die A-Kette ist für die Inaktivierung der Proteinsynthese und Abtötung der Zellen verantwortlich. Die B-Kette bindet Ricin an Zelloberflächen-Galaktosereste und erleichtert den Transport der A-Kette in das Cytosol (Olsnes et al., *Nature*, 1974; 249: 627-631). Siehe US-Patent Nr. 3,060,165.

[0078] Abrin umfasst die toxischen Lektine von *Abrus precatorius*. Die toxischen Wirkstoffe, Abrin a, b, c und d, weisen ein Molekulargewicht von etwa 63.000 und 67.000 Da auf und setzen sich aus zwei Disulfid-verknüpften Polypeptidketten A und B zusammen. Die A-Kette hemmt die Proteinsynthese; die B-Kette (Abrin-b) bindet an D-Galaktosereste. Siehe Funatsu et al., *The amino acid sequence of the A-chain of abrin-a and comparison with ricin*, *Agr. Biol. Chem.* 52: 1095 (1988). Siehe auch Olsnes, *Methods Enzymol.* 50: 330-335 (1978).

[0079] Bei bevorzugten Ausführungsformen ist das Toxin das *Pseudomonas* Exotoxin. *Pseudomonas* Exotoxin A (PE) ist ein extrem aktives monomeres Protein (Molekulargewicht 66 kD), das von *Pseudomonas aeru-*

ginosa sekretiert wird, welches die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen durch die Inaktivierung des Elongationsfaktors 2 (EF-2) hemmt, indem es seine ADP-Ribosylierung katalysiert (den Transfer der ADP-Ribosylkomponente von oxidiertem NAD auf EF-2 katalysiert).

[0080] Das Toxin enthält drei strukturelle Domänen, die gemeinsam als Verursacher der Zytotoxizität wirken. Domäne Ia (Aminosäuren 1-252) vermittelt die Zellbindung. Domäne II (Aminosäuren 253-364) ist für die Translokation in das Cytosol verantwortlich, und Domäne III (Aminosäuren 400-613) vermittelt die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2, welcher das Protein inaktiviert und den Zelltod bewirkt. Die Funktion der Domäne Ib (Aminosäuren 365-399) bleibt undefiniert, obschon ein großer Teil davon, Aminosäuren 365-380, ohne Verlust der Zytotoxizität deletiert werden kann. Siehe Siegel et al., J. Biol. Chem. 264: 14256-14261 (1989).

[0081] Die bei der vorliegenden Erfindung verwendeten Pseudomonas Exotoxine (PE) umfassen die native Sequenz, zytotoxische Fragmente der nativen Sequenz und konservativ modifizierte Varianten von nativem PE und seinen zytotoxischen Fragmenten. Die zytotoxischen Fragmente von PE umfassen solche, die mit oder ohne nachfolgende proteolytische oder anderweitige Prozessierung in der Zielzelle (z. B. als ein Protein oder Vorprotein) zytotoxisch sind. Zu den zytotoxischen Fragmenten von PE zählen PE40, PE38 und PE35. PE40 ist ein verkürztes Derivat von PE, wie im Fachgebiet zuvor beschrieben. Siehe Pai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 3358-62 (1991); Kondo et al., J. Biol. Chem. 263: 9470-9475 (1988). PE38 ist ein verkürztes PE, das sich aus Aminosäuren 253-364 und 381-613 zusammensetzt. PE35 ist ein Carboxyl-terminales Fragment von PE mit 35 kD, das sich aus einem Met an Position 280, gefolgt von Aminosäuren 281-364 und 381-613 des nativen PE, zusammensetzt. Bei bevorzugten Ausführungsformen wird das zytotoxische Fragment PE38 verwendet. PE38 ist ein Vorprotein, das zu seiner zytotoxischen Form auf die Prozessierung innerhalb einer Zelle hin aktiviert werden kann.

[0082] Mit den hierin bereitgestellten Pseudomonas Exotoxinen und Antikörpern kann ein Fachmann ohne weiteres eine Vielfalt von Klonen konstruieren, die funktionell äquivalente Nukleinsäuren enthalten, wie etwa Nukleinsäuren, die hinsichtlich der Sequenz abweichen, doch dieselbe PE- oder Antikörpersequenz codieren. Somit stellt die vorliegende Erfindung Nukleinsäuren bereit, die für Antikörper und Konjugate und Fusionen davon codieren.

B. Rekombinante Methoden

[0083] Die Nukleinsäuren der vorliegenden Erfindung können mittels jeglicher geeigneten Methode präpariert werden, einschließlich zum Beispiel der Klonierung und Restriktion geeigneter Sequenzen oder durch direkte chemische Synthese mittels Methoden, wie etwa der Phosphotriester-Methode von Narang et al. Meth. Enzymol. 68: 90-99 (1979); der Phosphodiester-Methode von Brown et al., Meth. Enzymol. 68: 109-151 (1979); der Diethylphosphoramidit-Methode von Beaucage et al., Tetra. Lett., 22: 1859-1862 (1981); der Festphasen-Phosphoramidittriestermethode, beschrieben von Beaucage und Caruthers (1981), Tetrahedron Letts., 22(20): 1859-1862, z. B. unter Verwendung eines automatisierten Synthesegeräts, wie z. B. beschrieben bei Needham-VanDevanter et al. (1984) Nucleic Acids Res., 12: 6159-6168; und der Festträger-Methode des US-Patents Nr. 4,458,066. Die chemische Synthese erzeugt ein einzelsträngiges Oligonukleotid. Dieses kann zu doppelsträngiger DNA durch Hybridisation mit einer komplementären Sequenz umgewandelt werden oder durch Polymerisation mit einer DNA-Polymerase unter Verwendung des Einzelstranges als einer Template. Ein Fachmann würde erkennen, dass zwar die chemische Synthese von DNA auf Sequenzen von etwa 100 Basen beschränkt ist, doch längere Sequenzen durch die Ligation von kürzeren Sequenzen erhalten werden können. Die Klonierungs-Methodologien zur Erreichung dieser Ziele und die Sequenzierungsmethode zur Verifizierung der Sequenz der Nukleinsäuren sind im Fachgebiet wohl bekannt und hierin durch Beispiele angegeben.

[0084] Die Immunkonjugate, PE und Antikörper der vorliegenden Erfindung können auch als Ganzes oder zum Teil unter Anwendung standardmäßiger Peptidsynthese-Methoden konstruiert werden. Die Festphasen-Synthese der Polypeptide der vorliegenden Erfindung von weniger als etwa 50 Aminosäuren in der Länge kann durch Heften der C-terminalen Aminosäure der Sequenz an einen unlöslichen Träger, gefolgt von der sequenziellen Addition der verbliebenen Aminosäuren in der Sequenz, erreicht werden. Techniken für die Festphasen-Synthese sind beschrieben bei Barany und Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; Seiten 3-284 in The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Bd. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, et al., J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963), und Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2. Auflage, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Proteine von größerer Länge können durch Kondensation der Amino- und Carboxyltermini von kürzeren Fragmenten synthetisiert werden. Methoden zur Bildung von Peptidbindungen durch Aktivierung eines Carboxy-terminalen Endes (z. B. durch die Verwendung des Kopplungsreagenz

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid) sind den Fachleuten des Gebiets bekannt.

[0085] Weitere Beispiele geeigneter Klonierungs- und Sequenzierungstechniken und genügend Anleitungen, um Fachleute durch viele Klonierungsvorgänge zu leiten, sind zu finden bei Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. Auflage, Bd. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), *Methods in Enzymology*, Bd. 152: *Guide to Molecular Cloning Techniques* (Berger and Kimmel (Hrsg.), San Diego: Academic Press, Inc. (1987)), oder *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausubel, et al. (Hrsg.), Greene Publishing und Wiley-Interscience, New York (1987)). Die Produktinformation der Hersteller der biologischen Reagentien und der Experimentiergeräte liefert auch die Information, die bei den bekannten biologischen Methoden nützlich ist. Zu solchen Herstellern zählen die SIGMA Chemical Company (Saint Louis, 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-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz), Invitrogen, San Diego, CA, und Applied Biosystems (Foster City, CA), als auch viele andere, einem Fachmann bekannte kommerzielle Quellen.

[0086] Nukleinsäuren, die für natives PE oder Anti-CD22-Antikörper codieren, können zum Erhalt des PE, der Antikörper oder Immunkonjugate der vorliegenden Erfindung modifiziert werden. Die Modifikation durch ortsgerichtete Mutagenese ist im Fachgebiet wohl bekannt. Nukleinsäuren, die für natives PE oder Anti-CD22-Antikörper (z. B. RBF4) codieren, können mittels in vitro-Methoden amplifiziert werden. Zu den Amplifikationsmethoden zählen die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die Ligase-Kettenreaktion (LCR), das Transkriptions-basierte Amplifikationssystem (TAS), das selbstunterhaltende Sequenzreplikationssystem (SSR). Eine breite Vielfalt von Klonierungsmethoden, Wirtszellen und in vitro-Amplifikations-Methodologien ist den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt.

[0087] Ist die Nukleinsäure, die ein PE, Anti-CD22-Antikörper oder Immunkonjugat der vorliegenden Erfindung codiert, einmal isoliert und kloniert, so kann das gewünschte Protein in einer rekombinant erzeugten Zelle, wie etwa in Bakterien-, Hefe-, Insekten- und Säugerzellen, exprimiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Fachleute des Gebiets hinsichtlich zahlreicher Expressionssysteme kenntnisreich sind, die für die Expression von Proteinen, einschließlich *E. coli*, anderen bakteriellen Wirten, Hefe und verschiedenen höheren eukaryotischen Zellen, wie etwa die COS-, CHO- und HeLa-Zelllinien und Myelomzelllinien, verfügbar sind. Es wird kein Versuch unternommen, die verschiedenen Methoden ausführlich zu beschreiben, die für die Expression von Proteinen in Prokaryoten oder Eukaryoten bekannt sind. Kurz gesagt wird die Expression von natürlichen oder synthetischen Nukleinsäuren, die für die isolierten Proteine der Erfindung codieren, typischerweise durch die operative Knüpfung der DNA oder cDNA an einen Promotoren (der entweder konstitutiv oder induzierbar ist), gefolgt von dem Einbau in einen Expressionsvektor, erreicht werden. Die Vektoren können für die Replikation und Integration entweder in Prokaryoten oder Eukaryoten geeignet sein. Typische Expressionsvektoren enthalten Transkriptions- und Translationsterminatoren, Initiationssequenzen und Promotoren, die für die Regulation der Expression der DNA, die für das Protein codiert, nützlich sind. Um eine hochgradige Expression eines klonierten Gens zu erreichen, ist die Konstruktion von Expressionsvektoren wünschenswert, die zumindest einen starken Promotoren zur Steuerung der Transkription, eine ribosomale Bindungsstelle für die Translationsinitiation und einen Transkriptions/Translationsterminator enthalten. Für *E. coli* umfasst dies einen Promotoren, wie etwa die T7-, trp-, lac- oder lambda-Promotoren, eine ribosomale Bindungsstelle und vorzugsweise ein Transkriptionsterminationssignal. Für eukaryotische Zellen können die Kontrollsequenzen einen Promotor und vorzugsweise einen Enhancer umfassen, der von Immunglobulin-Genen, SV40, Cytomegalovirus und einer Polyadenylierungssequenz abgeleitet ist, und können Spleiss-Donor- und Akzeptor-Sequenzen umfassen. Die Plasmide der Erfindung können in die gewählte Wirtszelle mittels wohlbekannter Methoden übertragen werden, wie etwa der Calciumchlorid-Transformation für *E. coli* und die Calciumphosphat-Behandlung oder Elektroporation für Säugerzellen. Die durch die Plasmide transformierten Zellen können anhand der Resistenz gegenüber Antibiotika ausgewählt werden, die durch Gene übertragen wird, die auf den Plasmiden enthalten sind, wie etwa die amp-, gpt-, neo- und hyg-Gene.

[0088] Ein Fachmann würde erkennen, dass Modifikationen an einer Nukleinsäure vorgenommen werden können, die ein Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert (d. h. Anti-CD22-Antikörper, PE oder durch deren Kombination gebildetes Immunkonjugat), ohne seine biologische Aktivität zu vermindern. Einige Modifikationen können vorgenommen werden, um die Klonierung, Expression oder Inkorporation des Targeting-Moleküls in ein Fusionsprotein zu erleichtern. Solche Modifikationen sind den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt und umfassen zum Beispiel ein Methionin, das an den Amino-Terminus addiert ist, um eine Initiationsstelle zu liefern, oder zusätzliche Aminosäuren (z. B. poly-His), die an einem der beiden Termini platziert sind, um bequem lokalisierte Restriktionsstellen oder Terminationscodons oder Reinigungssequenzen zu schaffen.

C. Reinigung

[0089] Einmal exprimiert, können die rekombinanten Immunkonjugate, Antikörper und/oder *Pseudomonas* Exotoxine der vorliegenden Erfindung gemäß standardmäßiger Verfahrensweisen des Fachgebiets gereinigt werden, einschließlich der Ammoniumsulfat-Präzipitation, Affinitätsäulen, Säulenchromatographie und ähnlichem (siehe generell R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N. Y. (1982)). Im Wesentlichen reine Zusammensetzungen von mindestens etwa 90 bis 95% Homogenität sind bevorzugt, und 98 bis 99% oder mehr Homogenität sind für pharmazeutische Anwendungen am bevorzugtesten. Einmal gereinigt, und zwar partiell oder bis zur Homogenität, je nach Wunsch, sollten die Polypeptide im Wesentlichen frei von Endotoxin für pharmazeutische Zwecke sein und können dann therapeutisch angewendet werden.

[0090] Methoden für die Expression einzelkettiger Antikörper und/oder die Rückfaltung zu einer entsprechend gefalteten Form, einschließlich einzelkettiger Antikörper von Bakterien, wie etwa *E. coli*, sind beschrieben worden und sind wohl bekannt und auf die Antikörper dieser Erfindung anwendbar. Siehe Buchner et al., *Analytical Biochemistry* 205: 263-270 (1992); Pluckthun, *Biotechnology*, 9: 545 (1991); Huse, et al., *Science*, 246: 1275 (1989) und Ward et al., *Nature*, 341: 544 (1989).

[0091] Oftmals wird funktionelles Protein von *E. coli* oder anderen Bakterien aus Einschlusskörpern generiert und erfordert die Solubilisierung des Proteins unter Anwendung starker Denaturierungsmitteln und die anschließende Rückfaltung. In dem Solubilisierungsschritt muss ein Reduktionsmittel vorhanden sein, um die Disulfidbindungen zu lösen, wie im Fachgebiet wohl bekannt ist. Ein Beispiel eines Puffers mit einem Reduktionsmittel ist: 0,1 M Tris, pH 8, 6 M Guanidin, 2 mM EDTA, 0,3 M DTE (Dithioerythritol). Die Reoxidation der Proteindisulfidbindungen kann in der Gegenwart von niedermolekularen Thiol-Reagentien in reduzierter und oxidierte Form wirksam katalysiert werden, wie beschrieben bei Saxena et al., *Biochemistry* 9: 5015-5021 (1970), und insbesondere beschrieben bei Buchner, et al., *Anal. Biochem.*, supra (1992).

