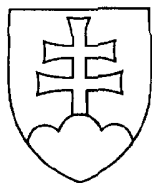


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285916

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2006):

C12N 15/13
C07K 16/18
A61K 39/395
C12N 1/21
A61K 51/02
G01N 33/577
G01N 33/68

- (21) Číslo prihlášky: **1612-98**
(22) Dátum podania prihlášky: **23. 5. 1997**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **2. 11. 2007**
Vestník ÚPV SR č.: **11/2007**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **9610967.3**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **24. 5. 1996**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **GB**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **12. 7. 1999**
Vestník ÚPV SR č.: **07/1999**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **8. 10. 2007**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/GB97/01412**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO97/45544**

(73) Majiteľ: **PHILOGEN S.r.l., Siena, IT;**

(72) Pôvodca: **Neri Dario, Zürich, CH;**
Carnemolla Barbara, Genova, IT;
Siri Annalisa, Genova, IT;
Balza Enrica, Genova, IT;
Castellani Patrizia, Genova, IT;
Pini Alessandro, Siena, IT;
Zardi Luciano, Genova, IT;
Winter Gregory Paul, Cambridge, GB;
Neri Giovanni, Siena, IT;
Borsi Laura, Genova, IT;

(74) Zástupca: **ROTT, RŮŽIČKA & GUTTMANN, v. o. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Protilátky proti ED-B doméne fibronektínu, ich konštrukcia a použitie**

(57) Anotácia:
Opisuje sa špecificky sa viažuci člen, ktorý je špecifický k ED-B onkofetálnej doméne fibronektínu (FN) a priamo sa na ňu viaže. Vynález tiež opisuje materiály a spôsoby produkcie takýchto väzbových členov.

SK 285916 B6

Oblasť techniky

Tento vynález sa vzťahuje na členy viažuce sa špecificky na zárodočnú izoformu fibronektínu označovanú ED-B, ktorú tiež exprimujú vyvíjajúce sa neovaskulárne nádory, ako sa dá preukázať cestou imunocytochémie a cieľným zavádzaním do nádorov *in vivo*. Vynález ďalej opisuje materiály a metódy, ktoré sa vzťahujú k týmto špecificky sa viažucim členom.

Doterajší stav techniky

Tento vynález sa vzťahuje na členy viažuce sa špecificky na zárodočnú izoformu fibronektínu označovanú ED-B, ktorú tiež exprimujú vyvíjajúce sa neovaskulárne nádory, ako sa dá preukázať cestou imunocytochémie a cieľným zavádzaním do nádorov *in vivo*. Vynález ďalej opisuje materiály a metódy, ktoré sa vzťahujú k týmto špecificky sa viažucim členom.

Primárnym cieľom väčšiny existujúcich foriem terapie nádorov je usmrtiť čo najviac konštitutívnych buniek nádoru, ako len je možné. Obmedzený úspech sa dosiahol metódami chemoterapie a rádioterapie, ktorý závisí od relatívneho štastia, čo sa týka špecifickosti liečby. Tieto metódy sú sprevádzané vedľajšími toxickými účinkami, ktoré postihujú normálne zdravé tkanivá. Jednou z ciest, ako možno dosiahnuť zlepšenie selektivity liečby nádorov, je zavedenie činidla priamo do nádoru pomocou väzbových proteínov, ktoré obvykle obsahujú väzbové domény protilátok a sú špecifické pre markerový antigén, ktorý sa exprimuje na povrchu nádoru, ale nenachádza sa na normálnych bunkách. Táto forma cieľovej terapie, ktorá sa nazýva „magic bullets“ sa hlavne demonštruje pomocou monoklonálnych protilátok (mAbs), ktoré pochádzajú z hlodavcov a ktoré sú špecifické pre takzvané antigény spojené s nádormi. Tieto antigény sa exprimujú na povrchu buniek. Také monoklonálne protilátky sa spájajú s cytotoxickou látkou chemickou cestou (napr. toxín alebo liek) alebo sa môžu produkovať ako rekombinantný fúzny proteín, kde gény kódujúce mAb a toxín sú spojené a exprimujú sa v tandeme.

Pristup označovaný „magic bullet“ má obmedzený, hoci podstatný, účinok pri liečbe ľudskej rakoviny, obzvlášť pri zavádzaní do nádorov lymfatického pôvodu, kde maligénne bunky sú najprístupnejšie terapeutickému dávke počas cirkulácie. Liečba pevných nádorov však zostáva vážnym klinickým problémom. Tento problém spočíva v tom, že iba malá časť celkovej bunkovej masy, prevládajú najperiférnejšie bunky nádoru, je vystavená cirkulujúcim terapeutickým imunokonjugátom; tieto periférne ciele tvoria takzvanú „bariéru väzbových miest“ vnútornej časti nádoru (Juweid et al, 1992, Cancer Res. 52, 5144 - 5153). V nádore je tkanivo všeobecne veľmi husté, tvorí ho vláknité podporné tkanivo a nádorové bunky, ktoré sú umiestnené veľmi blízko seba, čo umožňuje penetráciu molekúl v rozmedzí veľkosti zodpovedajúcej protilátkam. Nádory sú však známe tým, že majú zvýšený intersticiálny tlak, za ktorý zodpovedá nedostatok lymfatickej drenáže, čo ohrozuje prístup exogénnych molekúl. V publikácii Jain, R (1994), Sci. Am. 271 58 - 65 sa opisujú faktory, ktoré ovplyvňujú vstup terapeutických činidiel do nádorov.

Hoci existuje zjrejmé obmedzenie pri liečbe nádorov pomocou cieľného zavádzania antigénu do nádorov, tieto nádory majú bežný rys, ktorý poskytuje alternatívny antigénny cieľ pre protilátkovú terapiu. Ak nádory dorastú do určitej veľkosti, sú univerzálne závislé, aby si udržali pri-

vod kyslíka a nutrientov pre svoj rast, od nezávislého prísunu krvi. V prípade, že táto dodávka krvi je zablokovaná alebo uzavretá, existuje reálny potenciál vyhľadávať tisíce nádorových buniek. Ako sa nádor vyvíja, prechádza na angiogénny fenotyp, pričom produkuje odlišný súbor angiogénnych faktorov, ktoré pôsobia na okolité endotelálne bunky kapilár, pričom sa indukuje ich množenie a migrácia. Štruktúra týchto novo vytvorených krvných ciev, na rozdiel od usporiadanej štruktúry kapilár v normálnom tkanive, je vysoko neorganizovaná so slepými koncami a s perforáciami, ktoré vedú k úniku. Indukcia angiogenézy je sprevádzaná neregulovanou expresiou istých bunkových povrchových antigénov, kedy mnohé z nich sú bežné pri vaskularizácii normálneho tkaniva. Identifikované antigény, ktoré sa vyskytujú iba pri neovaskularizácii nádorov, sú hlavným limitujúcim faktorom pri vývoji generickej liečby pevných nádorov prostredníctvom vaskulárneho cieľného zavádzania. Antigén, ktorý je predmetom tohto vynálezu, priamo súvisí s týmto problémom.

Počas vývoja nádoru sa extracelulárna matrica okolitého tkaniva remodeluje dvoma hlavnými postupmi: (1) proteolytická degradácia komponentov extracelulárnej matrice normálneho tkaniva a (2) *de novo* syntéza komponentov extracelulárnej matrice nádorovými bunkami a bunkami podporeného tkaniva, ktorá sa aktivuje nádorom indukovanými cytokínmi. Tieto dva postupy generujú „nádorovú extracelulárnu matricu“, ktorá poskytuje vhodnejšie prostredie na vývoj nádoru a kvantitatívne a kvalitatívne sa líši od prostredia normálnych tkanív. Medzi komponentmi uvedenej matrice sú veľké izoformy tenaskínu a fibronektínu (FN); opis týchto proteínov ako izoforiem uvádza ich rozsiahlu štrukturálnu heterogenitu, ktorá sa získa na stupni transkripcie, post-transkripčného a post-translačného spracovania (uvedené ďalej v texte). Predmetom vynálezu je jedna z izoforiem fibronektínu, ktorá sa nazýva izoforma B+ (B-FN).

