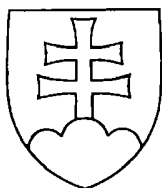


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: 23. 2. 2001
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/185 039
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 25. 2. 2000
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: US
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 4. 3. 2003
Vestník ÚPV SR č.: 3/2003
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: PCT/US01/05923
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: WO01/62931

(11), (21) Číslo dokumentu:

1223-2002

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷ :

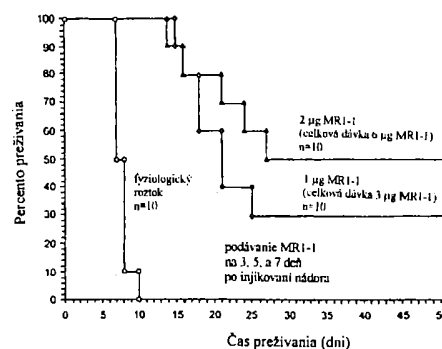
C12N 15/13,
C07K 16/28,
C12N 15/62,
C07K 19/00,
A61K 47/48

- (71) Prihlasovateľ: The Government of the United States, as represented by The Secretary of the Department of Health and Human Services, Rockville, MD, US;
DUKE UNIVERSITY, Durham, NC, US;
- (72) Pôvodca: Pastan Ira, Potomac, MD, US;
Beers Richard, Washington, DC, US;
Chowdhury Partha S., Rockville, MD, US;
Bigner Darell, Mebane, NC, US;
- (74) Zástupca: PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;

(54) Názov Anti-ERGFvIII scFv so zlepšenou cytotoxicitou a výťažkom, imunotoxíny a spôsoby ich použitia

- (57) Anotácia:
Sú opísané protilátky na mutovanú formu receptora na epidermálny rastový faktor, známeho ako EGFRvIII. Tento mutant sa nachádza len alebo hlavne na povrchu glioblastómových buniek, na bunkách rakoviny prsníka, vaječníkov a atypicky veľkých buniek rakoviny pľúcneho laloku. Protilátky majú vysokú afinitu pre EGFRvIII a tvoria imunotoxíny s vyššou cytotoxicitou a výťažkom ako dosiaľ známe protilátky. Tiež sú opísané ďalšie protilátky, v ktorých MR1 je mutovaná vo VH alebo VL, alebo oboch v CDR1 a 2, s lepšou väzbou na EGFRvIII, ako má pôvodná protilátka MR1.

Liečenie U87MG-EGFRvIII neoplastické meningitidy intratekálnym podaním MR1-1 imunotoxínu



Anti-EGFRvIII scFv so zlepšenou cytotoxicitou a výťažkom, imunotoxíny a spôsoby ich použitia

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka protilátky pre mutovanú formu receptora pre epidermálny rastový faktor, známeho ako EGFRvIII. Protilátky podľa vynálezu majú vysokú afinitu pre EGFRvIII a tvoria imunotoxíny s vyššou cytotoxicitou a výťažkom ako doposiaľ známa protilátka, MR1. Vynález predovšetkým poskytuje protilátku, označenú ako MR1-1, a jej použitie pre liečenie glioblastómov, rakoviny prsníka a vaječníkov a rakoviny veľkých buniek pľúcneho laloku

Súčasný stav techniky

Mutovaná forma receptora pre epidermálny rastový faktor, označeného ako „EGFRvIII“, sa nachádza v 50 až 60 % glioblastómov a jeho prítomnosť bola tiež dokázaná u 70 až 80 % rakoviny prsníka a vaječníkov a asi u 16 % veľkých buniek rakoviny pľúcneho laloku (Wikstrand a spol., *Cancer Res.* 55:3140-3148, 1995; Moscatello a spol., *Cancer Res.* 55:5536-5539, 1995). Mutácia je tvorená deléciou vo vnútri čítacieho rámca exónov 2 až 7 v blízkosti amino zakončenia extracelulárnej domény, čo má za následok expresiu EGFR mRNA s deléciou 801 báz. Mutovaný proteín obsahuje nový glycínový kodón v bode spojenia zostrihu (Moscatello a spol., vyššie). Mutovaný receptor je exprimovaný na povrchu buniek a vytvára nový, nádorovo špecifický bunkový povrchový epitop (sekvenciu) v delícii spojenia. Receptor má konštitutívnu tyrozínkinázovú aktivitu, ktorá zvyšuje tumorigenicitu glioblastómov *in vivo* (Nishikawa a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7727-7731, 1994). Prítomnosť nádorovo špecifickej extracelulárnej sekvencie mutovaného receptora predstavuje poten-

cionálny cieľ pre liečenie rakoviny, predovšetkým pomocou použitia imunotoxínov.

Imunotoxíny boli pripravené fúziou cieľovej zložky, ako je protilátka alebo časť protilátky voči proteínu toxínu, akým je pseudomonádový exotoxín. Fáza I klinických skúšok ukázala, že imunotoxíny sú aktívne voči ľudským kompaktným nádorom. Imunotoxín s protilátkou špecifickou pre Lewis Y-príbuzný antigén, nadmerne exprimovaný v mnohých nádoroch, vykazoval regresiu nádorov (Pai a spol., *Nat. Med.* 2:350-353, 1996). Imunotoxíny, ktoré boli použité v štúdiu Pai a spol. (vyššie), bol pripravený s myšou celou monoklonálnou protilátkou, majú niektoré nevýhody. Takéto imunotoxíny sú relatívne veľké, čo obmedzuje ich preniknutie do nádoru. Často vykazujú heterogenitu väzby medzi protilátkou a toxínom a je ťažké pripraviť veľké množstvo konjugátov. Podobne, aj použitie rôznych protilátok voči EGFRvIII pre konštrukciu imunotoxínov je obmedzené (U.S. patent č. 5 212 290, WO 96/16988 a Reist a spol., *Cancer Res.* 55:4375-4382, 1995). Snahy o prekonanie týchto problémov prípravou úplných rekombinantných imunotoxínov, v ktorých sú použité cielené klónované Fvs boli neúspešné, nakoľko väčšina protilátkových variabilných domén pôsobila ako slabé Fvs, buď z dôvodu nestability asociácie V_H - V_L , alebo pre zlú väzobnú afinitu.

MR1 je jedoreťazcová protilátka s variabilnou doménou (scFv), ktorá sa špecificky viaže na EGFRvIII. MR1 scFv bola izolovaná z fágovej knižnice protilátok (Lorimer a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14815-14820, 1996). scFv knižnica obsahujúca MR1 bola pripravená z mRNA sleziny myši, ktorá bola imunizovaná EGFRvIII špecifickým peptidom plus extracelulárnou doménou EGFRvIII, izoláciou pomocou afinitnej chromatografie z nádorových xenoimplantátov exprimujúcich EGFRvIII (Lorimer a spol., *Cancer Res.* 1:859-864,

1995). MR1 bola vyvinutá ako nádejný prostriedok pre vývoj terapeutickú látku, ktorá by mohla byť špecifická voči EGFRvIII pozitívnym nádorovým bunkám. Sekvencia MR1 bola uložená v GenBank pod prístupovým číslom U76382.

Imunotoxín MR1(Fv)-PE38 bol vytvorený fúziou scFv z MR1 so skrátenou formou pseudomonádového exotoxínu A, PE38, v ktorom boli odstránené všetky aminokyseliny v doméne Ia a aminokyseliny 365 až 380 v doméne Ib (Lorimer a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:14815-14820, 1996). V súčasnosti sa niektoré iné rekombinantné PE38 imunotoxíny podrobujú klinickým skúškam (Kreitman a spol., *Blood* 94(10):3340-3348, 1999; Pai-Scherf a spol., *Clin. Cancer Res.* (v tlači, 1999); Pai a spol., *Clin. Application Immunotoxins* 234:83-96, 1998). Všeobecne sú gény pre scFv spojené s génom pre PE38 cez krátky linker a sú klónované do T7 expresného vektora. Rekombinantné imunotoxíny sú exprimované v *E. coli*, a akumulujú sa v inklúzných telieskach. Izolované inklúzne telieska sú dôkladne premyté, rozpustené v guanidínhydrochloride a proteíny sú renaturované a prečistené ionexovou chromatografiou a gélovou filtráciou. Výsledné molekuly sú aktívne a cez scFv sú cielené voči bunkovo špecifickému antigénu. Bunková smrť je spôsobená aktivitou toxínu.

Pre použitie imunotoxínov ako terapeutických látok je potrebné, aby vykazovali vysokú afinitu pre antigén, čo spôsobuje vysokú cytotoxicitu pre bunky exprimujúce antigén. S ohľadom na výrobu a cenu je výhodné, aby imunotoxín bol produkovaný vo veľkom výťažku. MR1 (scFv)-PE38 je imunotoxín s najvyššou afinitou a najvyššou cytotoxicitou voči bunkám exprimujúcim EGFRvIII, nie je však ideálnou látkou. Hodnota K_d je 8 nM a výťažok je nižší ako 3 %. Výhodné by boli také protilátky, ktoré sa viažu s vysokou afinitou na EGFRvIII, a ktoré po pripojení na PE38 alebo iné toxíny, tvoria imunoto-

xíny vyššej cytotoxicity voči bunkám exprimujúcim EGFRvIII. Výhodné by boli také protilátky, ktoré poskytujú vyššie výťažky imunotoxínov.

Niektoré pokusy riešili uvedené nedostatky hľadaním ďalších scFv z monoklonálnych protilátok voči EGFRvIII, avšak boli neúspešné. MR1 zostáva jedinou dostupnou scFv pre prípravu imunotoxínov voči EGFRvIII.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje protilátky so zlepšenou väzbou pre mutovanú formu receptora pre epidermálny rastový faktor, známy ako EGFRvIII. Predkladaný vynález popisuje polypeptidy s mutáciami v oblastiach variabilných (V_H) reťazcov protilátok, alebo s mutáciami v oblasti ľahkého reťazca (V_L), alebo mutácie sú prítomné v oboch oblastiach. Hodnota K_d polypeptidu pre EGFRvIII je 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3,5 nM, 3 nM alebo nižšia, mutované V_H alebo V_L majú sekvenciu ktorá je odlišná od pôvodných V_H alebo V_L protilátky MR1 v dôsledku substitúcie aspoň jednej aminokyseliny v oblasti určujúcej komplementaritu („complementary determining region“) (CDR), aminokyseliny kódovanej kodónom pre nukleotid, ktorý patrí k aktívnym motívom, vybraným z AGY alebo RGYW, kde R je A alebo G, Y je C alebo T a W je A alebo T. V niektorých uskutočneniach sa substitúcia môže vyskytovať v CDR3 V_H alebo CDR3 V_L . V iných uskutočneniach sa substitúcie môžu vyskytovať v CDR1 V_H alebo CDR2 V_H alebo u oboch, alebo v CDR1 V_L alebo CDR2 V_L alebo u oboch, alebo v niektorej kombinácii CDR1, 2 a 3 V_H a V_L . Napríklad, v jednom uskutočnení substitúcie sa môžu vyskytovať v CDR3 V_L , CDR2 V_L a CDR1 V_H .

Vo výhodnom uskutočnení vynálezu má polypeptid substitúciu aspoň jednej aminokyseliny v CDR3 V_H , vybratej zo skupiny S98 a T99. V inom výhodnom uskutočnení sú substitúcie

vybrané zo skupiny P98-Y99, P98-N99, P98-W99, P98-I99, P98-F99 a P98-V99. Polypeptid môže mať ďalšiu substitúciu v CDR3 V_L, kde W je náhradou za F v polohe 92. V najvýhodnejšom uskutočnení vynálezu má polypeptid substitúcie v ťažkom reťazci S98P-T99Y a v ľahkom reťazci je prítomná substitúcia F92W (definuje protilátku označenú MR1-1").

Vyššie popísané polypeptidy môžu byť variabilnou oblasťou jednoreťazcovej protilátky („scFv“), disulfidom stabilizované F_v, Fab, F(ab')₂ alebo môžu obsahovať iný fragment protilátky, ktorá si zachováva schopnosť rozpoznať a viazať sa na antigén. Môžu tiež obsahovať povrchový proteín bakteriofága.

Vo výhodných uskutočneniach vynálezu majú vyššie popísané polypeptidy hodnotu K_d pre EGFRvIII nižšiu aspoň o 1 nM ako má MR1. Polypeptidy môžu mať hodnotu K_d 7, 6, 5, 4, 3,5, 3 alebo nižšiu.

Vyššie popísané peptidy môžu byť spojené, pripojené alebo naviazané na efektorovú molekulu, liečebnú aktívnu zložku alebo na detekovateľnú značku. Liečebnou aktívnou zložkou môže byť toxín alebo cytotoxická časť toxínu („toxická zložka“), ktorá v spojení s polypeptidom tvorí imunotoxín. Toxická zložka môže byť toxín záškrtu alebo jeho cytotoxický fragment, saporin, kapsulárny antivírusový proteín („pokeweed antiviral protein“), ricín alebo jeho cytotoxický fragment a bryodin 1. Vo výhodných uskutočneniach vynálezu toxín je pseudomonádový exotoxín („PE“), alebo cytotoxický fragment PE. V najvýhodnejšom uskutočnení PE je PE38. Imunotoxíny vytvorené spojením polypeptidu a toxickej zložky, môžu mať hodnotu IC₅₀ 7 ng/ml alebo nižšiu, 6 ng/ml alebo nižšiu, 5 ng/ml alebo nižšiu, 4 ng/ml alebo nižšiu, alebo 3,5 ng/ml alebo nižšiu. Výťažok rekombinantne exprimovaného imunotoxínu môže byť v množstve aspoň 3 % a môže byť v množstve 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 % alebo viac.

Vynález ďalej popisuje molekuly nukleových kyselín, ktoré kódujú polypeptidy s mutáciami vo variabilných oblastiach ťažkých (V_H) reťazcoch protilátok alebo polypeptidy s mutáciami v oblasti ľahkého reťazca (V_L), alebo v oboch oblastiach, keď polypeptid má hodnotu K_d pre EGFRvIII 7 nM alebo nižšiu, mutované V_H alebo V_L majú odlišnú sekvenciu ako pôvodné V_H alebo V_L protilátky MR1 v dôsledku substitúcie aminokyselín, aspoň jednej aminokyseliny, v komplementaritu určujúcej oblasti (CDR), aminokyselina je kódovaná kodónom pre nukleotid, ktorý patrí medzi aktívne motívy. Kodón je vybratý z AGY alebo RGYW, kde R je A alebo G, Y je C alebo T a W je A alebo T. V niektorých uskutočneniach sa substitúcia môže vyskytovať v CDR3 V_H alebo CDR3 V_L . V iných uskutočneniach sa substitúcia môže vyskytovať v CDR1 V_H alebo CDR2 V_H alebo u oboch, alebo v CDR1 V_L alebo CDR2 V_L alebo u oboch, alebo v niektorej z kombinácií CDR1, 2 a 3 V_H a V_L . Napríklad, v jednom uskutočnení sa substitúcie môžu vyskytovať v CDR3 V_L , CDR2 V_L a CDR1 V_H .

Vo výhodnom uskutočnení vynálezu má molekula nukleovej kyseliny, ktorá kóduje polypeptid, pri porovnaní s MR1, substitúciu aspoň jednej aminokyseliny, vybranej zo skupiny S98 a T99, v CDR3 V_H . V inom výhodnom uskutočnení vynálezu sú substitúcie vybrané zo skupiny P98-Y99, P98-N99, P98-W99, P98-I99, P98-F99 a P98-V99. Molekula nukleovej kyseliny môže tiež kódovať polypeptid, ktorý má substitúciu v CDR3 V_L , ktorá v porovnaní s MR1 obsahuje W namiesto F v polohe 92.

Molekuly nukleových kyselín môžu kódovať polypeptidy, ktoré sú variabilnou oblasťou jednoreťazcovej protilátky („scFv“), disulfidom stabilizované Fv, Fab a $F(ab')_2$ alebo iné fragmenty protilátky, ktorá si zachováva schopnosť rozpoznať a viazať sa na antigén. Peptidy tiež môžu obsahovať povrchový proteín bakteriofága. Molekuly nukleových kyselín popísané vyššie môžu byť operatívne pripojené k promótoru.

V iných uskutočneniach vynález popisuje spôsoby usmrtenia buniek, ktoré majú antigén. Usmrtenie predstavuje kontakt buniek s imunotoxínom, ktorý obsahuje toxickú zložku a cieľovú zložku. Cieľová zložka obsahuje polypeptid s mutáciami v oblastiach variabilných ťažkých (V_H) reťazcov protilátky alebo s mutáciami v oblasti ľahkého reťazca (V_L) alebo oboch, keď polypeptid má hodnotu K_d pre EGFRvIII 7 nM alebo nižšiu. Mutované V_H alebo V_L majú sekvenciu, ktorá je odlišná od V_H alebo V_L pôvodnej protilátky MR1 v dôsledku substitúcie aminokyselín, to znamená, aspoň jednej aminokyseliny, v komplementaritu určujúcej oblasti (CDR), aminokyselina je kódovaná kodónom, ktorý obsahuje nukleotid, ktorý patrí k aktívnym motívom, vybraným z AGY alebo RGYW, kde R je A alebo G, Y je C alebo T a W je A alebo T. V niektorých uskutočneniach sa substitúcia môže vyskytovať v CDR3 V_H alebo CDR3 V_L . V iných uskutočneniach sa substitúcia môže vyskytovať v CDR1 V_H alebo CDR2 V_H alebo v oboch, alebo v CDR1 V_L alebo CDR2 V_L alebo v oboch, alebo v niektorej kombinácii CDR1, 2 a 3 V_H , a V_L .

Vo výhodnom uskutočnení spôsob obsahuje cieľovú zložku, v ktorej polypeptid má substitúciu aspoň jednej aminokyseliny v CDR3 V_H , vybranej zo skupiny S98 a T99. V inom výhodnom uskutočnení vynálezu cieľová aktívna zložka obsahuje polypeptid so substitúciami vybratými z P98-Y99, P98-N99, P98-W99, P98-I99, P98-F99, P98-V99. V najvýhodnejšom uskutočnení vynálezu je cieľová zložka MR1.

Cieľová zložka môže byť variabilná oblasť jednoreťazcovej protilátky („scFv“), disulfidom stabilizované Fv, Fab, F(ab')₂ alebo iné fragmenty protilátky, ktorá si zachováva schopnosť rozoznať a viazať sa na antigén.

Bunky, ktoré majú na svojom povrchu antigén, môžu byť rakovinové bunky ako sú gliomové bunky, bunky rakoviny prsníka, bunky rakoviny pľúcneho laloka, alebo bunky rakoviny vaječníkov.

PODROBNÝ POPIS

I. Úvod

Predkladany vynález popisuje scFv protilátky a iné protilátky s vyššou afinitou pre EGFRvIII ako má MR1. Ďalej popisuje imunotoxíny s vyššou cytotoxicitou pre EGFRvIII exprimujúce bunky, ako majú imunotoxíny, ktoré používajú MR1 ako cieľovú časť molekuly. Protilátky sú pripravené z MR1, ale majú mutácie v aktívnych oblastiach ich komplementaritu určujúcich oblastiach (CDR). Prekvapujúco sa zistilo, že imunotoxíny, ktoré začleňujú takéto formy MR1 ako cieľovú zložku, majú vysokú afinitu nie len pre EGFRvIII, ale tiež môžu byť vytvorené vo vyššom výťažku ako podobné imunotoxíny používajúce MR1 ako cieľovú časť molekuly.

Obmedzujúcim faktorom pri príprave knižnice pre protilátky s náhodnými zmenami v CDR je veľký počet zvyškov, ktoré tvoria CDR. Pretože pre väčšinu protilátok nie je dostupná röntgenová štruktúra, zvyčajne sa neidentifikujú malé zvyšky CDR, kde sú mutácie vhodné pre získanie variantov s vyššou afinitou. Pre izoláciu variantov s vyššou afinitou je potrebné pripraviť extrémne veľké knižnice s náhodnými zmenami.

V typických štúdiách boli pripravené mutácie v CDR3 variabilnej oblasti ťažkého reťazca (V_H) MR1. V_H CDR3 v MR1 má jedenásť aminokyselinových zvyškov. Koncové dva zvyšky V_H oblasti, D101 a Y102, boli vylúčené zo štúdií mutagenézy, nakoľko je málo pravdepodobné, že sa zúčastňujú pri väzbe antigénu. Jedným z dôvodov je skutočnosť, že tieto dva zvyšky sa nachádzajú na rozhraní s V_L reťazcom. Druhý dôvod je to, že tieto zvyšky J segmentom spolupôsobia na nasledujúcu 3'-priľahlú oblasť V_H CDR2. Výsledkom je to, že sú relatívne viac konzervované ako zvyšok V_H CDR3.

Ďalších deväť aminokyselín v každej polohe CDR3 V_H bolo

substituovaných každou z ďalších prirodzených aminokyselín. Štúdie ukázali, že len mutácie v oblastiach známych ako aktívne body (to znamená oblasti, v ktorých počas dozrievania protilátkovej afinity sa uskutočňuje hypermutácia charakterizovaná motívmi RGYW a AGY, kde R je A alebo G, Y je C alebo T a W je A alebo T), majú za následok protilátky s vyššou cytotoxicitou, ako má pôvodná protilátka MR1. Tiež sa kázalo, že mutácie zvyšujú výťažok imunotoxínu keď tieto mutované scFv boli zabudované do imunotoxínov, v porovnaní s podobným imunotoxínom pripraveným s pôvodným MR1 scFv. V iných štúdiách boli pripravené mutácie vo variabilnej oblasti ľahkého reťazca MR1 CDR3. V týchto prípadoch boli prítomné mutácie len aminokyselín v aktívnom bode. Mutácie poskytovali protilátky s vyššou cytotoxicitou a výťažkom ako pôvodná protilátka MR1.

Tieto výsledky sú dôkazom toho, že nie je potrebné randomizovať každý zvyšok v CDR na identifikáciu tých, kde mutácie poskytujú varianty s vyššou afinitou. Očakávalo sa, že mutácie v aktívnych bodoch V_H a V_L CDR 1 a 2 budú mať tiež za následok protilátky so zlepšenou afinitou pre EGFRvIII-exprimujúce bunky, a tieto protilátky po zabudovaní do imunotoxínov budú vykazovať zlepšenú cytotoxicitu pre bunky exprimujúce EGFRvIII, a dosiahne sa lepši výťažok imunotoxínov s scFv, v porovnaní s imunotoxínmi odvodenými od MR1. Nakoľko zlepšené vlastnosti sú spôsobené substitúciou aminokyselín, rovnaké pozitívne účinky sa zistia vtedy, keď takéto mutované formy MR1 (zahrňujúce mutácie v V_H a V_L CDR3) sú zabudované do disulfidom stabilizovaných Fvs (dsFv) alebo do Fab', $F(ab')_2$ alebo Fab.

Zvýšená cytotoxická aktivita neznamena zvýšenie afinity (Tabuľky 4 a 5). Pre chýbanie tejto korelácie neexistuje jednoznačné vysvetlenie. Okrem väzobnej afinity, ktorá sa

zvyčajne meria pri teplote 22 °C, v toxikologických procesoch existuje mnoho vlastností, ktoré môžu byť ovplyvnené mutáciami „aktívnych bodov“. Napríklad je to stabilita pri teplote 37 °C, rýchlosť internalizácie, proteolýza a prenos častí potrebných pre translokáciu. Je možné, že niektoré z týchto vlastností sú ovplyvnené. Protilátky s vyššou afinitou pre EGFRvIII sú však užitočné pre rôzne účely, hlavne pre diagnostické použitie a *in vitro* testy, pre určenie prítomnosti alebo neprítomnosti EGFRvIII exprimujúcich buniek vo vzorke. Napríklad, pre *in vitro* použitie, môžu byť protilátky, ako scFv s vyššou afinitou pre EGFRvIII, konjugované s rádionuklidmi, alebo s niektorou z iných detekovateľných značiek, a použité na detekciu buniek exprimujúcich EGFRvIII vo vzorke z biopsie pacienta. Určí sa tak či pacient má rakovinu charakterizovanú prítomnosťou takýchto buniek, ale tiež, že rakovina u pacienta ešte nebola eliminovaná. Podobne, v *in vivo* použití môžu byť scFv, dsFv alebo iné protilátky podľa vynálezu konjugované s rádionuklidmi alebo inými detekovateľnými značkami a použité na detekciu prítomnosti buniek exprimujúcich EGFRvIII u pacienta. Môžu sa použiť na opätovnú diagnostiku a potvrdiť prítomnosť/neprítomnosť rakoviny u pacienta.

