

P02 00546

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

0000

171

Fibronectin ED-B-doménjére specifikus ellenanyagok, előállításuk és alkalmazásuk

K I V O N A T

A találmány tárgyát a fibronectin tumorok újonnan fejlődő érrendszerében is expresszáldó magzati izoformájára (ED-B) specifikus kötőmolekulák képezik, továbbá eljárások a specifikus kötőmolekulák előállítására és alkalmazására, valamint a kötőmolekulákat tartalmazó gyógyászati készítmények.

A találmány szerinti megoldás alkalmas különböző rákos elváltozások kezelésére és diagnosztizálására.

ellenőrző ábra



P02 00546

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



Ad

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

**Fibronectin ED-B-doménjére specifikus ellenanyagok, előál-
lításuk és alkalmazásuk**

A találmány tárgyát a fibronectin tumorok újonnan fejlődő érrendszerében is - mind immuncitokémiával, mind *in vivo* tumormegcélzással igazoltan - expresszálandó magzati izoformájára (ED-B) specifikus kötőmolekulák képezik, továbbá eljárások a specifikus kötőmolekulák előállítására és alkalmazására, valamint a kötőmolekulákat tartalmazó gyógyászati készítmények.

A találmány szerinti megoldás előnyösen alkalmazható rákos elváltozások kezelésére és diagnosztizálására.

A tumorterápia létező formáinak többsége elsődlegesen azt a cél tűzi ki, hogy annyi tumort alkotó sejtet elpusztítson, amennyi lehetséges. A kemoterápia és a radioterápia alkalmazása esetén tapasztalt korlátozott sikerek a kezelés specifitásának relatív hiányára vezethetők vissza, és arra, hogy ezek az eljárások hajlamosak toxikus mellékhatásokat kifejteni normál szövetekre. A terápia tumor-szelektivitásának javítására egy módszer az lehet, hogy ágenst juttatunk a tumorhoz egy kötőfehérjén keresztül, amely rendszerint egy olyan ellenanyag kötődoménjét tartalmazza, amely a tumor (és nem a normál sejtek) felszínén



expresszállódó marker-antigénre specifikus. A célirányos terápiának erre a formájára, melyet szakemberek egymás között egyszerűen „mágikus golyók”-nak is neveznek, főleg rágszállókból származó monoklonális ellenanyagok (a leírásban rövidítve mAb-k) szolgálnak példaként, amelyek a sejtfelszínen expresszállódó, úgynevezett tumor-asszociált antigénekre specifikusak. Ilyen monoklonális ellenanyagok kémiaiilag konjugálva lehetnek a citotoxikus csoporthoz (például toxinhoz vagy gyógyszerhez), vagy rekombináns fúziós fehérjeként termeltethetők, amelyben a monoklonális ellenanyagot kódoló és a toxin-gének egymáshoz vannak kapcsolva és tandem módon vannak expresszáltatva.

A „mágikus golyó” megközelítésének korlátozott, bár szignifikáns hatása volt a humán rák kezelésében, a leghatározottabban limfoid eredetű tumorokat célzó kezelésben, ahol a malignus sejtek a legszabadabban hozzáférhetők a keringésben lévő terápiás dózishoz. Azonban a szilárd tumorok kezelése súlyos klinikai probléma maradt, amelyekben a teljes sejttömeg csak nagyon kis részéhez, főleg a tumor legkülsőbb perifériájánál lévő sejtekhez férnek hozzá a keringésben lévő terápiás immunkonjugátumok; ezek a perifériás célpontok úgynevezett „kötőhely-gátat” képeznek a tumor belseje felé [Juweid és mtsai., Cancer Res. 52, 5144-5153 (1992)]. A tumorban a szövetszerkezet általában szálas szerkezetű stromából és szorosan elhelyezkedő tumorsejtekből álló, túl sűrű szerkezet ahhoz, hogy az ellenanyagok molekulatömeg-tartományába eső molekulák képesek legyenek behatolni. Ezenkívül a tumorokról ismeretes, hogy megnövelt

intersticiális nyomással rendelkeznek, limfatikus elvezetés nélkül, amely szintén akadályozza exogén molekulák beáramlását. A közelmúltban irodalmi áttekintés jelent meg a terápiás ágensek tumorok általi felvételét befolyásoló faktorról [Jain, R., Sci. Am. 271, 58-65 (1994)].

Bár kézenfekvő korlátai vannak szilárd tumorok kezelésének tumor-asszociált antigének megcélzásán keresztül, ezek a tumorok olyan közös jellegzetességgel rendelkeznek, amely alternatív antigén-célpontot biztosít az ellenanyag-terápia számára. Ha egyszer bizonyos méretnél nagyobbra növekednek, a tumorok általánosan függővé válnak megfelelő oxigén- és tápanyag-ellátást biztosító, független vérrellátástól a növekedés fenntartásához. Ha ez a vérrellátás megzavarható vagy elzárható, reális lehetőség van arra, hogy fejlődő tumorsejtek ezreit elpusztítsuk. Ahogyan a tumor fejlődik, átalakuláson megy keresztül angiogén fenotípusba, különféle angiogén faktorokat termelve, amelyek hatást fejtenek ki a szomszédos kapilláris endotél sejtekre, proliferációra és migrációra indukálva azokat. Az újonnan képződött véredények szerkezete nagymértékben szervezetlen, zsákutcákkal és megnövekedett szivárgáshoz vezető nyílásokkal rendelkezik, amely kirívó különbséget mutat normál szövetekben található kapillárisok rendezett szerkezetéhez képest. Az angiogenezis indukcióját bizonyos sejtfelszíni antigének expressziójának túlszabályzása kíséri, amelyek közül sok közönségesen előfordul normál szövetek érrendszerében. Egyedi antigének azonosítása tumorok újonnan kialakult érrendszerében a fő limitáló tényező szilárd tumorok ér-



rendszert célzó, általános kezelésének kifejlesztésében. A találmány tárgyát képező antigén közvetlenül ennek a problémának megoldását célozza.

A tumor fejlődése közben a környező szövet extracelluláris mátrixát két fő folyamat alakítja ki: (1) a normál szövet extracelluláris mátrixkomponenseinek proteolitikus degradációja, és (2) az extracelluláris mátrixkomponensek *de novo* szintézise, a tumor-indukált citokinek által aktivált tumorsejtek valamint stromasejtek által. Ez a két folyamat, stacionárius ("steady state") állapotban "tumoros extracelluláris mátrixot" alakít ki, amely még megfelelőbb környezet a tumorfejlődés előrehaladására, valamint minőségileg és mennyiségileg különbözik a normál szövetektől. Ezen mátrixkomponensek közé tartozik a tenaszkin és a fibronectin (FN) nagy izoformája; ezen fehérjék izoformákként való leírása vezetett strukturális heterogenitásuk felismeréséhez, amely transzkripciós, poszt-transzkripciós és poszt-transzlációs szinten jön létre (lásd lentebb). A fibronectin izoformáinak egyike, az úgynevezett "B+"-izoforma (B-FN) a találmány tárgya.

A fibronectinek (FN) multifunkcionális, nagy molekulatömegű, extracelluláris mátrixot és testfolyadékokat egyaránt alkotó glikoproteinek. Sok, különböző biológiai folyamatban játszanak szerepet, például a normál sejtmorfológia kialakulásában és fenntartásában, sejtmigrációban, homeosztázisban és trombózisban, sebgyógyulásban és az onkogén transzformációban [összefoglaló irodalmat lásd Alitalo és mtsai., Adv. Cancer Res. 37, 111-158 (1982);



Yamada, Ann. Rev. Biochem. 52, 761-799 (1983); Hynes, Ann. Rev. Cell. Biol. 1, 67-90 (1985); Ruoslahti és mtsai., Ann. Rev. Biochem. 57, 375-413 (1988); Hynes (1990), Owens és mtsai., Oxf. Surv. Eucaryot. Genes 3, 141-160 (1986)]. A fibronektinek struktúrális sokféleségét a primér FN-transzkriptum három régiójának (ED-A, ED-B és IIICS) alternatív splicing-ja idézi elő [Hynes, Ann. Rev. Cell. Biol. 1, 67-90 (1985); Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987)], ami legalább 20 különböző izoformát hoz létre, amelyek közül néhány különbözőképpen expresszálódik tumoros és normál szövetben. Amellett, hogy szövetspecifikus és fejlettségi állapotra specifikus módon szabályzott, ismert, hogy az FN-pre-mRNS splicing-mintázata transzformált sejtekben és malignitásokban deregulált [Castellani és mtsai., J. Cell. Biol. 103, 1671-1677 (1986); Borsi és mtsai., J. Cell. Biol. 104, 595-600 (1987); Vartio és mtsai., J. Cell Science 88, 419-430 (1987); Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987); Barone és mtsai., EMBO J. 8, 1079-1085 (1989); Carnemolla és mtsai., J. Cell. Biol. 108, 1139-1148 (1989); Oyama és mtsai., J. Biol. Chem. 10331-10334 (1989); Oyama és mtsai., Cancer Res. 50, 1075-1078 (1990); Borsi és mtsai., Exp. Cell. Res. 199, 98-105 (1992)]. Tulajdonképpen az ED-A-, ED-B- és IIICS-szekvenciákat tartalmazó FN-izoformák nagyobb mértékben expresszálódnak transzformált és malignus tumorsejtekben, mint normál sejtekben. Az ED-B-szekvenciát tartalmazó FN-izoforma (B+ izoforma) különösen magzati- és tumoros szövetben expresszálódik nagymértékben, valamint sebgyógyulás



alatt, de normál felnőtt szövetekben korlátozott mértékben expresszálódik [Norton és mtsai., Mol. Cell. Biol. 7, 4297-4307 (1987); Schwarzbauer és mtsai., EMBO J. 6, 2573-2580 (1987); Gutman és Kornblihtt, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7179-7182 (1987); Carnemolla és mtsai., J. Cell. Biol. 108, 1139-1148 (1989); Ffrench-Constant és mtsai., J. Cell. Biol. 109, 903-914 (1989); Ffrench-Constant és Hynes, Development 106, 375-388 (1989); Laitinen és mtsai., Lab. Invest. 64, 375-388 (1991)]. B+FN-molekulákat nem lehet detektálni érett véredényekben, de angiogén véredényekben túlszabályzás alá kerül normál (például az endometrium fejlődése), patológiás (például diabetikus retinopathia) esetben és tumorfejlődés alatt [Castellani és mtsai., Int. J. Cancer 59, 612-618 (1994)].

Az ED-B-szekvencia egy teljes, III. típusú, ismétlődő, homológ szekvencia, melyet egyetlen exon kódol, és 91 aminosavból áll. Az alternatív érési folyamaton (splicing) átmert IIICS-izoformával ellentétben, amely sejttípus-specifikus kötőhelyet tartalmaz, az A+ és B+ izoformák biológiai funkcióját még találgatják [Humphries és mtsai., J. Cell. Biol. 103, 2637-2647 (1986)].

A B+ izoforma jelenléte önmagában tumor-indukált neoantigént képez, de ezenkívül, az ED-B-expresszió hozzáférhetővé tesz egy normálisan rejtett antigént a III. típusú, 7. ismétlődő szekvenciában (az ED-B-t megelőzően); mivel ez az epitóp nem hozzáférhető az ED-B-nélküli FN-molekulákban, ebből az következik, hogy az ED-B-expresszió neoantigének expresszióját indukálja, mind közvetlenül,



mind közvetve. Erre a rejtett antigénre specifikus a BC-1 nevű monoklonális ellenanyag (mAb) [Carnemolla és mtsai., J. Biol. Chem. 24689-24692 (1992)]. Ezen mAb specifikitását és biológiai tulajdonságait az EP 0 344 134 B1. sz. európai közzétételi iratban írják le, és az "European Collection of Animal Cell Cultures"-nél (Porton Down, Salisbury, UK) 88042101. nyilvántartási szám alatt deponált hibridómából állítható elő. Az mAb sikeresen alkalmazható tumorokban lévő angiogén véredények lokalizálására, érett vaszkuláris endotéliummal adott keresztreaktivitás nélkül, ami az FN-izoformák lehetséges felhasználását szemlélteti az ellenanyagokat alkalmazó, érrendszeret célzó kezelésekben.

Azonban bizonyos ellentmondások maradtak a BC-1-mAb specifikitásával kapcsolatban. Az a tény, hogy az BC-1 közvetlenül nem ismeri fel a kérdéses B+ izoformát, azt a kérdést veti fel, hogy néhány szövetben, a BC-1 által felismert epitóp vajon nem ED-B nélkül válhat-e hozzáférhetővé, és ennél fogva nem vezet-e közvetve nem kívánt keresztreaktivitáshoz. Továbbá a BC-1 szigorúan humán B+ izoformára specifikus, ami azt jelenti, hogy a BC-1 biológiai rendszerben való eloszlását és alkalmazását tumorlokalizálásra nem lehet állatkísérletekben végezni. Bár B+ izoformát tartalmazó, rekombináns fúziós fehérjékre specifikus, poliklonális ellenanyagokat már termeltettek [Peters és mtsai., Cell. Adhes. Commun. 3, 67-89 (1995)], azok csak olyan FN-el reagáltak, amelyet előzőleg N-glikanázzal kezelték az epitóp hozzáférhetővé tétele érdekében.



További általánosan fennálló probléma egérreredetű, monoklonális ellenanyagok alkalmazásával kapcsolatban a humán szervezet anti-egér-ellenanyagra adott immunválasza (HAMA) [Schroff és mtsai., Cancer Res. 45, 879-885 (1985); Dejager és mtsai., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 29, 377 (1988)]. A HAMA-immunválasznak széles körű hatásai vannak, a beadott ellenanyag semlegesítésétől (amely csökkent terápiás dózishoz vezet) allergiás válaszokig, sérumbetegség és veseelégtelenség.

Bár azonosítottak rekombináns ED-B-vel reagáló poliklonális antiszérumot (lásd fentebb), BC-1-el megegyező specifitással rendelkező mAb-k izolálása egerek immunizálását követően általában nehéznek bizonyult, mivel a humán és egérreredetű ED-B-fehérjék látszólag 100%-os szekvencia-homológiát mutattak. A humán fehérje ezért egérben saját antigén, amelyre azután az egér nem ad immunválaszt. Valójában tíz évnél is tovább tartó, ezen a területen végzett intenzív kutatás eredményeképpen csak egyetlen, közvetett aktivitással rendelkező, B+ FN-izoformára specifikus mAb-t azonosítottak, amely az ED-B-t nem ismeri fel közvetlenül. Majdnem bizonyosan szignifikáns, hogy a BC-1 specifitása egy rejtett epitóra irányul, amely inkább az ED-B következményeként válik hozzáférhetővé, mint maga az ED-B-része, amely valószínűleg nincs jelen az egérreredetű FN-ben, és ezért nem tűnik „sajátnak” az egér immunrendszere számára.

A találmány gyakorlati megvalósítása során a korábbiaktól eltérő stratégiát alkalmaztunk, amelyben nem szükséges fibronectinnel vagy ED-B-vel végzett előzetes immunizá-



lás: ED-B-izofomára specifikus ellenanyagokhoz olyan humán ellenanyagból származó variábilis régiók könyvtáraiból származó, egyláncú Fv-k (a leírásban scFv-nek rövidítjük) formájában jutunk, melyek filamentumos bakteriofágok felszínén találhatók [Nissim és mtsai., EMBO J. 13, 692-698 (1994); lásd még WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172 nemzetközi közzétételi iratokat is].

Ellenanyag-fágkönyvtár alkalmazásánál azt találtuk, hogy specifikus scFv-ket lehet izolálni mind az ED-B-domént tartalmazó, rekombináns FN-fragmensek, mind magának a rekombináns ED-B-nek közvetlen szelekciójával, ha ezeket az antigéneket közvetlenül szilárd felszínre burkoljuk ("panning"). Ugyanezt az antigénforrást sikeresen alkalmaztuk "második generációs", a szülői klónokhoz képest javított tulajdonságokkal rendelkező scFv-k termeltetésére az "affinitásérlelés" folyamatában. Az találtuk, hogy az izolált scFv-k erősebben és specifikusabban reagáltak előzetes N-glikanázos kezelés nélküli, humán FN B+ izoformájával.

Tumorelles alkalmazásokban a találmány szerinti, humán ellenanyag antigénkötő doménjeinek előnye az, hogy nem alakul ki rá HAMA-immunválasz. Továbbá, az leírásban bemutatott példák szerint, hasznosak tumorszövet immuncitokémiai analízisében, mind *in vitro*, mind *in vivo*. Ezek és a leírás további részében tárgyalt, más alkalmazások szakember számára nyilvánvalóak.