Fibronektíny (FN) sú multifunkčné zložky glykoproteínov s vysokou molekulovou hmotnosťou tvoriacich extracelulárne matrice a telové kvapaliny. Podieľajú sa na rade rôznych biologických postupov, ako je zaistenie a udržanie normálnej bunkovej morfológie, migrácie buniek, hemostázy a trombózy, hojenia rán a onkogénnej transformácie (opisuje sa v publikáciách Alitalo et al., Adv. Cancer Res. 37, 111 - 158 (1982); Yamada, 1983; Hynes Ann., Rev. Cell Biol. 1, 67 - 90 (1985); Owens et al., Oxf. Surv. Euca-ryot. Genes 3, 141 - 160 (1986);). Štrukturálna diverzita FN sa získa alternatívnym zostrihom troch oblastí (ED-A ED-B a IIICS) primárneho transkriptu FN (Hynes Ann., Rev. Cell Biol. 1, 67 - 90 (1985); Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987), aby vzniklo najmenej 20 rôznych izoforiem, pričom niektoré z nich sa odlišne exprimujú v nádore alebo v normálnom tkanive. Rovnako ako regulácia tkanivovo a vývojovo špecifickým spôsobom je známe, že patern zostrihu FN-pre-mRNA je v transformovaných a maligných bunkách deregulovaný (Castellani et al., J. Cell. Biol. 103, 1671 - 1677 (1986); Borsi et al., J. Cell. Biol. 104, 595 - 600 (1987); Vartio et al., J. Cell Science 88, 419 - 430 (1987), Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987); Barone et al., EMBO J. 8, 1079 - 1085 (1989); Carnemolla et al., J. Cell Biol. 108, 1139 - 1148 (1989); Oyama et al., J. Biol. Chem. 10331 - 10334 (1989); Oyama et al., Cancer Res. 50, 1075 - 1078 (1990); Borsi et al., Exp. Cell Res. 199, 98 - 105 (1992b)). Izoformy FN obsahujúce sekvencie ED-A ED-B a IIICS sa exprimujú vo väčšom rozsahu v transformovaných bunkách a v bunkách maligných nádorov. Obzvlášť izoforma FN obsahujúca sekvenciu ED-B (B+ izoforma) sa silne exprimuje v zárodočnom a nádorovom tkanive, rovnako ako počas hojenia rán,

ale expresia je obmedzená v normálnych dospelých tkanivách (Norton and Hynes, Mol. Cell. Biol. 7, 4297 - 4307 (1987); Gutman and Kornblith, Proc. Natl. Acad. Sci USA 90 7179 - 7182, 1987;); Carnemolla et al., J. Cell Biol. 108, 1139 - 1148 (1989); French-Constant et al., J. Cell Biol. 109, 903 - 914 (1989); French-Constant et al., Development 106, 375 - 388 (1989); Laitinen et al., Lab. Invest. 64, 375 - 388 (1991)). Molekuly B+ FN nie sú v dospelých cievach detegovateľné, ale pri normálnom (napr. vývoj endometria), patologickom (napr. pri diabetickej retinopatii) a nádorovom vývoji (Castellani et al., Int. J. Cancer 59, 612 - 618 (1994) angiogénnych krvných ciev je ich množstvo vysoké.

Sekvencia ED-B je celá homológna repetícia typu III, ktorá je kódovaná jediným exonom a obsahuje 91 aminokyselín. Na rozdiel od alternatívne zostrihanej izoformy IIICS, ktorá obsahuje väzbové miesto špecifické k bunkovému typu, biologická funkcia izoformami A+ a B+ je stále predmetom špekulácie (Humphries et al., J. Cell Biol. 103, 2637 - 2647 (1986)).

Samotná prítomnosť izoformy B+ tvorí nádorom indukovaný neoantigén, ale navyše expresia ED-B vyjadruje normálne kryptický antigén v repetícii 7 typu III (predchádzajúci ED-B); pretože tento epitop nie je v molekulách FN, ktorým chýba ED-B, vyjadrený, čo umožňuje, že expresia ED-B indukuje priamu a nepriamu expresiu neoantigénov. Toto kryptické antigénne miesto tvorí cieľ monoklonálnych protilátok (mAb), ktoré sa nazývajú BC-1 (Carnemolla et al., J. Biol. Chem. 24689 - 24692 (1992)). Špecifickosť a biologické vlastnosti týchto mAb sa opisujú v EP 0 344 134 B1 a je ich možné získať z hybridómu uloženého v inštitúcii „European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, Salisbury, UK s prístupovým číslom 88042101. Monoklonálne protilátky sa úspešne používajú pri lokalizácii angiogénnych krvných ciev nádorov, bez skríženeho reagovania s dospelým vaskulárnym endotelom, čo ukazuje potenciál izoformami FN pri vaskulárnom cieľovom zavádzaní s použitím protilátok.

Stále však existujú isté námietky a to ku špecifite monoklonálnych protilátok BC-1. Na základe skutočnosti, že BC-1 priamo nerozoznávajú izoformu B+, vyvstala otázka, či v niektorých tkanivách je možné odmaskovať epitop, ktorý je rozpoznávaný protilátkami BC-1, bez prítomnosti ED-B, čo vedie nepriamo k nechcenej skřízenej reaktivite BC-1. Ďalej BC-1 je prísne špecifický pre ľudskú izoformu B+, čo znamená, že štúdia biodistribúcie BC-1 pri zvieratách a ich lokalizácia v nádore nie je možná. Hoci sa produkujú polyklonálne protilátky proti rekombinantným fúznym proteínom, ktoré obsahujú izoformu B+ (Peters et al., Cell. Adhes. Commun. 3, 67 - 89 (1995)), reagujú iba s FN, na ktoré sa aplikovala N-glykanáza s cieľom odkrytia epitopu.

Ďalší všeobecný problém s použitím myších monoklonálnych protilátok je odozva na anti-myšie protilátky u ľudí (HAMA) (Schroff et al., 1985, Cancer Res. 45: 879 - 885; Dejager et al., (1988), Proc. Am. Assoc. Cancer Res 29: 377). HAMA odozva má rozmedzie účinkov od neutralizácie aplikovaných protilátok, ktoré vedú ku zníženiu terapeutickú dávku, cez alergické reakcie, sérové ochorenia a reálne poškodenie.

Hoci sa určili polyklonálne antiséra reagujúce s rekombinantnou ED-B (uvedené v texte), izolácia mAbs s rovnakou špecifickosťou ako BC-1 nasledujúca po imunizácii myši bola všeobecne zlepšená, pretože ľudské a myšie proteíny ED-B majú 100 % sekvenčnú homológiu. Ľudský proteín môže preto vystupovať ako myši samoantigén, ktorý potom nezosilňuje imunitnú odozvu. V skutočnosti po

niekoľkých rokoch usilovného bádania sa identifikovali iba jediné mAb s nepriamou reaktivitou k FN izoforme B+ (BC-1), ktoré priamo nerozoznávajú ED-B. Väčšinou je podstatné, že špecifita BC-1 sa pre kryptický epitop vyjadruje ako konzekvencia ED-B, skôr než časť samotného ED-B, ktorý nie je pravdepodobne prítomný v myších FN a preto sa nezdá byť samotným myším imunitným systémom.

Realizácia vynálezu sa dosiahla použitím stratégie, ktorá je alternatívna k tej používanej predtým a kde predchádzajúca imunizácia s fibronektínom alebo ED-B nie je nutná: získali sa protilátky so špecifickosťou pre izoformu ED-B, ako jeden reťazec Fvs (scFvs) z knižnice ľudských protilátok variabilných oblastí vyjadrených na povrchu vláknitého bakteriofága (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 - 698 (1994), ďalej tiež WO 92/01407, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172).

Zistili sme, s použitím protilátkovej fágovej knižnice, že sa môžu izolovať špecifické scFvs priamou selekciou rekombinantných fragmentov, ktoré obsahujú doménu ED-B a samotnej ED-B, kedy tieto antigény poťahujú pevný povrch („panning“). Uvedené zdroje antigénu sa s úspechom použili pri produkcii „druhej generácie“ scFvs s vylepšenými vlastnosťami príbuznými s rodičovskými klonmi v procese „afinitnej maturácie“. Zistilo sa, že izolované scFvs silne a špecificky reagujú s izoformou B+ ľudského FN bez toho, že sa vopred aplikuje N-glykanáza.

Pri anti-nádorových aplikáciách ľudskej väzbovej domény protilátkového antigénu podľa vynálezu majú tú výhodu, že nie sú subjektom odozvy HAMA. Ďalej, ako sa tu uvádza, používajú sa pri imunohistochemickej analýze nádorového tkaniva spôsobom *in vivo* a *in vitro*. Tieto a ďalšie použitia sú v odbore známe.

Terminológia

Špecificky sa viažuci člen

Termín opisuje člena páru molekúl, ktoré majú vzájomnú väzbovú špecifickosť. Členovia špecifického väzbového páru sa môžu získať prirodzenou cestou alebo sa môžu celkom alebo sčasti syntetizovať. Jeden člen páru molekúl má na svojom povrchu oblasť alebo dutinu, prostredníctvom ktorej sa viaže na určitú priestorovú a polárnu organizáciu ďalšieho člena páru molekúl. Potom členovia páru molekúl sa vzájomne špecificky viažu jeden k druhému. Príklady typov špecificky sa viažucich párov sú dvojice antigén-protilátka, biotín-avidín, receptor hormón-hormón, receptor-ligand, enzým-substrát.

Protilátky

Termín „protilátky“ opisuje imunoglobín produkovaný prirodzeným spôsobom alebo čiastočne, alebo celkom syntetický. Termín tiež zahŕňa peptid alebo proteín, ktorý má väzbovú doménu, ktorá je protilátkovou väzbovou doménou alebo je s ňou homológna. Protilátky sa dajú získať z prirodzených zdrojov alebo sa môžu čiastočne alebo celkom syntetizovať. Príklady protilátok sú imunoglobínové izotypy a ich izotypické podtypy; fragmenty, ktoré obsahujú doménu viažucu antigén, ako je Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; a diabodies.