Medzi CDR mutantami sa prekvapivo sa pozoroval veľký rozdiel vo výťažku aktívneho monomérneho proteínu. Rekombinantné toxíny sa akumulujú v inklúzných telieskach ako nerozpustný agregovaný proteín (imunotoxín). Aktívne monoméry vznikajú rozpustením inklúzných teliesok v 6 M guanidín HCl, nasleduje kontrolovaná renaturácia v redoxnom systéme a oddelenie monomérov z multimérov a agregátov. Štúdie ukázali, že mutácie v jednej alebo dvoch aminokyselinách v CDR môžu významne zvýšiť výťažok (Tabuľka 6) imunotoxínu, ako bude ďalej vysvetlené. Výťažok MR1(Fv)-PE38 je len 2 %, ale výraz-

ne vzrástol na 17 % v prítomnosti mutácií S98P-T99 v ťažkom reťazci CDR3. Je pravdepodobné, že tieto mutácie majú vplyv na procesy skladania. Všetky mutácie ťažkého reťazca, izolované pri základnej mutagenéze ťažkého reťazca, majú lepší výťažok ako pôvodný MR1. Ťažký reťazec CDR3 je tak veľmi dôležitý pre vhodné skladanie a expresia fágového systému môže vybrať fágový systém expresie pre také proteíny, ktoré sa skladajú účinnejšie. Preto sa zdá, že fágy, ktoré obsahujú lepšie sa skladajúce Fvs, sú prítomné vo veľkom množstve a prednostne vzrastie ich počet pri interakcii s antigénom.

Na základe týchto výsledkov je možné predpokladať, že fág môže byť použitý pre výber mutovanej Fvs v CDR1 alebo 2 V_H a V_L reťazcov, ktoré vykazujú tiež zvýšený výťažok v porovnaní s pôvodnou MR1 scFv.

V *in vivo* testoch sa použili zvieracie modely ľudských nádorov a hodnotil sa účinok toxínov. Nádory u potkanov a myši bez týmusu boli vyvolané injekčným intratekálnym alebo intrakraniálnym podaním línie buniek ľudského glioblastómu (U87MG), ktorá bola transfektovaná na expresiu EGFRvIII (transfektovaná EGFRvIII expresná bunková línia je označená U87MG.deltaEGFRvIII; Nishikawa a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(16):7727-7731, 1994). Potom, ako vznikol nádor, potkany alebo myši boli ošetrované bolusovou injekciou alebo kontinuálnou infúziou rôznych dávok imunotoxínov. Ako je uvedené v nasledujúcich Príkladoch a na Obrázkoch 3 až 6, nezávisle na lokalizácii nádoru a spôsobe podávania imunotoxínu, zvieratá, ktoré dostávali imunotoxín v dávkach 1 alebo 2 μ g vykazovali značne nižší rast nádorov a dlhšiu dobu prežívania ako kontrolné zvieratá, ktorým bol podávaný fyziologický roztok.

II. Definícia

Jednotky, prefixy a symboly sú uvedené vo forme, ktorú povoľuje Medzinárodný systém jednotiek (SI). Keď nie je uvedené inakšie, nukleové kyseliny sú písané zľava doprava v orientácii od 5' ku 3' konci; aminokyselinové sekvencie sú písané zľava doprava v orientácii od amino skupiny ku karboxylovej kyseline. Uvedené príklady neobmedzujú rôzne aspekty alebo uskutočnenia vynálezu, ktoré môžu mať odkaz na špecifikáciu ako celok. Preto výrazy, definované nižšie, sú podrobnejšie definované odkazom na celú špecifikáciu.

Mutované zvyšky zo známej sekvencie sú označené podľa dohody kódom jedného písmena. Zvyšok normálne prítomný v uvedenej polohe sekvencie, poloha v sekvencii pozmeneného zvyšku a substituovaný zvyšok zastupujúci pôvodný zvyšok. Čo sa týka MR1 CDR3 V_H, výraz „S98P“ znamená, že serín, normálne prítomný v polohe 98 normálneho CDR3 ťažkého reťazca MR1, bol nahradený prolínom. Označenie ako „S98“, kde číslo neoznačuje zvyšok, sa týka buď zvyšku normálne prítomného v tejto polohe normálnej sekvencie peptidu, alebo, že v tejto polohe je teraz prítomný špecifický zvyšok (napríklad, že označený zvyšok bol zmenený za normálne prítomný zvyšok v tejto polohe). Zamýšľané použitie bude jasné z kontextu. Uvedené odkazy na čiastočne očíslované aminokyselinové zvyšky MR1-1 znamenajú zvyšky, ktoré sú očíslované podľa Kabat a spol., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, (1987) tak, ako bolo aktualizované (tento literárny odkaz, ktorý je zahrnutý do literárnych odkazov, bude v nasledujúcom texte označený ako „Kabat“); keď sekvenciu scFv je usporiadaná a očíslovaná podľa systému Kabata.

„EGFRvIII“ znamená mutovanú formu receptora pre epidermálny rastový faktor, ktorý rozpoznáva MR1 scFv a ktorý je

charakterizovaný deléciou v čítacom rámci 801 párov báz exónov 2 až 7 v blízkosti amino zakončenia, bez zmeny čítacieho rámca. Táto forma receptora je dobre známa v odbore, napríklad odkazy na Wickstrand a spol., Moscatelo a spol., Lorimer a spol., ktoré sú citované v príslušnej oblasti techniky. EGFRvIII bol pôvodne označovaný ako mutácia typu II, napríklad v US patente 5 212 290.

„Protilátka“ znamená imunoglobulínovú molekulu, ktorá imunologicky reaguje s konkrétnym antigénom a týka sa predovšetkým príslušných polyklonálnych a monoklonálnych protilátok. Výraz tiež zahrňuje geneticky upravené formy, ako sú chimérne protilátky (napríklad humanizované myšie protilátky), heterokonjugované protilátky (napríklad bisférické protilátky). Výraz sa v predkladanom vynáleze týka najmä fragmentov rekombinantnej jednoreťazcovej Fv (scFv), disulfidom stabilizovaných (dsFv) Fv fragmentov (pozri U.S.S.N 08/077,252, uvedený v literárnych odkazoch), alebo pFv fragmentov (pozri US predbežná patentová prihláška 60/042,350 a 60/048,848). Výraz „protilátka“ zahrňuje tiež formy protilátok, ktoré sa viažu na antigén, vrátane fragmentov schopných viazať sa na antigén (napríklad, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv a rIgG. Pozri tiež Pierce katalóg a príručku, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Pozri tiež Kuby J., *Immunology*, 3. vydanie, W.H. Freeman and Co., New York, 1998). Z kontextu bude zrejmý konkrétny význam, alebo významy.

Protilátka imunologicky reaktívna s konkrétnym antigénom môže byť pripravená rekombinantnými spôsobmi, ako je výber z knižníc pre rekombinantné protilátky vo fágových alebo podobných vektoroch, pozri napríklad, Huse a spol., *Science* 246:1275-1281, 1989; Ward a spol., *Nature* 341:544-646, 1989 a Vaughan a spol., *Nature Biotech.* 14:309-314, 1996, alebo imunizáciou zvierat antigénom alebo DNA, kódujúcou antigén.

Imunoglobulín má typicky ťažký a ľahký reťazec. Každý ťažký reťazec obsahuje konštantnú oblasť a variabilnú oblasť (oblasti sú známe ako „domény“). Variabilné oblasti ľahkého a ťažkého reťazca obsahujú štyri oblasti „čítacích rámcov“, prerušené tromi hypervariabilnými oblasťami, ktoré sa tiež nazývajú „komplementaritu určujúce oblasti“, alebo „CDR“. Rozsah oblastí čítacích rámcov a CDR bol definovaný (pozri Kabat, vyššie). Sekvencie oblastí čítacích rámcov rôznych ľahkých alebo ťažkých reťazcov sú v rámci druhu relatívne konzervované. Oblasť čítacieho rámca protilátky, ktorá je kombináciou oblastí čítacieho rámca konštitutívnych ľahkých a ťažkých reťazcov, napomáha trojrozmernému usporiadaniu CDR.

CDR sú hlavne zodpovedné za väzbu na epitop antigénu. CDR každého reťazca sú zvyčajne označované ako CDR1, CDR2 a CDR3, postupné číslovanie začína od N zakončenia a je tiež zvyčajne určené reťazcom, v ktorom sa konkrétny CDR nachádza. V_H CDR3 sa nachádza vo variabilnej doméne ťažkého reťazca protilátky, kým V_L CDR1 je CDR1 z variabilnej domény ľahkého reťazca protilátky.

Odkazy „V_H“ alebo „VH“ sa týkajú variabilnej oblasti ťažkého reťazca imunoglobulínovej protilátky, ktoré zahrňujú ťažký reťazec v Fv, scFv, dsFv alebo Fab. Odkazy „V_L“ alebo „VL“ sa týkajú variabilnej oblasti ľahkého reťazca imunoglobulínovej protilátky, ktoré zahrňujú ľahký reťazec v Fv, scFv, dsFv alebo Fab.

Spojenie „jeden reťazec Fv“ alebo „scFv“ sa týka protilátky, v ktorej variabilné domény ťažkého reťazca a ľahkého reťazca vo zvyčajne dvojreťazcovej protilátke sú spojené do jedného reťazca. Typicky je medzi dva reťazce vložený peptidový linker, čo umožní vhodné zloženie a vytvorenie aktívneho väzobného miesta.

Výraz „linkerový peptid“ znamená peptid v protilátke

viažucej fragment (napríklad Fv fragment), ktorý umožňuje nepriamu väzbu variabilnej domény ťažkého reťazca na variabilnú doménu ľahkého reťazca.

Výraz „pôvodná protilátka“ sa týka protilátky, ktorá má byť mutovaná alebo zmenená za účelom získania protilátok alebo jej fragmentov, ktoré sa viažu na rovnaký epitop ako pôvodná protilátka. Keď nie je inak určené, alebo to nevyplýva z kontextu, používaný výraz „pôvodná protilátka“ sa týka scFv, označenej ako „MR1“ (GenBank, prístupové číslo U76382).

Výraz „aktívny bod“ znamená časť nukleotidovej sekvencie CDR alebo oblasti čítacieho rámca variabilnej domény, kde sa veľmi často vyskytujú prirodzené mutácie. CDR sú pokladané za oblasti hypervariability. Zistilo sa, že mutácie sa nenachádzajú len v CDR. Konkrétne miesta alebo aktívne body boli identifikované ako miesta, kde sa koncentrujú mutácie. Aktívne body sú charakterizované množstvom štruktúrnych znakov a sekvencií. Tieto „aktívne motívy“ môžu byť použité pre určenie aktívnych bodov. Dva rovnaké sekvenčné motívy, ktoré sú veľmi dobre charakterizované, sú tetranukleotidová sekvencia RGYW a serínová sekvencia AGY, kde R je A alebo G, Y je C alebo T a W je A alebo T.

„Cieľová zložka“ alebo „cieľová molekula“ je časť imunokonjugátu, ktorá má schopnosť nasmerovať imunokonjugát na určité bunky. Cieľová zložka je typicky protilátka, scFv, dsFv, Fab alebo $F(ab')_2$, ktorá rozoznáva špecifický antigén na určitých bunkách.

„Toxická zložka“ je cytotoxín alebo časť cytotoxínu, ktorá po začlenení do imunotoxínu spôsobuje cytotoxicitu imunotoxínu.

„Imunotoxín“ je molekula obsahujúca takú cieľovú molekulu ako je scFv a toxickú zložku, akou je pseudomonádový exotoxín („PE“) alebo jeho cytotoxický fragment.

Imunotoxíny uvádzané v predkladanom vynáleze sú zvyčajne exprimované v inklúzných telieskach *E. coli*. Inklúzne telieska sú prečistené, rozpustené v 6 M guanidín HCl a proteíny sa opäť renaturujú. Používaný výraz „výťažok“ sa týka množstva správne zloženého monomérneho imunotoxínu, ktorý bol získaný týmto postupom. Je vyjadrený v percentách ako: miligramy proteínov po MonoQ ionexovej chromatografii/miligramy renaturovaných proteínov inklúzných teliesok.

„Liečebná zložka“ je časť imunokonjugátu, ktorý sa má použiť ako liečivá látka.

Výraz „liečivá látka“ zahrňuje množstvo látok v súčasnosti dobre známych alebo neskôr objavených, pre použitie ako antineoplastické látky, protizápalové látky, cytokíny, protiinfekčné látky, aktivátory enzýmov alebo ich inhibítory, alosterické modifikátory, antibiotiká alebo iné látky podávané pre dosiahnutie vhodného liečebného účinku u pacienta. Liečebnou látkou môže byť tiež toxín alebo rádioizotop, kde zamýšľaným liečebným účinkom je napríklad usmrtenie buniek.

„Detekovateľná značka“ znamená časť imunokonjugátu, ktorá umožňuje jeho detekovanie. Napríklad, imunokonjugát môže byť označený rádioaktívnym izotopom, ktorý umožňuje pomocou imunohistochemických testov detekovať bunky, v ktorých je imunokonjugát prítomný.

Výraz „efektorová zložka“ a „efektorová molekula“ znamená časť imunokonjugátu, ktorá má účinok na bunky cez cieľovú zložku, alebo rozpoznáva prítomnosť imunokonjugátu. Efektorová zložka môže byť napríklad liečebná zložka, toxín, rádionaučeka alebo fluoroscenčná značka.

Výraz „imunokonjugát“ znamená chimérnu molekulu, ktorá obsahuje cieľovú molekulu (ako je scFv) pripojenú priamo (napríklad kovalentnou väzbou) alebo nepriamo (napríklad peptidovým linkérom) na efektorovú molekulu. V podskupine

imunokonjugátov je efektorová molekula toxín a chimérna molekula je potom presnejšie nazývaná imunotoxín".

Výrazy „účinné množstvo" alebo „množstvo účinné pre" alebo „liečebne účinné množstvo" sa týka dávky liečebnej látky, dostatočnej pre vytvorenie požadovaného výsledku, ako je inhibícia syntézy bunkových proteínov aspoň o 50 %, alebo usmrtenie buniek.

Výraz „toxín" zahrňuje abrin, ricín, pseudomonádový exotoxín („PE"), toxín záškrtu (DT), botulínový jed alebo ich modifikácie. Napríklad, PE a DT sú vysoko toxické látky, ktoré zvyčajne spôsobujú smrť toxickým účinkom na pečeň. PE a DT po odstránení natívnej cieľovej časti toxínu (napríklad domény Ia z PE alebo B reťazca z DT) však môžu byť zmenené na formu pre použitie ako imunotoxín. Odstránená časť toxínu môže byť nahradená inou cieľovou časťou, ako je protilátka.

Výraz „IC₅₀" znamená koncentráciu toxínu alebo imunotoxínu (vyjadrené v ng/ml), ktorá spôsobí 50 % inhibíciu syntézy proteínov.

Výraz „kontaktný" sa týka umiestnenia v priamom fyzickom spojení.

„Expresívny plazmid" obsahuje nukleotidovú sekvenciu kódujúcu určitú molekulu, ktorá je operatívne pripojená na promótor.

Používaný výrazy „polypeptid", „peptid" a „proteín" sú vzájomne zameniteľné a vzťahujú sa na polymér aminokyselinových zvyškov. Výrazy sa používajú na označenie aminokyselinových zvyškov, v ktorých jeden alebo viac aminokyselinových zvyškov sú umelé chemické analógy, ktoré zodpovedajú prirodzene sa vyskytujúcim aminokyselinám, rovnako aj prirodzene sa vyskytujúcim aminokyselinovým polymérom. Výrazy sa tiež používajú na označenie polymérov, ktoré obsahujú konzervatívne aminokyselinové substitúcie, pri ktorých si proteín zachováva svoju funkčnosť.

Výraz „zvyšok“ alebo aminokyselinový zvyšok“ znamená aminokyselinu, ktorá je zabudovaná do proteínu, polypeptidu alebo peptidu (spoločné označenie „peptid“). Aminokyselina môže byť prirodzene sa vyskytujúca aminokyselina, keď nie je inak obmedzené, môže obsahovať známe analógy prirodzených aminokyselín, ktoré môžu pôsobiť podobným spôsobom ako prirodzene sa vyskytujúce aminokyseliny.

Aminokyseliny a analógy sú označené jedným písmenom alebo tromi písmenami tak, ako je uvedené v Tabuľke 1.

TABUĽKA 1
Nomenklatúra aminokyselín

<u>názov</u>	<u>3 písmená</u>	<u>1 písmeno</u>
alanín	Ala	A
arginín	Arg	R
asparagín	Asn	N
kyselina asparágová	Asp	D
cysteín	Cys	C
kyselina glutámová	Glu	E
glutamín	Gln	Q
glycín	Gly	G
histidín	His	H
izoleucín	Ile	I
leucín	Leu	L
lyzín	Lys	K
metionín	Met	M
fenylalanín	Phe	F
prolín	Pro	P
serín	Ser	S
treonín	Thr	T
tryptofán	Trp	W
tyrozín	Tyr	Y
valín	Val	V

„Konzervatívna substitúcia“, keď popisujú proteín, sa týka zmeny aminokyselinového zloženia proteínu, ktorá výrazne nemení aktivitu proteínu. „Konzervatívne zmenené variácie“ konkrétnej aminokyselinovej sekvencie sa týkajú aminokyselinových substitúcií týchto aminokyselín, ktoré nie sú rozhodujúce pre aktivitu proteínu, alebo substitúcií aminokyselín inými aminokyselinami, ktoré majú podobné vlastnosti (napríklad kyslosť, zásaditosť, pozitívny alebo negatívny náboj, sú polárne alebo nepolárne atď.) a substitúcia dokonca rozhodujúcich aminokyselín výrazne nemení aktivitu proteínu. V odbore sú dobre známe prehľady konzervatívnych substitúcií, ktoré poskytujú funkčne podobné aminokyseliny.

Každá z nasledujúcich šiestich skupín v Tabuľke 2 obsahuje aminokyseliny, ktoré sú typickými konzervatívnymi substitúciami jedna pre druhú:

TABUĽKA 2

- 1/ alanín (A), serín (S), treonín (T)
- 2/ kyselina asparágová (D), kyselina glutámová (E)
- 3/ asparagín (N), glutamín (Q)
- 4/ arginín (R), lyzín (K)
- 5/ izoleucín (I), leucín (L), metionín (M), valín (V)
- 6/ fenylalanín (F), tyrozín (Y), tryptofán (W)

Pozri tiež Creighton, *PROTEINS*, W. H. Freeman and Company, New York, 1984. Treba však poznamenať, že kým substitúcia fenylalanínu za tryptofán je všeobecne považovaná za konzervatívnu substitúciu, substitúcia tryptofánu za fenylalanín v aktívnom bode V_L CDR3 v scFv MR1 tvorí imunotoxín, ktorý je aktívnejší ako pôvodná scFv. Aj keď tieto aminokyseliny sú

považované za konzervatívne substitúcie pre časti protilátky mimo CDR, v zmysle predkladaného vynálezu tieto dve aminokyseliny nie sú v aktívnom bode konzervatívnou substitúciou jedna za druhú. Na základe týchto výsledkov, žiadna aminokyselinová substitúcia v aktívnom bode nemôže byť považovaná za konzervatívnu substitúciu, kým nie je testovaná, napríklad, sadou testov, či ovplyvňuje alebo neovplyvňuje väzobnú afinitu výslednej molekuly, alebo výťažok imunotoxínu vytvorený s touto molekulou ako cieľovou časťou.

Výrazy „významne podobný“ v zmysle peptidu znamená, že sekvencia peptidu je identická aspoň 90 %, výhodne 95 %, s referenčnou sekvenciou cez porovnávacie okno 10 až 20 aminokyselín. Percentá sekvenčnej identity sú určené porovnaním dvoch optimálne porovnateľných sekvencií cez porovnávacie okno, kde časť polynukleotidovej sekvencie v porovnávacom okne môže obsahovať v porovnaní s referenčnou sekvenciou (ktorá neobsahuje adície a delécie) adície alebo delécie (napríklad medzery) pre optimálne porovnanie dvoch sekvencií. Percentá sú vypočítané určením počtu pozícií, v ktorých sa vyskytujú identické bázy nukleových kyselín alebo aminokyselinové zvyšky v obidvoch sekvenciách, to znamená, počtu zhodných pozícií, deleno celkový počet pozícií v porovnávacom okne a vynásobením výsledku 100, čím sa získa výsledok ako percentá sekvenčnej identity.

Slovné spojenie „disulfidová väzba“ alebo „cysteín-cysteín disulfidová väzba“ sa týka kovalentnej interakcie medzi dvomi cysteínmi, v ktorých sú atómy síry oxidované za vytvorenia disulfidovej väzby. Priemerná väzobná energia disulfidovej väzby je asi 60 kcal/mol, v porovnaní s 1 až 2 kcal/mol pre vodíkový mostík. V predkladanom vynáleze cysteíny, ktoré tvoria disulfidovú väzbu, sú v oblastiach čítacieho rámca jednoreťazcovej protilátky a stabilizujú konformáciu protilátky.

Výrazy „konjugovaný“, „pripojený“, „naviazaný“ alebo „spojený“ znamenajú spojenie dvoch polypeptidov do jednej kontinuálnej polypeptidovej molekuly. Výrazy sa vzťahujú na pripojenie zložky protilátky na efektorovú molekulu (EM). Spojenie môže byť buď chemickým alebo rekombinantným spôsobom. Chemický spôsob sa týka reakcie medzi protilátkovou zložkou a efektorovou molekulou tak, že sa vytvorí kovalentná väzba medzi dvomi molekulami za vytvorenia jednej molekuly.

Výraz „rekombinantný“ sa vzťahuje na proteín, pripravený použitím buniek, ktoré v natívnom stave nemajú endogénnu kópiu DNA, schopnú exprimovať proteín. Bunky produkujú rekombinantný proteín, pretože boli geneticky upravené vložením vhodnej izolovanej sekvencie nukleovej kyseliny. Výraz sa tiež vzťahuje na bunku alebo nukleovú kyselinu alebo vektor, ktorý bol zmenený vložením heterológnej nukleovej kyseliny alebo zmenou natívnej nukleovej kyseliny na formu, ktorá nie je natívna pre takúto bunku, alebo takáto bunka je odvodená od bunky modifikovanej. Napríklad, rekombinantné bunky exprimujú gény, ktoré sa nachádzajú v natívnej (nerekombinantnej) forme buniek, expresívne mutanty génov, ktoré nie sú prítomné v natívnej forme, alebo exprimujú natívne gény, ktoré sú abnormálne exprimované, málo exprimované alebo vôbec nie sú exprimované.

Používané slovné spojenie „nukleová kyselina“ alebo „sekvencia nukleovej kyseliny“ sa vzťahuje na deoxyribonukleový alebo ribonukleový polymér buď v jedno- alebo dvojvláknovej forme a keď nie je inak obmedzené, obsahuje známe analógy prirodzených nukleotidov, ktoré hybridizujú s nukleovými kyselinami spôsobom podobným pre prirodzene sa vyskytujúce nukleotidy. Keď nie je uvedené inak, sekvencia konkrétnej nukleovej kyseliny zahŕňa jej komplementárnu sekvenciu rovnako aj konzervatívne varianty, napríklad

nukleové kyseliny, prítomné vo výmenných polohách takých kodónov a variant, že ich translácia do proteínov má za následok konzervatívnu substitúciu aminokyseliny.

Používanie výrazu „kódujúci“ vzhľadom ku špecifickej nukleovej kyseline sa vzťahuje na nukleové kyseliny, ktoré obsahujú informáciu pre transláciu do špecifického proteínu. Informácia je určená použitím kodónov. Zvyčajne je aminokyselínová sekvencia kódovaná nukleovou kyselinou „univerzálneho“ genetického kódu. Môžu byť použité varianty univerzálneho kódu, ktorý je prítomný v niektorých mitochondriách rastlín, zvierat a plesní, baktérií *Mycoplasma capricolum* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2306-2309, 1985), alebo rias *Macronucleus*. Môžu byť použité vtedy, keď nukleová kyselina je exprimovaná za použitia translačného aparátu týchto organizmov.

Slovné spojenie „fúzia v čítacom rámci“ sa týka spojenia dvoch alebo viacerých sekvencií nukleových kyselín, ktoré kódujú polypeptidy, takže spojená sekvencia nukleových kyselín je translantovaná do jednoreťazcového proteínu, ktorý obsahuje pôvodné polypeptidové reťazce.

Používanie výrazu „exprimovaný“ sa vzťahuje na transláciu nukleovej kyseliny do proteínu. Exprimované proteíny môžu zostať intracelulárne, môžu byť zabudované bo bunkovej povrchovej membrány, alebo môžu byť sekretované do extracelulárnej matrice alebo média.