Specifikus kötőmolekula

Molekulapár egyik tagját jelenti, amely kötési specifitással rendelkezik a másik felé. A specifikus kötőpár tagjai lehetnek természetes eredetűek, vagy teljesen vagy részlegesen szintetikus úton előállítottak. A molekulapár egyik tagjának felszínén egy olyan területtel vagy üreggel rendelkezik, amely specifikusan képes kötődni, és ennél fogva komplementer a molekulapár másik tagjával, amely sajátos forma és töltésszerveződéssel rendelkezik. Tehát a pár tagjai azzal a tulajdonsággal rendelkeznek, hogy specifikusan egymáshoz képesek kötődni. Specifikus kötőpár például antigén-ellenanyag, biotin-avidin, hormon-hormonreceptor, receptor-ligandum, enzim-szubsztrát.

Ellenanyag

Ez egy immunglobulint jelent, amely lehet természetes eredetű, vagy részben vagy egészben szintetikusan előállított. A kifejezésen bármilyen olyan kötődoménnel rendelkező polipeptidet vagy fehérjét is értünk, amely egy ellenanyag-kötődomén vagy azzal homológ. Származhatnak természetes forrásokból, vagy részben vagy egészben szintetikusan előállíthatók. Ellenanyagok például immunglobulin-izotípusok és azok izotipikus alosztályai; fragmensek, amelyek antigén-kötődomént, például Fab-t, scFv-t, dAb-t, Fd-t tartalmaznak; és diatestek.

Monoklonális vagy más ellenanyagokhoz lehet jutni, és a rekombináns DNS-technológia módszereit alkalmazva más ellenanyagokat vagy olyan kiméra-ellenanyagokat lehet előállítani, amelyek megőrzik az eredeti ellenanyag specifitá-



sát. Ilyen módszer lehet immunglobulin variábilis régióját vagy egy ellenanyag komplementaritását meghatározó régióit (a leírásban CDR-ként rövidítjük) kódoló DNS bejuttatása egy másik immunglobulin konstans régióját vagy a vázrégiókkal együtt vett konstans régiókat kódoló szakaszba. Lásd például EP-A-184187. sz., GB 2188638A. sz. vagy EP-A-239400. sz. közzétételi iratokat. Hibridómát, vagy más, ellenanyagot termelő sejtet genetikai mutációnak vagy más változtatásnak vethetünk alá, amely megváltoztathatja vagy változatlanul hagyhatja a termelt ellenanyagok kötőspecifitását.

Mivel az ellenanyagok módosításának számos lehetősége van, az "ellenanyag" kifejezést úgy kell értelmeznünk, hogy az bármilyen, kívánt specifitású kötődoménnel rendelkező, specifikus kötőmolekulát vagy anyagot felölel. Tehát ez a kifejezés felölel ellenanyag-fragmenseket, -származékokat, ellenanyagok funkcionális ekvivalenseit és homológjait, beleértve bármilyen immunglobulin-kötődomént tartalmazó polipeptidet, akár természetes, akár teljesen vagy részben szintetikus eredetűt. Ennélfogva más polipeptidhez fuzionált immunglobulin-kötődomént tartalmazó kiméramolekulák, vagy ekvivalenseik is beletartoznak. Kiméraellenanyagok klónozásának és expresszáálásának leírását lásd EP-A-0120694. sz. és EP-A-0125023. sz. európai közzétételi iratokban.

Kimutatták, hogy egész ellenanyag fragmensei is képesek antigéneket megkötni. Kötőfragmensek például (i) VL-, VH-, CL- és CH1-doménekből álló Fab-fragmens; (ii) VH- és



CH1-doménekből álló Fd-fragmens; (iii) (ugyanazon,) egyetlen ellenanyag VL- és VH-doménjeiből álló Fv-fragmens; (iv) a dAb-fragmens [Ward és mtsai., Nature 341, 544-546 (1989)], amely VH-doménből áll; (v) izolált CDR-régiók; (vi) F(ab')₂-fragmensek, amelyek két összekapcsolt Fab-fragmenst tartalmaznak; (vii) Fv-molekulákból származó egyedülálló lánc (scFv), amelyben egy VH-domén és egy VL-domén peptidlinkerrel van összekapcsolva, amely lehetővé teszi, hogy a két domén összekapcsolódva antigénkötőhelyet alakítson ki [Bird és mtsai., Science 242, 423-426 (1988); Huston és mtsai., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)]; (viii) Fv-dimerek bispecifikus, egyedülálló lánc (PCT/US92/09965.sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés); és (ix) "diatestek", génfúzióval előállított multivalens vagy multispecifikus fragmensek [W094/13804. sz. nemzetközi közvéteteli irat; Holliger és mtsai., Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)].

A diatestek polipeptidek multimerjei, minden egyes polipeptid tartalmaz egy immunglobulin könnyű láncából származó kötőrégiót tartalmazó első domént, és egy immunglobulin nehéz láncából származó kötőrégiót tartalmazó második domént, a két domén össze van kapcsolva (például egy peptidlinkerrel), de nem képesek asszociálódni egymással antigénkötőhelyet kialakítva: az antigénkötőhely úgy alakul ki, hogy a multimerben található egyik polipeptid első doménje asszociálódik a multimerben található másik polipeptid második doménjével (W094/13804. sz. nemzetközi közvéteteli irat).



Bispecifikus ellenanyagok alkalmazása esetén, ezek lehetnek hagyományos bispecifikus ellenanyagok, amelyeket sokféle módon lehet termeltetni [Holliger és Winter, Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)], például kémiaiilag, vagy hibrid-hibridómákból, vagy lehet a fentebb említett bármelyik bispecifikus ellenanyag-fragmens. Előnyösen inkább scFv-dimereket vagy diatesteket alkalmazunk, mint egész ellenanyagokat. Diatesteket és scFv-dimereket előállíthatunk Fc-régió nélkül, csak variábilis doméneket felhasználva, potenciálisan csökkentve az anti-idiotipikus reakció hatásait. Bispecifikus ellenanyagok más formái közé tartozik az egyláncú „Janusins” [Traunecker és mtsai., EMBO Journal 10, 3655-3659 (1991)].

Bispecifikus diatestek, a bispecifikus egész ellenanyagokkal szemben, szintén különösen hasznosak lehetnek, mivel könnyen előállíthatók és expresszálhatók *E. coliban*. Megfelelő kötőspecifitásokkal rendelkező diatestek (és sok más polipeptid, például ellenanyag-fragmensek) könnyen szelektálhatók könyvtárakból vett fág-„display” (WO94/13804. sz. nemzetközi közzétételi irat) alkalmazásával. Ha a diatest egyik karját állandónak vesszük, például X-antigénre specifikusan, akkor egy olyan könyvtárat készíthetünk, amelyben a másik kart variáljuk, és megfelelő specifitással rendelkező ellenanyagot szelektálunk.

Antigénkötő domén

Egy ellenanyagnak azt a részét jelenti, amely azt a területet tartalmazza, amely specifikusan képes kötni egy antigén egy részét vagy egészét, és komplementer az antigén

egy részével vagy egészével. Ha az antigén nagy, egy ellenanyag csak az antigén egy adott részét képes megkötni, amely részt epitópnak nevezünk. Egy antigénkötő domén egy vagy több ellenanyag variábilis doménjéből állhat. Előnyösen egy antigénkötő domén tartalmaz egy ellenanyag könnyű láncából származó variábilis régiót (VL), és egy ellenanyag nehéz láncából származó variábilis régiót (VH).

Specifitás

Ez a kifejezés egy olyan helyzetre utal, amelyben egy specifikus kötőpár egyik tagja nem mutat szignifikáns kötődést a saját specifikus kötőpartnerén kívül semmilyen más molekula irányában. A kifejezés alkalmazható olyan esetben is, amikor például egy antigénkötő domén egy olyan különleges epitópra specifikus, amelyet számos antigén tartalmaz, amely esetben az antigénkötő domént hordozó specifikus kötőmolekula az epitópokat tartalmazó, különböző antigénekhez képes kötődni.

Funkcionálisan ekvivalens variáns forma

Ez egy olyan molekulára (a variáns) utal, amely, bár szerkezetileg különbözik a másik (a szülő) molekulától, bizonyos szignifikáns homológiát, és legalább néhányat megőriz a szülői molekula biológiai funkciói közül, például egy antigénhez vagy epitóphoz való kötődés képességét. A variánsok lehetnek fragmensek, származékok vagy mutánsok formájában. Egy variánshoz, származékhoz vagy mutánshoz úgy juthatunk, hogy módosítjuk a szülői molekulát egy vagy több aminosav addíciójával, deléciójával, szubsztitúciójával vagy inszerciójával, vagy más molekula hozzákapcsolásával.

Ezeket a változtatások elvégezhetők nukleinsav- vagy fehérje-szinten. Például a kódolt polipeptid lehet Fab-fragmens, amelyet azután más forrásból származó Fc-farokhoz kapcsolunk. Más módszer szerint markert, például enzimet, fluoreszceint, stb. kapcsolhatunk hozzá.

A találmány tárgya specifikus kötőmolekula, amely az ED-B-re, fibronektin onkofetális doménjére specifikus.

A találmány szerinti specifikus kötőmolekulák közvetlenül kötik az ED-B-domént. A találmány előnyös megvalósítási módja szerint, a specifikus kötőmolekula az FN termolizin-proteázos kezelése után, az egyik, bármelyik vagy valamennyi ED-B-t tartalmazó FN-hez kötődik. A találmány egy további előnyös megvalósítási módja szerint, a specifikus kötőmolekula az egyik, bármelyik vagy valamennyi FN-hez kötődik, amely ED-B-domént tartalmazó, III. típusú, homológ ismétlődő szekvenciát tartalmaz. Ismert FN-ket azonosítanak két közleményben [Carnemolla és mtsai., J. Cell. Biol. 108, 1139-1148 (1989); Carnemolla és mtsai., J. Biol. Chem. 24689-24692 (1992)]. „Valamennyi, ED-B-t tartalmazó FN” kifejezés az összes olyan FN-re utal, melyet az adott közleményben úgy azonosítottak, hogy ED-B-domént tartalmaz.

A specifikus kötőmolekula előnyösen humán ED-B-t köt, és előnyösen legalább egy másik fajból, például egérből, patkányból és/vagy csirkéből származó B+FN-t. A specifikus kötőpár-tag előnyösen képes mind humán fibronektin-ED-B-t, mind nem-humán, például egérből származó fibronektin-ED-B-t egyaránt kötni, lehetővé téve a specifikus kötőpár-tag tesztelését és analízisét állatmodellben.

A találmány szerinti specifikus kötőpár-tagok úgy kötnek fibronectin-ED-B-t, hogy nem lépnek kompetícióba a nyilvánosan rendelkezésre álló, deponált BC-1-ellenanyaggal, melyet máshol tárgyalunk. BC-1 szigorúan a humán B+ izoformára specifikus. A találmány szerinti specifikus kötőpár-tagok nem ugyanazt az epitópot kötik, mint a BC-1.

A találmány szerinti specifikus kötőmolekula B+FN-hez való kötődését ED-B-doménnel gátolni lehet.

A találmány egyik vonatkozásában a kötődomén, tisztított monomerként mérve, 6×10^{-8} M vagy kisebb disszociációs állandóval (Kd) rendelkezik FN-ED-B-re.

A találmány egyik vonatkozásában a kötődomén fibronectin-ED-B-vel reaktív, azaz képes azt kötni anélkül is, hogy a fibronectin-ED-B-t N-glikanázzal előzetesen kezelnék.

A találmány szerinti specifikus kötőpár-tagokat előállíthatjuk izolált vagy tisztított formában, azaz a preparátum vagy forma mentes más, specifikus kötőpár-tagoktól, például ellenanyagoktól vagy ellenanyag-fragmensektől, vagy mentes más, olyan specifikus kötőpár-tagoktól, amelyek képesek fibronectin-ED-B-t kötni. Előnyösen, a találmány szerinti specifikus kötőpár-tagok lényegében tiszta formában vannak. Lehetnek „monoklonálisak” abban az értelemben, hogy egyetlen klónból származnak, inkább, minthogy hagyományos hibridóma-technológia alkalmazásával előállított ellenanyagokra korlátozódnának. A fentebb tárgyaltak szerint, a találmány szerinti specifikus kötőpár-tagokhoz bakteriofág-„display” technológia alkalmazásával és/vagy rekombináns,

például bakteriális gazdasejtekben történő expresszálassal juthatunk. Nincsen olyan ezt megelőző közlemény, amelyben monoklonális, közvetlenül fibronectin-ED-B-t kötni képes, specifikus kötőpár-tagokat ismertetnek.

A specifikus kötőpár előnyösen ellenanyagot tartalmaz. A specifikus kötőpár ellenanyag-fragmens, például egy-láncú Fv (scFv) formájában tartalmazhat polipeptid-szekvenciát. Más típusú ellenanyag-fragmenseket is felhasználhatunk, például Fab-t, Fab'-t, F(ab')-t, F(ab')₂-t, Fabc-t, Facb-t vagy diatestet [Winter és Milstein, Nature 349, 293-299 (1991); WO94/13804]. A specifikus kötőmolekula lehet egész ellenanyag formájában. Az egész ellenanyag lehet bármilyen ellenanyag-izotípus, például IgG, IgA, IgD, IgE és IgM formájában, valamint bármilyen izotípus alosztály, például IgG1 vagy IgG4 formájában.

Az ellenanyag bármilyen eredetű lehet, például humán, egér/patkány, birka vagy nyúl. Szakember számára nyilvánvaló más származtatás is. Az ellenanyag előnyösen humán eredetű. A „humán” azt jelenti, hogy az ellenanyag részben vagy egészben humán cDNS-, fehérje- vagy peptidkönyvtárból származik. Ezen a kifejezésen humanizált, nem-humán eredetű peptideket és fehérjéket is értünk, amelyek módosítva lettek abból a célból, hogy humán tulajdonságokat adjunk az ellenanyag-molekulának, ezáltal lehetővé téve azt, hogy elkerülje a humán immunrendszer védekezését.

A specifikus kötőmolekula lehet tervezett ellenanyag, például bispecifikus ellenanyag-molekula (vagy fragmens, például F(ab')₂) formájában is, amely egy, a fentebb ismer-



tetett, fibronectin-ED-B-re (azaz az adott doménre) specifikus antigénkötő karral és egy eltérő specifitással rendelkező másik karral rendelkezik, vagy lehet bivalens vagy multivalens molekula.

Az ellenanyag-szekvenciákon kívül, a specifikus kötőmolekula tartalmazhat más aminosavakat is, amelyek például peptidet vagy polipeptidet alakítanak ki, vagy a molekulába más funkcionális tulajdonságot visznek be az antigénkötésen kívül. Például, a specifikus kötőmolekula tartalmazhat jelet, enzimet vagy ezek fragmensét, és így tovább.

A kötődomén tartalmazhat csíravonal-szegmens által vagy átrendeződött génszegmens által kódolt VH-domént, részben vagy egészben. A kötődomén tartalmazhat VL-kappa-domén- vagy VL-lambda-domén részletét vagy egészét.

A kötődomén tartalmazhat VH1-, VH3- vagy VH4-csíravonal-génszekvenciát, vagy annak átrendeződött formáját.

A találmány szerinti specifikus kötőmolekula tartalmazhat humán DP47-csíravonalból származó, nehéz lánc variábilis régiót („VH”-domén), melynek szekvenciáját bemutatjuk az 1.(a) ábrán, 1-98. csoportként. A „DP”-nomenklatúrát Tomlinson és munkatársai [J. Mol. Biol. 227, 776-798 (1992)] írták le. CDR3 aminosav-szekvenciája lehet Ser-Leu-Pro-Lys. CDR3 aminosav-szekvenciája lehet Gly-Val-Gly-Ala-Phe-Arg-Pro-Tyr-Arg-Lys-His-Glu. Tehát a találmány szerinti specifikus kötőmolekula kötődoménje tartalmazhat olyan VH-domént, amely az 1.(a) ábrán bemutatott, CGS1- és CGS2-re leírt aminosav-szekvenciákat tartalmazza.



A kötődomén tartalmazhat humán DPL16-csíravonalból származó, könnyű lánc variábilis régiót („VL”-domén), melynek szekvenciáját bemutatjuk az 1.(a) ábrán, 1-90. kódonként.

A VL-domén tartalmazhat CDR3-szekvenciaként Asn-Ser-Ser-Pro-Val-Val-Leu-Asn-Gly-Val-Val-szekvenciát. A VL-domén tartalmazhat CDR3-szekvenciaként Asn-Ser-Ser-Pro-Phe-Glu-His-Asn-Leu-Val-Val-szekvenciát.

A találmány szerinti specifikus kötőmolekulák tartalmazhatják az 1. ábrán bemutatott szekvenciák funkcionálisan ekvivalens variánsait, azaz egy vagy több inszertált, deletált, szubsztituált vagy hozzáadott aminosavat, feltéve, ha a leírásban kiemelt tulajdonság megmarad. Például a CDR3-szekvenciát meg lehet változtatni, vagy a vázrégiókban lehet végezni egy vagy több változtatást, vagy a vázrégiót lehet helyettesíteni egy másik vázrégióval, vagy módosított formával, feltéve, ha a specifikus kötőmolekula képes ED-B-t kötni.