Je možné vziať monoklonálne a iné protilátky a s použitím metód génového inžinierstva vytvoriť iné protilátky alebo chimérické molekuly, ktoré si ponechávajú špecifickosť pôvodných protilátok. Také metódy napríklad môžu zahŕňať zavedenie DNA kódujúcej variabilnú oblasť imunoglobulínu alebo oblasti určujúcej komplementaritu (CDR) protilátok proti konštantným oblastiam alebo konštantným oblastiam plus rámcovým oblastiam odlišného imunoglobulínu, čo sa opisuje napríklad v EP-A-184187,

GB 2188638A alebo EP-A-239400. Hybridóm alebo iné bunky, ktoré produkujú protilátky, sa môžu stať predmetom génových mutácií alebo iných zmien, ktoré môžu alebo nemusia pozmeniť väzbovú špecifickosť produkovaných protilátok.

Protilátky sa môžu modifikovať radom spôsobov. Termín „protilátky“ zahŕňa špecificky sa viažuce členy alebo látky, ktoré majú väzbovú doménu s požadovanou špecifickosťou. Ďalej zahŕňajú fragmenty protilátok, deriváty, funkčné ekvivalenty a homológy protilátok, ľubovoľný polypeptid obsahujúci väzbovú doménu imunoglobulínu, či už sú pripravené prirodzenou cestou alebo sčasti alebo celkom syntetizované. Ďalej zahŕňajú chimérické molekuly obsahujúce väzbovú doménu imunoglobulínu alebo ekvivalentu fúzaného s iným polypeptidom. Klonovanie a expresia chimérických protilátok sa opisujú v EP-A-0120694 a EP-A-0125023.

Zistilo sa, že fragmenty celých protilátok vykonávajú funkciu naviazania antigénov. Príklady väzbových fragmentov sú (i) Fab fragment obsahujúci VL, VH, CL a CH1 domény; (ii) Fd fragment obsahujúci domény VH a CH1; (iii) fragment Fv obsahujúci domény VL a VH jednej protilátky; (iv) fragment dAb (Ward, E. S. et al., Nature 341, 544 - 546 (1989), ktorý obsahuje doménu VH; (v) izolované oblasti CDR; (vi) fragmenty F(ab')₂, čo sú bivalentné fragmenty obsahujúce dva spojené fragmenty Fab, (vii) jednoreťazové molekuly Fv (scFv), kde doména VH a VL sú spojené peptidovým linkerom, ktorý umožňuje spojenie dvoch oblastí za vytvorenia väzbového miesta pre antigén (Bird et al., Science, 242, 423 - 426. (1988), (viii) bišpecifické jednoreťazové diméry Fv (PCT/US92/09965) a (xi) „diabodies“, čo sú multivalentné fúzie génov (WO 94/13804; Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444 - 6448, 1993).

„Diabodies“ sú multiméry polypeptidov, kde každý polypeptid obsahuje prvú doménu, ktorá zahŕňa väzbovú oblasť ľahkého reťazca imunoglobulínu, a druhú doménu, ktorá zahŕňa väzbovú oblasť ťažkého reťazca imunoglobulínu. Tieto dve domény sú spojené (napr. peptidovým linkerom), ale nie sú schopné sa spojiť vzájomne za vzniku väzbového miesta pre antigén: väzbové miesta pre antigén sa tvoria spojením prvej domény jedného polypeptidu v multimére s druhou doménou iného polypeptidu v multimére (WO 94/13804).

V prípade, že sa používajú bišpecifické protilátky, môžu to byť bežné bišpecifické protilátky, ktoré sa môžu vyrábať rôznymi spôsobmi (Holliger, P. and Winter G, Current Opinion Biotechnol. 4, 446 - 449 (1993)), napríklad chemickou cestou alebo z hybridných hybridómov, alebo to môžu byť ľubovoľné zo zmiených bišpecifických protilátkových fragmentov. Môže sa preferovať skôr použitie dimérov scFv alebo „diabodies“ než celých protilátok. „Diabodies“ a scFv sa môžu konštruovať bez oblasti Fc, s použitím iba variabilných oblastí, ktoré silne redukujú účinky anti-idiotypickej reakcie. Iné formy bišpecifických protilátok zahŕňajú jeden reťazec „Janusins“ opísaný v publikácii Traunecker et al., Embo Journal, 10, 3655 - 3659, (1991).

Bišpecifické „diabodies“ na rozdiel od bišpecifických celých protilátok sa môžu tiež výhodne používať, pretože ich konštrukcia a expresia v baktériách *E. coli* je ľahká. Ľahko sa môžu vybrať „diabodies“ (a rad iných polypeptidov, ako sú fragmenty protilátok) vhodnej väzbovej špecifickosti s použitím fágovej knižnice (WO 94/13804). V prípade, že jedno rameno „diabody“ sa udržuje konštantné, napríklad so špecifickosťou riadenou proti antigénu X, môže sa potom vytvoriť knižnica, kde ďalšie rameno je variabilné a vyberú sa protilátky s vhodnou špecifickosťou.

Väzbová doména pre antigén

Tento termín opisuje časť protilátok, ktorá obsahuje oblasť, ktorá sa špecificky viaže na časť alebo na celý antigén a je s ním komplementárna. V prípade, že antigén je veľký, protilátka sa môže viazať iba na jeho časť, ktorá sa nazýva epitop. Väzbovú doménu pre antigén môže tvoriť jedna alebo viac variabilných domén protilátok. Uprednostňuje sa, aby väzbová doména pre antigén bola variabilná oblasť (VL) ľahkého reťazca protilátok a variabilná oblasť (VH) ťažkého reťazca protilátok.

Špecifický

Termín „špecifický“ označuje situáciu, kedy jeden člen špecifického väzbového páru nemá žiadnu podstatnú väzbu s ďalšími molekulami, než je jeho špecifický väzbový partner. Termín sa dá tiež využiť v prípade, že napríklad väzbová doména pre antigén je špecifická pre určitý epitop, ktorý je nesený radom antigénov, v takom prípade špecifický väzbový člen nesúci väzbovú doménu pre antigén bude schopný viazať rôzne antigény, ktoré nesú epitop.

Funkčne ekvivalentná forma variantu

Tento termín zahŕňa molekulu (variant), ktorá má hocí štrukturálne odlišnosti v porovnaní s inou molekulou (rodičovskou), stále si uchováva podstatnú homológiu a tiež najmenej niektorú z biologických funkcií rodičovskej molekuly, napr. schopnosť viazať sa na určitý antigén alebo epitop. Varianty sa môžu vyskytovať vo forme fragmentov, derivátov alebo mutantov. Variant, derivát alebo mutant sa môže získať modifikáciou rodičovskej molekuly adíciou, deléciou, substitúciou alebo inzerciou jednej alebo viacerých aminokyselín, alebo spojením s inou molekulou. K týmto zmenám môže dôjsť na úrovni nukleotidu alebo proteínu. Kódovaným polypeptidom môže byť napríklad fragment Fab, ktorý sa potom naviaže na chvost FC z iného zdroja. V inom prípade sa môže naviazať marker, ako je napríklad enzým, fluoresceín atď.

Podstata vynálezu

Vynález opisuje špecificky sa viažuci člen, ktorý je špecifický pre onkofetálnu doménu fibronektínu (FN) ED-B.

Špecificky sa viažuce členy podľa vynálezu sa viažu na doménu ED-B priamo. V jednom uskutočnení vynálezu špecificky sa viažuce členy sa viažu po aplikácii proteázového termolýzínu na FN, na ľubovoľný alebo na všetky FN, ktoré obsahujú ED-B. V ďalšom uskutočnení vynálezu sa špecificky sa viažuce členy viažu na ľubovoľný alebo všetky FN, ktoré obsahujú homológne repetície typu III, ktoré zahŕňajú doménu ED-B. Známe FN sa opisujú vo dvoch publikáciách Carnemolla et al., J. Biol. Chem 24689 - 24692 (1992) a Carnemolla et al., J. Cell Biol. 108, 1139 - 1148 (1989). Odkaz na „všetky FN, ktoré obsahujú ED-B“, sa môže brať ako odkaz na všetky FN opísané v tejto publikácii, ktoré obsahujú ED-B.

Špecificky sa viažuci člen prednostne viaže ľudský ED-B a prednostne B+FN najmenej jedného ďalšieho druhu, ako je myš, krysa a/alebo kura. Uprednostňuje sa, aby špecificky sa viažuci člen páru bol schopný viazať tak ľudskú, ako aj neľudskú ED-B fibronektínu, ako je myšia ED-B, čo umožňuje testovanie a analýzu sbp člena vo zvieracom modeli.