Označenie „hostiteľská bunka“ znamená, že podporuje replikáciu alebo expresiu expresívneho vektora. Hostiteľské bunky môžu byť prokaryotické bunky, napríklad *E. coli*, alebo eukaryotické bunky, napríklad kvasinky, bunky hmyzu, obojživelníkov alebo cicavcov.

Slovné spojenie „fágová knižnica“ sa týka populácie bakteriofágov, každý z nich obsahuje cudziu cDNA rekombi-

nantne fúzovanú v čítacom rámci na povrchový proteín. Po replikácii v bakteriálnom hostiteľovi, zvyčajne *E. coli*, sú fágy, ktoré obsahujú určitú cudziu cDNA, vybraté pomocou expresie cudzieho proteínu na povrchu fágu.

Výrazy „zhodný“ alebo percentá „zhodnosti“ pre dve alebo viac nukleových kyselín alebo polypeptidových sekvencií, pre dve alebo viac sekvencií alebo subsekvencií znamená, že sú zhodné alebo majú zhodné určité množstvo aminokyselinových zvyškov alebo nukleotidov, keď sa porovnajú na maximálnu zhodnosť, použitím algoritmu pre sekvenčné porovnanie alebo vizuálnu kontrolu.

Slovné spojenie „značne zhodný“ znamená, že dve aminokyseliny alebo polypeptidy, dve alebo viac sekvencií alebo subsekvencií, majú aspoň 60 %, výhodne 80 % a najvýhodnejšie 90 až 95 nukleotidov alebo aminokyselinových zvyškov zhodných, keď sa porovnajú na maximálnu zhodnosť použitím algoritmu pre sekvenčné porovnanie alebo vizuálnu kontrolu. Prednostne existuje značná zhodnosť medzi oblasťami sekvencií, ktoré sú dlhé aspoň 50 zvyškov, výhodne medzi oblasťami aspoň 100 zvyškov a najvýhodnejšie sú sekvencie značne zhodné medzi 150 zvyškami. V najvýhodnejšom uskutočnení sú sekvencie značne zhodné po celej dĺžke kódujúcich oblastí.

Pri porovnaní sekvencií zvyčajne jedna sekvencia je referenčná sekvencia, voči ktorej sú porovnávané testované sekvencie. Keď sa použije algoritmus pre sekvenčné porovnanie, testovaná a referenčná sekvencia sú vložené do počítača, keď je potrebné sú určené sekvenčné koordináty a sú určené parametre programu sekvenčného algoritmu. Na základe určených parametrov programu algoritmus pre sekvenčné porovnávanie potom vypočíta percento sekvenčnej podobnosti. V odbore je známych veľa programov pre takéto porovnávanie.

Ďalším znakom, že dve sekvencie nukleových kyselín alebo

polypeptidov sú významne zhodné je, že polypeptid kódovaný prvou nukleovou kyselinou, vykazuje imunologicky skríženú reakciu s polypeptidom, ktorý je kódovaný druhou nukleovou kyselinou tak, ako je popísané ďalej. Polypeptid je zvyčajne zhodný s druhým polypeptidom napríklad vtedy, keď sa dva peptidy líšia navzájom len v konzervatívnych substitúciách. Iný znakom, že dve sekvencie nukleových kyselín sú významne zhodné je to, že dve molekuly hybridizujú jedna s druhou za prísnych podmienok tak, ako je popísané nižšie.

„Ex vivo a „in vitro“ znamená mimo organizmu, z ktorého boli získané bunky.

Slovné spojenie „malígna bunka“ alebo „zhubné bujnenie“ sa týka nádorov alebo nádorových buniek, ktoré sú invazívne a/alebo schopné metastazovať, napríklad rakovinové bunky.

Používanie slovného spojenia „cicavčie bunky“ sa vzťahuje na bunky, ktoré sú odvodené z cicavčích buniek, ktoré zahŕňujú ľudské, potkanie, myšie, morských prasiat, šimpanzov alebo opíc. Bunky môžu byť kultivované *in vivo* alebo *in vitro*.

Výraz „selektívne reaktívny“ sa týka vzhlľadom k antigénu, uprednostňovanej asociácie celej protilátky alebo jej časti, s bunkou alebo tkanivom, ktoré majú tento antigén a nie s bunkami alebo tkanivami, ktoré nemajú tento antigén. Zistilo sa, že sa môže vyskytovať určitý stupeň nešpecifických interakcií medzi molekulou a necieľovou bunkou alebo tkanivom. Selektívna reaktivita môže byť rozlíšená pomocou špecifického rozpoznanie antigénu. Hoci sa reaktívne protilátky selektívne viažu na antigén, väzba môže mať nízku afinitu. Špecifická väzba má však za následok oveľa silnejšie spojenie medzi protilátkou a bunkami, ktoré nesú antigén, v porovnaní s väzbou protilátky na bunky, ktoré nemajú antigén. Špecifická väzba má za následok zvyčajne viac ako 2-

násobné, výhodne viac ako 5-násobné, výhodnejšie viac ako 10-násobné a najvýhodnejšie viac ako 100-násobné zvýšenie väzby protilátky (za časovú jednotku) na bunky alebo tkanivo, ktoré má EGFRvIII, pri porovnaní s bunkami alebo tkanivami, ktoré nemajú EGFRvIII. Špecifická väzba proteínu v týchto podmienkach si vyžaduje protilátku, ktorá je vybratá pre svoju špecificitu pre konkrétny proteín. Rozmanitosť imunotestov je vhodná pre výber protilátok špecificky imunoreaktívnych pre konkrétny proteín. Napríklad ELISA imunotesty na pevnej fáze sa zvyčajne používajú pre výber monoklonálnych protilátok špecificky imunoreaktívnych pre proteín. Pozri Harlow a Lane, ANTIBODIES, laboratórny manuál, Cold Spring Harbour Publication, New York (1988), popisuje usporiadanie imunotestov a podmienky, ktoré môžu byť použité na určenie špecifickej imunoreaktivity.

Výraz „imunologicky reaktívne podmienky“ sa vzťahuje na podmienky, ktoré umožňujú protilátke, pripravenej voči špecifickému epitopu, naviazať sa tak, že epitop je na vyššom stupni detekcie ako väzba na podstatne všetky ostatné epitopy. Imunologicky reaktívne podmienky sú závislé na usporiadaní reakcie väzby protilátky a tieto podmienky sú zachované v podmienkach imunotestu, alebo takéto podmienky sa vyskytujú *in vivo*. Pozri Harlow a Lane, vyššie, pre popis usporiadania a podmienok imunotestov. Prednostne sú imunologicky reakčné podmienky, použité v spôsoboch uskutočnenia predkladaného vynálezu, „fyziologické podmienky“, ktoré sa vzťahujú na podmienky (napríklad teplota, osmolarita, pH), ktoré sú normálne vo vnútri živých cicavcov alebo cicavčích bunkách. Zistilo sa, že niektoré orgány sú vystavené extrémnym podmienkam, prostrediu vo vnútri organizmu. Intracelulárne hodnoty pH sú okolo 7 (napríklad od pH 6,0 do pH 8,0, zvyčajne pH 6,5 až 7,5) pre vodu ako prevládajúce

rozpúšťadlo a platia pre teploty v rozsahu 0 °C až 50 °C. Osmolarita je v takom rozsahu, že podporuje životaschopnosť a proliferáciu buniek.

III. Príprava protilátok s vyššou afinitou pre EGFRvIII ako má MR1

Protilátky sa viažu na antigény cez zvyšky na ich CDR. Mutagenéza CDR často používa pre zvýšenie afinity Fab a Fv fragmenty protilátok. Pre CDR mutagenézu existuje veľa rôznych prístupov. Sú to mutagenéza kodónov (Yelton a spol., *J. Immunol.* 155:1994-2004, 1995), vnesenie CDR (Barbas a spol., *Trends Biotech.* 14:230-234, 1996; Yang a spol., *J. Biol. Chem.* 254:392-403, 1995), replikácia majúca náchylnosť k chybám (Low a spol., *J. Mol. Biol.* 260:359-368, 1996) a syntetická príprava CDR (de Kruif a spol., *J. Mol. Biol.* 248:97-105, 1995) si vyžaduje prípravu veľkých knižníc, ktoré sú technicky náročné na prípravu a ťažko sa realizujú. Trendom v dozrievaní protilátkovej afinity je izolácia vysoko afinitných väzobných látok z relatívne menších knižníc (Pini a spol., *J. Biol. Chem.* 273:21769-21776, 1998; Wu a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:6037-6042, 1998; Chowdhury a spol., *Nature Biotechnol.* 17:568-572, 1999). Všetky tieto prístupy zahrňujú prípravu expresívnych knižníc pre protilátky s mutáciou v CDR a výberom najlepších väzobných látok.

Technológia vytvorenia fágov sa stala užitočným nástrojom pre skríning veľkých peptidových alebo proteínových knižníc (Winter a spol., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994; McCafferty J., *Nature* 348:552-554, 1990; Barbas a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:7978-7982, 1991). Jeden reťazec Fvs môže byť exprimovaný na fágových častiach ako fúzie s M13 gén 3 proteínom vo fagemidovom vektore. Fúzne proteíny sú exprimované v *E. coli* a v prítomnosti helper fágu

sú umiestnené na špičky M13 fágov, ktoré môžu byť odobraté z kultivačného média. Fágy, ktoré nesú scFv fúzne proteíny, a ktoré sa viažu na špecifický antigén, sú vybraté pomocou selektívneho výberu fágových knižníc bunkami exprimujúcimi antigén, alebo selektívneho výberu na povrchu, na ktorý je antigén naviazaný, ako sú magnetické guľičky. Fágy, ktoré nie sú naviazané, sú odmyté, naviazané fágy sú eluované a amplifikované reinfekciou do *E. coli*. Viac cyklov selektívneho výberu má za následok zvýšenie počtu špecifických väzobných látok. Prísnejšie podmienky selektívneho výberu umožnia účinnejšie oddelenie lepších väzobných látok od horších väzobných látok.

Technológia vytvorenia fágov môže byť využitá pre vyvinutie takých protilátok, ktoré sa viažu na EGFRvIII s vyššou afinitou ako MR1. Odborníci dobre vedia, že intaktná protilátka obsahuje dva ťažké reťazce a dva ľahké reťazce; každý reťazec má tri CDR, označené ako 1, 2 a 3. Je známe, že každý CDR nerovnomerne prispieva k väzbe antigénu. Pozri Kuby J., *Immunology*, W.H. Freeman and Co., New York (tretie vydanie, 1998). Aminokyseliny ktoréhokoľvek CDR môžu byť mutované pre získanie mutácií s vyššou afinitou, CDR3 každého reťazca prispieva viac k väzbe antigénu ako CDR1 alebo CDR2 toho istého reťazca. Pozri Kuby, strana 117, vyššie. Zvlášť výhodná môže byť mutácia v CDR3 V_H a V_L reťazcov. Okrem toho, CDR3 V_H v myšej MR1 CDR3 je relatívne dlhá, čo môže čiastočne prispievať k relatívnej stabilite MR1 scFv v porovnaní s inými scFv.

Po odstránení posledných dvoch aminokyselín z V_H CDR3, ktoré sa nezúčastňujú väzby na antigén z dôvodov uvedených vyššie, bolo zvyšných deväť zvyškov v V_H CDR3 individuálne substituovaných každou z 19 prirodzených aminokyselín. Len mutácia serínu a treonínu v polohách aminokyselín 98 a 99

mala za následok zvýšenie cytotoxicity výsledného imunotoxínu (aminokyselinová sekvencia V_H a V_L CDR je uvedená jednopísmenným kódom v Tabuľkách 5, 6 a 7). Sekvencia V_H neukazuje dva zvyšky D101 a Y102, nakoľko sa nepredpokladá, že sa zúčastňujú väzby na antigén). Výhodné substitúcie v V_H CDR3 boli P98-Y99, ktorých hodnota IC_{50} pre PE38 imunotoxín bola 3,5 ng/ml, P98-N99, P98-W99 a P98-I99, všetky mali hodnoty IC_{50} 4,5 ng, P98-F99 mal hodnotu IC_{50} 6 ng, IC_{50} pre P98-V99 mal hodnotu 6,5 ng. Štyri klóny: P98-S99, W98-V99, S98-W99 a P98-T99 mali hodnotu IC_{50} rovnakú ako pôvodný klón. (Podľa konvencie výraz „P98-Y99“ znamená, že aminokyselina prolín sa nachádza v polohe 98 daného polypeptidu, v tomto prípade MR1 V_H CDR3, a že tyrozín sa nachádza v polohe 99, ale zvyšok molekuly je normálny peptid, v tomto prípade je to pôvodná protilátka MR1).

Čo sa týka mutácie V_L CDR3, len jedna mutácia, P92W, dávala imunotoxínu väčšiu aktivitu, ako má pôvodná protilátka. Jeho hodnota IC_{50} bola 1,3 ng/ml. V tomto prípade „pôvodná“ molekula bola MR1 so substitúciou P98-Y99 vo V_H CDR3, ktorá bez pridanej substitúcie v V_L CDR3 mala hodnotu IC_{50} 3,5 ng/ml. Táto mutácia MR1, ktorá spojuje mutácie v CDR3 oboch V_H a V_L reťazcov (V_H S98P-T99Y- V_L F92W) bola najviac cytotoxicky testovanou formou, keď bola pripravená ako cieľová časť imunotoxínu, a je označovaná „MR1-1“.

Tieto výsledky ukazujú, že mutácie v rôznych CDR môžu mať ďalší účinok a môžu zvýšiť cytotoxicitu výsledného imunotoxínu. Z pohľadu týchto výsledkov budú mať mutácie aminokyselín v aktívnych bodoch CDR1 a 2 v V_H a V_L reťazcoch MR1 protilátok podobné následky, to znamená ďalšie zvýšenie afinity pre EGFRvIII v imunotoxínoch a ďalšie zvýšenie cytotoxicity pri porovnaní s MR1.

Najlepšie je analyzovať čo najskôr tvorbu klónov. Selek-

tívny výber po dosiahnutí vrcholov by mohol byť škodlivý, pretože je nebezpečie straty klónov. Je možné, že Fvs s nízkou afinitou, ale vysokou expresiou, môžu byť vo veľkom množstve, kým látky s dobrou väzbou môžu byť stratené. Tento dôkaz bol pozorovaný počas selektívneho výberu knižníc pre ľahký reťazec CDR3: mutant F92S s nízkou afinitou (K_d 22 nM) bol zistený v siedmich z desiatich klónov testovaných po treťom cykle. Najlepšia väzobná látka, F92W, bola prítomná len jedenkrát. Naproti tomu v druhom cykle F92S bol zistený len v dvoch zo sedemnástich klónov, kým F92W bol prítomný v šiestich zo sedemnástich klónov.

IV. Protilátky voči EGFRvIII

Predkladaný vynález popisuje protilátky, ktoré sa viažu na EGFRvIII s vyššou afinitou ako doteraz známe protilátky, a ktoré selektívne reagujú s EGFRvIII. Vynález hlavne popisuje protilátky, ktoré majú nižšiu hodnotu K_d pre EGFRvIII ako má MR1, v minulosti najlepšia známa scFv, cielená na tento antigén. Okrem toho, tieto protilátky tvoria imunotoxíny, ktoré majú vyššiu cytotoxicitu pre EGFRvIII exprimujúce bunky ako má rovnaký imunotoxín vytvorený s MR1. Vynález ďalej poskytuje spôsob prípravy protilátok s vyššou afinitou a väčšou cytotoxicitou voči EGFRvIII ako má MR1. Popísané imunokonjugáty sú cielené k EGFRvIII a používajú protilátky podľa predkladaného vynálezu. Tieto protilátky sú za imunologických podmienok selektívne reaktívne s determinantami EGFRvIII, ktoré sa nachádzajú na povrchu cicavčích buniek, a ktoré sú prístupné pre protilátky z extracelulárneho prostredia.

Vo výhodných uskutočneniach predkladaného vynálezu je protilátka voči EGFRvIII rekombinantná protilátka, ako je scFv alebo disulfidom stabilizovaná Fv protilátka. Fv pro-

tilátky majú zvyčajne veľkosť 25 kDa a obsahujú celé antigén viažuce miesto s 3 CDR na ťažkom i ľahkom reťazci. Keď V_H a V_L reťazce sú exprimované nekontinuálne, reťazce Fv protilátky sú zvyčajne spojené nekovalentnými väzbami. Tieto reťazce však majú po zriedení tendenciu disociovať, preto boli vyvinuté spôsoby prekriženia reťazcov cez glutaraldehyd, intermolekulárne disulfidické väzby alebo pomocou peptidového likeru. Disulfidom stabilizované Fv sú uvedené, napríklad, v US patente č. 5 747 654.

Vo zvlášť výhodnom uskutočnení vynálezu je protilátka tvorená jedným reťazcom Fv (scFv). V_H a V_L oblasti scFv protilátky obsahujú jeden reťazec, ktorý je poskladaný a vytvára väzobné miesto pre antigén, ktoré je podobné miestu nachádzajúcemu sa v dvojreťazcových protilátkach. Po zložení protilátky, nekovalentné interakcie stabilizujú jednoreťazcovú protilátku. Vo výhodnejšom uskutočnení vynálezu je scFv produkovaná rekombinantne. Odborník vie, že podľa predkladaného vynálezu môžu byť pripravené konzervatívne varianty protilátok. Takéto konzervatívne varianty použité v scFv fragmentoch si ponechávajú rozhodujúce aminokyselinové zvyšky, ktoré sú potrebné pre správne poskladanie a stabilizáciu medzi V_H a V_L oblasťami.

V niektorých uskutočneniach predkladaného vynálezu je scFv protilátka priamo spojená s efektorovou molekulou (EM) pomocou ľahkého reťazca. Avšak scFv protilátky môžu byť pripojené na EM cez amino- alebo karboxylový koniec.

V niektorých uskutočneniach V_H a V_L oblasti protilátky môžu byť priamo spojené a odborníci ocenia, že oblasti môžu byť oddelené peptidovým linkérom, ktorý je tvorený jednou alebo viacerými aminokyselinami. Peptidové likery a ich použitie sú dobre známe v odbore. Pozri: Huston a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:5879, 1988; Bird a spol., *Science* 242:4236,

1988; Glockshuber a spol., *Biochemistry* 29:1362, 1990; US patent č. 4 946 778, US patent č. 5 132 405 a Stemmer a spol., *Biotechniques* 14:256-265, 1993, všetky sú uvedené v literárnych odkazoch. Všeobecne, peptidový linker nebude mať špecifickú biologickú aktivitu inú, ako spojiť oblasti, alebo zachovať minimálnu vzdialenosť, alebo iný priestorový vzťah medzi V_H a V_L . Avšak konštitutívne aminokyseliny peptidového linkera môžu byť vybraté pre dosiahnutie niektorých vlastností molekuly ako je poskladanie, náboj alebo hydrofobicita. Jenoreťazcové Fv (scFv) protilátky voliteľne zahrňujú peptidový linker, ktorý nie je dlhší ako 50 aminokyselín, ktorý nie je všeobecne dlhší ako 40 aminokyselín, výhodne nie je dlhší ako 30 aminokyselín, výhodnejšie nie je dlhší viac ako 20 aminokyselín. V niektorých uskutočneniach je peptidový linker paralelný sekvenciou Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, výhodne má 2, 3, 4, 5, alebo 6 takýchto sekvencií. Môžu sa uskutočniť aj niektoré substitúcie aminokyselín v likeri. Napríklad, valín môže byť substituovaný glycínom.

A. Príprava scFv

Ako je uvedené vyššie, vo výhodných uskutočneniach predkladaného vynálezu je protilátka (napríklad cieľová zložka imunotoxínu) scFv. Spôsob prípravy scFv protilátok už bol popísaný. Pozri: Huse a spol., vyššie; Ward a spol., *Nature* 341:544-546, 1989; a Vaughan a spol., vyššie. V krátkosti, z B buniek je vyizolovaná mDNA a potom je pripravená cDNA. cDNA je amplifikovaná dobre známymi technikami, ako je PCR, s primérmí špecifickými pre variabilné oblasti ťažkých a ľahkých reťazcov imunoglobulínov. PCR produkty sú prečistené, napríklad, elektroforézou na agarózovom géli, a potom sú spojené sekvencie nukleových kyselín. Keď je prítomný vhodný

linker, sekvencie nukleových kyselín, ktoré kódujú peptid, sú vložené medzi sekvencie nukleových kyselín ťažkého a ľahkého reťazca. Sekvencie môžu byť spojené technikami známymi v odbore, ako je ligácia tupých koncov, inzercia restriktčných miest na konci produktov PCR, alebo spojenie prečnievajúcich predĺžení (Chowdhury a spol., *Mol. Immunol.* 34:9, 1997). Po amplifikácii je nukleová kyselina, ktorá kóduje scFv, vložená do vektora, opäť technikami známymi v odbore. Prednostne je vektor schopný replikácie v prokaryotických bunkách a je exprimovaný tak v eukaryotických, ako aj v prokaryotických bunkách. Vo výhodnom uskutočnení sú scFv gény spojené s PE38 génom krátkym linkérom a sú klónované do T7 expresívneho vektora. V najvýhodnejšom uskutočnení je expresia scFv pod kontrolou T7 promótoru v *E. coli* BL21 (λ DE3).

Ako je uvedené v predchádzajúcich odsekoch, scFv, ktoré sa špecificky viažu na EGFRvIII sú detekované pomocou selektívneho výberu. Selektívny výber sa môže uskutočniť ktorýmkoľvek z rôznych spôsobov. Vo výhodnom uskutočnení predkladaného vynálezu môže byť selektívny výber uskutočnený použitím buniek, ktoré na svojom povrchu exprimujú EGFRvIII. Protokol pre selektívny výber s použitím buniek je uvedený v Príkladoch uskutočnenia vynálezu, nižšie. Selektívny výber sa môže tiež uskutočniť na pevnom povrchu, ktorý je pokrytý EGFRvIII, a inkubáciou fágov na povrchu počas vhodného času a vo vhodných podmienkach. Zvyčajne môžu povrch tvoriť magnetické guľičky. Nenaviazané fágy sú odmyté z pevného povrchu a naviazané fágy sú vymyté.

Nájdienie protilátky s najvyššou afinitou je podmienené účinnosťou výberového procesu a závisí od množstva klónov, ktoré treba prehľadávať, a od presnosti. Zvyčajne väčšia presnosť sa vzťahuje na selektívnejší výber. V prísnych podmienkach sa však fág nenaviaže. Po jednom cykle výberu

fágy, ktoré sa naviažu na EGFRvIII potiahnuté plochy alebo bunky exprimujúce na povrchu EGFRvIII, sú potom rozmnožené v *E. coli* a vložené do ďalšieho cyklu selektívneho výberu. Týmto spôsobom sa po treťom cykle získa niekoľkonásobné obohatenie. Hoci obohatenie v každom cykle je malé, mnoho cyklov selektívneho výberu umožní izoláciu vzácných fágov a genetického materiálu, ktorý obsahuje gén kódujúci scFv s najvyššou afinitou, alebo gén s lepšou expresiou vo fagu.

Nezávisle od spôsobu selektívneho výberu je fyzikálny vzťah medzi genotypom a fenotypom zaistený fágovým vystavením a vytvára sa tak možnosť testovať všetkých členov cDNA knižnice pre väzbu na antigén, dokonca aj s veľkými knižnicami klónov.

B. Vázobná afinita protilátok

Protilátky podľa vynálezu sa viažu na epitop EGFRvIII s hodnotou K_d nižšou aspoň o 1 nM ako má pôvodná protilátka MR1. Vázobná afinita pre cieľový antigén sa zvyčajne hodnotí alebo meria interakciou protilátka - antigén. Sú to kompetitívne testy, saturačné testy alebo imunotesty, ako je ELISA alebo RIA.

Tieto testy môžu byť použité na určenie disociačnej konštanty protilátky. Výraz „disociačná konštanta“ sa týka merania afinity protilátky pre antigén. Špecifická väzba medzi protilátkou a antigénom je prítomná vtedy, keď hodnota disociačnej konštanty ($K_d = 1/K$, kde K je afinitná konštanta) protilátky je v mikromolárnom rozsahu, výhodne < 100 nM, najvýhodnejšie $< 0,1$ nM. Molekuly protilátky budú zvyčajne mať nižší rozsah K_d . $K_d = [Ab-Ag]/[Ab][Ag]$, kde $[Ab]$ je koncentrácia protilátky pri rovnováhe, $[Ag]$ je koncentrácia antigénu pri rovnováhe a $[Ab-Ag]$ je koncentrácia komplexu protilátka - antigén pri rovnováhe. Zvyčajne väzobné inter-

akcie medzi antigénom a protilátkou zahrňujú nekovalentné spojenia, ako sú elektrostatická príťažlivosť, Van der Waalsove sily a vodíkové väzby. Tento spôsob určenia väzobnej špecificity sa vzťahuje na jeden ťažký a/alebo ľahký reťazec, CDR, fúzne proteíny alebo fragmenty ťažkých a/alebo ľahkých reťazcov, ktoré sú špecifické pre EGFRvIII.