A leírásban ismertetett ellenanyag antigénkötő doménjének VL- vagy VH-doménjéből származó, egy vagy több CDR-t alkalmazhatunk úgynevezett „CDR-graft”-ban, amelyben egy első ellenanyagból származó egy vagy több CDR-szekvenciát helyezünk nem az illető ellenanyag, azaz egy másik ellenanyag vázrégió-szekvenciába, lásd EP-B-0239400. sz. európai közzétételi irat. CGS1- és CGS2-be való CDR-szekvenciákat az 1.(a) és 1.(b) ábrákon mutatunk be.

A találmány szerinti specifikus kötőmolekula lehet olyan, hogy kompetícióba lép egy leírás szerinti,



fibronektin-ED-B-t kötni képes ellenanyaggal vagy scFv-vel. Kötőmolekulák közötti kompetíciót könnyen vizsgálhatunk *in vitro*, például specifikus riportermolekulát kapcsolunk az egyik kötőmolekulához, amelyet detektálhatunk a másik, jelöletlen kötőmolekula (molekulák) jelenlétében, lehetővé téve olyan specifikus kötőmolekulák azonosítását, amelyek ugyanahhoz vagy egy átfedő epitóphoz kötnek.

A találmány szerinti specifikus kötőmolekulát alkalmazhatjuk olyan eljárásban, amely kiváltja vagy lehetővé teszi a specifikus kötőmolekula kötődését epitópjához. A kötődés létrejöhet a specifikus kötőmolekula emlős-, például humán vagy rágcsáló-szervezetbe, például egérbe való beadását követően.

A találmány tárgyát képezi a fenti specifikus kötőmolekulák alkalmazása diagnosztikai reagensként tumorokra. A lentebb leírt, kísérleti állatmodellel alapján nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti kötőmolekulák hasznosak tumor *in vivo* lokalizációjában.

A találmány szerinti, előnyös specifikus kötőmolekulák közé tartoznak azok, amelyek olyan humán tumorokhoz kötődnek, például kriosztátos metszetben, amelyek invazív és angiogén fenotípust mutatnak, és azok, amelyek embrionális szövetekhez kötődnek, például kriosztátos metszetben. A kötődést immuncitokémiai festéssel lehet kimutatni.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a specifikus kötőmolekula nem köt, vagy szignifikánsan nem köt tenaszkin, extracelluláris mátrixfehérjét.



A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint, a specifikus kötőmolekula nem kötődik, vagy szignifikánsan nem kötődik normál humán bőrhöz, például kriosztátos metszetben és/vagy immuncitokémiai festésként kimutatva.

A találmány további előnyös megvalósítási módjai szerint, a találmány szerinti kötőmolekulák nem kötődnek, vagy szignifikánsan nem kötődnek az alábbiak közül egy vagy több normál szövethez, például máj-, lép-, vese-, gyomor-, vékonybél-, vastagbél-, petefészek-, méh-, húgyhólyag-, hasnyálmirigy-, mellékvese-, vázizom-, szív-, tüdő-, pajzsmirigy- és agyszövethez (például kriosztátos metszetben és/vagy immuncitokémiai festéssel kimutatva).

ED-B-re specifikus kötőmolekulát alkalmazhatunk olyan *in vivo* célzóágensként, amelyet fibronectin-ED-B-t expresszáló vagy azzal asszociált tumorok jelenlétének és helyének specifikus kimutatására lehet alkalmazni. Leképező ágensként lehet azt alkalmazni. A találmány tárgyát képező eljárás fibronectin-ED-B-t expresszáló vagy azzal asszociált tumor vagy sejt jelenlétének meghatározására, amelyben sejteket érintkeztetünk a találmány szerinti specifikus kötőmolekulával, és meghatározzuk a specifikus kötőmolekula sejtekhez való kötődésének mértékét. Az eljárást végrehajthatjuk *in vivo*, vagy a testből eltávolított sejtekből álló tesztmintán *in vitro*.

Az ellenanyagok reaktivitásait sejtmintán meghatározhatjuk bármilyen alkalmas módszerrel. Egyedi riportertermolekulák rákapcsolása az egyik lehetőség. A riportertermolekulák

közvetlenül vagy közvetve kelthetnek detektálható, és előnyösen mérhető jeleket. A riportertermolekulák kapcsolása lehet közvetlen vagy közvetett, kovalens, például peptidkötéssel keresztüli, vagy nem-kovalens. Peptidkötéssel keresztüli kapcsolat lehet ellenanyagot és riportertermolekulát kódoló génfúzió rekombináns expressziójának eredménye. Egy kedvelt módszer az egyes ellenanyagok kovalens kapcsolása egyedi fluorokrómmal, foszforral vagy spektrálisan elkülöníthető abszorpció és emissziós tulajdonságokkal rendelkező lézerfestékkel. Alkalmas fluorokróm például fluoreszcein, rhodamin, fitoeritrin és Texasvörös. Alkalmas kromogén festék például diamino-benzidín.

Másféle riporter lehet makromolekuláris kolloidpartikulumok vagy partikuláris anyag, például színezett, mágneses vagy paramágneses látexgyöngyök, és biológiailag vagy kémiaiilag aktív ágensek, amelyek közvetlenül vagy közvetve keltenek detektálható szignálokat, vizuális megfigyelés, elektronikus detektálás vagy más módszerrel való rögzítés céljából. Ezek a molekulák lehetnek enzimek, amelyek olyan reakciókat katalizálnak, amelyek például szint fejlesztenek vagy megváltoztatnak, vagy elektromos tulajdonságokban okoznak változásokat. Lehetnek molekulárisan gerjeszthetők, és így az energiaállapotok közötti elektronátmenetek jellemző abszorpció és emisszió spektrális változásokat eredményeznek. Lehetnek kémiai jellegűek, melyeket bioszenzorokkal összekapcsolva alkalmazunk. Biotin/avidint vagy biotin/szterpavidint és alkalikus foszfatázt tartalmazó detekciós rendszereket is alkalmazhatunk.

A kötődés meghatározásának módja nem képezi a találmány tárgyát, és szakember képes alkalmas módszert választani az alapján, mit részesít előnyben és általános ismerete szerint.

Egyedi ellenanyag-riporter-konjugátumok által keltett jelek felhasználhatók az adott ellenanyag (normál- és teszt-) sejtmintákban végbement kötődéséből származó, mennyiségileg meghatározható, abszolút vagy relatív adatok származtatására. Ezenkívül általános, például propidium-jodidos sejtmagfestést alkalmazhatunk a mintában lévő teljes sejtpopuláció számlálására, lehetővé téve mennyiségi arányok felállítását egy adott egyedi sejtpopuláció és a teljes sejtszám között. Ha radioaktív jelölést, például ^{125}I , ^{111}In vagy $^{99\text{m}}\text{Tc}$ atomokat kapcsolunk az ellenanyaghoz, ha ez az ellenanyag főleg inkább tumorban lokalizálódik, mint normál szövetekben, a radioaktív jelölés jelenléte a tumorszövetben detektálható, és gamma-számláló alkalmazásával mennyiségileg meghatározható. Az így kapott tumor-kép minősége közvetlen korrelációban van a jel:zaj aránnyal.

Az ellenanyagok felhasználhatók diagnosztikai ágensként újonnan vaszkularizálódott tumorok nyomon követésére, és például módosított formában is alkalmazhatók citotoxikus ágensek célba juttatására, vagy vérárvadás beindítására az új ércsatornáknak, így megfosztva a fejlődő tumort oxigéntől és tápanyagoktól, és tumorterápia indirekt formáját alkothatja.



A találmány tárgyát képezi a fentebb leírt, specifikus kötőmolekulák alkalmazása terápiás reagensként, például ha kapcsoljuk, kötjük vagy fúziós fehérjeként megtervezzük, hogy effektorfunkcióval rendelkezzen. A találmány szerinti kötőmolekulát toxin, radioaktivitás, T-sejtek, killer sejtek vagy más molekulák célba juttatására lehet alkalmazni tumorhoz, amely a kérdéses antigént expresszálja vagy azzal asszociált.

Ennek megfelelően, a találmány további vonatkozásában, a találmány tárgyát képezik a fenti specifikus kötőmolekula beadását magában foglaló kezelési eljárások, ilyen specifikus kötőmolekulát tartalmazó gyógyászati készítmények, és ilyen specifikus kötőmolekula alkalmazása beadásra szánt gyógyszer gyártásában, például gyógyszer vagy olyan gyógyászati készítmény előállítására szolgáló eljárásban, amely a specifikus kötőmolekulát gyógyászatilag elfogadható segédanyaggal kisserelve tartalmazza.

A találmány szerint, az előállított készítményeket beadhatjuk egyéneknek. A beadás előnyösen „terápiásan hatásos mennyiségben” történik, amely elegendő ahhoz, hogy jótékony hatást fejtsen ki a páciensre. Ilyen jótékony hatás lehet legalább egy kórtünetnek legalább az enyhítése. Az aktuálisan beadott mennyiség, és sebessége és a beadás időzítése függ a kezelendő állapot természetétől és súlyosságától. A kezelés előírása, például a dózismagyság eldöntése, stb., általános gyakorló orvos vagy más orvosdoktorok felelőssége. A megfelelő ellenanyag dózis szakember számára nyilvánvaló; lásd Ledermann és mtsai. [Int. J. Cancer 47,

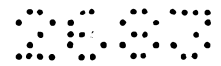
659-664 (1991)]; Bagshawe, K. D. és mtsai. ["Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4, 915-922 (1991)].

A készítmény beadható egymagában vagy más kezelésekkel kombinációban, akár szimultán, akár egymás követően, a kezelendő állapottól függően.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények, és azok találmány szerinti alkalmazása tartalmazhat a hatóanyagon kívül gyógyászatilag elfogadható segédanyagot, hordozót, puffert, stabilizátort vagy más, szakember által jól ismert anyagot. Az ilyen anyagoknak nem szabad toxikusnak lenniük, és nem zavarhatják meg a hatóanyag hatékonyságát. A hordozó vagy más anyag pontos természete függ a beadás módjától, amely lehet orális, vagy injekció, pl. intravénás.

Az orális beadásra szánt gyógyászati készítmények lehetnek tabletta, kapszula, por vagy folyadék formában. A tabletta tartalmazhat szilárd hordozót, például zselatint vagy adjuvánst. A folyékony gyógyászati készítmények általában folyékony hordozót, például vizet, petróleumot, állati vagy növényi eredetű olajat vagy szintetikus olajat tartalmaznak. Fiziológias sóoldatot, dextrózt vagy más szacharid-oldatot, vagy glikolokat, például etilén-glikolt, propilén-glikolt vagy polietilén-glikolt is tartalmazhatnak.

Az intravénás injekcióban, vagy a betegség által sújtott helyre adott injekcióban lévő hatóanyag lehet parenterálisan elfogadható vizes formában, amely pirogénmentes, és



megfelelő pH-, izotóniás és stabilitást biztosító körülmények között van. Szakember képes megfelelő oldatokat előállítani, például izotóniás oldószer, például nátrium-klorid-injekció, Ringer-féle injekció, laktátot tartalmazó Ringer-féle injekció felhasználásával. Szükség szerint tartósítószeret, stabilizátorokat, puffereket, antioxidánsokat és/vagy más adalékanyagokat is tartalmazhatnak.

A találmány szerinti specifikus kötőmolekulák a kódoló nukleinsavból expresszióval állíthatók elő. Bármelyik specifikus kötőmolekulát kódoló nukleinsav önmagában a találmány tárgyát képezi, valamint a specifikus kötőmolekula előállítására szolgáló eljárás, amely eljárásban ennek következtében a kódoló nukleinsavból expresszálunk. Az expresszió kényelmesen elérhető a nukleinsavat tartalmazó rekombináns gazdasejtek megfelelő körülmények közötti tenyésztésével.

A nukleinsav az ellenanyag itt leírt antigénköti doménjének vagy bármilyen funkcionálisan ekvivalens formájának bármilyen aminosav-szekvenciáját kódolhatja. Nukleinsav-szinten változtatásokat tehetünk addícióval, szubsztitúcióval, delécióval, vagy egy vagy több nukleotid inszerciójával, amely változtatás vagy hatással van az aminosav-sorrendre, vagy nem, a genetikai kód degeneráltságának függvényében.

Polipeptid klónozására és különböző gazdasejtekben történő expressziójára szolgáló rendszerek jól ismertek. Megfelelő gazdasejtek például baktériumok, emlős sejtek, élesztő és baculovírus-rendszerek. A technika állása sze-



rint rendelkezésre álló, heterológ polipeptid expressziójára szolgáló emlős sejtvonalak például kínai hörcsögből származó petefészek-sejtek, HeLa-sejtek, bébi-hörcsög veséjéből származó sejtek és sok más. Közösleges, előnyben részesített gazdaszervezet az *E. coli*.

Ellenanyagok vagy ellenanyag-fragmensek expressziója prokarióta sejtekben, például *E. coli*-ban, jól ismert a technika állása szerint. Összefoglaló irodalomként lásd Plückthun [Bio/Technology 9, 545-551 (1991)]. Expresszió eukarióta sejtek tenyészetében szakember számára szintén rendelkezésre áll a specifikus kötőmolekulák előállításának egyik lehetőségeként, lásd a közelmúltban megjelent összefoglaló irodalmakat, például Reff [Curr. Opinion Biotech. 4, 573-576 (1993)]; Trill és munkatársai [Curr. Opinion Biotech. 6, 553-560 (1995)].

Alkalmas vektorokat választhatunk vagy állíthatunk össze, amelyek megfelelő promóterszekvenciákat, terminátorszekvenciákat, poliadenilálási szekvenciákat, enhanszerszekvenciákat tartalmazó szabályzószekvenciákat, markergéneket és más, ide illő szekvenciákat tartalmaznak. A vektorok lehetnek plazmidok, virális eredetűek, például fágok vagy fágmidok, az alkalmazáshoz illően. További részleteket lásd például Sambrook és munkatársai, „Molecular Cloning: a Laboratory Manual” (2. kiadás, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Sok ismert, nukleinsavak manipulálására szolgáló, például nukleinsav-szerkezetek előállítására, mutagenézisre, szekvenálásra, DNS bevitelére sejtbe és génexpresszióra, valamint fehérjék analízisére szolgáló



technika és recept részletes leírását megtalálhatjuk Ausubel és munkatársai (szerk.) könyvében „Short Protocols in Molecular Biology” (2. kiadás, John Wiley & Sons, 1992). Sambrook és munkatársai, valamint Ausubel és munkatársai közleményei a kitanítás tárgyát képezik.

Tehát a találmány további vonatkozásában, a találmány tárgyát képezi a találmány szerinti nukleinsavat tartalmazó gazdasejt. A találmány egy még további vonatkozásában, a találmány tárgyát képezi eljárás ilyen nukleinsav bevitelére gazdasejtbe. A bevitelhez bármilyen rendelkezésre álló technikát alkalmazhatunk. Eukarióta sejtek esetén alkalmas technika például kalcium-foszfátos transzfekció, DEAE-dextrán, elektroporáció, liposzóma-mediált transzfekció és retrovírust vagy más vírust például vakcciniát (tehénhimlőt) alkalmazó transzdukció, vagy rovarsejtek esetén baculovírus alkalmazása. Bakteriális sejtek esetén alkalmas technika lehet kalcium-kloridos transzformáció, elektroporáció és bakteriofágot alkalmazó transzfekció.

A bevitel után következhet a nukleinsavból való expresszió kiváltása vagy az expresszió, például a gazdasejt tenyésztésével, a gén expressziójához megfelelő körülmények között.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a találmány szerinti nukleinsav a gazdasejt genomjába (például kromoszómájába) integrálódik. Az integrációt elősegíthetjük olyan szekvenciák beépítésével, amelyek elősegítik a genommal való rekombinációt standard technikák szerint.



Specifikus kötőmolekula előállítását követően, például a leírásban ismertetett bármilyen módon alkalmazhatjuk azt, például gyógyászati vagy diagnosztikai termék formájában, például olyan reagenskészletként, amely a specifikus kötőmolekulán kívül a molekula sejtekhez való, fentebb tárgyalt kötődésének meghatározására szolgáló, egy vagy több reagenst tartalmaz.

A találmány további vonatkozásai és előnyös megvalósítási módjai szakember számára nyilvánvalóak. A találmány szerinti megoldás teljes megértése érdekében az alábbi példákat mutatjuk be szemléltetés céljából, anélkül, hogy az igényelt oltalmi kört ezekre korlátoznánk. A következő ábrákra hivatkozunk:

Az 1. ábrán a CGS-1 és CGS-2, scFv-kból származó, egymás alá rendezett, VH és VL aminosav-szekvenciáját mutatjuk be. Az 1.a ábra a VH-szekvenciákat, az 1.b ábra a VL-szekvenciákat mutatja. A CDR-ket (1, 2 és 3) megjelöltük. Mindkét scFv-vel leginkább homológ humán csíravonal a VH3-család DP47-szegmense; mindkét klón VL-szegmense DPL16, a könnyű láncot használtuk az eredeti scFv-könyvtár felépítéséhez [Nissim és mtsai., EMBO J. 13, 692-698 (1994)]. Aláhúztuk azokat a csoportokat, amelyek a két klónban különböznek egymástól.