Špecificky sa viažuce párové členy podľa vynálezu viažu ED-B fibronektínu, bez súťaženia s bežne dostupnými uloženými protilátkami BC-1, ktoré sa opisujú ďalej v tex-

te. BC-1 je striktné špecifická pre ľudskú B+ izoformu. Špecificky sa viažuce párové členy podľa vynálezu sa neviažu na rovnaký epitop ako BC-1.

Naviazanie špecificky sa viažuceho člena podľa vynálezu na B+FN sa môže inhibovať doménou ED-B.

S ohľadom na vynález má väzbová doména, keď sa meria ako čistý monomér, hodnotu disociačnej konštanty (K_d) 6×10^{-8} M alebo v prípade ED-B FN menšiu.

V súlade s vynálezom väzbová doména reaguje, čo znamená je schopná sa viazať, s ED-B fibronektínu bez toho, že sa ED-B fibronektín vopred upraví N-glykanázou.

Špecificky sa viažuce párové členy podľa vynálezu sa môžu pripravovať ako izoláty alebo v čistej forme. Pripravujú sa do formulácií alebo prípravkov, ktoré neobsahujú iné špecificky sa viažuce párové členy, napríklad protilátky alebo ich fragmenty alebo neobsahujú iné špecificky sa viažuce párové členy, ktoré sú schopné viazať ED-B fibronektínu. Uprednostňuje sa, aby špecificky sa viažuce párové členy podľa vynálezu sa pripravovali v podstate v čistej forme. Môžu byť monoklonálne v zmysle, že pochádzajú z jedného klonu, skôr než sa obmedziť na protilátky, ktoré sa získali použitím tradičnej technológie hybridómov. Ako sa uviedlo, špecificky sa viažuce párové členy podľa vynálezu sa môžu získať s použitím technológie vyjadrenia bakteriofága a/alebo exprese v rekombinantných, napríklad v bakteriálnych, hostiteľských bunkách. Neexistuje prioritná požiadavka na monoklonálne špecificky sa viažuce párové členy podľa vynálezu, ktoré priamo viažu ED-B fibronektínu.

Uprednostňuje sa, aby špecificky sa viažuci člen obsahoval protilátky. Špecificky sa viažuci člen môže obsahovať polypeptidovú sekvenciu vo forme fragmentu protilátok, ako je jediný reťazec Fv (scFv). Môžu sa tiež využívať iné typy fragmentov protilátok, ako sú Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Facb alebo diabody (Winter, G and C. Milstein, Nature 349, 293 - 299, 1991; WO 94/13804). Špecificky sa viažuci člen môže byť vo forme celých protilátok. Celé protilátky môžu byť ľubovoľnej z foriem protilátkových izotypov napr. IgG, IgA, IgD, IgE a IgM a v ľubovoľných formách izotypových podtried, napríklad IgG1 alebo IgG4.

Protilátky môžu byť ľubovoľného pôvodu, napríklad ľudské, myšie, ovčie. Iné odvodenia sú v odbore dobre známe. Uprednostňuje sa, aby protilátky boli ľudského pôvodu. Termín „ľudský“ znamená protilátky, ktoré sa čiastočne alebo celkom získali z ľudskej cDNA, proteínovej alebo peptidovej knižnice. Tento termín zahŕňa ľudské peptidy a proteíny, ktoré nemajú ľudský pôvod, ktoré sa modifikovali s cieľom ponechať si ľudské charakteristiky k molekule protilátok a tak umožňujú molekule obísť obranu ľudského imunitného systému.

Špecificky sa viažuci člen sa môže tiež vyskytovať vo forme manipulovaných protilátok, napríklad vo forme bišpecifickej molekuly protilátok (alebo fragment, ako je F(ab')₂), ktorá má jedno rameno viažuce antigén (t. j. špecifickú doménu) proti ED-B fibronektínu a ďalšie rameno proti odlišnej špecifickosti, alebo bivalentnú, alebo multivalentnú molekulu.

Vedľa sekvencií protilátok špecificky sa viažuci člen môže obsahovať iné aminokyseliny, napr. môžu tvoriť peptid alebo polypeptid, alebo môžu udeľovať molekule vedľa schopnosti viazať antigén ďalšiu funkčnú charakteristiku. Špecificky sa viažuci člen môže napríklad obsahovať značku, enzým alebo jeho fragment a tak ďalej.

Väzbová doména môže obsahovať časť alebo celú doménu VH kódovanú segmentom zárodočnej línie alebo znovu usporiadaného génového segmentu. Väzbová doména

na môže obsahovať časť alebo celú doménu VL kappa alebo VL lambda.

Väzbová doména môže obsahovať VH1, VH3 alebo VH4 génové sekvencie zárodočnej línie alebo ich znovu usporiadanú formu.

Špecificky sa viažuci člen podľa vynálezu môže obsahovať ťažký reťazec variabilnej oblasti („VH“ oblasti) získaný z ľudskej zárodočnej línie DP47, sekvenciu, ktorá je zobrazená na obr. č. 1(a), zvyšky 1 až 98. Nomenklatura „DP“ sa opisuje v publikácii Tomlinson I. M. et al., (1992) J. Mol. Biol. 227: 776 - 798. Aminokyselinová sekvencia CDR3 môže byť Ser Leu Pro Lys. Aminokyselinová sekvencia CDR3 môže byť Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu. Takto väzbová doména špecificky sa viažuceho člena podľa vynálezu môže zahŕňať VH doménu, ktorá obsahuje aminokyselinové sekvencie na obr. č. 1 (a) pre CGS1 a CGS2.

Väzbová doména môže obsahovať variabilnú oblasť ľahkého reťazca („VL“ doménu) získanú z ľudskej zárodočnej línie DPL16, sekvenciu, ktorá je zobrazená na obr. č. 1 (b) ako kodóny 1 až 90.

Doména VL môže obsahovať sekvenciu CDR3 Asn Ser Ser Pro Val Val Leu Asn Gly Val Val. Doména VL môže obsahovať sekvenciu CDR3 Asn Ser Ser Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val.

Špecificky sa viažuce členy podľa vynálezu môžu obsahovať funkčne ekvivalentné varianty sekvencií, ktoré sú zobrazené na obr. č. 1, napr. kde sa začlenili, deletovali, substituovali alebo pridali jedna alebo viac aminokyselín, čo poskytlo uvedené vlastnosti. Môže sa zmeniť sekvencia CDR3 alebo sa môže uskutočniť jedna alebo viac zmien v rámcových oblastiach alebo rámec môže byť nahradený inou rámcovou oblasťou alebo modifikovanou formou za vzniku špecifického väzbového člena, ktorý viaže ED-B.

Jedna alebo viac CDR z domén VL alebo VH tu opisných protilátok, ktoré viažu antigén, sa môže použiť pri tzv. „implantácii CDR“, pri ktorej je jedna alebo viac sekvencií CDR prvých protilátok umiestnená do sekvencií rámca, ktorý nesúvisí s protilátkami, napr. iných protilátok, ako sa opisuje v EP-B-0239400. CDR sekvencie pre CGS1 a CGS2 sú uvedené na obr. č. 1 (a) a 1 (b).

Špecificky sa viažuci člen podľa vynálezu môže byť ten, ktorý pri väzbe s ED-B fibronektínu konkuruje protilátkam alebo tu opísanému scFv. Konkurencia medzi špecifickými sa viažucimi členmi sa môže jednoducho testovať *in vivo*, napríklad pripojením špecifickej reportnej molekuly k jednému špecificky sa viažúcemu členovi, ktorý sa môže delegovať v prítomnosti iných nepripojených väzbových členov, čo umožňuje identifikáciu špecificky sa viažuceho člena, ktorý sa viaže na rovnaký epitop alebo presahujúci epitop.

Špecificky sa viažuci člen podľa vynálezu sa môže využiť pri metóde, ktorá spôsobuje alebo umožňuje väzbu špecificky sa viažuceho člena na jeho epitop. Naviazanie môže nasledovať po aplikácii špecificky sa viažuceho člena cicavcovi, napríklad človeku alebo hlodavcovi, ako je myš.

Vynález opisuje použitie špecificky sa viažuceho člena ako diagnostického činidla v prípade nádorov. Experimentálny dôkaz na zvieracom modeli, ako sa opisuje ďalej v texte, ukazuje, že špecificky sa viažuce členy podľa vynálezu sú užitočné pri *in vivo* lokalizácii nádoru.

Preferovanými špecifickými sa viažucimi členmi podľa vynálezu sú tie, ktoré sa viažu na ľudské nádory, napríklad v sekcii kryostatu, ktoré majú invazívny a angiogénny fenotyp a ktoré sa viažu na embryonálne tkanivá, napr. v sekcii kryostatu. Naviazanie sa môže demonštrovať imunocytochemickým farbením.

V preferovanom uskutočnení vynálezu sa špecificky sa viažuci člen neviaže alebo sa v podstate neviaže na tenaskin, čo je extracelulárny matricový proteín.

V inom preferovanom uskutočnení vynálezu sa špecificky sa viažuci člen neviaže, alebo sa v podstate neviaže, na normálnu ľudskú kožu, napríklad v sekcii kryostatu a/alebo ako sa demonštrovalo použitím imunocytochemického farbenia.