C. Imunotesty

Protilátky môžu byť detekované a/alebo kvantifikované použitím veľkého množstva dobre známych imunologických väzobných testov. Pozri: US patenty č. 4 366 241; 4 376 110; 4 517 288 a 4 837 168. Prehľad všeobecných imunotestov sa nachádza tiež v *Methods in cell biology*, zv. 37, Asai, ed. Academic Press Inc. New York, 1993; *Basic and clinical immunology* 7. vydanie, Stites and Terr ed. 1991. Imunologické väzobné testy (alebo imunotesty) všeobecne používajú ligand (napríklad EGFRvIII) pre špecifickú väzbu na- a často imobilizovanú protilátku. Protilátky, používané v imunotestoch podľa predkladaného vynálezu sú podrobne popísané vyššie.

Imunotesty tiež často používajú pre stanovenie špecifickej väzby a označenie väzobného komplexu ligand-proti látka, označené činidlo. Samotné značiace činidlo môže byť jedna zo zložiek protilátka-analytický komplex, napríklad, protilátka voči EGFRvIII. Značiace činidlo môže byť alternatívne treťou zložkou, akou je iná protilátka, ktorá sa špecificky viaže na protilátka-EGFRvIII proteínový komplex.

V jednom uskutočnení je kompetitívny test založený na tom, že označené činidlo je druhá protilátka voči EGFRvIII. Dve protilátky tak súťažia o naviazanie na imobilizovaný EGFRvIII. Keď je afinita prvej protilátky porovnávaná s MR1, druhou protilátkou môže byť MR1. Pri nekompetitívnom usporiadaní EGFRvIII protilátke chýba označenie, ale označená je

druhá protilátka, ktorá je špecifická voči anti-EGFRvIII protilátkam, napríklad myšia, a ktorá sa viaže na anti-EGFRvIII protilátku.

Ako označujúce činidlá môžu byť tiež použité iné proteíny, ktoré sú schopné špecificky sa viazať na imunoglobulínové konštantné oblasti, (proteín A alebo G). Tieto proteíny sú zvyčajne súčasťou bunkových stien stafylokokových baktérií. Majú silnú neimunitnú reaktivitu s konštantnými oblasťami rôznych druhov imunoglobulínov. Pozri: Kronval a spol., *J. Immunol.* 111:1401-1406, 1973 a Akerstrom a spol., *J. Immunol.* 135:2589-2542, 1985.

Po zmiešaní reakčných činidiel môžu byť potrebné kroky inkubácie a/alebo premývania. Inkubácia môže trvať v rozsahu od 5 sekúnd do niekoľko hodín, výhodne trvá 5 minút až 24 hodín. Inkubačný čas bude závisieť od usporiadania testu, protilátky, objemu roztoku, koncentrácií a podobne. Zvyčajne sa testy uskutočňujú pri izbovej teplote, avšak sú možné aj teploty v rozsahu 4 °C až 40 °C.

Podrobnosti uskutočnenia imunotestov podľa predkladaného vynálezu sa môžu líšiť v konkrétnych usporiadaniach, ale spôsob detekcie anti-EGFRvIII protilátok vo vzorke s obsahom protilátky, predstavuje všeobecne kontakt vzorky s protilátkou, ktorá špecificky reaguje, za imunologických reakčných podmienok, s komplexom EGFRvIII-protilátka.

V. Príprava imunokonjugátov

Anti-EGFRvIII protilátky, pripravené podľa predkladaného vynálezu, môžu byť pripojené na efektorové molekuly (EM) cez karboxylový koniec EM, aminokyselinový koniec EM, cez vnútorný aminokyselinový zvyšok EM, ako je cysteín, alebo ich kombinácie. Podobne EM môže byť pripojená priamo na ťažký, ľahký, Fc (konštantná oblasť), alebo čítacie rámce protilát-

ky. Väzba môže byť uskutočnená cez amino- alebo karboxylový koniec protilátky, alebo cez vnútorný aminokyselinový zvyšok. Keď PE alebo jeho cytotoxický fragment bol použitý ako EM, väzby na-, alebo blízko karboxylového konca sa uskutočnia tak, že predlžujú alebo pridávajú (keď je väzba na C konci) sekvenciu, ktorá pôsobí ako signálna sekvencia smerujúca molekulu do cytozolu. V odbore sú známe vhodné signálne aminokyselinové sekvencie, ako sú REDLK (sekvencia natívneho PE v jednopísmennom kóde), KDEL, RDEL a opakovania KDEL. Pozri: WO 91/18099. Via EM molekúl (napríklad 2 až 10) môže byť pripojených na anti-EGFRvIII protilátku a/alebo viac protilátok (napríklad 2 až 5) môže byť naviazaných na EM. Vo zvlášť výhodnom uskutočnení KDEL je C koncová sekvencia. Molekula vytvorená väzbou efektorovej molekuly na protilátku, je známa ako imunokonjugát.

Liečebná látka je látka s konkrétnou biologickou aktivitou, smerovanou voči konkrétnej cieľovej molekule alebo bunke s cieľovou molekulou. Odborník vie, že liečebné látky môžu zahrňovať rôzne lieky, ako je vinblastin, daunomycin a podobné, cytotoxíny, ako je natívny alebo modifikovaný pseudomonádový exotoxín alebo toxín záškrtu, opúzdrovacie látky (napríklad lipozómy), ktoré obsahujú farmakologické prostriedky, rádioaktívne činidlá, ako sú ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C , ^3H a ^{35}S a iné činidlá, cieľové časti a ligandy.

Výber konkrétnej liečebnej látky závisí na konkrétnej cieľovej molekule alebo bunke a určitom biologickom účinku, ktorý je potrebné vyvolať. Napríklad, liečebná látka môže byť cytotoxín, ktorý sa použije na usmrtenie konkrétnych cieľových buniek. Keď je vhodné vyvolať len neletálnu biologickú odpoveď, môže byť terapeutická látka konjugovaná na neletálne farmakologické činidlo alebo lipozóm, ktorý obsahuje neletálnu farmakologickú látku.

Podľa tu popísaných liečebných látok a protilátok, môže odborník ľahko pripraviť rôzne klóny, ktoré obsahujú funkčné ekvivalenty nukleových kyselín, ako sú nukleové kyseliny, ktoré sa líšia sekvenciou, ale kódujú rovnaký EM alebo sekvenciu protilátky. Predkladaný vynález popisuje nukleové kyseliny, ktoré kódujú protilátky a konjugáty a ich fúzne proteíny.

A. Rekombinantné metódy

Sekvencie nukleových kyselín podľa predkladaného vynálezu môžu byť pripravené vhodnou metódou, ktorá zahŕňa, napríklad, klónovanie vhodných sekvencií alebo priamu chemickú syntézu, metódami ako sú fosfotriesterová metóda (Narang a spol., *Meth. Enzymol.* 68:90-99, 1979), fosfodiesterová metóda (Brown a spol., *Meth. Enzymol.*, 68:109-151, 1979), dietylfosforamiditová metóda (Beaucage a spol., *Tetra. Lett.*, 22:1859-1862, 1981) a fosforamidittriesterová metóda na pevnej fáze (Beaucage a Caruthers, *Tetra Lett.*, 22(20):1859-1862, 1981). Môže byť použitý tiež automatický syntetizátor (Needham-VanDevanter a spol., *Nucl. Acids Res.* 12:6159-6168, 1984) a metóda na pevnom povrchu popísaná v US patente č. 4 458 066. Chemická syntéza vytvára jednovláknové oligonukleotidy. Tieto môžu byť konvertované na dvojvláknovú DNA hybridizáciou s komplementárnou sekvenciou, alebo polymerizáciou s DNA polymerázou, pri použití jedného vlákna ako templátu. Odborník vie, že kým chemická syntéza DNA je obmedzená na sekvencie s asi 100 bázami, dlhšie sekvencie môžu byť získané ligáciou kratších sekvencií.

Vo výhodnom uskutočnení predkladaného vynálezu sú sekvencie nukleových kyselín pripravené klónovaním. Vhodné klónovacie a sekvenčné techniky a návody, vhodné pre odborníkov, sa nachádzajú v učebniciach Sambrook a spol.,

Molecular cloning: a laboratory manual (2. vydanie), zv. 1 až 3, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, Berger and Kimmel eds.; Guide to Molecular Cloning Techniques, Academic Press, Inc., San Diego CA, 1987, alebo Ausubel a spol. (vyd.), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing a Wiley-Interscience, NY, 1987. Informácie o výrobkoch od výrobcov biologických činidiel a zariadení poskytujú tiež užitočné informácie. Výrobcovia sú, napríklad, 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-Biochemica Analytica (Fluka Chemie AG, Buchs, Švajčiarsko), Invitrogen (San Diego, CA) a PE Applied Biosystems (Foster City, CA), rovnako a iné komerčné zdroje známe odborníkom.

Nukleové kyseliny, ktoré kódujú natívne efektorové molekuly (EM) alebo anti-EGFRvIII protilátky, môžu byť zmenené a vytvoriť EM, protilátky alebo imunokonjugáty podľa predkladaného vynálezu. V technike je dobre známa modifikácia cielenou mutagenézou. Nukleové kyseliny kódujúce EM alebo anti-EGFRvIII protilátky, môžu byť amplifikované metódami *in vitro*. Amplifikačné metódy zahŕňujú polymerázovú reťazovú reakciu (PCR), ligázovú reťazovú reakciu (LCR), amplifikačný systém na základe transkripcie (TAS) a samostatný sekvenčný replikačný systém (3SR). Odborníci dobre poznajú rôzne klónovacie metódy, rôzne hostiteľské bunky a *in vitro* amplifikačné metódy.

Vo výhodnom uskutočnení predkladaného vynálezu sú imunokonjugáty pripravené vložením cDNA, ktorá kóduje anti-EGFRvIII scFv protilátky do vektora, ktorý obsahuje cDNA kó-

dujúcu EM. Inzercia sa uskutočnila tak, že scFv a EM sú čítané v čítacom rámci, ktorý je v jednom neprerušenom polypeptide obsahujúcom funkčnú Fv oblasť a funkčnú EM oblasť. Vo zvlášť výhodnom uskutočnení je cDNA kódujúca fragment toxínu záškrtu, ligovaná do scFv tak, že toxín je umiestnený na amino zakončení scFv. V najvýhodnejšom uskutočnení je cDNA kódujúca PE alebo jeho cytotoxický fragment ligovaná s scFv tak, že toxín sa nachádza na karboxylovom zakončení scFv. V najvýhodnejšom uskutočnení je to cytotoxický fragment PE38.

Keď sú izolované a klónované nukleové kyseliny, ktoré kódujú EM, anti-EGFRvIII protilátku alebo imunokonjugát podľa predkladaného vynálezu, vhodný proteín môže byť exprimovaný pomocou rekombinantne upravených buniek, ako sú bakteriálne, rastlinné, kvasničné bunky, bunky hmyzu a cicavcov. Očakáva sa, že odborníci poznajú veľké množstvo expresívnych systémov vhodných pre expresiu proteínov, ako sú *E. coli*, iní bakteriálni hostitelia, kvasinky a rôzne vyššie eukaryotické bunky, ako sú COS, CHO, HeLa a myelómové bunkové línie. Nebude uvedený podrobný popis rôznych známych metód pre expresiu proteínov v prokaryotických alebo eukaryotických bunkách. Stručne, expresia prirodzených alebo syntetických nukleových kyselín, kódujúcich izolované proteíny podľa vynálezu, sa všeobecne dosiahne pripojením DNA alebo cDNA na promótor (ktorý je buď konštitutívny alebo indukčný), nasleduje inkorporácia do expresívnej kazety. Kazety môžu byť vhodné pre replikáciu a integráciu buď v prokaryotických alebo eukaryotických bunkách. Typické expresívne kazety obsahujú transkripčné a translačné terminátory, iniciačné sekvencie a promótory, ktoré sú užitočné pre reguláciu expresie DNA kódujúcej proteín. Zvyčajne môžu byť kazety umiestnené v plazmidoch, ktoré tiež obsahujú jeden alebo viac génov rezistentných voči antibiotikám. Pre získanie vysokej expresie klónovaného génu je vhodné pripraviť kazety, ktoré

obsahujú minimálne silný promótor pre riadenie transkripcie, miesto väzby na ribozóm pre iniciáciu translácie a transkripčný/translačný terminátor. *E. coli* obsahuje promótor, ako sú T7, trp, lac alebo lambda, miesto väzby na ribozóm a prednostne transkripčný terminálny signál. Pre eukaryotické bunky môže kontrolná sekvencia obsahovať promótor a výhodne posilovač, odvodený od imunoglobulínových génov, SV40, cytomegalovírusu a polyadenylačné sekvencie, a môže obsahovať sekvencie zostrihu donora a zostrihu akceptora. Kazety podľa predkladaného vynálezu môžu byť dobre známymi spôsobmi, ako je transformácia chloridom vápenatým alebo elektroporácia, prenesené do vybratej hostiteľskej bunky, pre *E. coli* pôsobením fosforečnanu vápenatého, elektroporácia alebo lipofekcia pre cicavčie bunky. Bunky, transformované kazetami, môžu byť vybraté pomocou rezistencie voči antibiotikám, ktorá je spôsobená génmi prítomnými v kazetách, ako sú amp, kan, gpt, neo a hyg gény. Výhodnými pre prácu s fágmi sú kanamycínová rezistencia a ampicilínová rezistencia.

Odborník vie, že modifikácie môžu byť uskutočnené na nukleovej kyseline kódujúcej polypeptid podľa predkladaného vynálezu (napríklad, anti-EGFRvIII protilátky, PE alebo imunokonjugát, vytvorený ich kombináciou), bez zníženia ich biologickej aktivity. Pre uľahčenie klónovania môžu byť uskutočnené niektoré modifikácie, expresie alebo inkorporácie cieľovej molekuly do fúzneho proteínu. Odborníci dobre poznajú takéto modifikácie a zahrňujú, napríklad, pridanie metionínu na amino zakončenie pre zaistenie iniciačného miesta, alebo pridanie aminokyselín (napríklad, polyHis) na niektoré zakončenie pre vytvorenie správne umiestnených restričných miest, alebo terminálnych kodónov, alebo purifikačných sekvencií.

Okrem rekombinantných metód môžu byť imunokonjugáty, EM

a protilátky podľa predkladaného vynálezu pripravené celé alebo ako časť, použitím štandardnej peptidovej syntézy. Syntéza polypeptidov na pevnej fáze podľa predkladaného vynálezu kratších ako 50 aminokyselín, môže byť uskutočnená pripojením C koncovej aminokyseliny na nerozpustný nosič, nasleduje postupné pridávanie ďalších aminokyselín do sekvencie. Techniky pre syntézu na pevnej fáze sú popísané v: Barany a Merrifield, *The peptides: analysis, synthesis, biology*. Zv.2: *Special methods in peptide synthesis*, časť A, str. 3-284; Merrifield a spol., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2156, 1963 a Steward a spol., *Solid phase peptide synthesis*, druhé vyd., Pierce Chem. Co., Rockford, III, 1984. Proteíny väčšej dĺžky môžu byť syntetizované kondenzáciou amino a karboxylových koncov kratších fragmentov. Sú dobre známe metódy tvorby peptidových väzieb aktiváciou koncového karboxylu (napríklad použitím väzobného činidla N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu).

B. Purifikácia

Rekombinantné imunokonjugáty, protilátky a/alebo efektorové molekuly podľa vynálezu môžu byť hneď po expri-movaní purifikované štandardnými postupmi, ako sú precipitácia síranom amonným, afinitná chromatografia, použitie ionexovej a gélovej filtračnej kolóny, násadovej chromatografie a podobne (pozri: R. Scopes, *Protein purification*, Springer-Verlag, N.Y. 1982). Výhodné sú čistejšie prostriedky s 90 až 95 % čistotou a pre farmaceutické použitie je najvýhodnejšia 98 až 99 % alebo vyššia čistota. Po purifikácii, čiastočnej alebo na požadovanú rovnorodosť, by polypeptidy pre liečebné použitie nemali mať endotoxín.

Sú dobre známe metódy pre expresiu jednoreťazcových protilátok a/alebo znovuzloženie do vhodnej aktívnej formy.

Zahrňujú jednoreťazcové protilátky z baktérií, ako je *E. coli*. Tieto metódy sú aplikovateľné na protilátky podľa predkladaného vynálezu. Pozri: Buchner a spol., *Anal. Biochem.* 205:263-270, 1992; Pluckthun, *Biotechnology* 9:545, 1991; Huse a spol., *Science* 246:1275, 1989 a Ward a spol. *Nature* 341:544, 1989. Všetky citácie sú uvedené v literárnych odkazoch.

Často sú funkčné heterológne proteíny *E. coli* alebo z iných baktérií izolované z inklúzných teliesok a vyžadujú si rozpustenie pomocou silných denaturačných činidiel. Po tomto kroku nasleduje znovuzloženie. Je dobre známe, že počas purifikácie musí byť prítomné redukčné činidlo, ktoré redukuje disulfidové mostíky. Typický pufer s redukčným činidlom obsahuje: 0,1 M Tris pH 8, 6 M guanidín, 2 mM EDTA, 0,3 M DTE (ditioerytritol). Reoxidácia disulfidových mostíkov sa môže uskutočniť v prítomnosti tiolových činidiel nízkej molekulovej hmotnosti v redukovanej aj oxidovanej forme tak, ako je popísané v: Saxena a spol., *Biochemistry* 9:5015-5021, 1970, uvedené v literárnych odkazoch, a hlavne Buchner a spol., vyššie.

Renaturácia sa zvyčajne uskutoční zriedením (napríklad 100 krát) denaturovaného a redukovaného proteínu v puffri pre znovuzloženie. Pufer typicky obsahuje: 0,1 M Tris pH 8, 0,5 M arginín, 8 mM oxidovaný glutation (GSSG), 2 mM EDTA.

Modifikáciou protokolu je purifikácia dvojreťazcových protilátok. Oblasti ťažkého a ľahkého reťazca sú oddelene rozpustené a redukované, potom sú zmiešané v puffri pre znovuzloženie. Výhodný výťažok sa získa vtedy, keď tieto dva proteíny sú zmiešané v ekvimolárnom pomere, ktorý nepresahuje nadbytok 5 dielov jedného proteínu oproti druhému. Po ukončení zmeny redox potenciálu je vhodné pridať do roztoku pre znovuzloženie prebytok oxidujúceho glutationu alebo iných oxidačných látok nízkej molekulovej hmotnosti.

VI. Pseudomonádový exotoxín a iné toxíny

Toxíny môžu byť použité s protilátkami podľa predkladaného vynálezu pre vytvorenie imunotoxínov. Vzorové toxíny zahrňujú ricín, abrin, toxín záškrtu a ich podjednotky, rovnako aj botulínové toxíny A až F. Tieto toxíny sú komerčne dostupné (napríklad, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Toxín záškrtu je izolovaný z *Corynebacterium diphtheriae*. Ricín je lektín RCA₆₀ z *Ricinus communis* (Castor bean). Termín tiež označuje jeho toxické varianty. Napríklad, pozri: US patenty č. 5 079 163 a 4 689 401. *Ricinus communis* aglutinín (RCA) sa vyskytuje v dvoch formách, označených RCA₆₀ a RCA₁₂₀, podľa ich molekulovej hmotnosti v rozsahu od 65 do 120 kDa (Nicholson a Blaustein, *J. Biochim. Biophys. Acta* 266:543, 1972). A reťazec je zodpovedný za inaktiváciu syntézy proteínov a bunkovú smrť. B reťazec viaže ricín na galaktózové zvyšky na bunkovom povrchu a uľahčuje transport A reťazca do cytozolu (Olsnes a spol., *Nature* 249:627-634, 1974 a US patent č. 3 060 161)5.

Abrin zahrňuje toxické lektíny z *Abrus precatorius*. Toxické látky, abrin a, b, c a d, majú molekulovú hmotnosť 63 až 67 kDa a sú zložené z dvoch polypeptidových reťazcov A B spojených disulfidom. A reťazec inhibuje syntézu proteínov; B reťazec (abrin b) sa viaže na galaktózové zvyšky (pozri Funatsu a spol., *Arg. Biol. Chem.* 52:1095, 1988 a Olsnes, *Methods Enzymol* 50:330-335, 1978).

Vo výhodnom uskutočnení predkladaného vynálezu je toxín pseudomonádový exotoxín A (PE). Natívny PE je veľmi aktívny monomérny proteín (molekulová hmotnosť 66 kDa), sekretovaný *Pseudomonas aeruginosa*, ktorý inhibuje syntézu proteínov v eukaryotických bunkách. Natívna PE sekvencia je popísaná v US patente č. 5 602 095, uvedený v literárnych odkazoch. Spôsob účinku PE je inaktivácia elongačného faktora 2 (EF-2)

ribozyláciou ADP. Exotoxín obsahuje tri štruktúrne domény, ktoré spolu zodpovedajú za toxicitu. Doména Ia (aminokyseliny 1 až 252) sprostredkuje väzbu na bunku. Doména II (aminokyseliny 253 až 364) je zodpovedná za translokáciu do cytozolu a doména III (aminokyseliny 400 až 613) sprostredkuje ADP ribozyláciu elongačného faktora 2. Funkcia domény Ib (aminokyseliny 365 až 399) nie je známa, hoci jej veľká časť, aminokyseliny 365 až 380, môžu byť odstránené bez straty cytotoxicity.

Výraz „pseudomonádový exotoxín“, tak ako sa tu používa, sa týka natívnej sekvencie, cytotoxických fragmentov natívnej sekvencie a konzervatívne modifikovaných variantov natívneho PE a jeho cytotoxických fragmentov. Vo výhodných uskutočneniach predkladaného vynálezu bola molekula PE modifikovaná deléciou domény Ia pre zníženie alebo odstránenie nešpecifickej väzby toxínu. Cytotoxické fragmenty PE zahŕňujú tie, ktoré sú cytotoxické s-, alebo bez nasledujúcich proteolytických alebo iných spracovaní v cieľovej bunke (napríklad ako proteín alebo pre-proteín). Cytotoxické fragmenty PE zahŕňujú PE40, PE38 a PE35. PE40 je odvodený od PE jeho skrátením, čo už bolo v minulosti popísané. Pozri: Pai a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:3358-3362, 1991 a Kondo a spol., *J. Biol. Chem.* 263:9470-9475, 1988). PE35 je 35 kDa karboxylový koncový fragment PE, ktorý v polohe 280 obsahuje met, nasledujú aminokyseliny 281 až 364 a 381 až 613 natívneho PE. PE38 je skrátený PE pro-proteín a obsahuje aminokyseliny 253-364 a 381-613 natívneho PE. PE38 je aktivovaný na cytotoxickú formu pomocou jeho spracovania v bunke (pozri: US patent č. 5 608 039, zahrnutý do literárnych odkazov).

Vo zvlášť výhodných uskutočneniach je PE38 toxická zložka imunotoxínu podľa predkladaného vynálezu. Môžu byť

tiež použité cytotoxické fragmenty PE35 a PE40; tieto fragmenty sú popísané v US patentoch č. 5 602 095 a 4 892 827, zahrnuté v citovanej literatúre. Pokusy s imunotoxínmi na základe MR1 ukázali, že KDEI je výhodnou modifikáciou C koncovej sekvencie (pozri: Lorimer a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14815-14820, 1996).

A. Konzervatívne modifikované varianty PE

Konzervatívne modifikované varianty PE alebo ich cytotoxické fragmenty majú aspoň 80 % sekvenčnú podobnosť, výhodne 85 % sekvenčnú podobnosť, výhodnejšie aspoň 90 % sekvenčnú podobnosť a najvýhodnejšie aspoň 95 % sekvenčnú podobnosť aminokyselín s PE38.