2. ábra: A 2.a ábrán egy humán FN-alegység doménszerkezetének modellje látható. A IIICS-, ED-A- és ED-B-régiókat, az FN pre-mRNS alternatív érése (splicing) következtében variábilis régiókat megjelöltük. Az ábra a belső homológiákat is bemutatja, valamint a termolizines

emésztés, ED-B-t tartalmazó főbb termékeit [Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987)]. A 2.b ábra a plazmából származó, a WI38VA-FN, és azok termolizines emésztményeinek 4-18%-os SDS-PAGE-t mutatja be, Coomassie Blue-val festve és azok immunblotjait BC-1, IST-6, CGS-1 és CGS-2 próbák alkalmazásával. Emésztetlen (1. sáv) és termolizinnel emésztett, plazmából származó FN, 1 µg/mg FN (3. sáv) és 10 µg/mg (4. sáv) FN alkalmazása esetén. Emésztetlen (2. sáv) és termolizinnel emésztett, WI38VA-FN, 1 µg/mg FN (5. sáv), 5 µg/mg (6. sáv) és 10 µg/mg (7. sáv) FN alkalmazása esetén. A jobb oldalon található számok a termolizines emésztés 2.a ábrán bemutatott, fő termékeit jelzik. A bal oldalon található értékek a molekulatömeg-standardeket jelzik, kilodaltonban (kD) kifejezve.

3. ábra: A 3.a ábra *E. coli*-ban expresszált fúziós és rekombináns fehérjék által tartalmazott, FN-ből származó, III. típusú ismétlődő szekvenciákat mutatja be, és ezen fehérjék reaktivitását CGS-1-el és CGS-2-vel valamint BC-1 és IST-6 mAb-ekkel. A 3.B. ábra Coomassie Blue-val festett gél és mellette az immunblottot mutatja, CGS-1, CGS-2, BC-1, IST-6 próbákat alkalmazva. A sávok számozása megfelel az ábra felső részén található peptidkonstrukciónál alkalmazott számozással. A bal oldalon található értékek a molekulatömeg-standardeket jelzik, kilodaltonban (kD) kifejezve.

A 4. ábrán infravörös "egér-leképező" látható; a tumorcélzó kísérletekben alkalmazott "egér-leképező" egy fekete, nem-fluoreszcens dobozból áll, amely wolfrám/halogén-lámpával, speciálisan a CY7, infravörös

fluorofórhhoz tervezett gerjesztési és emissziós szűrővel, és számítógép-vezérelt, 8-bites, monokróm CCD-kamerával van felszerelve.

5. ábra: Fluoreszcensen jelölt ellenanyag-fragmensek célba jutása F9 egér/patkány teratokarcinómába, B-FN-re specifikus monomer scFv(CGS-1) és dimer scFv(CGS-1)₂ alkalmazásával. Lizozimra specifikus, dimer scFv(D1.3)₂-t alkalmaztunk negatív kontrollként.

6. ábra: Fluoreszcensen jelölt ellenanyag-fragmensek célba jutása F9 egér/patkány teratokarcinómába, affinitásérlelt scFv(CGS-2) és ugyanarra, a B-FN epitópra specifikus, kisebb affinitással rendelkező scFv(28SI) alkalmazásával. A célba jutást mind nagy tumorok (körülbelül 0,6 gramm), melyet a 48. óránál fekete kéreg fedett, amely részlegesen meggátolta a leképezést, mind kis tumorok (körülbelül 0,2 gramm) esetén detektáltuk.

A leírásban említett dokumentumok a kitanítás tárgyát képezik.

Az 1. példa: Humán fibronectin ED-doménjére specifikus, humán scFv izolálása.

A 2. példa: Humán FN-ED-B-doménre specifikus, humán scFv-k affinitásérlelése.

A 3. példa: Affinitásérlelt scFv-k specifikitása ED-B-t tartalmazó fibronectinekre.

A 4. példa: Affinitásérlelt, anti-ED-B scFv-k alkalmazása humán és egérből származó tumorok immuncitokémiai festésében.



Az 5. példa: Affinitásérlelt anti-ED-B scFv-k alkalmazása humán tumorok *in vivo* megcélzásában.

A 6. példa: Egér/patkány, xenograft F9-teratokarcinóma megcélzása meztelen egerekben.

1. példa

Humán fibronektin ED-doménjére specifikus, humán scFv izolálása

Humán scFv-fágkönyvárat [Nissim és mtsai., EMBO J. 13, 692-698 (1994)] alkalmaztunk rekombináns ellenanyagok szelekciójára. Az ED-B-izoforma két különböző formáját használtuk antigénforrásként a szelekcióhoz, és mindkét esetben az izoforma rekombináns, humán fehérje volt.

III. típusú, 2-11 (b-) és 2-11 (B+) ismétlődő szekvenciákat tartalmazó, rekombináns FN-peptideket expresszáltunk *Escherichia coliban*.

Egy konstrukciót állítottunk elő, pFH154- [Kornblihtt és mtsai., EMBO J. 4, 1755 (1985)], λ F10- és λ F2-klónokból [Carnemolla és mtsai., J. Cell. Biol. 108, 1139-1148 (1989)] származó FN-cDNS alkalmazásával. A 2229-4787. bázisokat felölelő cDNS-konstrukciókat [Kornblihtt és mtsai., EMBO J. 4, 1755 (1985)] pQE-3/5-vektorba inszertáltuk, "QIAexpress kit" (Qiagen cégtől szereztük be, Chatsworth, CA) alkalmazásával. Az FN-III 2-11 (B-) és (B+) rekombinánsokat immunaffinitás-kromatográfiával tisztítottuk, Sepharose 4B-hez (Pharmacia) konjugált 3E3-mAb alkalmazásával [Pierschbacher és mtsai., Cell 26, 259-267 (1981)]. A III. típusú, 7B89, 789, ED-B és FN-6 homológ, ismétlődő szekvenciákat tartalmazó, rekombináns FN-

fragmensek előállítására szolgáló DNS-fragmenseket polimeráz-láncreakciót (PCR) alkalmazó amplifikációval állítottuk elő, "UltMa" DNS-polimeráz (Perkin Elmer) alkalmazásával, templátként FN 2-11 (B+) és FN 2-11 (B-) klónokból származó cDNS-t használtuk. A láncindító oligonukleotidokat úgy terveztük, hogy lehetővé tegyék a PCR-termékek klónozását pQE-12-be "QIAexpress kit" (Qiagen) alkalmazásával. Azokat egymást követően transzformáltuk *E. coli*-ba, és expresszáltuk. Valamennyi cDNS-klónt "Sequenase 2.0 DNA" szekvenáló kit (USB) alkalmazásával szekvenáltunk.

A rekombináns fehérjét Ni-NTA-kromatográfiával (IMAC) tisztítottuk, a gyártó (Qiagen) utasításai alapján, hexahisztidin-szekvencia alkalmazásával az FN-fragmensek karboxil-terminálisánál. ED-B- β Gal fúziós fehérjét állítottunk elő úgy, hogy ED-B-cDNS-t klónoztunk bakteriofág λ gt11-vektorba, így λ ED-B-klónhoz jutottunk. A λ chFN60-klónt (ED-B-szekvencia egy részét tartalmazta) fúziós fehérjeként származtattuk, klónozott, csirke eredetű FN-pchFN60-ból [Norton és mtsai., Mol. Cell. Biol. 7, 4297-4307 (1987)].

Humán scFv-fágkönyvtár szelekciójához három ciklus „panning”-ot végeztük, két különböző rekombináns antigén (7B89 és ED-B) mindegyikére. Immuncsöveket (Nunc; Maxisorp, Roskilde, Dánia) burkoltunk mindkét antigénnel, 50 μ g/ml-es koncentrációt alkalmazva PBS-ben (20 mM foszfát-puffer, 0,15 M NaCl, pH 7,2). Az első antigén 7B89, rekombináns FN-fragmens volt, amelyben az ED-B-domén a szomszédos, III. típusú, homológ, ismétlődő FN-szekvenciákkal van szegélyez-



ve; ezzel 4°C-on, egy éjszakán át burkoltunk. A második alkalmazott antigén a rekombináns ED-B [Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987)] volt, karboxil-terminálisánál hexahisztidin-szekvenciával; ez a fehérje nem tartalmaz lizin-csoportokat, így az első aminosav terminális aminosav csoportja rendelkezésre áll arra a célra, hogy az ED-B-t helyspecifikusan, kovalensen immobilizáljuk reaktív ELISA-tálcákhoz (Nunc; Covalink). A burkolást szobahőmérsékleten végeztük egy éjszakán át.

Három „panning”-ciklus után, az eluált fagot HB2151 *E. coli* sejtekbe fertőztük, és szélesztettük [Nissim és mtsai, EMBO J. 13, 692-698 (1994)]. A „panning”-ciklusok után 95 ampicillin-rezisztens, egyedi kolóniát szkrineltünk ELISA-val, antigénspecifikus scFv-k azonosítása céljából. Az antigénekkel legnagyobb ELISA-jeleket adó klónokat szelektáltuk ki további analízisre, és affinitásérlelésre. A 4. példában részletesen bemutatjuk, hogy ezek a klónok specifikus festést adnak glioblasztóma multiformák és melltumorok metszeteiben, immunocitokémiai festéssel.

2. példa

Humán FN-ED-B-doménre specifikus, humán scFv-k affinitásérlelése

35GE- (7B89-val végzett szelekcióból származó) és 28SI- (ED-B-doménnel végzett szelekcióból származó) klónokat szelektáltuk ki, ellenanyag-jelöltként az affinitásérleléshez. A könnyű láncok variálásának céljából, az affinitás javításának eszközeként, egy egyszerű affinitásérlelési stratégiát dolgoztunk ki a könnyű lánc CDR3-ban lévő, köz-



ponti elhelyezkedésű, hat csoport (DSSGNH) random variálására építve, degenerált oligonukleotidok és PCR (1. ábra) alkalmazásával, amely $20^6 = 6,4 \times 10^7$ potenciális szekvenciaváltozatot biztosít. Ez a régió (a nehéz lánc CDR3-al együtt) az antigén-kötőhely középpontjában helyezkedik el [Padlan és mtsai., (1994)]. A hat csoportot közvetlenül megelőző, szerinhez nyúló arginincsoportot is mutáltuk abból a célból, hogy elkerüljük a szelekciót domináló, elektrosztatikus hatások lehetőségét.

„Szülői” scFv-fragment expresszázó, egyetlen bakteriális kolóniából származó plazmidot PCR-el amplifikáltuk, LMB3 (5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC-3') és CDR3-6-VL-FOR (5'-CTT-GGT-CCC-TCC-GCC-GAA-TAC-CAC-MNN-MNN-MNN-MNN-MNN-MNN-AGA-GGA-GTT-ACA-GTA-ATA-GTC-AGC-CTC-3') láncindító oligonukleotidok alkalmazásával, 72°C-on (1'30"), 25 ciklus; a puffereket és a körülményeket lásd Marks és munkatársai, (1991). Az így kapott terméket gélen tisztítottuk (abból a célból, hogy eltávolítsuk az eredeti scFv-gént tartalmazó plazmid nyomait), és templátként alkalmaztuk egy második amplifikációs lépésben, amelyben LMB3 és J1-Not-FOR (5'-ATT-GCT-TTT-CCT-TTT-TGC-GGC-CGC-GCC-TAG-GAC-GGT-CAG-CTT-GGT-CCC-TCC-GCC-3') láncindító oligonukleotidokat alkalmaztunk, (94°C [1'] - 55°C [1'] - 72°C [1'30"]) 25 ciklus. A nyers PCR-terméket, amely agaróz gélben a helyes molekulatömegnek megfelelő, egyetlen csíkként futott, közvetlenül az PCR-reakciókeverékből tisztítottuk „Spin-Bind” (FMC, Rockland, ME, USA) alkalmazásával, duplán emésztettük NcoI/NotI-enzimekkel, és gélen tisztított, NcoI/NotI-



enzimekkel emésztett, pHEN1-fágmidba [Hoogenboom és mtsai., Nucl. Acid. Res. 19, 4133-4137 (1991)] ligáltuk, amely egy NcoI/NotI-enzimekkel emésztett néma inszertet tartalmazott, hogy elősegítsük a duplán emésztett vektornak az egyszere- sen emésztett vektortól való szétválasztását. A vektort Qiagen (Chatsworth, CA, USA) „plazmid maxiprep kit” alkal- mazásával állítottuk elő. Körülbelül 5 µg emésztett plazmidot és inszertet alkalmaztunk a ligálási reakciókeve- rékben, amelyet egyszer fenollal, egyszer fe- nol/kloroform/izoamil-alkohollal (25:25:1) extraháltunk, azután etanollal kicsaptuk, hordozóként glikogént (Boehringer Mannheim, Németország) alkalmaztunk, és „speed- vac”-ban szárítottuk. A leülepedett csapadékot 20 µl vízzel felszuszpendáltuk, és elektroporáltuk elektrokompetens TG1 *E. coli* sejtekbe [Gibson, PhD thesis, University of Camb- ridge, Cambridge, UK (1984)]. Az elektrokompetens sejteket tipikusan 10^9 transzformáns/µg titerrel alkalmaztuk, ha glicerines törzsoldatból indultunk ki, vagy 10^{10} transzformáns/µg titerrel, ha frissen preparált elektrokom- petens sejteket alkalmaztunk. Ez tipikusan $>10^7$ klónt ered- ményezett az itt leírt eljárás szerint.

Az érlelési könyvtárat ezután Nissim-féle könyvtár- ként [Nissim és mtsai., EMBO J. 13, 692-698 (1994)] kezel- tük fágpartikulumok előállítása céljából, amelyeket egy újabb szelekciós ciklusban használtuk immuncsőveken, anti- génként 7B89-et (10 µg/ml) alkalmaztunk, melyet egy ciklus kinetikus szelekció [Hawkins és mtsai., J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992)] követett. Ezt a szelekciós lépést úgy haj-



tottuk végre, hogy biotinilált 7B89-et (10 nM) inkubáltunk fáguszuszpenzióval (körülbelül 10^{12} t.u.) 2% tej-PBS-ben (2% MPBS), az első szelekciós ciklusban 5 percig, azután hozzáadtunk nem-biotinilált 7B89-et (1 μ M), és 30 percig hagytuk, hogy a kompetíció végbemenjen. Előzetesen 2% MPBS-el blokkolt, 100 μ l sztreptavidinnel burkolt „dynabeads”-gyöngyöket (Dyna: M480) adtunk azután a reakciókeverékhez, 2 percig kevertettük, és azután mágnesen kifogtuk, és 10-szer mostuk felváltva PBS + 0,1% Tween-20-al és PBS-el. A fágot 0,5 ml 100 mM trietil-ammóniummal eluáltuk a gyöngyökről. Ezt az oldatot azután 0,25 ml, 1 M Tris-pufferrel (pH 7,4) neutralizáltuk, és exponenciálisan növekvő HB2151-sejtek fertőzésére [Nissim és mtsai., EMBO J. 13, 692-698 (1994)] alkalmaztuk. 95 ampicillin-rezisztens, egyedi kolóniát használtunk fel scFv-tartalmú felülúszók termelésére [Nissim és mtsai., EMBO J. 13, 692-698 (1994)], melyeket ELISA-val, immunhisztokémiával és BIAcore-al szkríneltünk a legjobb kötődések azonosítására. Azokat azután szubklónoztuk pDN268 expressziós vektor SfiI/NotI-hasítóhelyei közé [Neri és mtsai., Bio/Techniques 20, 708-713 (1996)], melyhez foszforilálható szakaszt, FLAG-epitópot és hexahisztidin-szekvenciát kapcsolunk az scFv C-terminálisának legvégéhez.