[0092] Die Renaturierung wird typischerweise durch Verdünnen (z. B. 100-fach) des denaturierten und reduzierten Proteins in Rückfaltungs-Puffer erreicht werden. Ein Beispiel eines Puffers ist 0,1 M Tris, pH 8,0, 0,5 M L-Arginin, 8 mM oxidiertes Glutathion (GSSG) und 2 mM EDTA.

[0093] Als einer erforderlichen Modifikation an dem einzelkettigen Antikörper-Protokoll wurden die Schwer- und Leichtketten-Regionen separat solubilisiert und reduziert und dann in der Rückfaltungslösung kombiniert. Eine bevorzugte Ausbeute wird erhalten, wenn diese beiden Proteine in einem molaren Verhältnis gemischt werden, so dass ein molarer Überschuss eines Proteins gegenüber dem anderen einen 5-fachen Überschuss nicht übersteigt. Es ist erwünscht, einen Überschuss an oxidiertem Glutathion oder anderen oxidierenden niedermolekularen Verbindungen zu der Rückfaltungslösung zu geben, nachdem das Redox-Shuffling abgeschlossen ist.

Pharmazeutische Zusammensetzungen und Verabreichung

[0094] Die Antikörper- und/oder Immunkonjugat-Zusammensetzungen dieser Erfindung (d. h. an einen Antikörper geknüpft PE) sind besonders nützlich für die parenterale Verabreichung, wie etwa die intravenöse Verabreichung oder die Verabreichung in eine Körperhöhle oder den Hohlraum eines Organs. Die Zusammensetzungen für die Verabreichung werden üblicherweise eine Lösung des Antikörpers und/oder Immunkonjugats umfassen, gelöst in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger, vorzugsweise einem wässrigen Träger. Eine Vielfalt wässriger Träger kann verwendet werden, z. B. gepufferte Saline und ähnliches. Diese Lösungen sind steril und allgemein frei von unerwünschter Materie. Diese Zusammensetzungen können mittels herkömmlicher, wohl bekannter Sterilisationstechniken sterilisiert werden. Die Zusammensetzungen können pharmazeutisch akzeptable Hilfssubstanzen enthalten, je nach Erfordernissen, um sie physiologischen Bedingungen anzunähern, wie etwa pH-einstellende und puffernde Agenzien, Toxizitäts-einstellende Agenzien und ähnliches, zum Beispiel Natriumacetat, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchlorid, Natriumlactat und ähnliches. Die Konzentration des Fusionsproteins in diesen Formulierungen kann breit variieren und wird primär basierend auf Flüssigkeitsvolumina, Viskositäten, Körpergewicht und ähnlichem entsprechend der jeweils gewählten Verabreichungsform und den Bedürfnissen des Patienten gewählt werden.

[0095] Somit würde eine typische pharmazeutische Immunkonjugat-Zusammensetzung für die intravenöse Verabreichung für die Gesamtbehandlung etwa 0,3 bis etwa 30 mg/kg pro Tag betragen, wobei die Dosierung vorzugsweise kontinuierlich verabreicht oder auf eine Dosis von 0,1 bis 10 mg/kg dreimal täglich verteilt würde. Vorzugsweise würde die Dosis an jedem zweiten Tag bei etwa 0,2 bis 2 mg/kg dreimal täglich oder 0,6 bis 6 mg/kg pro Tag in einer kontinuierlichen Infusion gegeben werden. Die tatsächlichen Methoden zur Zubereitung

der verabreichbaren Zusammensetzungen werden den Fachleuten des Gebiets bekannt oder offensichtlich sein und sind in größerer Ausführlichkeit in Veröffentlichungen wie Remington's Pharmaceutical Science, 19. Aufl., Mack Publishing Company, Esston, Pennsylvania (1995), beschrieben.

[0096] Die Zusammensetzung, die das Immunkonjugat der vorliegenden Erfindung umfasst, kann für therapeutische Behandlungen verabreicht werden. Bei therapeutischen Anwendungen werden die Zusammensetzungen einem Patienten, der an einer Erkrankung leidet, in einer ausreichenden Menge verabreicht, um die Erkrankung und ihre Komplikationen zu heilen oder zumindest teilweise zum Stillstand zu bringen. Eine adäquate Menge, um dies zu erreichen, ist als eine "therapeutisch wirksame Dosis" definiert. Die wirksamen Mengen für diese Anwendung werden von dem Schweregrad der Erkrankung und dem allgemeinen gesundheitlichen Zustand des Patienten abhängen.

[0097] Einzelne oder mehrfache Verabreichungen der Zusammensetzungen können in Abhängigkeit von der Dosierung und Häufigkeit, je nach Bedarf und Toleranz des Patienten, verabreicht werden. In jedem Falle sollte die Zusammensetzung eine ausreichende Menge der Proteine dieser Erfindung bereitstellen, um den Patienten wirksam zu behandeln. Vorzugsweise wird die Dosierung dreimal täglich an jedem zweiten Tag oder kontinuierlich an jedem zweiten Tag verabreicht, kann aber periodisch verabreicht werden, bis entweder ein therapeutisches Ergebnis erzielt ist oder bis Nebenwirkungen den Abbruch der Therapie rechtfertigen. Generell sollte die Dosis ausreichend sein, um Symptome oder Anzeichen einer Erkrankung zu behandeln oder zu mildern, ohne dabei eine inakzeptable Toxizität für den Patienten zu erzeugen. Eine wirksame Menge der Verbindung ist die, die entweder eine subjektive Besserung eines/mehrerer Symptoms/e oder eine objektiv identifizierbare Besserung verschafft, wie durch den Arzt oder eine andere qualifizierte untersuchende Person festgestellt.

[0098] Parenterale Formulierungen mit kontrollierter Freisetzung der Immunkonjugat-Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können als Implantate, ölige Injektionen oder als partikuläre Systeme hergestellt werden. Für einen breiten Überblick über die Protein-Darreichungssysteme, siehe Banga, A. J., "Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems" Technomic Publishing Company, Inc. 1995. Lancaster, PA. Zu partikulären Systemen zählen Mikrokügelchen, Mikropartikel, Mikrokapseln, Nanokapseln, Nanokügelchen und Nanopartikel. Mikrokapseln enthalten das therapeutische Protein als einen zentralen Kern. In Mikrokügelchen ist das Therapeutikum im gesamten Partikel dispergiert. Partikel, Mikrokügelchen und Mikrokapseln, die kleiner als etwa 1 µm sind, werden generell als Nanopartikel, Nanokügelchen bzw. Nanokapseln bezeichnet. Kapillaren weisen einen Durchmesser von etwa 5 µm auf, so dass nur Nanopartikel intravenös verabreicht werden. Mikropartikel betragen typischerweise um 100 µm im Durchmesser und werden subkutan oder intramuskulär verabreicht. Siehe z. B. Kreuter, J. 1994. "Nanoparticles," in Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, Hrsg., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, S. 219-342; Tice und Tabibi. 1992. "Parenteral Drug Delivery: Injectibles," in Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, Hrsg., Marcel Dekker, Inc. New York, NY, S. 315-339.

[0099] Polymere können zu Zwecken der kontrollierten Freisetzung von Immunkonjugat-Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Verschiedene abbaubare und nicht-abbaubare polymere Matrices zur Verwendung in der kontrollierten Wirkstoffdarreichung sind im Fachgebiet bekannt. Langer, R. 1993. "Polymer-Controlled Drug Delivery Systems," Accounts Chem. Res., 26: 537-542. Zum Beispiel liegt das Blockcopolymer Polaxamer 407 als eine mobile visköse Substanz bei niedrigen Temperaturen vor, bildet aber ein halbfestes Gel bei Körpertemperatur. Es wurde als ein wirksames Vehikel für die Formulierung und verzögerte Verabreichung von rekombinantem Interleukin-2 und Uresse nachgewiesen. Johnston et al., Pharm. Res., 9: 425-434 (1992); Pec et al., J. Parent. Sci. Tech., 44(2): 58-65 (1990). Hydroxyapatit kann ebenfalls als ein Mikroträger für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen verwendet werden. Ijntema et al., Int. J. Pharm., 112: 215-224 (1994). Liposome können für die kontrollierte Freisetzung als auch das Wirkstoff-Targeting von eingekapseltem Wirkstoff verwendet werden. Betageri et al. 1993. "Targeting of Liposomes," in Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA. Zahlreiche weitere Systeme für die kontrollierte Darreichung von therapeutischen Proteinen sind bekannt. Siehe z. B. US-Pst. Nrn. 5,055,303, 5,188,837, 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, 4,957,735 und 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 und 5,534,496.

[0100] Zu den verschiedenen Anwendungen der rekombinanten Fusionsproteine der vorliegenden Erfindung zählen eine Vielfalt von krankhaften Zuständen, die durch spezifische Humanzellen verursacht sind, die durch die toxische Wirkung des Proteins eliminiert werden können. Eine bevorzugte Anwendung für die Immunkonjugate der Erfindung ist die Behandlung maligner B-Zellen, die CD22 exprimieren. Zu Beispielen maligner B-Zellen zählen chronische B-lymphozytische Zellen (B-CLL), B-Lymphomzellen, wie etwa Burkitt-Lymphome,

und Haarzell-Leukämien.

Diagnostische Kits

[0101] Bei anderen Ausführungsformen stellt die Erfindung Kits für den Nachweis von CD22 oder einem immunreaktiven Fragment davon (d. h. kollektiv ein "CD22-Protein" genannt) in einer biologischen Probe bereit. Die Kits werden typischerweise einen Anti-CD22-Antikörper der vorliegenden Erfindung umfassen, umfassend eine variable schwere (V_H) Kette, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 2 ist, und eine variable leichte (V_L) Kette, die im Wesentlichen ähnlich der SEQ ID NR: 4 ist. Bei einigen Ausführungsformen wird der Anti-CD22-Antikörper ein Anti-CD22-Fv-Fragment sein; vorzugsweise ein dsFv-Fragment.

[0102] Außerdem werden die Kits typischerweise Instruktionsmaterial enthalten, das die Methoden zur Anwendung eines Antikörpers der vorliegenden Erfindung beschreibt (z. B. zum Nachweis von B-Zellen in einer Probe). Die Kits können auch zusätzliche Komponenten umfassen, um die jeweilige Anwendung zu erleichtern, für die der Kit entworfen ist. So kann der Kit beispielsweise zusätzlich Mittel zum Nachweisen der Markierung enthalten (z. B. Enzym-Substrate für enzymatische Markierungen, Filtersets zum Nachweis von fluoreszierenden Markierungen, entsprechende sekundäre Markierungen, wie etwa Schaf-Anti-Maus-HRP oder ähnliches). Die Kits können außerdem Puffer und weitere Reagentien enthalten, die für die Durchführung einer bestimmten Methode routinemäßig verwendet werden. Solche Kits und die entsprechenden Inhaltsstoffe sind den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt.

Detektierbare Markierungen

[0103] Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können wahlweise kovalent oder nicht-kovalent an eine detektierbare Markierung gebunden sein. Zu den für eine solche Anwendung geeigneten detektierbaren Markierungen zählen jegliche Zusammensetzungen, die mittels spektroskopischer, photochemischer, biochemischer, immunchemischer, elektrischer, optischer oder chemischer Methoden nachweisbar sind. Zu nützlichen Markierungen bei der vorliegenden Erfindung zählen magnetische Kügelchen (z. B. DYNABEADS), fluoreszierende Farbstoffe (z. B. Fluoreszeinisothiocyanat, Texasrot, Rhodamin, grün fluoreszierendes Protein und ähnliches), Radiomarkierungen (z. B. 3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C oder ^{32}P), Enzyme (z. B. Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase und andere, die herkömmlicherweise in einem ELISA verwendet werden) und kolorimetrische Markierungen, wie etwa kolloidales Gold oder farbige Glas- oder Kunststoff-(z. B. Polyesterol, Polypropylen, Latex etc.)-Kügelchen.

[0104] Die Methoden zum Nachweisen solcher Markierungen sind den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt. So lassen sich beispielsweise Radiomarkierungen unter Verwendung eines photographischen Films oder von Szintillationszählern nachweisen, lassen sich fluoreszierende Marker unter Verwendung eines Photodetektors zum Nachweis der abgegebenen Strahlung nachweisen. Enzymatische Markierungen werden typischerweise nachgewiesen, indem das Enzym mit einem Substrat versehen und das Reaktionsprodukt, das durch die Wirkung des Enzyms auf dem Substrat erzeugt wird, detektiert wird, und kolorimetrische Markierungen werden durch einfache Inaugenscheinnahme der farbigen Markierung detektiert.

Weitere therapeutische Komponenten

[0105] Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können auch zum Targeting einer beliebigen Anzahl verschiedener diagnostischer oder therapeutischer Verbindungen auf Zellen, die CD22-Antigene tragen, verwendet werden. So kann ein Antikörper der vorliegenden Erfindung, wie etwa ein Anti-CD22-Fv-Fragment, direkt oder über einen Linker an einen Wirkstoff gebunden werden, der direkt an Zellen, die CD22 tragen, verabreicht werden soll. Zu therapeutischen Mitteln zählen solche Verbindungen wie Nukleinsäuren, Proteine, Peptide, Aminosäuren oder Derivate, Glykoproteine, Radioisotope, Lipide, Kohlehydrate oder rekombinante Viren. Therapeutische und diagnostische Nukleinsäure-Komponenten umfassen Antisense-Nukleinsäuren, derivatisierte Oligonukleotide für die kovalente Vernetzung mit einzel- oder doppelsträngiger DNA und Triplex-bildenden Oligonukleotiden.

[0106] Alternativ kann das an einen Anti-CD22-Antikörper gebundene Molekül ein Verkapselungssystem sein, wie etwa ein Liposom oder eine Mizeile, die eine therapeutische Zusammensetzung enthält, wie etwa einen Wirkstoff, eine Nukleinsäure (z. B. eine Antisense-Nukleinsäure) oder eine andere therapeutische Komponente, die vorzugsweise vor direkter Exposition an das Kreislaufsystem abgeschirmt wird. Methoden zur Herstellung der Liposome, die an Antikörper gebunden sind, sind den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt. Siehe z. B. US-Patent Nr. 4,957,735, Connor et al., Pharm. Ther., 28: 341-365 (1985).

Konjugation an den Antikörper

[0107] Therapeutische, diagnostische oder verkapselnde Moleküle oder Systeme können an die Anti-CD22-Antikörper oder Immunkonjugate der vorliegenden Erfindung unter Anwendung einer Anzahl von Methoden gebunden werden, die den Fachleuten des Gebiets bekannt sind. Sowohl kovalente als auch nicht-kovalente Anlagerungsmethoden können mit den Anti-CD22-Antikörpern der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0108] Die Verfahrensweise zur Bindung eines Agens an einen Antikörper oder ein anderes Polypeptid-Targeting-Molekül werden entsprechend der chemischen Struktur des Agens variieren. Polypeptide enthalten typischerweise eine Vielfalt von funktionellen Gruppen; z. B. Carboxylsäure (COOH) oder freie Amin-(-NH₂)-Gruppen, die für die Reaktion mit einer geeigneten funktionellen Gruppe oder einem Effektormolekül zur Bindung des Effektors daran zur Verfügung stehen.