Ďalšie uskutočnenia špecificky sa viažucich členov podľa vynálezu sa neviažu alebo sa v podstate neviažu na jedno alebo viac normálnych tkanív (napr. v sekcii kryostatu a/alebo ako sa demonštruje použitím imunocytochemického farbenia) vybraných zo skupiny, ktorá zahŕňa pečenie, slezinu, obličky, žalúdok, tenké črevo, hrubé črevo, vajecniky, maternicu, močový mechúr, pankreas, supraprenálne žľazy, skeletový sval, srdce, pľúca, štítnu žľazu a mozog.

Špecificky sa viažuci člen pre ED-B sa môže použiť ako činidlo pre cieľové zavádzanie *in vivo*, ktoré sa môže použiť pri demonštrácii prítomnosti a lokalizácie nádorov, ktoré exprimujú alebo sú inak spojené s ED-B fibronektínom. Môžu sa používať ako zobrazovacie činidlo. Vynález opisuje metódu stanovenia prítomnosti bunky alebo nádoru, ktorý exprimuje alebo je inak spojený s expresiou ED-B fibronektínu, pričom spôsob zahŕňa kontakt buniek so špecificky sa viažucim členom a stanovenie naviazania špecificky sa viažuceho člena na bunky. Spôsob sa môže uskutočniť *in vivo* alebo *in vitro* na testovacej vzorke buniek, ktoré sa izolovali z tela.

Reaktivita protilátok v bunkovej vzorke sa môže stanoviť vhodným spôsobom. Jedna z možností je označenie s jednotlivými reportnými molekulami. Reportné molekuly môžu priamo a nepriamo generovať detegovateľné a prednostne merateľné signály. Spojenie reportných molekúl môže byť priame alebo nepriame, kovalentné, napríklad prostredníctvom peptidovej väzby alebo nekovalentné. Spojenie prostredníctvom peptidovej väzby môže byť ako výsledok rekombinantnej exprese génovej fúzie, ktorá kóduje protilátka a reportnú molekulu.

Jedným z favoritných módov je kovalentné spojenie každej protilátky s individuálnym fluorochrómom, fosforom alebo laserovým farbivom so spektrálne izolovanými absorpčnými alebo emisnými charakteristikami. Medzi vhodné fluorochrómy patrí fluoresceín, rodamín, fykoerytrín a texasová červená. Vhodné chromogénne farbivá zahŕňajú diaminobenzidín.

Iné reportné molekuly zahŕňajú makromolekulové kolidné partikuly alebo časticový materiál, taký ako sú latexové guľôčky, ktoré sú sfarbené, magnetické alebo paramagnetické a biologicky alebo chemicky aktívne činidlá, ktoré môžu priamo alebo nepriamo spôsobovať detegovateľné signály, aby mohli byť pozorované vizuálne, elektronicky detegovateľné alebo inak zaznamenávané. Týmito molekulami môžu byť napríklad enzýmy, ktoré katalyzujú reakcie, ktoré vyvíjajú alebo menia farbu a spôsobujú zmeny elektrických vlastností. Molekuly môžu byť molekulárne excitabilné tak, že elektronické prechody medzi energetickými stavmi vedú k charakteristickej spektrálnej absorpcii alebo emisii. Môžu zahŕňať chemické entity používané v spojení s biosenzormi. Sú to spojenie biotín/avidín alebo biotín/streptavidín a detekčné systémy založené na alkalickéj fosfatáze.

Spôsob stanovujúci väzbu nie je rysom vynálezu a odborník je schopný vybrať vhodný spôsob na základe svojich preferencií a všeobecných znalostí.

Signály generované jednotlivými konjugátmi protilátka-reportná molekula sa môžu použiť na získanie kvantifikovateľných absolútnych alebo relatívnych dát relevantné-

ho naviazania protilátok v bunkových vzorkách (normálnych a testovaných). Navyše pri použití všobecného farbenia jadra je možné stanoviť vo vzorke celkovú bunkovú populáciu, čo umožňuje stanoviť kvantitatívne pomery jednotlivých bunkových populácií vzťahujúcich sa k celkovému počtu buniek. V prípade, že sa rádioaktívne značené nukleotidy ^{125}I , ^{111}In alebo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pripoja k protilátkam, potom sa tieto protilátky prednostne lokalizujú v nádore skôr než v normálnych tkanivách. Prítomnosť rádioaktívnych značiek v nádorovom tkanive sa môže detegovať a kvantifikovať s použitím gamma snímača. Kvalita získaného zobrazenia nádoru priamo koreluje s pomerom signál: zvukový signál.

Protilátky sa môžu používať ako diagnostické činidlá na sledovanie novo vaskularizovaných nádorov a môžu sa tiež používať, napr. v modifikovanej forme, na zavedenie cytotoxických činidiel alebo pri koagulácii v nových krvných cievach, pričom vyvíjajúce sa nádory trpia nedostatkom kyslíka a nutričov a tvoria tak nepriamu formu terapie nádoru.

Vynález ďalej opisuje použitie vyššie špecifikovaného špecificky sa viažuceho člena, ktorý sa používa ako terapeutické činidlo pri spojovaní, viazaní alebo manipulácii ako fúzny proteín, aby získal funkciu efektora. Špecificky sa viažuci člen podľa vynálezu sa môže použiť na cielené zavedenie toxínu, rádioaktívnych látok, T-buniek, smrtiacich buniek alebo iných molekúl do nádoru, ktorý exprimuje alebo je spojený s antigénom v strede záujmu.

Vynález ďalej opisuje spôsoby liečby, ktoré zahŕňajú aplikáciu špecificky sa viažuceho člena, farmaceutických kompozícií obsahujúcich taký špecificky sa viažuci člen a použitie uvedeného špecificky sa viažuceho člena pri výrobe medikamentu vhodného na aplikáciu, napríklad pri metóde prípravy medikamentu alebo farmaceutickej kompozície, ktorá obsahuje špecificky sa viažuci člen s farmaceuticky prijateľným excipientom.

V súlade s vynálezom sa môžu uvedené kompozície aplikovať jednotlivcom. Prednostne sa aplikuje „terapeutický účinný množstvo“, ktoré je pre pacienta prínosom. Taký prínos môže byť prinajmenšom zlepšenie najmenej jedného symptómu. Aktuálne aplikované množstvo, rýchlosť a časový priebeh aplikácie závisí od povahy a stavu ochorenia, ktoré sa lieči. Zodpovednosť za predpis liečby, napríklad rozhodnutie o dávke atď., nesú praktickí lekári a iní terapeuti. Vhodná dávka protilátok je v odbore dobre známa, uvádza sa v publikácii Ledermann J. A. et al., (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659 - 664; Bagshawe K. D. et al., (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915 - 922.

Kompozícia sa môže aplikovať samotná alebo v kombinácii s inou liečbou, buď súčasne, alebo sekvenčne, čo závisí od liečeného stavu.

Farmaceutické kompozície podľa vynálezu a na ich použitie v súlade s vynálezom môžu obsahovať navyše aktívnu ingredienciu, farmaceuticky prijateľný excipient, nosič, pufer, stabilizátor alebo iné materiály, ktoré sú dobre známe v odbore. Také materiály by nemali byť toxické a nemali by interferovať s účinnosťou aktívnej ingrediencie. Presná povaha nosiča alebo iného materiálu závisí od spôsobu aplikácie, ktorá môže byť orálna alebo injekciou, napr. intravenózne.

Farmaceutické kompozície na orálnu aplikáciu môžu byť v tabletovej, kapsulovej, práškovej a kvapalnej forme. Tableta môže obsahovať pevný nosič, ako je želatína alebo adjuvans. Kvapalné farmaceutické kompozície všeobecne obsahujú kvapalnú nosič, ako je voda, nafta, živočišne alebo rastlinné oleje, minerálny olej alebo syntetický olej.

Môže sa používať fyziologický roztok, dextróza alebo iný sacharidový roztok, alebo glykoly, ako je etylénglykol, propylénglykol alebo polyetylénglykol.

Pri intravenózne injekcii alebo injekcii do miesta postihnutia bude aktívna ingrediencia vo forme parenterálne prijateľného vodného roztoku, ktorý neobsahuje žiadne pyrogény a má vhodné pH, je vhodne izotonický a stabilný. Odborníci sú schopní ľahko pripraviť vhodné roztoky s použitím napríklad izotonických vehikulov, ako je napríklad injekcia chloridu sodného, Ringerova injekcia, laktátová Ringerova injekcia. Roztoky môžu zahŕňať konzervačné činidlá, stabilizátory, pufre, antioxidanty a/alebo iné aditíva, ak je to nutné.

