



(12) **Oversettelse av  
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2197903 B1**

**NORGE**

(19) NO  
(51) Int Cl.

**C07K 14/21 (2006.01)**  
**A61K 38/16 (2006.01)**  
**C07K 19/00 (2006.01)**  
**C12N 15/11 (2006.01)**  
**C12N 15/62 (2006.01)**

**Patentstyret**

|      |                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) | Oversettelse publisert                                                        | 2015.02.16                                                                                                                                                                                                                                                      |
| (80) | Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet | 2014.11.12                                                                                                                                                                                                                                                      |
| (86) | Europeisk søknadsnr                                                           | 08799197.2                                                                                                                                                                                                                                                      |
| (86) | Europeisk innleveringsdag                                                     | 2008.09.04                                                                                                                                                                                                                                                      |
| (87) | Den europeiske søknadens Publiseringsdato                                     | 2010.06.23                                                                                                                                                                                                                                                      |
| (30) | Prioritet                                                                     | 2007.09.04, US, 969929 P<br>2008.01.03, US, 18853 P                                                                                                                                                                                                             |
| (84) | Utpekte stater                                                                | AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR<br>HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT<br>RO SE SI SK TR                                                                                                                                                     |
| (73) | Innehaver                                                                     | The Government of the United States of America as represented by the Secretary of the Department of Health and Human Services, National Institutes of Health Office of Technology Transfer 6011 Executive Boulevard Suite 325, Rockville, MD 20852-3804, US-USA |
| (72) | Oppfinner                                                                     | PASTAN, Ira, H., 37 Convent DriveRoom 5116, Bethesda, MD 20892, US-USA<br>WELDON, John, 37 Convent DriveRoom 5116, Bethesda, MD 20892, US-USA<br>FITZGERALD, David, 37 Convent DriveRoom 5116, Bethesda, MD 20892, US-USA                                       |
| (74) | Fullmektig                                                                    | Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge                                                                                                                                                                                                         |

|      |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (54) | Benevnelse            | <b>SLETTINGER I DOMENE II AV PSEUDOMONAS-EKSOTOKSIN A, SOM REDUSERER IKKE-SPESIFIKK TOKSISITET</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| (56) | Anførte publikasjoner | WO-A-98/20135<br>WO-A-2007/016150<br>WO-A-2008/052322<br>MANSFIELD E ET AL: "Characterization of RFB4-Pseudomonas exotoxin A immunotoxins targeted to CD22 on B-cell malignancies" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 5, no. 7, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 557-563, XP002075147 ISSN: 1043-1802<br>ONDA MASANORI ET AL: "Characterization of the B cell epitopes associated with a truncated form of Pseudomonas exotoxin (PE38) used to make immunotoxins for the treatment of cancer patients" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 177, no. 12, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 8822-8834, XP002420637 ISSN: 0022-1767<br>SCHWEMMLEIN M ET AL.: "A CD19-specific single-chain immunotoxin mediates potent apoptosis of B-lineage leukemic cells" LEUKEMIA, vol. 21, 10 May 2007 (2007-05-10), pages 1405-1412, XP002445346 |

## SLETTINGER I DOMENE II AV PSEUDOMONAS-EKSOTOKSIN A, SOM REDUSERER IKKE-SPESIFIKK TOKSISITET

### Beskrivelse

5

### OPPFINNELSENS BAKGRUNN

[0001] I de senere år har immunokonjugater blitt utviklet som en alternativ tilnærming til behandling av ondartede svulster. Immunokonjugater ble opprinnelig sammensatt av et antistoff som var kjemisk konjugert til en plante- eller bakterietoksin, en form kjent som immunotoksin. Antistoffet binder seg til antigenet som utpresses på målcellen, og toksinet internaliseres og fører til celledød ved at det sperrer proteinsyntese og utløser apoptose (Brinkmann, U., Mol. Med. Today, 2:439-446 (1996)). I senere tid har genene som koder antistoffet og toksinet blitt smeltet sammen og immunotoksinet har blitt utpresset som et fusjonsprotein.

15

[0002] En variant av plante-, sopp- og bakterietoksiner har blitt tilpasset bruk med immunotoksiner, inkludert ricin, difteritoksin og Pseudomonas eksotoksin A (PE) (Pastan, I. m. fl., Nat Rev Cancer, 6:559-565 (2006); Pastan, I. m. fl., Annu Rev Med, 58:221-237 (2007)). PE-baserte immunotoksiner gjennomgår for tiden klinisk testing for behandling av CD22-uttrykkende lymfomer og leukemier, i tillegg til mesotelin-uttrykkende faste tumorer. (Kreitman, R., m. fl., J Clin Oncol, 23:6719-6729 (2005); Hassan, R., Clin Cancer Res, 13:5144-5149 (2007)). Vanligvis har PE blitt avkortet eller mutert for å redusere den ikke-spesifikke toksisiteten samtidig som toksisiteten opprettholdes mot celler og målrettes mot med den målrettede delen av immunotoksinet. I årenes løp har det blitt utviklet flere muterte og avkortede former for PE. Den som per idag brukes i flest kliniske forsøk er en 38 kD, som i avkortet form omtales som "PE38."

25

[0003] WO 2008/052322 fremlegger en avkortet form av Pseudomonas eksotoksin A som består av aminosyrene 252 til 608, eller en variant av disse.

[0004] Til tross for slike forsøk over flere tiår, er PE-baserte immunotoksiner fortsatt ikke helt tilfredsstillende. Selv om PE38-immunotoksinene som har gjennomgått kliniske forsøk tåles relativt godt i mindre doser, har dose-begrensende toksisiteter begrenset deres terapeutiske effekt. I et klinisk forsøk i fase I av et PE-basert immunotoksin kjent som LMB-2 besto dosebegrensende toksisiteter over 40 µg/kg gitt annenhver dag (QOD) X 3 av forhøyet transamin, diare, kardiomyopati og en allergisk reaksjon (Kreitman, R.J. m. fl., J Clin Oncol, 18:1622-1636 (2000)). I et klinisk forsøk i fase I av et anti-mesotelinimmunotoksin, kalt SS1P, ble bivirkningene pleuritt, urtikaria og karlekkasjesyndrom funnet å være dosebegrensende (Hassan, R. m. fl., Clin Cancer Res, 13:144-5149 (2007)). I et forsøk i fase I av et tredje PE-basert immunotoksin, BL22, omfattet

35

dosebegrensende toksisiteter flere tilfeller av hemolytturemisk syndrom og et cytokinutløsningssyndrom med systemisk karlekkasjesyndrom (Kreitman, R.J. m. fl., J Clin Oncol, 23:6719-6729 (2005)).

5 **[0005]** Videre er de PE-baserte immunotoksinene som for tiden gjennomgår klinisk testing svært immunogeniske. Dette har vist seg å ikke være problematisk med hensyn til behandlingen av hematologiske maligniteter, der immunsystemets evne til å forsvare seg ofte er svekket. Immunotoksiner kan som oftest administreres flere ganger til pasienter med hematologiske maligniteter. Pasienter med faste tumorer vil imidlertid vanligvis utvikle nøytraliserende antistoffer  
10 mot PE-baserte immunotoksiner i løpet av noen uker etter første gangs administrering. Siden mange protokoller krever tre uker fra administrering av immunotoksinene betyr utviklingen av antistoffene i denne tidsperioden i praksis at, for faste tumorer, kun én administrering vanligvis kan foretas for PE-basert immunotoksin, før pasientens antistoffer gjør den ineffektiv. Selv en enkelt administrering av et PE-basert immunotoksin kan være svært nyttig når det gjelder å redusere  
15 pasientens tumorbyrde, eliminere mindre metastaser og lindre symptomer, men adgangen til å administrere flere doser ville helt klart vært nyttig.

**[0006]** Et begrenset antall tilnærmingsmåter er utviklet i et forsøk på å ta tak i disse problemene. En tilnærming til reduisering av ikke-spesifikk toksisitet, reduisering av det isoelektriske punktet i  
20 rammeverkområdene til Fvs brukt som målhalvdelen til immunotoksinene, ble rapportert i den felles PCT-applikasjonen PCT/US01/43602, publisert som International Publication No. WO 02/40545. En tilnærming til reduisering av immunogenisitet beskrives i den felles PCT-søknaden PCT/US06/028986, publisert som WO 2007/016150, som rapporterer om kartlegging av de ulike epitopene av PE og muteringer av individuelle aminosyrerester som kan kombineres slik at de  
25 reduserer den totale immunogenisiteten til det resulterende PE-molekylet, sammenlignet med PE38. Like fullt vil det være ønskelig å ha flere tilnærminger til reduisering av immunotoksinets dosebegrensende toksisitet. Videre vil det være ønskelig å ha flere tilnærminger til reduisering av immunogenisiteten til PE og til immunotoksiner der PE fungerer som den toksiske halvdelen. Herværende oppfinnelse oppfyller disse og andre behov.

30

## KORT SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

**[0007]** I et første aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et isolert og mutert *Pseudomonas*-eksotoksin A (PE), som omfatter en sekvens av formelen:  $R^1_n\text{-FCS-R}^2_n\text{-R}^3_n\text{-PE}$ -funksjonelt domene III, der : n  
35 = 0 eller 1, uavhengig for hver  $R^1$ ,  $R^2$  og  $R^3$ ;  
 $R^1$  = 1 til 10 aminosyrerester;  
FCS= en furinspaltesekvens av aminosyrerester, der sekvensn kan spaltes med furin og har en aminosyreende og en karboksylende, der FCS:

a) representeres av formelen P4-P3-P2-P1, der P4 er en aminosyrerest på aminoenden, P1 er en aminosyrerest på karboksylenden, P1 er en arginin- eller lysinrest og nevnte sekvens kan spaltes på karboksylenden av P1 med furin;

b) (i) videre omfatter aminosyrerester som representeres av P6-P5 ved nevnte aminoende,

(ii) videre omfatter aminosyrerester representert av P1'-P2' ved nevnte karboksylende, (iii) videre der P1 er en arginin- eller lysinrest, P2' er tryptofan og P4 kan være arginin, valin eller lysin, forutsatt at P4 ikke er arginin, da er P6 og P2 grunnleggende rester, og (iv) nevnte sekvens kan spaltes på karboksylenden til P1 ved hjelp av furin;

c) er valgt fra SEKV ID NR:12-20;

d) er SEKV ID NR:10, eller en avkortet versjon av dette, som består av RQPR (SEKV ID NR:21); eller

e) er SEKV ID NR:11, eller en avkortet versjon av dette, som omfatter RSKR (SEKV ID NR:26);

$R^2 = 1$  til 10 aminosyrer; og

$R^3 = 1$  eller flere etterfølgende rester av restene 365-394 til SEKV ID NR:1;

der det PE-funksjonelle domenet III er restene 395-613 av SEKV ID NR:1, eventuelt bestående av

(i) utskiftninger i en eller flere rester som tilsvarer 609-613 i SEKV ID NR:1, (ii) en utskifting av glysin, alanin, valin, leusin eller isoleusin for arginin ved en posisjon som tilsvarer posisjon 490 til

SEKV ID NR:1, (iii) en utskifting av alanin, glysin, serin eller glutamin for en eller flere rester som tilsvarer restene valgt fra D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590, og L597 til SEKV ID NR:1, der restene til SEKV ID NR:1

oppretholder immunogenisiteten til en epitop eller underepitop til PE-domene, eller (iv) en

kombinasjon av en av (i) - (iii), der mutert PE ikke omfatter restene 1 til 273 og 285 til 364 av SEKV ID NR:1.

**[0008]** I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et tenkt molekyl som omfatter

(a) et cytokin, antistoff eller antistoffragment, som cytokinet, antistoffet eller

antistoffragmentet spesifikt binder til et antigen eller reseptor på en celleoverflate, konjugert eller smeltet til

(b) et mutert PE, i samsvar med hvilken som helst av utgavene av første aspekt av oppfinnelse 5.

**[0009]** I enkelte utgaver kan FCS representeres av formelen P4-P3-P2-P1 (SEKV ID NR:36), der P4 benevner aminoenden, P1 benevner karboksylenden, P1 er en arginin-rest og sekvensen kan spaltes på karboksylenden til P1 med furin. I enkelte utgaver omfatter FCS videre aminosyrerester som representeres av P6-P5 på nevnte aminoende, (ii) videre omfatter aminosyrerester

representert av P1'-P2' på nevnte karboksylende, (iii) videre der P1 er en arginin- eller lysinrest, P2' er tryptofan og P4 kan være arginin, valin eller lysin, forutsatt at P4 ikke er arginin, da er P6 og P2 grunnleggende rester, og (iv) nevnte sekvens kan spaltes på karboksylenden til P1 ved hjelp av furin; I enkelte utgaver har FCS SEKV ID NR:10. I enkelte utgaver består det PE-funksjonelle domeneet III av sekvensen av restene 395 til 613 til SEKV ID NR:1. I enkelte utgaver omfatter mutert PE en eller flere sammenhengende rester av restene 365-394 til SEKV ID NR:1 mellom nevnte FCS og nevnte PE-domene III. I enkelte utgaver er "n" 0 for R1, R2 og R3. I enkelte utgaver er liganden et antistoff eller fragment av dette, som holder beholder evnen til å gjenkjenne antigener.

**[0010]** I et tredje aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et tenkt molekyl til bruk ved hemming av veksten til en målcelle som har en utside, der nevnte tenkte molekyl omfatter;

- (a) et cytokin, antistoff eller antistofffragment, som cytokinet, antistoffet eller antistofffragmentet spesifikt binder til et antigen eller reseptor på utsiden av nevnte celle, konjugert eller smeltet til
- (b) et mutert PE, i samsvar med hvilken som helst av utgavene av første aspekt av oppfinnelsen.

**[0011]** I enkelte utgaver kan FCS representeres av formelen P4-P3-P2-P1 (SEKV ID NR:36), der P4 benevner aminoenden, P1 benevner karboksylenden, P1 er en arginin-rest og sekvensen kan spaltes på karboksylenden til P1 med furin. I enkelte utgaver omfatter FCS videre aminosyrerester som representeres av P6-P5 på nevnte aminoende, (ii) videre omfatter aminosyrerester representert av P1'-P2' på nevnte karboksylende, (iii) videre der P1 er en arginin- eller lysinrest, P2' er tryptofan og P4 kan være arginin, valin eller lysin, forutsatt at P4 ikke er arginin, da er P6 og P2 grunnleggende rester, og (iv) nevnte sekvens kan spaltes på karboksylenden til P1 ved hjelp av furin; I enkelte utgaver har FCS SEKV ID NR:10. I enkelte utgaver består det PE-funksjonelle domenet III av sekvensen til restene 395 til 613 til SEKV ID NR:1, i enkelte utgaver omfatter mutert PE en eller flere sammenhengende rester av restene 365-394 til SEKV ID NR:1 mellom nevnte FCS og nevnte PE-domene III. I enkelte utgaver er liganden et antistoff eller fragment av dette, som holder beholder evnen til å gjenkjenne antigener.

**[0012]** I et fjerde aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en isolert nukleinsyre, der nevnte nukleinsyre koder en mutert PE, i samsvar med hvilken som helst utgave av oppfinnelsens første aspekt.

**[0013]** I enkelte utgaver kan FCS representeres av formelen P4-P3-P2-P1 (SEKV ID NR:36), der P4 benevner aminoenden, P1 benevner karboksylenden, P1 er en arginin-rest og sekvensen kan spaltes på karboksylenden til P1 med furin. I enkelte utgaver omfatter FCS videre aminosyrerester

som representeres av P6-P5 på nevnte aminoende, (ii) videre omfatter aminosyrerester representert av P1'-P2' på nevnte karboksylende, (iii) videre der P1 er en arginin- eller lysinrest, P2' er tryptofan og P4 kan være arginin, valin eller lysin, forutsatt at P4 ikke er arginin, da er P6 og P2 grunnleggende rester, og (iv) nevnte sekvens kan spaltes på karboksylenden til P1 ved hjelp av furin; I enkelte utgaver har FCS SEKV ID NR:10. I enkelte utgaver består PE-domenet III av sekvensen av restene 395 til 613 til SEKV ID NR:1. I enkelte utgaver koder nukleinsyren videre en ligande som spesifikt binder et antigen eller en reseptor til en celleoverfalte, der liganden er fusjonert direkte eller gjennom en peptidforbindelse til nevnte PE. I enkelte utgaver er liganden et antistoff eller del av dette, som holder beholder evnen til å binde antigener.

## KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

### [0014]

**Figur 1A og 1B.** Figur 1A er en skjematisk visning av oppbygningen til anti-CD22-immunotoksinet kjent som "HA22". HA22 omfatter en disulfidforbundet Fv (VH/VL) anti-CD22-antistoffragment rekombinant forbundet med en 38 kD cytotoksisk avkortning av *Pseudomonas*-eksotoksin A ("PE", 38 kD-avkortningen er på fagspråket kjent som "PE38"). PE38 dannes ved at man fjerner fra 613-aminosyren restsekvensen med naturlige PE-rester 1-252, som tilsvarer domenet I, sammen med restene 365-380 til domene Ib. Figur 1B viser sekvensen av PE38-domenene II (rester 251-364) og Ib (rester 365-394) (SEKV ID NR:4). Nummereringen av restene er basert på aminosyresekvensen i den naturlige PE. Restene 365 til 380 fra naturlig PE (vises i bok) ble fjernet i genereringen av PE38. Spaltestedene for lysosomal protease angis av piler ved siden av benevnningen av deres tilhørende bånd fra SDS-PAGE-analysen. Spaltestedene for lysosomal protease forekommer mellom restene 260-261, 265-266, 297-298, 341-342, 342-343, 351-352, 352-353, 353-354, 364-381, 390-391 og 391-392. Spaltestedet for furin (279-280) er også angitt. Den 11-resters furinsensitive sekvensen i domene II fra HA22-LR er skravert.

**Figur 2.** Figur 2 er en skjematisk oversikt over oppbygningen til HA22-mutant "JW008". JW008 er en form for HA22, med samme avkortninger av PE38 som HA22 LR, men der den naturlige sekvensen av den furinspaltbare sekvensen av restene 274-284 er forandret ved at to rester er skiftet ut (SEKV ID NR:11).

**Figur 3.** Figur 3 viser skjematiske tegninger av HA22 og en serie varianter, der utelatelsene ble introdusert i domenenene II og Ib i PE38-komponenten av HA22, for å eliminere spaltestedene for lysosomal protease. Disse fem mutantproteinene (M1, M2, M3, M4 og M5) illustreres med en utvidet visning av domenenene II og Ib for PB38, for å vise

utstrekningen av utelatelser (stiplede linjer) og tilstedeværelsene av en C287S-punktmutasjon i M3 og M4. Nummereringen av restene er basert på plasseringen av aminosyresene i den naturlige PE. Proteinene ble deretter rensert og sammenlignet med HA22 ved hjelp av en *in vitro* cytotoxissitetsanalyse av Raji-celler. M5-proteinet omtales heri også som "HA22-LR" (SEKV ID NR:10). IC<sub>50</sub> (ng/ml) for hver mutering, i forhold til IC<sub>50</sub> til HA22, presenteres som middelerdien av minst tre ulike eksperimenter.

**Figur 4.** HA22-LR er motstandsdyktig mot forråtnelse med lysomale ekstrakter. HA22 og HA22-LR ble inkubert med lysosomale ekstrakter av Raji-celler, under identiske forhold. Etter tilføring av lysosomalekstraktet ble prøvene umiddelbart fjernet (0), etter 30 min og etter 1, 2, 4, 8 og 24 t, før de ble analysert med redusering av SDS-PAGE. Pilene angir V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>-PE38 (HA22) og V<sub>H</sub>-PE25 (HA22-LR) båndene som utgjør de utviklede immunotoksinene.

**Figur 5. Farmakokenetikk for HA22-LR.** Balb/C-mus fikk intravenøs injisering med 10 µg enten HA22 (□) eller HA22-LR (○) og fikk tappet blod i flere omganger mellom 2 og 60 minutter etter injiseringen. Konsentrasjonen av immunotoksin i serumet ved de ulike intervallene ble avgjort av ELISA og innført i en enkelt eksponensiell forråtnelsesfunksjon. Den tilhørende halveringstiden (t<sub>1/2</sub>) er angitt. Hvert punkt er konsentrasjonen av immunotoksin i serumet fra én mus, og konsentrasjonen ved hver tidsintervall ble funnet med data fra minst to ulike mus.

**Figur 6. HA22-LR har potent antitumoraktivitet.** SCID-mus med CA46 xenograft-tumorer ble behandlet med QOD X 3 (dage 6, 8 og 10), intravenøst med PBS (x; linje), 0,3 mg/kg HA22 (○; linje), eller HA22-LR ved 1,0 (▲; stiplet linje), 1,75 (□; linje), eller 2,5 (\*; stiplet linje) mg/kg. Pilene angir dagene da behandlingen ble administrert. Tumorstørrelsen ble målt over 40 dager. Punktene representerer gjennomsnittlig tumorstørrelse for samtlige mus i behandlingsgruppen. Feillinjene viser 95 % konfidens-intervall for hver middelerdi.

## DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

### INNLEDNING

[0015] I de siste tyve årene har *Pseudomonas*-eksotoksin A ("PE") blitt omhyggelig studert for bruk som den toksiske delen av målrettede toksiner som f.eks. immunotoksiner. Den vanligste formen for PE som brukes i målrettede toksiner har vært en 38 kD-form kjent som PE38, der hele domene I til toksinet er fjernet, sammen med restene 365-379 av domene Ib. PE38 beholder hele domene II og III av toksinet. Domene II av PE har en seksens som er gjenkjent og spaltet av et

enzym kjent som furin, som finnes i dyreceller. PE-er som inneholder furinspalteseksensen gjennomgår proteolytisk behandling inne i målcellene, som aktiverer toksinets cytotoxiske aktivitet. Noen former for PE som har blitt utviklet tidligere forsøkte å øke aktiviteten ved å eliminere den delen av domene II oppstrøms for furinspaltestedet, for å se om dette kunne fjerne  
5 behoeet for proteolytisk behandling inne i målcellene.

**[0016]** Overraskende nok har vi nå oppdaget at former for PE kan lages ved at man reverserer noen av strategiene som før ble brukt til å utvikle PE-er for bruk i målrettede toksiner og at disse nye PE-formene har fordeler som tidligere PE-er ikke hadde. Det er også overraskende at disse  
10 nye PE-formene beholder en utmerket cytotoxiske aktivitet som er langt mer ikke-spesifikt toksiske for *in vivo*-bruk. Denne minskningen i toksisitet gjør det mulig å bruke langt større doser, med konkomitant økning i antitumor-aktivitet.

**[0017]** I de nye PE-formene har vi slettet de gjenværende restene i domene Ib (annet enn de som  
15 er nødvendig for god ADP-ribosyleringsaktivitet) som man mente var nyttige for å tilrettelegge for effektiv transport av toksinet i målcellen etter proteolytisk aktivering. I tillegg har vi slettet hele domene II, unntatt furinspaltesekvensen.

**[0018]** Fjerningen av mesteparten av domene II og hele domene Ib gir PE-molekylene flere  
20 fordeler over andre former for PE som tidligere har vært tilgjengelige. Først og fremst inneholder både domene Ib og II ipitoper som sørger for større total immunogenisitet for PE. Ved å fjerne hele domene II, bortsett fra furinspaltestedet og delen av domene Ib som før var inkludert selv i avkortede PE-er, fjernes både lineære og konforme epitoper som finnes i domenene, slik at immunogenisiteten til den resulterende PE-en blir mindre, sammenlignet med toksinformene som  
25 tidligere har vært tilgjengelige.

**[0019]** For det andre er toksinets totale størrelse redusert. Eksempelformene som ble studert i  
herværende verk hadde en molekylvekt på 25 kD og utgjorde derfor en reduksjon på omtrent 13  
kD fra størrelsen til den vanligste formen for PE som brukes idag, PE38. Mindre molekyler kan  
30 trenge dyper inn i faste tumorer, og det har derfor generelt vært ansett som ønskelig å utvikle mindre utgaver av toksinet, til bruk mot faste tumorer. Den mindre størrelsen til PE-ene i oppfinnelsen, sammenlignet med de som tidligere har vært tilgjengelige, tyder på at de vil vise seg nyttige, både til behandling av faste tumorer, der toksinets mindre størrelse tilrettelegger for gjennomtrenging av tumoren, og til behandling av hematologiske maligniteter, der toksinets  
35 størrelse er mindre viktig. Videre brukes PE-er som toksiske halvdeler av toksiner som rettes mot målceller annet enn tumorceller. Oppfinnelsens mindre toksiner bør være nyttig også i forhold til disse målcellene.