Výraz „konzervatívne modifikované varianty“ sa vzťahuje na sekvencie aminokyselín aj nukleových kyselín. Vzhľadom na konkrétne sekvencie nukleových kyselín sa konzervatívne modifikované varianty týkajú takých sekvencií nukleových kyselín, ktoré kódujú zhodné alebo v podstate zhodné sekvencie aminokyselín, alebo keď nukleová kyselina nekóduje sekvenciu aminokyselín, v podstate zhodných so sekvenciou nukleových kyselín. Z dôvodu degenerácie genetického kódu, kóduje daný polypeptid veľké množstvo funkčne zhodných nukleových kyselín. Napríklad všetky kodóny GCA, GCC, GCG a GCU kódujú aminokyselinu alanín. V každej polohe, kde je alanín špecifikovaný kodónom, môže byť kodón pozmenený za niektorý z uvedených kodónov, bez zmeny kódovaného polypeptidu. Takéto variácie nukleových kyselín sú „tiché variácie“, ktoré sú jedným druhom konzervatívne modifikovaných variantov. Každá tu uvedená sekvencia nukleových kyselín, ktorá kóduje polypeptid, popisuje tiež všetky možné tiché varianty nukleovej kyseliny. Odborník vie, že každý kodón v nukleovej kyseline (okrem AUG, ktorý je zvyčajne jediný kodón pre me-

tionín a UGG, ktorý je jediným kodónom pre tryptofán) môže byť modifikovaný na získanie funkčne zhodnej molekuly. Preto každá tichá variácia nukleovej kyseliny, ktorá kóduje polypeptid, vyplýva z každej popísanej sekvencie.

Odborník vie, že jednotlivé substitúcie, delécie alebo adície v sekvencii nukleovej kyseliny, v sekvencii peptidu, polypeptidu alebo proteínu, ktoré menia, pridávajú alebo deletujú jednu aminokyselinu alebo malé percento aminokyselín v kódovanej sekvencii, je „konzervatívne modifikovaný variant“. Znamená to, že zámena má za výsledok substitúciu aminokyseliny chemicky podobnou aminokyselinou.

B. Určenie cytotoxicity PE

Pseudomonádové exotoxíny, použité v predkladanom vynáleze, môžu byť testované pre určenie vhodnej cytotoxicity. Napríklad, cytotoxicita je často hodnotená nepriamym meraním, schopnosťou pseudomonádového toxínu inhibovať syntézu proteínov. Pozri: Lorimer a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14815-14820, 1996. V tejto metóde sa hodnotí vychytávanie rádioznačenej aminokyseliny (uvedené v Prior a spol., *Cell* 64:1017-1023, 1991) bunkami, ktoré normálne neexprimujú EGFRvIII, ale ktoré boli transfektované EGFRvIII cDNA. V uvedených príkladoch bolo merané vychytávanie tríciovaného leucínu v NR6M bunkách (švajčiarske 3T3 bunky, použité preto, že neexprimujú myšiu EGFR a sú transfektované ľudskou EGFRvIII cDNA). Takto môže byť ľahko testovaná cytotoxicita cytotoxických fragmentov PE a konzervatívne modifikovaných variantov týchto fragmentov.

Cytotoxicita mnohých PE molekúl môže byť na súčasne testovaná známymi metódami. Napríklad, na cytotoxicitu môžu byť testované podskupiny molekúl. Pozitívne reagujúce podskupiny molekúl môžu byť rozdelené väzbou a opäť testované až

do určenia vhodných cytotoxických fragmentov (fragmentu). Tieto metódy umožňujú rýchly skrining veľkého množstva cytotoxických fragmentov alebo konzervatívnych variantov PE.

C. Iné liečebné zložky

Protilátky podľa predkladaného vynálezu môžu byť tiež použité pre nasmerovanie mnohých rôznych diagnostických alebo liečebných zlúčenín na bunky, ktoré na svojom povrchu exprimujú EGFRvIII. Protilátka podľa predkladaného vynálezu, ako je anti-EGFRvIII scFv, môže byť pripojená priamo cez linker na liek, takže je priamo privedená na bunky, ktoré majú na svojom povrchu EGFRvIII. Liečebné látky zahrňujú také zlúčeniny ako sú nukleové kyseliny, proteíny, peptidy, aminokyseliny alebo ich deriváty, glykoproteíny, rádioizotopy, lipidy, uhľovodíky, alebo rekombinantné vírusy. Liečebné a diagnostické zložky nukleových kyselín zahrňujú antimediatorové nukleové kyseliny, odvodené oligonukleotidy pre kovalentnú väzbu s jednovláknitou alebo dvojvláknitou DNA a trojitú oligonukleotidy.

Molekuly pripojené na anti-EGFRvIII protilátku môžu byť voliteľne v opúzdrenom systéme, ako je lipozóm alebo micela, ktoré obsahujú liečebnú zložku ako je liek, nukleovú kyselinu (napríklad antimediatorovú nukleovú kyselinu), alebo iné liečebné zložky, ktoré sú prednostne chránené pred priamym pôsobením obehového systému. Prostriedky pre prípravu lipozómov, pripojených na protilátky, sú dobre známe v odbore. Pozri: US patent č. 4 957 735 a Connor a spol., *Pharm. Ther.* 28:341-365, 1985.

D. Detekovateľné značiace molekuly

Protilátky podľa predkladaného vynálezu môžu byť voliteľne kovalentne alebo nekovalentne pripojené na detekovateľ-

nú značiacu molekulu. Detekovateľné značiace molekuly, vhodné pre takéto použitie, zahŕňujú ktorúkoľvek kompozíciu detekovateľnú spektroskopicky, fotochemicky, biochemicky, imunochémicky, elektricky, opticky alebo chemicky. Vhodné značky v predkladanom vynáleze zahŕňujú magnetické guľičky (napríklad Dynabeads), fluorescenčné farbenie (napríklad fluoresceínizokyanát, texaská červen, rodamín, zelený fluorescenčný proteín a podobne), rádioaktívne prvky (napríklad ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C alebo ^{32}P), enzýmy (napríklad chrenová peroxidáza, alkalická fosfatáza, luciferáza a iné bežne používané v ELISA) a kolorimetrické značenia, ako je koloidné zlato alebo farebné sklenené alebo plastové (napríklad polystyrénové, polypropylénové, latexové) guľičky.

Odborníci dobre poznajú prostriedky pre detekciu týchto značiek. Napríklad, rádioznačenie môže byť detekované použitím fotografického filmu alebo scintilačných meračov, fluorescenčné markery môžu byť detekované použitím fotodetektora alebo hodnotením emitovaného žiarenia. Enzymatické značenie je zvyčajne detekované po reakcii enzýmu so substrátom. Jednoduchou vizualizáciou farebnej značiacej molekuly sa hodnotí výsledný produkt, jeho kolorimetrické označenie.

E. Konjugácia na protilátku

V nerekombinantných uskutočneniach predkladaného vynálezu sú efektorové molekuly, napríklad liečebné, diagnostické alebo detekčné aktívne zložky, pripojené na anti-EGFRvIII protilátky použitím niektorého z veľkého množstva prostriedkov. Podľa predkladaného vynálezu môžu byť použité kovalentné a aj nekovalentné prostriedky pripojenia na anti-EGFR protilátky.

Postup pripojenia efektorovej molekuly na protilátku sa bude líšiť podľa chemickej štruktúry EM. Polypeptidy zvyčajne

obsahujú rôzne funkčné skupiny; napríklad karboxylovú (COOH), voľný amín ($-NH_2$) alebo sulhydrylovú ($-SH$) skupinu, ktoré sú dostupné pre reakciu s vhodnou skupinou na protilátke; výsledkom je naviazanie efektorovej molekuly.

Protilátka môže byť voliteľne pozmenená tak, aby vystavila alebo mohla pripojiť ďalšie funkčné skupiny. Zmena môže zahŕňať pripojenie niektorej z množstva linkerových molekúl, ako sú tie, ktoré dodáva Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.

„Linker“, ako sa tu používa, je molekula, ktorá je použitá k pripojeniu protilátky na efektorovú molekulu. Linker je schopný tvoriť kovalentné väzby s protilátkou a aj s efektorovou molekulou. Odborníci dobre poznajú vhodné linkery, sú to, okrem iných, nerozvetvené alebo rozvetvené reťazce uhľíkových linkerov, heterocyklické uhľíkové linkery alebo peptidové linkery. Keď protilátka a efektorová molekula sú polypeptidy, linkery môžu byť aj pripojené na základné aminokyseliny cez ich vedľajšie skupiny (napríklad cez difulfidovú väzbu na cysteín). Vo výhodnom uskutočnení predkladaného vynálezu budú linkery pripojené na alfa uhľík amino a karboxylových skupín koncových aminokyselín.

Keď imunokonjugát dosiahne cieľ, je niekedy vhodné odstrániť z protilátky efektorovú molekulu. V takýchto prípadoch budú imunokonjugáty obsahovať väzby, ktoré sú schopné odštiepenia v blízkosti cieľového miesta. Odštiepenie linkera pre uvoľnenie efektorovej molekuly z protilátky sa môže rýchlo uskutočniť enzymaticky alebo v takých podmienkach, keď imunokonjugát je vo vnútri cieľovej bunky alebo v blízkosti cieľového miesta. Keď cieľovým miestom je nádor, môže byť použitý linker, ktorý sa odštiepi v podmienkach, prítomných v mieste nádora (napríklad, keď je vystavený enzýmom spojených s nádorom, alebo kyslému pH).

Vzhľadom na veľké množstvo publikovaných metód pre pripojenie rôznych rádiodiagnostických zlúčenín, rádioterapeutických zlúčenín, liekov, toxínov a iných látok na protilátky, bude odborník schopný vybrať vhodnú metódu pre pripojenie daného činidla na protilátku alebo iný peptid.

VII. Farmaceutické kompozície a dávkovanie

Kompozície s protilátkami a/alebo imunokonjugátmi podľa predkladaného vynálezu (napríklad PE pripojený na protilátku s K_d pre epitop EGFRvIII nižšou aspoň o 1 nM ako má MR1) sú vhodné pre podávanie do mozgu. Použitie imunotoxínov pre liečenie mozgového nádora bolo nedávno publikované (Oldfield E. a Youl R., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 234:97-114, 1998). Malé peptidy prenikajú hematoencefalickou bariérou. Spôsoby podávania do mozgu pre peptidy, ktoré neprechádzajú hematoencefalickou bariérou sú dobre známe. Napríklad, proteíny, polypeptidy alebo iné zlúčeniny a bunky, môžu byť podané do mozgu cicavca intracerebroventrikulárnou (ICV) injekciou alebo cez kanylu (pozri: Motta a Martini, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 168:62-64, 1981; Peterson a spol., *Biochem. Pharmacol.* 31:2807-2810, 1982; Rzepczynski a spol., *Metab. Brain Dis.* 3:211-216, 1988; Leibowitz a spol., *Brain Res. Bull.* 21:905-912, 1988; Sramka a spol., *Stereotact. Funct. Neurosurg.* 58:79-83, 1992; Peng a spol., *Brain Res.* 632:57-67, 1993; Chem a spol., *Exp. Neurol.* 125:72-81, 1994; Nikkhah a spol., *Neuroscience* 63:57-72, 1994; Anderson a spol., *J. Comp. Neurol.* 357:296-317, 1995; Brecknell a Fawcett, *Exp. Neurol.* 138:338-344, 1996.

Napríklad, glioblastóm môže byť ošetrovaný lokálne cez kanylu alebo injekciou do tkaniva v okolí nádora, alebo všeobecne do časti centrálného nervového systému ICV. Okrem toho, imunokonjugáty môžu byť podávané systémovo tam, kde napríklad, glioblastóm poškodil epitelové bunky pacienta tak, že môže byť prekonaná hematoencefalická bariéra.

Protilátka alebo imunokonjugáty podľa predkladaného vynálezu môžu byť tiež podávané lokálne alebo systémovo pre ošetrovanie nádorov prsníka, vaječníkov a pľúc. Napríklad, tieto rakoviny môžu byť tiež ošetrované priamo injekciou do nádorov, ktoré nemôžu byť chirurgicky odstránené. Tieto karcinómy môžu byť ošetrované pôvodným podaním imunokonjugátov, napríklad, pre lokalizáciu a usmrtenie metastázujúcich buniek, ktoré ešte nevytvorili nádor dostatočnej veľkosti pre liečenie rádiáciou alebo chirurgicky, alebo pre istejšiu a ľahšiu detekciu.

Kompozície pre podávanie budú zvyčajne obsahovať roztok protilátky a/alebo imunokonjugátu, rozpusteného vo farmaceuticky vhodnom nosiči, výhodne vodnom nosiči. Môžu byť použité rôzne vodné nosiče, napríklad pufrovaný fyziologický roztok a podobne. Tieto roztoky sú sterilné a bez prítomnosti nevhodných látok. Tieto roztoky môžu byť sterilizované dobre známymi sterilizačnými technikami. Tieto kompozície môžu obsahovať farmaceuticky vhodné pomocné látky, keď si to vyžaduje priblíženie k fyziologickým podmienkam, ako je pH, použije sa pufrovacie činidlo, toxicitu upravujúce činidlá a podobne, napríklad octan sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, mliečnan sodný a podobne. Koncentrácia fúzneho proteínu v týchto prostriedkoch sa môže značne líšiť a bude vybratá hlavne na základe objemu kvapaliny, viskozity, telesnej hmotnosti a podobne, v súhlase s konkrétnym spôsobom podávania a podľa pacientových potrieb.

Typická farmaceutická imunotoxínová kompozícia podľa predkladaného vynálezu pre podávanie do mozgu môže byť 1,2 až 1 200 µg denne. Kompozícia pre vnútrožilné podávanie pre liečenia karcinómu prsníka, vaječníkov alebo pľúc je 0,1 až 10 mg/pacient/deň. Môžu byť použité dávky 0,1 až 100 mg/pacient/deň, hlavne keď je liek podávaný do izolovaného

miesta a nie do obehového alebo lymfatického systému, ako do vnútra telesnej dutiny alebo do vnútra orgánu. Aktuálne metódy pre prípravu kompozícií pre podávanie sú známe odborníkom a sú podrobne popísané v takých publikáciách ako Remington's Pharmaceutical Sciences, 19. vydanie, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1995.

Kompozície podľa predkladaného vynálezu môžu byť podávané pre liečebné účely. Pri liečebnej aplikácii sú kompozície podávané pacientovi s ochorením ako je glioblastóm, rakovina prsníka, rakovina vaječníkov alebo rakovina pľúc, v množstve dostatočnom pre aspoň spomalenie alebo čiastočné zastavenie ochorenia alebo jeho komplikácií. Množstvo, zodpovedajúce tomuto uskutočneniu, je definované ako „liečebná účinná dávka“. Účinné množstvo pre takéto použitie bude závisieť od závažnosti ochorenia a všeobecne od stavu pacientovho zdravia. Účinné množstvo zlúčeniny je také, ktoré zaistuje buď subjektívnu úľavu symptómu (symptómov), alebo objektívne identifikovateľné zlepšenie, ktoré pozoruje odborník na klinické liečenie, alebo iný kvalifikovaný pozorovateľ.

Jednorázové alebo viacnásobné podávanie kompozícií závisí od dávky a jej opakovania, v závislosti od tolerancie pacienta. V každom prípade prostriedok by mal zaistiť dostatočné množstvo proteínov podľa predkladaného vynálezu pre účinnú liečbu pacienta. Výhodne sa podáva dávka naraz, ale môže byť podávaná opakovane, kým sa nedosiahne liečebný výsledok, alebo až kým vedľajšie účinky neprerušia liečbu. Všeobecne, dávka je dostatočná pre liečenie alebo zlepšenie symptómov alebo prejavov ochorenia vtedy, keď u pacienta nevyvoláva neprijateľné toxické pôsobenie.

Kontrolované uvoľňované parenterálne prostriedky imuno-konjugátov podľa predkladaného vynálezu môžu byť pripravené ako implantáty, olejové injekcie, alebo ako systém častíc.

Široký prehľad systémov, ktoré nesú proteíny je uvedený v: Banga, A.J., *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, 1995, zahrnuté v literárnych odkazoch. Konkrétne systémy častíc zahrňuje mikroguličky, mikročastice, mikrokapsule, nanokapsule, nanoguličky a nanočastice. Mikrokapsule obsahujú liečebný proteín ako centrálné jadro. V mikroguličkách je liek dispergovaný v celej častici. Častice, mikroguličky a mikrokapsule menšie ako 1 μm sa všeobecne nazývajú nanočastice, nanoguličky a nanokapsule. Kapiláry majú priemer približne 5 μm , takže len nanočastice sú podávané intravenózne. Mikročastice majú zvyčajne priemer 100 μm a sú podávané podkožne alebo injekčne do svalu. Pozri: Kreuter, J., *Colloidal Drug, Delivery Systems*, J. Kreuter, vyd., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, str. 219-342, 1994; Tice a Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus, vyd., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, str. 315-339, 1992 (obe citácie sú zahrnuté v zozname literatúry).

Polyméry môžu byť použité pre iónovo kontrolované uvoľňovanie parenterálnych kompozícií podľa predkladaného vynálezu. V odbore sú známe rôzne degradovateľné a nedegradovateľné polymérne matrice pre kontrolované dodávanie lieku (Langer R., *Accounts Chem, Res.* 26:537-542, 1993). Napríklad, blokový kopolymér, polaxamer 407, existuje ako viskózna ešte pohyblivá kvapalina pri nižších teplotách, ale tvorí polopevný gél pri telesnej teplote. Ukázal sa ako účinný nosič pre prípravu prostriedkov a nepretržité dodávanie rekombinantného interleukínu-2 a ureázy (Johnston a spol., *Pharm. Res.* 9:425-434, 1992; Pec a spol., *J. Parent. Sci. Tech.* 44(2):58-65, 1990). Pre kontrolované uvoľňovanie proteínov môže byť voliteľne použitý ako mikronosič hydroxyapatit (Ijntema a spol., *Int. J. Pharm.* 112:215-224, 1994). V inom uskutočnení sú pre kontrolované uvoľňovanie použité lipozómy

a lipidom obalené lieky (Betageri a spol., Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1993). Je známych veľa ďalších systémov pre kontrolované uvoľňovanie liečebných proteínov. Pozri: US patenty č. 5 055 303, 5 188 837, 4 235 871, 4 501 728, 4 837 028, 4 957 735 a 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 a 5 534 496, všetky sú uvedené v literárnych odkazoch.

Medzi rôzne použitia imunotoxínov podľa predkladaného vynálezu sú zahrnuté podmienky ochorenia, spôsobeného špecifickými ľudskými bunkami, ktoré exprimujú EGFRvIII, ktoré môžu byť eliminované toxickým účinkom imunokonjugátu. Výhodné použitie imunotoxínov podľa predkladaného vynálezu je liečenie malígnych buniek exprimujúcich EGFRvIII. Príkladmi malígnych buniek sú bunky glioblastómu, karcinómu prsníka, karcinómu vaječníkov a karcinómu pľúc.

VIII. Diagnostické kity a *in vitro* použitie

V inom uskutočnení predkladaný vynález popisuje kity pre detekciu EGFRvIII v biologickej vzorke. „Biologická vzorka“, tak ako sa tu používa, je vzorka biologického tkaniva alebo kvapaliny, ktorá obsahuje EGFRvIII. Takéto vzorky obsahujú, neobmedzene, tkanivo z biopsie, hlien, plodovú vodu, krv a krvné bunky (napríklad biele krvinky). Kvapalné vzorky môžu byť rôzne dôležité, všeobecne nie sú uprednostňované preto, že detekovateľné koncentrácie EGFRvIII sú v týchto vzorkách zistené len ojedinele. Biologické vzorky tiež zahrňujú časti tkanív, ako sú zmrazené časti odobraté pre histologické vyšetrenie. Biologická vzorka sa zvyčajne získa z viacbunkového eukaryonta, výhodne z cicavca, ako je potkan, myš, krava, pes, morča alebo králik a výhodnejšie z primátov ako sú opice a šimpanzy. Najvýhodnejšia biologická vzorka je ľudská vzorka.

Kity budú zvyčajne obsahovať anti-EGFRvIII scFv podľa predkladaného vynálezu, ktoré sú viac afinitné pre EGFRvIII ako pre MR1 scFv.

Kity budú zvyčajne obsahovať návod, popisujúci spôsob použitia protilátky podľa predkladaného vynálezu (napríklad pre detekciu buniek obsahujúcich EGFRvIII vo vzorke). Tieto kity môžu tiež obsahovať ďalšie zložky pre uľahčenie konkrétnej aplikácie, pre ktorú bol kit navrhnutý. Napríklad, kit môže obsahovať tiež prostriedky pre detekciu označenia (napríklad, enzýmové substráty pre enzymatické označenie, sadu filtrov pre detekciu fluorescenčného označenia, vhodné sekundárne označenia, ako je ovčia protimyšia HRP, a podobne). Kity môžu tiež obsahovať pufre a ďalšie činidlá bežne používané pre konkrétnu metódu. Odborníci dobre poznajú takéto kity a vhodný obsah.

V jednom uskutočnení predkladaného vynálezu obsahuje diagnostický kit imunotest. Ako je uvedené vyššie, aj keď sa podrobnosti imunotestov podľa predkladaného vynálezu môžu líšiť pri konkrétnom použití, spôsob detekcie EGFRvIII v biologickej vzorke predstavuje kroky kontaktu biologickej vzorky s protilátkou, ktorá špecificky reaguje, za podmienok imunologickej reakcie, s EGFRvIII vyššou afinitou k EGFRvIII ako MR1 scFv. Protilátka sa môže viazať na EGFRvIII za podmienok imunologickej reakcie a prítomnosť naviazanej protilátky je detekovaná priamo alebo nepriamo.

Zvýšená afinita protilátok vyvinutých tu uvedenými spôsobmi, v porovnaní s scFv, označenej ako MR1-1, protilátky tu popísané budú hlavne užitočné ako diagnostické činidlá a v *in vitro* testoch pre detekciu prítomnosti EGFRvIII v biologických vzorkách. Napríklad, MR1-1 a ďalšie protilátky, pripravené tu uvedenými spôsobmi, môžu byť použité ako cieľové časti imunokonjugátov v imunohistochemických testoch pre určenie, či vzorka obsahuje bunky exprimujúce EGFRvIII.

Keď je vzorka odobratá z tkaniva pacienta, ktoré normálne neexprimuje EGFRvIII, môže detekcia EGFRvIII indikovať buď to, že pacient má rakovinu charakterizovanú prítomnosťou buniek exprimujúcich EGFRvIII, alebo že liečenie takejto rakoviny nebolo ešte účinné. Odborníci ocenia, že protilátky voči EGFRvIII podľa predkladaného vynálezu, pripojené na vhodnú značku, môžu byť podobne použité *in vivo*, na detekciu prítomnosti buniek exprimujúcich EGFRvIII, čím sa u pacienta indikuje prítomnosť rakoviny charakterizovanej prítomnosťou buniek exprimujúcich EGFRvIII, alebo že liečenie takejto rakoviny nebolo ešte úspešné.

Popis obrázkov

Obrázok 1. Obrázok 1 ukazuje stratégiu pre PCR konštrukciu knižníc mutácií. A. pCANTAB5E-MR1 bol použitý ako templát pre amplifikáciu za použitia priméru so sekvenciou proti smeru, S1, a priméru v smere expresie, CDR3H b, d alebo f, ktoré obsahujú degenerácie (NNS) v cieľových oblastiach. B. pCANTAB5E-MR1 bol použitý ako templát pre amplifikáciu, ktorá využíva produkty reakcie z kroku A ako priméry so sekvenciou proti smeru expresie a priméry so sekvenciou v smere expresie AMBN. C. Produkty reakcie B sú zostrihnuté a klónované do pCANTAB5E.

Obrázok 2. BIAcore senzogram MR1, MR1-1 a MR1 s S98P až T99Y mutáciami vo VH CDR3.

Obrázok 3. Prežívanie potkanov bez týmusu s vnútro-mozgovým nádorom ľudských glioblastómových buniek, ktoré boli transfektované EGFRvIII, po ošetrovaní MR1-1 cieľovým imunotoxínom. Os Y zaznamenáva percento prežívajúcich zvierat v danom čase. Os X vyjadruje dobu prežívania v dňoch. Legenda: MR1-1 označuje imunotoxín MR1-1-PE38. Plné kosoštvorce - zvieratá dostávali v 24 hodinových intervaloch

infúzne 6 μg imunotoxínu MR1-1-PE38 počas 7 dní. Prázdny trojuholník: zvieratá dostávali v rovnakom časovom režime 2 μg imunotoxínu MR1-1-PE38. Prázdny kruh: kontrolné zvieratá dostávali v rovnakom časovom režime fyziologický roztok.