Špecificky sa viažuci člen podľa vynálezu sa môže pripraviť expresiou z nukleovej kyseliny, ktorá ho kóduje. Nukleová kyselina kódujúca špecificky sa viažuci člen umožňuje spôsob produkcie uvedeného špecificky sa viažuceho člena, ktorý zahŕňa expresiu tejto kódujúcej nukleovej kyseliny. Expresiu možno bežne dosiahnuť kultiváciou rekombinantných hostiteľských buniek, ktoré obsahujú uvedenú nukleovú kyselinu, za vhodných podmienok.

Nukleová kyselina môže kódovať ľubovoľne tu uvedenú aminokyselinovú sekvenciu domén protilátok viažuce antigén alebo ľubovoľnú funkčne ekvivalentnú formu. Zmeny sa môžu uskutočniť na úrovni nukleotidov adíciou, substitúciou, deléciou alebo inzerciou jedného alebo viac nukleotidov. Tieto zmeny sa môžu alebo nemusia odraziť na úrovni aminokyseliny v závislosti od degenerácie genetického kódu.

Systémy klonovania a exprese polypeptidu pri rôznych hostiteľských bunkách sú dobre známe. Vhodné hostiteľské bunky zahŕňajú baktérie, cicavčie bunky, kvasinky a bakulovírusy. Cicavčie bunkové línie, ktoré sú dostupné pre expresiu heterogénneho polypeptidu zahŕňajú bunky vaječníkov čínskych morčiat, bunky HeLa, obličkové bunky novorodených morčiat a mnoho ďalších. Bežným preferovaným bakteriálnym hostiteľom je *E. coli*.

Expresia protilátok a fragmentov protilátok v prokaryontných bunkách, ako sú baktérie *E. coli*, je v odbore dobre zavedená. Prehľad informácií je uvedený v publikácii Pluckhuth, A Bio/Technology 9: 545 - 551 (1991). Pri produkcii špecificky sa viažuceho člena je možné tiež využiť jeho expresiu v kultivovaných eukaryontných bunkách (Reff M. E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4: 573 - 576; Trill J. J. et al., (1995) Curr. Opinion Biotech. 6: 553 - 560).

Vhodné vektory sa môžu vybrať alebo konštruovať. Mali by obsahovať vhodné regulačné sekvencie, medzi ktoré patria promótorové sekvencie, polyadenylačné sekvencie, zosilňovacie sekvencie, markerové gény a iné sekvencie, ak je treba. Ďalšie detaily sú uvedené napr. v publikácii Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Rad známych metód a protokolov vhodných pri manipulácii nukleovej kyseliny, napríklad pri príprave konštrukcií nukleových kyselín, mutagenéze, sekvenovaní, zavedení DNA do buniek a expresii génu a analýze proteínov, sa detailne opisuje v publikácii Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, 1992.

Ďalej vynález opisuje hostiteľskú bunku, ktorá obsahuje tu opísanú nukleovú kyselinu. Ďalej vynález opisuje spôsob zahrňujúci zavedenie uvedenej nukleovej kyseliny do hostiteľskej bunky. Pri zavedení nukleovej kyseliny do hostiteľskej bunky sa môže použiť ľubovoľný dostupný spôsob. V prípade eukaryontných buniek vhodný spôsob môže zahŕňať transfekciu s fosforečnanom vápenatým, DEAE-dextran, elektroporáciu, transfekciu sprostredkovanú lipo-

zómami a transdukciu s použitím retrovirusov alebo iných vírusov, napr. vakcín alebo v prípade hmyzích buniek, bakulovírusov. V prípade bakteriálnych buniek vhodné metódy môžu zahŕňať transformáciu chloridom sodným, elektroporáciu a transfekciu s použitím bakteriofaga.

Po zavedení nukleovej kyseliny môže nasledovať expresia nukleovej kyseliny, napríklad v kultivovaných hostiteľských bunkách v podmienkach vhodných pre expresiu génu.

V jednom uskutočnení vynálezu je nukleová kyselina začlenená do genómu (napr. chromozóm) hostiteľskej bunky. Integrácia sa môže podporiť v súlade so štandardnými metódami inkluziou sekvencií, ktoré podporujú rekombináciu s genómom.

Nasledujúca produkcia špecificky sa viažuceho člena sa môže napríklad používať ľubovoľným tu opísaným spôsobom, ako je napríklad pri formulácii farmaceutického alebo diagnostického produktu, ako je kit, ktorý obsahuje okrem špecificky sa viažuceho člena jedno alebo viac činidiel, ktoré slúžia pri stanovení naviazania špecificky sa viažuceho člena na bunky, ako sa diskutuje v texte.

Ďalšie predmety vynálezu a ich uskutočnenia sú pre odborníka zrejmé. Nasledujúce príklady sú uvedené na ilustráciu a v žiadnom prípade neobmedzujú rozsah vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Na obrázku č. 1 sú uvedené aminokyselinové sekvencie VH a VL scFvs CGS-1 a CGS-2. Obrázok č. 1 (a) ukazuje sekvencie VH; obrázok č. 1 (b) ukazuje sekvencie VL. CDR (1, 2 a 3) sú označené. Ľudská zárodočná línia VH, ktorý má najväčšiu homológiu k obom scFvs, je segment DP47 rodiny VH3; segment VL oboch klonov je DPL16, ľahký reťazec sa používa na vybudovanie pôvodnej knižnice scFv (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 - 698 (1994)). Zvyšky, ktoré odlišujú jeden klon od druhého, sú podčiarknuté.

Obrázok č. 2. Na obrázku č. 2A je zobrazený model doménovej štruktúry ľudskej FN podjednotky. Označené sú variabilné oblasti III₁CS, EDA a ED-B, ktoré sú spôsobené alternatívnym zostrihom pre-mRNA FN. Obrázok tiež ukazuje vnútornú homológiu, rovnako ako hlavné produkty štiepenia termolýzom obsahujúce ED-B (Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987)). Obrázok 2B ukazuje 4 až 18 % SDS-PAGE plazmy a WI38VA FN a produkty ich štiepenia termolýzom zafarbené Coomassieovou modrou a imunoblotty, ktoré sa testovali sondou BC-1, IST-6, CGS-1 a CGS-2. V dráhe (1) sú neštiepené a v dráhe (3) sú štiepené FN plazmy s použitím termolýzinu, pričom koncentrácia FN je 1 µg/ml a 10 µg/ml (dráha (4)). V dráhe (2) sú neštiepené a v dráhe (5) sú štiepené WI38VA FN plazmy s použitím termolýzinu, pričom koncentrácia FN je 1 µg/ml a 5 µg/ml (dráha (6)) a 10 µg/ml (dráha (7)). Číslo na pravej strane indikujú hlavné produkty štiepenia termolýzom, ktoré sú zobrazené na obr. č. 2A. Hodnoty na ľavej strane indikujú štandardy molekulovej hmotnosti v kilodaltonoch (kD).

Obrázok č. 3. Na obrázku č. 3A sú zobrazené repetičné sekvencie FN typu III, ktoré sú obsiahnuté vo fúzii a rekombinantné proteíny exprimované v baktériách *E. coli* a reaktivita týchto proteínov s CGS-1 a CGS-2 a s mAbs BC-1 a IST-6. Obrázok č. 3B zobrazuje gél zafarbený Coomassieovou modrou a imunoblotty, ktoré sa testovali sondou CGS-1, CGS-2, BC-1, IST-6. Číslovanie dráh zodpovedá číslovaní peptidových konštrukcií vo vrchnej časti obráz-

ka. Hodnoty naľavo označujú molekulovú váhu štandardov v kD.

Na obrázku č. 4 je uvedený infračervený zobrazovač myši; zobrazovač myši sa používa pri experimentoch cieľného zavádzania a tvorí ho čierna, nefluorescenčná skrinka, ktorá je vybavená volfrámovou halogénovou lampou, excitačnými a emisnými filtermi, ktoré sú špecifické pre CY7 fluorofor a počítačom riadenou osem bitovou monochromatickou CCD-kamerou.

Obrázok č. 5 zobrazuje cieľné zavádzanie fluorescenčne značených protilátkových fragmentov proti F9 myšiemu teratokarcinómu s použitím monomérnych scFv(CGS-1) a dimérnych scFv(CGS-1)2 riadených k B-FN. Ako negatívna kontrola slúžili dimérne scFv(D 1.3)2 s väzbovou špecifickosťou k lysozýmu.

Obrázok č. 6 zobrazuje cieľné zavádzanie fluorescenčne značených protilátkových fragmentov proti F9 myšiemu teratokarcinómu s použitím afinitných maturovaných scFv(CGS-2) a menej afinitných scFv(28SI) riadených do rovnakého epitopu B-FN. Cieľné zavádzanie sa deleguje tak pri veľkých (približne 0,6 g) ako aj pri malých nádoroch (približne 0,2 g), ktoré sa po 48 hodinách pokryjú čiernou krustou, ktorá čiastočne zastreje obraz.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1: Izolácia ľudských scFvs špecifických pre oblasť ED-B ľudského FN.

Fágová knižnica ľudských scFv ((Nissim et al., EMBO J. 13, 692 - 698 (1994) sa používa pri selekcii rekombinantných protilátok. Ako zdroj antigénu pri selekcii sa použili dve rôzne formy izoformy ED-B. V oboch prípadoch izoformou bol rekombinantný ľudský proteín.