A releváns ellenanyagok egyedi kolóniáit pDN268-ba szubklónoztuk, melyet 37°C-on növesztettünk 100 mg/l ampicillint és 0,1% glükózt tartalmazó 2 x TY-ban. Amikor a sejttenyészet elért $OD^{600}=0,8$ -at, IPTG-t adtunk hozzá 1 mM végkoncentrációban, és a növesztést tovább folytattuk 16-20



óraig, 30°C-on. Centrifugálás után (GS-3 Sorvall rotor, 7000 rpm, 30 perc) a felülúszót leszűrtük, töményítettük, és kicseréltük felvivő pufferre (50 mM foszfát, pH 7,4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol), Minisette (Filtron), tangenciális áramlást biztosító berendezés alkalmazásával. Az így kapott oldatot 1 ml Ni-NTA-gyantára (Qiagen) vittük, 50 ml felvivő pufferrel mostuk, és elúciós pufferrel (50 mM foszfát, pH 7,4, 500 mM NaCl, 100 mM imidazol) eluáltuk. A tisztított ellenanyagot SDS-PAGE-val [Laemmli, (1970)] analizáltuk, és PBS-el szemben dializáltuk 4°C-on. A tisztított scFv-preparátumokat a továbbiakban gélszűréssel dolgoztuk fel, S-75 oszloppal felszerelt FPLC-berendezés (Pharmacia) alkalmazásával, mivel tudjuk, hogy a multivalens scFv-fragmensek mesterségesen kialakított, jó kötési készséget mutathatnak BIAcore-on [Jonsson és mtsai., BioTechniques 11, 620-627 (1991)] aviditáshatások következtében [Nissim és mtsai., EMBO J. 13, 692-698 (1994); Crothers és Metzger, Immunochemistry 9, 341-357 (1972)]. Az FPLC-vel tisztított, monomer-frakciókban az ellenanyag koncentrációját spektrofotometriánál határoztuk meg, feltételezve, hogy 1 mg/ml-es scFv-oldat 280 nm-en mért abszorbanciája 1,4 egység.

Monovalens scFv kötődését 0,1 - 1 μ M tartományba eső különböző koncentrációknál, PBS-ben mértük BIAcore berendezésén (Pharmacia Biosensor), a következő antigének alkalmazásával: (i) 1000 rezonancia-egység (RU) biotinilált rekombináns 7B89-FN-fragmens, sztreptavidinnel burkolt chipre immobilizálva, amelyet 250 RU scFv köt specifikusan; (ii) az N-terminális amino-csoportnál kémiaiilag immobili-



zált, 200 RU rekombináns ED-B, amelyet 600 RU scFv köt specifikusan; (iii) 3500 RU ED-B-gazdag WI38VA-fibronektin (lásd a 3. példát), amelyet 150 RU scFv köt specifikusan. Az adatok kinetikus analízisét a gyártó utasításai szerint végeztük. Az ellenanyagtartalmú felülúszók kvalitatív BIAcore-analízise alapján szelektáltuk az egyes scFv-klónok egy affinitásérlelt variánsát: CGS-1-klónt a 78B9-fragmenssel való szelekcióból, és CGS-2-klónt az ED-B, rekombináns FN-fragmenssel való szelekcióból. Az asszociációs sebességi állandókat (k_{on}) és a disszociációs sebességi állandókat (k_{off}) az 1. táblázatban mutatjuk be, az scFvs-re és az eredeti 28SI-klónra számolt egyensúlyi disszociációs állandókkal (K_d) együtt. Bár mind a CGS-1-klón, mind a CGS-2-klón K_d -je nanomoláris tartományba esik, a CGS-2-klón mutatta a legjobb javulást szülői klónjához képest, amelynek K_d -je 1 nM volt (110 nM-ról javult) a szenzor-chipben tesztelt mindhárom fehérjére nézve (1. táblázat). A javulás főleg a lassúbb kinetikai disszociációs állandónak (kb. 10^{-4} s^{-1}) tulajdonítható, monomer ellenanyag-preparátumokon mérve (nem mutatjuk be).

Az érlelési stratégia általánosnak tűnik, és javított affinitású ellenanyagot eredményez maltózkötő fehérje, citokróm-C, egér/patkányból származó endoglin extracelluláris doménje [D. N., L. Wyder, R. Klemenzt], citomegalovírus [A. P., G. Neri, R. Botti, P. N.], HMGI-C-fehérje (nukleáris tumormarker) [A. P., P. Soldani, V. Giancotti, P. N.] és placentából származó alkalikus foszfatáz (petefészek-tumormarker) [M. Deonarain és A. A.



Epentos] esetén. A stratégia tehát legalább annyira hatékonynak tűnik, mint más érlelési stratégiák [Marks és mtsai., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Low és mtsai., J. Mol. Biol. 260, 359-368 (1996)], és hasonló affinitással rendelkező ellenanyagokat eredményez, mint a nagyon nagy fág-ellenanyag-könyvtárakból származó ellenanyagok [Griffiths és mtsai., EMBO J. 13, 3245-3260 (1994); Vaughan és mtsai., Nature Biotechnol. 14, 309-314 (1996)].

A CGS-1 és CGS-2 affinitásérlelt klónokat szekvenáltuk, és humán csíravonalból származó V-gének adatbázisához (V-BASE) rendeztük, azután "MacVector" software alkalmazásával lefordítottuk. Mindkét klón VH-génje volt leginkább homológ a DP47 humán csíravonallal (VH3), ezenkívül az egyes klónok különböző VH-CDR3-szekvenciával rendelkeztek (1. ábra). Mindkét klón VL-génje humán, szintetikus scFv-készlet összeállításában alkalmazott, Nissim és munkatársai által leírt [EMBO J. 13, 692-698 (1994)] DPL16-csíravonal volt. A VL-CDR3-szekvenciák különböztek egymástól, véletlenszerűen, négy-hat helyzetben (1.b ábra).

1. TÁBLÁZAT

CGS-1 és CGS-2 monomer scFv-fragmensek kinetikus és disszociációs állandói ED-B-domént tartalmazó fehérjékkel szemben

Antigén: ED-B

ScFv:	CGS-1	S128	CGS-2
$k_{off} (s^{-1}) *$	$7,0 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-4}$
$k_{on} (M^{-1}s^{-1}) *$	$1,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
$K_d (M) *$	$5,4 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-9}$

Antigén: 7B89

ScFv:	CGS-1	S128	CGS-2
$k_{off} (s^{-1}) *$	$3,9 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-4}$
$k_{on} (M^{-1}s^{-1}) *$	$1,1 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
$K_d (M) *$	$3,5 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-9}$

Antigén: FN WI38VA

ScFv:	CGS-1	S128	CGS-2
$k_{off} (s^{-1}) *$	$5,0 \times 10^{-3}$	$7,1 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^{-4}$
$k_{on} (M^{-1}s^{-1}) *$	$4,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$
$K_d (M) *$	$1,2 \times 10^{-8}$	$5,9 \times 10^{-8}$	$2,4 \times 10^{-9}$

Jelmagyarázat az I. táblázathoz:

A kísérleteket az "Anyagok és módszerek" fejezet szerint hajtottuk végre.

* A k_{off} és k_{on} értékek pontossága $\pm 30\%$, a koncentráció-meghatározás pontossága, és a kissé eltérő eredmények miatt, melyeket akkor kaptunk, amikor a szenzogrammok különböző régióit használtuk fel az illesztési eljárásban. $K_d = k_{off}/k_{on}$.

3. példa

Affinitásérlelt scFv-k specifitása ED-B-t tartalmazó fibronektinekre

A két affinitásérlelt scFv (CGS-1 és CGS-2) immunreaktivitását eredetileg ELISA-val határoztuk meg, és közvetlenül BC-1-mAb-hez (amely a B-FN-izofórmát ismeri fel) és IST-6-mAb-hez (amely csak az ED-B-nélküli FN-izofórmákat ismeri fel) hasonlítottuk [Carnemolla és mtsai., J. Cell. Biol. 108, 1139-1148 (1989); Carnemolla és mtsai., J. Biol. Chem. 24689-24692 (1992)]. Ezen mAb-k jellemzését a korábbiakban már leírták [Carnemolla és mtsai., J. Cell. Biol. 108, 1139-1148 (1989); Carnemolla és mtsai., J. Biol. Chem. 24689-24692 (1992)]. Ezután finomspecifitásvizsgálatot végeztünk termolizín-kezeléssel származtatott, sokféle FN-fragmens és rekombináns fúziós fehérje alkalmazásával.

Az ELISA-hoz és az immunblottoláshoz alkalmazott antigéneket az alábbiak szerint állítottuk elő. FN-t humán plazmából és WI38VA13-sejtvonal kondicionált tápközegéből



tisztítottuk korábbiakban leírtak szerint [Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987)]. Tisztított FN-t termolizinnel emésztettünk (X. típusú proteáz; Sigma Chemical Co.) Carnemolla és munkatársai, J. Cell. Biol. 108, 1139-1148 (1989) közleménye szerint. A natív FN 110 kD (B-) és a natív FN 120 kD (B+) fragmenseit (lásd 2. táblázat) korábbi közlemény [Borsi és mtsai., Anal. Biochem. 192, 372-379 (1991)] szerinti FN-emésztményekből tisztítottuk. A tenaszkin-C nagy izoformáját Saginati és munkatársai [Eur. J. Biochem. 205, 545-551 (1992) által leírtak szerint tisztítottuk. A rekombináns fehérjét az 1. példában leírtak szerint expresszáltuk és tisztítottuk. SDS-PAGE-t és Western-blottolást Carnemolla és munkatársai (1989) által leírtak szerint végeztünk.

Az ELISA-ban alkalmazott valamennyi antigént PBS-el hígítottuk 50-100 µg/ml-es koncentráció közé, és 4°C-on burkoltunk egy éjszakán át Immuno-Plate mérőhelyeire (Nunc, Roskilde, Dánia). A nem kötődött antigént PBS-el távolítottuk el, és azután a tálcákat 3 térf% marhaszérumból származó albumint (BSA) tartalmazó PBS-el blokkoltuk 2 óra hosszáig 37°C-on. Ezt négy mosás követte 0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS-el (PBST). Az ellenanyagot azután 1,5 óra hosszáig hagytuk kötődni 37°C-on; az scFv-eket a toldalékszekvenciára (a FLAG-toldalékre specifikus M2-mAb-vel [Kodak, New Haven, CT], vagy a myc-toldalékre specifikus 9E10-el [ATCC, Rockville, MD]) specifikus antiszérummal előinkubáltuk. Kontroll-ellenanyagként BC-1 és IST-6 mAb-t teszteltünk. PBST-vel való négyszeri mosás után a tálcákat

1 óra hosszáig inkubáltuk 37°C-on 1:2000 hígítású (3% BSA, PBST-ben), biotinilált, kecskében termeltetett, anti-egér IgG-vel (Bio-SPA Division, Milánó, Olaszország). A mosásokat megismételtük, és hozzáadtunk sztreptavidinből és biotilinált alkalikus foszfatázból álló komplexet (Bio-SPA Division, Milánó, Olaszország) (1:8000 hígításban PBST-vel, amely 2 mM MgCl₂-t tartalmazott) 1 óra hosszára 37°C-on. A reakciót 10%-os dietanol-aminban (pH 9,8) feloldott foszfatáz-szubsztrát ["Phosphatase substrate tablets" (Sigma)] hozzáadásával hívtuk elő, és az optikai denzitást 405 nm-en olvastuk le. Az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat

	CGS-1	CGS-2	BC-1	IST-6
Plazma FN	0,07		0,04	0,09
WI38VA FN	1,16		0,72	1,20
n110 kD (B-)	0,03		0,01	0,05
n120 kD (B+)	0,82		0,81	1,20
rec FN7B89	1,11	1,02	1,02	0,01
rec FN789	0,01		0,01	0,05
rec ED-B	1,21		1,32	0,15
rec FN-6	0,01		0,01	0,08
Tenaszkin	0,01		0,02	0,06

Az scFv és a monoklonális ellenanyagok immunreaktivitását fibronectinből származtatott antigénekkel mértük ELISA-val. Az értékek 405 nm-en mért OD-ket je-

lentenek a háttér-jel levonása után. Az adatok négy kísérlet átlagát jelentik, maximum 10% standard deviációval.

A kísérletekben alkalmazott, különböző fibronectin-formák azonosítása az alábbi: plazma FN = humán plazmából származó fibronectin; WI38-VA FN = SV40-el transzformált fibroblasztok felülúszóiból származó fibronectin [Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987)]; n110kD = termolizinnel kezelt, ED-B-nélküli FN-domén-4; n120kD = termolizinnel kezelt, ED-B-t tartalmazó FN-domén-4; rec FN7B89 = szomszédos, III. típusú, homológ, ismétlődő FN-szekvenciákkal szegélyezett ED-B-domén; rec FN789 = III. típusú, homológ, ismétlődő FN-szekvenciák ED-B-doménnel; rec ED-B = rekombináns ED-B egymagában; rec FN6 = rekombináns FN-domén-6.

Mind a CGS-1, mind a CGS-2 felismeri a rekombináns ED-B-peptidet, valamint az összes, ED-B-szekvenciát tartalmazó, natív vagy rekombináns FN-fragmenst is, miközben nem kötődnek semmilyen, ED-B-nélküli FN-fragmenshez. Továbbá, a CGS-1 és CGS-2 nem reagál tenaszkinnal [amely tizenöt III. típusú, homológ, ismétlődő szekvenciát tartalmaz, Siri és munkatársai, Nucl. Acid. Res. 19, 525-531 (1991)], és plazmából származó FN-el, amely nem tartalmaz detektálható mennyiségben ED-B-szekvenciát a termolizinnel emésztett termékekben [Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987)]. Ezzel ellentétben, a CGS-1 és CGS-2 erőteljesen reagál SV40-el transzformált, WI38VA-sejtvonalból tisztított FN-el. Ebből a sejtvonalból származó FN-molekulák körülbelül 70-90%-a tartalmaz ED-B-t, amint azt tisztított FN-t és a

sejtvonalból izolált össz-RNS-t alkalmazó, termolizines emésztéssel és S1-nukleázos kísérletekkel kimutatták [Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987); Borsi és mtsai., Int. J. Cancer 52, 688-692 (1992)]. FN-ből származó ED-B-komponensre termeltetett scFv-k specifitását még a továbbiakban mutatjuk be, szolubilis, rekombináns ED-B alkalmazásával, amely képes gátolni a CGS-1- és/vagy CGS-2-nek WI38VA-sejteken lévő FN-hez való kötődését (az adatokat nem mutatjuk be).

Az adatok azt igazolják, hogy a CGS-1 és CGS-2 csak olyan FN-származékokkal reagál specifikusan, amelyek tartalmazzák az ED-B-domént. Mindkettő ugyanolyan reaktivitást mutat, mint a BC-1-mAb, kivéve rekombináns ED-B esetén, amelyet nem ismer fel a BC-1. Az ELISA-jelek kontroll mAb-khoz viszonyított intenzitása a két scFv nagy specifitására utal ED-B-tartalmú antigének esetén.

A CGS-1 és CGS-2 specifitását immunblottokon vizsgáltuk tovább, plazmából származó FN és WI38VA-sejtek, valamint ezek termolizines emésztményeinek alkalmazásával. WI39VA-sejtekből származó FN (a többségük tartalmaz ED-B-domént) termolizines emésztése során 120 kD méretű (ED-B-t tartalmazó) fragmens, és egy ED-B-nélküli, 110 kD méretű kisebb fragmens keletkezik [2.a ábra; Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987)]. A 120 kD méretű domén további emésztésével két fragmens keletkezik: egy 85 kD méretű fragmens, amely majdnem az egész ED-B-szekvenciát tartalmazza karboxil-terminálisánál, és egy 35 kD méretű szekven-



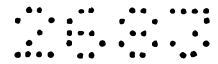
cia [2.a ábra; Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987)].

A 2.b ábra bal oldalán immunblottal analizált fehérjefrakciók Coomassie-val festett géljeit láthatjuk. A plazmából származó FN-t (1. sáv) és a fehérje termolizines emésztményeit (3. sáv, amely a 110 kD méretű fehérjét tartalmazza, és 4. sáv, amely az emésztett 110 kD méretű fehérjét tartalmazza) nem ismeri fel a CGS-1 és CGS-2. Ezzel ellentétben, az ED-B-gazdag, WI38VA-sejtekből származó FN-t, mind intakt (2. sáv), mind növekvő mennyiségű termolizinnel emésztett formában (5., 6. és 7. sáv) felismeri mindkét scFv-fragmens. A legkisebb, FN-ből származó fragmens, melyet a CGS-1 specifikusan képes felismerni, a 120 kD méretű fehérje (a 2-11., III. típusú ismétlődő szekvenciák közötti rész, azokat is beleértve), míg a CGS-2 a 85 kD méretű fragmenst képes felismerni, amely a 2-7. ismétlődő szekvenciák közötti részt foglalja magában az ED-B N-terminálisánál [2.b ábra; Zardi és mtsai., EMBO J. 6, 2337-2342 (1987)]. Ezek az eredmények azt indikálják, hogy a két scFv két különböző epitópra reaktív az ED-B-szekvenciában. A CGS-2 kötődése a 85 kD méretű doménhez azt indikálja, hogy a klónnak megfelelő epitóp az ED-B aminos terminálisában helyezkedik el. Ezzel ellentétben, a CGS-1 nem képes kötődni, ha a 120 kD méretű domént 85 kD méretűre emésztjük, ami azt támasztja alá, hogy olyan epitópot ismer fel, amely sokkal inkább az ED-B-molekula karboxil-terminálisa felé helyezkedik el.