[0109] Alternativ kann das Targeting-Molekül und/oder das Effektormolekül derivatisiert werden, um zusätzliche reaktive funktionelle Gruppen freizulegen oder zu binden.

[0110] Die Derivatisierung kann die Bindung jeglicher aus einer Anzahl von Linkermolekülen einbeziehen, wie etwa solche, die von Pierce Chemical Company, Rockford Illinois, verfügbar sind.

[0111] Ein "Linker", wie hierin verwendet, ist ein Molekül, das zur Bindung des Targeting-Moleküls an das Effektormolekül verwendet wird. Der Linker ist zur Bildung von kovalenten Bindungen an sowohl das Targeting-Molekül als auch an das Effektormolekül fähig. Geeignete Linker sind den Fachleuten des Gebiets wohl bekannt und umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, gerad- oder verzweigt-kettige Kohlenstofflinker, heterozyklische Kohlenstofflinker oder Peptidlinker. Wo das Targeting-Molekül und das Effektormolekül Polypeptide sind, können die Linker an den Aminosäure-Bestandteil durch deren Seitengruppen (z. B. durch eine Disulfidbindung an Cystein) gebunden werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform jedoch werden die Linker an die Amino- und Carboxylgruppen des Alpha-Kohlenstoffs der terminalen Aminosäuren angelagert.

[0112] Ein bifunktionaler Linker mit einer funktionellen Gruppe, die mit einer Gruppe auf einem bestimmten Agens reaktiv ist, und einer anderen Gruppe, die mit einem Antikörper reaktiv ist, kann zur Bildung des gewünschten Immunkonjugats verwendet werden. Alternativ kann die Derivatisierung die chemische Behandlung des Targeting-Moleküls einbeziehen, z. B. die Glykospaltung der Zuckerkomponente eines Glykoprotein-Antikörpers mit Periodat, um freie Aldehydgruppen zu erzeugen. Die freien Aldehydgruppen auf dem Antikörper können mit freien Amin- oder Hydrazingruppen auf einem Agens reagiert werden, um das Agens daran zu binden (siehe US-Patent Nr. 4,671,958). Verfahrensweisen zur Erzeugung der freien Sulfhydrylgruppen an Polypeptid, wie etwa Antikörper oder Antikörper-Fragmente, sind ebenfalls bekannt (siehe US-Patent Nr. 4,659,839). Viele Verfahrensweisen und Linkermoleküle zur Bindung der verschiedenen Verbindungen, einschließlich Radionuklid-Metallchelaten, Toxinen und Wirkstoffen, an Proteine, wie etwa Antikörper, sind bekannt. Siehe zum Beispiel Europäische Patentanmeldung Nr. 188,256; US-Patent Nrn. 4,671,958, 4,659,839, 4,414,148, 4,699,784; 4,680,338; 4,569,789 und 4,589,071; und Borlinghaus et al. Cancer Res. 47: 4071-4075 (1987).

[0113] Unter manchen Umständen ist es erwünscht, das Effektormolekül aus dem Targeting-Molekül zu befreien, wenn das chimäre Molekül seine Zielstelle erreicht hat. Daher können chimäre Konjugate, umfassend Bindungen, die in der Umgebung der Zielstelle spaltbar sind, verwendet werden, wenn der Effektor an der Zielstelle freigesetzt werden soll. Die Spaltung der Bindung zur Freisetzung des Agens von dem Antikörper kann durch enzymatische Aktivität oder Bedingungen erreicht werden, denen das Immunkonjugat entweder innerhalb der Zielzelle oder in der Umgebung der Zielstelle unterworfen wird. Ist die Zielstelle ein Tumor, so kann ein Linker, der unter Bedingungen spaltbar ist, die an der Tumorstelle vorhanden sind (z. B. wenn an Tumorasoziierte Enzyme oder sauren pH exponiert) verwendet werden.

[0114] Eine Anzahl verschiedener spaltbarer Linker ist den Fachleuten des Gebiets bekannt. Siehe US-Pat. Nrn. 4,618,492; 4,542,225 und 4,625,014. Die Mechanismen zur Freisetzung eines Agens von diesen Linkergruppen umfassen zum Beispiel die Bestrahlung einer photolabilen Bindung und die Säure-katalysierte Hydrolyse. US-Pat. Nr. 4,671,958 enthält zum Beispiel eine Beschreibung von Immunkonjugaten, umfassend Linker, die an der Zielstelle in vivo durch die proteolytischen Enzyme des Komplementsystems des Patienten gespalten werden. Angesichts der großen Anzahl von Methoden, die zur Bindung einer Vielzahl radiodiagnostischer Verbindungen, radiotherapeutischer Verbindungen, Wirkstoffen, Toxinen und anderer Agenzien an Antikörper berichtet worden sind, wird ein Fachmann des Gebiets zur Bestimmung einer geeigneten Methode zur Bindung

eines gegebenen Agens an einen Antikörper oder ein anderes Polypeptid in der Lage sein.

CD22-Protein-Immunoassays

[0115] Die Methoden zum Nachweisen der CD22-Proteine der vorliegenden Erfindung (d. h. CD22- und RFB4-immunreaktive Fragmente davon) stellen keine entscheidenden Aspekte der vorliegenden Erfindung dar. Die CD22-Proteine können unter Anwendung irgendeines aus einer Anzahl wohl bekannter immunologischer Bindungsassays detektiert und/oder quantifiziert werden (siehe z. B. US-Patente Nrn. 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288 und 4,837,168). Für einen Überblick über die allgemeinen Immunoassays, siehe auch *Methods in Cell Biology*, Bd. 37: *Antibodies in Cell Biology*, Asai, Hrsg. Academic Press, Inc. New York (1993); *Basic and Clinical Immunology*, 7. Aufl., Stites & Terr, Hrsg. (1991). Immunologische Bindungsassays (oder Immunoassays) verwenden typischerweise einen Antikörper, um das Analyt (in diesem Fall CD22-Protein) spezifisch zu binden und oftmals zu immobilisieren. Der in den Immunoassays der vorliegenden Erfindung verwendete Antikörper ist in größerer Ausführlichkeit oben erörtert. Der Anti-CD22-Antikörper kann mittels irgendeiner aus einer Anzahl von Methoden produziert werden, die den Fachleuten des Gebiets bekannt sind, wie hierin beschrieben.

[0116] Immunoassays verwenden oftmals außerdem ein markierendes Agens, um den Bindungskomplex spezifisch zu binden und zu markieren, der durch das Einfang-Agens und das Analyt gebildet ist. Das Markierungsagens kann selbst eine der Komponenten sein, umfassend den Antikörper/Analyt-Komplex. So kann das Markierungsagens ein markiertes CD22-Protein oder ein markierter Anti-CD22-Protein-Antikörper sein. Alternativ kann das Markierungsagens eine dritte Komponente sein, wie etwa ein anderer Antikörper, der an den Antikörper/CD22-Protein-Komplex spezifisch bindet.

[0117] Bei einigen Ausführungsformen ist das Markierungsagens ein zweiter CD22-Protein-Antikörper, der eine Markierung trägt. Alternativ kann dem zweiten CD22-Protein-Antikörper eine Markierung fehlen, doch kann er wiederum durch einen markierten dritten Antikörper gebunden werden, der für Antikörper der Spezies spezifisch ist, von der der zweite Antikörper abgeleitet ist. Der zweite Antikörper kann mit einer nachweisbaren Komponente, wie etwa Biotin, modifiziert sein, an die ein drittes markiertes Molekül spezifisch binden kann, wie etwa ein Enzym-markiertes Streptavidin.

[0118] Weitere Proteine, die zur spezifischen Bindung der konstanten Regionen von Immunglobulin fähig sind, wie etwa Protein A oder Protein G, können ebenfalls als das Markierungsagens verwendet werden. Diese Proteine sind normale Bestandteile der Zellwände von Streptokokken-Bakterien. Sie zeigen eine starke nicht-immunogene Reaktivität mit den konstanten Regionen von Immunglobulin von einer Vielzahl von Spezies (siehe allgemein Kronval, et al. (1973) *J. Immunol.*, 111: 1401-1406, und Akerstrom et al. (1985) *J. Immunol.*, 135: 2589-2542).

[0119] Während der gesamten Assays können Inkubations- und/oder Waschschrte nach jeder Kombination der Reagentien erforderlich sein. Die Inkubationsschritte können von etwa 5 Sekunden bis zu mehreren Stunden, vorzugsweise von etwa 5 Minuten bis etwa 24 Stunden, variieren. Die Inkubationszeit wird jedoch von dem Assay-Format, Analyt, Volumen der Lösung, den Konzentrationen und ähnlichem abhängen. Üblicherweise werden die Assays bei Raumtemperatur durchgeführt, obschon sie über einen Bereich von Temperaturen, wie etwa 10°C bis 40°C, vorgenommen werden können.

[0120] Zwar können die Einzelheiten der Immunoassays der vorliegenden Erfindung mit dem jeweils verwendeten Format variieren, doch umfasst die Methode des Nachweisens eines CD22-Proteins in einer biologischen Probe generell die Schritte des Kontaktierens der biologischen Probe mit einem Antikörper, welcher unter immunologisch reaktiven Bedingungen spezifisch auf das CD22-Protein reagiert. Der Antikörper darf an das CD22-Protein unter immunologisch reaktiven Bedingungen binden, und das Vorhandensein des gebundenen Antikörpers wird direkt oder indirekt nachgewiesen.

[0121] Obschon die vorliegende Erfindung anhand von Veranschaulichung und Beispielen für die Zwecke eines klaren Verständnisses in einiger Ausführlichkeit beschrieben worden ist, wird offensichtlich sein, dass bestimmte Veränderungen und Modifikationen innerhalb des Rahmens der Ansprüche im Anhang vorgenommen werden können.

Beispiel 1

[0122] Beispiel 1 beschreibt die Klonierung, Expression und Reinigung von rekombinanten Klonen, die

RFB4(scFv)PE38, RFB4 V_H-PE38 und RFB4 V_L exprimieren.

Klonierung

[0123] Gereinigtes RFB4 IgG wurde mit 10 mM DTT reduziert, und die leichten und schweren Ketten wurden auf 4-20% SDS PAGE (Novex) getrennt und auf eine PVDF-Membran getupft. Die Banden der leichten und schweren Ketten wurden aus der Membran ausgeschnitten und einer N-terminalen Sequenzanalyse unterzogen. Die N-terminale Aminosäure-Analyse ergab die Sequenzdaten sowohl für die leichte als auch die schwere Kette des RFB4 mAb, die in [Fig. 1](#) angegeben sind.

[0124] Um cDNAs zu erhalten, die für die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten von RFB4 codieren, wurde die Gesamt-RNA aus RFB4-Hybridomzellen präpariert und revers transkribiert, um die Erststrang-cDNA zu erhalten. Anschließend wurde eine PCR vorgenommen, um die schweren und die leichten Ketten zu amplifizieren. Primer, die für die schwere und die leichte Kette spezifisch sind, wurden basierend auf den Daten der N-terminalen Aminosäure synthetisiert, und die Amplifikation wurde unter Verwendung dieser Primer zusammen mit Primern aus den konstanten Regionen CH1 (schwer) und C_κ (leicht) verwendet. Dies führte zu der Amplifikation des variablen Abschnitts der schweren Kette plus eines Teils von CH1 und der Amplifikation der variablen Region der leichten Kette plus eines Teils von C_κ. Die PCR-Amplifikation wurde vorgenommen, wie beschrieben bei Benhar I. und Pastan I. (1994), Protein Eng. 7, 1509-1515, mit der Ausnahme, dass die Gesamt-RNA und RFB4-spezifische 5'-Primer RFB4 V_H5 und RFB4 V_L5 verwendet wurden, die aus den Daten der N-terminalen Proteinsequenz designed waren. Die Sequenzen aller bei der Klonierung verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Primer sind von 5' nach 3' angegeben. Die Primer γCH1 und C_κ wurden wie beschrieben designed (Benhar und Pastan, 1994). RFB4 V_H5 und RFB4 V_L5 wurden entsprechend den N-terminalen Proteinsequenzen designed, wie durch Edman-Abbau bestimmt. RFB4 V_H5 codiert eine NdeI-Stelle (fett gedruckt) und ein Initiator-Met (fett und kursiv gedruckt). RFB4 V_L3 codiert eine HindIII-Stelle (kursiv gedruckt). Die Primer RFB4 V_H3 und RFB4 V_L3 wurden entsprechend der Nukleotidsequenz designed, die aus den cDNA-Klonen bestimmt wurde. Die Primer RFB4 V_H3 und RFB4 V_L5 enthalten partielle Gly₄Ser-Linkersequenzen, die teilweise überlappen (unterstrichen und kursiv gedruckt). Primer RFB4 V_L3 dsFv mutiert den V_LGly₁₀₀-Rest zu Cys (unterstrichen), enthält ein Terminatorcodon (fett gedruckt) und eine EcoRI-Stelle (kursiv gedruckt). Primer RFB4 V_H dsFv(cys) mutiert V_HArg₄₄ zu Cys (unterstrichen). RFB4 V_H3 dsFv enthält ein zusätzliches Lys-Codon und eine HindIII-Stelle (kursiv gedruckt). RFB4 V_L5 dsFv enthält eine NdeI-Stelle (fett gedruckt) und ein Initiator-Met (fett und kursiv gedruckt).