**[0020]** For det tredje, overraskende nok, viste *in vivo*-prøver at immunotoksiner som ble fremstilt med de resulterende toksinene beholdt god cytotoxiskitet mot de fleste målceller, samtidig som de hadde betydelig mindre ikke-spesifikk toksisitet i en dyremodell enn hva som var tilfelle for sammenlignbare immunotoksiner fremstilt med PE38. Faktisk var det slik at mens mus som hadde xenografttumorer av en human hematologisk malignitet viste komplett respons når de ble injisert med immunotoksinet flere ganger med 2,5 mg/kg, døde ingen mus når de ble injisert med immunotoksinet flere ganger ved 5,0 mg/kg (tilsvarende 100 mg per dose). Til sammenligning er LD50 for HA22 i must omtrent 1,3 mg/kg. Disse resultatene viser ikke bare at mus kan tolerere doser av de nye immunotoksinene mer enn 3 ganger bedre enn et tilsvarende immunotoksin fremstilt med PE38, men de kan også tåle doser på minst to ganger det som er nødvendig for å fremkalle en komplett respons.

**[0021]** For det fjerde fjernet enkelte tidligere former for PE, der en del av domene II ble slettet, furinspaltestedet. Dette fjernet behovet for intracellulær spaltning med furin men gjorde det også vanskeligere å konstruere et fungerende molekyl. Vanligvis var antistoffet festet til PE-domene III, og det forble som regel forbundet med PE-halvdelen i cellen. I tenkte molekyler som bruker PE-ene til herværende oppfinnelse kan antistoffet eller en annen målrettet halvdel festes oppstrøms for furinspaltestedet og spaltes vekk fra PE-domene III så snart det er inne i cellen.

**[0022]** Både *in vitro*- og *in vivo*-studier ble utført på et eksemplar av PE fra oppfinnelsen, for å sammenligne effekten når den ble omgjort til et immunotoksin med tilsvarende immunotoksiner fremstilt med PE38. Eksempelet på immunotoksin som brukes til sammenligning er et immunotoksin kalt HA22, som bruker et anti-CD22-antistoff smeltet til PE38. Det ble foretatt sammenligninger mellom et immunotoksin der antistoffet som ble brukt i HA22 ble smeltet til ett av de nye PE-ene som toksinet (for enkelhets skyld omtales dette heri som "HA22-LR", der "LR" henviser til motstandsdyktighetene til den modifiserte PE-komponenten overfor lysosomal nedbrytning) til HA22 (der det samme antistoffet er smeltet til PE38). I *in vitro*-studier hadde immunotoksinet som ble danneet med den nye PE-en omtrent samme cytotoxiskitet som HA22 mot celler fra ulike cellelinjer som utpresser CD22. I *in vivo*-studier i en dyremodell ble det anslått at immunotoksinet HA22-LR var mindre cytotoxisk enn HA22, immunotoksinet fremstilt med PE38. Det nye immunotoksinet hadde imidlertid også betydelig redusert ikke-spesifikk toksisitet og kunne tåles av mus ved langt høyere doser enn HA22, slik at antitumor-effekten til behandlingen ble bedre og man kunne ha et større terapeutisk vindu mellom maksimal tålbart dose og det som kreves for å fremkalle en komplett respons.

**[0023]** Et stort antall immunotoksiner har blitt fremstilt med ulike antistoffer og andre ligander som målrettet halvdel, men med PE som toksin-halvdel. Det har vært kjent at den målrettede halvdel i enkelte tilfeller kan bidra til et immunotoksins ikke-spesifikke toksisitet. Se f.eks. felles PCT-søknad

nr. PCT/US01/43602, publisert som International Publication No. WO 02/40545, som melder at ikke-spesifikk toksisitet for enkelte immunotoksiner kunne reduseres ved at man reduserte det isoelektriske punktet til rammeverksområder for Fv-er som ble brukt som målrettet halvdel. Det har imidlertid også blitt klart at immunotoksiner og andre tenkte molekyler som bruker PE som

5 toksinhalvdel, er den viktigste faktoren for ikke-spesifikk toksisitet PE-komponenten. Derfor forventes det at redusert ikke-spesifikk toksisitet tilsvarende den som ble observert for HA22-LR-immunotoksinet i undersøkelsene som omtales heri også forekommer når oppfinnelsens PE-er brukes som toksinhalvdel for tenkte molekyler som bruker, som målrettet halvdel, andre antistoffer enn de som brukes i HA22 som målrettet halvdel, eller andre ligander som målrettet halvdel.

10

**[0024]** Det ble gjennomført undersøkelser om cytotoxissiteten til et immunotoksin fremstilt med et annet antistoff, SS1, som gjenkjenner og binder mesotelin, et antigen som finnes på mange typer kreftceller. SS1-antistoffet omtales i f.eks. amerikansk patent nr. 7,081,518, og et immunotoksin som inneholder SS1 smeltet til PE38 (immunotoksinet omtales som "SS1P") har blitt testet i et

15 klinisk forsøk i fase 1. Et immunotoksin ble dannet med SS1-antistoffet som målrettet halvdel og formen av PE som brukes i HA22-LR ("PE-LR") som toksisk halvdel, og de to immunotoksinene SN1P og SS 1-PE-LR ble testet for cytotoxissitet mot et antall cellelinjer som utpresset mesotelin. De to immunotoksinene hadde sammenlignbar aktivitet mot flere cellelinjer. SS1-PE-LR-immunotoksinet hadde betydelig lavere aktivitet mot enkelte cellelinjer, sammenlignet med SS1P.

20 Det indikerer at, som for de fleste behandlingsmidler, ikke alle pasienters kreft eller andre aktuelle celler vil være mottakelige or behandling med et immunotoksin som bruker PE-LR som toksinhalvdel. Enten celleveksten til en bestemt kreftform eller andre aktuelle målceller kan hemmes, kan man enkelt finne ut med vanlige fremgangsmåter, for eksempel ved å ta biopsi av cellene, sette cellene i kontakt med det PE-LR-holdige immunotoksinet og sjekke om

25 immunotoksinet hemmer vekst i kreftcellene eller andre målceller, i ønsket grad.

**[0025]** Videre finnes det flere kjente måter å øke PE-ens cytotoxissitet på, ved å endre restene i domene III fra den naturlige sekvensen. Undersøkelser fra laboratoriet til herværende oppfinnere fra over et tiår tilbake fant at enkelte aminosyresekvenser og gjentakelser av disse sekvensene

30 kunne brukes istedenfor den naturlige sekvensen for rester 609-613 i PE, for å øke cytotoxissiteten til den resulterende PE-en, sammenlignet med PE dannet med den naturlige sekvensen (den naturlige sekvensen for restene 609-613 og spesifikke mutasjoner som øker cytotoxissiteten omtales mer detaljert nedenfor, i avsnittet kalt "*Pseudomonas*-eksotoksin A"). Mer nylig har arbeid fra laboratoriet til herværende oppfinnere indikert at en erstatning av glysin, alanin, valin og andre

35 rester for argininet som finnes på posisjon 490 i den naturlige PE-sekvensen kan øke cytotoxissiteten. Å erstatte argining med alanin er spesielt fordelaktig. Se f.eks. publisert amerikansk patentapplikasjon 2007/0189962; Bang m. fl., Clin Cancer Res, 11:1545-1550 (2005). Mens PE-er for oppfinnelsen som bruker den naturlige domene III-sekvensen forventes å være

nyttige i seg selv, kan cytotoksisiteten til PE om ønsket økes ved hjelp av en eller flere av disse erstatningene eller mutasjonene. Enhver erstatning eller mutasjon kan testes for å finne ut om den beholder tilstrekkelig cytotoksisitet for in vitro-bruk og om den har tilstrekkelig lav ikke-spesifikk toksisitet for in vivo-bruk ved hjelp av analyser som er kjent for fagparsoner, inkludert de som fremføres i eksemplene.

**[0026]** Videre har tidligere arbeid fra laboratoriet til herværende oppfinnere kartlagt tilstedeværelsen av epitoper eller underepitoper i domene III. Binding av antistoffer som gjenkjenner disse epitopene kan reduseres eller fjernes ved utskifting av restene som vanligvis er tilsted ved forskjellige plasseringer. Som fremsatt i den amerikanske patentapplikasjonen kan binding av disse antistoffene reduseres ved utskifting av en alanin, glycin, serin eller glutamin mot en aminosyrerest som tilsvarer en aminosyrerest i SEKV ID NR:1, valgt fra gruppen som består av D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590, og L597. Siden tilstedeværelsene av disse restene før de skiftes ut forblir en epitop eller underepitop i domene III, for enkel referanse, kan restene på disse posisjonene omtales som at de "oppretholder" immunogenisiteten til de respektive epitopene eller underepitopene, mens det å erstatte dem med alanin eller lignende reduserer immunogenisiteten til PE-domene III som oppstår fra den naturlige epitopen eller underepitopen. Mens PE-ene i oppfinnelsen som bruker den naturlige domene III-sekvensen forventes å være nyttige i seg selv, kan om ønskelig erstatninger for en eller flere av restene som er identifisert ovenfor gjøres, for å videre redusere immunogenisiteten til PE-ene i oppfinnelsen. Enhver erstatning eller mutasjon kan testes for å finne ut om den beholder tilstrekkelig cytotoksisitet for in vitro eller in vivo-bruk ved hjelp av analyser som er kjent for fagparsoner, inkludert de som fremføres i eksemplene.

**[0027]** I foretrukne utgaver vil ikke det målrettede middelet i de tenkte molekylerne, for eksempel immunotoksiner, der oppfinnelsens PE brukes, påvirke vekstfaktoren  $\alpha$  ("TGF $\alpha$ ").

## FURIN OG FURINSPALTBARE SEKVENSER

**[0028]** Som rapportert av Duckert m. fl. Protein Engineering, Design & Selection 17(1):107-112 (2004) (heretter, "Duckert m. fl."), er furin et enzym i en "familie av evolusjonært bevarte dibasisk- og monobasisk-spesifikke CA<sup>2+</sup>-avhengige serinprotaser som kalles subtilisin/kexin-aktige proprotein-konvertaser." *Id.*, på s. 107. Furin, også kjent som et "paret basisk aminosyrespaltende enzym", eller "PACE", er ett av syv patteyr i familien og spiller en rolle i behandlingen av flere endogene menneskeproteiner. Se generelt f.eks., Thomas G. Nat Rev Mol Cell Biol, (10):753-66 (2002). Dette er et membran-tilknyttet protein som finnes hovedsaklig i trans-Golgi-nettverket. Menneskefurinsekvensen har vært kjent siden tidlig på 90-tallet. Se f.eks., Hatsuzawa, K. m. fl., J. Biol Chem., 267:16094-16099 (1992); Molloy, S. m. fl., J. Biol. Chem., 267:16396-16402 (1992).

**[0029]** Det minimale spaltestedet for furin er, med enkeltbokstavkoden for aminosyrerester, R-X-X-R (SEKV ID NR:6), der spaltingen forekommer etter den andre "R"-en. Duckert m. fl. oppsummerer informasjonen som er tilgjengelig om sekvensene på 38 proteiner i litteraturen som har furinspaltesteder, inkludert pattedyrproteiner, proteiner i patogene bakterier og virusproteiner. Der rapporteres det at 31, eller 81 %, av spaltemotivene som ble undersøkt hadde konsensussekvensen R-X-[R/K]-R (SEKV ID NR:7), der 11, eller 29 % hadde R-X-R-R (SEKV ID NR:8), og 20, eller 52 %, hadde R-X-K-R (SEKV ID NR:9). Tre av spaltemotivene inneholdt kun den minimale spaltesekvensen. Duckert m. fl. justerte motivene og identifiserte restene som fantes ved hver posisjon i hvert furin, både for selve spaltemotivet og de omliggende restene. Fig. 1A fra Duckert m. fl. viser, i relativ størrelse, de vanligste restene ved hver posisjon. Etter vedtatte former er restene som omringer furinspaltestedet nummerert fra spaltepunktet (som vanligvis angis med symbolet "↓"). I retning N-terminus benevnes substratrestene som P1, P2 og så videre, mens mot C-terminus benevnes restene P1', P2' og så videre. Se f.eks. Rockwell, N. C. og J. W. Thorner, Trends Biochem. Sci., 29:80-87 (2004), Thomas G., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3:753-766 (2002). Dermed, i henhold til avtalte former, kan følgende sekvens brukes til å innrette og nummerere restene til den minimale spaltesekvensen og omliggende rester:

P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5',

der den minimale furinspaltesekvensen har nummeret P4-P1. Duckert m. fl. sin innretting av 38 sekvenser spaltet av furin identifiserer variasjonene som er tillatt, avhengig av hvilke rester som finnes på de ulike posisjonene. For eksempel, hvis resten ved P4 ikke er en R, kan dette kompenseres for ved å ha arginin- eller lysinrester på P2 og P6. *Id.*, på s. 109.

**[0030]** I naturlig PE forekommer furinspalting mellom arginin 279 og glysin 280 i en arginin-rik sløyfe plassert i domene II på toksinet. Den naturlige furinspaltesekvensen i domene II på PE vises nedfor (tallene indikerer posisjonene til restene i den 614-aminosyres naturlige PE-sekvensen) og er innrettet slik at nummereringen er i henhold til de avtalte formene omtalt ovenfor.

274- R H R Q P R G W E Q L -284 (SEKV ID NR:10)

P6-P5-P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'-P5'

**[0031]** I undersøkelser som ligger til grunn for herværende oppfinnelse ble det skiftet ut ved posisjon P3 og P2, for å danne følgende sekvens, der utskiftingene er understreket:

274- R H R S K R G W E Q L -284 (SEKV ID NR:11).

**[0032]** Denne sekvensen viste en spaltrate som var raskere enn for den naturlige sekvensen, og da den ble brukt på et eksempel-immunotoksin (omtalt som "JW008" for enkelhets skyld) førte den til en cytotoxissitet til målcellene som var omtrent tilsvarende den naturlige sekvensen.

5 **[0033]** Basert på dette og våre tidligere undersøkelser kan furinspaltesekvensen som ble brukt til å feste de målrettede molekylene til PE-domene III være den minimale furinspaltesekvensen, R-X-X-R (SEKV ID NR:6), eller hvilken som helst av de andre furinspaltesekvensene som er kjent på fagområdet eller som tillates etter fig. 1A til Duckert m. fl., forutsatt at det finnes en rest på posisjonen identifisert som P2', den bør være tryptofan, hvis ikke tryptofan, bør den være valin  
10 eller alanin. For eksempel kan sekvensen i noen utgaver være RKKR (SEKV ID NR:12), RRRR (SEKV ID NR:13), RKAR (SEKV ID NR:14), SRVARS (SEKV ID NR:15), TSSRKRRFW (SEKV ID NR:16), or ASRRKARSW (SEKV ID NR:17).

**[0034]** Som bemerket av Duckert m.fl. kan en mindre fordelaktig rest enn R (hovedsaklig valin)  
15 brukes i posisjon P4, hvis det kompenseres med arginin- eller lysinrester på posisjon P2 og P6, slikat minst to av de tre restene på P2, P4 og P6 er basiske. Dermed kan den furinspaltbare sekvensen i enkelte utgaver være RRVKKRFW (SEKV ID NR:18), RNVVRRDW (SEKV ID NR:19), eller TRAVRRRSW (SEKV ID NR:20). Resten ved posisjon P1 kan være argininet som finnes i den naturlige sekvensen, eller lysin. Altså kan et lysin erstatte argininet ved posisjon P1, for eksempel i  
20 en av sekvensene som vises ovenfor.

**[0035]** I enkelte utgaver vil sekvensen til den furinspaltbare sekvensen følge sekvensen til den furinspaltbare sekvensen til PE: R-H-R-Q-P-R-G-W-E-Q-L (SEKV ID NR:10) eller en avkortet versjon av den naturlige sekvensen, så lenge den inneholder den minimale furinspaltesekvensen  
25 og kan spaltes av furin. Altså kan den furinspaltbare sekvensen i enkelte utgaver være R-Q-P-R (SEKV ID NR:21), R-H-R-Q-P-R-G-W (SEKV ID NR:22), R-H-R-Q-P-R-G-W-E (SEKV ID NR:23), H-R-Q-P-R-G-W-E-Q (SEKV ID NR:24), eller R-Q-P-R-G-WE (SEKV ID NR:25). I enkelte utgaver er sekvensen R-H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEKV ID NR:11), eller en avkortet versjon av den naturlige sekvensen, så lenge den inneholder den minimale furinspaltesekvensen og kan spaltes  
30 av furin. Altså kan den furinspaltbare sekvensen i enkelte utgaver være R-S-K-R (SEKV ID NR:26), R-H-R-S-K-R-G-W (SEKV ID NR:27), H-R-S-K-R-G-W-E (SEKV ID NR:28), R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEKV ID NR:29), H-R-S-K-R-G-W-E-Q-L (SEKV ID NR:30), eller R-H-R-S-K-R (SEKV ID NR:31). En bestemt furinspaltbar sekvens kan enkelt testes ved at den gjøres om til et immunotoksin med antistoffet som ble brukt i HA22, hvorpå man tester det resulterende immunotoksinet *in vitro* på en  
35 CD22+ cellelinje. I foretrukne utgaver vil ikke de tilgjengelige furinspaltesekvensene redusere cytotoxissiteten til det resulterende immunotoksinet under 10 % av cytotoxissiteten til HA22 når HA22 testes på samme cellelinje, og enda mer foretrukket vil den ikke redusere cytotoxissiteten til det resulterende immunotoksinet under 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, eller 100 %.

80 %, 90 % eller mer av cytotoxisiteten til HA22 når HA22 testes på samme cellelinje, der hver økte prosentdel cytotoxisitet foretrekkes fremfor den som kommer før.

**[0036]** Enten en bestemt sekvens kan spaltes av furing eller ikke, kan man finne ut ved hjelp av kjente metoder. For eksempel kan man teste hvorvidt en sekvens kan spaltes av furin ved å inkubere sekvensen med furin i en furinbuffer (0,2 M NaOAc (pH 5,5), 5 mM CaCl<sub>2</sub>) med et 1:10 enzymsubstrat molarforhold ved 25°C, i 16 timer. Disse forholdene har tidligere blitt erklært optimale for furinspalting av PE. Helst skal furinet som brukes være menneskefurin. Rekombinant avkortet menneskefurin er kommersielt tilgjengelig, for eksempel fra New England Biolabs (Beverly, MA). se også Bravo m. fl., J Biol Chem, 269(14):25830-25837 (1994).

**[0037]** For tydelighets skyld anmerkes det at PE-er som brukes idag, f.eks. PE38 og PE40, inneholder den naturlige furinspaltesekvensen og at furinspaltesekvensen er koblet til PE-domene III. Til forskjell fra oppfinnelsens PE-er er imidlertid furinspaltesekvensen til PE38 og PPE40 ikke koblet direkte til domene III på disse PE-ene, men heller koblet til domene III gjennom (a) 79 rester av domene II på karboksylsiden av furinspaltestedet (rester 285 til 364 av domene II, for enkelhets skyld omtales disse restene som "karboksylrestene til domene II"), samt (b) enten restene 365-394 på SEKV ID NR:1, i tilfellet PE40, eller restene 381-394 på SEKV ID R:1, i tilfellet PE38. Som videre beskrevet heri, mens den strukturelle grensen til domene III for PE anses å være der rest 405 begynner, har funksjonelle analser vist at domene III krever et segment av domene Ib for å opprettholde den ADP-ribosylatende aktiviteten. Derfor er det funksjonelle domenet III definert som restene 395-613 på PE, og det foretrekkes derfor at toksinene i oppfinnelsen inneholder restene 395-613 til PE, med enkelte tillatte varianter videre beskrevet nedenfor. For enkelhets skyld vil henvisninger heri til slettinger av domene Ib eller til den alternative inkluderingen av enkelte sammenhengende rester av domene Ib henvise til den delen av domene Ib som omfatter restene 365-394, selv om domene Ib strukturelt omfatter restene 365-399.

**[0038]** Sletting av restene 365-394 og restene som utgjør domene II, annet enn de som finnes i furinspaltesekvensen, er ønskelig, da slettingene fjerner eventuelle immunogene epitoper som finnes i disse delene av PE-molekylet. I enkelte utgaver vil praktikerer imidlertid ønske å beholde noen av eller alle restene 381-394, som vanligvis finnes i PE38, eller beholde 1-10 rester av amino- eller karboksylenden, eller begge, i furinspaltesekvensen, med 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 og 1 rester mellom suksessivt mer foretrukket. Vanligvis er restene på hver side av furinspaltesekvensen restene som vanligvis finnes i PE-ens tilhørende posisjon (SEKV ID NR:1). For eksempel, som nevnt ovenfor, er furinspaltesekvensen for PE ansett for å slutte ved rest 284. Hvis praktikerer bestemmer seg for å forlenge sekvensen til karboksylsiden med tre rester, vil restene som velges vanligvis være de som finnes ved posisjon 285-287 på SEKV ID NR:1. Derfor, selv om uttrykket "furinspaltesekvens" i foretrukne utgaver henviser til en restsekvens med 4 til 11

saminosyrer som kan spaltes med furin (som i den naturlige furinspaltesekvensen for PE, vist ovenfor som SEKV ID NR:10), vil den i enkelte utgaver henvise til en slik sekvens, som videre omfatter 1-10 aminosyrerester, plassert på amino- eller karboksylenden, eller begge.

- 5 **[0039]** Som tidligere nevnt, i PE-er som nå brukes som toksiske halvdel, f.eks. PE38 og PE40, er furinspaltesekvensen festet til domene III gjennom karboksylsekvensen (rester 285-364) på domene II og gjennom enten restene 365-394 (i PE40) eller gjennom restene 381-394 (i PE38). I motsetning, i oppfinnelsens PE-er er en furinspaltesekvens (som f.eks. SEKV ID NR:10, eller
- 10 innkoplet mellom de to noen av eller alle karboksylrestene i domene II, og helst uten å ha mellom de to noen av eller alle restene 365-394.

**[0040]** Oppfinnelsens PE-er kan representeres av formelen som er definert i oppfinnelsens første aspekt.

15

- [0041]** I enkelte utgaver vil minst én av  $R^1$ ,  $R^2$  og  $R^3$ ,  $n$  ikke være lik 0. Som nevnt, i enkelte foretrukne utgaver vil alle restene 365-394 slettes, derfor, i disse utgavene, i termen  $R^3_n$ ,  $n=0$ . På samme måte, i enkelte utgaver finnes det ingen rester på aminosiden til FCS; i disse utgavene, i termen  $R^1_n$ ,  $n=0$ . På samme måte, i enkelte utgaver finnes det ingen rester på karboksylsiden til
- 20 FCS; mellom FCS- og PE-domenene Ib eller III, i disse utgavene, i termen  $R^2_n$ ,  $n=0$ . I spesielt foretrukne utgaver er  $n$  i  $R^1_n$ , og  $R^3_n$ , lik null.

## DEFINISJONER

- 25 **[0042]** Enheter, forstavelser og symboler brukes i sin aksepterte form i henhold til Système International de Unites (SI). Nummerverdier inkluderer numrene som definerer verdigrensene. Med mindre annet er angitt skrives nukleinsyrer fra venstre mot høyre, i 5' til 3' retning, aminosyresekvenser skrives fra venstre mot høyre i retning amino-til-karboksy.

- 30 **[0043]** *Pseudomonas*-eksotoksin A ("PE") er et ekstremt aktivt monomerisk protein (molekylvekt 66 kD), som utskilles av *Pseudomonas aeruginosa*, som hemmer proteinsyntese i eukaryotiske celler. Den naturlige PE-sekvensen (SEKV ID NR:1) er svært kjent på fagområdet og fremsettes f.eks. i SEKV ID NR:1 i amerikansk patent nr. 5,602,095. Handlingsmåten og oppbygningen til PE, samt modifikasjonene som fører til et antall varianter av PE, omtales noe detaljert i avsnittet avsatt
- 35 til dette.