Rekombinantné peptidy FN, ktoré obsahujú repetície typu III 2-11 (B-) a 2-11 (B+), sa exprimovali v baktériách *Escherichia coli*.

Konštrukcia sa pripravila s použitím cDNA FN z klonov pFH154 (Kombliht et al., EM-BO J. 4, 1755 (1985)), λ F10 a λ F2 (Camemolla et al., J. Cell Biol. 108, 1139 - 1148 (1989)). Konštrukcia cDNA v rozsahu 2229 - 4787 báz (Kombliht, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 7179 - 7182, 1987) sa začlenila do vektoru pQE-3/5 s použitím kitu QIAexpress od Qiagen (Chatsworth, CA). Rekombinanty FN-III 2-11 (B-) a (B+) sa čistili imunoafinitnou chromatografiou s použitím mAb 3E3 (Pierschbacher et al., Cell 26, 259 - 267 (1981)), ktoré sú spojené so sefárovou 4B (Pharmacia). Fragmenty DNA na prípravu rekombinantných fragmentov FN, ktoré obsahujú typ III homológnej repetície 7B89, 789, ED-B a FN-6, sa pripravili polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) s použitím UltMa DNA polymerázy (Perkin Elmer), cDNA z klonov FN 2-11 (B+) a FN 2-11 (B-) ako templátu. Priméry sa navrhli tak, aby umožnili klonovanie PCR produktov do pQE-12 s použitím kitu QIAexpress od Qiagen (Chatsworth, CA). Potom nasleduje transformácia buniek baktérie *E. coli* a expresia. Všetky klony cDNA sa sekvenovali s použitím Sequenase 2.0 DNA sekvenačného kitu (USB).

Rekombinantné proteíny sa čistili Ni-NTA chromatografiou (IMAC), podľa inštrukcií výrobcu (Qiagen), s použitím hexahistidínového tag na C-konci fragmentov FN. Fúzny proteín ED-B-pGal sa pripravil klonovaním ED-B cDNA do bakteriofágového vektora λ gt11 za vzniku klonu λ ED-B. Klon λ chFN60 (obsahujúci časť sekvencie ED-B) sa získal ako fúzny proteín z klonovaného kuracieho FN pchFN60 (Norton and Hynes, Mol. Cell. Biol. 7, 4297 - 4307 (1987)).

Pri selekcii fágovej knižnice ľudského scFv sa testoval každý z dvoch rôznych rekombinantných antigénov (7B89 a ED-B) v troch kolách. Imunoskúmovky (Nunc; Maxisorp, Roskilde, Denmark) sa pokryli antigénmi cez noc v koncentrácii 50 μ g/ml v PBS (20 mM fosforečnanový pufer, 0,15 M NaCl, pH 7,2). Prvým antigénom je rekombinantný fragment 7B89, v ktorom oblasť ED-B je lemovaná príľahlou homológnou repetíciou typu III FN; tento antigén sa nanášal pri teplote 4 °C cez noc. Druhý používaný antigén je rekombinantný ED-B (Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987)), ktorý má na C-konci hexahistidín tag; tento proteín neobsahuje zvyšky lyzínu, čo znamená, že terminálna aminoskupina prvej aminokyseliny je dostupná pre miestne špecifickú kovalentnú imobilizáciu ED-B na reaktívne doštičky pre test ELISA (Nunc; Covalink). Poťahovanie sa uskutočnilo cez noc pri teplote miestnosti.

Po troch kolách testovania sa bunky baktérie *E. coli* infikovali eluovaným fágom HB2151 a naniesli sa na platne, ako sa opisuje v publikácii (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 - 698 (1994)). Po každom kole selekcie sa testovalo 95 na ampicilín rezistentných jednotlivých kolónií, aby sa testom ELISA identifikovali antigén špecifické scFvs. Na ďalšiu analýzu a afinitnú maturáciu sa vybrali klony, ktoré majú najsilnejší signál testu ELISA na imobilizované antigény. Tieto klony tiež demonštrujú pri imunocytochemickom farbení špecifické sfarbenie sekcií multiforiem glioblastómu a nádorov prsníka, ako sa opisuje detailnejšie v príklade 4.

Príklad 2: Afinitná maturácia ľudských scFvs špecifických pre oblasť ED-B ľudského FN.

Klony 35GE (vybratý s použitím 7B89) a 28SI (vybratý pomocou samotnej domény ED-B) sa vybrali ako kandidáti protilátok na afinitnú maturáciu. S cieľom obmeniť ľahké reťazce s cieľom vylepšenia afinity sa potom skúmali jednotlivé maturačné stratégie založené na náhodnosti šiestich centrálnych zvyškov (DSSGNH) ľahkého reťazca CDR3 s použitím degenerovaných oligonukleotidov a PCR (obr. č. 1), čo umožňuje potenciálnu sekvenčnú diverzitu $20^6 = 6,4 \times 10^7$. Táto oblasť (podiel ťažkého reťazca CDR3) je lokalizovaná v centre väzbového miesta antigénu (Padlan, 1994). Ďalej sa mutoval zvyšok arginínu, ktorý priamo predchádza radu šiestich zvyškov k serínu s cieľom zabrániť možnosti elektrostatických účinkov dominujúcej selekcie.

Plazmid získaný z jednej bakteriálnej kolónie, ktorý exprimuje „rodičovský“ scFv fragment, sa amplifikoval PCR s primérmí LMB3 (5'CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') a CDR3-6-VLFOR (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') (94C (1') - 55C (1') - 72C (1'30''), 25 cyklov; v publikácii Marks et al., (1991), J. Mol. Biol., 222, 581 - 597 sa opisujú použité pufre a podmienky PCR). Výsledný produkt sa čistil na géli (s cieľom odstrániť stopy plazmidu, ktorý obsahuje pôvodný gén scFv) a použil sa ako templát pri druhej amplifikácii s primérmí LMB3 a JI-Not-FOR (5'ATT GCT TTT CCT TTT TGC GGC CGC GCC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC TCC GCC 3') (94C (1') - 55C (1') - 72C (1'30''), 25 cyklov. Surový produkt PCR, ktorý sa na agarózovom géli javí ako jediný pruh so správnou molekulovou váhou, sa priamo čistil zo zmesi PCR s použitím Spin-Bind (FMC, Rockland, ME, USA), sa dvakrát štiepil s reštrikčnými enzýmami NcoI/NotI a ligoval sa do na géli čisteného fagemidu pHEN1 (Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res. 19, 4133 - 4137 (1991) štiepeného reštrikčnými enzýmami NcoI/NotI, ktorý obsahuje inzert NcoI/NotI, čo

umožňuje separáciu vektora, ktorý je štiepený dvakrát, od vektora, ktorý je štiepený iba raz. Vektor sa pripravil s plazmid maxi-prep kit Qiagen (Chatsworth, CA, U. S. A.). Pri ligácii sa zmiešalo približne 5 µg štiepeného plazmidu a inzertu. Ligačná zmes sa extrahovala jeden raz s fenolom, jeden raz so zmesou fenol/chloroform/izooamylalkohol (25 : 25 : 1), potom sa precipitovala etanolom s použitím glykogénu (Boehringer, Mannheim, Germany) ako nosiča a sušila sa na speed-vaku.

Peleta sa resuspendovala v 20 µl vody a elektroporáciou sa vnesla do elektrokompetentných buniek *E. coli* TG1 (Gibson T. J. (1984), PhD thesis. (University of Cambridge, Cambridge, UK). V typickom prípade sa používajú elektrokompetentné bunky s titrom 10⁹ transformantov na µg v prípade, že sa používa glycerol, alebo 10¹⁰ transformantov na µg čerstvo pripravených elektrokompetentných buniek. Elektroporácia vedie v typickom prípade k vytvoreniu viac ako 10⁷ klonov.

Maturačná knižnica sa potom spracovala rovnakým spôsobom ako knižnica podľa Nissima (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 - 698 (1994)) za vzniku fágových partikul, ktoré sa používajú pri selekcii v jednom cykle pomocou imunoblotov, kde sa používa ako antigén 7B89 (v koncentrácii 10 µg/ml), potom nasleduje kinetická selekcia (Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889 - 896 (1992)). Táto selekcia prebehla inkubáciou biotinylovaných 7B89 (v koncentrácii 10 nM) s fágovou suspenziou (približne 10¹² t. u.) z prvého kola výberu v 2 % roztoku mlieka a PBS (2 % MPBS) počas 5 minút, potom sa pridali 7B89 (v koncentrácii 1 µM), ktoré nie sú značené biotínom, a počas 30 minút prebiehala kompetícia. Do reakčnej zmesi sa pridalo 100 µl častíc dyna (Dyna: M480) potiahnutých streptavidínom, ktoré boli vopred zablokované v 2 % MPBS, všetko sa 2 minúty miešalo a potom sa častice zachytili na magnete a desaťkrát sa premyli roztokom PBS + 0,1 % Tween-20 alebo PBS. Fág sa z častíc eluoval 0,5 ml trietylaminu v koncentrácii 100 mM. Tento roztok sa potom neutralizoval 1 M Tris, pH 7,4 s objemom 0,25 ml a použilo sa na infekciu exponenciálne rastúcich buniek HB2151 (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 - 698 (1994)). 95 jednotlivých kolónií rezistentných na ampicilín sa použilo pri produkcii supernatantov, ktoré obsahujú scFv (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 - 698 (1994)) a ktoré sa testovali testom ELISA BIAcore a imunochemicky s cieľom identifikácie klonu s najsilnejšou schopnosťou sa viazať. Tie sa potom subklonovali medzi reštrikčné miesta SfiI/NotI expresívneho vektora pDN268 (Neri et al., (1996a), Bio/Techniques, 20, 708 - 713; Neri et al., (1996b), Nature Biotechnology, 14, 385 - 390), ktorý pripojil k C-koncu scFv fosforylovateľný tag, epitop FLAG a hexahistidínový tag.