Tabelle 1

Tabelle 1. PCR-Primer	
Schwerketten-Primer	
RFB4 VH5	GGACCTCAATTTGGAAAGTGCAGCTGGTGGAGTCT _λ (Seq ID No: 6)
γCHL	AGCAGATCCAGGGGCCAGTGGATA _λ (Seq ID No: 7)
RFB4 VH3	AGATCCGGCCACCAACCGGATTCGGCTTCGGCTGCAGAGACAGTGCACAGAGTCCC _λ (Seq ID No: 8)
RFB4 VH3 dsFv	CCGGAAGCTTTTGCAGAGACAGTGACCC _λ (Seq ID No: 9)
RFB4 VH dsFv (cys)	GACCCACTCCAGGGCACTTCTCCGGAGTC _λ (Seq ID No: 10)
Leichtketten-Primer	
RFB4 VL5	GGTGGCGGATTTGGAGGTGGGGAAGGAGATATCCAGATGACACAGACT _λ (Seq ID No: 11)
C-K	TGGTGGGAAGATGGATACAGTTGG _λ (Seq ID No: 12)
RFB4 VL3	CCGGAAGCTTTGATTTCCAGCTTGG _λ (Seq ID No: 13)
RFB4 VL5 dsFv	GGACCTCATATGGATATCCAGATGACCC _λ (Seq ID No: 14)
RFB4 VL3 dsFv	CCGGAATTGATTTTGTATTTCCAGCTTGGTGGTGGCCGCAACCGATCC _λ (Seq ID No: 15)

Die Primer sind von 5' nach 3' angegeben. Die Primer gammaCH1 und C-k wurden wie beschrieben designed (Benhar und Pastan, 1994). RFB4 VH5 und RFB4 VL5 wurden entsprechend den N-terminalen Proteinsequenzen designed, wie durch Edman-Abbau bestimmt. RFB4 VH5 codiert eine NdeI-Stelle (fett gedruckt) und ein Initiator-Met (fett und kursiv gedruckt). RFB4 VL3 codiert eine HindIII-Stelle (kursiv gedruckt). Die Primer RFB4 VH3 und RFB4 VL3 wurden entsprechend der Nukleotidsequenzen designed, die aus den cDNA-Klonen bestimmt wurde. Die Primer RFB4 VH3 und RFB4 VL5 enthalten partielle Gly4Ser-Linkersequenzen, die teilweise überlappen (unterstrichen und kursiv gedruckt). Primer RFB4 VL3 dsFv mutiert den VL Gly100-Rest zu Cys (unterstrichen), enthält ein Terminatorcodon (fett gedruckt) und eine EcoRI-Stelle (kursiv gedruckt). Primer RFB4 VH dsFv (cys) mutiert VH Arg44 zu Cys (unterstrichen). RFB4 VH3 dsFv enthält ein zusätzliches Lys-Codon und eine HindIII-Stelle (kursiv gedruckt). RFB4 VL5 dsFv enthält eine NdeI-Stelle (fett gedruckt) und ein Initiator-Met (fett und kursiv gedruckt).

[0125] Die PCR-Produkte wurden in den PCR-Kloniervektor (Invitrogen) kloniert und unter Verwendung von Sequenase (US Biochemical Corp.) Reagentien und Protokollen sequenziert. Das Nukleotid und die hergeleiteten Aminosäuresequenzen von V_H und V_L sind in [Fig. 1](#) gezeigt.

[0126] V_H und V_L wurden unter Verwendung von RFB4 V_H5- und RFB4 V_L5-Primern und den neuen RFB4-spezifischen Primern, RFB4 V_H3 und RFB4 V_L3, basierend auf der 3' DNA-Sequenz, nochmals amplifiziert. V_H3 und V_L3 waren daraufhin designed, sich mit dem 3'-Ende jeder cDNA zu vereinigen. V_H3 und V_L5 enthalten überlappende Sequenzen, die einen flexiblen Gly₄Ser-Peptidlinker codieren, der zur Verbindung der V_H- und V_L-Ketten verwendet wird ([Fig. 2A](#)). Eine rekombinante PCR wurde unter Verwendung der amplifizierten leichten und schweren Ketten vorgenommen, um ein V_H-Linker-V_L-Produkt zu schaffen, das dann zur Ersetzung des V_H-Linker-V_L des Plasmids pUL17 an den NdeI- und HindIII-Stellen verwendet wurde, was pEM9 schuf. Dieses codiert das RFB4 V_H-Linker-V_L-PE38-Fusionskonstrukt, bezeichnet als RFB4(scFv)PE38 ([Fig. 2A](#)).

[0127] Der Bindungsabschnitt der Disulfid-verknüpften Immunkonjugate besteht aus V_H- und V_L-Ketten, die durch einen einzigen Schlüsselrest in jeder Kette kovalent verknüpft sind, der zu Cystein mutiert worden ist.

Die Cysteinreste jeder Kette assoziieren, um eine Disulfidbindung zu bilden, die im allgemeinen sehr stabil ist und eine verminderte Neigung des Immuntoxins zum Aggregieren zeigt. Reiter et al., (1994), Biochemistry 33,5451-9. Um RFB4(dsFv)PE38 herzustellen, wurde V_L unter Verwendung eines 5'-Primers, RFB4 V_L 5 dsFv, amplifiziert, wodurch eine NdeI-Stelle eingeführt wurde, und eines 3'-Primers, RFB4 V_L 3 dsFv, wodurch ein Terminationscodon, eine EcoRI-Stelle eingeführt wurde, und ein Glycinrest 100 zu Cystein mutiert wurde. V_H wurde unter Verwendung von RFB4 V_H 5 und RFB4 V_H 3 dsFv amplifiziert, was eine HindIII-Stelle und einen Lysinrest an dem C-Terminus von V_H einführt. Die PCR-Produkte wurden mit NdeI und entweder HindIII (V_H) oder EcoRI (V_L) verdaut und wurden zur Ersetzung des V_H -Linker- V_L von pUL17 (V_H) oder zur Ersetzung des gesamten V_H -Linker- V_L -PE38 (V_L) verwendet. Das klonierte Produkt pEM16 (das RFB4 V_L -Cys₁₀₀ codiert) wurde sequenziert, und es wurde gezeigt, dass die Gly zu Cys-Mutation inkorporiert worden war (Fig. 2B). V_H -PE38 wurde mutagenisiert, um Arg44 zu Cys auszutauschen, unter Verwendung des Muta-Gene-ortsgerichteten Mutagenese-Kits und Protokolls (Bio-Rad) und eines phosphorylierten Primers RFB4 V_H dsFv (Cys). Das resultierende mutierte Konstrukt, pEM15, wurde sequenziert, und es wurde gezeigt, dass die Arg zu Cys-Mutation inkorporiert worden war (Fig. 2B). Klone, die die Cys44-Mutation inkorporiert hatten, wurden mittels DNA-Sequenzierung identifiziert (Fig. 2B).

Expression und Reinigung von rekombinanten Klonen

[0128] Expressionsplasmide, die für RFB4(scFv)PE38, RFB4 V_H -PE38 und RFB4 V_L (d. h. pEM10, und pEM15 und pEM16) codieren, wurden separat in E. coli BL21 (ADE3) exprimiert. Studier F. W. und Moffatt B. A. (1986), J. Mol. Biol. 189, 113-130. Kulturen von transformierten Bakterien wurden mit IPTG für eine hochgradige Expression induziert, wobei sich die Proteinenprodukte in Einschlusskörpern anhäuferten. Einzelkettige und Disulfid-verknüpfte Immuntoxine wurden durch Rückfaltung von gereinigtem Einschlusskörper-Protein hergestellt, wie allgemein beschrieben. Buchner J., Pastan I. und Brinkmann U. (1992), Anal. Biochem. 205, 263-270. Kurz gesagt wurden Einschlusskörper aus Zellpaste durch Lyse und Waschen in nicht-ionischem Detergens präpariert, dann in 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M Tris, pH 8, 2 mM EDTA, solubilisiert. Solubilisiertes Protein zu 10 mg/ml wurde mit 10 mg/ml DTE (65 mM) reduziert, dann schnell in 100 Vol. an 0,1 M Tris, 0,5 M L-arginin, 0,9 mM oxidiertes Glutathion, 2 mM EDTA bei 10°C verdünnt. Gleiche Gewichtsmengen an V_L und PE38 wurden zur Rückfaltung von RFB4(dsFv)PE38 verwendet. Einzelkettiges Immuntoxin wurde in Puffer rückgefaltet, der auf pH 8 (Raumtemperatur) eingestellt war, und dsFv wurde in Puffer rückgefaltet, der auf pH 9,5 (Raumtemperatur) eingestellt war. Immuntoxine durften sich für 48 Stunden rückfalten, wurden dann gegen 100 mM Harnstoff, 20 mM Tris, pH 8 zu einer Leitfähigkeit von weniger als 3,5 mS/cm dialysiert. Korrekt rückgefaltete Proteine wurden mittels sequenzieller Anionenaustausch-FPLC auf Q-Sepharose und MonoQ (Pharmacia, Arlington Heights, IL) gereinigt, gefolgt von einer Gelfiltration auf 30 ml TSK G3000SW (TosoHaas, Montgomeryville, PA). Die gereinigten Immuntoxine wurden bei -80°C gelagert.

Beispiel 2

[0129] Beispiel 2 beschreibt einen Bindungsassay zur Untersuchung der relativen Bindungsaffinitäten der rekombinanten Immuntoxine.

[0130] Die relativen Bindungsaffinitäten der rekombinanten Immuntoxine wurden mittels der Konkurrenz gegen ¹²⁵I-markiertes RFB4 IgG um die Bindung an CA46 Zielzellen bei 4°C gemessen. Zu > 10⁶/ml gezüchtete CA46-Zellen wurden zweimal in eiskaltem Bindungspuffer (RPMI, 50 mM BES, pH 6,8, 1% BSA) gewaschen und bei 10⁶ Zellen/150 µl Bindungspuffer/Well in 96-Well-Platten auf Eis ausplattiert. Den Zellen wurden 0,35 ng an ¹²⁵I-RFB4 (2,5 × 10⁹ cpm/nmol) in Bindungspuffer und variierende Konzentrationen an RFB4(Fv)PE38 und RFB4(dsFv)PE38 zugegeben. Die Zellen wurden für 3 Stunden auf Eis inkubiert, zweimal in kaltem Bindungspuffer gewaschen und in 200 µl an 0,5% SDS/TE solubilisiert. Gebundener ¹²⁵I-RFB4 wurde auf einem Wallace 1470 Wizard-Gammazähler quantifiziert. Die Mittelwerte der Duplikatproben wurden für die Berechnungen verwendet. Wie in Fig. 4 gezeigt, wurde eine 50% Reduktion der Bindung von ¹²⁵I-RFB4 IgG an CA46-Zellen bei 70 nM RFB4(scFv)PE38 und an Daudi bei 90 nM RFB4(scFv)PE38 erzielt. Die Bindung an CA46-Zellen war bei 10 nM RFB4(dsFv)PE38 um 50% reduziert. Nativer RFB4 IgG reduzierte die Bindung von markiertem RFB4 IgG an CA46-Zellen um 50% bei 4,5 nM und an Daudi-Zellen bei 10 nM.

Beispiel 3

[0131] Beispiel 3 beschreibt eine Stabilitätsstudie von RFB4(dsFv)PE38 und RFB4(scFv)PE38 für ausgedehnte Perioden bei 37°C.

[0132] Die Stabilität von PE-basierten rekombinanten Immuntoxinen ist mit ihrer Aktivität in vitro korreliert

worden. Benhar I. und Pastan I. (1994), Protein Eng. 7, 1509-1515. Demgemäß wurde RFB4(dsFv)PE38 bei 37°C für 1-7 Tage inkubiert, und seine zytotoxische Aktivität nach der Inkubation wurde zu der von unbehandeltem Immuntoxin verglichen. RFB4(Fv)PE38 wurde für 2-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zytotoxizitäten der behandelten Proben wurden mit Proben verglichen, die bei -80°C gelagert wurden. Übereinstimmend mit dem zuverigen Befund einer hohen Stabilität der dsFv-Immuntoxine bei 37°C, war RFB4(dsFv)PE38 auch sehr stabil über die gesamten 7 Tage, wie durch die Aufrechterhaltung der vollen zytotoxischen Aktivität in einem 24-Stunden-Assay bewertet (Fig. 5). In ähnlichen Assays verlor RFB4(Fv)PE38 keine Zytotoxizität nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C.

Beispiel 4

[0133] Beispiel 4 beschreibt Zytotoxizitäts-Assays unter Verwendung einer Vielfalt von Zelltypen.

[0134] RFB4(scFv)PE38 und RFB4(dsFv)PE38 (Fig. 3) wurden an fünf Burkitt-Lymphom-Zelllinien (CA46, Daudi, JD38, Namalwa und Raji) und HUT 102, einer T-Zelllinie, die CD22-negativ ist, getestet. Daudi-, Raji- und Namalwa-Zellen wurden bezogen von ATTC, Rockville, MD. Die Zellen wurden in RPMI 1640 gehalten, das 20% (Daudi) oder 10% fötales Rinderserum (FBS) (alle anderen Linien), 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und zusätzlich 2 mM L-Glutamin enthielt. Für die Zytotoxizitäts-Assays wurden 4×10^4 Zellen/Well in 200 µl Kulturmedium in 96-Well-Platten ausplattiert. Die Immuntoxine wurden seriell in PBS/0,2% HSA verdünnt, und 10 µl wurden den Zellen zugegeben. Die Platten wurden für die angegebenen Zeiträume bei 37°C inkubiert, dann mit 1 µCi/Well ^3H -Leucin in 10 µl PBS für 4-5 Stunden bei 37°C gepulst. Radiomarkiertes Material wurde auf Filtermatten eingefangen und in einem Betaplatten-Szintillationszähler (Pharmacia, Gaithersburg, MD) gezählt. Die Triplikat-Probenwerte wurden gemittelt und die Hemmung der Proteinsynthese durch Berechnen des prozentualen Einbaus im Vergleich zu Kontroll-Wellen ohne zugegebenes Toxin bestimmt.

[0135] RFB4(dsFv)PE38 war generell 2-7 mal zytotoxischer als RFB4(scFv)PE38 gegenüber den Burkitt-Linien, und keines wies eine signifikante zytotoxische Aktivität gegenüber den Nicht-B-Zelllinien auf (Tabelle II).

Tabelle II. Zytotoxizität von RFB4(scFv)PE38 und RFB4(dsFv)PE38 gegenüber verschiedenen Zelllinien

Zytotoxizität IC_{50} (ng/ml) ^b		
Zelllinie ^a	Quelle RFB4(scFv)PE38	RFB4(dsFv)PE38
CA46	Burkitt-Lymphom 2	0,6
Daudi	30	20
JD-38	2	0,3
Namalwa	2	1,5
Raji	2,5	0,4
HUT 102	T-Zell-Leukämie > 1000	> 1000

^a Alle Zelllinien sind von menschlichem Ursprung

^b Zytotoxizitäts-Daten sind als IC_{50} angegeben, welches die Konzentrationen an Immuntoxin sind, die eine 50% Reduktion der Proteinsynthese im Vergleich zu den Kontrollen nach der Inkubation mit Zellen für 24 Stunden bewirken.

[0136] Von den getesteten B-Zelllinien gab es Variationen in der Empfindlichkeit beider RFB4-Immuntoxine, wobei RFB4(dsFv)PE38 einen IC_{50} -Wert im Bereich von 0,25-0,6 ng/ml auf CA46, JD38 und Raji, und von 1,5 ng/ml auf Namalwa und 20 ng/ml auf Daudi aufwies (Tabelle II). Nachfolgende Studien haben gezeigt, dass Daudi-Zellen PE38 nicht wirksam prozessieren können. Die zytotoxische Aktivität des RFB4(dsFv)PE38-Immuntoxins schneidet bei einem Vergleich auf einer molaren Basis mit dem RFB4-PE35-Immuntoxin, das durch Binden von PE35 an den RFB4-Antikörper über eine Disulfid-Bindung konstruiert war, günstig ab.

Beispiel 5

[0137] Beispiel 5 beschreibt die zeitliche Messung der zytotoxischen Aktivität von RFB4(dsFv)PE38.