Obrázok 4: Prežívanie potkanov bez týmusu s vnútromozgovým nádorom ľudských glioblastómových buniek, ktoré boli transfektované EGFRvIII, po ošetrovaní MR1-1 cieľovým imunotoxínom alebo fyziologickým roztokom ako kontrolou. Os Y zaznamenáva percento prežitia v danom čase. Os X udáva dobu prežitia v dňoch. Legenda: MR1-1 označuje imunotoxín MR1-1-PE38. Prázdne kosoštvorce - zvieratá dostávali v 24 hodinových intervaloch infúziou 0,2 μg imunotoxínu MR1-1-PE38 (200 μl PBS s 0,2 % HSA) počas 7 dní. Prázdny trojuholník - zvieratá dostávali rovnakým spôsobom 0,6 μg imunotoxínu MR1-1-PE38. Prázdny kruh - zvieratá dostávali rovnakým spôsobom 2 μg imunotoxínu MR1-1-PE38. „X“ - kontrolné zvieratá dostávali rovnakým spôsobom fyziologický roztok.

Obrázok 5. Prežívanie potkanov bez týmusu s neoplastickou meningitídou vyvolanou intratekálnou injekciou ľudských glioblastómových buniek, transfektovaných EGFRvIII, po ošetrovaní MR1-1 cieľovým imunotoxínom alebo fyziologickým roztokom, ako kontrolou. Os Y zaznamenáva percento prežitia v danom čase. Os X udáva dobu prežitia v dňoch. Legenda: MR1-1 znamená imunotoxín MR1-1-PE38. Trojuholníky - zvieratá dostávali 2 μg imunotoxínu MR1-1-PE38 (40 μl PBS s 0,2 % HSA) na tretí, piaty a siedmy deň po naočkovaní nádora, celková dávka bola 6 μg . Kosoštvorce - zvieratá dostávali 1 μg imunotoxínu MR1-1-PE38 (40 μl PBS s 0,2 % HSA) na tretí, piaty a siedmy deň po naočkovaní nádora, celková dávka bola 3 μg . Kruhy - kontrolné zvieratá dostávali 40 μl PBS s 0,2 % HSA na tretí, piaty a siedmy deň po naočkovaní nádora.

Obrázok 6. Objem nádorov v priebehu času u potkanov bez

týmusu, ktorým boli do pravého boku injekčne podané ľudské glioblastómové bunky transfektované EGFRvIII, po ošetrovaní MR1-1 cieľovým imunotoxínom alebo fyziologickým roztokom, ako kontrolou. Os Y zaznamenáva objem nádorov v mm³. Os X udáva čas v dňoch od zahájenia liečby (zvieratá dostali injekčne nádorové bunky 7 dní pred dňom „0“). Legenda: MR1-1 znamená imunotoxín MR1-1-PE38. Štvorce - zvieratá dostávali 1 µg bolusovú injekciu imunotoxínu MR1-1-PE38 (v 20 µl) 0., 2. a 4. deň, celková dávka bola 3 µg. Trojuholník hore - zvieratá dostávali 2 µg imunotoxínu MR1-1-PE38 (20 µl fyziologického roztoku) 0., 2. a 4. deň, celková dávka bola 6 µg. Trojuholník dole - zvieratá dostávali bolusovú injekciu 3 µg imunotoxínu MR1-1-PE38 (20 µl fyziologického roztoku) 0., 2. a 4. deň, celková dávka bola 9 µg. Kosoštvorce - kontrolné zvieratá dostávali 20 µl fyziologického roztoku 0., 2. a 4. deň.

Príklady uskutočnenia vynálezu

PRÍKLAD 1

Stratégia vývoja protilátok s lepšou väzbou ako MR1.

Pre objavenie protilátok s lepšou väzbou na EGFRvIII ako MR1 bola pripravená fágová knižnica s MR1 scFv. Náhodné mutácie boli zavedené do komplementáritu určujúcej oblasti 3' (V_HCDR3) ťažkých reťazcov, ktorá má hlavnú úlohu pri väzbe na antigén (MacCallum a spol., *J. Mol. Biol.* 262:732-745, 1996). Selektívny výber pomocou buniek exprimujúcich EGFRvIII poskytol niekoľko mutantov, ktoré, keď boli použité pre prípravu imunotoxínov, mali zvýšenú afinitu, cytotoxicitu a výťažok. Analýza týchto variant ukázala, že všetky majú mutácie lokalizované v oblasti V_HCDR3, ktorá je aktívnym miestom pre hypermutáciu (Neuberger a spol., *Curr. Opin. Immunol.* 7:248-

254, 1995; Jolly, C.J., *Semin. Immunol.* 8:159-168, 1996; Neuberger a spol., *Immunological Rev.* 62:107-116, 1998). Aktívne miesta sú definované konvenčnými sekvenciami G/A-G-T/C-A/T alebo A-G-C/T. Posledné obsahujú serínové kodóny, ktoré sa nachádzajú vo variabilnej doméne génov pre protilátky (Goyenechea a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13979-13984, 1996). Aktívne miesta sú oblasti, ktoré v priebehu maturácie protilátok mutujú s veľkou frekvenciou. Selektívny výber v V_H CDR3 knižnici neposkytol žiadne klóny s mutáciami mimo aktívneho miesta. Tento výsledok potvrdili nedávne zistenia, že selektívny výber produkuje mutanty so zlepšenou afinitou (Chowdhury a spol., *Nature Biotechnol.* 17:568-572, 1999). Protilátka s najlepšou väzbou selektívne vybratá z V_H CDR3 knižnice bola použitá pre prípravu fágovej knižnice s náhodným výberom aktívneho miesta v ľahkom reťazci CDR3. Selektívny výber z tejto knižnice poskytol viac mutovaných klónov dokonca s lepšími vlastnosťami.

PRÍKLAD 2

Konštrukcia knižnice pre mutovaný V_H

V_H CDR3 M1 sa skladá z jedenástich aminokyselín. Ako je uvedené v úvode, predpokladá sa, že dve z týchto aminokyselín sa nezúčastňujú väzby na antigén. Zvyšných deväť aminokyselín vo V_H bolo mutovaných substitúciou všetkými prirodzenými aminokyselinami, za prirodzene sa nachádzajúce aminokyselinové zvyšky. Boli navrhnuté DNA oligoméry pre prípravu troch knižníc, každá s náhodným výberom deviatich nukleotidov (tri za sebou nasledujúce aminokyseliny). MR1 fagemid bol použitý ako templát pre vloženie troch aminokyselín s náhodnými zmenami v CDR3 ťažkom reťazci pomocou 3 samostatných dvojkrokových polymerázových reťazových reakcií (PCR) (Obrázok 1). Použité boli nasledujúce oligoméry:

CDR3Hb(5'-CTTGGCCCCASNNSNNSNAGAGGTACTAGAATAGCCTCTTGTGCA-3'),
 CDR3Hd(5'-CTTGGCCCCACATAGCATASNNSNNSNAGAATAGCCTCTTGTGCA-3'),
 CDR3Hf(5'-CTTGGCCCCACATAGCATAAGAGGTACTSNNSNNSNNTCTTGTGCA-3'),
 S1 (5'-CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC-3'),
 AMBN (5'-GCTAAACAACCTTTCAACAGTCTATGCGGGCAC-3')

V prvom cykle PCR bolo použitých 50 pg fagemidu pCANTAB 5 E-MR1, ako templátu, v troch samostatných reakciách pri použití 20 pmol DNA oligoméru S1 spolu s 20 pmol DNA oligoméru CDR3Hb, CDR3Hd alebo CDR3Hf. Templát a oligoméry boli zmiešané s 2 Ready-To-Go PCR Beads (Pharmacia) v objeme 50 μ l a zmes bola cyklovaná nasledovnými krokmi: 1 cyklus pri teplote 95 °C počas 5 minút, nasledovalo 30 cyklov pri teplote 94 °C v trvaní 1 minúty, a pri teplote 72 °C v trvaní 1 minúta. Tieto reakcie vytvorili 407 bp produkty, ktoré obsahujú mutácie. Produkty vytvorené v prvom kroku boli použité ako priméry v troch samostatných reakciách s primérom AMBN, pri použití MR1 fagemidu ako templátu. V týchto reakciách bol použitý 1 μ l produktu z prvej reakcie s 20 pmol DNA oligoméru AMBN a 50 pg fagemidu pCANTAB 5 E-MR1, ako templátu. Priméry a templáty boli zmiešané s 2 PCR Beads v objeme 50 μ l a boli cyklované krokmi, ako je popísané vyššie. Každá reakcia vytvorila 876 bp knižnicu. PCR produkty boli zostrihané restriktónymi enzýmami Sfi a NotI, a potom boli prečistené. 150 ng prečistených produktov PCR bolo ligovaných s 250 ng fágového vektoru DNA pCANTAB 5 E (vopred rozstřihtuté tak, ako dodáva Pharmacia). Ligačné zmesi boli odsolené, a 40 ng z každej ligácie bolo použitých na transformáciu *E. coli* TG1. Každá transformácia poskytla približne $1,5 \times 10^6$ klónov. Z transformovaných baktérií boli potom získané fágové knižnice. Bunky z každej transformácie rástli v 10 ml 2xYT médiu (16 g baktotrypton, 10 g baktokvasničný extrakt, 5 g NaCl/liter vo vode) s obsahom 2 %

glukózy, pri teplote 37 °C a pohybe 250 RPM. Po hodine bol pridaný ampicilín (výsledná koncentrácia 100 µg/ml) a 1×10^6 plaky tvoriacich jednotiek (pfu) M13KO7 helper fágu. Kultúry rástli 1 hodinu, potom boli centrifugované a resuspendované v 10 ml 2xYT plus ampicilín (100 µg/ml) a kanamycín (50 µg/ml), a potom rástli 16 hodín pri teplote 37 °C a pohybe 250 RPM. Baktérie boli peletované centrifugáciou v Sorval SS34 rotore pri 8 000 RPM 20 minút. Supernatanty s obsahom fágov boli prefiltrované cez 0,45 µm filtračnú jednotku. Fágy boli potom precipitované pridaním 2 ml PEG, NaCl (20 % PEG 8 000 v 2,5 M NaCl), a potom boli inkubované na lade po dobu 30 minút. Precipitované fágy boli centrifugované v rotore Sorval SS34 pri 10K RPM 20 minút, potom boli resuspendované v 1 ml NTE (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA). Získané fágové knižnice boli titrované a uskladnené pri 4 °C.

Selektívny výber z knižnice pre V_HCDR3

NR6M bunky, ktoré rástli v DMEM s obsahom 10 % fetálneho hovädzieho séra plus 750 µg/ml G418, boli zozbierané použitím 0,02 % EDTA (Sigma, kat. č. E-8008). 2×10^7 buniek bolo centrifugovaných a resuspendovaných v 10 ml chladného blokovacieho pufru (2 % BSA, 0,02 % NaN₃ v DPBS) a pomaly sa otáčali 1 hodinu pri teplote 4 °C. Potom boli bunky centrifugované a resuspendované v 5 ml chladeného blokovacieho pufru. 1×10^9 fágov z každej knižnice pre ťažký reťazec CDR3 bolo pridaných k bunkovej suspenzii a zmes sa pomaly otáčala 2 hodiny pri teplote 4 °C. Bunky boli premyté dvakrát chladným blokovacím pufrom a resuspendované v 5 ml chladného blokovacieho pufru. Ako kompetitívny inhibítor bol pridaný MR1dsFvPE38 (výsledná koncentrácia 2 µM) a suspenzia sa pomaly otáčala 2 hodiny pri teplote 4 °C. Bunky boli premyté trikrát 10 ml chladného blokovacieho pufru. Naviazané fágy

boli eluované resuspendovaním premytých buniek v 1,5 ml ľado-vo chladnej 50 mM HCl a inkubované 10 minút na ľade. NR6M bunky boli centrifugované a eluované fágy boli prenesené do novej skúmavky s obsahom 200 μ l 1 M Tris pH 8,0. Eluované fágy boli titrované pre určenie počtu získaných fágov. 0,5 ml eluovaných fágov bolo potom amplifikovaných vložением do *E. coli* TG1 pre použitie v ďalšom cykle selektívneho výberu.

Konštrukcia knižnice mutovaného V_L

CDR3 s mutáciami v ťažkom reťazci (S98P-T99Y) bol použitý ako templát v dvoj krokovej PCR, kde sa uskutočnil náhodný výber aktívnych miest v ľahkom reťazci CDR3. V prvej reakcii bolo 50 μ g fagemidu s mutáciou ťažkého reťazca (S98P-T99Y) zmiešaných s 20 pmol DNA oligomérov VLMUT (5'-GATTACTACTGTTTGCAANNNSNNSAACGTGCCTCTTACA-3') a AMBN v objeme 50 μ l. Zmes bola cyklovaná rovnakými krokmi ako boli použité pre vytvorenie knižnice pre ťažký reťazec CDR3. Reakcie vytvorili 150 bp produkty obsahujúce náhodné „aktívne miesta“ v ľahkom reťazci CDR3. Po prečistení, 1 μ l produktu vytvoreného v prvom cykle PCR bol zmiešaný s 20 pmol DNA oligoméru S1, v druhom cykle PCR s 50 μ g fagemid DNA obsahujúcej mutáciu ťažkého reťazca (S98P-T99Y) ako templátu. Templát a priméry boli zmiešané s 2 PCR Beads v objeme 50 μ l a cyklované v krokoch, ako je popísané vyššie. Reakcie vytvorili 876 bp knižnicu, ktorá obsahuje V_H CDR3 mutáciu (S98P-T99Y) a náhodné aktívne miesto v CDR3L. PCR produkty boli zostrihnuté restriktónymi enzýmami Sfi a Not I, prečistené a ligované s pCANTAB5E vektorom tak, ako knižnice pre ťažký reťazec CDR3. Produkty ligácie boli odsolené a jedna desatina (40 ng) bola použitá na transformáciu *E. coli* TG1. Získala sa fágová knižnica obsahujúca 3×10^5 klónov tak, ako je popísané pre konštrukciu ťažkých reťazcov CDR. Jedna štvrtina bola amplifikovaná a použitá pre prvý cyklus selektívneho výberu.

Selektívny výber z knižnice pre V_LCDR3

NR6M bunky boli zozbierané tak, ako pri postupe selektívneho výberu V_HCDR3. Keď nie je uvedené inak, všetky kroky a premývania boli uskutočnené chladným blokovacím pufrom. 5×10^6 buniek bolo resuspendovaných v 1 ml blokovacieho pufru a otáčali sa 1 hodinu. Potom boli bunky centrifugované a resuspendované. Bola pridaná knižnica fágov a suspenzia sa pomaly otáčala 2 hodiny pri teplote 4 °C. Bunky boli premyté trikrát, potom boli resuspendované v blokovacom pufri s obsahom 2 pM MR1 s mutáciou v ťažkom reťazci (S98P-T99Y) scFv-PE38 a zmes sa pomaly sa otáčala 2 hodiny pri teplote 4 °C. Bunky boli premyté trikrát a naviazané fágy boli eluované a neutralizované tak, ako pre knižnicu ťažkých reťazcov CDR3. Eluované fágy boli titrované a použité pre ďalší cyklus selektívneho výberu.

Izolácia fágov

Fágy získané po každom cykle selektívneho výberu boli amplifikované pre použitie v ďalšom cykle selektívneho výberu. *E. coli* TG1 rástli v 10 ml 2xYT s obsahom 2 % glukózy, inkubácia sa uskutočnila pri teplote 37 °C a pohybe 250 RPM. Keď OD₆₀₀ dosiahlo hodnotu 0,3, do kultúry bolo pridaných 0,5 ml získaných fágov a pokračovala inkubácia. Po 1 hodine bol pridaný ampicilín (100 µg/ml, výsledná koncentrácia) a 1×10^{10} pfu M13KO7 helper fág a inkubácia pokračovala 1 hodinu. Bunky boli centrifugované a sediment buniek bol resuspendovaný v 10 ml čerstvého 2xYT média s obsahom ampicilínu (100 µg/ml) a kanamycínu (50 µg/ml). Nasledujúca inkubácia pri teplote 37 °C a otáčkach 250 RPM trvala 16 hodín. Baktérie boli 20 minút centrifugované v rotore Sorval SS34 pri 8K RPM. Supernatanty obsahujúce fágy boli prefiltrované cez 0,45 mikrónový filter. Fágy boli vyvrážané pridaním 2 ml PEG/NaCl (20 % PEG 8000 v

2,5 M NaCl, hmotnosť/objem) a potom boli inkubované na ľade 30 minút. Vyzrážané fágy boli 20 minút centrifugované v rotore Sorval SS34 pri 10K RPM, potom boli resuspendované v 1 ml NTE (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4). Získaná fágová knižnica bola titrovaná a uskladnená pri teplote 4 °C.

Detekcia pozitívnych klónov

Po treťom cykle selektívneho výberu bolo 48 klónov z knižnice pre ťažké reťazce analyzovaných pomocou ELISA pre väzbu na EGFRvIII peptid (LEEKKGNVVTDHSGGK-biotin). Dvadsať dva klónov, ktoré vykazovali najsilnejší signál, bolo ďalej analyzovaných a určila sa ich sekvencia DNA. Po štvrtom cykle selektívneho výberu bolo pomocou ELISA analyzovaných 48 klónov a desiatim klónom s najsilnejším signálom boli určené sekvencie DNA. Z knižnice pre ľahký reťazec bolo po druhom cykle selektívneho výberu analyzovaných ELISOU 48 klónov a 17 klónov s najsilnejším signálom bolo sekvenovaných. Po treťom cykle bolo analyzovaných 20 klónov a u 10 klónov s najsilnejším ELISA signálom bola určená sekvencia DNA. Pre získanie fágov z jednotlivých klónov boli jednotlivé kolónie odobraté z platničky, kde bol použitý posledný titer selektívneho výberu. Kolónia bola inokulovaná do 150 μ l 2xYT s 2 % glukózou a 100 μ g/ml ampicilínu a bola inkubovaná v 96 jamkovej kultivačnej platničke pri teplote 37 °C a 150 RPM otáčkach. Po 3 hodinách bolo 20 μ l kultúry prenesených do jamôk na druhej kultivačnej platni s obsahom 100 μ l 2xYT s 2 % glukózou a 100 μ g/ml ampicilínu plus 1×10^8 M13K07 helper fágom a kultivácia trvala 2 hodiny. Kultúry boli centrifugované a resuspendované v čerstvom 2xYT médiu plus ampicilín a kanamycín a potom rástli 16 hodín. Následne boli bunky centrifugované a 50 až 100 μ l supernatantu s obsahom

fágov bolo testovaných pomocou ELISA. ELISA fágov bola uskutočnená tak, ako je popísané (Lorimer a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14815-14820, 1996) s tou výnimkou, že ako substrát pre detekciu bolo použitých 100 μ l 3,3',5,5'-tetrametylbenzidínu (BM modrá, Boehringer Mannheim). Po vzniku modro-zeleného sfarbenia bolo pridaných 100 μ l 2 M H_2SO_4 , čím sa zastavilo vyfarbovanie. Absorbancia bola meraná pri 450 nm.

Sekvenovanie DNA

Sekvenovanie DNA sa uskutočnilo použitím Rhodamine Terminator Cycle Sequencing kitu (Foster City, CA). Vzorky boli analyzované v automatickom sekvenátore PE Applied Biosystems, Model 310.

Konštrukcia, expresia a purifikácia scFv imunotoxínového plazmidu

scFv z vybratých fagemidových klónov bolo amplifikovaných pomocou PCR a primérov, ktoré vniesli NdeI a HindIII restriktčné miesta. Produkty boli rozstrihnuté a klónované do základného expresívneho vektora T7, kde scFv je fúzovaná so skrátenou verziou pseudomonádového exotoxínu A. Plazmidy boli transformované do expresívnych hostiteľských BL1(λ DE3). MR1 mutované imunotoxíny boli exprimované a pripravené tak, ako už bolo popísané (Buchner a spol., *Anal. Biochem.* 205:263-270, 1992).

Rezonancia povrchových plazmónov

Väzobná kinetika bola meraná použitím Biacore 2000 Biosensor (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). Streptavidín bol naviazaný na CMS senzorový čip výskumnej kvality, a použili sa reakčné činidlá viažuce amín (BIAcore). Biotinylovaný

EGFRvIII peptid bol naviazaný na streptavidín injekčným nanosením 10 μ l 10 nM roztoku peptidu na čip. Imunotoxíny boli zriedené na koncentráciu 25 μ g/ml Hepes soľným roztokom (HBS). Rýchlosti vstupu a výtoku boli merané nanosením 50 μ l zriedeného imunotoxínu na povrch čipu pri rýchlosti 10 μ l/minúta. Naviazaný materiál sa ponechal disociovať 5 minút alebo dlhšie. Zostávajúci naviazaný materiál bol odstránený z EGFRvIII peptidu injekčným pridaním 5 μ l 10 mM kyseliny fosforečnej. Vázobná kinetika bola analyzovaná použitím počítačového programu BIAevaluation 2,1.

Bunková kultúra a testy cytotoxicity

NR6M bunky boli kultivované v DMEM médiu plus 10 % fetálne hovädzie sérum obohatené 750 μ g/ml G418. Testy cytotoxicity merali inhibíciu inkorporácie [3 H]-leucínu tak, ako už bolo popísané (Prior a spol., *Cell* 64:1017-1023, 1991).

Baktérie a bunkové línie

E. coli TG1; K12 delta(lac-pro), sepE, thi, hsdelta5/F'[traD36, proAB, lacI^q, lacZdeltaM15]. *E. coli* BL21(λ DE3); F⁻ompT[lon]hsdS_B(r_B- m_B-; kmeň *E. coli* B) s DE3, λ profág nesúci gén T7 RNA polymerázy. NR6 je bunková línia varianty švajčiarskych myších 3T3 fibroblastov bez EGFR. NR6M je NR6 bunková línia transfektovaná cDNA pre mutovaný receptor EGFRvIII, ktorý je pod kontrolou promótoru pre β -aktín. Zdroj NR6 a NR6M už bol v minulosti popísaný (Lorimer a spol., *Clin. Cancer Res.* 1:859-864, 1995).

PRÍKLAD 3

Konštrukcia knižnice pre V_HCDR3

Pre zvýšenie afinity MR1(Fv) a aktivity príslušného imunotoxínu MR1(FV)-PE38 sme mutovali V_HCDR3 a V_LCDR3,

nakoľko tieto časti protilátky majú významný kontakt s antigénom (MacCallum a spol., *J. Mol. Biol.* 262:732-745, 1996). Prvých deväť z jedenástich aminokyselín v V_HCDR3 je uvedených v Tabuľke 5 (posledné dve, D101 a Y102 nie sú zahrnuté, nakoľko nie je pravdepodobné, že prispievajú k väzbe na antigén). Pretože kompletná knižnica, v ktorej by bolo randomizovaných deväť aminokyselinových zvyškov, by si vyžiadala 5×10^{11} jednotlivých klónov, pripravili sme tri rôzne knižnice s obsahom zvyškov 95 až 97, 98 až 100 a 101A až 101C tak, ako je popísané v Príklade 1. Knižnica pre H-CDR3 95 až 97 obsahovala $1,6 \times 10^6$ klónov, knižnica pre H-CDR3 98 až 100 obsahovala 4×10^5 klónov a knižnica pre H-CDR3 101A až 101C obsahovala 1×10^6 klónov. Aby sa zistilo, či knižnice boli pripravené správne, bolo sekvenovaných päť klónov z každej knižnice. Ako sa predpokladalo, každý klón mal inú kombináciu aminokyselín v oblasti vystavenej mutáciám. Pretože kompletná odlišná knižnica randomizujúca 3 aminokyseliny by si vyžadovala len 8×10^3 nezávislých klónov, veľkosť knižníc dáva istotu, že určite sú prítomné všetky možné sekvencie DNA.

Selektívny výber z knižnice pre V_HCDR3 a analýza vybratých klónov

Nakoľko výsledné zamýšľané použitie zlepšeného mutantu MR1 bolo nasmerovať toxín k EGFRvIII-pozitívnym rakovinovým bunkám, pre selektívny výber sme použili EGFRvIII pozitívne NR6M bunky. Selektívny výber sa uskutočnil v prítomnosti imunotoxínu MR1(Fv)-PE38, u ktorého sa predpokladalo, že bude pôsobiť ako kompetitor voči divokému typu MR1 Fv v knižnici. Fágy z každej knižnice boli odobraté a rovnaké množstvo fágov (1×10^9) z každej knižnice bolo vložených do prvého cyklu selektívneho výberu. Eluované fágy boli titrované a použité pre ďalší cyklus selektívneho výberu. Nasledujúce selektívne

výbery boli uskutočnené bez určenia titra získaných fágov. Získal sa tým čas a znížila sa možnosť, že nestabilné väzby by mohli byť stratené počas 24 hodín, potrebných pre titrovanie získaných fágov. Získaný výťažok bol zvyčajne 1×10^{12} cfu/ml. Tabuľka 3 sumarizuje počet fágov získaných po každom zo štyroch cyklov selektívneho výberu. Najväčšie obohatenie sa dosiahlo v treťom cykle a v štvrtom cykle nastalo zníženie.