A CGS-1 és CGS-2 finomspecifitását a továbbiakban rekombináns FN-fragmenseket és ED-B-szekvenciát tartalmazó vagy azokat nem tartalmazó fúziós fehérjéket alkalmazó immunblottolással vizsgáltuk. FM fúziós fehérjéket Carnemolla és munkatársai [J. Cell. Biol. 108, 1139-1148 (1989)] leírása szerint állítottunk elő. Ezen kísérletek eredményeit a 3. ábrán mutatjuk be; a vázlatos diagram megfeleltetését a humán FN doménjeinek szerkezetéhez lásd Carnemolla és mtsai. [J. Biol. Chem. 24689-24692 (1992)]. A kapott kötési görbék lényegében megerősítik az előző kísérletekben, az ELISA és az immunblottok esetén találtakat tisztított FN-re és proteolitikus hasítási termékekre: a CGS-1 és CGS-2 erőteljesen reaktív az ED-B-tartalmú FN-fragmensekkel (2. és 4. sáv), de nem mutat reaktivitást az ED-B-nélküli FN-szekvenciákkal (1. és 3. sáv). A CGS-1 nem reagál sem humán (5. sáv), sem csirkéből származó (6. sáv) ED-B fúziós fehérjével, míg a CGS-2 erősen reagál mindkét fragmenssel (3. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy bizonyos konformációs akadály van a CGS-1 által felismert, ED-B-t tartalmazó FN-ben lévő epitópban; például lehetséges, hogy az epitóp denaturációra érzékeny, vagy nem hozzáférhető teljes mértékben, ha SDS-PAGE-val frakcionáljuk és szilárd hordozóra, például nitrocellulózra visszük át.

Mindent összevetve, ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy a CGS-1 és CGS-2 erősen és specifikusan kötődik ED-B-tartalmú FN-khez, az ED-B-szerkezet egymástól jól elkülöníthető régióiban, valamint jól elkülöníthetően az ED-



B-szerkezetnek attól a régiójától, amit a BC-1-mAb felismer.

4. példa

Affinitásérlelt, anti-ED-B scFv-k alkalmazása humán és egérből származó tumorok immuncitokémiai festésében

A CGS-1-et és CGS-2-t egyaránt alkalmazhatjuk az ED-B-tartalmú FN-molekulák immunológiai lokalizálására különböző normál és neopláziás humán szövetekben. Normál szövetként a bőrt választottuk, mivel ismeretes, hogy a B-FN-izoforma makrofágokban és fibroblasztokban expresszálódik a kután sebgyógyulás folyamán [Carnemolla és mtsai., J. Cell. Biol. 108, 1139-1148 (1989); Brown és mtsai., Amer. J. Pathol. 142, 793-801 (1993)]. A két kiválasztott humán tumoron előzőleg anti-fibronektin mAb-eket alkalmazó festés specifitását vizsgáltuk: glioblasztóma multiformát tanulmányoztuk részletesen, mivel ebben a tumorban a véredények endotél sejtjei nagymértékben proliferatív állapotban vannak, megnövekedett mértékű angiogén folyamatokkal, köztük B-FN-izoformák expressziójával [Castellani és mtsai., Int. J. Cancer 59, 612-618 (1994)]. Továbbá sokféle normál, hiperpláziás és neopláziás humán mellszövetet alkalmaztunk a kísérletekben, amelyek további bizonyítékokat szolgáltatnak az angiogenezis és a B-FN-expresszió közötti kapcsolatra [Kaczmarek és mtsai., Int. J. Cancer 58, 11-16 (1994)].

Az itt leírt kísérletekben a CGS-1-el és CGS-2-vel végzett immunhisztokémiai festést a BC-1-mAb-al (amely a B-FN-izoformát ismeri fel) végzett festéshez, és más olyan mAb-al végzett festéshez hasonlítottuk, amelyekről ismere-



tes, hogy valamelyik vagy mindegyik ismert FN-izoforma-variánssal (IST-4) reagál, vagy csak az ED-B nélküli FN-izoformákkal (IST-6). Ezen valamennyi kontroll ellenanyagot előzőleg már jellemezték [Carnemolla és mtsai., J. Cell. Biol. 108, 1139-1148 (1989); Carnemolla és mtsai., J. Biol. Chem. 24689-24692 (1992)].

Normál és neopláziás szöveteket kaptunk sebészeti beavatkozás közben vett mintákból. Az már ismeretes volt, hogy a szövetek preparálása és fixálása kritikus az FN-tartalmú molekulák pontos és érzékeny detektálásához [Castellani és mtsai., Int. J. Cancer 59, 612-618 (1994)]. Immunhisztokémia céljára 5 μ m vastagságú kriosztát-metszeteket levegőn szárítottunk, és hideg acetonban fixáltunk 10 percig. Az immunfestést sztreptavidin és biotinilált alkalikus foszfataz komplexét tartalmazó festő-reagenskészlet (Bio-SPA Division, Milano, Olaszország), és naftol-AS-MX-foszfát és Fast Red TR (Sigma) alkalmazásával hajtottuk végre. Gill-féle hematoxilint alkalmaztunk utánszínezőként, amelyet követően „glycergel”-be (Dako, Carpinteria, CA) ágyasztuk, korábban leírtak szerint [Castellani és mtsai., Int. J. Cancer 59, 612-618 (1994)]. A specifitás további analizálása céljából, azokban a kísérletekben, ahol a szövetek pozitívan festődtek, az ED-B-re való specifitást úgy bizonyítottuk, hogy az ellenanyagokat rekombináns ED-B-doménnel előinkubáltuk, azt követően a fentebb leírtak szerint detektáltunk.

Ezen kísérletek eredményei egészében véve azt mutatták, hogy mind a CGS-1, mind a CGS-2 ugyanazzal a hisztológiai struktúrával reagál, mint a BC-1-mAb. Bőrre kapott festési mintázat CGS-1-et, CGS-2-t és BC-1-et alkalmazva arra utal, hogy FN-ből származó ED-B-expresszió nincs a dermisben. Invazív ductalis karcinómametszetek festése esetén a CGS-1, CGS-2 és BC-1 korlátozott eloszlású festődést mutatott a neopláziás sejtek és a stroma közötti határon. Ez összhangban van azzal a ténnyel, hogy bár az össz-FN homogénen oszlik el a tumor stromájában, a B-FN expressziója csak bizonyos régiókra korlátozódik, és ezek azok a területek, amelyeket előzőleg sikeresen lokalizáltunk (az esetek 95%-ában) invazív ductalis karcinómában BC-1-mAb alkalmazásával [Kaczmarek és mtsai., Int. J. Cancer 58, 11-16 (1994)].

Igazoltuk azokat a korábbi felismeréseket, melyeket glioblasztoma multiforma-tumor BC-1-et alkalmazó festésekor találtunk. Castellani és munkatársai [Int. J. Cancer 59, 612-618 (1994)] glomerulus-szerű vaszkuláris struktúrák tipikus festődési mintázatát figyelték meg, és a mi kísérleteinkben a CGS-1- és CGS-2-ről kimutattuk, hogy kvalitatíve ezzel azonos eredményeket ad.

Azonban egy lényeges különbség van a CGS-1 és CGS-2 valamint a BC-1-mAb között: a két humán scFv-ről kimutattuk, hogy képes kötődni mind csirkéből, mind egérből származó B-FN-hez, míg a BC-1 szigorúan humán-specifikus. A CGS-2 képes volt csirkeembriókkal reagálni (az adatokat nem



mutatjuk be), és mind a CGS-1, mind a CGS-2 képes volt egérből származó tumorokkal reagálni.

Egér/patkányból származó, F9-teratokarcinóma-metszeteken lévő vaszkuláris struktúrák CGS-1-festését szintén bemutatjuk. Ellenben valamennyi egérből származó, tesztelt normál szövet (máj-, lép-, vese-, gyomor-, vékonybél-, vastagbél-, petefészek-, méh-, húgyhólyag-, hasnyálmirigy-, mellékvese-, vázizom-, szív-, tüdő-, pajzsmirigy- és agyszövet) negatív festődési reakciót mutatott CGS-1-el és CGS-2-vel (az adatokat nem mutatjuk be). Az F9-teratokarcinóma-metszeteken festődött struktúrákról kimutattuk, hogy ED-B-specifikusak voltak, rekombináns ED-B-domént alkalmazva, amely teljesen meggátolta az így kapott festődést (az adatokat nem mutatjuk be).

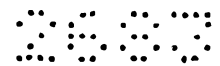
5. példa

Affinitásérlelt anti-ED-B scFv-k alkalmazása humán tumorok in vivo megcélzásában

SKMEL-28, humán melanóma sejtvonalat alkalmaztunk xenograft (két különböző fajból átültetett szövetet tartalmazó) tumorok kifejlesztésére 6-10 hetes meztelen egerekben (Balb-c vagy MF-1; Harlan, UK) úgy, hogy 1×10^7 sejtet injektáltunk egerenként szubkután az egyik horpaszba. Tumorokat hordozó egerek farok-erébe injektáltunk 100 μ l, 1 mg/ml scFv₁-Cy7₁-oldatot PBS-ben, amikor a tumorok körülbelül 1 cm átmérőt értek.



Rekombináns ellenanyagokat CY7-el úgy jelöltünk, hogy hozzáadtunk 100 μ l, 1 M nátrium-hidrogén-karbonát-oldatot (pH = 9,3) és 200 μ l CY7-bis-Osu-t (Amersham; kat.sz. PA17000; 2 mg/ml DMSO-ban) 1 ml, PBS-ben oldott ellenanyag-oldathoz (1 mg/ml). Szobahőmérsékleten, 30 perc múlva, a keverékhez hozzáadtunk 100 μ l 1M Tris-puffert, pH = 7,4, és a jelölt ellenanyagot elválasztottuk a reagálatlan festéktől, egyszer használatos, PBS-el ekvilibrált PD10-oszlopok alkalmazásával (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Az eluált zöld ellenanyag-frakciókat betöményítettük körülbelül 1 mg/ml-re Centricon-10-csövek alkalmazásával (Amicon, Beverly, MA, USA). Az elért jelölési arány általában egy molekula CY7 volt egy molekula ellenanyagra nézve. Ezt spektroszkópiusan határoztuk meg 1 cm-es küvettákban, feltételezve, hogy 1 mg/ml ellenanyag-oldat abszorpciója 280 nm-en 1,4 egység, és a CY7 moláris extinkciós állandója 747 nm-en 200.000 ($M^{-1}cm^{-1}$), és elhanyagoltuk a CY7 abszorpcióját 280 nm-en. Az ellenanyag-minták immunreaktivitását a jelölés után vagy "band-shift"-el [Neri és mtsai., Nature Biotechnology 14, 385-390 (1996)], antigén-oszlopon végzett affinitáskromatográfiával, vagy BIAcore-analízissel igazoltuk. Az egereket házilag épített egér-leképezővel képeztük le, szabályos időközönként, oxigén/fluorotán-keverék belélegeztetésével előidézett anesztézia alatt. Az egyes minták esetén két-nyolc egeret tanulmányoztunk abból a célból, hogy meggyőződjünk az eredmények reprodukálhatóságáról. Az eljárásokat UK Project Licence: "Tumour Targeting" szerint hajtottuk végre (kiadta D. Neri UK PPL 80/1056).



Az infravörös "egér-leképezőt" Folli és munkatársai [Cancer Res. 54, 2643-2649 (1994)] szerinti fotodetekciós rendszer módosításaként állítottuk össze, amely CY7 infravörös fluorofór alkalmazását tette lehetővé. Az infravörös megvilágítást azért választottuk, mert jobb szövetpenetrációt kapunk. A CY7 fluoreszcenciája (>760 nm) az emberi szem számára láthatatlan, és számítógéppel vezérelt CCD-kamera alkalmazása szükséges. Az "egér-leképező" egy feketére festett, fénytől elzárt doboz, amely 100 W-os wolfrám/halogén-lámpával van felszerelve, speciálisan CY7-hez tervezett gerjesztési szűrő (Chroma Corporation, Brattleboro, VT, USA; 673-748 nm) van ráillesztve. Az így kapott besugárzó fény, jó közelítéssel egy 5 x 10 cm méretű területen homogén, amelyre az egeret helyeztük a leképezés céljából. A fluoreszcenciát egy 8-bites, monokróm Pulnix CCD-kamerával detektáltuk, amely "C-mount" lencsékkel és 50 mm emissziós szűrővel (Chroma Corporation, Brattleboro, VT, USA; 765-855 nm) volt felszerelve, és "ImageDOK" adatátviteli rendszerhez (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool) kapcsolódott. Ez a rendszer képkimerevítővel felszerelt számítógépből és software-ből áll, egymás után következő képek felvétele és integrálása céljából. Egy átlagos eljárásban három egymást követő képet vettünk fel 50 ms alatt; ezt a számot állandónak vettük egy állatról készült képsorozat esetén, lehetővé téve a tumorcélzás közvetlen összehasonlítását különböző időpontokban. A TIFF-formátumú képeket azután PICT-fájlokká konvertáltuk "Graphics Converter" program alkalmazásával, és kiértékeljük "MacDraw Pro" program



alkalmazásával "Power Macintosh 7100/66" típusú számítógépen.

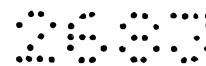
A berendezés vázlatos rajza a 4. ábrán látható.

Ezek a kísérletek alátámasztották, hogy mindkét scFv a tumornál lokalizálódik, ha makroszkópikus szinten láthatóvá tesszük.

Fejlődő tumorokban lévő, újonnan képződött érrendszer két anti-EDB scFv-vel való megcélzásának mikroszkópikus bemutatását az alábbiakban ismertetjük részletesen.

Az egyik horpaszban SKMEL-28, xenograft humán melanómában, vagy egéreredetű F9-teratokarcinómában szenvedő meztelen egerekbe és/vagy SCID-egerekbe injektáltunk jelöletlen FLAG-toldalékkal ellátott scFv-fragmenseket, vagy biotinilált scFv-fragmenseket.

Az egereket az injekció után, különböző időpontokban elpusztítottuk, tumoros és nem-tumoros metszeteket készítettünk, amelyeket azután szokásos immunhisztokémiai eljárás szerint festettünk, vagy anti-FLAG M2-ellenanyag (Kodak, 181), vagy sztreptavidin-alapú detekciós reagensek alkalmazásával. Optimális célzást általában 12 órával az injekció után kaptunk. Mind a CGS1-re, mind a CGS2-re bemutattuk, hogy képes mind xenograft humán tumorhoz, mind egér/patkányeredetű teratokarcinómához kötődni.



6. példa

Egér/patkány, xenograft F9-teratokarcinóma megcélzása meztelen egerekben

Szilárd tumorokat fejlesztettünk ki meztelen egerek horpaszában, 4×10^6 egér/patkányból származó, F9 teratokarcinóma-sejtek szubkután injekciójával. Ezek a tumorok nagyon gyorsan növekednek egerekben, az 1 cm-es átmérőt az injekció után körülbelül 1 héttel eléri, és nagymértékben vaszkularizáltak. Az ellenanyaggal végzett megcélzás leképezése céljából, Folli és munkatársai [Cancer Res. 54, 2643-2649 (1994)] által leírt fotodetekciós módszer módosítását alkalmaztuk, amely lehetővé teszi a tumor megcélzás és az ellenanyag-kiürülés kinetikai kiértékelését ugyanabban az állatban, különböző időpontokban, a fentebb részletesen leírtak szerint (lásd a 4. ábrát).

A tumor megcélzása és az ellenanyagok detektálása céljából, scFv(CGS-1), scFv(CGS-2) és anti-lizozim scFv(D1.3) [McCafferty és mtsai., „Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains”, Nature (London) 348, 552-554 (1990)] ellenanyagokhoz egy homodimerizációs toldalékot [Pack és mtsai., Bio/Technology 11, 1271-1277 (1993)] kapcsoltunk úgy, hogy az ellenanyagokat pGIN50 expressziós vektor SfiI/NotI-hasítóhelyébe szubklónoztuk. Ez a vektor a pDN268 [Neri és mtsai., Nature Biotechnology 14, 385-390 (1996)] származéka, amelyben a toldalék His6-szekvenciáját helyettesítettük a következő szekvenciával: GGC-LTD-TLQ-AFT-DQL-EDE-KSA-LQT-EIA-HLL-KEK-EKL-EFI-LAA-H, amely egy cisztein-csoportot, és a Fos-

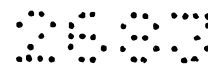


fehérje amfipatikus hélixét tartalmazza, az ellenanyag-fragmensek kovalens homodimerizációja [Abate és mtsai., (199)] céljából. A teljes kovalens dimerizációt nem értük el: az ellenanyag-fragmensek körülbelül 30-50%-át kovalensen kapcsolt dimerek alkották.

Az ellenanyag-fragmenseket affinitáskromatográfiával tisztítottuk olyan oszloppal, melyre tyúktojásból származó lizozimot (D1.3) vagy 7B89-et [anti-ED-B ellenanyagok; Carnemolla és mtsai., (1996)] kapcsoltunk CNBr-aktivált Sepharose-hoz (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). A felülúszókat felvittük az affinitás-hordozókra, melyet azután PBS-el, PBS + 0,5 M NaCl-al mostunk, és 100 mM Et3N-el eluáltunk. Az ellenanyagokat azután PBS-el szemben dializáltuk.