[0138] Die Zeit, die die Zellen zum Internalisieren und Prozessieren von Immuntoxin benötigen, ist von the-

therapeutischem Interesse, da die Blutspiegel an Immuntoxin in behandelten Patienten oberhalb eines zytotoxischen Grenzwerts für eine ausreichend lange Zeit verbleiben müssen, um die malignen Zellen zu intoxizieren. Daher wurde das Zeiterfordernis für die Zytotoxizität untersucht.

[0139] RFB4(dsFv)PE38-Verdünnungen wurden mit CA46- und JD38-Zellen für 2, 24 und 48 Stunden in standardmäßigen Zytotoxizitäts-Assays inkubiert, und mit Ausnahme bei der für den 2-Stunden-Zeitpunkt wurde das Immuntoxin aus dem Medium durch Waschen mit RPME + 10% FCS entfernt und durch standardmäßiges Medium für die verbliebenen 22 Stunden des Assays ersetzt. Für die 48-Stunden-Assays wurden die Zellen kontinuierlich für 48 anstelle von 24 Stunden inkubiert.

[0140] Der 2-stündigen Exposition folgten weitere 22 Stunden der Inkubation in Immuntoxinfreiem Medium, um eine gewisse Zeit für das intrazelluläre Trafficking einzuräumen, das für die Intoxikation erforderlich ist. Sowohl bei CA46- als auch JD38-Zellen verminderte die Erhöhung der Expositionszeit an Immuntoxin von 2 auf 24 Stunden die IC_{50} um das 5-10-fache. Die kontinuierliche Inkubation der Zellen für 48 Stunden mit RFB4(dsFv)PE38 führte zu einer geringen, sofern überhaupt, zusätzlichen Wirkung auf die Zytotoxizität gegenüber der, die nach einer 24-stündigen Inkubation beobachtet wurde. Daher wurde gefolgert, dass die verwendeten Zelllinien eine mehr als 2-stündige Exposition erfordern, um die maximalen Mengen an Immuntoxin zu binden und zu internalisieren, und nach 24 Stunden zu nahezu dem größt möglichen Umfang intoxiziert sind. Eine Erhöhung der Exposition auf Zeiträume von mehr als 24 Stunden erbringt keinerlei Vorteil in vitro.

Beispiel 6

[0141] Beispiel 6 beschreibt eine Toxizitätsstudie von RFB4(dsFv)PE38 und RFB4(Fv)PE38 in Mäusen und deren Hemmung der CA46-Tumoretablierung.

[0142] Die ausgezeichnete Zytotoxizität und Stabilität von RFB4(dsFv)PE38 in vitro sagte voraus, dass dieses Molekül eine gute Antitumor-Aktivität in einem Tiermodell des Lymphoms ergeben würde. Die Fähigkeit von RFB4(dsFv)PE38, den Tumorwuchs in einem subkutanen festen Tumormodell zu hemmen, wurde anfänglich unter Verwendung von CA46-Burkitt-Lymphomzellen, die in Nackmäuse injiziert wurden, ausgewertet. Zwei Protokolle wurden verwendet. In dem ersten Protokoll wurden Mäuse am Tag -4 bestrahlt und mit 5×10^6 CA46-Zellen injiziert. Die Mäuse wurden in Gruppen von fünf aufgeteilt und beginnend 24 Stunden nach der Injektion von CA46-Zellen für vier aufeinander folgende Tage (Tage 1-4) mit verschiedenen Mengen an Immuntoxin, zusätzlich zu der Verdünnungsmittel-Kontrolle, behandelt ([Fig. 6A](#)). In dem zweiten Protokoll wurden weibliche athymische Nacktmäuse am Tag -3 bestrahlt und dann mit 10^7 CA46-Zellen am Tag 0 subkutan injiziert ([Fig. 6B](#)). Die Tumolvolumina wurden für 21 Tage aufgezeichnet, und Mäuse, die keine Tumoren entwickelten, wurden für weitere 80 Tage überwacht.

Toxizität in Mäusen

[0143] Eine einleitende Studie wurde vorgenommen, um die Toxizität der Immuntoxine in Mäusen zu bestimmen. 6-8 Wochen alte weibliche Balb/C-Mäuse wurden von dem National Cancer Institute, Frederick, MD, erhalten. Die LD_{50} -Werte vielfacher i. v.-Dosen wurden bei einem Behandlungsschema von Dosis \times 3 qod (an jedem zweiten Tag) bestimmt. Verschiedene Mengen an Immuntoxinen wurden zu 200 μ l mit PBS/0,2% HSA verdünnt und in die Schwanzvenen an jedem zweiten Tag für 3 Dosen injiziert. Zwei Mäuse wurden mit jeder Dosis injiziert, und die Mäuse wurden auf Gewichtsverlust und Tod für 14 Tage nach der letzten Injektion überwacht.

Hemmung der CA46-Tumoretablierung

[0144] 6-8 Wochen alte weibliche athymische Nacktmäuse wurden von dem National Cancer Institute, Frederick, MD, erhalten. Die Mäuse wurden mit 300 Rad Gammabestrahlung 3 oder 4 Tage vor der Injektion von malignen Zellen behandelt. CA46-Zellen wurden bei $1,8 \times 10^5$ /ml 2 Tage vor der Injektion ausgesät. Am Tag 0 wurden CA46-Zellen in RPMI ohne Serum gewaschen und entweder auf 10^8 Zellen/ml oder 5×10^6 Zellen/ml in RPME eingestellt. Jede Maus erhielt 100 μ l der Zellsuspension durch subkutane Injektion. Die Mäuse wurden mittels Schwanzvenen-Injektion täglich für 4 aufeinander folgende Tage mit verschiedenen Mengen der Immuntoxine oder mit Kontrollmaterialien in 200 μ l-Volumina behandelt. Das Auftreten von Tumoren wurde täglich oder an jedem zweiten Tag für 21 Tage nach der ersten Behandlung überwacht. Mäuse, bei denen keinerlei nachweisbarer Tumor nach 21 Tagen gewachsen war, wurden für bis zu 100 Tage auf das Wachstum von Tumoren an der Injektionsstelle überwacht. Mäuse, die unter Verwendung des zweiten Protokolls beimpft und mit 5 oder 3 μ g RFB4(dsFv)PE38 behandelt waren, entwickelten sehr kleine Tumorknötchen, die sich auf

die Behandlung bei allen Mäusen mit der 5 µg-Dosis und bei 9 von 10 Mäusen mit der 3 µg-Dosis hin vollständig zurück entwickelten. Die Behandlung mit 1 µg Immuntoxin verzögerte die Tumorentwicklung während der Beobachtungsperiode signifikant, erzielte aber keine Heilungen.

Immuntoxin-Aktivität gegen etablierte CA46-Tumoren

[0145] Der Erfolg der Antitumor-Experimente (oben) ermutigte eine Untersuchung der Fähigkeit von RFB4(dsFv)PE38, etablierte Tumoren auszumerzen. Athymische weibliche Nacktmäuse wurden am Tag -3 bestrahlt und dann mit 10^7 CA46-Zellen am Tag 0 injiziert. Bis zum Tag 4 waren bei der Mehrheit der Mäuse Tumoren gewachsen, die 5×5 mm in der Größe waren. Beginnend an Tag 4 wurden die Tumor-tragenden Mäuse täglich für 4 Tage oder an jedem zweiten Tage für 3 Tage behandelt. Die Behandlung wurde durch Injektion in die Schwanzvene für 5 aufeinander folgende Tage mit verschiedenen Mengen an Immuntoxin oder mit Kontrollmaterialien verabreicht. Die Tumorgöße wurde täglich oder an jedem zweiten Tag unter Verwendung von Präzisionscalipern überwacht. Das Tumolvolumen wurde anhand der Formel $v = l(w^2) \times 0,4$ berechnet, worin l die Länge und w die Breite ist.

[0146] Unter Anwendung beider Behandlungsprotokolle wurde die Hemmung des Tumorwachstums bei einer Dauer von einer Woche bis 10 Tagen nach der letzten Verabreichung des Immuntoxins beobachtet ([Fig. 7A](#), [Fig. 7B](#)). Diese Antitumor-Reaktionen wurden unter Verwendung von 8, 5 oder 3 µg RFB4(dsFv)PE38 erzielt. Die Tumoren in allen behandelten Mäusen nahmen schließlich das Wachstum wieder auf. Dosen von 30 µg RFB4 IgG alleine hemmten das Wachstum der Tumoren nicht signifikant, wohingegen 1 µg RFB4(dsFv)PE38 das Wachstum während der Periode der Verabreichung des Immuntoxins hemmen konnte. Geimpfte und entweder mit 5 oder 2 µg Immuntoxin behandelte Mäuse entwickelten kleine Tumorzellknötchen, die sich auf die Behandlung hin zurück entwickelten und dann langsam wiederkehrten. Die Behandlung mit 1 µg Immuntoxin verzögerte die Tumorentwicklung im Vergleich zu den Kontrollen, doch wuchsen die Tumoren darauf hin schnell.

[0147] Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen, dass beide Immuntoxin-Moleküle bei 37°C für ausge dehnte Inkubationszeiten stabil sind. Die Zytotoxizitäts-Profile an mehreren Antigen-positiven und Antigen-negativen Zelllinien zeigten, dass die rekombinanten Moleküle in hohem Maße und selektiv toxisch gegenüber CD22-tragenden Zellen waren und nicht-toxisch gegenüber CD22-negativen Linien waren. Die Dauer der Inkubation, die für die maximale Intoxikation der Zellen erforderlich war, wurde als größer 2 Stunden bestimmt, doch wurde wenig zusätzlicher Nutzen bei Inkubationsdauern von größer als 24 Stunden festgestellt. Die Stabilität der RFB4-Immuntoxine ist daher mit der Zeit kompatibel, die für eine wirksame Intoxikation erforderlich ist.

[0148] RFB4(dsFv)PE38 ist etwa 2-7-mal aktiver gegenüber allen empfindlichen Zelllinien als RFB4(scFv)PE38, obschon beide ähnliche Stabilitäten nach 24 Stunden zeigen. Kompetitions-Bindungsstudien dieser rekombinanten Moleküle, verglichen zu dem markierten Voll-IgG, ergaben einen Unterschied hinsichtlich der Fähigkeit, um die Bindung zu konkurrieren, und eine gefolgerte verminderte Affinität von RFB4(scFv)PE38 für das CD22-Antigen.

[0149] Da das Disulfid-gebundene Immuntoxin recht stabil war, Bindungseigenschaften ähnlich dem Vollantikörper aufwies und hervorragende zytotoxische Wirkungen zeigte, wurde es für die weitere Auswertung in Tiermodellen gewählt. Seine Antitumor-Aktivität wurde durch Beurteilen seiner Fähigkeit ausgewertet, Tumoren auszumerzen, die durch die Injektion von CA46-Zellen in bestrahlte Nacktmäuse gebildet waren, und es wurde gezeigt, dass es Tumorzellen ausmerzen konnte, wenn die Verabreichung des Immuntoxins 24 Stunden nach der Tumorimplantation erfolgte, und eine signifikante Antitumor-Aktivität aufwies, wenn Mäusen mit etablierten Tumoren verabreicht. Verglichen zu mit Kontrolle behandelten Tumoren bewirkte die Behandlung mit irgendeiner Menge an RFB4(dsFv)PE38 von 1-8 µg, dass sich die Tumoren zurück entwickelten oder ein statisches Volumen bis zum Ende der Behandlungsperiode und bis zu 10 weiteren Tagen in Abhängigkeit von der Dosis beibehielten.

Beispiel 7

[0150] Dieses Beispiel beschreibt die Zytotoxizität von RFB4(dsFv)PE38 für CD22-positive maligne Zellen von menschlichen Patienten.

[0151] Sechzehn frische Proben von chronischen lymphozytischen Leukämiezellen wurden von verschiedenen menschlichen Patienten erhalten. Proben der Haarzell-Leukämie (HCL), des großzelligen Lymphoms

(LCL) und der prolymphozytischen Leukämie (PLL) wurden ebenfalls erhalten. Diese Zeilen wurden jeweils mit RFB4(dsFv)PE38 für 24 Stunden wie oben in Beispiel 4 beschrieben in einem Zytotoxizitäts-Assay inkubiert. Die IC_{50} (ng/mL) von RFB4(dsFv)PE38 für jede Zellprobe ist in nachstehender Tabelle III angegeben. Ebenfalls für Vergleichszwecke angegeben ist die Anzahl der CD22-Stellen/Zelle. Es ist interessant, festzustellen, dass selbst Zellen mit relativ geringen Anzahlen an CD22-Stellen pro Zelle durch das Immuntoxin wirksam abgetötet wurden. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass RFB4(dsFv)PE38 für viele frische humane chronische lymphozytische Leukämiezellen signifikant toxisch ist.

Tabelle III

EMPFINDLICHKEIT FRISCHER HUMANER LEUKÄMIEZELLEN FÜR RFB4(dsFv)PE38 (BL22)

PT DX #	IC_{50} (ng/mL) RFB4(Fv)PE38 (BL22)	CD22-Stellen/Zelle
1. CLL	10	1050
2. CLL	360	1400
3. CLL	43	430
4. CLL	11	680
5. CLL	> 1000	380
6. CLL	172	1070
7. CLL	> 1000	
8. CLL	86	2200
9. CLL	27	350
10. CLL	91	300
11. CLL	74	1200
12. CLL	61	800
13. CLL	560	1850
14. CLL	16,5	4700
15. CLL	14	4075
16. CLL	4	5040
17. HCL	1,8	
18. LCL	274	
19. PLL	31	600

Beispiel 8

[0152] RFB4(dsFv)PE38 zeigt eine potente Antitumor-Aktivität gegen CD22-positive Humantumoren in Mäusen.

[0153] CA46-Tumoren wurden in Mäusen etabliert, wie oben beschrieben. Mäuse in Gruppen von drei wurden intravenös mit RFB4(dsFv)PE38 injiziert. Die Dosierung wurde in $\mu\text{g/kg}$ jeden zweiten Tag $\times 3$ gegeben, wie in der folgenden Tabelle IV dargestellt.

[0154] Die vollständige Totalreaktion (Complete Response – CR, Total) ist ebenfalls angegeben. Eine bevorzugte wirksame Dosis, die aus diesem Test erkennbar ist, ist $275 \mu\text{g/kg}$ i. v. qod. $\times 3$.

[0155] In einem Toxizitätsassay in Tumor-etablierten Mäusen, bei dem die Dosierungen an RFB4(dsFv)PE38 bei $275 \mu\text{g/kg}$ bis zu $1200 \mu\text{g/kg}$ begannen, wurde eine LD_{10} bei $500 \mu\text{g/kg}$ i. v. qod $\times 3$ erhalten und wurde eine LD_{50} bei $900 \mu\text{g/kg}$ i. v. qod $\times 3$ erhalten. Siehe Tabelle V. Die Anzahl der getesteten Mäuse und die Zahl der Mortalitäten pro Dosierungsbereich ist angegeben.