**[0044]** Mutasjoner av PE omtales som regel med henvisning til aminosyreresten som finnes på en bestemt posisjon i 613-aminsyresekvensen til naturlig PE (SEKV ID NR:1). Denne konvensjonen

følges i denne patentsøknaden. Hvis aminosyreresten som finnes på en bestemt posisjon er erstattet av en annen rest, i motsetning til å for eksempel ha blitt slettet som del av en avkorting av den naturlige sekvensen, angis dette ved at resten som finnes i den naturlige PE-sekvensen fremsettes, med posisjonsnummer, etterfulgt av aminosyreresten som den naturlige resten er

5 erstattet av i den aktuelle mutasjonen. Dermed indikerer f.eks. uttrykket "R490A" at "R" (arginin, i vanlig enkeltbokstavkode) ved posisjon 490 på den naturlige PE-sekvensen (SEKV ID NR:1) er skiftet ut med en "A" (alanin, i vanlig enkeltbokstavkode) i den muterte PE-en som omtales. På samme måte indikerer "K590Q" at lysinet som vanligvis finnes på posisjon 590 til PE er erstattet med en glutamin. Den vanlige enkeltbokstavkoden for vanlige aminosyrer vises nedenfor.

10

**[0045]** Uttrykket "PE-funksjonelt domene III" henviser til restene 395-613 til den naturlige PE-en (den naturlige sekvensen er SEKV ID NR:1). Selv om de strukturelle grensene til domene III er satt til rester 405-613, har funksjonsanalyser vist at domene III krever et segment for domene Ib for å opprettholde ADP-ribosylationaktiviteten (Hwang, J. m. fl., Cell, 48:129-136 (1987); Siegall, C.B. m.

15 fl., J Biol Chem, 264:14256-14261 (1989)). Det PE-funksjonelle domenet er dermed definert av restene 395-613 of PE (Kihara, A. og Pastan, I., Bioconjug Chem, 5:532-538 (1994)).

20

**[0046]** Flere agenter, som f.eks. cytokiner, veet man at binder seg til spesifikke reseptorer på celleoverflater. Disse kan brukes på målrettede toksiner for celler som bærer slike reseptorer. For eksempel har 1L-13 blitt brukt som virkemiddel som retter seg mot toksiner, inkludert former av PE til celler som overutpresser 1L-13-reseptoren. Antistoffer binder spesifikke antigener og er en annen type virkestoff som retter toksinene mot de ønskede målcellene.

25

**[0047]** Uttrykket "ligand" brukes heri for å generisk omtale molekyler som binder seg spesifikt til en reseptor eller et antigen på en celleoverflate. I foretrukne utgaver omfatter uttrykket både cytotoxiner eller antistoffer, eller fragmenter av disse, som beholder antigenets evne til å gjenkjenne og binde. I den mest foretrukne utgaven omfatter uttrykket antistoffer eller fragmenter av disse som opprettholder antigenets evne til å gjenkjenne og binde.

30

**[0048]** Uttrykket "målrettet toksin" henviser til et toksin som er målrettet mot ønskede celler ved hjelp av en ligand som binder seg til spesifikke reseptorer eller angigener som finnes på overflaten av slike celler. Uttrykket immunotoksiner henviser til en undergruppe målrettede toksiner der toksiner er målrettet mot de ønskede cellene med et antistoff eller fragment av dette.

35

**[0049]** Omformende vekstfaktor  $\alpha$ , eller "TGF $\alpha$ " er en velkjent vekstfaktor som i utviklet form et protein med 5,5 kD og 50 aminosyrer. Se f.eks., Brown, "The epidermal growth factor/transforming growth factor- $\alpha$  family and their receptors". Eur J Gastroenterol Hepatol 7:914-922 (1995); Soler C., og Carpenter G., Thomson A.W., red. "The epidermal growth factor (EGF) family". The



Cytokine Handbook, 3. utg., San Diego, CA, (side 194-197 (1998)). Rekominant humant TGF  $\alpha$  er kommersielt tilgjengelig fra, for eksempel, Stigma-Aldrich (katalognr. T7924, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO).

5 **[0050]** For enkelhets skyld betyr uttrykket "antistoff" her hele (som også kan omtales som "intakte") antistoffer, antistofffragmenter som beholder antigenets gjenjennelses- og bindeevne, enten de er produsert ved modifisering av hele antistoffer eller syntetisert *de novo* med rekombinant DNA-teknologi, monoklonale antistoffer, polyklonale antistoffer og antistoffetterligninger, med mindre annet er nødvendig utfra konteksten. Antistoffet kan være et  
10 IgM, IgG (f.eks. IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> or IgG<sub>4</sub>), IgD, IgA eller IgE.

**[0051]** Uttrykket "antistofffragmenter" betyr molekyler som utgjør en del av et intakt antistoff, generelt det antigenbindende eller variable området av det intakte antistoffet. Eksempler på antistoffregmenter inkluderer Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>-, og Fv-fragmenter, heliksstabiliserte antistoffer  
15 (se f.eks. Arndt m. fl., J Mol Biol, 312:221-228 (2001); diastoffer (se nedenfor); enkeltkjedede antistoffmolekyler ("scFvs," se f.eks. , amerikansk patent nr. 5,888,773); disulfidstabiliserte antistoffer ("dsFvs", se f.eks. amerikansk patent nr. 5,747,654 og 6,558,672), og domeneantistoffer ("dAbs," se f.eks. Holt m. fl., Trends Biotech, 21(11):484-490 (2003), Ghahroudi m. fl. FEBS Lett., 414:521-526 (1997), Lauwereys m. fl., EMBO J, 17:3512-3520 (1998), Reiter m. fl., J. Mol. Biol.,  
20 290:685-698 (1999) og Davies og Riechmann, Biotechnology, 13:475-479 (2001)).

**[0052]** Uttrykket "diastoffer" henviser til små antistofffragmenter med to antigenbindende områder, der fragemntene omfatter et variabelt tungt domene ("V<sub>H</sub>" eller "VH") som er knyttet til et variabelt lett domene ("V<sub>L</sub>" eller "VL") i samme polypeptidkjede (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Ved å bruke et forbindelsesledd som  
25 er for kort til å muliggjøre paring av de to domenene på samme kjede, tvinges kjedene til å pare seg med de komplementære domenene på en annen kjede, slik at det dannes to antigen-bindende steder. Diastoffene og produksjonen av disse beskrives mer detaljert i for eksempel EP 404,097: WO 93/11161; og Hollinger m. fl.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

30 **[0053]** Henvisninger til "V<sub>H</sub>" eller en "VH" henviser til det variable området på en immunoglobintung kjede, inkludert en Fv, scFv, dsFv eller Fab. Henvisninger til "V<sub>L</sub>" eller en "VL" henviser til det variable området på en immunoglobintung kjede, inkludert en Fv, scF, dsFv eller Fab

**[0054]** Uttrykket "enkeltkjedet Fv" eller "scFv" henviser til et antistoff der de variable domenene til  
35 den tunge kjeden og den lette kjeden på et tradisjonelt tokjedetantistoff refers to an antibody in which the variable domains of the heavy chain and of the light chain of a traditional two chain antibody have been joined to form one chain. Oftest settes en linkerpeptid mellom de to kjedene, for å sørge for riktig bretteing og oppretteing av et aktivt bindingssted.

**[0055]** Uttrykket "linkerpeptid" inkluderer henvisning til en peptid med et antistoffbindende fragment (f.eks. Fv-fragment) som indirekte binder det variable domenet på den tunge kjeden til det variable domenet på den lette kjeden.

- 5 **[0056]** Uttrykket "parentalt antistoff" betyr alle aktuelle antistoffer som skal muteres eller varieres for å oppnå antistoffer eller fragmenter av disse som binder seg til samme epitop som det parentale antistoffet, men med kraftigere tiltrekning.

- 10 **[0057]** Uttrykket "hotspot" betyr en del av en nukleotidsekvens på en CDR eller et rammeverkområde på et variabelt domene, som er et område med spesielt stor naturlig variasjon. Selv om CDR-ene selv anses som områder for hypervariabilitet, vet man at mutasjoner ikke er jevnt fordelt over CDR-ene. Bestemte steder, eller hotspots, har blitt identifisert som slike steder, som gjennomgår konsentrerte mutasjoner. Slike hotspots kjennetegnes av et stort antall strukturelle egenskaper og sekvenser. Disse "hotspot-motivene" kan brukes til å identifisere hotspots. To  
15 hotspot-sekvensmotiv som er spesielt godt kjennetegnet er tetranukleotid-sekvensen RGYW (SEKV ID NR:33) og seriensekvensen AGY (SEKV ID NR:34), der R er A eller G, Y er C eller T og W er A eller T.

- 20 **[0058]** En "målrettet halvdel" er delen av en immunokonjugat som skal målrette immunokonjugaten mot en celle av interesse. Vanligvis er den målrettede halvdelen et antistoff, eller et fragment av et antistoff, som beholder evnen til å gjenkjenne antigenet, f.eks. en scFv, en dsFv, en Fab, eller en F(ab')<sub>2</sub>.

- 25 **[0059]** Som regel har immunoglobulin en tung og en lett kjede. Hver tunge og lett kjede inneholder et konstant område og et variabelt område (områdene er også kjent som "domener"). Variable områder med lette og tunge kjeder inneholder et "rammeverks"-område, som er avbrutt av tre hypervariable områder, også kalt "komplementaritetsbestemmende områder" eller "CDR-er". Rammeverksområdets og CDR-ens utstrekning har blitt definert. Sekvensene til rammeverkområdene med ulike lette eller tunge kjeder bevares forholdsmessig innenfor en art.  
30 Rammeverkområdet til et antistoff, det vil si de kombinerte rammeverkområdene og bestanddelene lett og tung kjede, sørger for å posisjonere CDR-en i et tredimensjonalt område.

- 35 **[0060]** CDR-ene er hovedsaklig ansvarlige for å binde seg til et antigens epitop. CDR-ene for hver kjede omtales oftest som CDR1, CDR2 og CDR3, nummerert i rekkefølge fra N-terminus, som også oftest identifiseres av kjeden der den bestemte CDR-en er plassert. Altså er en V<sub>H</sub> CDR3 plassert i det variable domenet til den tunge kjeden i antistoffet der den ble funnet, mens en V<sub>L</sub> CDR1 er CDR1 fra det variable domenet til den lette kjeden av antistoffet der den ble funnet.

**[0061]** Uttrykket "disulfidbinding" eller "cystein--cystein-disulfid-forbindelse" henviser til et kovalent samspill mellom to cysteiner der sulfuratomenene på cysteinene oksideres slik at de danner en disulfidbinding. Den gjennomsnittlige bindeenergien for en disulfidforbindelse er omtrent 60 kcal/mol, sammenlignet med 1-2 kcal/mol for en hydrogenbinding.

5

**[0062]** Uttrykket "disulfid-stabilisert Fv" eller "dsFv" henviser til det variable området på en immunoglobulin der det finnes en disulfidbinding mellom den lette kjeden og den tunge kjeden. I denne oppfinnelsen er cysteinene som utgjør disulfidforbindelsen innenfor rammeverksområdene til antistoffkjedene og sørger for å stabilisere antistoffets struktur. Vanligvis er antistoffene konstruert slik at de introduserer cysteiner i rammeverkområdet ved posisjoner der utskiftingen ikke forstyrrer antigenbindingen.

10

**[0063]** En antistoff som er immunologisk reaktiv med et bestemt antigen kan genereres ved hjelp av rekombinante metoder som f.eks. valg av samlinger av rekombinante antistoffer i bakteriofag eller lignende indikatorer, se f.eks. Huse m. fl., Science, 246:1275-1281 (1989); Ward, m. fl., Nature, 341:544-546 (1989); og Vaughan, m. fl., Nature Biotech., 14:309-314 (1996), eller ved å immunisere et dyr med antigenet eller ved å DNA-kode antigenet.

15

**[0064]** En "toksisk halvdel" er den delen av et immunotoksin som gjør at immunotoksinet blir cytotoxisk mot ønskede celler.

20

**[0065]** En "terapeutisk halvdel" er delen av en immunokonjugat som skal fungere som terapeutisk hjelpemiddel.

25

**[0066]** Uttrykket "terapeutisk hjelpemiddel" inkluderer alle sammensetninger som er kjent eller som senere utvikles som antineoplast, antiinflammatoriske, cytokiner, antiinfektiver, enzymaktivatorer eller -hemmere, allosteriske modifikatorer, antibiotika eller andre midler som administreres for å indusere en ønsket terapeutisk effekt hos pasienten. Det terapeutiske middelet kan også være et toksin eller en radioisotop, der den tiltenkte terapeutiske effekten for eksempel kan være å drepe en kreftcelle.

30

**[0067]** En "påvisbar etikett" betyr, med hensyn til immunokonjugat, en del av immunokonjugatet som har en egenskap som gjør at dens tilstedeværelse kan påvises. For eksempel kan immunokonjugatet være merket med en radioaktiv isotop som gjør at celler der immunokonjugatet er tilstede kan påvises i immunohistokjemiske undersøkelser.

35

**[0068]** Uttrykket "effektorhalvdel" betyr den delen av et immunokonjugat som er ment å ha en effekt på en celle som søkes av den målrettede halvdel, eller for å identifisere tilstedeværelsen

av immunokonjugatet. Dermed kan effektorhalvdelen for eksempel være en terapeutisk halvdel, et toksin, en radioetikett eller en fluorescerende etikett.

**[0069]** Uttrykket "immunokonjugat" inneholder en henvisning til en kovalent forbindelse av et effektormolekyl til et antistoff. Effektormolekylet kan være et toksin.

**[0070]** Uttrykkene "effektiv mengde" eller "mengde effektiv mot" eller "terapeutisk effektiv mengde" omfatter henvisning til en dosering av et terapeutisk middel som er tilstrekkelig for å gi ønsket resultat, for eksempel hemming av celleproteinsyntese med minst 50 %, eller at cellen drepes.

**[0071]** Uttrykket "toksin" inkluderer en henvisning til abrin, ricin, *Pseudomonas* eksotoksin A (PE), difteritoksin (DT), botulinumtoksin eller modifiserte toksiner av disse. For eksempel er PE og DT svært toksiske sammensetninger som ofte fører til dødsfall på grunn av levertoksisitet. PE og DT modifiseres imidlertid som regel for bruk som immunotoksin ved at de fjerner den naturlige målrettingskomponenten i toksinet (f.eks. domene Ia i PE eller B-kjeden til DT) og erstatter dem med en annen målrettignshalvdel, for eksempel et antistoff.

**[0072]** Uttrykket "kontakt" inkluderer en henvisning til plassering i direkte fysisk forbindelse.

**[0073]** En "ekspresjonsplasmid" omfatter en nukleotidsekvens som koder et molekyl eller interesse, som er funksjonelt forbundet med en akselerator.

**[0074]** Slik det brukes heri, brukes "polypeptid", "peptid" og "protein" omvekslende og inneholder en henvisning til et polymer bestående av aminosyrerester. Uttrykkene brukes om aminosyrepolymerer, der en eller flere aminosyrerester er en kunstig kjemisk analog for en tilhørende naturlig forekommende aminosyre, i tillegg til naturlig forekommende aminosyrepolymerer. Uttrykkene gjelder også for polymerer som inneholder konservative aminosyreerstatninger, slik at proteinet forblir funksjonelt.

**[0075]** Uttrykket "rest" eller "aminosyrerest" eller "aminosyre" omfatter henvisning til en aminosyre som er innlemmet i et protein, polypeptid eller peptid (samlet "peptid"). Aminosyren kan være en naturlig forekommende aminosyre, og, med mindre den ellers er begrenset, kan omslutte kjente analoger av naturlige aminosyrer som kan fungere på en tilsvarende måte som naturlig forekommende aminosyrer.

**[0076]** Aminosyrene og analagene det henvises til heri omtales i kortform som følger i tabell A:

**Tabell A: Fagterminologi for aminosyrer**

| Navn                    | 3 bokstaver | 1 bokstav |
|-------------------------|-------------|-----------|
| Alanin                  | Ala         | A         |
| Arginin                 | Arg         | R         |
| Asparagin               | Asn         | N         |
| Aspartinsyre            | Asp         | D         |
| Cystein                 | Cys         | C         |
| Glutaminsyre            | Glu         | E         |
| Glutamin                | Gln         | Q         |
| Glycin                  | Gly         | G         |
| Histidin                | His         | T         |
| Homoserin               | Hse         | -         |
| Isoleucin               | Ile         | In        |
| Leucin                  | Leu         | L         |
| Lysin                   | Lys         | K         |
| Metoionin               | Met         | M         |
| Midioninsulfoksid       | Met (O)     | -         |
| Mteionin-metylsulfonium | Met (S-Me)  | -         |
| Norleusin               | Nle         | -         |
| Fenylalanin             | Phe         | F         |
| Prolin                  | Pro         | P         |
| Serin                   | Ser         | S         |
| Treonin                 | Thr         | T         |
| Tryptofan               | Trp         | W         |
| Tyrosin                 | Tyr         | Y         |
| Valin                   | Val         | V         |

5 **[0077]** En "konservativ erstatning", ved beskrivelse av et protein, henviser til en endring i proteinets aminosyresammensetning, som ikke i stor grad endrer proteinets aktivitet. Dermed henviser "konservativt modifiserte varianter" av en bestmt aminosyresekvens til aminosyrer som ikke er kritiske for aminosyreaktivitet eller utskifting av aminosyrer med andre aminosyrer med tilsvarende egenskaper (f.eks. syreholdige, basiske, positivt eller negativt ladede, polare eller ikke-

polare, osv.), slik at erstatningene selv for kritiske aminosyrer ikke i stor grad endrer aktiviteten. Konservative erstatningstabeller som tilveiebringer funksjonelt lignende aminosyrer er godt kjent i fagmiljøet. Følgende seks grupper i tabell B inneholder alle aminosyrer som er konservative erstatninger for hverandre:

5

**Tabell B**

|                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Alanin (A), Serin (S), Treonin (T);                                          |
| 2) Aspartinsyre (D), Glutaminsyre (E);                                          |
| 3) Asparagin (N), Glutamin (Q);                                                 |
| 4) Arginin (R), Lysin (K);                                                      |
| 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Metionin (M), Valin (V); og                       |
| 6) Fnylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptofan (W).                                  |
| Se også Creighton, <i>Proieins : Structures and Molecular Properties</i> , W.H. |
| Freeman and Company, New York (2. utg., 1992).                                  |

**[0078]** Uttrykkene "hovedsaklig tilsvarende" i forbindelse med et peptid indikerer at en peptid omfatter en sekvens på minst 90 %, helst minst 95 % sekvsnidentitet mot referansesekvensen over et sammenligningsvindu på 10-20 aminosyrer. Prosentdelen sekvensidentitet avgjøres ved at man sammenligner to optimalt justerte sekvenser over et sammenligningsvindu, der andelen av polynukleotidsekvensen i sammenligningsvinduet kan omfatter tillegg eller utelatelser (dvs. mellomrom) ved sammenligning med referansesekvensen (som ikke omfatter tillegg eller utelatelser) for optimal innstilling av de to sekvensene. Prosentdelen beregnes ved at man finner antall posisjoner der den identiske nukleinsyrebasen eller aminosyreresten forekommer i begge sekvenser, slik at det gir antall tilpassede posisjoner, der man deler antall tilpassede posisjoner på totalt antall posisjoner i sammenligningsvinduet og ganger resultatet med 100, for å gi prosentdel sekvensidentitet.

**[0079]** Uttrykkende "bindende," "konjugerende," "forbindende," "knyttende" eller "tilknyttede" henviser til at de to polypeptidene blir til ett sammenhengende polypeptidmolekyl. I konteksten til herværende oppfinnelse omfatter begrepene henvisning til kobling av en antistoffhalvdel til en PE i oppfinnelsen. Denne koblingen kan være kjemisk eller rekombinant. Kjemiske måter henviser til en reaksjon mellom antistoffhalvdelen og PE-molekylet, slik at det oppstår en kovalent forbindelse mellom de to molekylene, og de danner ett molekyl.

**[0080]** Slik det brukes heri omfatter "rekombinant" henvisning til et proteinprodukt som er produsert med celler som ikke har, i sin naturlige form, en endogen kopi av DNA-et som kan

- utpresse proteinet. Cellene produserer det rekombinante proteinet fordi de er genetisk endret ved innføring av en passende isolert nukleinsyresekvens. Begrepet omfatter også henvisning til en celle, eller nukleinsyre, eller vektor, som er modifisert ved innføring av en heterolog nukleinsyre eller endring av en naturlig nukleinsyre til en form som ikke er naturlig for cellen, eller at cellen er avledet fra en celle som er modifisert på denne måten. Dermed vil for eksempel rekombinante celler utskille gener som ikke finnes i den naturlige (ikke-rekombinante) celleformen, utpresse mutasjoner av gener som finnes i den naturlige formen, eller utpresse de naturlige genene som ellers er unormalt utpresset.
- 10 **[0081]** Slik det brukes heri, omfatter "nukleinsyre" og "nukleinsyresekvens" henvisning til et deoksyribonukleotid eller ribonukleotidpolymer i enkelt- eller dobbeltstrengt form, og, med mindre det er begrenset på andre måter, omfatter det kjente analoger av naturlige nukleotider som hybridiseres til nukleinsyrer på en måte som likner naturlig forekommende nukleotider. Med mindre annet er angitt, omfatter en bestemt nukleinsyresekvens den komplementære sekvensen derav, i tillegg til konservative varianter, dvs. nukleinsyrene som finnes i slengposisjoner på 15 codoner og varianter av disse, når de omdannes til protein, fører til konservativ utskiftning av en aminosyre.
- 20 **[0082]** Slik det brukes heri, inkluderer "koding", med hensyn til en spesifisert nukleinsyre henvisning til nukleinsyrer som utgjør informasjonen som skal omdannes til det spesifikke proteinet. Informasjonen er spesifisert med bruk av codoner. Vanligvis er aminosyresekvensen kodet av nukleinsyren, ved hjelp av den "universelle" genetiske koden. Imidlertid kan varianter av den universelle koden, f.eks. i enkelte plante- dyre og soppmitokondria, bakteriet *Mycoplasma capricolum* (Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82:2306-2309 (1985)), eller ciliatet *Macronucleus*, brukes 25 når nukleinsyren utpresses ved hjelp av omdanningsmaskineriet i disse organismene.
- 30 **[0083]** Uttrykket "sammensmelting i ramme" henviser til to eller flere nukleinsyresekvenser som koder polypeptidene slik at den sammenkoblede nukleinsyresekvensen omdannes til et protein med en enkelt kjede, som omfatter de opprinnelige polypeptidkjedene.
- 35 **[0084]** Slik det brukes heri, omfatter "utpresset" henvisning til omdanning av en nukleinsyre til et protein. Proteiner kan utpresses og forbli intracellulære, bli en viktig komponent for celleoverflatens membran eller utskilt i den ekstracellulære matrisen eller mediet
- [0085]** Med "vertscelle" menes en celle som kan støtte replisering eller utpressing av ekspresjonsvektoren. Vertsceller kan være prokaryotiske celler som *E. coli*, eller eukaryotiske celler som gjær-, insekt-, amfibie- eller pattedyrceller.

**[0086]** Frasen "bakteriofagvisningssamling" henviser til en samling bakteriofager som hver inneholder et fremmed cDNA, rekombinant smeltet sammen i rammen til et overflateprotein. Bakteriofagen viser fremmedproteinet kodet av cDNA på overflaten. Etter replikasjon i en bakterievert, som regel *E. coli*, vil bakteriofagen som inneholder det aktuelle fremmede cDNA-et velges ved utpressing av fremmedproteinet på bakteriofagens overflate.