Pôvodne sme testovali fágy zo štvrtého cyklu selektívneho výberu. Fágovou ELISA bola analyzovaná väzba štyridsiatych ôsmich klónov a u desiatich klónov s najsilnejším signálom bola stanovená sekvencia DNA. Ako je uvedené v Tabuľke 6, získali sa len mutácie v polohe 98 a 99. DNA sekvenčná analýza ukázala, že klóny patria do piatich rôznych skupín: pôvodný S98-T99; a mutácie P98-N99; P98-Y99; P98-F99 a P98-W99. Aby sme zistili, či látky s dobrou väzbou neboli stratené medzi tretím a štvrtým cyklom, analyzovali sme tiež fágy získané v treťom cykle. ELISOU sme analyzovali väzbu 48 jednotlivých klónov na EGFRvIII peptid a u 22 z nich, ktoré dávali najvyšší signál, bola určená sekvencia DNA. Opäť sa získali len mutácie v polohách 98 a 99 (Tabuľka 6). V týchto polohách boli získané rôzne aminokyseliny. Najčastejším bol S98-T99 (divoký typ), nasledovali P98-S99; P98-Y99; P98-N99 a A98-D99. Štvrtý cyklus selektívneho výberu mal za následok obohatenie klónov P98-N99 a P98-Y99 oproti divokému typu (S98-T99), stratu niektorých klónov a tiež získanie nového klónu, obsahujúceho P98-F99.

Cytotoxicita a afinita V_H CDR3 mutantov

Každý z 12 mutantov, ktoré boli získané selektívnym výberom z knižnice pre V_H CDR3, bol použitý pre vytvorenie imunotoxínu. Každý imunotoxín bol pripravený PCR amplifiká-

ciou Fv z fágového vektora a jeho subklonovaním do imunotoxického extresívneho vektora. Všetky imunotoxíny (okrem A98-D99 mutácie v V_H CDR3) mohli byť vysoko prečistené, ich homogenita bola viac ako 90 až 95 %. Pre určenie cytotoxicity u prečistených imunotoxínov boli použité NR6M bunky. Väzobné afinity boli merané metódou Biacore za použitia buď peptidu, imobilizovaného na čipe (alebo mutovanej formy extracelulárnej domény EGFR, pripojenej na čip). Výsledky jednej sady pokusov sú uvedené v Tabuľke 6; pri porovnaní s pôvodným klónom (S98-T99), ktorý mal hodnotu IC_{50} 8,0 ng/ml, bolo šesť klónov viac toxických. P98-Y99, mal hodnotu IC_{50} 3,5 ng/ml, nasledoval P98-N99, P98-W99, P98-I99, ktoré mali hodnotu IC_{50} 4,5 ng/ml, P98-F99 mal hodnotu IC_{50} 6 ng/ml a P98-V99 mal hodnotu IC_{50} 6,5 ng/ml. Štyri klóny, P98-S99, W98-F99, S98-W99 a P98-T99 mali hodnotu IC_{50} rovnakú, ako pôvodný klón.

Konštrukcia knižnice pre V_L CDR3

Všetky mutanty získané po selektívnom výbere z knižníc pre V_H CDR3 mali zmeny v polohách 98 a 99. Sekvencia DNA týchto dvoch zvyškov vytvára aktívne miesto, ktoré je oblasťou, kde dochádza k mutáciám počas dozrievania afinity protilátky. Bol použitý mutant s najvyššou cytotoxickou aktivitou z knižnice pre V_H CDR3 a tento bol podrobený mutácii, nasmerovanej len na aktívne miesto v V_L CDR3. Sekvencia V_L CDR3 je uvedená v Tabuľke 3. Knižnica zaviedla náhodné zvyšky do aktívneho miesta, ktoré kodovali zvyšky 91 a 92. Bola skonštruovaná fágová knižnica pre V_L CDR3 tak, ako je popísané v Príklade 1 a obsahovala 3×10^5 klónov. Nakoľko pre dosiahnutie všetkých možných aminokyselinových kombinácií v dvoch polohách vybratých pre mutáciu bola potrebná knižnica len so 400 klónmi, možno predpokladať, že všetky možné sekvencie DNA boli prítomné v tejto knižnici.

Selektívny výber z knižnice pre V_LCDR3 a analýza vybratých klónov

Uskutočnili sa tri cykly selektívneho výberu. Fágy získané v každom cykle sú uvedené v Tabuľke 3. S touto knižnicou sme získali väčšie obohatenie v druhom cykle selektívneho výberu ako v treťom cykle. V druhom cykle selektívneho výberu bolo získaných 48 jednotlivých klónov a ELISOU bola hodnotená ich väzba na peptid. Sekvencia DNA bola vyhodnotená u sedemnástich klónov, ktoré dávali najsilnejší signál. Ako zaznamená Tabuľka 7, získalo sa päť rôznych mutantov. Všetky si zachovali ako divoký typ serínový zvyšok v polohe 91 a mutácia bola prítomná vo zvyšku 92. Najviac bol zastúpený F92W (6 zo 17), nasledoval F92R (3 zo 17), F92S (2 zo 17), F92L (1 zo 17) a F92M (1 zo 17). Zo 17 analyzovaných mutantov boli štyri pôvodného typu.

Tiež boli analyzované vlastnosti klónov izolovaných v treťom cykle selektívneho výberu. Náhodne bolo vybratých dvadsať klónov, u odobratých fágov bola hodnotená väzba na peptid ELISOU. Desať klónov, ktoré dávali najsilnejší signál, bolo vybratých pre sekvenčnú analýzu DNA. Sekvenovanie DNA ukázalo, že boli prítomné tri rôzne klóny, všetky boli prítomné v treťom cykle. Okrem jedného, pôvodného klónu, tieto klóny boli: F92S (7 z 10), F92W (1 z 10) a F92R (1 z 10). Nenašli sa žiadne nové mutanty a nenašli sme mutanty F92L a F92M.

Cytotoxicita a väzobné vlastnosti V_LCDR3 mutantov

Získané rôzne Fv boli použité pre prípravu imunotoxínov. Ich cytotoxické aktivity a väzobné afinity boli merané použitím prečistených rekombinantných proteínov. Len jeden mutant, F92W, dával imunotoxín, ktorý bol aktívnejší ako pôvodný. Jeho hodnota IC₅₀ bola 1,3 ng/ml v porovnaní s 3,5

ng/ml pre pôvodný (Tabuľka 7). Iné mutanty mali nižšiu aktivitu. Hodnoty v Tabuľke 7 tiež ukazujú, že F92W má vyššiu afinitu ($K_d = 3$ nM) ako pôvodný klón F92 ($K_d = 6$ nM). Iný mutant, F92L, má mierne zvýšenú afinitu ($K_d = 4$ nM), ale nevykazuje zvýšenú cytotoxicitu. Obrázok 2 ukazuje BIACore senzogram a porovnanie väzobných vlastností pôvodného klónu s najaktívnejším imunotoxínom, vytvoreným z Fv, ktorý bol získaný z knižnice pre V_H CDR3 (V_H S98Y-T99Y) a s najaktívnejším klónom získaným z knižnice pre V_L CDR3 (V_H S98P-T99Y- V_L F92W), ktorý sa teraz nazýva MR1-1. Obrázok ukazuje, že dva mutanty majú pomalšiu disociačnú rýchlosť ako pôvodný Fv. Analýza imunotoxínu (MR1-1(Fv)-PE38) s mutáciami vo V_H a V_L ukázala, že má zníženú k_{off} a mierne zvýšenú k_{on} , výsledkom čoho je hodnota $K_d = 3$ nM.

Tabuľka 4 zaznamenáva výsledky dvoch pokusov, v ktorých cytotoxická aktivita MR1(Fv)-PE38 bola porovnávaná s dvomi zlepšenými variantmi: MR1(Fv)(V_H S98P-T99Y)-PE38 a MR1-1(Fv)-PE38. V oboch pokusoch bol MR1(Fv)-PE38 najmenej aktívny a MR1-1(Fv)-PE38 bol najaktívnejší.

PRÍKLAD 4

Výťažok imunotoxínu

V priebehu purifikácie bolo pozorované pozoruhodné zvýšenie výťažku rôznych mutovaných imunotoxínov. Po znovuzložení boli proteíny dialyzované a chromatograficky prečistené (Buchner a spol., *Anal. Biochem.* 205:263-270, 1992). Proteín bol prítomný v prvej frakcii po prečistení na Q-sefarózovej ionexovej živici, ktorá odstraňuje veľké zhluky, nukleové kyseliny a iné kontaminácie. Eluovaný proteín je potom prečistený na MonoQ kolóne a proteíny sú eluované kontinuálnym gradientom 0 až 0,3 M NaCl. Tento krok odstráni menšie zhluky. Správne zložený monomérny imunotoxín

je eluovaný z MonoQ charakteristickou koncentráciou 280 mM NaCl. Čistota získaných MonoQ frakcií bola potvrdená prítomnosťou jedného monoméneho vrcholu eluovaného z TSK G3000SW kolóny a SDS-PAGE. Výťažok každého mutovaného imunotoxínu MR1(Fv)-PE38 je vypočítaný z množstva proteínov vo vrcholoch MonoQ frakcií a z vrcholu po gélovej chromatografii (TSK 3000). Tabuľky 6 a 7 ukazujú výťažky po purifikácii 100 mg proteínov inklúzných teliesok. Je zrejmé, že výťažok imunotoxínu je značne ovplyvnený mutáciami v CDR a zvýšil sa z 2 % pôvodného MR1(Fv)-PE38 na viac ako 10 až 17,5 % u mnohých mutantov.

PRÍKAD 5

EGFRvIII vnútrolebečné nádory u potkanov bez týmusu boli vyvolané injekčným podaním 10^5 U87MG.déltaEGFRvIII buniek (ľudská glyoblastómová bunková línia, vytvorená transfekciou U87MG buniek EGFRvIII. Pozri: Nishikawa a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7727-7730, 1994). Katéter bol vložený 1 mm pred a 4 mm vedľa temena. Nádory boli ošetrované infúziou cez katéter priamo do nádora, podával sa imunotoxín MR1-1PE38, alebo fyziologický roztok, ako kontrola. Pomocou osmotickej pumpy Alzet® 2M1 (Durect Corp., Cupertino, CA) bol imunotoxín podávaný v dávkach 2 alebo 6 μg v 200 μl fosfátom pufrovanom fyziologickom roztoku („PBS“) s 0,2 % ľudským sérovým albumínom („HSA“) počas 7 dní. Kontrolné zvieratá dostávali rovnakým spôsobom 200 μl PBS-HSA roztok. Podávanie začalo 3 dni po naočkovaní nádora. Ako zaznamenáva Obrázok 3, všetky kontrolné zvieratá, ktoré dostávali fyziologický roztok, boli po 20-tych dňoch mŕtve. Desať percent zvierat, ktoré dostávali dávku 6 μg , žilo ešte po 160 dňoch. Viac ako tridsať percent zvierat, ktoré dostávali dávku 2 μg , ešte žilo po 160 dňoch. Rozdiel v prežívaní medzi 2 μg a 6 μg

naznačuje, že vo vnútrolebečnom prostredí môže byť koncentrácia imunotoxínu v dávke 6 μg dosť vysoká a pôsobiť nešpecificky toxicky na mozgové tkanivo, čo sa neprejavilo pri dávke 2 μg ; obe dávky imunotoxínu predlžujú prežívanie.

PRÍKLAD 6

EGFRvIII vnútrolebečné nádory u potkanov bez týmusu boli vyvolané injekčným podaním 10^5 U87MG.deltaEGFRvIII buniek cez katéter, ktorý bol vložený 1 mm pred a 4 mm vedľa temena. Nádory boli ošetrované infúziou imunotoxínu MR1-1-PE38, alebo fyziologickým roztokom cez katéter priamo do nádora. Imunotoxín (0,2, 0,6 a 2,0 μg) bol podávaný v 200 μl PBS+HSA počas 7 dní pomocou osmotickéj pumpy Alzet® tak, ako je popísané v predchádzajúcom Príklade. Ošetrovanie začalo 3 dni po naočkovaní nádora.

Obrázok 4 ukazuje, že len desať percent zvierat, ktoré dostávali dávku 0,2 alebo 0,6 μg imunotoxínu, žilo po 25. dni, kým žilo asi 22 % zvierat, ktoré dostávali kontrolný fyziologický roztok. Naproti tomu, prežilo asi 55 % zvierat, ktoré dostávali dávku 2 μg , to znamená, viac ako dvojnásobok percent zvierat, ktoré dostávali fyziologický roztok. Výsledky naznačujú, že dávky 0,2 alebo 0,6 μg boli veľmi nízke aby ovplyvnili prežívanie, dávka 2,0 μg imunotoxínu významne predlžovala prežívanie.

PRÍKLAD 7

EGFRvIII neoplastická meningitída bola u potkanov bez týmusu spôsobená injekčným podaním 10^5 U87MG.deltaEGFRvIII buniek v 40 μl PBS-HSA roztoku pomocou intratekálneho katétra. Ošetrovanie zvierat s nádorom začalo 3 dni po naočkovaní nádora. Imunotoxín MR1-1-PE38 bol podávaný v 40 μl PBS-HSA na tretí, piaty a siedmy deň po naočkovaní nádora. V rovnakom časovom režime kontrolné zvieratá dostávali 40 μl PBS-HSA.

Obrázok 5 ukazuje, že zvieratá, ktoré dostávali kontrolný fyziologický roztok, zomreli do 10. dňa. Na druhej strane, všetky zvieratá, ktoré dostávali imunotoxín, prežili dlhšie, aspoň do 14. dňa; 30 % zvierat, ktoré dostávali dávku 1 μg a 50 % zvierat, ktoré dostávali dávku 2 μg prežilo viac ako 60 dní.

PRÍKLAD 8

Nádory u myši bez týmusu boli spôsobené injekčným podaním 50 μl homogenátu 10^5 U87MG.deltaEGFRvIII buniek sedem dní pred začiatkom ošetrovania (začiatok ošetrovania bol pre túto štúdiu označený ako deň „0“). Nádory boli ošetrené tromi jednorázovými injekciami do nádora 20 μl imunotoxínu MR1-1-PE38 v dávkach 1, 2 alebo 3 μg , ako kontrola bol podávaný fyziologický roztok (PBS-HSA roztok, popísaný v predchádzajúcich Príkladoch) 0, 2 a 4 deň. Na začiatku liečenia mali nádory priemerný objem 600 mm^3 .

Obrázok 6 zaznamenáva, že veľkosť nádorov zvierat ošetrovaných akoukoľvek dávkou imunotoxínu zostáva skoro rovnaká pri meraní 2. deň po prvom ošetrovaní a je prítomné účinné zastavenie rastu nádorov. Na druhú stranu zvieratá, ktoré boli ošetrené kontrolným fyziologickým roztokom, vykazovali rýchly rast nádorov a zväčšenie objemu nádorov na viac ako 7 500 mm^3 na siedmy deň.

Všetky publikácie a patenty uvedené v tomto predkladanom patente sú zahrnuté odkazom do literárneho zoznamu v takom rozsahu, ako keď každá jednotlivá publikácia alebo patent boli konkrétne a jednotlivo uvedené, že sú zahrnuté v literárnych odkazoch.

TABULKA 3

Obohatenie fágov v priebehu selektívneho výberu

cyklus interakcií V _H CDR3	vložené fágy	eluované fágy
1	3x10 ⁹	1,5x10 ⁵
2	3x10 ¹¹	1,0x10 ⁶
3	5x10 ¹¹	1,5x10 ⁸
4	5x10 ¹¹	2,0x10 ¹¹
V _L CDR3		
1	1x10 ¹⁰	2,4x10 ⁵
2	1x10 ¹⁰	5,5x10 ⁶
3	1x10 ¹⁰	2,0x10 ⁷

TABULKA 4

**Porovnanie cytotoxickej aktivity MR1(Fv)-PE38 s dvomi
mutantami so zvýšenou afinitou pre EGFRvIII**

	Pokus 1 IC ₅₀	Pokus 2 IC ₅₀
MR1(Fv)-PE38	9,2±2,1	6,6±0,2
MR1(Fv)(V _H S98P-T99Y)-PE38	6,0±0,39	4,6±0,7
MR1-1(Fv)-PE38	2,6±6,2	2,0±1,0

Hodnoty IC₅₀ sú vypočítané z testov založených na použití rôznych množstiev imunotoxínov. Hodnoty znamenajú priemer ± štandardnú odchýlku. P hodnoty sú < 0,01, pre porovnanie MR1(Fv)-PE38 s MR1-1(Fv)-PE38 a MR1(Fv)(V_HS98P-T99Y)-PE38 s MR1-1(Fv)-PE38 v pokuse 1. Štatistická významnosť P < 0,01 pre porovnanie MR1(Fv)-PE38 s MR1(Fv)(V_HS98P-T99Y)-PE38 a MR1(Fv)(V_HS98P-T99Y)-PE38 s MR1-1(Fv)-PE38 v pokuse 2.

TABULKA 5
DNA a aminosekvencia ťažkého reťazca CDR3 a
ľahkého reťazca CDR3 v MR1 Fv*

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

*Aktívne miesta, ktoré majú sekvenciu Pu G A/T sú podčiarknuté.

TABULKA 6.

**Sekvence a vlastnosti mutovaného fágu, izolovaného z knižnice pre
ťažký reťazec CDR3 a imunotoxínov, pripravených s mutovanou scFv**

poloha	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	počet z	IC ₅₀	K _d	výťažok
										22	ng/ml	nM	%
pôvodné	AK	G	Y	S	S	T	S	Y	A	M	8,0	8,0	2,0
zvyšky v					S	T*				5	8,0	8,0	2,0
treťom cykle					P	S				4	8,0	ND	17,5
					P	Y				3	3,5	6,0	7,0
					P	N				2	4,5	11,0	10,0
					P	W				2	4,5	4,0	10,0
					A	D**				2	ND	ND	ND
					P	I				1	4,5	5,0	10,0
					W	F				1	8,0	ND	10,0
					P	V				1	6,5	ND	7,0
						W				1	8,0	ND	5,0
					P					1	8,0	8,0	?
zvyšky v										počet z			
štvrtom cykle										10			
					S	T*				1	8,0	8,0	2,0
					P	N				3	4,5	11,0	10,0
					P	Y				3	3,5	6,0	7,0
					P	F				2	6,0	20,0	3,0
					P	W				1	4,5	4,0	10,0

*divoký typ, **nemôže vytvoriť imunotoxín, AK - aminokyseliny

TABULKA 7

**Sekvence a vlastnosti mutovaného fágu, izolovaného z knihnice pro
lehký řetazec CDR3 a imunotoxinů připravených s mutovanou scFv**

poloha	89	90	91	92	93	94	95	96	97	počet z IC ₅₀ 17	K _d ng/ml	výtazek nM	%
původné AK	L	Q	S	F	N	V	P	L	T		3,5	6	7
zvyšky v			S	F						4	3,5	6	7
druhom cykle			S	W						6	1,3	3	7
			S	R						3	6,0	9	8
			S	S						2	15,0	22	16
			S	L						1	5,5	4	8
			S	M						1	9,0	6	2
počet z 10													
zvyšky v			S	F*						1	3,5	6	7
treťom cykle			S	S						7	15,0	22	16
			S	W						1	1,3	3	7
			S	R						1	6,0	9	8

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Polypeptid, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje mutovanú variabilnú oblasť ťažkého reťazca (V_H) protilátky alebo mutovanú variabilnú oblasť ľahkého reťazca (V_L), polypeptid má hodnotu K_d pre antigén EGFRvIII 7 nM alebo nižšiu, mutovaný V_H alebo V_L má sekvenciu, ktorá sa líši od V_H alebo V_L pôvodnej protilátky MR1 substitúciou aminokyselín, aspoň jednej aminokyseliny, v komplementaritu určujúcej oblasti (CDR), aminokyselina je kódovaná kodónom, ktorý obsahuje nukleotid, ktorý je súčasťou aktívneho miesta vybraného z AGY alebo RGYW, kde R je A alebo G, Y je C alebo T a W je A alebo T.
2. Polypeptid podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že substitúcia sa vyskytuje vo variabilnej oblasti ťažkého reťazca CDR3.
3. Polypeptid podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že substitúcia sa vyskytuje vo variabilnej oblasti ľahkého reťazca CDR3.
4. Polypeptid podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že substitúcia sa vyskytuje vo variabilnej oblasti ľahkého reťazca CDR1 alebo CDR2.
5. Polypeptid podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že substitúcia sa vyskytuje vo variabilnej oblasti ťažkého reťazca CDR1 alebo CDR2.
6. Polypeptid podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že V_H reťazec a V_L reťazec sú mutované substitúciou aminokyselín, najmenej jednej aminokyseliny, v CDR.

7. Polypeptid podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že mutovaný V_H reťazec má sekvenciu, ktorá sa líši od protilátky MR1 substitúciou aminokyselín, aspoň jednej aminokyseliny, vybratej zo skupiny S98 a T99.
8. Polypeptid podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že substitúcie sú vybrate zo skupiny, ktorá sa skladá z: P98-Y99, P98-N99, P98-W99, P98-I99, P98-F99, a P98-V99.
9. Polypeptid podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený polypeptid je scFv.
10. Polypeptid podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený polypeptid je scFv.
11. Polypeptid podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený polypeptid je dsFv, Fab alebo $F(ab')_2$.
12. Polypeptid podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že substitúcie v ťažkom reťazci sú S98-T99Y a substitúcie v ľahkom reťazci sú F92W (MR1-1).
13. Polypeptid podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ďalej obsahuje efektorovú molekulu, liečivú zložku alebo detekovateľnú značku.
14. Polypeptid podľa nároku 13, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že liečivá zložka je toxická zložka.
15. Polypeptid podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že toxická zložka je pseudomonádový exotoxín alebo jeho cytotoxický fragment.

16. Polypeptid podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že toxická zložka je cytotoxický fragment, ktorý je PE38.

17. Polypeptid podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený polypeptid má hodnotu IC_{50} 7 ng/ml alebo nižšiu.

18. Polypeptid podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený polypeptid má hodnotu IC_{50} 5 ng/ml alebo nižšiu.

19. Polypeptid podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený polypeptid má hodnotu IC_{50} 3,5 ng/ml.

20. Polypeptid podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený polypeptid má aspoň jednu substituovanú aminokyselinu vo V_H , kde uvedená substitúcia je vybratá zo skupiny P98-S99, W98-V99, S98-W99 a P98-T99.

21. Polypeptid podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený polypeptid má výťažok aspoň 3 %.

22. Polypeptid podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený polypeptid má výťažok asi 7 %.

23. Polypeptid podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že toxická zložka je vybratá zo skupiny toxín záškrtu alebo jeho cytotoxický fragment, saporin alebo jeho cytotoxický fragment, kapsulárny antivírusový toxín alebo jeho cytotoxický fragment, ricín alebo jeho cytotoxický fragment a bryodin 1 alebo jeho cytotoxický fragment.

24. Polypeptid podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že substitúcie v ťažkom reťazci sú SS98-T99Y a substitúcia v ľahkom reťazci je F92W (MR1-1).

25. Polypeptid podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ďalej obsahuje povrchový proteín bakteriofága.

26. Molekula nukleovej kyseliny, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsahuje nukleotidovú sekvenciu kódujúcu polypeptid, ktorý obsahuje mutovanú variabilnú oblasť ťažkého reťazca protilátky alebo mutovanú variabilnú oblasť ľahkého reťazca, polypeptid má hodnotu K_d pre EGFRvIII 6 alebo nižšiu, polypeptid má sekvenciu, ktorá sa líši od MR1 substitúciou aminokyselín, aspoň jednej aminokyseliny, v komplementaritu určujúcej oblasti (CDR), aminokyselina je kódovaná kodónom, ktorý obsahuje nukleotid, ktorý je súčasťou aktívneho miesta vybraného z AGY alebo RGYW, kde R je A alebo G, Y je C alebo T a W je A alebo T.

27. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 26, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že polypeptid má sekvenciu, ktorá sa líši od MR1 scFv substitúciou aminokyselín, aspoň jednej aminokyseliny, v mutovanej variabilnej oblasti ťažkého reťazca alebo mutovanej variabilnej oblasti ľahkého reťazca v CDR1 alebo CDR2.

28. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 26, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že polypeptid má sekvenciu, ktorá sa líši od MR1 scFv substitúciou aminokyselín, aspoň jednej aminokyseliny, vybraté z S98 a T99 v V_H ťažkom reťazci CDR3 oblasti, alebo substitúciou F92 v V_L CDR3 oblasti.

29. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 28, v y z n a-
č u j ú c a s a t ý m, že substitúcie v V_H reťazci sú
vybraté z: S98P-T99Y, S98P-T99W, S98P-T99I a S98P-T99V.

30. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 28, v y z n a-
č u j ú c a s a t ý m, že substitúcie v ťažkom reťazci sú
S98P-T99Y a substitúcia v ľahkom reťazci je F92W (MR1-1).

31. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 26, v y z n a-
č u j ú c a s a t ý m, že je operatívne pripojená na
promótor.

32. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 27, v y z n a-
č u j ú c a s a t ý m, že je operatívne pripojená na
promótor.

33. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 28, v y z n a-
č u j ú c a s a t ý m, že je operatívne pripojená na
promótor.

34. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 29, v y z n a-
č u j ú c a s a t ý m, že je operatívne pripojená na
promótor.

35. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 30, v y z n a-
č u j ú c a s a t ý m, že je operatívne pripojená na
promótor.

36. Spôsob usmrtenia buniek nesúcich antigén sa uskutoční
kontaktom bunky s imunotoxínom, ktorý obsahuje toxickú zložku
a cieľovú zložku, cieľova zložka obsahuje polypeptid, ktorý
obsahuje mutovanú variabilnú oblasť ťažkého reťazca

protilátky alebo mutovanú variabilnú oblasť ľahkého reťazca, polypeptid má hodnotu K_d pre EGFRvIII 7 nM alebo nižšiu, polypeptid má sekvenciu, ktorá sa líši od pôvodnej protilátky MR1 substitúciou aminokyselín, aspoň jednej aminokyseliny, v komplementaritu určujúcej oblasti (CDR), aminokyselina je kódovaná kodónom, ktorý obsahuje nukleotid, ktorý je súčasťou aktívneho miesta vybratého z AGY alebo RGYW, kde R je A alebo G, Y je C alebo T a W je A alebo T.

37. Spôsob podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že aspoň jedna aminokyselina je substituovaná vo variabilnej oblasti ťažkého reťazca CDR1 alebo CDR2 mutovanej protilátky alebo vo variabilnej oblasti ľahkého reťazca CDR1 alebo CDR2 mutovanej protilátky.

38. Spôsob podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že mutovaná variabilná oblasť ťažkého reťazca v CDR3 obsahuje substitúciu aminokyselín vybratú zo skupiny: P98-Y99, P98-N99, P98-W99, P98-I99, P98-F99 a P98-V99.

39. Spôsob podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že mutovaná variabilná oblasť ľahkého reťazca CDR3 obsahuje v polohe 92 tryptofán substituovaný za fenylalanín.

40. Spôsob podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že cieľová zložka je MR1-1.

41. Spôsob podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že bunka je malígna bunka.

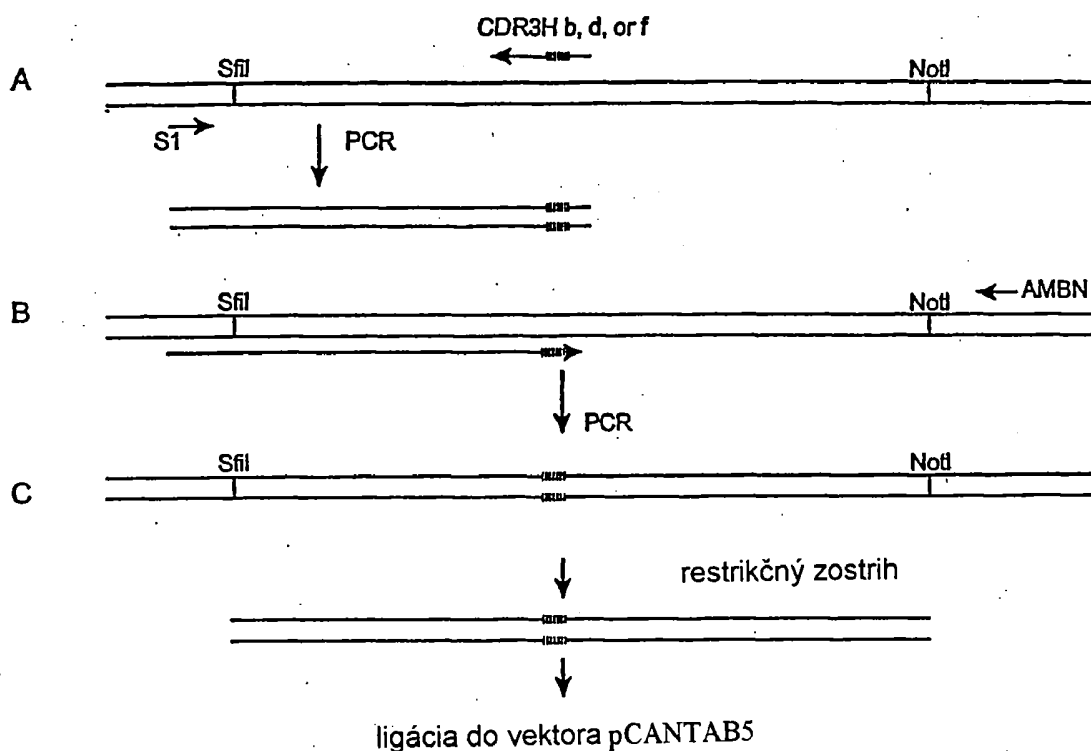
42. Spôsob podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že malígna bunka je gliomová bunka.

43. Spôsob podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že malígna bunka je bunka rakoviny prsníka.

44. Spôsob podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že malígna bunka je bunka rakoviny pľúc.

45. Spôsob podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že malígna bunka je bunka rakoviny vaječníkov.

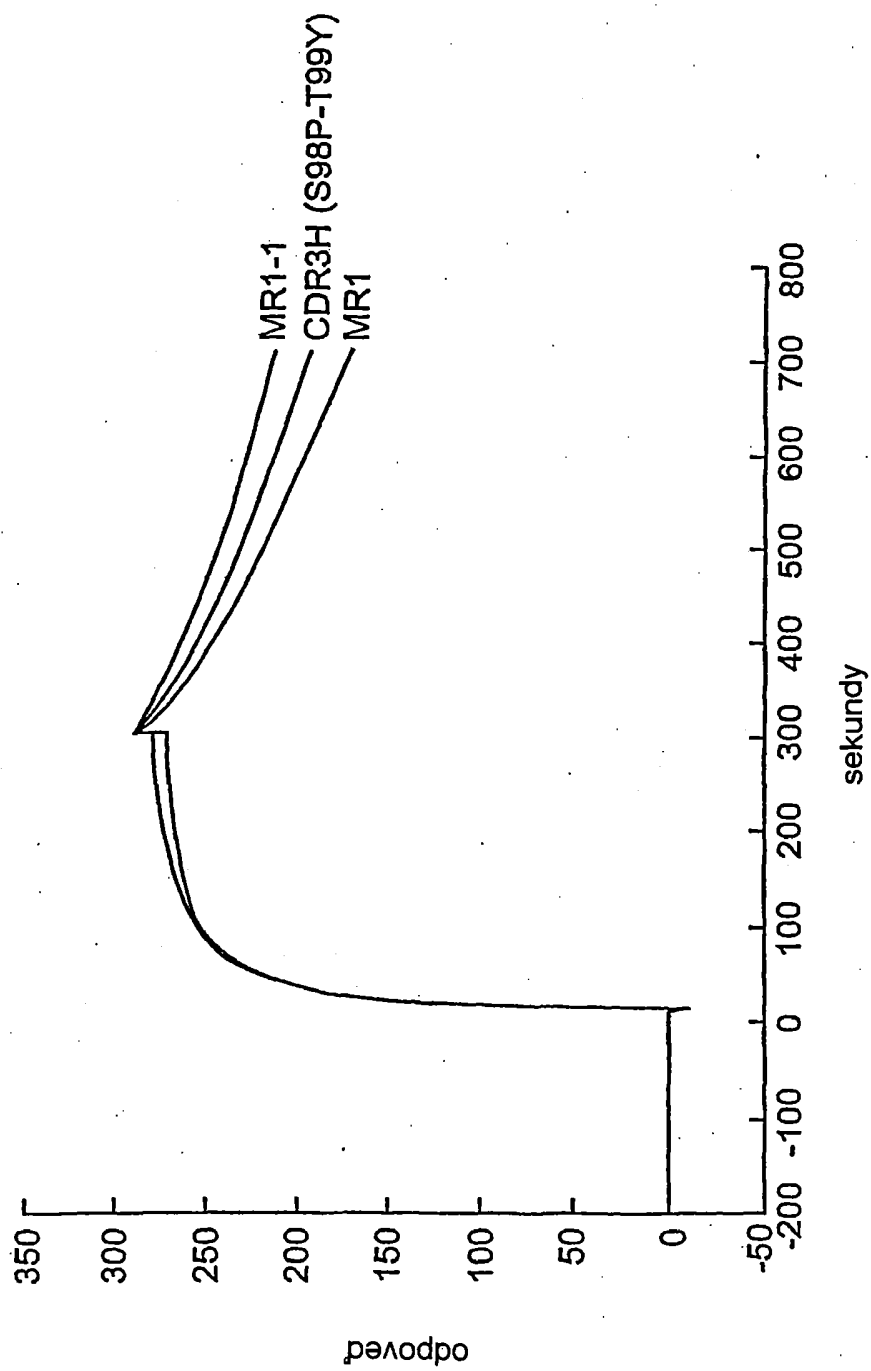
Stratégia pre konštrukciu knižníc s mutáciami



- A) pCANTAB5-MR1 bol použitý ako templát pre amplifikáciu priméru so sekvenciou proti smeru expresie, S1 a priméru v smere expresie, CDR3H b, d alebo f, ktoré obsahujú degenerácie (NNS) v cieľových oblastiach.
- B) pCANTAB5-MR1 bol použitý ako templát pre amplifikáciu, použili sa produkty reakcie z kroku A, priméry se sekvenciou proti smeru expresie a priméry so sekvenciou v smere expresie AMBN.
- C) Produkty reakcie B sú rozstřihtuté a klónované do pCANTAB5.

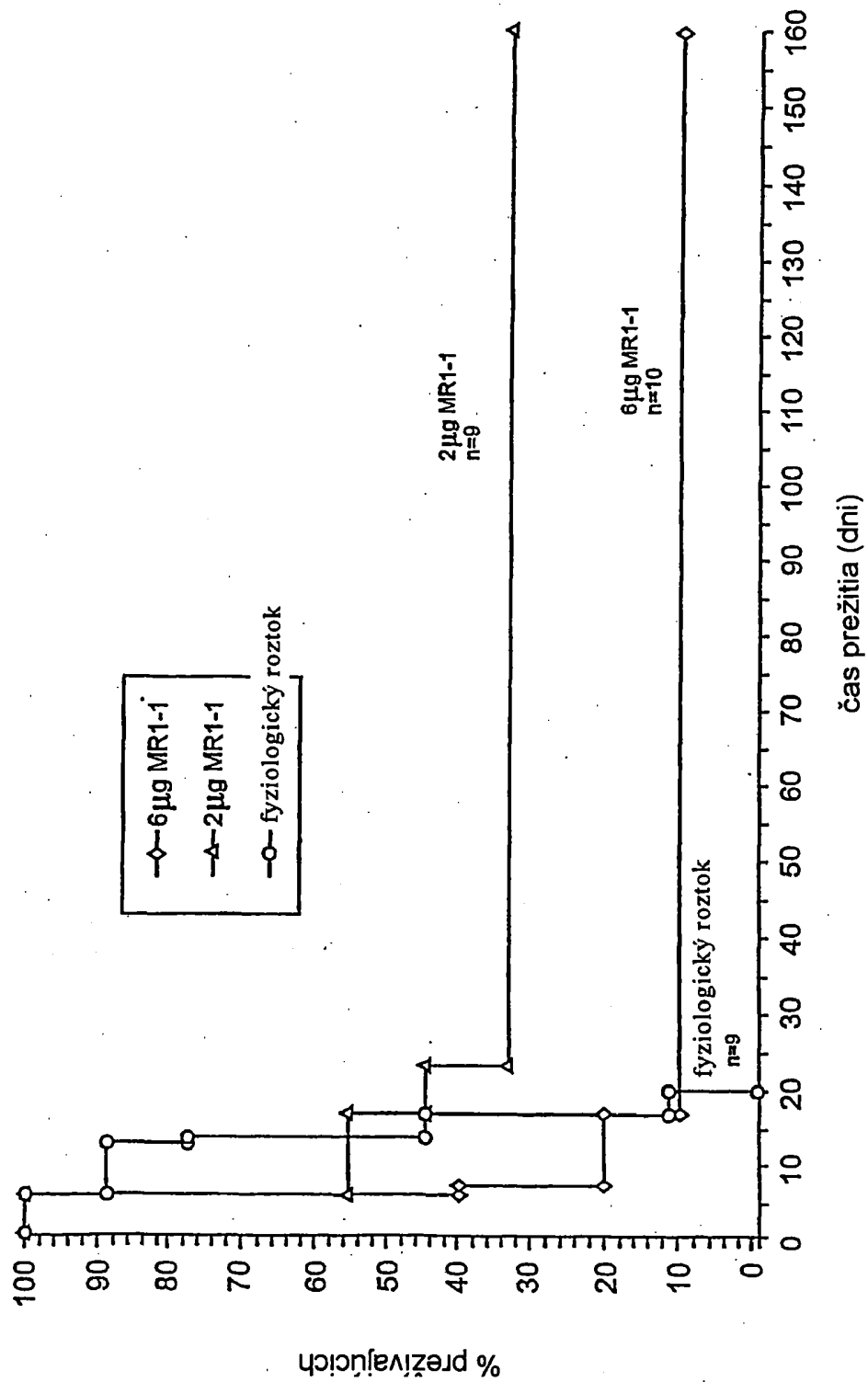
obr. 1

BiAcCore senzogram MR1 a mutantných derivátov



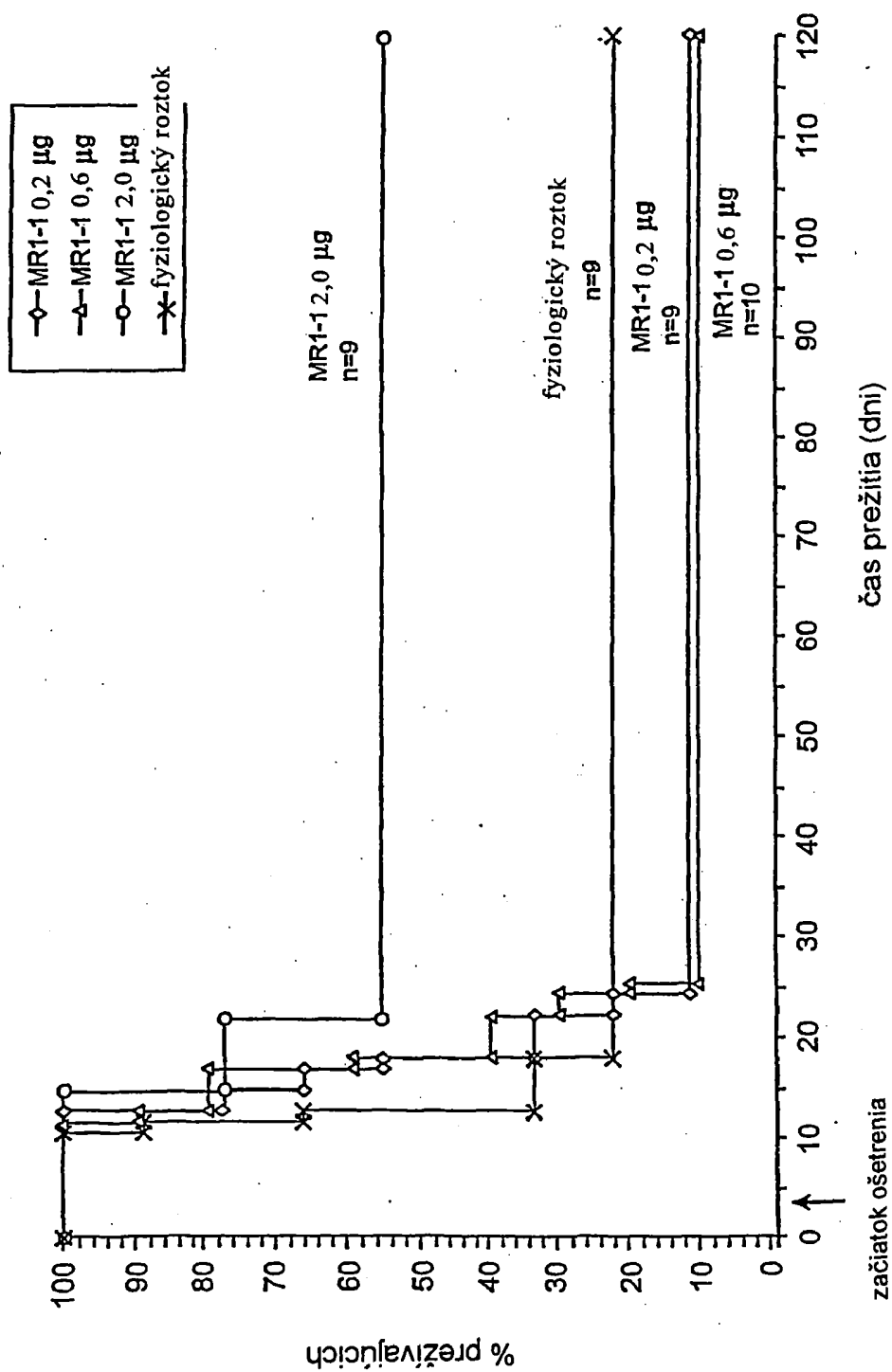
obr. 2

Ošetrovanie U87MG. Δ EGFRvIII vnútromozgových nádorov
podaním 200 μ l MR1-1 do nádora počas 24 h infúzie



obr. 3

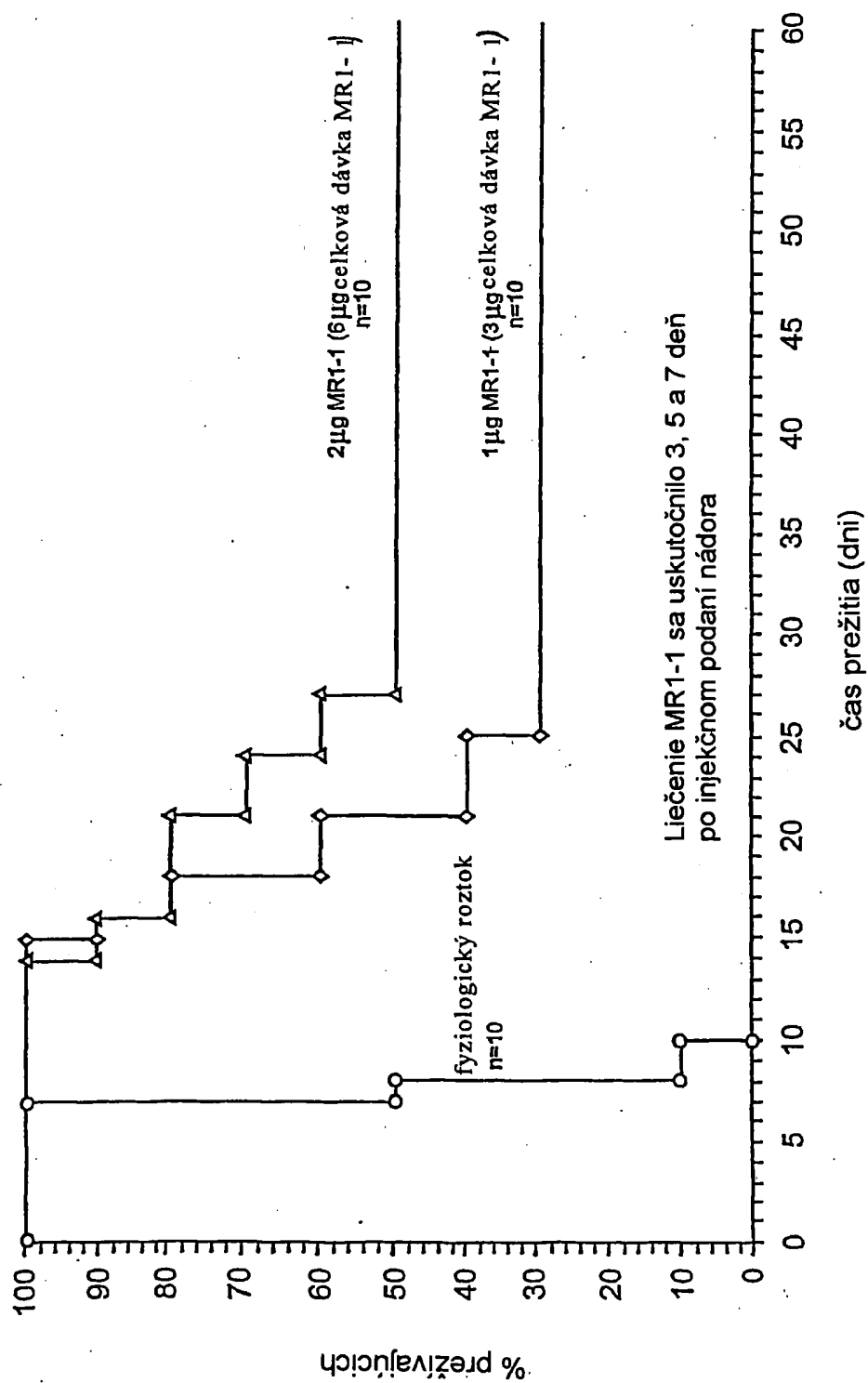
Ošetrenie vnútromozgových EGFRvIII exprimujúcich U87MG.ΔEGFRvIII
podaním 200 μ l MR1-1 do nádora počas 24 h infúzie



obr. 4

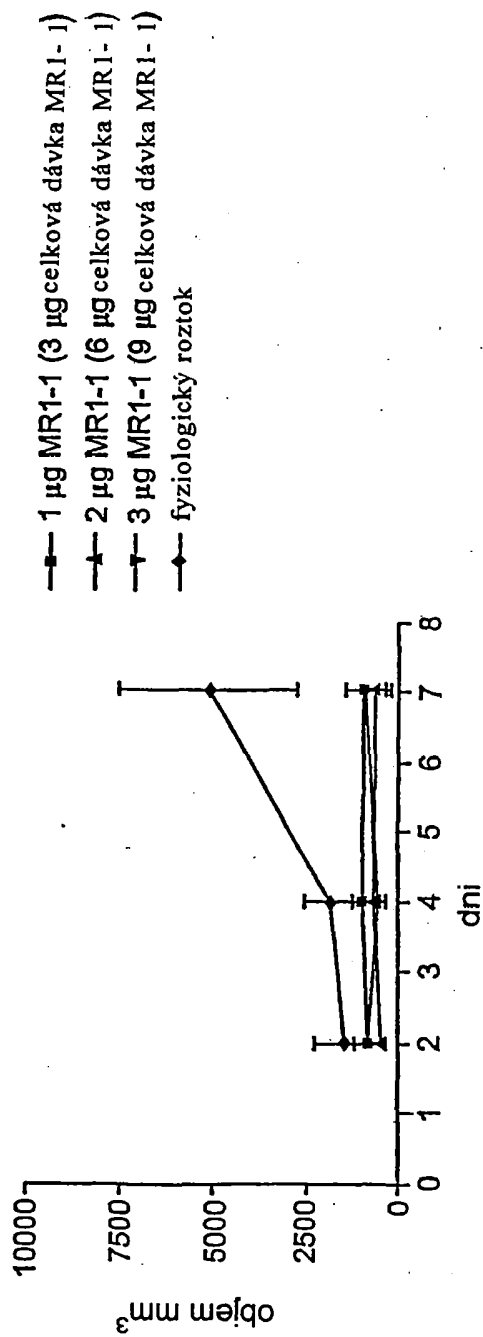
Intratekálne ošetrovanie U87MG.ΔEGFRvIII neoplastickej meningitídy

MR1-1 imunotoxínom



obr. 5

Objemy U87MG. Δ EGFRvIII nádorů ošetřených
injekčním podáním MR1-1 do nádora



myši dostali injekčně 20 µl MR1-1 do nádora 0, 2 a 4 deň

obr. 6