[0156] In einem ähnlichen Antitumor-Assay in Mäusen wie oben wurde ein Test vorgenommen, bei dem

RFB4(dsFv)PE38 durch kontinuierliche Infusion i. p. bei den nachstehend angegebenen Dosierungen verabreicht wurde, wobei die Ergebnisse in nachstehender Tabelle VI angegeben sind. Folglich war der Wirkstoff in der Hemmung der Tumoraktivität in Mäusen wirksam.

Tabelle IV

Antitumor-Aktivität von RFB4(dsFv)PE38 in i. v. behandelten Mäusen

Dosis (µg/Kg qod × 3)	CR/total	% CR
0	0/13	0
200	4/5	80
275	14/14	100
345	7/7	100
Minimale wirksame Dosis = 275 µg/Kg i. v. qod × 3		

Tabelle V

Toxizität von RFB4(dsFv)PE38 in i. v. behandelten Mäusen

Dosis (µg/Kg qod × 3)	Todesfälle/total	% Mortalität
0	0/13	0
275	0/14	0
400	0/10	0
600	2/10	20
1200	4/5	80
LD ₁₀ = 500 µg/Kg i. v. qod. × 3		
LD ₅₀ = 900 µg/Kg i. v. qod. × 3		

Tabelle VI

Antitumor-Aktivität und Toxizität von RFB4(dsFv)PE38 durch kontinuierliche Infusion i. p. in Mäuse

Dosis	CRs	Todesfälle
50 µg/Kg/d	0/5	0/5
100 µg/Kg/d	5/5	0/5
200 µg/Kg/d	5/5	0/5
500 µg/Kg/d		4/5
1000 µg/Kg/d		5/5

Beispiel 9

Toleranz von Affen für RFB4(dsFv)PE38.

[0157] Da RFB4 an Primaten-CD22 bindet und nicht an murines CD22 bindet, wurden Toxikologie-Studien an Cynomolgus-Affen vorgenommen, die RFB4(dsFv)PE38 bis zu 500 µg/Kg i. v. qod × 3 gut vertrugen. Die an die Affen verabreichten Dosierungen waren wie folgt:

0,1 µg/Kg i. v. qod × 3
0,5 µg/Kg i. v. qod × 3
1,25 mg/Kg i. v. qod × 3
1,75 mg/Kg i. v. qod × 3
2,0 mg/Kg i. v. qod × 3

[0158] Die standardmäßigen Laborwerte wurden aus Serumproben erhalten, die an Tagen 2, 4, 6, 8, 15 und 21 genommen wurden und alle im normalen Bereich waren, außer, dass ein zweifacher oder geringerer Anstieg der Leberenzyme, Transaminasen und Kreatinin beobachtet wurde. Siehe [Fig. 9A](#) und [Fig. 9B](#). Somit kann RFB4(dsFv)PE38 in hohen Dosen an einen Säuger verabreicht werden, bei dem das CD22-Antigen durch den RFB4-Antikörper erkannt wird. Eine klinische Studie der Phase I am Menschen mit CD22-positiven Malignitäten ist geplant.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: The Government of the United States of America,
vertreten durch den Secretary of the
Department of Health and Human Services

(B) STRAßE:

(C) STADT: Bethesda

(D) STAAT: Maryland

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL (ZIP): 20892

(G) TELEFON: (301) 496-7056

(H) TELEFAX: (301) 402-0220

(I) TELEX:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Fitzgerald, David

(B) STRAßE: 1202 Azalea Drive

(C) STADT: Rockville

(D) STAAT: Maryland

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL (ZIP): 20852

(G) TELEFON:

(H) TELEFAX:

(I) TELEX:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Pastan, Ira

(B) STRAßE: 11710 Beall Mountain Road

(C) STADT: Potomac

(D) STAAT: Maryland

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL (ZIP): 20892-4255

(G) TELEFON:

(H) TELEFAX:

(I) TELEX:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Mansfield, Elizabeth

(B) STRAßE: 4710 Bethesda Avenue, Apartment 408

(C) STADT: Bethesda

(D) STAAT: Maryland

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL (ZIP): 20814

(G) TELEFON:

(H) TELEFAX:

(I) TELEX:

- (i) ANMELDER:
 - (A) NAME: Kreitman, Robert
 - (B) STRAßE: 11915 Reynolds Avenue
 - (C) STADT: Potomac
 - (D) STAAT: Maryland
 - (E) LAND: USA
 - (F) POSTLEITZAHL (ZIP): 20854
 - (G) TELEFON:
 - (H) TELEFAX:
 - (I) TELEX:
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: Rekombinante Antikörper und Immunkonjugate, gerichtet auf CD22-tragende Zellen und Tumoren
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 15
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADDRESSAT: Townsend and Townsend and Crew LLP
 - (B) STRAßE: Two Embarcadero Center, Achter Stock
 - (C) STADT: San Francisco
 - (D) STAAT: Kalifornien
 - (E) LAND: USA
 - (F) POSTLEITZAHL (ZIP): 94111-3834
- (iv) COMPUTERLESBARE FORM:
 - (A) MEDIUMTYP: Floppy-Disk
 - (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0 Version #1.30
- (vi) DERZEITIGE ANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSNUMMER: WO PCT/US98/05453
 - (B) ABLAGEDATUM: 19. MÄRZ 1998
 - (C) KLASSIFIKATION:
- (vi) VORHERIGE ANMELDUNGSDATEN:
 - (A) ANMELDUNGSNUMMER: US 60/041.437
 - (B) ABLAGEDATUM: 20. MÄRZ 1997
- (viii) ANWALT / AGENT-INFORMATION:
 - (A) NAME: Weber, Ellen Lauver
 - (B) REGISTRATIONSNUMMER: 32.762
 - (C) REFERENZ/LISTENNUMMER: 15280-3171PC
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONS-INFORMATION:
 - (A) TELEFON: (415) 576-0200
 - (B) TELEFAX: (415) 576-0300

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 1:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.
 - (A) LÄNGE: 369 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: DNA

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LOKALISATION: 1...369
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Produkt= „RFB4-Schwerkette“

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1:

GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC GCT TTC AGT ATC TAT	96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr	
20 25 30	
GAC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCG GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC	144
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
GCA TAC ATT AGT AGT GGT GGT GGT ACC ACC TAC TAT CCA GAC ACT GTG	192
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val	
50 55 60	
AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
GCA AGA CAT AGT GGC TAC GGT AGT AGC TAC GGG GTT TTG TTT GCT TAC	336
Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr	
100 105 110	
TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA	369
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
115 120	

- (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 2:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.
- (A) LÄNGE: 123 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLART: Protein

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2:

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 321 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LOKALISATION: 1...321
 (D) WEITERE INFORMATION: /Produkt= „RFB4-Leichtkette“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 3:

GAT ATC CAG ATG ACC CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT GCC TCT CTG GGA	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
GAC AGA GTC ACC ATT AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAC ATT AGC AAT TAT	96
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr	
20 25 30	
TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT AAA CTC CTG ATC	144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
TAC TAC ACA TCA ATA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC	192
Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
AGT GGG TCT GGA ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATT AGC AAC CTG GAG CAA	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln	
65 70 75 80	
GAA GAT TTT GCC ACT TAC TTT TGC CAA CAG GGT AAT ACG CTT CCG TGG	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp	
85 90 95	

ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 107 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 4:

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

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 5:

Gly Gly Gly Ser
 1

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISATION: 1...33
- (D) WEITERE INFORMATION: /Kennzeichen= „RFB4 VH5-Schwerketten-Primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 6:

GGACCTCATA TGGAAGTGCA GCTGGTGGAG TCT

33

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL:
- (B) LOKALISATION: 1...24
- (D) WEITERE INFORMATION: /Kennzeichen= „Gamma-CH1-Schwerketten-Primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 7

AGCAGATCCA GGGGCCAGTG GATA

24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL:
- (B) LOKALISATION: 1...54
- (D) WEITERE INFORMATION: /Kennzeichen= „RFB4 VH3-Schwerketten-Primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 8:

AGATCCGCCA CCACCGGATC CGCCTCCGCC TGCAGAGACA GTGACCAGAG TCCC 54

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL:
- (B) LOKALISATION: 1...27
- (D) WEITERE INFORMATION: /Kennzeichen= „RFB4 VH3 dsFv-Schwerketten-Primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 9:

CCGGAAGCTT TTGCAGAGAC AGTGACC 27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL:
- (B) LOKALISATION: 1...28
- (D) WEITERE INFORMATION: /Kennzeichen= „RFB4 VH dsFv(cys)-Schwerketten-Primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 10:

GACCCACTCC AGGCACTTCT CCGGAGTC 28

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL:
 (B) LOKALISATION: 1...48
 (D) WEITERE INFORMATION: /Kennzeichen= „RFB4 VL5-
 Leichtketten-Primer“
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 11:

GGTGGCGGAT CTGGAGGTGG CGGAAGCGAT ATCCAGATGA CACAGACT 48

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 12:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.
 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: DNA
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL:
 (B) LOKALISATION: 1...24
 (D) WEITERE INFORMATION: /Kennzeichen= „C-Kappa-
 Leichtketten-Primer“
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 12:

TGGTGGGAAG ATGGATACAG TTGG 24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 13:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.
 (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLART: DNA
- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL:
 (B) LOKALISATION: 1...25
 (D) WEITERE INFORMATION: /Kennzeichen= „RFB4 VL3-
 Leichtketten-Primer“
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 13:

CCGGAAGCTT TGATTTCAG CTTGG 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL:
- (B) LOKALISATION: 1...28
- (D) WEITERE INFORMATION: /Kennzeichen= „RFB4 VL5 dsFv-Leichtketten-Primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 14:

GGACCTCATA TGGATATCCA GATGACCC

28

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN.

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: Einzel-
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL:
- (B) LOKALISATION: 1...48
- (D) WEITERE INFORMATION: /Kennzeichen= „RFB4 VL3 dsFv-Leichtketten-Primer“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 15:

CCGGAATTCA TTATTTGATT TCCAGCTTGG TGCCGCAACC GAACGTCC

48

Patentansprüche

1. Rekombinantes Immunkonjugat, umfassend ein therapeutisches Mittel oder ein nachweisbares Markerpeptid, das kovalent an ein RFB4-Bindungsfragment gebunden ist, umfassend eine V_H-Kette mit einem Cystein an Aminosäure-Position 44 und eine V_L-Kette mit einem Cystein an Aminosäure-Position 100, wobei die V_H-Kette wenigstens 90% Identität zu SEQ ID NR. 2 über ein Vergleichsfenster von 10-20 Aminosäuren aufweist und die V_L-Kette wenigstens 90% Identität zu SEQ ID Nr. 4 über ein Vergleichsfenster von 10-20 Aminosäuren aufweist.

2. Rekombinantes Immunkonjugat nach Anspruch 1, wobei die V_H-Kette wenigstens 80% Identität zu SEQ ID NR. 2 aufweist und die V_L-Kette wenigstens 80% Identität zu SEQ ID Nr. 4 aufweist.

3. Rekombinantes Immunkonjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei das therapeutische Mittel ein Toxin ist.

4. Rekombinantes Immunkonjugat nach Anspruch 3, wobei das Toxin ein Pseudomonas-Exotoxin (PE) oder ein zytotoxisches Fragment davon ist.

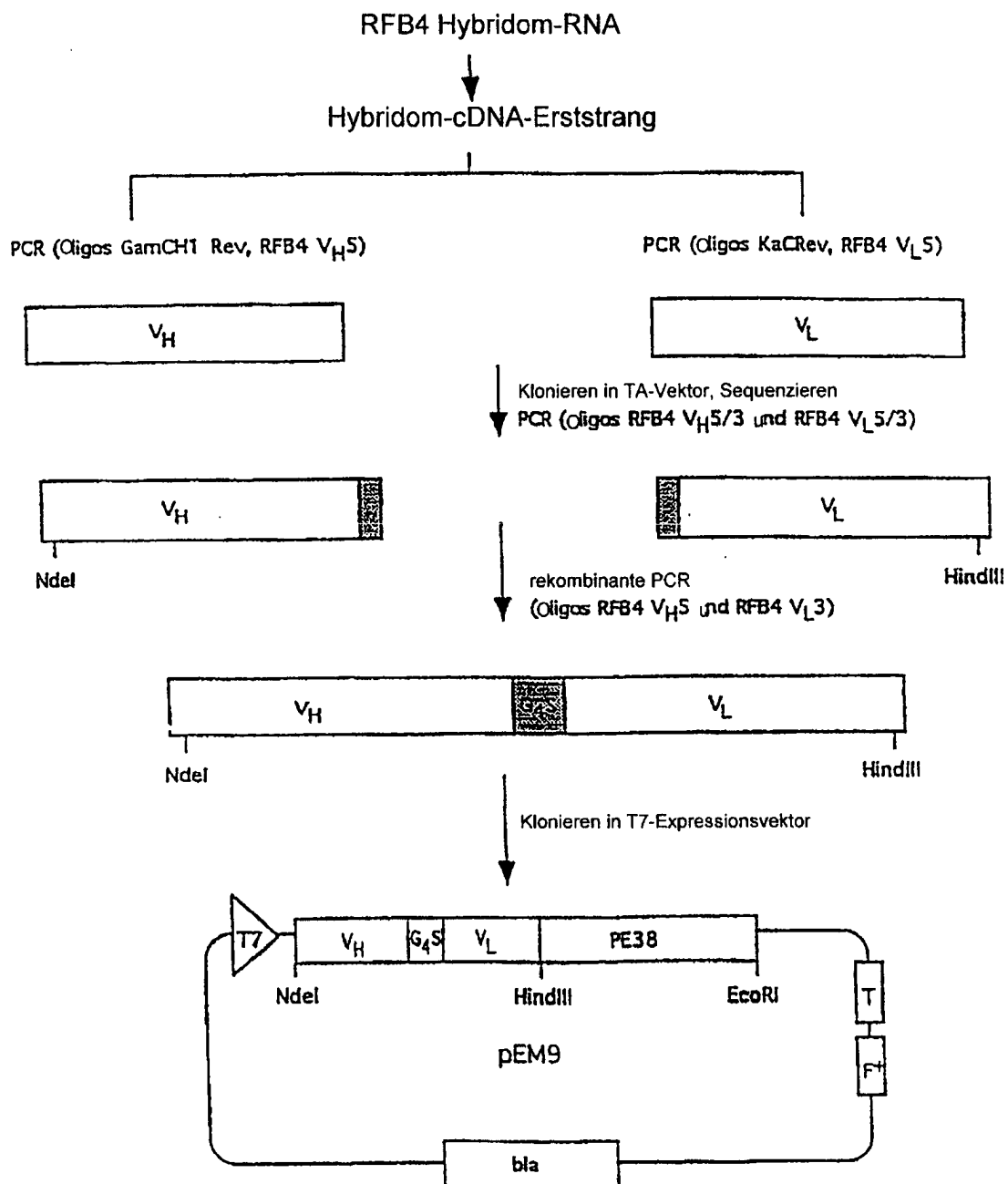
5. Rekombinantes Immunkonjugat nach Anspruch 4, wobei das zytotoxische Fragment PE38 ist.
6. Rekombinantes Immunkonjugat nach Anspruch 4 oder 5, wobei die variable schwere (V_H) Kette peptidgebunden ist an den Amino-Terminus des Toxins.
7. Rekombinantes Immunkonjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die V_H -Kette peptidgebunden ist an die V_L -Kette durch ein Linkerpeptid.
8. Rekombinantes Immunkonjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die V_H -Kette an die V_L -Kette durch eine Cystein-Cystein-Disulfidbindung gebunden ist.
9. Rekombinantes Immunkonjugat nach Anspruch 7, wobei das Linkerpeptid die in SEQ ID NR. 5 dargestellte Sequenz aufweist.
10. Expressionskassette, die ein rekombinantes Immunkonjugat codiert, umfassend eine Sequenz, die ein Toxinpeptid codiert, das kovalent an ein RFB4-Bindungsfragment gebunden ist, umfassend eine V_H -Kette mit einem Cystein an Aminosäure-Position 44 und eine V_L -Kette mit einem Cystein an Aminosäure-Position 100, wobei die V_H -Kette wenigstens 90% Identität zu SEQ ID Nr. 2 über ein Vergleichsfenster von 10-20 Aminosäuren aufweist und die V_L -Kette wenigstens 90% Identität zu SEQ ID Nr. 4 über ein Vergleichsfenster von 10-20 Aminosäuren aufweist.
11. Expressionskassette nach Anspruch 10, wobei das Toxin ein Pseudomonas-Exotoxin (PE) oder ein zytotoxisches Fragment davon ist.
12. Expressionskassette nach Anspruch 11, wobei das zytotoxische Fragment PE38 ist.
13. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10 bis 12, außerdem umfassend eine Sequenz, die ein Linkerpeptid mit der in SEQ ID NR. 5 dargestellten Sequenz codiert.
14. Isolierte Wirtszelle, umfassend eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10 bis 13.
15. Verfahren zum Hemmen des Wachstums einer malignen B-Zelle, welches Verfahren das Kontaktieren in vitro der malignen B-Zelle mit einer wirksamen Menge eines rekombinanten Immunkonjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 9 umfasst.
16. Verwendung eines rekombinanten Immunkonjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 9 für die Herstellung eines Medikaments zum Hemmen des Wachstums einer malignen B-Zelle.
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die maligne B-Zelle ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus: einer Nager-B-Zelle, einer Hunde-B-Zelle und einer Primaten-B-Zelle.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