**[0087]** Uttrykkene "identisk" eller prosent "identitet," når det gjelder to eller flere nukleinsyrer eller polypeptidreksener henviser til to eller flere sekvenser eller undersekvenser som er like, eller som har en spesifikk prosentdel aminosyrerester eller nukleotider som er like, når de sammenlignes og innstilles for maksimal korresponssanse, målt ved hjelp av en av følgende algoritmer for sekvenssammenlikning, eller ved visuell inspisering.

**[0088]** Uttrykket "hovedsaklig identisk," i forbindelse med to nukleinsyrer eller polypeptider, henviser til to eller flere sekvenser eller undersekvenser som har minst 60 %, mer foretrukket 65 %, enda mer foretrukket 70 %, enda mer foretrukket 75 %, enda mer foretrukket 80 % og aller helst 90-95 % nukleotid- eller aminosyrerestidentitet, når de sammenlignes og innstilles for maksimal korrespondanse, målt ved hjelp av en av følgende algoritmer for sekvenssammenligning, eller ved visuell inspisering. Helst finnes hovedsaklig identitet over et sekvensområde som består av en lengde på minst 50 rester, mer foretrukket over et område på minst 100 rester, og aller helst skal sekvensene være hovedsaklige identiske over minst 150 rester. I den aller mest foretrukne utgaven er sekvensene hovedsaklig identiske over hele lengden til kodeområdene.

**[0089]** For sekvenssammenligning opptrer vanligvis en sekvens som referansesekvens, som testsekvensene sammenliknes med. Når man bruker en algoritme for sekvenssammenlikning mates test- og referansesekvenser inn i en datamaskin, undersekvenskoordinater tildeles, om nødvendig, og parametere for sekvensalgoritmeprogrammet tildeles. Algoritmen for sekvenssammneligning beregner deretter prosentdel sekvensidentitet for testsekvensen(e), i forhold til referansesekvensen, basert på de tildelte programparametrene.

**[0090]** Optimal innstilling av sekvenser til sammenligning kan utføres, f.eks. ved hjelp av den lokale homologialgoritmen til Smith & Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 (1981), ved hjelp av algoritmen for homologiinnstilling til Needleman & Wunsch, J Mol. Biol., 48:443 (1970), ved at metoden for søking etter likheter fra Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988), ved datastyrt implementering av disse algoritmene (GAP, BESTFIT, FASTA, og TFASTA i Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), eller ved visuell inspisering (se generelt Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel m. fl., red., Current Protocols, et fellesprosjekt mellom Greene Publishing Associates, Inc. og John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).



- [0091]** Eksempler på algoritmer som passer til å fastslå prosentdel sekvensidentitet og sekvenslikhet er algoritmene BLAST og BLAST 2.0, som beskrives av henholdsvis Altschul m. fl., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990) og Altschuel m. fl. Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1977). Programvare for utføring av BLAST-analyse er offentlig tilgjengelig gjennom National Center for Biotechnology Information (tilgjengelig på Internett via "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>"), etterfulgt av "nlm.nih.gov/"). Denne algoritmen går ut på at man først identifiserer sekvensparene med høyest poengsum (HSP), ved at man identifiserer korte ord av lengde W i hver sekvens, som enten samsvarer eller tilfredsstiller en grenseverdi for positiv verdi T når de er innstilt mot et ord med sammen lengde i databasesekvensen. T omtales som grenseverdien for nabo-ord (Altschul m. fl., *supra*). Disse første nabo-ordtreffene fungerer som grunnlag for å starte søk som finner lengre HPS-er som inneholder disse. Ordtreffene strekkes deretter i begge retninger, langs hver sekvens, så langt som den kumulative justeringsverdien kan økes. Kumulative verdier beregnes med, for nukleotidsekvenser, parametrene M (belønningspoeng for et par tilsvarende rester, alltid  $> 0$ ) og N (strafeverdi for ikke-tilsvarende rester, alltid  $< 0$ ). For aminossekvenser brukes en poengmatrise til å beregne kumulativ verdi. Forlengelse av ordtreffene i hver retning stanses når: den kumulative verdien for innretning faller fra med mengde X fra maksimalt oppnådd verdi; den kumulative summen er null eller mindre, på grunn av akkumulering av en eller flere restestillinger med negativ verdi, eller enden av en av sekvensene nås. BLAST-algoritmens parametre W, T og X avgjør innrettingens følsomhet og hastighet. Programmet BLASTN (for nukleotidsekvenser) bruker som standard en ordlengde (W) på 11, en forventning (E) på 10, M=5, N=-4, og en sammenlikning av de to strengene. For aminossekvenser bruker BLASTP-programmet som standard en ordlengde (W) på 3, en forventning (E) på 10 og poengmatrisen BLOSUM62 (se Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915 (1989)).
- [0092]** I tillegg til å beregne prosentdel sekvensidentitet utfører BLAST-algoritmen også en statistisk analyse over likheten mellom to sekvenser (se f.eks. Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90:5873-5787 (1993)). Ett mål på likhet som BLAST-algoritmen sørger for er minste-sum-sannsynligheten ( $P(N)$ ), som gir en indikasjon på sannsynligheten for at samsvar mellom to nukleotid- eller aminosyresekvenser skjer ved en tilfeldighet. For eksempel anses nukleinsyren for å ligne en referansesekvens hvis minste-sum-sannsynligheten i en sammenlikning av prøvenukleinsyren og referanse-nukleinsyren er mindre enn omtrent 0,1, mer foretrukket mindre enn omtrent 0,01 og aller helst mindre enn omtrent 0,001.
- [0093]** En videre indikasjon på at to nukleinsyresekvenser eller polypeptider er hovedsaklig identiske er at polypeptiden som er kodet av den første nukleinsyren er immunologisk kryssreaktiv med polypeptiden som er kodet av den andre nukleinsyren, som omtalt nedenfor. Dermed er en polypeptid som oftest hovedsaklig identisk med en annen polypeptid, for eksempel, når de to peptidene kun er adskilt av konservative utskiftninger. En annen indikasjon på at to

nukleinsyresekvenser er hovedsaklig identiske er at de to molekylerne hybridiserer hverandre under strenge forhold, som beskrevet nedenfor.

**[0094]** Uttrykket "*in vivo*" inkluderer henvisning til inne i kroppen på organismen som cellen ble hentet fra. "*Ex vivo*" og "*in vitro*" betyr utenfor kroppen til organismen som cellen ble hentet fra.

**[0095]** Uttrykket "ondartet celle" eller "malignitet" henviser ofte til tumorer eller tumorceller som er invasive og/eller som kan gjennomgå metastase, dvs. kreftceller.

**[0096]** Slik det brukes her, betyr "pattedyrceller" en henvisning til celler fra pattedyr, inkludert mennesker, rotter, mus, marsvin, sjimpanser og makaker. Cellene kan dyrkes *in vivo* eller *in vitro*.

**[0097]** Uttrykket "selektivt reaktiv" betyr, i forbindelse med et antigen, til den foretrukne assosiasjonen av et antigen, helt eller delvis, til en celle eller et vev som bærer antigenet, ikke til celler og vev som ikke inneholder antigenet. Det er naturligvis kjent at en grad av ikke-spesifikk påvirkning kan forekomme mellom et molekyl og en ikke-målcelle eller -vev. Likevel er selektiv reaktivitet forskjellig, da den dannes gjennom spesifikk gjenkjenning av antigenet. Selv om selektiv reaktive antistoffer binder antigener, kan de gjøre det med lite affinitet. På den andre siden vil spesifikk binding føre til langt sterkere tilknytning mellom antistoffet og cellene som bærer antigenet, enn mellom de det bundne antigenet og celler som ikke inneholder antigenet. Spesifikk binding medfører som regel mer enn 2 ganger, helst mer enn 5 ganger, mer foretrukket mer enn 10 ganger og aller helst mer enn 100 ganger økning i mengden bundet antistoff (per enhetstid) til en celle eller et vev som bærer et antigen, i forhold til en celle eller et vev som ikke inneholder mål-antigenet. Spesifikk binding til et protein under slike forhold krever et antistoff som er valgt for sin spesifisitet for et bestemt protein.. En rekke immunoanalyseformater passer til å velge antistoffer som er spesifikt immunoreaktive med et bestemt protein. For eksempel brukes fast-fasete ELISA-immunologiske analyser regelmessig for å velge monoklonale antistoffer som er spesifikt immunoreaktive med et protein. Se Harlow & Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York (1988), for en beskrivelse av immunoanalyseformater og forhold som kan brukes til å avgjøre spesifikk immunologisk reaktivitet.

**[0098]** Uttrykket "immunologisk reaktive forhold" inkluderer henvisning til forhold som lar et antistoff generert til en bestemt epitop bindes til epitopen i påvisbart større grad enn, og/eller til hovedsaelig utelatelse av, binding til hovedsaklig alle andre epitoper. Immunologisk reaktive forhold avhenger av formatet til antistoffbindereaksjonen og er vanligvis de som brukes i protokoller for immunologisk analyse eller forholdene som finnes *in vivo*. Se Harlow & Lane, *supra*, for en beskrivelse av immunoanalyseformater og forhold. Helst skal immunologisk reaktive forhold som benyttes for metodene i herværende oppfinnelse være "fysiologiske forhold", som inkluderer henvisning til forhold (f.eks. temperatur, osmolaritet, ph) som er typiske for innsiden av et pattedyr

eller en pattedyrceelle. Selv om man vet at enkelte organer utsettes for ekstreme forhold, ligger intra-organisale og intracellulære miljøer omtrent ved pH 7 (dvs. fra pH 6,0 til pH 8,0, mer typisk fra pH 6,5 til 7,5), inneholder vann som viktigste løsemiddel og eksisterer ved temperaturer mellom 0°C og 50°C. Osmolariteten er innenfor området som kan støtte cellenes levedyktighet og forøkning.

5

## **PSEUDOMONAS-EKSOTOKSIN A**

**[0099]** Naturlig *Pseudomonas*-eksotoksin A ("PE") er et ekstremt aktivt monomerisk protein (molekylvekt 66 kD), som utskilles av *Pseudomonas aeruginosa*, som hemmer proteinsyntese i eukaryotiske celler. Den naturlige PE-sekvensen (SEKV ID NR:1) er svært kjent og fremsettes f.eks. i SEKV ID NR:1 i amerikansk patent nr. 5,602,095. Handlingsmetoden er inaktivering av ADP-ribosylateringen av elongasjonsfaktor 2 (EF-2).

10

**[0100]** PE har blitt studert i over 20 år for bruk som behandlingsmiddel. Eksotoksinet inneholder tre strukturelle domener som fungerer sammen og fører til cytotoksi. Domene Ia (aminosyre 1-252) medierer cellebindingen. Domene II (aminosyre 253-364) er ansvarlige for transport til cytosolen og domene III (aminosyre 400-613) medierer ADP-ribosylering av elongasjonsfaktor 2. Funksjonen til domene Ib (aminosyre 365-399) forblir udefinert, skjønt det har vært kjent at store deler av den, aminosyrene 365-380, kan slettes uten at cytotoxisiteten går tapt. Se Siegall m. fl., J Biol Chem, 264:14256-14261 (1989).

15

20

**[0101]** Uttrykkene "*Pseudomonas*-eksotoksin" og "PE", slik de brukes her, henviser vanligvis til en PE som er modifisert fra det naturlige proteinet, slik at binding og opptak via LRP1/CD91 er redusert (celleoverflatereseptoren som er bundet av toksinet i full lengde), for å eliminere foldeproblemer, eller for å redusere ikke-spesifikk toksisitet. Flere slike modifikasjoner er kjent på fagområdet og inkluderer, men er ikke begrenset til, fjerning av domene Ia, flere slettinger av aminosyrer i domene Ib, II og III, utskifting av enkle aminosyrer og tillegg av én eller flere sekvenser ved karboksylterminus, for eksempel KDEL (SEKV ID NR:2) og REDL (SEKV ID NR:3). Se Siegall m. fl., *supra*. Cytotoksiske PE-framenter omfatter de som er cytotoksiske med eller uten påfølgende proteolytisk eller annen behandling i målcellen (f.eks. som protein eller pre-protein).

25

30

**[0102]** Enkelte cytotoksiske PE-framenter er kjent innenfor fagområdet og omtales ofte etter fragmentets molekulvekt, som for personer med fagkunnskap bestemmer PE-fragmentets komposisjon. For eksempel var PE40 et av de første fragmentene som ble studert og brukt som den toksiske delen av immunotoksinene. Uttrykket brukes om en avkortet form av PE, der domene I er domenet som er ansvarlig for ikke-spesifikk binding. Se f.eks. Pai m. fl., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 88:3358-3362 (1991); og Kondo m. fl., J. Biol. Chem., 263:9470-9475 (1988). Eliminering av

35

ikke-spesifikk binding kan imidlertid også oppnås ved mutering av enkelte rester av domene Ia. Amerikansk patent nr. 5,512,658 forteller f.eks. at et mutert PE der domene Ia er tilstede, men der de basiske restene av domene Ia på posisjon 57, 246, 247 og 249 er erstattet av syrlige rester (glutaminsyre, eller "E")) viser betydelig redusert ikke-spesifikk cytotoxissitet. Denne mutantutgaven av PE omtales iblant som "PE4E".

**[0103]** Uttrykket "PE38" henviser til et cytotoxisk fragment av PE som består av aminosyrene 253-364 og 381-613 PE, og som har en molekylvekt på omtrent 38 kD. Det inneholder transport- og ADP-ribosyleringsdomenene til PE, men ikke cellebindedelen (Hwang J. m. fl., Cell, 48:129-136 (1987)). PE38 er et pro-protein som aktiveres til sin cytotoxiske form når det behandles inne i en celle (se f.eks. amerikansk patent nr. 5,608,039 og Pastan m. fl., Biochim. Biophys. Acta, 1333:C1-C6 (1997)). Sekvensen til PE38 er velkjent innenfor fagområdet, men den kan også enkelt fastslås ved å trekke fra de angitte restene fra den kjente PE-sekvensen. Personer med kunnskap om fagområdet vil vite at, grunnet nedbrytbarheten til den genetiske koden, aminosyresekvensen til PE38, dets varianter, som f.eks. PE38KDEL eller PE38QQR, og andre PE-derivater som diskuteres heri kan kodes av et stort utvalg nukleidsyresekvenser, og alle disse kan uttrykkes slik at de avgir ønsket polypeptid.

**[0104]** "PE35" er et 35 kD karboksyl-terminalfragment i PE, der aminosyrerestene 1-279 har blitt slettet og molekylet begynner med en metionin på posisjon 280, etterfulgt av aminosyrene 281-364 og 381-613 i naturlig PE. PE35 og PE40 tilveiebringes i amerikansk patent nr. 5,602,095 og 4,892,827.

**[0105]** Undersøkelser har også vist at mutasjoner av derminalrestene til PE, REDLK (SEKV ID NR:5, restene 609-613) kan varieres slik at cytotoxissiteten til den resulterende mutasjonen økes. For eksempel kan immunotoksiner som er laget med muterte PE-er i sekvensene KDEL (SEKV ID NR:2), REEL (SEKV ID NR:32) eller RDEL (SEKV ID NR:3) være langt mer cytotoxiske overfor målceller enn like immunotoksiner laget med PE38 som inneholder den naturlige terminalsekvensen. Se, Kreitman og Pastan, Biochem J, 307(del 1):29-37 (1995). Repetisjoner av disse sekvensene kan også brukes. Se, f.eks. amerikansk patenr nr. 5,854,044; 5,821,238; og 5,602,095, samt International Publication WO 99/51643. Mens PE-er som ender i KDEL (SEQ ID NO:2) er nyttige til *in vitro*-formål, har de vist seg å ha ikke-spesifikk toksisitet i dyr, og de er derfor mindre foretrukket til *in vivo*-bruk.

**[0106]** I en foretrukket utgave beholder det cytotoxiske PE-fragmentet minst 10 %, mer foretrukket minst 40 %, enda mer foretrukket 50 %, enda mer foretrukket 75 %, mer foretrukket minst omtrent 90 %, og enda mer foretrukket 95 % av cytotoxissiteten til PE38. I spesielt foretrukne utgaver har det cytotoxiske fragmentet minst samme cytotoxissitet som PE38, helst mer.

## A. Konservativt modifiserte varianter av PE

[0107] Det forstås at sekvensen med naturlig PE og variantene som omtales ovenfor kan ha konservative erstatninger og beholde sin cytotoksiske kapasitet, og, ønskelig, redusert antigenisitet sammenlignet med den naturlige PE-sekvensen. I foretrukne utgaver har modifiserte varianter av PE eller cytotoksiske fragmenter av disse minst 80 % sekvenslikhet, helst minst 85 % sekvenslikhet, enda mer foretrukket minst 90 % sekvenslikhet, og aller helst minst 95 % sekvenslikhet på aminosyrenivå, som den aktuelle PE-en, for eksempel PE38.

[0108] Uttrykket "konservativt modifiserte varianter" gjelder for både amino- og nukleinsyresekvenser. Med hensyn til bestemte nukleinsyresekvenser henviser konservativt modifiserte varianter til de nukleinsyresekvensene som koder identiske eller i hovedsak identiske aminosyresekvenser, eller hvis nukleinsyren ikke koder en aminosyresekvens, hovedsaklig identiske nukleinsyresekvenser. På grunn av nedbrytingen av den genetiske kode vil et stort antall funksjonelt identiske nukleinsyrer kode en gitt polypeptid. For eksempel vil codonene GCA, GCC, GCG og GCU alle kode aminosyrealaninet. Altså vil det ved hver posisjon der et alanin er spesifisert av et codon være slik at codonet kan endres til alle korresponderende codoner som beskrives, uten at det kodede polypeptidet endres. Slike nukleinsyrevariasjoner er "stille variasjoner" som er en type konservativt modifiserte variasjoner. Hver nukleinsyresekvens heri, som koder et polypeptid, beskriver også hver mulige stille variant av nukleinsyren. Personer med kunnskap på området vil se at hvert codon i en nukleinsyre (unntatt AUG og TGG, som vanligvis er de eneste kodonene for henholdsvis metiodin og tryptofan) kan modifiseres slik at de gir et funksjonelt identisk molekyl. Altså er hver stille variant av en nukleinsyre som koder et polypeptid implisitt i hver beskrevne sekvens.

[0109] Når det gjelder aminosyresekvenser vil personer med kunnskap på området se at individuelle utskiftninger, slettinger eller tillegg til en nukleinsyre, peptid, polypeptid eller proteinsekvens som endrer, legger til eller sletter en enkelt aminosyre eller liten prosentdel av aminosyrer i den kodede sekvensen er en "konservativt modifisert variant", der endringen fører til utskifting av en aminosyre med en kjemisk tilsvarende aminosyre.

## B. Analysering for cytotoksisitet eller antigenisitet i PE

[0110] *Pseudomonas*-eksotoksiner som brukes i oppfinnelsen kan analyseres for ønsket cytotoksisitet-nivå ved analyseringsmetoder som er velkjente for personer med kunnskap om fagområdet. Altså kan cytotoksiske PE-fragmenter og konservativt modifiserte varianter av slike fragmenter enkelt analyseres for cytotoksisitet. Et stort antall kandidat-PE-molekyler kan analyseres for cytotoksisitet samtidig, ved hjelp av metoder som er godt kjent innenfor fagområdet.

For eksempel kan undergrupper av kandidatmolekylene analyseres for cytotoksisitet. Positivt reagerende undergrupper av kandidatmolekylene kan kontinuerlig deles videre inn og analyseres på nytt, til de ønskede cytotoksiske fragmentene er identifisert. Slike metoder muliggjør rask filtrering av store mengder cytotoksiske fragmenter eller konservative varianter av PE. Antigenisitet

5 kan for eksempel analyseres ved hjelp av metodene som vises i eksemplene heri.

### C. Konjugering til et målmolekyl

[0111] I en ikke-rekombinant utgave av oppfinnelsen er en målmolekyl, f.eks. et antistoff, bundet

10 til et PE-molekyl i herværende oppfinnelse, ved hjelp av hvilken som helst metode som er kjent for personer med fagkunnskap på området. Både kovalente og ikke-kovalente bindemetoder kan brukes med PE-molekylene i herværende oppfinnelse. Fremgangsmåten for å binde et PE-molekyl til et antistoff eller annet målrettet molekyl ("TM") vil variere avhengig av den kjemiske strukturen til TM. Polypeptider inneholder som regel flere ulike funksjonelle grupper, f.eks. karboksylsyre

15 (COOH), frie amin- (-NH<sub>2</sub>) eller sulfhydryl- (-SH) groups, som er tilgjengelige for reaksjon med en egnet funksjonell gruppe av et antistoff, for eksempel, som resulterer i binding av et PE-molekyl.

[0112] Alternativt kan antistoffet eller en annen TM avledes slik at den eksponerer eller fester ytterligere reaktive funksjonelle grupper. Deriveringen kan omfatte binding av et antall

20 forbindelsesmolekyler, f.eks. de som er tilgjengelige fra Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

### PRODUKSJON AV IMMUNOKONJUGATER

[0113] Immunokonjugater i oppfinnelsen inkluderer molekyler som har kovalent binding av et PE-molekyl til et antistoff eller annet målrettet middel. Valget av et bestemt målrettet middel avhenger av den spesielle cellen som er målet. Med PE-molekylene som tilveiebringes heri kan personer med fagkunnskap enkelt konstruere flere kloner som inneholder funksjonelt tilsvarende nukleinsyrer, for eksempel nukleinsyrer med ulik sekvens men som koder samme PE- og

30 antistoffsekvens. Dermed tilveiebringer herværende oppfinnelse nukleinsyrer som koder antistoffer og PE-konjugater og fusjonsproteiner av disse.

### A. Rekombineringsmetoder

[0114] Nukleinsyresekvensene til herværende oppfinnelse kan lages med enhver egnet metoder, inkludert for eksempel kloning av egnede sekvenser eller ved direkte kjemisk syntese iht. fremgangsmåter som f.eks. fosfotriester-metoden til Narang m. fl., Meth. Enzymol., 68:90-99 (1979); fosfodiestermetoden til Brown m. fl., Meth. Enzymol., 68:109-151 (1979);

dietylfosforamiditt-metoden til Beaucage m. fl.. Tetra. Lett., 22:1859-1862 (1981); den fastfasede fosforamiditt-triestermetoden som beskrives av Beaucage & Caruthers, Tetra. Letts., 22(20):1859-1862 (1981), f.eks. ved hjelp av en automatisert syntetiserer som beskrevet i f.eks. Needham-VanDevanter m. fl., Nucl. Acids Res., 12:6159-6168 (1984) og den faste støttemetoden til amerikansk patent nr. 4,458,066. Kjemisk syntese produserer et enkeltstrenget oligonukleotid. Dette kan omdannes til dobbeltstrandet DNA ved hybridisering med en komplimentær sekvens eller ved polymerisering med en DNA-polymerase, med den enkle strengen som mal. Personer med kunnskap på området vil se at mens kjemisk syntese av DNA er begrenset til sekvenser på omtrent 100 baser, kan lengre sekvenser ordnes ved ligasjon av kortere sekvenser.

**[0115]** I en foretrukket utgave lages nukleinsyresekvensene i denne oppfinnelsen ved hjelp av kloneteknikker. Eksempler på egnede klonings- og sekvenseringsteknikker og instruksjoner som er tilstrekkelige til å an vise personer med kunnskap på området finnes i Sambrook m. fl., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2. utg.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)), Berger og Kimmel (red.), GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, Academic Press, Inc., San Diego CA (1987)), eller Ausubel m. fl. (red.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY (1987).

Produktinformasjon fra produsenter av biologiske reagenser og eksperimentelt utstyr gir også nyttig informasjon. Slike produsenter er f.eks. kjemikalieselskapet SIGMA (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 Chemika-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), Invitrogen, San Diego, CA, og Applied Biosystems (Foster City, CA), i tillegg til en rekke andre kommersielle kilder som vil være kjent for personer med kunnskap om fagområdet.

**[0116]** Nukleinsyrer som koder naturlig PE kan også modifiseres slik at de danner immunokonjugatene i herværende oppfinnelse. Modifisering med områdebestemt mutagenese er velkjent innenfor fagområdet. Nukleisyrer som koder PE kan forsterkes ved hjelp av *in vitro*-metoder. Forsterkningsmetoder inkluderer polymeraskjedereaksjonen (PCR), ligasekjedereaksjonen (LCR), det transkripsjonsbaserte forsterkningssystemet (TAS), det selvbærende sekvenssystemet (3SR). Et stort utvalg klonemetoder, vertsceller og metoder for *in vitro*-forsterkning er godt kjent for personer med kunnskap om fagområdet.