Az ellenanyagokat a fentebb leírtak szerint jelöltük, és azután a tumort hordozó egerek farok-erébe injektáltuk PBS-ben oldott, 100 μ l, 1 mg/ml scFv₁-Cy7₁-oldattal, ha a tumor körülbelül 1 cm átmérőt elért.

Ahogy az 5. ábrán látható, scFv(CGS-1)-et három napig volt lokalizálható a tumoron, bár gyorsan ki is ürült a tumorból ezen periódus alatt. Azonban bizonyos mértékű festődés a combnál is volt. A CGS-1 tumorcélzó hatékonysága drámaian javult az amfipatikus hélix bevitelével, amely egy cisztein-csoportot tartalmazott a C-terminálisnál az ellenanyag-dimerizáció elősegítése céljából [Pack és mtsai., Bio/Technology 11, 1271-1277 (1993)]. Valóban úgy tűnt, hogy a dimer scFv(CGS-2)₂ lokalizációja nem csökkent szignifikánsan 24-72 óra között. Ezzel ellentétben a negatív



kontroll [a dimer scFv(D1.3)2, anti-lizozim-ellenanyag] gyors kiürülést mutatott, és nem volt detektálható lokalizáció a tumoron vagy combon.

Az ScFv(28SI) gyenge tumorcélzó képességet mutatott 6 óra elteltével (nem mutatjuk be), de nem volt detektálható 24 óra elteltével vagy később (6. ábra). Az affinitásérlelés sokkal jobb célzó képességhez vezetett; tehát az scFv(CGS-2) hatékonyan célzott kis és nagy F9-tumороkat, akár monomerként (6. ábra), akár dimerként (nem mutatjuk be). Két nap múlva a tumor egy grammjára vonatkoztatott, injektált ellenanyag-dózis körülbelül 2%-a volt megtalálható az scFv(CGS-2) monomer esetén, és 3-4%-a az scFv(CGS-2) dimer esetén. Az scFv(CGS-2) által a tumorhoz szállított dózis szintén nagyobb volt, mint az scFv(CGS-1) esetén (5. és 6. ábra), és korrelációban volt megfelelő affinitásukkal (1. táblázat). Azonban úgy tűnik, hogy mind az scFv(28SI), mind az scFv(CGS-2) hajlamos proteolitikus hasításra, és a máj nagy mértékben felvette, míg az scFv(CGS-1)-ellenanyagok szignifikánsan stabilabbak voltak, és a máj kisebb mértékben vette fel.



Referencialista

- Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992; Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition.
- Alitalo et al. Adv. Cancer Res. 37, 111-158 (1982).
- Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922.
- Barone et al. EMBO J. 8, 1079-1085 (1989).
- Bird et al, Science, 242, 423-426, (1988).
- Borsi et al. J. Cell. Biol. 104, 595-600 (1987).
- Borsi et al. Anal. Biochem. 192, 372-379 (1991).
- Borsi et al. Int. J. Cancer 52, 688-692 (1992a).
- Borsi et al. Exp. Cell Res. 199, 98-105 (1992b).
- Brown et al. Amer. J. Pathol. 142, 793-801 (1993).
- Carnemolla et al. J. Cell Biol. 108, 1139-1148 (1989).
- Carnemolla et al. J. Biol. Chem 24689-24692 (1992).
- Castellani et al. J. Cell. Biol. 103, 1671-1677 (1986).
- Castellani et al. Int. J. Cancer 59, 612-618 (1994).
- Crothers et al. Immunochemistry 9, 341-357 (1972).
- DeJager et al (1988) Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 29:377.
- Folli, et al (1994), Cancer Res., 54, 2643-2649.
- Ffrench-Constant et al. J. Cell Biol. 109, 903-914 (1989).
- Ffrench-Constant et al. Development 106, 375-388 (1989).
- Gibson TJ (1984) PhD thesis. (University of Cambridge, Cambridge, UK).
- Griffiths, et al. (1994), EMBO J. 13, 3245-3260.
- Gutman and Kornblihtt. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84, 7179-7182 (1987).
- Hawkins et al. J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992).
- Holliger et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993).
- Holliger, P. and Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993).
- Hoogenboom et al. Nucl. Acids Res 19, 4133-4137 (1991).
- Humphries et al. J. Cell Biol. 103, 2637-2647 (1986).
- Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, (1988)
- Hynes Ann. Rev. Cell Biol. 1, 67-90 (1985).

- Jain RK. Sci. Am. 271, 58-65 (1994).
- Jonsson et al. BioTechniques 11, 620-627 (1991).
- Juweid et al. Cancer Res 52, 5144-5153 (1992).
- Kaczmarek et al. Int. J. Cancer 58, 11-16 (1994).
- Kornblihtt et al. EMBO J. 4, 1755 (1985).
- Laitinen et al. Lab. Invest. 64, 375-388 (1991).
- Ledermann J.A. et al. (1991) Int J. Cancer 47: 659-664; Low et al (1996), J. Mol. Biol., 260, 359-368.
- Marks et al (1991), J. Mol. Biol., 222, 581-597.
- Marks et al, (1992), Bio/Technology, 10, 779-783.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature (London), 348, 552-554.
- Neri et al (1996a), Bio/Techniques, 20, 708-713.
- Neri et al (1996b), Nature Biotechnology, 14, 385-390.
- Nissim et al. EMBO J. 13, 692-698 (1994).
- Norton and Hynes. Mol. Cell. Biol. 7, 4297-4307 (1987).
- Owens et al. Oxf. Surv. Eucaryot. Genes 3, 141-160 (1986).
- Oyama et al. J. Biol. Chem. 10331-10334 (1989).
- Oyama et al. Cancer Res. 50, 1075-1078 (1990).
- Pack et al (1993), Bio/Technology, 11, 1271-1277.
- Peters et al. Cell Adhes. Commun. 3, 67-89 (1995).
- Pierschbacher et al. Cell 26, 259-267 (1981).
- Plückthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991).
- Reff, M.E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576.
- Ruoslahti. Ann. Rev. Biochem. 57, 375-413 (1988).
- Saginati et al. Eur J. Biochem. 205, 545-549 (1992).
- Schwarzbauer et al. EMBO J. 6, 2573-2580 (1987).
- Schroff et al, 1985 Cancer Res 45: 879-885.
- Siri et al. Nucl. Acids Res. 19, 525-531 (1991).
- Tomlinson I.M. et al, (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798.
- Traunecker et al, Embo Journal, 10, 3655-3659, (1991).
- Trill J.J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech 6: 553-560.
- Vartio et al. J. Cell Science 88, 419-430 (1987).
- Vaughan et al (1996), Nature Biotechnol., 14, 309-314.
- Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989).
- Winter, G and C. Milstein, Nature 349, 293-299, 1991.
- WO94/13804 Yamada. Ann. Rev. Biochem. 52, 761-799 (1983).
- Zardi et al. EMBO J. 6, 2337-2342 (1987).

SZEKVENCIÁLISTA

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 4 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ser Leu Pro Lys

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 12 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 17 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CAGGAAACAG CTATGAC

17

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 51 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CTTGGTCCCT CCGCCGAATA CCACMNNMNN MNNMNNMNNM NNAGAGGAGT

TACAGTAATA GTCAGCCTC

69

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 54 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATTGCTTTTC CTTTTTGCGG CCGCGCCTAG GACGGTCAGC TTGGTCCCTC CGCC 54

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 43 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Gly Cys Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Phe Thr Asp Gln Leu Glu
Asp Glu Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala His Leu Leu Lys Glu
Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala His

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Pro Val Val Leu Asn Gly Val Val

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 8 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: peptid

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 113 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: protein

EREDETI FORRÁS:

TÖRZS: CGS1

A 9. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Ser Leu Pro Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
Arg

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 121 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: protein

EREDETI FORRÁS:

TÖRZS: CGS2

A 10. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
Ala Arg Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu Trp Gly
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg

A 11 AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 109 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLOGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: protein

EREDETI FORRÁS:

TÖRZS: CGS1

A 11. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Pro Val Val Leu Asn Gly
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 109 aminosav

TÍPUSA: aminosav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: protein

EREDETI FORRÁS:

TÖRZS: CGS2

A 12. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Pro Phe Glu His Asn Leu
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás szintetikus molekulakészletből izolált, fibronektin (FN) ED-B onkofetális doménjére specifikus és ahhoz közvetlenül kötődni képes, specifikus kötőmolekula előállítására, azzal jellemezve, hogy a specifikus kötőmolekulát kódoló nukleinsavat expresszáljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy

(i) fágban expresszált, peptid- vagy fehérjekönyvtárat szkrínélünk fibronektin-fehérjéből származó ED-B-domént tartalmazó fibronektin-fragmenssel;

(ii) bakteriális gazdasejteket fertőzünk a pozitív klónokkal;

(iii) a pozitív fág-klónokat affinitásérlelési folyamatnak vetjük alá;

(iv) megismételjük az (i) és (ii) lépéseket az antigénnel szemben javított affinitású, pozitív fágklónok szelektálására;

(v) gazdasejteket fertőzünk a pozitív klónokkal, és ellenanyag-molekulákat tisztítunk a gazdasejtekből.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az (i) lépésben scFv-fágkönyvtárat szkrínélünk fibronektin-fehérjéből származó rekombináns antigénnel.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy humán eredetű scFv-eket expresszáló fágkönyvtárat szkrínélünk.

5. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az (i) lépésben a fágklónokat 7B89 vagy ED-B rekombináns antigénekkal szkríneljük.

6. Szintetikus molekulakészletből izolált, fibronectin (FN) ED-B onkofetális doménjére specifikus és ahhoz közvetlenül kötődni képes, specifikus kötőmolekula, amely 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárással lett előállítva.

7. A 6. igénypont szerinti specifikus kötőmolekula, amely egy ellenanyag antigénkötő doménjét tartalmazza.

8. A 7. igénypont szerinti specifikus kötőmolekula, amely humán eredetű ellenanyag antigénkötő doménjét tartalmazza.

9. A 6-8. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely - az FN termolizin-proteázos kezelését követően - valamennyi ED-B-tartalmú FN-hez kötődik.

10. A 6-9. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely valamennyi ED-B-domént és III. típusú homológ ismétlődő szekvenciákat tartalmazó rekombináns FN-hez kötődik.

11. A 6-10. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, melynek B-FN-hez kötődését az ED-B-domén gátolja.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely képes humán, egérből, patkányból, csirkéből vagy bármilyen más fajból származó, konzervált ED-B-domént tartalmazó B-FN-hez kötődni.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely az FN N-glikanázos kezelése nélkül is képes B-FN-hez kötődni.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely DP47 humán csíravonalból származó szekvencia nehéz lánc variábilis régiójával (VH) (1. kódon: Glu - 98. kódon: Arg, az 1. ábrán) és Ser-Leu-Pro-Lys CDR3-szekvenciával rendelkezik.

15. A 6-13. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely DP47 humán csíravonalból származó szekvencia nehéz lánc variábilis régiójával (VH) (1. kódon: Glu - 98. kódon: Arg, az 1. ábrán) és Gly-Val-Gly-Ala-Phe-Arg-Pro-Tyr-Arg-Lys-His-Glu CDR3-szekvenciával rendelkezik.

16. A 6-13. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely DPL16 humán csíravonalból származó szekvencia könnyű lánc variábilis régiójával (VL) (1. kódon: Ser - 90. kódon: Ser, az 1. ábrán) és Pro-Val-Val-Leu-Asn-Gly-Val-Val szekvenciaként a CDR3-szekvencia maradék részével rendelkezik.

17. A 6-13. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely DPL16 humán csíravonalból származó szekvencia könnyű lánc variábilis régiójával (VL) (1. kódon: Ser - 90. kódon: Ser, az 1. ábrán) és Pro-Phe-Glu-His-Asn-Leu-Val-Val-ként a CDR3-szekvencia maradék részével rendelkezik.

18. A 6-13. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely DP47 humán csíravonalból származó szekvencia nehéz lánc variábilis régiójával (VH) (1. kódon: Glu - 98. kódon: Arg, az 1. ábrán) és a CDR3-szekvenciával rendelkezik.

19. Az 1-18. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely tisztított monomerként mérve, ED-B-FN-re 6×10^{-8} M disszociációs állandóval (Kd) rendelkezik.

20. Az 1-19. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely scFv-molekulát tartalmaz.

21. Az 1-20. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely dimer scFv-molekulát tartalmaz.

22. Az 1-21. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, amely 14-18. igénypontok bármelyike szerint definiált ellenanyag-fragmens.

23. Az 1-22. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekulát tartalmazó gyógyászati készítmény, amely gyógyászatilag elfogadható segédanyaggal van kombinálva.

24. Nukleinsav, amely 6-22. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekulát kódol.

25. Fág, amely 6-22. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekulát kódol.

26. Gazdasejt, amely 24. igénypont szerinti nukleinsavval van transzformálva vagy transzfektálva.

27. A 6-22. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula, terápiás alkalmazásra.



28. A 6-22. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekula alkalmazása tumorok leképezésére vagy megcélzására szolgáló gyógyszer gyártásában.

29. Diagnosztikai kit, amely 6-22. igénypontok bármelyike szerinti specifikus kötőmolekulát és a molekula sejtekhez való kötődésének meghatározását lehetővé tevő, egy vagy több reagenst tartalmaz.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

65 oldal beírás
9 oldal rajz

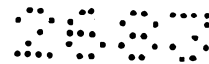
94 oldal

dr. Pethő Árpád

P02 00546

PCT/GB97/01412

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



7-1

1/9

	CDR1				CDR2	
	10	20	30	40	50	60
CGS1	QVQLVESGGCLVQPGGSLRLSCA V SGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEWS AISCSCGSIYYADSVKG					
CGS2	EVQLVESGGCLVQPGGSLRLSCA A SGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEWS AISCSCGSIYYADSVKG					

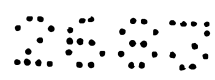
	CDR3			
	70	80	90	98
CGS1	RFTISRINSKNTLYLQ M NSLRAEDTAVYYCAR SLEK WQQGILVIVSR			
CGS2	RFTISRINSKNTLYLQ M NSLRAEDTAVYYCAR GYCAFRPYRKIE WQQGILVIVSR			

1a ábra

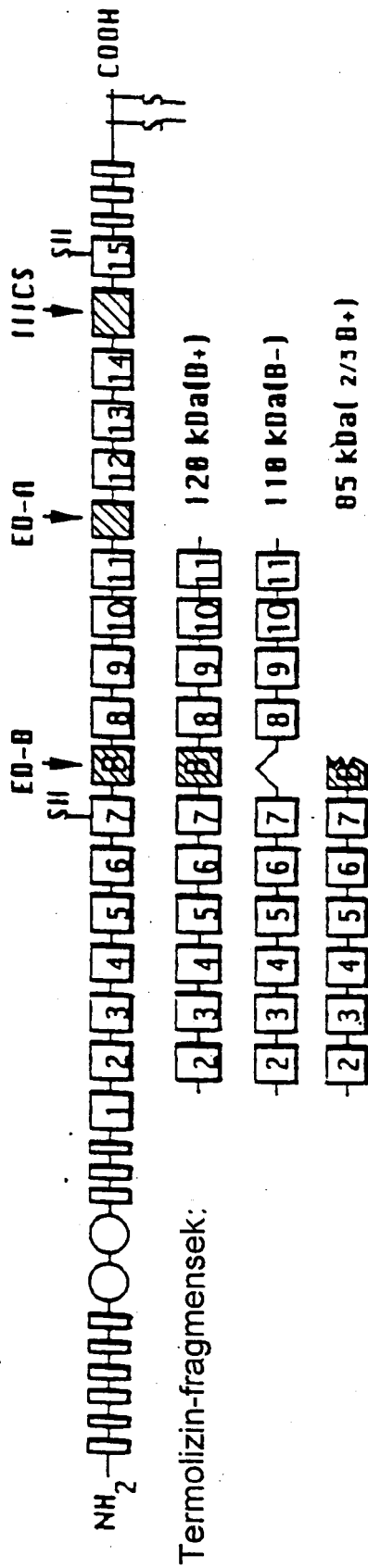
1b ábra

	CDR1					CDR2
	10	20	30	40	50	
CGS1	SSELTQDPAVSVALGQIVRITC QGDSLSRYVAS WYQQKPCQAPVLVITY GKNNRPS					
CGS2	SSELTQDPAVSVALGQIVRITC QGDSLSRYVAS WYQQKPCQAPVLVITY GKNNRPS					

	CDR3				
	60	70	80	90	100
CGS1	GIPDRF9GSS9ENFASLTITCAQAEDEADYYC NSSEPVNLGW FCGGKLTIVLG				
CGS2	GIPDRF9GSS9ENFASLTITCAQAEDEADYYC NSSPEEHLW FCGGKLTIVLG				