RFB4 Leichte Kette	
1 D I Q M T Q T T S G L S A S L G D R V T 60	20
1 gat atc cag atg acc cag act aca tcc tcc ctg tct ggc tct ctg gga gac aga gtc acc	
21 I S C R A S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P 40	120
61 att agt tgc agg gca agt cag gac att agc aat tat tta aac tgg tat cag cag aaa cca	
41 D G T V K L L I Y Y T S I L H S G V P S 60	180
121 gat gga act gtt aaa ctg ctg atc tac tac aca tca ata tta cac tca gga gtc cca tca	
61 R F S S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q 80	240
181 agg ttc agt ggc agt ggg tct gga aca gat tat tct ctg acc att agc aac ctg gag caa	
81 E D F A T Y F C Q Q G N T L P W T F G S 100	300
241 gaa gat ttt gcc act tac ttt tgc caa cag ggt aat acg ctt ccg tgg acg ttc ggt gga	
101 G T K L E I K 107	
301 ggc acc aag ctg gaa atc aaa 121	
RFB4 Schwere Kette	
1 E V Q L V E S G G G G L V K P G G S L K L 20	60
1 gaa gtc cag ctg gtc gag tct ggg gga ggc tta gtc aag cct gga ggg tcc ctg aaa ctc	
21 S C A A S G F A F S I Y D M S W V R Q T 40	120
61 tcc tgt gca gcc tct gga ttc gct ttc agt atc tat gac atg tct tgg gtt cgc cag act	
41 P E K R L E W V A Y I S S G G T T Y Y 60	180
121 ccg gag aag agg ctg gag tgg gtc gca tac att agt agt ggt ggt acc acc tac tat	
61 P D T V K G R F T I S R D N A K N T L Y 80	240
181 cca gac act gtc aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac	
81 L Q M S S L K S E D T A M Y Y C A R H S 100	300
241 ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt gca aga cat agt	
101 G Y G S S Y G V L F A Y W G Q G T L V T 120	360
301 ggc tac ggt agt agc tac ggg gct ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act	
121 T S A 123	
361 gtc tct gca 369	

Figur 1

Figur 2A

Figur 2B

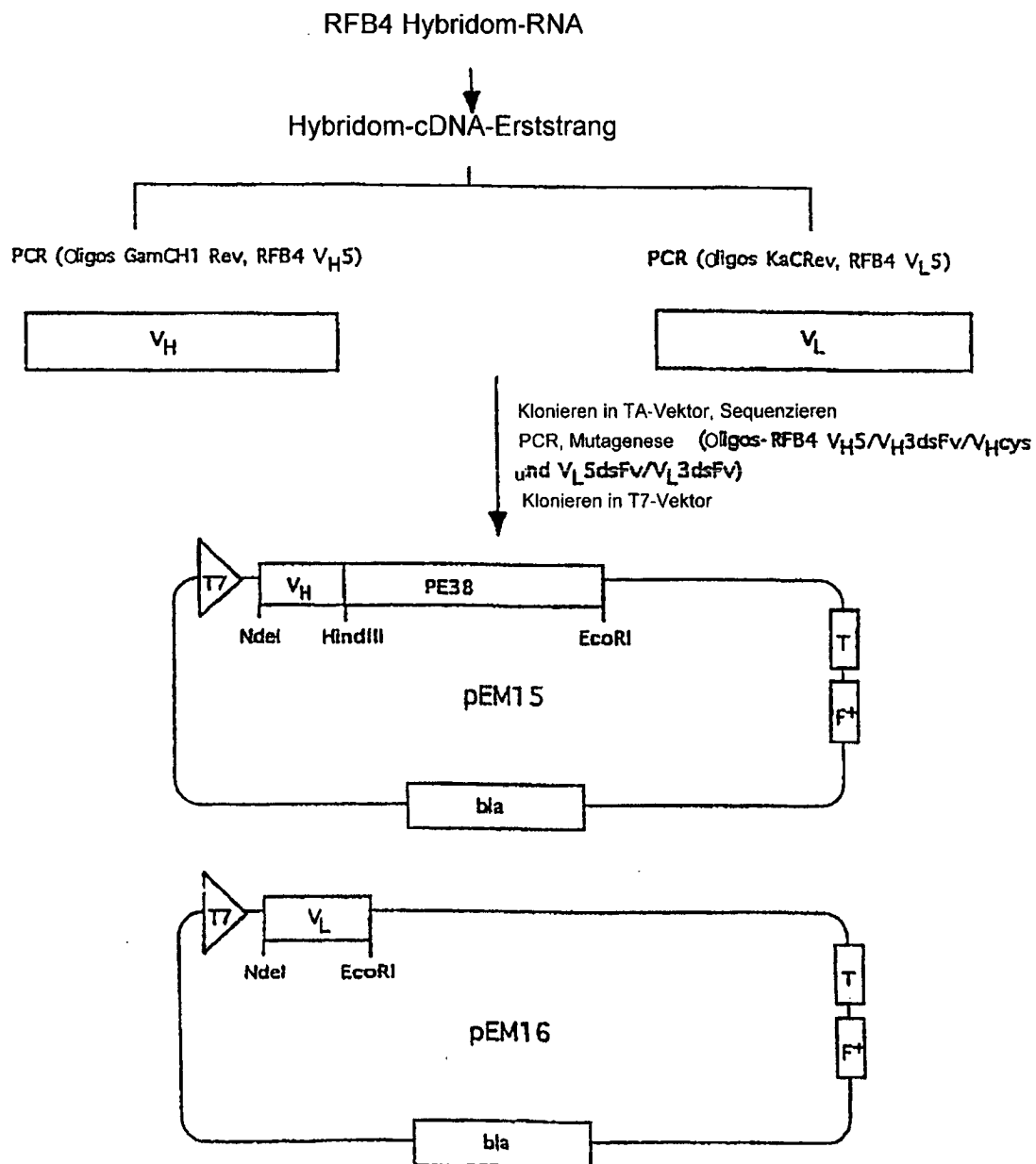


Fig. 3

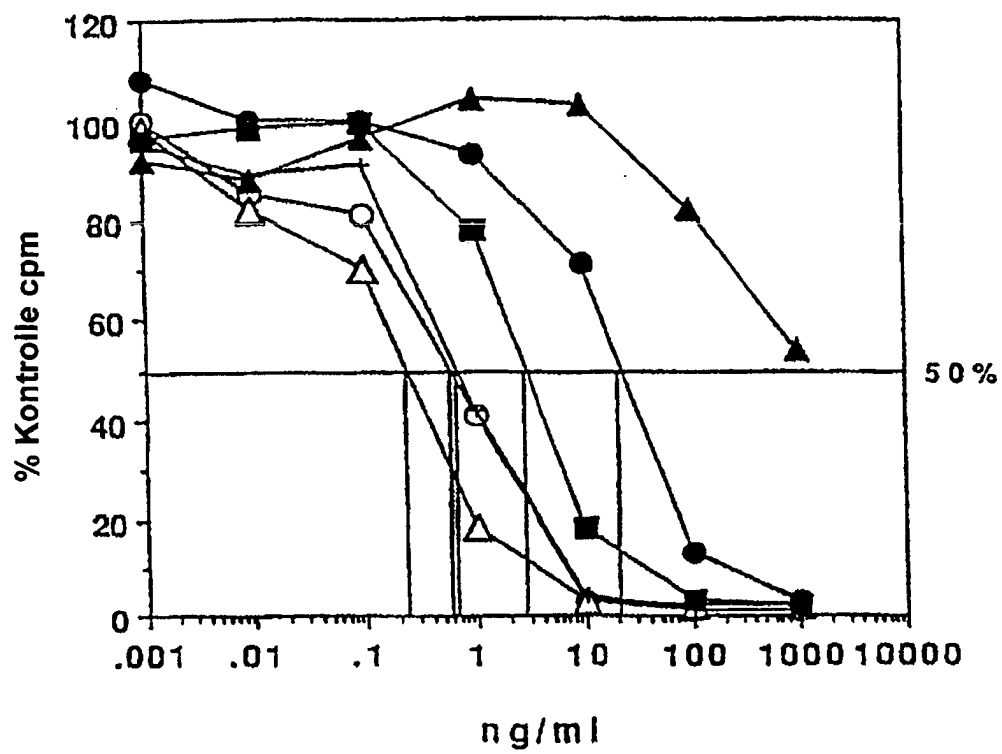


Fig. 4

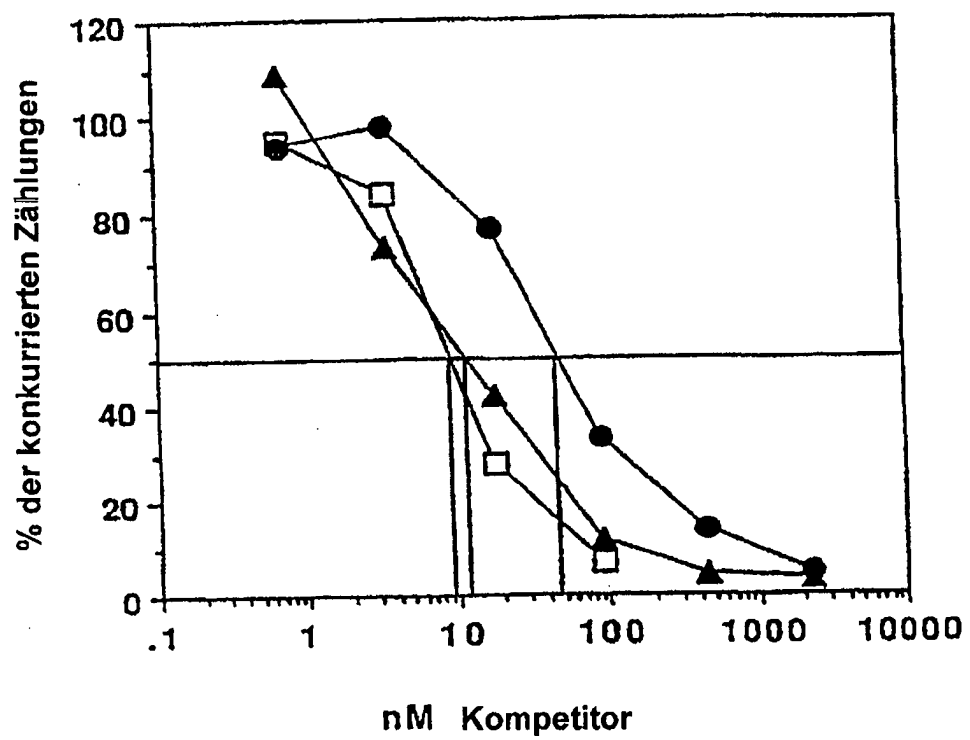
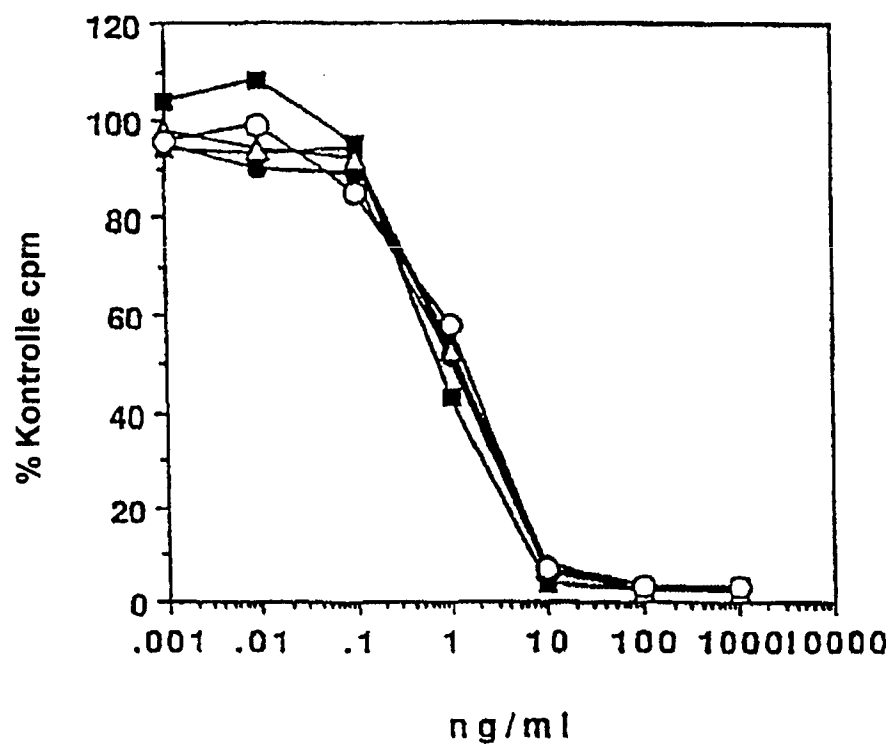
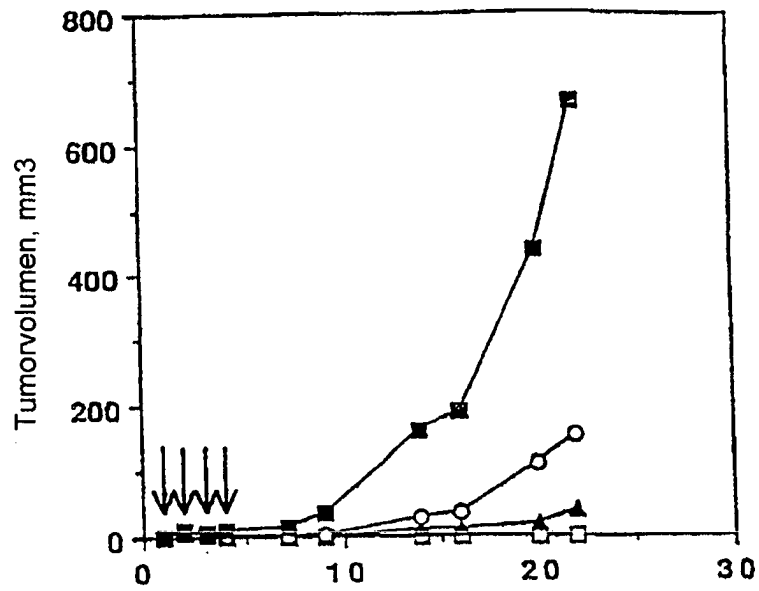