**[0117]** I en foretrukket utgave klargjøres immunokonjugater ved innføring av cDNA, som koder et antistoff eller annet valgt TM, i en vektor som inneholder cDNA-et som koder en ønsket PE i oppfinnelsen. Innføringen skjer slik at målmiddelet (for å gjøre diskusjonen enklere, antar vi her at målmiddelet er en Fv, selv om andre målmidler kan benyttes med samme effekt) og PE leses i

ramme, dvs. i en kontinuerlig polypeptid som inneholder et fungerende Fv-område og et fungerende PE-område. I en spesielt foretrukket utgave er cDNA-kodingen av en PE i oppfinnelsen ombundet på en scFv, slik at toksinet er plassert på karboksylterminusen til scFv. I en annen foretrukket utgave er cDNA-kodingen av en PE i oppfinnelsen ombundet på en scFv, slik at

5 toksinet er plassert på aminotermi- nusen til scFv.

**[0118]** Så snart nukleinsyrene som koder et PE-antistoff, eller et immunokonjugat i hverværende oppfinnelse, er isolert og klonet, kan man presse ut det ønskede proteinet i en rekombinant konstruert celle, f.eks. bakterie-, plante-, gjær-, insekt- eller pattedyrceller. Det forventes at de som

10 har kunnskap på området kjenner til de ulike utpressingssystemene som er tilgjengelige for utpressing av proteiner, inkludert *E. coli*, andre bakterieverter, gjær og flere høyere eukariotceller, som COS, CHO, HeLa og myelom-cellelinjer. Det vil ikke gjøres forsøk på å gi en detaljert beskrivelse av de ulike fremgangsmåtene som er kjent for utpressing av proteiner i prokaryoter eller eukarioter. Kort sagt er utpressing av naturlige eller syntetiske nukleinsyrer som koder de

15 isolerte proteinene i oppfinnelsen som regel oppnådd ved at man funksjonelt lenker DNA eller cDNA til en akselerator (som er enten konstitutiv eller ustrekkelig), etterfulgt av innlemming i en ekspresjonskasset. Kassetene kan være egnet til replisering og integrering i enten prokaryoter eller eukarioter. Typiske ekspresjonskassetter inneholder transkriberings- og omsettelsesterminatorer, initieringssekvenser og akseleratorer som er nyttige i styringen av DNA-

20 kodingen av proteinet. For å oppnå utpressing av et klonet gen på høyt nivå, er det ønskelig å konstruere ekspresjonskassetter som inneholder, minst, en kraftig akselerator som styrer transkriberingen, et ribosombindingssted som starter omsettelsen og en transkriberings- og omsettelsesterminator. For *E. coli* inkluderer dette en katalysator som f.eks. T7, trp, lac, eller lambda promoters, et ribosombindingssted og helst et omsettingstermineringssignal. For eukaryot-

25 celler kan kontrollsekvensene omfatte en akselerator og helst en forsterker fra immunoglobulingener, SV40, cytomegalovirus og en polyadenylsekvens, og kan inkludere en skjøtedonor og akseptorsekvenser. Kassetter som innlemmer nukleinsyrene til oppfinnelsen kan overføres til ønsket vertscelle med velkjente fremgangsmåter som f.eks. kalsiumkloridomdanning eller elektroporering for *E. coli*- og kalsiumfosfatbehandling, elektroporering eller lipofeksjon for

30 pattedyrceller. Celler som er omformet av kassetteene kan velges etter motstandsdyktighet mot antibiotika fra genene i kassetteene, for eksempel amp-, gpt-, neo- og hyg-genet.

**[0119]** Personer med kunnskap på området forstår at modifisering er mulig på nukleinsyren som koder en polypeptid i herværende oppfinnelse (dvs. PE eller et immunokonjugat dannet fra en PE i

35 oppfinnelsen), uten at den biologiske aktiviteten minsker. Enkelte modifikasjoner kan foretas for å gjøre det enklere å klonere, presse ut eller innlemme det målrettede molekylet i et fusjonsprotein. Slike modifikasjoner er godt kjent for personer med kjennskap til fagområdet og omfatter blant annet spiringscodoner, et metioin tilsatt aminotermi- nusen for å sørge for oppstart, sted, ytterligere



aminosyrer plassert på en av terminusene, for å danne bekvemmelig plasserte begrensingssteder, eller ytterligere aminosyrer (f.eks. poly-His), som bidrar i rensestegene.

**[0120]** I tillegg til rekombinant-metoder kan immunokonjugatene og PE-ene i herværende oppfinnelse også konstrueres helt eller delvis ved hjelp av vanlig peptidsyntese. Fastfaset syntese av polypeptidene i herværende oppfinnelse på mindre enn 50 aminosyrer i lengde kan oppnås ved å feste C-terminalens aminosyre i sekvensen til en uløselig støtte som etterfølges av sekvensiell tillegging av de gjenværende aminosyrene i sekvensen. Teknikker for fastfaset syntese beskrives av Barany & Merrifield, THE PEPTIDES: ANALYSIS, SYNTHESIS, BIOLOGY. VOL. 2: SPECIAL METHODS IN PEPTIDE SYNTHESIS, PART A, pp. 3-284; Merrifield m. fl., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2156 (1963), and Stewart m. fl., SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 2ND ED., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Lengre proteiner kan syntetiseres med kondensering av amino- og karboksyl-terminen til kortere fragementer. Måter å danne peptidbindinger ved aktivering av en karboksyl-terminalende (f.eks. ved hjelp av koplingsreagensen N, N'-disykyloheksylkarbodiimid) er kjent for personer med kunnskap på fagområdet.

## B. Rensing

**[0121]** Så snart de er utpresset kan de rekombinante immunokonjugatene og PE-ene i herværende oppfinnelse renses i henhold til vanlige prosedyrer kjent på området, inkludert ammoniumsulfatpresipitering, affinitetskolonner, kolonnekromatografi og lignende (se, generelt, R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Hovedsaklig rene sammensetninger med minst 90 til 95 % homogenitet foretrekkes, og 98 til 99% homogenitet er aller helst å foretrekke for legemiddelbruk. Så snart de er rensset, delvis eller til ønsket homogenitet, hvis de skal brukes terapeutisk, bør polypeptidene være hovedsaklig fri for endotoksin.

**[0122]** Fremgangsmåter for utpressing av enkeltkjedete antistoffer eller bretteing til passende aktiv form, inkludert enkeltkjedete antistoffer, fra bakterier som f.eks. *E. coli* har blitt omtalt og er godt kjent og egnede for antistoffene i denne oppfinnelsen. Se Buchner m. fl., Anal. Biochem., 205:263-270 (1992); Pluckthun, Biotechnology, 9:545 (1991); Huse m. fl., Science, 246:1275 (1989) and Ward m. fl., Nature, 341:544 (1989).

**[0123]** Ofte er funksjonelle heterologe proteiner fra *E. coli* og andre bakterier isolert fra inklusjonslegemer og krever økt løselighet med sterke denatureringsmidler og påfølgende bretteing. I løselighetstrinnet, som er godt kjent innen fagområdet, må et reduksjonsmiddel være på plass for å skille disulfidbindinger. Et eksempel på en buffer med reduksjonsmiddel er: 0,1 M Tris pH 8, 6 M guanidin, 2 mM EDTA, 0,3 M DTE (ditiokrytrotol). Reoksidasjon av disulfidbindingene kan

forekomme ved tilstedeværelse av tiolreagenser med lav molekylvekt, som beskrevet i Saxena m. fl., *Biochemistry*, 9: 5015-5021 (1970), og spesielt som beskrevet av Buchner m. fl., *supra*.

**[0124]** Renaturering oppnås som regel ved fortykning (f.eks. 100 ganger) av det denaturerte og reduserte proteinet i foldebufferen. Et eksempel på en buffer er 0,1 M Tris, pH 8,0, 0,5 M L-arginin, 8 mM oksidert glutation og 2 mM EDTA.

**[0125]** Som en modifikasjon av de to kjedeantistoffenes renseprotokoll kan områdene med tunge og lette kjeder løses opp separat og reduseres, før de kombineres i refoldingsløsningen. Et foretrukket resultat oppnås når disse to proteinene blandes i et molært forhold slik at fem ganger molar overskudd av et protein over et annet ikke overstiges. Det er fordelaktig å legge til overskytende oksidert glutation eller andre oksiderende sammensetninger med lav molekylvekst i refoldeløsningen, etter fullført redoksomflytting.

## **FARMASØYTISKE SAMMENSETNINGER OG ADMINISTRERING**

**[0126]** De immunokonjugate sammensetningene i oppfinnelsen (dvs. PE knyttet til et antistoff på et annet målrettingsmiddel) er spesielt nyttige for parenteral administrering, inkludert intravenøs administrering og administrering i ett av kroppens hulrom.

**[0127]** Sammensetningene for administrering består vanligvis av en løsning av antistoffet og/eller immunokonjugat oppløst i en farmasøytisk akseptabel bærer, helst en vannholdig bærer. En rekke ulike vannholdige bærere kan brukes, f.eks. bufret saltløsning og lignende. Disse løsningene er steriliserte og generelt fri for uønskede fremmedlegemer. Disse sammensetningene kan steriliseres med vanlige og velkjente steriliseringsmåter. Sammensetningene kan inneholde farmasøytisk akseptable hjelpesubstanser som kreves for å tilnærme fysiologiske forhold som f.eks. justering av pH-verdi og buffermidler, toksisitetsjusterende midler og lignende, f.eks. natriumacetat, natriumlaktat og lignende. Konsentrasjonen av fusjonsprotein i disse formuleringene kan variere mye og velges hovedsaklig basert på væskevolumer, viskositet, kroppsvekt og lignende, i henhold til den valgte administrasjonsmåten og pasientens behov.

**[0128]** Derfor vil en typisk sammensetning som inneholder et immunotoksin fra herværende oppfinnelse til intravenøs administrering være omtrent 0,1 til 10 mg per pasient per dag. Doseringer fra 0,1 til omtrent 100 mg per pasient per dag kan brukes. Aktuelle metoder for klargjøring av administrerbare sammensetninger vil være kjent eller opplagte for personer med kunnskap på området og beskrives mer detaljert i publikasjoner som REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 19TH ED., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1995).

- [0129]** Komposisjonene som inneholder immunotoksiner fra herværende oppfinnelse kan administreres til terapeutisk behandling. Ved terapeutisk bruk administreres sammensetningene til pasienter som lider av en sykdom, i en mengde som er tilstrekkelig til å helbrede, eller i det minste delvis stanse, sykdommen og dens komplikasjoner. En mengde som er tilstrekkelig til å oppnå dette er definert som en terapeutisk effektiv dose." Effektive mengder til slik bruk avhenger av hvor alvorlig sykdommen er og pasientens generelle helsetilstand. En effektiv mengde av sammensetningen er mengden som enten sørger for subjektiv lindring av ett eller flere symptomer eller en objektiv identifiserbar bedring, påvist av klinikeren eller en kvalifisert observatør.
- [0130]** En eller flere administreringer av sammensetningene administreres avhengig av doseringen og frekvensen utfar hva som kreves og hva patienten tåler. Uansett skal sammensetningen tilveiebringe en tilstrekkelig mengde av proteinene i denne oppfinnelsen for å behandle pasienten effektivt. Helst skal dosen administreres én gang, men den kan tilføres periodisk til enten et behandlingsresultat er oppnådd eller til bivirkningene krever at behandlingen avsluttes. Generelt er dosen tilstrekkelig til å behandle eller lindre symptomer eller tegn på sykdom, uten å produsere uaktseptabel toksisitet i pasienten.
- [0131]** Parentereale formuleringer med kontroller utløsning som inneholder immunokonjugatene i herværende oppfinnelse kan lages som implantater, oljeholdige injiseringer eller partikkelholdige systemer. For en generell oversikt over leveringssystemer for proteiner, se, Banga, A.J., THERAPEUTIC PEPTIDES AND PROTEINS: FORMULATION, PROCESSING, AND DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Partikulærsystemer omfatter mikrosfærer, mikropartikler, mikrokapsler, nanokapsler, nanosfærer og nanopartikler. Mikrokapsler inneholder det terapeutiske proteinet som en indre kjerne. I mikrosfærene er behandlingsmiddelet fordelt over partikkelen. Partikler, mikrosfærer og mikrokapsler som er mindre enn omtrent 1 µm omtales som regel som henholdsvis nanopartikler, nanosfærer og nanokapsler. Kapillærer har en diameter på omtrent 5 µm, slik at det kun er nanopartikler som kan administreres intravenøst. Mikropartikler er som regel omtrent 100 µm i diameter og administreres subkutant eller intramuskulært. Se f. eks. Kreuter J., COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, s. 219-342 (1994); og Tice & Tabibi, TREATISE ON CONTROLLED DRUG DELIVERY, A. Kydonieus, red., Marcel Dekker, Inc. New York, NY, s. 315-339 (1992). .
- [0132]** Polymerer kan brukes til ion-kontrollert utløsning av immunokonjugate sammensetninger av herværende oppfinnelse. Flere nedbrytbare og ikke nedbrytbare polymermatriser for bruk i kontrollert legemiddeltilførsel er kjent innen fagmiljøet (Langer R., Accounts Chem. Res., 26:537-542 (1993)). For eksempel er blokk-kopolymeret, polaksamer 407, som en viskøs men mobil væske ved lav temperatur, mens den omdannes til en halvfast gelé ved kroppstemperatur.

Den har vist seg å være effektiv for formulering og vedvarende tilførsel av rekombinant interleukin - 2 og urease (Johnston m. fl., Pharm. Res., 9:425-434 (1992); and Pec m. fl., J. Parent. Sci. Tech., 44(2):58-65 (1990)). Alternativt har hydroksyapatitt blitt brukt som mikrobærer for kontrollert utløsning av proteiner (Ijntema m. fl., Int. J. Pharm., 112:215-224 (1994)). I et annet aspekt blir

5 liposomer brukt til kontrollert utløsning og legemiddelmålretting av det lipid-innkapslede legemiddelet (Betageri m. fl., LIPOSOME DRUG DELIVERY SYSTEMS, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Flere andre systemer for kontrollert tilførsel av terapeutiske proteiner er kjent. Se, e.g., U.S. Pat. No. 5,055,303, 5,188,837, 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028 4,957,735 and 5,019,369, 5,055,303; 5,514,670; 5,413,797; 5,268,164; 5,004,697; 4,902,505;

10 5,506,206, 5,271,961; 5,254,342 og 5,534,496.

**[0133]** Blant de mange bruksområdene for immunotoksinene i herværende oppfinnelse finner vi flere sykdomsforhold som er forårsaket av spesifikke menneskeceller som kan elimineres ved hjelp av fusjonsproteinets toksiske oppførsel.

15

### **IN VITRO BRUK**

**[0134]** Heri fremlegges også sett som fjerner målceller *in vitro* eller *ex vivo*, ved hjelp av PE-er i oppfinnelsen. For eksempel kan immunotoksiner som omfatter en PE fra oppfinnelsen brukes til å

20 skylle ut målceller fra en cellepopulasjon i en kultur. Dermed kan for eksempel celler som er dannet fra en pasient med en krefttype som utpresser CD22 tømmes for kreftceller ved kontakt med kulturen med immunotoksiner som bruker nati-CD22-antistoffene som målrettet halvdel.

**[0135]** I enkelte tilfeller kan måcellene holdes i en biologisk prøve. Et "biologisk prøveeksemplar", slik det brukes heri, er en prøve biologisk vev eller væske som inneholder målceller og ikke-målceller. Slike prøver inkluderer, men er ikke begrenset til, vev fra biopsi, blod og blodceller (f.eks. hvite celler). En biologisk prøve innhentes vanligvis fra en flercellet eukariot, helst et pattedyr som rotte, mus, ku, hund, marsvin eller kanin, og mer foretrukket en primat, for eksempel en makak, sjimpanse eller menneske. Aller helst skal prøven stamme fra et menneske.

30

### **EKSEMPLER**

#### **Eksempel 1**

35 **[0136]** Dette eksempelet legger frem materialer og metoder som brukes i noen av studiene som danner grunnlaget for herværende oppfinnelse.

#### **Lysosomal klargjøring av Raji-celler**

[0137] Raji Burkitts lymfomceller ( $1-3 \times 10^8$ ) ble innhentet, vasket to ganger i kald PBS, en gang i en homogeniseringsbuffer (250 mM sukrose, 1 mM EDTA) og resuspendert i 2 ml homogeniseringsbuffer. Suspenderte celler ble delt med nitrogenuthuling, med en 45 ml-celles gjennomslagsbombe ((Parr Instrument Company, Moline, IL), nedkjølt til 4°C og trykksatt med nitrogengass til 150-200 psi i 10 min. De gjennomslåtte cellene ble spunnet ved 800 x g i 10 min. Det supernukleære mellomlaget ble fjernet og lagt i lag oppå en 8,5 ml 27 % PERCOLL<sup>®</sup> løsnings dempet på et 1,2 ml 10X homogeniseringsbuffer i et 16 x 76 Ultraclear Beckman sentrifugerør (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) og spunnet ved 4°C i en Beckman Type 50 Ti rotor i 1t ved 36 000 x g. Fraksjoner fra PERCOLL<sup>®</sup>-gradienten ble samlet og deretter undersøkt hver for seg for  $\beta$ -heksosaminidase-aktivitet, som beskrevet (Schaub, B.E. m. fl., Curr Protoc Cell Biol, 15:8.1-8.12 (2005)). Fraksjonene med toppaktivitet ble samlet, overført til polykarbonatrør med 13 x 51 mm tykke vegger og spunnet ved 4°C med en S100 AT4-542 rotor i 30 min i 200 000 x g, for å fjerne PERCOLL<sup>®</sup>. Det øverste laget ble samlet og brukt til å fordøye immunotoksinene.

#### 15 **Forråtnelse av lysosomal protease av B3(dsFv)-PE38 og N-terminal sekvensering av fragmentene**

[0138] Renset lysosomal protease-katepsin B, katepsin D og katepsin S (EMD Biosciences, San Diego, CA), eller den lysosomale delen av Raji-celler ble brukt til å forråtne immunotoksinet B3(dsFv)-PE38. B3(dsFv)-PE38 (0.2 mg/ml) ble inkubert enten med 5 µg/ml av de rensede katepsin-lysosomale proteasene (catepsin B, D og S) eller med 30 % (v/v) av den lysosomale resten av Raji-cellerne ved 37°C i en buffer som inneholdt 0,1 M MES (pH 5.5), 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, og 0,5 % Triton X-100. Ved tidsintervaller på mellom 0 og 60 timer etter påbegynt inkubering ble allikvotene fjernet og lagt i en tris-glysin SDS-PAGE prøvebuffer og inkubert ved 85°C i 5 min. Halvparten av hver prøve ble lagt i en Novex 4-20 % akrylamid tris-glycine proteingelé (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) og visualisert med Microwave Blue Coomassie blå proteinfarge (Protiga Inc., Frederick, MD). Den gjenværende prøven ble fraksjonert med gel-elektroforese på samme måte, og deretter elektrofarget på PVDF-membran (ProBlott; Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) i en 10 mM CAPC buffer (pH 11) med en halvtørr overføringsenhet. Etter farging ble membranet raskt rensert med vann, farget med 0,1 % Coomassie Blue R-250 i 0,5 % eddiksyre / 40 % metanol i 2 min, og deretter avfarget i 50 % metanol i vann. Proteinbånd ble fjernet fra membran og analysert i ved hjelp av en Procise 494 cLC automatisert proteinsekvenser (Applied Biosystems, Inc.).

#### 35 **Mutasjoner i HA22**

[0139] Mutasjoner i HA22 ble generert ved hjelp av Quikchange stedinnrettet mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA) med mutagenesisgrunning fra Lofstrand Labs Limited (Gaithersburg,

MD).

**[0140]** Rensing av immunotoksiner - Immunotoksiner ble rensset som beskrevet (Pastan, I. m. fl., Methods Mol Biol, 248 : 503-518 (2004)), bortsett fra at oksidert, ikke redusert, glutation ble lagt til refolderbufferen.

## Cellelinjer

**[0141]** CD22-positive humane Burkitt-lymfom-cellelinjer (CA46, Daudi, Raji og Ramos) ble hentet fra American Type Culture Collection (Manassas, VA). KOPN-8 ALL-cellelinjene ble hentet fra Dr. Alan Wayne ved National Cancer Institute (Bethesda, MD). WSU-CLL-cellelinjen [som faktisk kan være et derivat fra REH ALL-cellelinjen (Drexler, H.G. m. fl., Leukemia, 16:1868-1870 (2002))] ble hentet fra Dr. A. Al-Katib (Wayne State University, Detroit, MI). Alle cellelinjer ble dyrket ved 37°C med 5 % CO<sub>2</sub> i RPMI-1640-medium, supplementert med 10 % FBS, 2 mM L-glutamin, 1 mM natriumpyruvat, 100 U penicillin og 100 µg streptomycin (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

## Cytotoksisitetsanalyser

**[0142]** Celleoverlevelse for cellelinjer behandlet med immunotoksiner ble målt med WST-8-analyse ved hjelp av Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), vesentlig som beskrevet i den tekniske håndboken. Kort fortalt ble 10 000 celler/brønn inkubert med toksin i et 96-brønns brett (Pastan, I. m. fl., Methods Mol Biol, 248:503-518 (2004)) i 48-72 t, før CCK-8-reagensen ble lagt til brønnene. Brettene ble inkludert til brønnene med maksimal absorbans ved 450 nm nådde en verdi på ~1 OD. Sykloheksamid (10 µg/ml endelig tetthet) ble brukt som kontroll for 100 % celledødelighet. Verdiene ble normalisert mellom sykloheksamidet og PBS/HSA (0,2 %)-kontrollene og tilpasset en standard 4-parameters sigmoidal ligning med variabel gradient, med programmet GraphPad PRISM® (v 2.00) (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA), for å oppnå konsentrasjonen for immunotoksinet der det var 50 % celledødelighet (IC<sub>50</sub>). Celler fra pasienter med CLL og HCL ble analysert som tidligere beskrevet (Kreitman, R.J. et al., Clin. Cancer Res., 6:1476-1487 (2000)). Kort fortalt ble leukemiceller inkubert med rekombinante immunotoksiner i 3 dager, før de ble behandlet med <sup>3</sup>H-leucine for å vurdere graden av proteinsyntesehemming, eller med WST-1 for å vurdere celledødeligheten.

## Statistisk analyse

**[0143]** IC<sub>50</sub>-verdiene fra tilpassede par cytotoksisitetsanalyser analyserte effekten av HA22 og HA22-LR på overlevelsen av Raji (n=10), Ramos (n=3), Daudi (n=3), CA46 (n=5), KOPN8 (n=3), og WSU-CLL (n=4)-cellelinjene ble sammenlignet med en paret, to-halet t-test.

## Ikke-spesifikk musetoksisitet

[0144] Hunnkjønnede nakenmus (5-6 wk, 18-22 g) ble intravenøst injisert med en enkelt dose bestående av 2,0 mg/kg HA22 eller HA22-LR mellom 2,5-20 mg/kg i 0,2 ml PBS med 0,2 % HSA.

- 5 Musene ble observert i 10 dager. Alle prosedyrer som involverte mus ble utført i henhold til retningslinjene fra National Institutes of Health, godkjent av Animal Care and Use Committee of the National Cancer Institute.