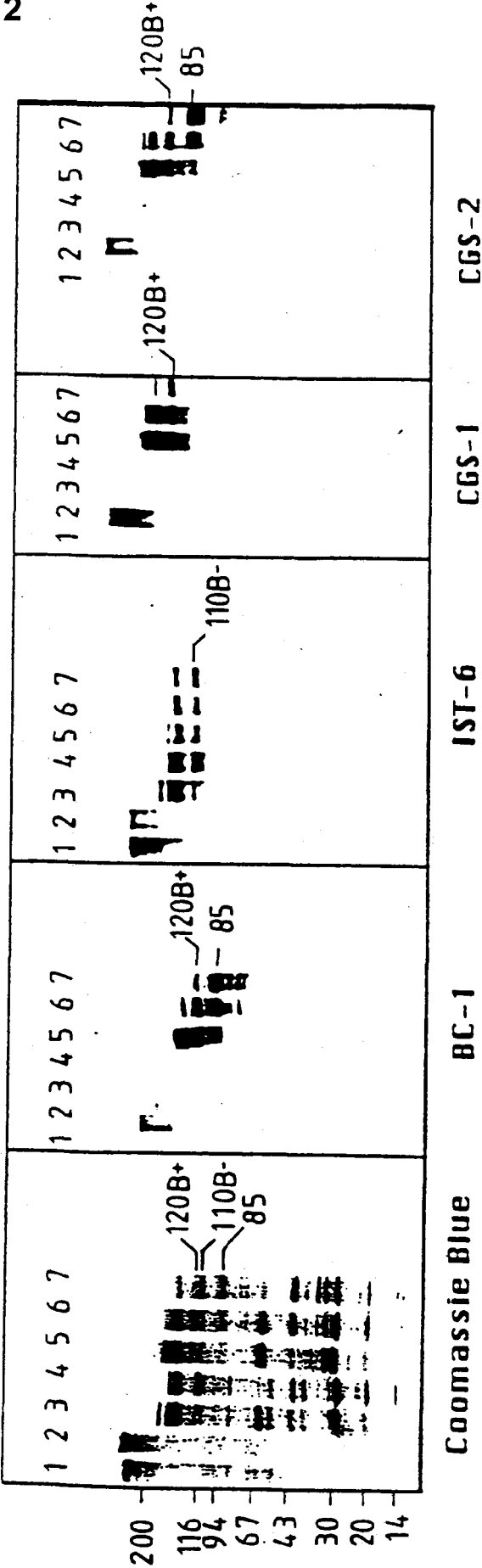


Homológia: I. típus 
 II. típus 
 III. típus 



2a ábra

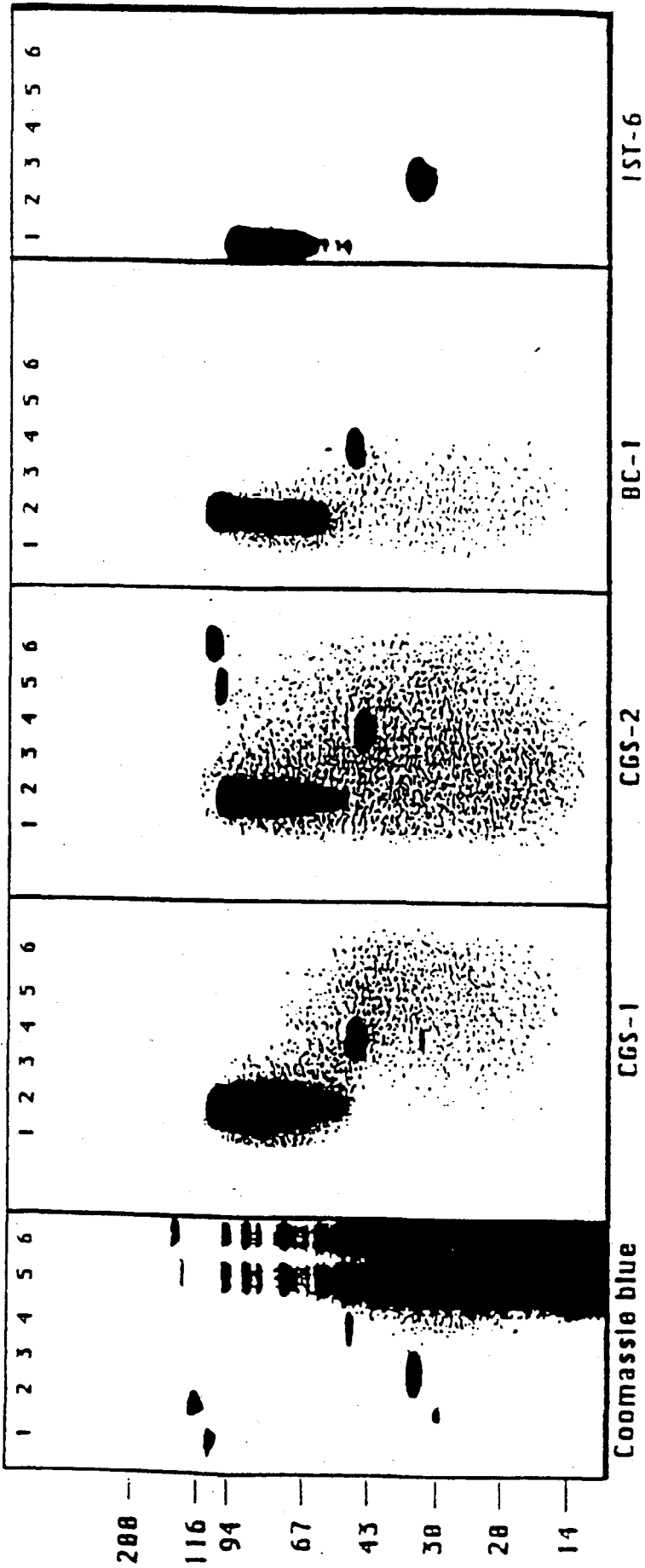




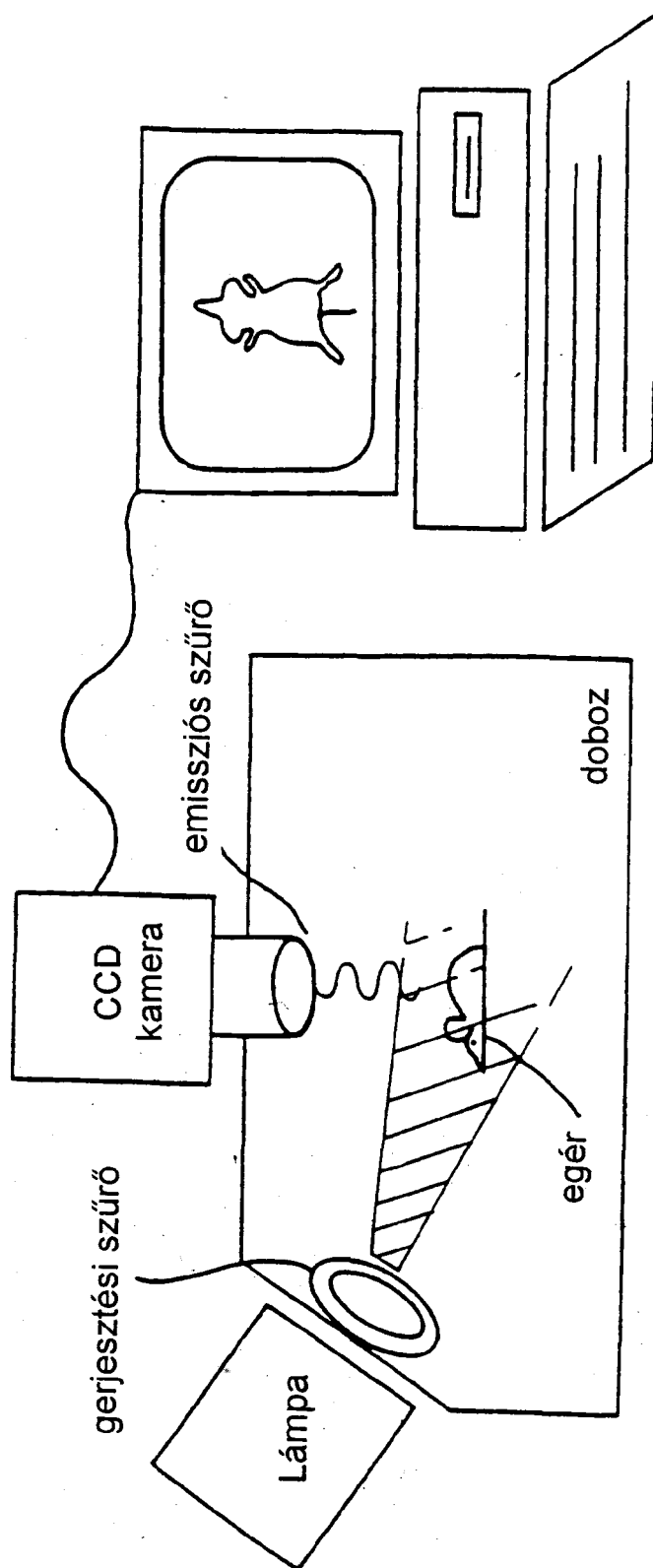
2b ábra

		CGS-1	CGS-2	BC-1	IST-6
1		-	-	-	+
2		+	+	+	-
3		-	-	-	+
4		+	+	+	-
5		-	+	-	-
6		-	+	-	-

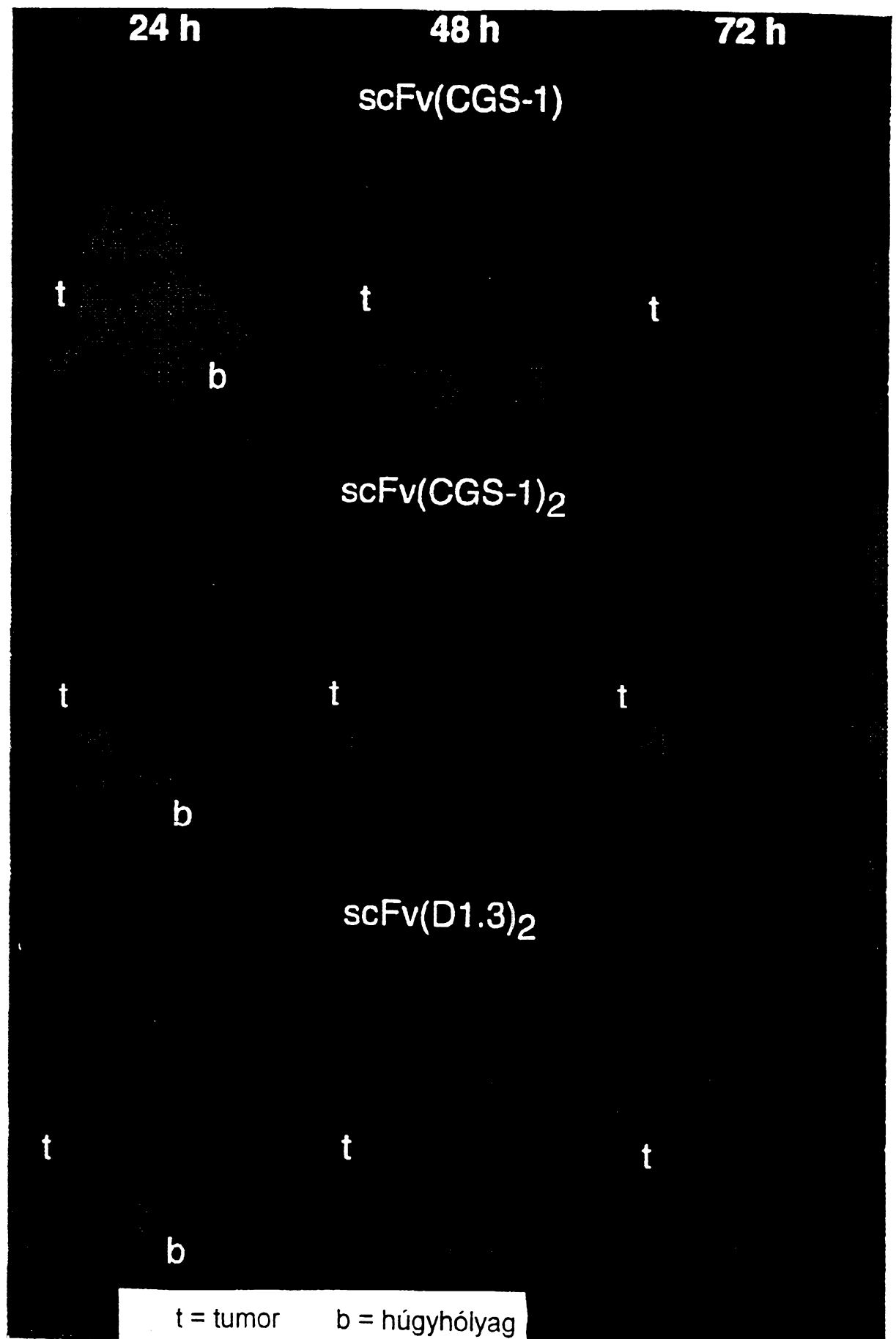
3a ábra



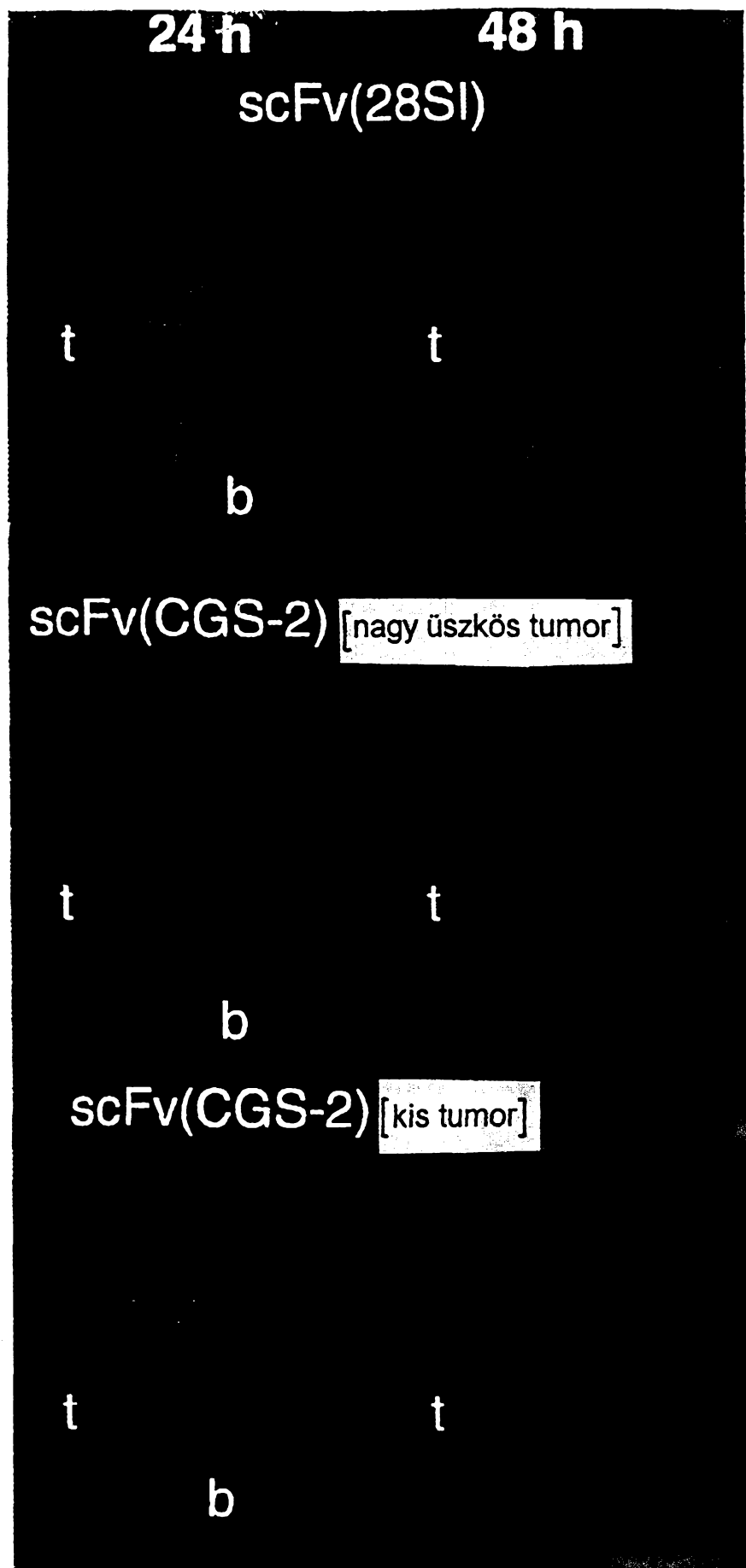
3b ábra



4. ábra



5. ábra



6. ábra