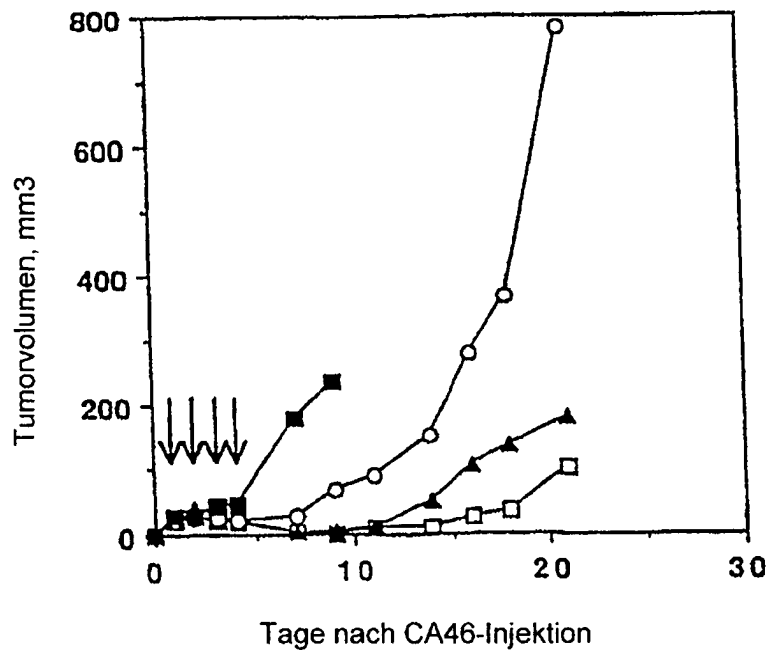
Fig. 5



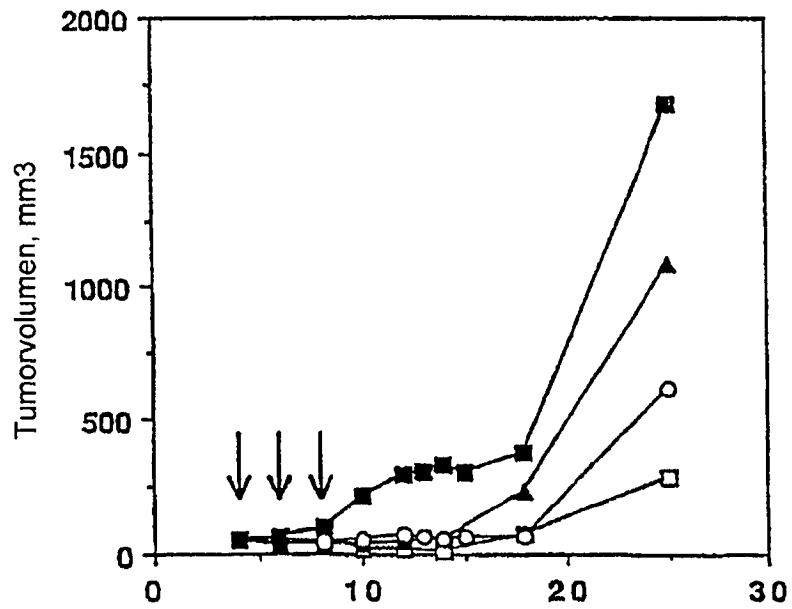
6 A



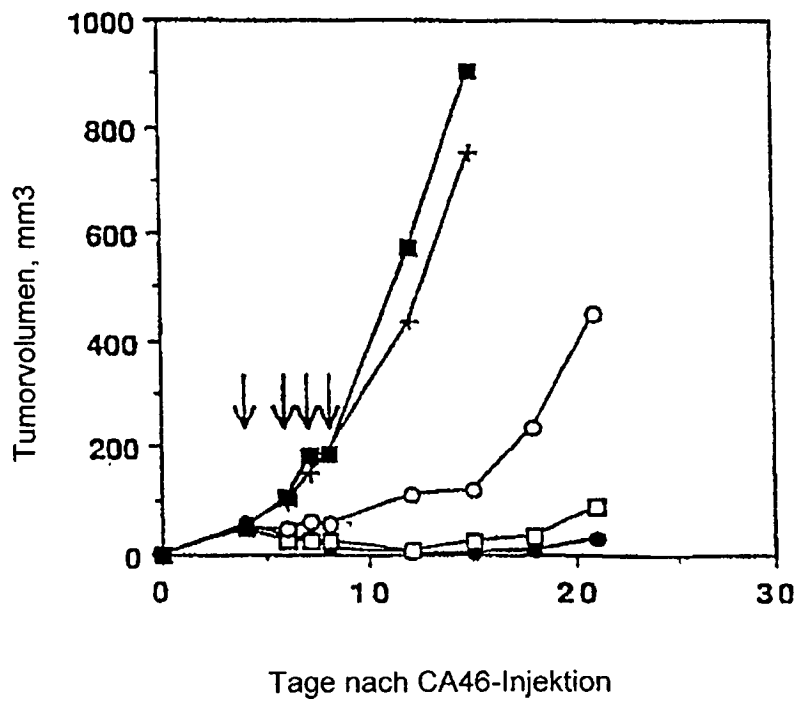
6 B



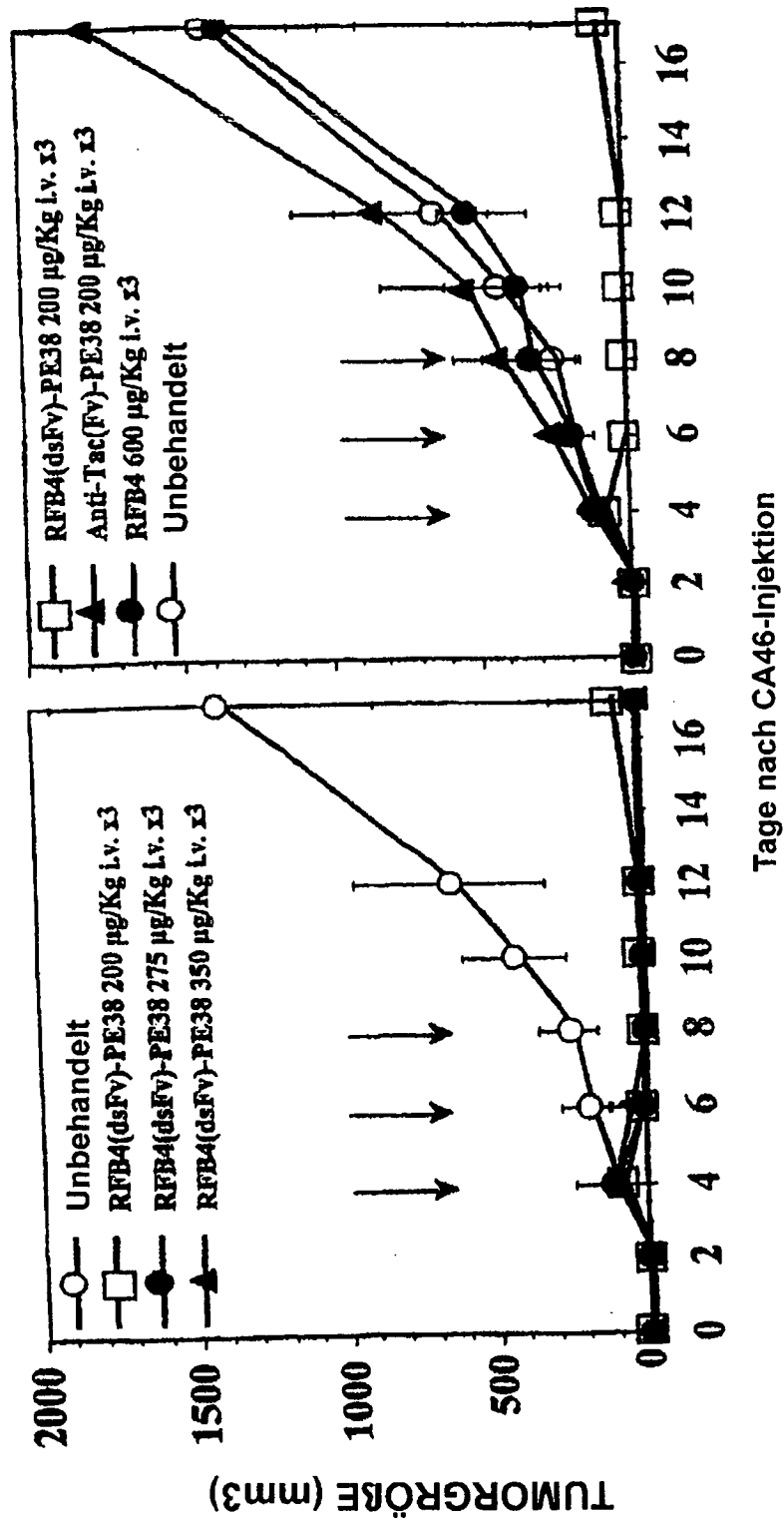
7 A



7 B



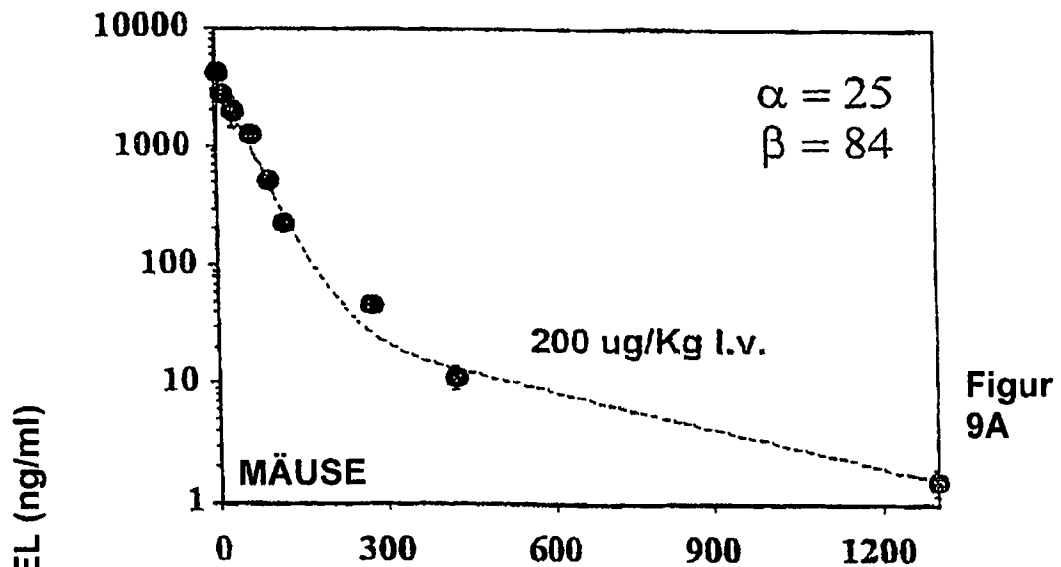
ANTITUMOR-AKTIVITÄT VON RFB4(dsFv)-PE38 IN MÄUSEN



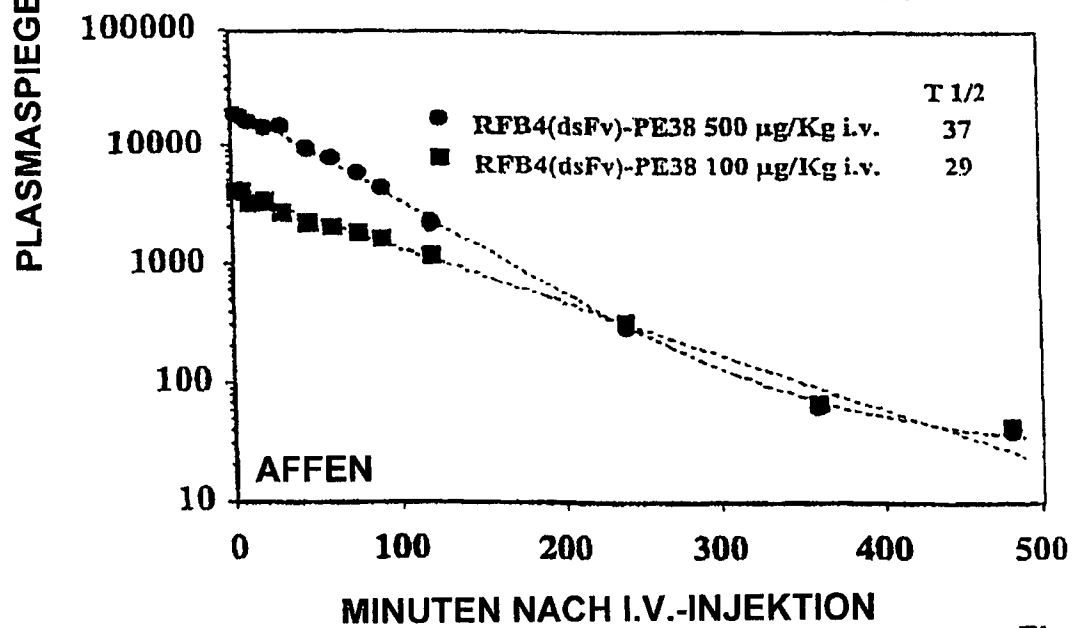
Figur 8A

Figur 8B

PHARMAKOKINETIKEN VON RFB4(dsFv)-PE38



Figur 9A



Figur 9B