- 10 [0145] *Farmakokinetikk*- Ni hunnkjønnede Balb/c-mus ble injisert i haleblodåren med 10 µg HA22 eller HA22-LR i 0,2 ml PBS med 0,2 % HSA. Blodprøver ble tatt fra tre ulike mus 2, 5, 10, 20, 30, og 60 min fra injisering, og hver mus ble tappet to ganger. Grupper på tre mus ble tappet ved tidsintervaller på 2 og 60 minutter, 5 og 30 minutter, eller 10 og 20 minutter. Serum ble hentet fra blodprøvene og analysert av ELISA (Bang S. et al., Clin Cancer Res, 11: 1545-1550 (2005)) sammenlignet med en standard kurve for det tilhørende rene immunotoksinet, for å bestemme konsentrasjonen av immunotoksinet i museserumet.
- 15

- [0146] *Musexenograft-antitumoraktivitet* - Førti hunkjønnede mus med alvorlig kombinert immunsivt (SCID) ble injisert subkutan med  $10^7$  CA6-celler på dag 0, som tidligere beskrevet (Kreitman, R.J. m. fl. Int J Cancer, 81:148-155 (1999)). Tumorvolumet ble målt regelmessig med krumpasser de neste seks ukene. Når den gjennomsnittlige størrelsen nådde  $\sim 120 \text{ mm}^3$ , 6 dager etter implantering, ble musene delt inn i fem grupper á åtte og injisert QOD X 3 med 0,2 ml PBS som inneholdt 0,2 % HSA og enten HA22 (0,3 mg/kg) eller HA22-LR (1,0, 1,75, eller 2,5 mg/kg), eller gikk ubehandlet (kun PBS/0,2 % HSA). Musene ble avlivet dersom tumorene ble større enn  $1000 \text{ mm}^3$  eller når det 10 uker lange eksperimentet var over.
- 20

25

## Eksempel 2

- [0147] Dette eksempelet viser resultatene av PE-lysosomale proteasespalteundersøkelser. Immunotoksiner ble internalisert i celler via målrettet endocytose og må nå cytosolen for å utøve sin toksiske effekt. Siden lysosomer er den viktigste nedbrytende banen for eksogen, internalisert makromolekyl, må immunotoksinene unngå lysosomal nedbryting på vei til cytosolen (Fitzgerald, D., Semin Cancer Biol, 7:87-95 (1996)). Derfor ble det utført undersøkelser for å se om et immunotoksin kunne produseres ved å identifisere og fjerne lysosomale proteasespaltesteder i immunotoksinet.
- 30

35

## Lysosomal proteaseforråtnelse av immunotoksiner

[0148] For å avgjøre plasseringen til de lysosomale proteasespaltestedene i immunotoksinene ble

en stor mengde svært godt rensset immunotoksin brukt. En stor samling immunotoksiner B3(dsFv)-PE38, som inneholder samme PE38-fragment som HA22, men med en annen Fv som målhalvdel, var tilgjengelig (Reiter, Y. m. fl., Cancer Res, 54:2714-2718 (1994)). B3(dsFv)-PE38 ble inkubert enten med lysosomale ekstrakter fra Raji-celler, eller med rensset lysosomal protease katepsin B, katepsin D eller katepsin S. Allikvoter fra reaksjonen ble fjernet etter mellom 0 og 60 t, og fragmentene ble adskilt og visualisert ved å redusere SDS-PAGE.

**[0149]** Hver gel viste to forventede bindinger på tidspunkt 0, som samsvarte med de disulfid-knyttede polypeptidene VL-PE38 og VH, som beveger seg med henholdsvis omtrent 50-kDa og 12-kDa. Forråtnelse av B3(dsFv)-PE38 med lysosomal ekstrakt viste fem spaltefragmenter av 38-kDa (Lys-1), 30-kDa (Lys-2), 27-kDa (Lys-3), 25-kDa (Lys-4), og 23-kDa (Lys-5). Katepsin B-forråtnelse viste tre fragmenter av 38-kDa (B-1), 30-kDa (B-2) og 25-kDa (B-3). Katepsin D-forråtnelse viste minst fem fragmenter: 36-kDa (D-1), 30-kDa (D-2), 15-kDa (D-3), 14-kDa (D-4) og 13-kDa (D-5). Forråtnelse med katepsin S viste fire fragmenter: 38-kDa (S-1), 30-kDa (S-2), 25-kDa (S-3) og 13-kDa (S-4). De fire forråtnelsene inneholder flere fragmenter som beveger seg med lignende molekyllvekt, hvilket kan tyde på at spaltestedene kan ligne hverandre.

**[0150]** For å finne spaltestedene ble fragmentene adskilt av SDS-PAGE, immobilisert ved elektroblotting og ordnet i henhold til Edman-degradering. N-terminalsekvensene ble sammenlignet med sekvensen til B3(dsFv)-PE38, for å finne spaltestedene. Sekvensene fra flere fragmenter samsvarer med the N-terminus til B3(dsFv)-PE38 VL-PE38 (Lys-4, Lys-5, D-5, og S-4). De resterende fragmentene er plassert i domene II eller Ib på PE38. Ingen spaltesteder ble funnet i Fv- eller PE-doene III.

## **Fjerning av proteaseutsatte områder**

**[0151]** Siden det finnes mange lysosomale proteaser med bred og ofte overlappende spesifisitet og de obsverte stedene er samlet i et begrenset segment i PE38, ble spaltestedene eliminert ved at man foretok slettinger for å fjerne stedene.

**[0152]** Selv om B3(dsFv)-PE38 ble brukt til å studere spaltestedene, brukes det ikke lenger til behandlingsbruk. Et annet PE38-basert immunotoksin, HA22, ble brukt til å studere effekten av sletting av steder. HA22 er en affinitetsoptimert, mer aktiv variant av anti-CD22-immunotoksinet BL22 (Salvatore, G. m. fl., Clin Cancer Res, 8:995-1002 (2002)), og gjennomgår for tiden klinisk testing for behandling av B-cellelidelser (kronisk lymfocytisk leukemi [CLL], hårcelleleukemi [HCL] og akutt lymfoblastisk leukemi [ALL]). En serie slettinger som fjernet store segmenter av domene II og Ib fra PE38 ble satt inn i HA22. Mutantproteinene ble uttrykt, rensset og sammenlignet med HA22 *in vitro* med cytotoxissitetsanalyser av Raji-celler.



[0153] Figur 3 indikerer andelen av den naturlige PE-sekvensen som forblir i HA22 og i andre muterte former for PE (betegnet som M1-M5) som ble opprettet i løpet av herværende undersøkelser og aktivitetene til M1-M5 i forhold til Ha22 på Raji-celler. Fjerning av restene 251 til 273 (M1) eller 365 til 394 (M2) har ingen betydelig påvirkning på immunotoksinaktivitet. På samme måte vil det å slette restene 251 til 273 og 350 til 394, samt det å endre en fri cystein på posisjon 287 til serien (M3) danne et fullt aktivt immunotoksin. C287S-mutasjonen, kombinert med sletting av restene 350 til 394 og 251 til 280 (M4), som fjerner furinspalting ved Arg279, danner et immunotoksin som er omtrent 5 ganger mindre aktivt enn HA22. Uventet var en mutasjon med mange slettinger, som fjernet de fleste restene og alle spaltesteden fra domene II og Ib (M5), fortsatt svært aktive. M5-mutasjonen beholder kun en 11-resters sekvens (274-284) i domene II, som inneholder furin-gjenkjenningen og Arg279-spaltestedet.

[0154] M5 HA22-mutasjonen fikk den nye betegnelsen "HA22-LR" for å indikere at den er "lysosom-resistent". For å verifisere at HA22-LR er resistent overfor lysosomal nedbryting ble den behandlet med lysosomale ekstrakter og undersøkt av SDS-PAGE over 24 timer. Mens HA22 stort sett er hydrolisert i mindre deler etter 30 min og fullstendig fragmentert etter 4 timer, var proteolysen for HA22-LR betydelig tregere, med såvidt påvisbar hydrolyse etter 2 t og en hovedsaklig intakt fraksjon fortsatt påvisbar etter 24 t.

### Eksempel 3

[0155] Dette eksempelet tilveiebringer resultatet av undersøkelsene om aktiviteten til HA22-LR på CD22-positive cellelinjer.

[0156] Aktiviteten til HA22-LR ble undersøkt på flere CD22-positive tumorcellelinjer og sammenlignet med HA22 ved hjelp av en paret, to-halet t-test mellom de resulterende  $IC_{50}$ -verdiene (tabell 1). HA22-LR hadde en aktivitet som ikke kunne skjelnes fra HA22 på Ramos (n=3), CA46 (n=5), og Daudi (n=3) lymfomcellelinjer, men hadde store ulikheter i forhold til WSU-CLL-cellelinjen (212 % aktivitet,  $p=0,01$ , n=4), KOPN-8 ALL-cellelinjen (22 % aktivitet,  $p=0,01$ , n=3), og Raji-cellelinjen (49 %,  $p=0,0002$ , n=10). Selv om det er litt variasjon i aktiviteten til HA22-LR, hadde HA22-LR og HA22 generelt lignende aktiviteter på de CD22-positive cellelinjene.

**Tabell 1. Aktiviteten til HA22 og HA22-LR på seks CD22-positive cellelinjer**

| $IC_{50} \pm SE$ (ng/ml) |                 |                 |                   |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Cellelinje               | HA22            | HA22-LR         | Relativ aktivitet |
| CA46 (n=5)               | $0,30 \pm 0,08$ | $0,26 \pm 0,06$ | 1,15              |
| Daudi (n=3)              | $0,27 \pm 0,04$ | $0,24 \pm 0,04$ | 1,12              |

| IC <sub>50</sub> ± SE (ng/ml)                                                                                                  |             |             |                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------------|
| Cellelinje                                                                                                                     | HA22        | HA22-LR     | Relativ aktivitet |
| Ramos (n=3)                                                                                                                    | 1,62 ± 0,28 | 1,78 ± 0,15 | 0,91              |
| Raji* (n=10)                                                                                                                   | 0,36 ± 0,04 | 0,73 ± 0,09 | 0,49              |
| KOPN-8* (n=3)                                                                                                                  | 0,10 ± 0,02 | 0,45 ± 0,05 | 0,22              |
| WSU-CLL* (n=4)                                                                                                                 | 2,50 ± 0,53 | 1,18 ± 0,34 | 2,12              |
| *Indikerer signifikant forskjell (p < 0,05 i en paret, to-halet t-test) mellom IC <sub>50</sub> -verdiene til HA22 og HA22-LR. |             |             |                   |

#### Eksempel 4

**[0157]** Dette eksempelet tilveiebringer resultatet av undersøkelsene om aktiviteten til HA22-LR på CD22-positive ondartede celler som nettopp har blitt innhentet fra pasienter.

**[0158]** For å slå fast om det nye immunotoksinet også kunne drepe celler som var hentet direkte fra pasienter, ble det testet på celler fra 5 pasienter med CLL og 3 med HCL. Som vist i tabell 2 ble det observert aktivitet i alle pasientcellepopulasjoner som ble testet med HA22-LR. I CLL var ondartede celler fra alle 5 pasienter mer følsomme overfor HA22-LR enn HA22, med et gjennomsnitt på over 17 ganger (p = 0,009, Wilcoxon). IC<sub>50</sub>-er for hemming av proteinsyntese varierte mellom <1 og 5,6 ng/ml. HA22-LR-hemmet proteinsyntese ved 55 % ved 1 ng/ml i celler fra pasient-CLL #2 (IC<sub>50</sub> <1 ng/ml). Analyser for celledødelighet i CLL-pasientceller viste også mer følsomhet overfor HA22-LR enn HA22. Mens IC<sub>50</sub>-ene til HA22 i CLL-pasientceller varierte stort, fra 8 til >1000 ng/ml, varierte IC<sub>50</sub>-er for HA22-LR mindre enn 10 ganger. I HCL var HA22-LR generelt mindre aktivt enn HA22, med hensyn til hemming av proteinsyntese. Undersøkelser for celledødelighet i to av de tre HCL-pasientpopulasjonene viste tilsvarende funn. Oppsummert var HA22-LR svært cytotoxisk mot CD22-positive CLL- og HCL-celler, men blant CLL-celler, som viste varierende følsomhet overfor HA22, var cytotoxisiteten til HA22-LR betydelig kraftigere og mer ensartet.

**Tabell 2. Cytotoksisitet for HA22 og HA22-LR mot kronisk lymfocytisk leukemi- (CLL) og hårcelleleukemi- (HCL) celler nylig innhentet fra pasienter**

| IC <sub>50</sub> ± SD (ng/ml) |             |              |                   |                |
|-------------------------------|-------------|--------------|-------------------|----------------|
| Type og pasientnr.            | HA22        | HA22-LR      | Relativ aktivitet | Analysetype    |
| CLL #1                        | >1000       | 4,7 ± 0,54   | > 210             | Proteinsyntese |
| CLL #1                        | 55 ± 12,8   | 3,4 ± 0,53   | 16,2              | Celledød       |
| CLL #2                        | 16,8 ± 1,05 | < 1          | > 16,8            | Proteinsyntese |
| CLL #2                        | 10,1 ± 0,48 | 1,32 ± 0,164 | 7,65              | Celledød       |

| IC <sub>50</sub> ± SD (ng/ml) |                |             |                   |                |
|-------------------------------|----------------|-------------|-------------------|----------------|
| Type og pasientnr.            | HA22           | HA22-LR     | Relativ aktivitet | Analysetype    |
| CLL #3                        | 8,1 ± 2,1      | 3,9 ± 0,50  | 2,07              | Proteinsyntese |
| CLL #4                        | 290 ± 167      | 5,6 ± 1,10  | 51,8              | Proteinsyntese |
| CLL #5                        | 8,0 ± 1,51     | 3,7 ± 0,27  | 2,16              | Proteinsyntese |
|                               |                |             |                   |                |
| HCL #1                        | 5,2 ± 0,37     | 5,9 ± 1,03  | 0,88              | Proteinsyntese |
| HCL #2                        | 0,177 ± 0,0062 | 1,25 ± 0,24 | 0,14              | Proteinsyntese |
| HCL #2                        | 0,165 ± 0,0098 | 2,0 ± 0,39  | 0,08              | Celledød       |
| HCL #3                        | 1,76 ± 0,51    | < 1         | > 1,76            | Proteinsyntese |
| HCL #3                        | 2,1 ± 0,51     | 1,51 ± 0,29 | 1,39              | Celledød       |

### Eksempel 5

**[0159]** Dette eksempelet legger frem resultatet av undersøkelsene om toksisitet og farmakonetikk for HA22-LR på mus.

### Toksisitetsundersøkelser

**[0160]** Nakenmus ble injisert intravenøst med en enkelt dose HA22-LR på mellom 2,5 og 20 mg/kg og observert i 10 dager. Det ble ikke observert noen dødsfall opp til dosenivået på 20 mg/kg (tabell 3). Høyere doser ble ikke evaluert. I sterk kontrast, og i samsvar med tidligere data (Bang, S. m. fl., Clin Cancer Res, 11:1545-1550 (2005)), førte en 2,0 mg/kg stor dose HA22 til dødsfall blant 100 % (5/5) av musene. En enkelt dose intravenøst v. LD<sub>50</sub> HA22-LR er større enn 20 mg/kg, hvilket indikerer 10 ganger mindre ikke-spesifikk toksisitet i forhold til HA22.

### Farmakokinetikk

**[0161]** Balb/c-mus ble injisert med 10 µg av enten HA22 eller HA22-LR og blod ble tappet i intervaller på mellom 2 og 60 min. Immunotoksinkonsentrasjonene i museserumet ble målt med ELISA. Dataene ble tilpasset en enkelt eksponensiell forråtnelsesfunksjon (fig. 5). Halveringstiden (t<sub>1/2</sub>) for HA22 var 14,6 min (k=0,047), mens halveringstiden for HA22-LR var 7,8 min (k=0,089).

**Tabell 3. Ikke-spesifikk toksisitet for HA22-LR**

| Immunotoksin | Dose (mg/kg) | Dødsfall / totalt ant. mus |
|--------------|--------------|----------------------------|
| HA22         | 2,0          | 5/5                        |

| Immunotoksin | Dose (mg/kg) | Dødsfall / totalt ant. mus |
|--------------|--------------|----------------------------|
| HA22-LR      | 2,5          | 0/12                       |
|              | 5,0          | 0/4                        |
|              | 10           | 0/10                       |
|              | 20           | 0/10                       |

### Eksempel 6

**[0162]** Dette eksempelet presenterer resultatene av *in vivo*-studier av HA22-LR på xenograft i mus.

**[0163]** Basert på sammenlignbarheten mellom *in vitro*-aktiviteten til HA22 og HA22-LR og den lave dyretoksisiteten til HA22-LR, ble effektiviteten til HA22-LR testet på en xenografttumormodell for mus. SCID-mus med CA46-xenografttumorer på i snitt  $\sim 120 \text{ mm}^3$  ble behandlet intravenøst QOD X 3 med PBS, 0,3 mg/kg HA22, eller HA22-LR i doser på 1,0, 1,75, eller 2,5 mg/kg. Tumorstørrelsen ble målt regelmessig i opptil 40 dager (fig. 6) og observert visuelt i 10 uker.

**[0164]** Tumorene på PBS-behandlede mus vokste raskt til en gjennomsnittlig størrelse på over  $1000 \text{ mm}^3$  på dag 26. Mus som ble behandlet på dag 6, 8 og 10 med 0,3 mg/kg HA22, den maksimale dosen som kan gis til mus QOD X 3 uten toksisitet, førte til regresjoner som minsket den gjennomsnittlige tumorstørrelsen til minst  $\sim 52 \text{ mm}^3$  på dag 12. Ved dag 21 hadde alle tumorene igjen begynt å vokse raskt.

**[0165]** Tumoerresponsen på 1,0 mg/kg HA22-LR lignet på responsen på 0,3 mg/kg HA22, men 1,75 mg/kg HA22-LR var langt mer effektivt. På dag 14 hadde 5/8 mus behandlet med 1,75 mg/kg HA22-LR upåviselige tumorer, som forble umerkelige under resten av studien. De andre tumorene krympet først, men vokste sidne til en gjennomsnittlig størrelse på  $54 \text{ mm}^3$  ved dag 40. Den 2,5 mg/kg store dosen HA22-LR viste en bemerkelsesverdig antitumor-aktivitet. På 7/8 mus hadde tumorene forsvunnet helt i løpet av dag 10, og de hadde ikke kommet tilbake etter 10 uker. En tumor krympet til  $10 \text{ mm}^3$  på dag 14, men hadde vokst til  $30 \text{ mm}^3$  på dag 40. Vi konkluderer med at den lave dyretoksisiteten til HA22-LR gjør det mulig å administrere større doser immunotoksin trygt, hvilket bedrer antitumor-aktiviteten i immunotoksinet dramatisk.

### Eksempel 7

**[0166]** Dette eksempelet diskuterer resultatene av studier som bruker som målrettet halvdel et antistoff som binder et antidgen kalt mesotelin og som finnes på overflaten på mange kreftformer.

- [0167] Et immunotoksin som bruker antistoffet, kjent som "SS1" (se f.eks. amerikansk patent nr. 7.081,5118), som målrettet halvdel, og PE38 som toksinhalvdel, ble testet i en klinisk studie, fase 1, på pasienter med mesoteliom eller eggstokkreft, som hadde mislykket med vanlig behandling (Hassan, R. m. fl., Clin Cancer Res, 13:5144-5149 (2007)). For å sammenligne virkningen av lysosom-resistent PE i oppfinnelsen, ble PE-en som ble brukt i HA22-LR-immunotoksinet som ble diskutert i foregående eksempler smeltet til antistoffet SS1, slik at de dannet immunotoksinet SS1-PE-LR, og dette ble testet på mesotelin-utpressende cellelinjer mot et tilsvarende immunotoksin av SS1 smeltet til PE38.
- [0168] Resultatene vises i tabell 4. Som vi ser, for to av cellelinjene, var cytotoxisiteten sammenlignbar, mens for en av cellelinjene var immunotoksinet med PE-LR 3,72 ganger mer cytotoxisk på cellene enn immunotoksinet som ble laget med PE38. På en cellelinje hadde SS1-PE-LR-immunotoksinet omtrent halvparten så mye toksisitet som PE38-immunotoksinet, hvilket indikerer at det kunne være svært nyttig dersom det, i likhet med HA22-LR-immunotoksinet, kan administreres i langt høyere doser uten toksisitet. SS1-PE-LR-immunotoksinet hadde IC50-verdier i ensifret ng/ml-område for 5 av de 6 cellelinjene som ble testet. For en av cellelinjene var SS1-PE-LR-immunotoksinet langt mer cytotoxisk overfor cellene enn den PE38-baserte immunotoksinen. Disse resultatene viser at immunotoksiner som bruker PE-LR som toksisk halvdel sannsynligvis vil være viktige behandlingsmidler, men som de fleste behandlingsmidler vil de ikke nødvendigvis være nyttige mot celler fra alle krefttyper eller andre sykdommer. Praktiseren kan enkelt avgjøre hvorvidt en bestemt tenkt modul som bruker oppfinnelsens PE som toksinhalvdel vil være effektiv mot målceller, for eksempel cellene i pasientens kreft, ved å ta biopsi av målcellene som det tenkte molekylet skal rettes mot og teste det tenkte molekylet på de biopsi-behandlede cellene, for å se om de er mottakelige for å få hemmet veksten med det tenkte molekylet, med en IC50 med ensifret ng/mL, hvilket indikerer at veksthemmingen er akseptabel.

**Tabell 4. Cytotoxisitet for SS1-PE- og SS1-PE-LR-immunotoksin for celler med mesotelin-utpressende cellelinjer.**

| Cellelinje | Målrettet halvdel | IC50 (ng/ml)                 |                               | Relativ aktivitet |
|------------|-------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|
|            |                   | Immunotoksin dannet med PE38 | Immunotoksin dannet med PE-LR |                   |
| L55        | SS1               | 4,77 ± 0,87                  | 3,87 ± 0,41                   | 1,23              |
| A1847      | SS1               | 4,06 ± 0,35                  | 4,24 ± 0,28*                  | 0,96              |
| A431/K5    | SS1               | 0,20 ± 0,02                  | 1,19 ± 0,19                   | 0,17              |

| Cellelinje | Måltrettet halvdel | IC50 (ng/ml)                 |                               | Relativ aktivitet |
|------------|--------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|
|            |                    | Immunotoksin dannet med PE38 | Immunotoksin dannet med PE-LR |                   |
| OVCAR-8    | SS1                | 2,32 ± 0,58                  | 4,29 ± 0,67*                  | 0,54              |
| HAY        | SS1                | 4,54 ± 0,59                  | 1,22 ± 0,15                   | 3,72              |
| KB31       | SS1                | 5,15 ± 0,57                  | ≥1000*                        | ≥200X minskning   |

\* - Ufullstendig celledød.

### Eksempel 8

**[0169]** Dette eksempelet diskuterer resultatene av studiene som presenteres heri.

5

**[0170]** Sletting av protease-utsatte steder i PE produserte en mindre form for PE, som i et standard immunotoksin, HA22-LR, opprettholdt utmerket cytotoxisk aktivitet på CD22-positive cellelinjer og på celler som var direkte isolert fra pasienter med HCL og CLL. I tillegg var HA22-LR betydelig mindre giftig for mus, med mer enn 10 ganger reduksjon i ikke-spesifikk toksisitet.

10 Tidligere studier på mus har vist at HA22 har en enkeltdose-LD<sub>0</sub> på 1,33 mg/kg (Bang, S. m. fl., Clin Cancer Res, 11:1545-1550 (2005)). Studiene som ligger til grunn for herværende oppfinnelse viste at en enkelt intravenøs dose på 2,0 mg/kg HA22 drepte 5/5 mus, mens doser på HA22-LR opptil 20 mg/kg ikke drepte noen av musene som ble injisert. Denne store nedgangen i dyretoksitet muliggjorde administrering av langt større behandlingsdoser, som førte til langt bedre antitumor-aktivitet.

15

**[0171]** Den ikke-spesifikke toksisiteten til immunotoksiner blant mus er hovedsaklig resultatet av leverskade (Kreitman, R.J. m. fl., Blood, 83:426-434 (1994); Onda, M. m. fl., J Immunol, 165:7150-7156 (2000); Onda, M. m. fl., J Immunol, 163:6072-6077 (1999); Onda, M. m. fl., Cancer Res, 61:5070-5077 (2001)), og toksisitet blant pasienter skyldes også delvis hepatisk toksisitet (Kreitman, R.J. m. fl., J Clin Oncol, 23:6719-6729 (2005); Hassan, R. m. fl., Clin Cancer Res, 13:5144-5149 (2007); Kreitman, R.J. m. fl., N Engl J Med., 345:241-247 (2001); Kreitman, R.J. m. fl., J Clin Oncol, 18:1622-1636 (2000)). Muselevertoksisitet overfor LMB-2 (en immunotoksin målrettet mot interleukin-2-reseptoren), og dermed alle PE38-immunotoksiner, er forbundet med akkumulering av immunotoksinet i Kupffer-celler i leveren, hvilket fører til lokalisert utslipp av TNF-α og alvorlig hepatotoksitet (Onda, M. m. fl., J Immunol, 165:7150-7156 (2000)). Den lave ikke-

25

spesifikke toksisiteten til HA22-LR indikerer at den mangler elementer i HA22, antakeligvis segmentene som ble fjernet fra domenene II og Ia, og som er ansvarlige for Kupffer-cellens opptak og/eller stimulering av TNF- $\alpha$ -utløsning. De fjernede segmentene er imidlertid ikke grunnleggende for anti-CD22-måltrettet toksisitet, siden HA22-LR opprettholder en antitumor-aktivitet på linje med HA22.

**[0172]** En annen faktor som kan bidra til forskjellen i ikke-spesifikk toksisitet er forskjellen på halveringstiden til HA22 og HA22-LR (fig. 5), som i seg selv antakeligvis skyldes mer effektivt filtrering og fjerning av HA22-LR (51,0 kDa) enn HA22 (63,3 kDa) av glomeruli i nyren (Brenner, B.M. m. fl., *Am J Physiol*, 234:F455-F460 (1978)). Den to ganger forskjellen i halveringstiden er i seg selv ikke tilstrekkelig til å forklare den >10 ganger forskjellen i ikke-spesifikk toksisitet. Tidligere forsøk på å redusere den ikke-spesifikke toksisiteten til immunotoksiner har vist at å senke det isoelektriske punktet (pI) til Fv i immunotoksinene LMB-2, B3(dsFv)-PE38, eller SS1P senker deres ikke-spesifikke toksisitet omtrent 2 til 3 ganger på mus (Onda, M. m. fl., *J Immunol*, 163:6072-6077 (1999); Onda, M. m. fl., *Cancer Res*, 61:5070-5077 (2001)). Denne observasjonen tar ikke hensyn til forskjellen mellom HA22 og HA22-LR, da disse to begrepene har identisk Fv og pI for HA22-LR er noe større enn pI for HA22 (pI<sub>HA22</sub>=5,26 og pI<sub>HA22-LR</sub>=5,63). I tillegg er den 2 til 3 gangers forskjellen i toksisitet som ble observert for denne strategien også langt mindre enn den >10 gangers forskjellen mellom HA22 og HA22-LR.

**[0173]** For å produsere HA22-LR-immunotoksinet ble lysosomale proteasespaltesteder inne i PE38 bestemt og slettet. Immunotoksinet B3(dsFv)-PE38 ble forråtnet med både lysosomale ekstrakter og Cathepsiner B, D og S, som er implisert i antigenbehandling (Plüger, E.B. m. fl., *Eur J Immunol*, 32:467-476 (2002); Zhang, T. m. fl., *Immunology*, 100:13-20 (2000); Deussing, J. m. fl., *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:4516-4521 (1998); Nakagawa, T.Y. m. fl., *Immunity*, 10:207-217 (1999); Shi, G.P. m. fl., *Immunity*, 10:197-206 (1999)). Den lysosomale proteasespaltingen av PE-baserte immunotoksiner viste seg å være konsentrert i domenene II og Ib på PE38-toksinfragmentet. Tidligere arbeid med naturlig PE har vist at domene Ib er svært utsatt for begrenset proteolyse med cymotrypsin, Staphylococcal serinprotease, pepsin A, og subtilisin (Bourdenet, S. m. fl., *Eur J Biochem*, 192:379-385 (1990)), noe som bekrefter at domene Ib er lett tilgjengelig for proteaser. Resultatene heri viser at domene II i PE38 også er protease-tilgjengelige, mens domene III ikke er like enkelt spaltet, antakelig på grunn av en mer kompakt og stabil oppbygning.

**[0174]** Informasjonen fra spalteanalysen ble brukt til å produsere en serie slettinger i HA22-immunotoksinet, som i begrepet kalt "M5" fjernet det meste av domenene II og Ib, slik at det kun gjensto en kort lengde på 11 aminosyrer fra domene II (fig. 3). Dette fragmentet på 11 rester er bygget opp av aminosyresekvensen RHRQPRGWEQL (SEKV ID NR:11) og inneholder et

furinproteasespaltested som er viktig for intracellulær behandling og aktivering av det naturlige toksinet (Ogata, M. m. fl., J Biol Chem, 265:20678-20685 (1990); Jinno, Y. m. fl., J Biol Chem, 264: 15953-15959 (1989)). Dette begrepet, med det nye navnet HA22-LR, som trekker frem dens forbedrede motstandsdyktighet mot lysosomale proteaser, er dannet av en anti-CD22 dsFv som er festet til et 25-kDa fragment av PE (PE25), som inneholder fragmentet med 11 rester fra domene II og hele domene III. Når det ble utprøvd på flere CD22-utpressende cellelinjer ar aktiviteten til HA22-LR nesten lik HA22-immunotoksinet den ble avledet fra.

**[0175]** Tidligere forskning har vist at domene Ib ikke er grunnleggende viktig for aktiviteten til PE-immunotoksiner (Sieggall, C.B. et al., J Biol Chem, 264:14256-14261 (1989); Kihara, A. og Pastan, I., Bioconjug Chem, 5:532-538 (1994); Debinski, W. m. fl., Mol Cell Biol, 11:1751-1753 (1991); Kuan, C.T. og Pastan, I., Proc Natl Acad Sci USA, 93:974-978 (1996); Prior, T.I. m. fl., Biochemistry, 31:3555-3559 (1992)). Domene II tror man imidlertid spiller en stor rolle i membrantransport ved PE-intoksikasjon (Hwang, J. m. fl., Cell, 48:129-136 (1987); Prior, T.I. m. fl., Biochemistry, 31:3555-3559 (1992); Taupiac, M.P. m. fl., Mol Microbiol, 31:1385-1393 (1999); Wedekind, J.E. m. fl., J Mol Biol, 314:823-837 (2001); Méré, J. m. fl., J Biol Chem, 280:21194-21201 (2005)). Resultatene som rapporteres heri indikerer at en viktig komponent av transportaktiviteten i domene II kan lokaliseres til en kort rad rester rundt furinspaltestedet. Dataene viser 5 ganger minskning i aktiviteten til M4-mutasjonen, som eliminerer furinspaltestedet, og tidligere arbeid (Jinno, Y. m. fl., J Biol Chem, 264:15953-15959 (1989)) indikerer at furinspalting spiller en viktig rolle i cytotoxissiteten til PE. En annen mulighet er at motstandsdyktigheten til HA22-LR overfor lysosomal degradering kan kompensere for eventuelt tapt transportaktivitet, ved at det lar HA22-LR to overleve lengre i cellen. Celleoverflatemålene til immunotoksiner og den målrettede celletypen kan også påvirke deres intracellulære trafikk og tilgang til cytosolen.

**[0176]** HA22-LR hadde lignende eller noe mindre cytotoxissitet, sammenlignet med HA22, på celler med høy CD22-utpressing, inkludert CD22-positive cellelinjer og ferske HCL-celler. Imidlertid var cytotoxissiteten på CLL-celler kraftigere og mer ensartet enn HA22. Dette kan skyldes motstandsdyktigheten til HA22-LR overfor lysosomal degradering, som fører til lengre intracellulær overlevelse, i forhold til HA22. Det er lite sannsynlig at dette kun skyldtes at HA22-LR overlever lengre enn HA22 i mediet under den 3 dager lange inkubasjonsperioden som ble brukt i undersøkelsene, sidne andre eksperimenter har vist at HA22 har utmerket stabilitet i serum og i cellekulturer. Det er mulig at lysosomal proteaseforråtnelse er en viktig mekanisme i immunotoksinresistens for CLL-celler og at HA22-LR-molekylet overlever denne motstandsdyktigheten. Lysosomal proteaseforråtnelse kan også være tilstede i celler med høy CD22-utpressing, men kan være behandlingsbegrensende kun i CLL, der CD22-utpressingen er lav og et relativt lite antall internaliserte molekyler begrenser immunotoksinets aktivitet. I tillegg er aktiviteten i HA22-LR i CLL svært lik den som ble observert for HA22 i HCL, hvilket antyder at



HA22-LR bør utvikles videre, som mulig behandling for denne sykdommen.

**[0177]** I tillegg til ikke-spesifikke toksisiteter er en annen viktig faktor som begrenser nyttigheten til immunotoksinene utviklingen av antistoffer som reagerer med toksinet og nøytraliserer dets effektivitet. Annet arbeid fra laboratoriet til herværende oppfinnere nylig beskrev et mutant immunotoksin, HA22-8X, som er betydelig mindre immjunogent på mus, fordi mange, men ikke alle, av B-celleepitopene ble fjernet. Heldigvis er størsteparten av de gjenværende B-celleepitopene i HA22-8X plassert i områdene til domene II som ble slettet i HA22-LR. Når man kombinerer mutasjonene i begge disse molekylerne, dannes et immunotoksin som er enda mindre immunogent.

**[0178]** HA22-LR har flere fordele sammenlignet med HA22, som forventes å kunne brukes på andre PE-immunotoksiner, men som er spesielt lovende for behandling av CLL. Den ikke-spesifikke toksisiteten til HA22-LR på mus er mer enn 10 ganger lavere enn HA22. Bruk av HA22-LR bør derfor bidra til å forhindre behandlingsrelaterte bivirkninger og la pasienter motta større doser, med bedre behandlingsresultater på mennesker. I tillegg vil de slettede elementene som ble brukt til å generere HA22-LR fjerne kjente antistoffepitoper og dermed antakeligvis bidra til å begrense genereringen av nøytraliserende antistoffer, slik at flere behandlingssykluser kan gis til pasientene. I forhold til HA22 har HA22-LR også vist betydelig forbedret og mer ensartet aktivitet mot pasientavledede CLL-celler, og generelt lignende aktivitet på CD22-positive celler og HCL-pasientceller. Av disse årsakene utgjør HA22-LR et viktig fremskritt i utviklingen av immunotoksiner.

## SEKVENSLISTE

## [0179]

5           <110> Pastan, Ira H. Weldon, John FitzGerald, David The Government of the United States  
of America, representert av The Secretary of the Department of Health and Human  
Services

10           <120> Deletions in Domain II of Pseudomonas  
Exotoxin A That Remove Immunogenic Epitopes

            <130> 015280-545100PC

            <140> WO PCT/US08/75296  
            < 141> 2008-09-04

15           <150> US 60/969,929  
            < 151> 2007-09-04

            <150> US 61/018,853  
20           < 151> 2007-01-03

            <160> 34

            <170> FastSEQ for Windows, versjon 4.0

25           <210> 1  
            < 211> 613  
            < 212> PRT  
            < 213> Pseudomonas aeruginosa

30           <220>  
            < 223> naturlig Pseudomonas-eksotoksin A (PE)

            <400> 1

35

50

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Glu | Glu | Ala | Phe | Asp | Leu | Trp | Asn | Glu | Cys | Ala | Lys | Ala | Cys | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Asp | Leu | Lys | Asp | Gly | Val | Arg | Ser | Ser | Arg | Met | Ser | Val | Asp | Pro |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ala | Ile | Ala | Asp | Thr | Asn | Gly | Gln | Gly | Val | Leu | His | Tyr | Ser | Met | Val |
|     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Leu | Glu | Gly | Gly | Asn | Asp | Ala | Leu | Lys | Leu | Ala | Ile | Asp | Asn | Ala | Leu |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Ser | Ile | Thr | Ser | Asp | Gly | Leu | Thr | Ile | Arg | Leu | Glu | Gly | Gly | Val | Glu |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Pro | Asn | Lys | Pro | Val | Arg | Tyr | Ser | Tyr | Thr | Arg | Gln | Ala | Arg | Gly | Ser |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Trp | Ser | Leu | Asn | Trp | Leu | Val | Pro | Ile | Gly | His | Glu | Lys | Pro | Ser | Asn |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ile | Lys | Val | Phe | Ile | His | Glu | Leu | Asn | Ala | Gly | Asn | Gln | Leu | Ser | His |
|     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Met | Ser | Pro | Ile | Tyr | Thr | Ile | Glu | Met | Gly | Asp | Glu | Leu | Leu | Ala | Lys |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Leu | Ala | Arg | Asp | Ala | Thr | Phe | Phe | Val | Arg | Ala | His | Glu | Ser | Asn | Glu |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Met | Gln | Pro | Thr | Leu | Ala | Ile | Ser | His | Ala | Gly | Val | Ser | Val | Val | Met |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Gln | Thr | Gln | Pro | Arg | Arg | Glu | Lys | Arg | Trp | Ser | Glu | Trp | Ala | Ser |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Gly | Lys | Val | Leu | Cys | Leu | Leu | Asp | Pro | Leu | Asp | Gly | Val | Tyr | Asn | Tyr |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Leu | Ala | Gln | Gln | Arg | Cys | Asn | Leu | Asp | Asp | Thr | Trp | Glu | Gly | Lys | Ile |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Tyr | Arg | Val | Leu | Ala | Gly | Asn | Pro | Ala | Lys | His | Asp | Leu | Asp | Ile | Lys |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Pro | Thr | Val | Ile | Ser | His | Arg | Leu | His | Phe | Pro | Glu | Gly | Gly | Ser | Leu |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ala | Ala | Leu | Thr | Ala | His | Gln | Ala | Cys | His | Leu | Pro | Leu | Glu | Thr | Phe |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Thr | Arg | His | Arg | Gln | Pro | Arg | Gly | Trp | Glu | Gln | Leu | Glu | Gln | Cys | Gly |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Tyr | Pro | Val | Gln | Arg | Leu | Val | Ala | Leu | Tyr | Leu | Ala | Ala | Arg | Leu | Ser |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Trp | Asn | Gln | Val | Asp | Gln | Val | Ile | Arg | Asn | Ala | Leu | Ala | Ser | Pro | Gly |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Ser | Gly | Gly | Asp | Leu | Gly | Glu | Ala | Ile | Arg | Glu | Gln | Pro | Glu | Gln | Ala |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Arg | Leu | Ala | Leu | Thr | Leu | Ala | Ala | Ala | Glu | Ser | Glu | Arg | Phe | Val | Arg |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Gln | Gly | Thr | Gly | Asn | Asp | Glu | Ala | Gly | Ala | Ala | Asn | Ala | Asp | Val | Val |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Ser | Leu | Thr | Cys | Pro | Val | Ala | Ala | Gly | Glu | Cys | Ala | Gly | Pro | Ala | Asp |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Asp | Ala | Leu | Leu | Glu | Arg | Asn | Tyr | Pro | Thr | Gly | Ala | Glu | Phe |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Leu | Gly | Asp | Gly | Gly | Asp | Val | Ser | Phe | Ser | Thr | Arg | Gly | Thr | Gln | Asn |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Trp | Thr | Val | Glu | Arg | Leu | Leu | Gln | Ala | His | Arg | Gln | Leu | Glu | Glu | Arg |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Gly | Tyr | Val | Phe | Val | Gly | Tyr | His | Gly | Thr | Phe | Leu | Glu | Ala | Ala | Gln |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Ser | Ile | Val | Phe | Gly | Gly | Val | Arg | Ala | Arg | Ser | Gln | Asp | Leu | Asp | Ala |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Ile | Trp | Arg | Gly | Phe | Tyr | Ile | Ala | Gly | Asp | Pro | Ala | Leu | Ala | Tyr | Gly |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Tyr | Ala | Gln | Asp | Gln | Glu | Pro | Asp | Ala | Arg | Gly | Arg | Ile | Arg | Asn | Gly |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Ala | Leu | Leu | Arg | Val | Tyr | Val | Pro | Arg | Ser | Ser | Leu | Pro | Gly | Phe | Tyr |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |
| Arg | Thr | Ser | Leu | Thr | Leu | Ala | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Glu | Val | Glu |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |

<210> 2

< 211> 4

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

5

<220>

< 223> syntetisk tilleggssekvens med PE-karboksylterminus

<400> 2

10

Lys Asp Glu Leu  
1

<210> 3

< 211> 4

15

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> syntetisk tilleggssekvens med PE-karboksylterminus

20

<400> 3

Arg Glu Asp Leu  
1

25

<210> 4

< 211> 128

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

30

<220>

< 223> syntetisk 38 kD PE-avkortet form (PE38) domener II (rester 251-364) og Ib (rester 365-394)

<400> 4

35

53

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Glu | Gly | Gly | Ser | Leu | Ala | Ala | Leu | Thr | Ala | His | Gln | Ala | Cys | His |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Leu | Pro | Leu | Glu | Thr | Phe | Thr | Arg | His | Arg | Gln | Pro | Arg | Gly | Trp | Glu |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gln | Leu | Glu | Gln | Cys | Gly | Tyr | Pro | Val | Gln | Arg | Leu | Val | Ala | Leu | Tyr |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Leu | Ala | Ala | Arg | Leu | Ser | Trp | Asn | Gln | Val | Asp | Gln | Val | Ile | Arg | Asn |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Ala | Leu | Ala | Ser | Pro | Gly | Ser | Gly | Gly | Asp | Leu | Gly | Glu | Ala | Ile | Arg |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Glu | Gln | Pro | Glu | Gln | Ala | Arg | Leu | Ala | Leu | Thr | Leu | Ala | Ala | Ala | Glu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ser | Glu | Arg | Phe | Val | Arg | Gln | Gly | Thr | Gly | Asn | Asp | Glu | Ala | Gly | Ala |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ala | Asn | Gly | Pro | Ala | Asp | Ser | Gly | Asp | Ala | Leu | Leu | Glu | Arg | Asn | Tyr |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |

&lt;210&gt; 5

&lt; 211&gt; 5

5

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk naturlig PE-karboksyl-terminalsekvens (rester 609-613)

10

&lt;400&gt; 5

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Glu | Asp | Leu | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |

15

&lt;210&gt; 6

&lt; 211&gt; 4

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

20

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk minimalt furinspaltested

&lt;220&gt;

&lt; 221&gt; MOD\_RES

25

&lt; 222&gt; (2) ... (3)

&lt; 223&gt; Xaa = hvilken som helst aminosyre

<400> 6

Arg Xaa Xaa Arg  
1

5

<210> 7

< 211> 4

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

10

<220>

< 223> syntetisk furinspaltested, spaltemotiv overensstemmelsessekvens

<220>

15

< 221> MOD\_RES

< 222> (2) ... (2)

< 223> Xaa = hvilken som helst aminosyre

<220>

20

< 221> MOD\_RES

< 222> (3) ... (3)

< 223> Xaa = Arg eller Lys

<400> 7

25

Arg Xaa Xaa Arg  
1

<210> 8

< 211> 4

< 212> PRT

30

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> syntetisk furinspaltested

35

<220>

< 221> MOD\_RES

< 222> (2) ... (2)

< 223> Xaa = hvilken som helst aminosyre

<400> 8

Arg Xaa Arg Arg  
1

5

<210> 9

< 211> 4

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

10

<220>

< 223> syntetisk furinspaltested

<220>

15

< 221> MOD\_RES

< 222> (2) ... (2)

< 223> Xaa = hvilken som helst aminosyre

<400> 9

Arg Xaa Lys Arg  
1

20

<210> 10

< 211> 11

< 212> PRT

25

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> syntetisk naturlig furinspaltesekvens (FCS) i domene II på PE

<400> 10

30

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu  
1 5 10

<210> 11

< 211> 11

35

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens



&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk furinspaltbar sekvens med erstatninger på posisjon P3 og P2

&lt;400&gt; 11

5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | His | Arg | Ser | Lys | Arg | Gly | Trp | Glu | Gln | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

&lt;210&gt; 12

&lt; 211&gt; 4

10

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk furinspaltseksens (FCS)

15

&lt;400&gt; 12

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Lys | Lys | Arg |
| 1   |     |     |     |

20

&lt;210&gt; 13

&lt; 211&gt; 4

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

25

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk furinspaltseksens (FCS)

&lt;400&gt; 13

30

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Arg | Arg | Arg |
| 1   |     |     |     |

&lt;210&gt; 14

&lt; 211&gt; 4

&lt; 212&gt; PRT

35

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

&lt;220&gt;

< 223> syntetisk furinspalteseksens (FCS)

<400> 14

Arg Lys Ala Arg  
1

<210> 15

< 211> 6

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> syntetisk furinspalteseksens (FCS)

<400> 15

Ser Arg Val Ala Arg Ser  
1 5

<210> 16

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> syntetisk furinspalteseksens (FCS)

<400> 16

Thr Ser Ser Arg Lys Arg Arg Phe Trp  
1 5

<210> 17

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> syntetisk furinspalteseksens (FCS)

<400> 17

58

Ala Ser Arg Arg Lys Ala Arg Ser Trp  
1 5

&lt;210&gt; 18

&lt; 211&gt; 8

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk furinspaltbar sekvens

&lt;400&gt; 18

Arg Arg Val Lys Lys Arg Phe Trp  
1 5

&lt;210&gt; 19

&lt; 211&gt; 8

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk furinspaltbar sekvens

&lt;400&gt; 19

Arg Asn Val Val Arg Arg Asp Trp  
1 5

&lt;210&gt; 20

&lt; 211&gt; 9

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk furinspaltbar sekvens

&lt;400&gt; 20

Thr Arg Ala Val Arg Arg Arg Ser Trp  
1 5

&lt;210&gt; 21

&lt; 211&gt; 4

&lt; 212&gt; PRT

5 &lt; 213&gt; Kunstig sekvens

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk furinspaltbar sekvens

10 &lt;400&gt; 21

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Gln | Pro | Arg |
| 1   |     |     |     |

&lt;210&gt; 22

15 &lt; 211&gt; 8

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

&lt;220&gt;

20 &lt; 223&gt; syntetisk furinspaltbar sekvens

&lt;400&gt; 22

|     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | His | Arg | Gln | Pro | Arg | Gly | Trp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |

25

&lt;210&gt; 23

&lt; 211&gt; 9

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

30

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk furinspaltbar sekvens

&lt;400&gt; 23

35

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | His | Arg | Gln | Pro | Arg | Gly | Trp | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

<210> 24  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Kunstig sekvens

5

<220>  
 < 223> syntetisk furinspaltbar sekvens

<400> 24

10

His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln  
 1 5

<210> 25  
 < 211> 7  
 < 212> PRT  
 < 213> Kunstig sekvens

15

<220>  
 < 223> syntetisk furinspaltbar sekvens

20

<400> 25

Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu  
 1 5

25

<210> 26  
 < 211> 4  
 < 212> PRT  
 < 213> Kunstig sekvens  
 <220>

30

< 223> syntetisk furinspaltbar sekvens

<400> 26

Arg Ser Lys Arg  
 1

35

<210> 27  
 < 211> 8

61

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

&lt;220&gt;

5 &lt; 223&gt; syntetisk furinspaltbar sekvens

&lt;400&gt; 27

|     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | His | Arg | Ser | Lys | Arg | Gly | Trp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |

10

&lt;210&gt; 28

&lt; 211&gt; 8

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

15

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk furinspaltbar sekvens

&lt;400&gt; 28

20

|     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Arg | Ser | Lys | Arg | Gly | Trp | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |

&lt;210&gt; 29

&lt; 211&gt; 9

25

&lt; 212&gt; PRT

&lt; 213&gt; Kunstig sekvens

&lt;220&gt;

&lt; 223&gt; syntetisk furinspaltbar sekvens

30

&lt;400&gt; 29

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Ser | Lys | Arg | Gly | Trp | Glu | Gln | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

35

&lt;210&gt; 30

&lt; 211&gt; 10

&lt; 212&gt; PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> syntetisk furinspaltbar sekvens

5

<400> 30

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Arg | Ser | Lys | Arg | Gly | Trp | Glu | Gln | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

<210> 31

10

< 211> 6

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

15

< 223> syntetisk furinspaltbar sekvens

<400> 31

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | His | Arg | Ser | Lys | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |

20

<210> 32

< 211> 4

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

25

<220>

< 223> syntetisk muterte terminalrester av PE (rester 609-613)

<400> 32

30

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Glu | Glu | Leu |
| 1   |     |     |     |

<210> 33

< 211> 4

35

< 212> DNA

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> syntetisk tetranukleotidoverensstemmelse "hotspotmotiv" sekvens

<400> 33

5

rgyw 4

<210> 34

< 211> 3

< 212> DNA

10

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> syntetisk serinoverensstemmelse "hotspotmotiv" sekvens

15

<400> 34

agy 3

20



**Krav**

1. Et isolert, mutert *Pseudomonas*-eksotoksin A (PE) som omfatter en sekvens av formelen:

$R^1_n$ -FCS- $R^2_n$ - $R^3_n$ -PE-funksjonelt domene III, der:

5

$n = 0$  eller  $1$  uavhengig for hver av  $R^1$ ,  $R^2$  og  $R^3$ ;

$R^1 = 1$  til  $10$  aminosyrerester;

FCS = en furinspaltesekvens av aminosyrerester, der sekvensen kan spaltes av furing og haren aminosyreende og en karboksylende, der FCS

10

a) er representert ved formelen P4-P3-P2-P1, der P4 er en aminosyrerest på aminoenden, P1 er en aminosyrerest på karboksylenden, P1 er en arginin- eller lysinrest og nevnte sekvens kan spaltes ved karboksylenden ved P1 med furin;

15

b) (i) videre omfatter aminosyrerester som representeres av P6-P5 ved nevnte aminoende, (ii) videre omfatter aminosyrerester representert av P1'-P2' ved nevnte karboksylende, (iii) videre der P1 er en arginin- eller lysinrest, P2' er tryptofan og P4 kan være arginin, valin eller lysin, forutsatt at P4 ikke er arginin, da er P6 og P2 grunnleggende rester, og (iv) nevnte sekvens kan spaltes på karboksylenden til P1 ved hjelp av furin;

20

c) er valgt fra SEKV ID NR: 12-20.

d) er SEKV ID NR: 10, eller en avkortet versjon av denne, som omfatter RQPR (SEKV ID NR: 21); eller

e) er SEKV ID NR: 11, eller en avkortet versjon av denne, som omfatter RSKR (SEKV ID NR: 26);

25

$R^2 = 1$  til  $10$  aminosyrer, og

$R^3 = 1$  eller flere sammenhengende rester av restene 365-394 til SEKV ID NR: 1;

det PE-funksjonelle domenet III er restene 395-613 av SEKV ID NR: 1, eventuelt inkludert

30

(i) erstatninger i en eller flere rester som samsvarer med 609-613 av SEKV ID NR: 1, (ii) en erstatning for glysin, alanin, valin, leusin eller isoleusin for arginin ved en posisjon som samsvarer til posisjon 490 av SEKV ID NR: 1, (iii) en erstatning for alanin, glutasin, serin eller glutamin for en eller flere rester som samsvarer med restene valgt fra D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590, og L597 fra SEKV ID NR: 1, der rester av SEKV ID NR: 1 opprettholder

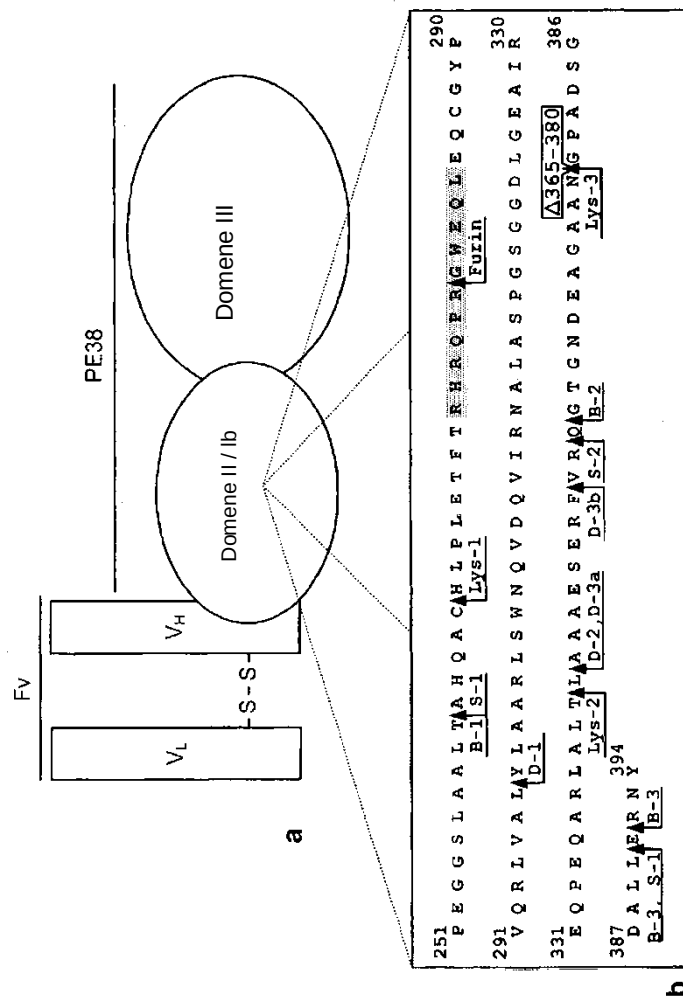
35

immunogenisitet til en epitop eller subepitop i PE-domene III, eller (iv) en kombinasjon av en av (i) - (iii), der mutert PE ikke inkluderer restene 1 til 273 og 285 av 364 av SEKV ID NR: 1.

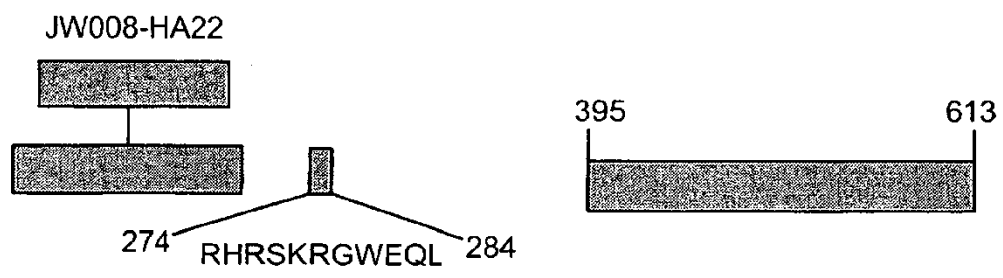
2. Mutert PE fra krav 1, der  $n=0$  for  $R^3$ .
3. Mutert PE fra krav 1, der FCS er konjugert eller smeltet direkte på det PE-funksjonelle domenet III.
- 5 4. Mutert PE i påstand 1, der det PE-funksjonelle domenet III består av restene av sekvensene 395-613 i SEKV ID NR: 1.
- 10 5. Mutert PE fra påstand 1, der det PE-funksjonelle domenet III omfatter (i) erstatninger i én eller flere rester som samsvarer med 609-613 i SEKV ID NR: 1, (ii) en erstatning for glysin, alanin, valin, leusin eller isoleusin for arganin ved en posisjon som samsvarer til posisjon 490 av SEKV ID NR: 1, (iii) en erstatning for alanin, gluasin, serin eller glutamin for en eller flere rester som samsvarer med restene valgt fra D403, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590, og L597 fra SEKV ID NR: 1, der  
15 rester av SEKV ID NR: 1 opprettholder immunogenisiteten til en epitop eller subepitop fra PE-domenet III, eller (iv) en kombinasjon av hvilke som helst av (i)-(iii).
6. Et tenkt molekyl som omfatter
  - 20 (a) et cytokin, antistoff eller antistofffragment, som cytokinet, antistoffet eller antistofffragmentet spesifikt binder til et antigen eller reseptor på en celleoverflate, konjugert eller smeltet til
  - (b) et mutert PE fra ett av kravene 1 til 5, der det tenkte molekylet ikke inkluderer restene 1 til 273 og 285 til 364 i SEKV ID NR: 1.
- 25 7. Det tenkte molekylet i krav 6, videre der (a) er et antistoff eller fragment av dette, som opprettholder antigenes gjenkjennelsesevne.
8. Det tenkte molekylet fra krav 7, der nevnte antistoff eller fragment av dette bindes til et  
30 målantigen, valgt fra mesotelin eller CD22.
9. Et tenkt molekyl til bruk ved hemming av veksten til en målcelle som har en utside, der nevnte tenkte molekyl omfatter;
  - 35 (a) et cytokin, antistoff eller antistofffragment, som cytokinet, antistoffet eller antistofffragmentet spesifikt binder til et antigen eller reseptor på utsiden av nevnte celle, konjugert eller smeltet til
  - (b) et mutert PE fra ett av kravene 1 til 5, der det tenkte molekylet ikke inkluderer restene 1

til 273 og 285 til 364 i SEKV ID NR: 1.

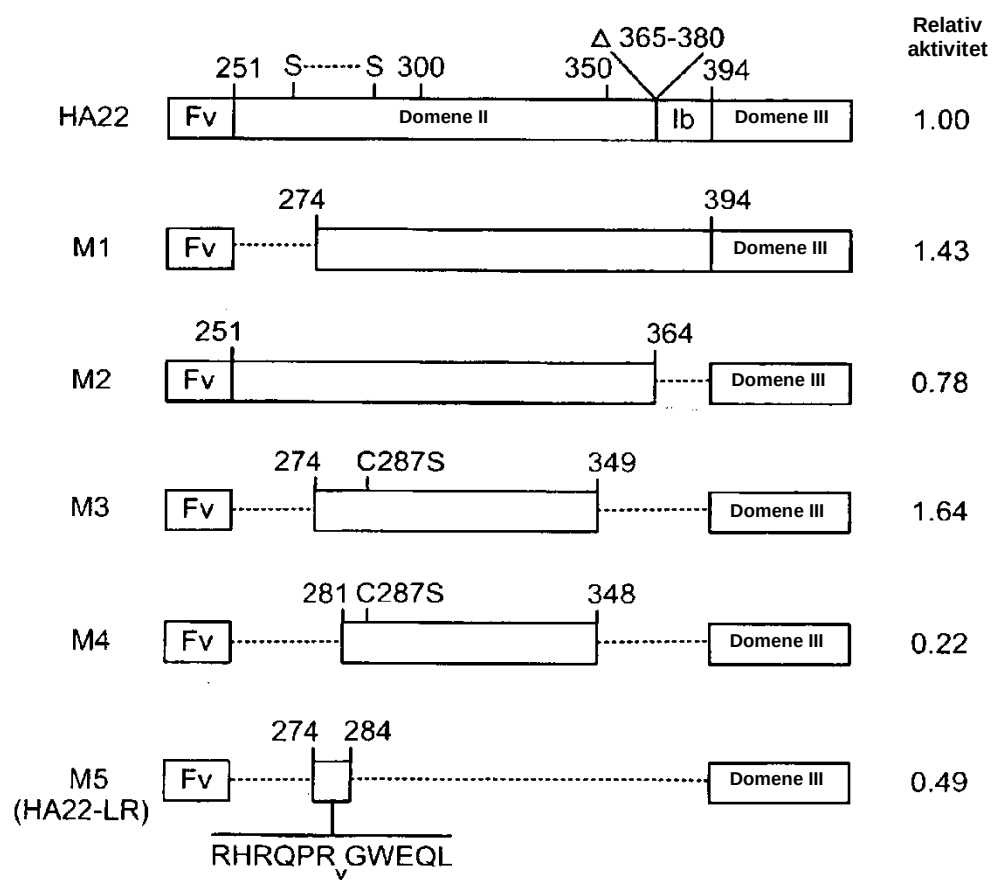
- 5
- 10.** Det tenkte molekylet i krav 9, videre der (a) er et antistoff eller fragment av dette, som opprettholder antigenes gjenkjennelsesevne.
- 11.** Det tenkte molekylet fra krav 10, der nevnte antistoff eller fragment av dette bindes til et målantigen, valgt fra mesotelin eller CD22.
- 10
- 12.** En isolert nukleidsyre, der nevnte nukleidsyre koder den muterte PE-en til ett av kravene 1 til 5.
- 15
- 13.** Den isolerte nukleidsyren i krav 12, der også nevnte nukleidsyre koder et cytokin, antistoff eller antistofffragment som spesifikt binder seg til et antigen eller en reseptor på en celleoverflate, der cytokin, antistoff eller antistofffragment smeltes direkte eller via en peptidforbindelse til nevnte muterte PE.
- 14.** Den isolerte nukleidsyren i krav 13, videre nevnte nukleidsyre koder et antistoff eller fragment av dette, som opprettholder antigenes gjenkjennelsesevne.
- 20
- 15.** Den isolerte nukleidsyren krav 14, der nevnte antistoff eller fragment av dette bindes til et målantigen, valgt fra mesotelin eller CD22.



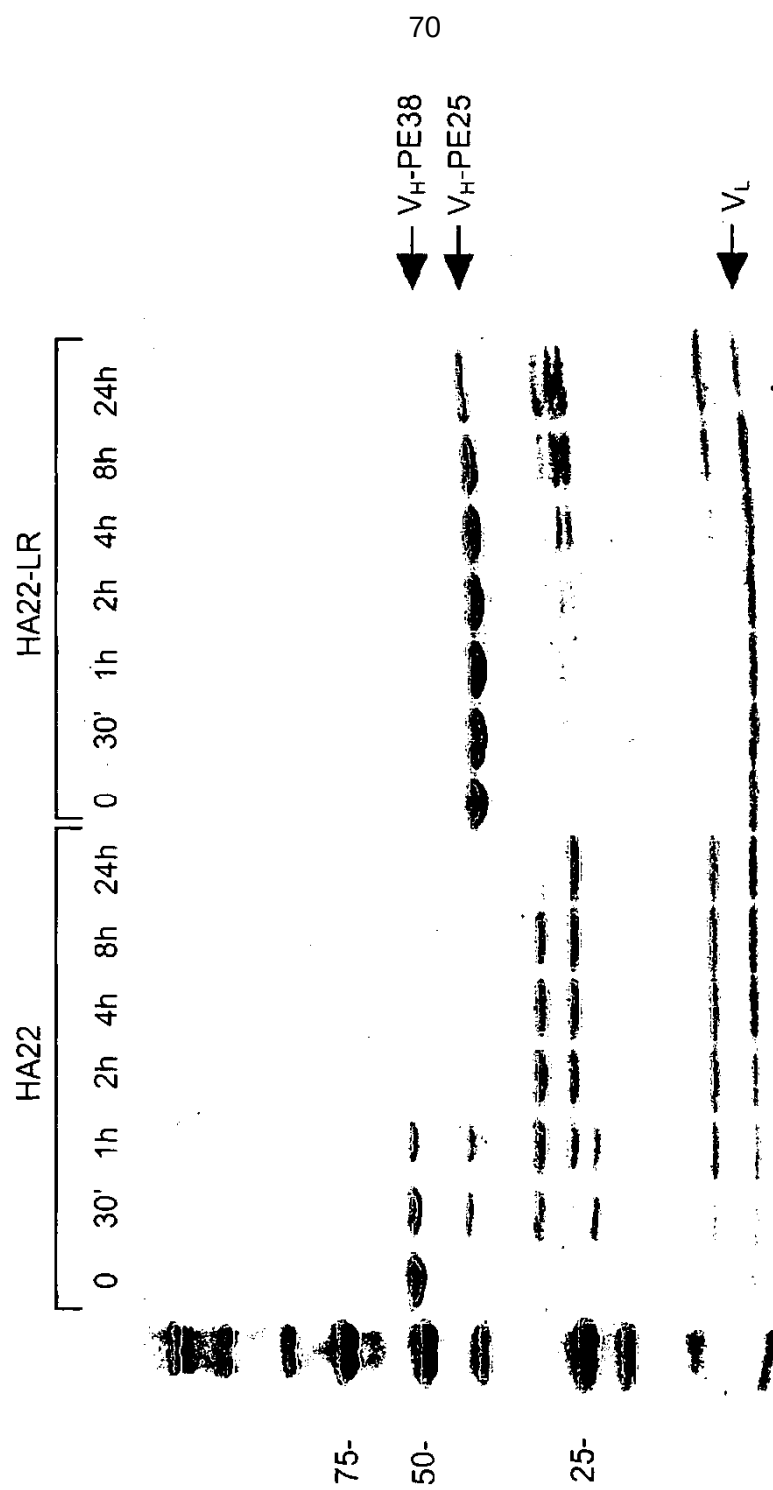
Figur 1



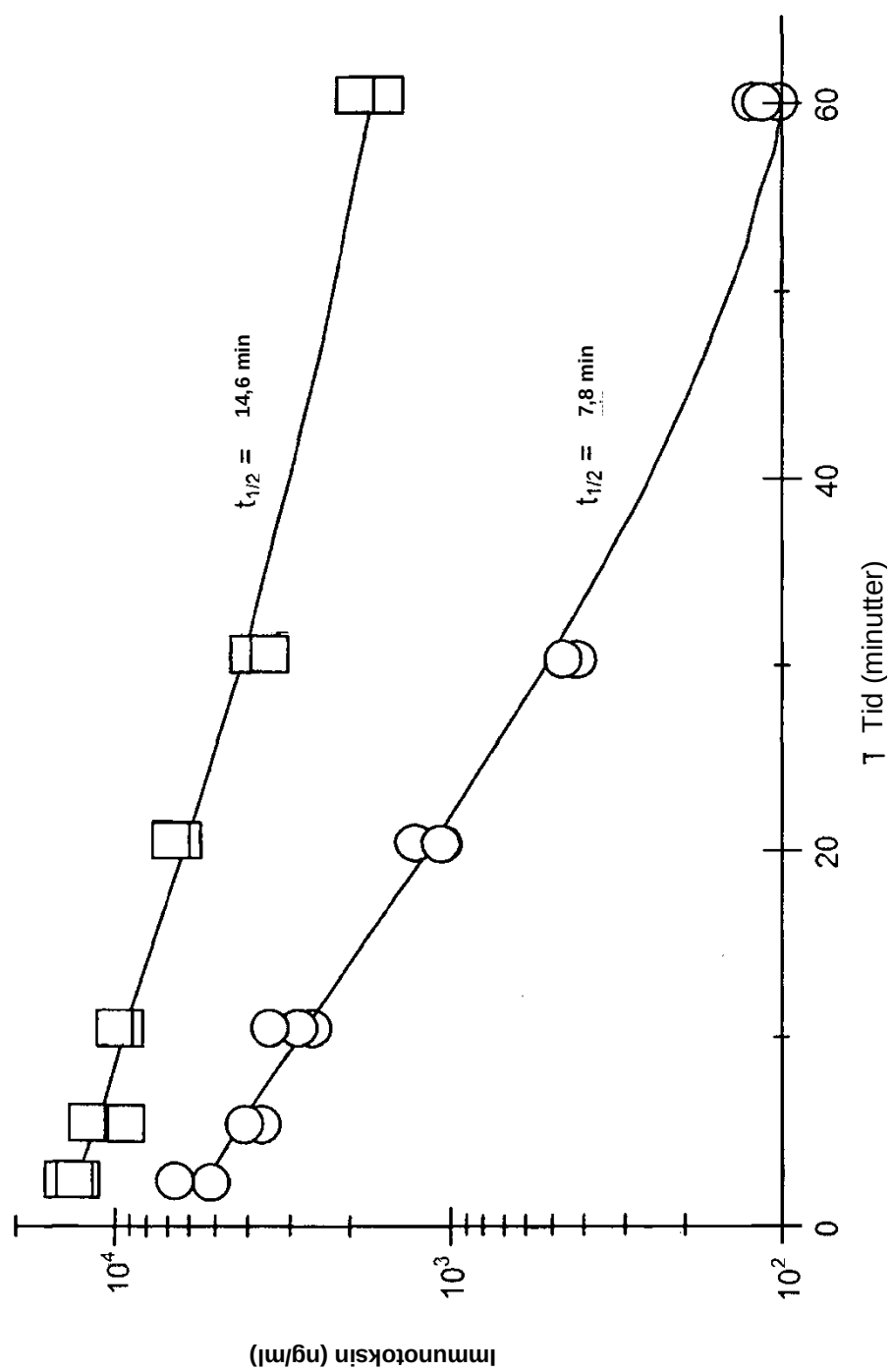
Figur 2



Figur 3

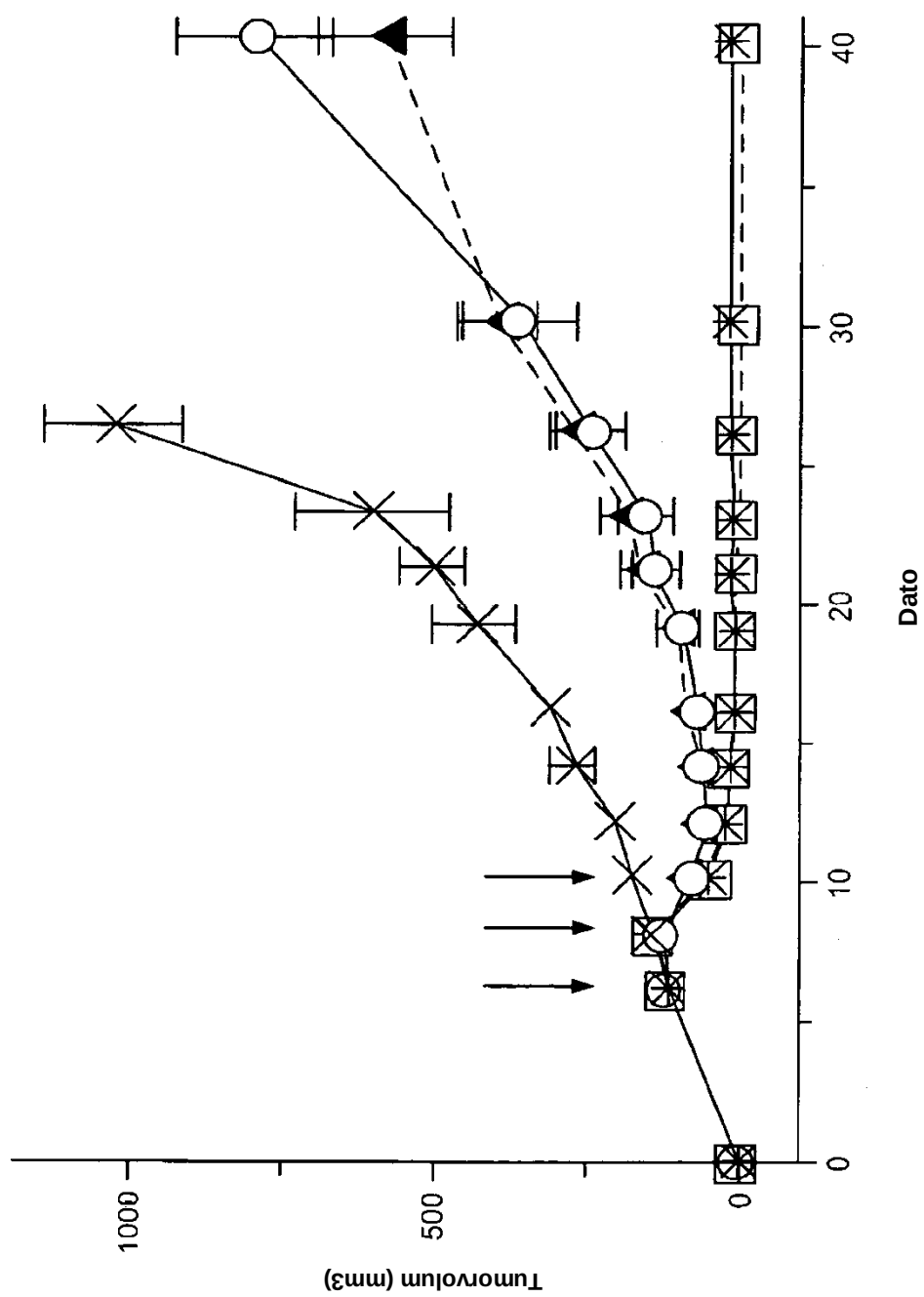


Figur 4



Figur 5





Figur 5