Jednotlivé kolónie relevantných protilátok subklonovaných do pDN268 sa kultivovali pri teplote 37 °C v 2x TY obsahujúcom 100 mg/l ampicilínu a 0,1 % glukózy. Keď bunková kultúra dosiahla hodnotu OD⁶⁰⁰ = 0,8, pridalo sa IPTG tak, aby konečná koncentrácia bola 1 mM a kultivácia pokračovala 16 až 20 hodín pri teplote 30 °C. Po centrifugácii (GS-3 Sorvall rotor, pri 7000 ot/min. a počas 30 min.) sa supernatant filtroval, zakonzentroval a s použitím prístroja Minisette (Filteron) s tangencionálnym tokom prešiel do pufra (50 mM fosforečnan, pH7, 4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol). Čistené protilátky sa analyzovali SDS-PAGE (Laemmli, 1970) a dialyzovali sa proti PBS pri

teplote 4 °C. Čistené scFv sa ďalej spracovávali gélovou filtráciou s použitím prístroja FPLC vybaveného kolónou S-75 (Pharmacia), keďže je známe, že multivalentné fragmenty scFv môžu mať dobré naviazanie na BIAcore (Jonsson et al., BioTechniques 11, 620 - 627 (1991)) účinkom avidity (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 - 698 (1994); Crotthers and Metzger et al., Immunochemistry 9, 341 - 357 (1972)). Koncentrácia protilátok monomerických frakcií čistených na FPLC sa stanovila spektrofotometricky za predpokladu, že absorbancia pri vlnovej dĺžke 280 nm je pre roztok scFv v koncentrácii 1 µg/ml 1,4 jednotiek.

Na prístroji BIAcore (Pharmacia Biosensor) sa meralo naviazanie monovalentnej scFv pri koncentračnom rozmedzí 0,1 až 1 µM v PBS. Pri uvedenom meraní sa použili tieto čidlá: (i) 1 000 jednotiek rezonancie (RU) biotinylovaného rekombinantného FN fragmentu 7B89, ktorý je imobilizovaný na čipe potiahnutom streptavidínom, ktorý sa špecificky viazal 250 RU scFv; (ii) 200 RU rekombinantného ED-B, chemicky imobilizovanom na N-terminálnej aminokysline, ktorá sa špecificky viaže 600 RU scFv; (iii) 3500 RU fibronektínu WI38VA bohatého na ED-B (uvedené v príklade 3), ktorý sa špecificky viazal 150 RU scFv. Kinetická analýza dát sa uskutočnila podľa inštrukcií výrobcu. Na základe kvalitatívnej BIAcore analýzy supernatantov obsahujúcich protilátky sa vybrala jedna afinitne maturovaná verzia každého scFv klonu: klon CGS-1 z výberu pomocou fragmentu 7B89 a CGS-2 z výberu s ED-B rekombinantným FN fragmentom. V tabuľke č. 1 sú uvedené asociačné rýchlostné konštanty (k_{on}) a disociačné rýchlostné konštanty (k_{off}) spolu s vypočítanými rovnovážnymi disociačnými konštantami (K_d) scFv a pôvodného klonu 28SI. Hoci oba klony CGS-1 a CGS-2 majú K_d v nanomolárnom rozmedzí, klon CGS-2 má najväčšie zlepšenie v porovnaní s rodičovským klonom. Jeho K_d vzhľadom na všetky tri testované proteíny na senzorovom čipe (tabuľka č. 1) je 1 nM (pôvodná hodnota bola 110 nM). Vylepšenie sa uskutočnilo hlavne pomalšou kinetickou disociačnou konštantou (približne 10⁴ s⁻¹), čo sa meralo monomerickými protilátkovými prípravkami (dáta nie sú uvedené).

Stratégia maturácie sa javí byť všeobecne a poskytuje protilátky so zlepšenou afinitou proti proteínu, ktorý sa viaže na maltózu, cytochrómu C, extracelulárnej domény myšieho endoglinu (D. N., L. Wyder, R. Klemenz), cytomegalovírusu (A. P., G. Neri, R. Botti, P. N.), jadrovému nádorovému markerovému HMGI-C proteínu (A. P., P. Saldani, V. Giancotta, P. N.) a placentovej alkalickej fosfatáze, čo je marker nádoru vaječníkov (M. Deonarain and A. A. Epenetos). Stratégia sa preto zdá byť najmenej rovnako účinná ako iné maturačné stratégie (Marks et al., (1992), Bio/Technology, 10, 779 - 783; Low et al., 1996) a výsledkom sú protilátky s rovnakými afinitami ako tie získané z veľmi veľkých fágových protilátkových knižníc (Griffiths et al., (1994), EMBO J. 13, 3245 - 3260; Vaughan et al., (1996), Nature Biotechnol., 14, 309 - 314).

Afinitné maturované klony CGS-1 a CGS-2 sa sekvenovali a zanesli sa do databázy génov ľudských zárodočných protilátok V (V-BASE), potom sa prekládali s použitím softvéru MacVector. Gén VH oboch klonov bol najviac homológny s ľudskou zárodočnou líniou DP47 (VH3) a navyše každý klon mal rôzne sekvencie VH CDR3 (obr. č. 1). Gén VL oboch klonov zárodočnej línie DPL16 sa použil pri konštrukcii repertoáru ľudského syntetického scFv, ako opisuje (Nissim et al., EMBO J. 13, 692 - 698 (1994)). Sekvencie VL CDR3 sa líšia jedna od druhej štyrmi zo šiestich náhodných zvyškov (obr. č. 1b).

Tabuľka č. 1

Kinetické a disociačné konštanty monomérnych scFv fragmentov CGS-1 a CGS-2 k proteínom obsahujúcim doménu ED-B

Antigén	ED-B			7B89			FN W138VA		
	CGS-1	SI28	CGS-2	CGS-1	SI28	CGS-2	CGS-1	SI28	CGS-2
$k_{\text{off}}(\text{s}^{-1})^*$	$7,0 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-2}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$7,1 \cdot 10^{-2}$	$6,5 \cdot 10^{-4}$
$k_{\text{on}}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})^*$	$1,3 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^5$
$K_d(\text{M})^*$	$5,4 \cdot 10^{-8}$	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^{-9}$	$3,5 \cdot 10^{-8}$	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-9}$	$1,2 \cdot 10^{-8}$	$5,9 \cdot 10^{-8}$	$2,4 \cdot 10^{-9}$

Legenda k tabuľke č. 1

Experimenty sa uskutočnili spôsobom, ktorý sa opisuje v sekcii materiály a metódy.

*hodnoty k_{off} a k_{on} dosahujú presnosť $\pm 30\%$, čo závisí od presnosti stanovenia koncentrácie a vo vzťahu k mierne odlišným výsledkom, ktoré sa získali, keď sa použili odlišné oblasti senzogramov. $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$.

Príklad 3: Špecifickosť afinitných maturovaných scFvs pri fibronektínoch, ktoré obsahujú ED-B.

Imunoreaktivita dvoch afinitných maturovaných scFvs, CGS-1 a CGS-2 sa spočiatku odhadla pomocou testu ELISA a porovnávala sa priamo mAb BC-1 (ktoré rozpoznávajú izoformu B-FN) a mAb IST-6, ktoré rozpoznávajú iba izoformy FN, ktorým chýba doména ED-B (Camemolla et al., J. Cell Biol. 108, 1139 - 1148 (1989); Camemolla et al., J. Biol. Chem. 24689 - 24692 (1992)). Potom prebehla analýza špecifickosti s použitím extenzívneho panelu fragmentov FN, ktoré sa získali aplikáciou termolýzínu, a rekombinantných fúzných proteínov.

Antigény, ktoré sa použili v teste ELISA a pri imunoblotovaní, sa pripravili nasledovne. FN sa čistil z ľudskej plazmy a z upraveného média pre bunkovú líniu W138VA13, ako sa opisuje v publikácii Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987). Čistené FN sa štiepli termolýzínom (proteáza typ X; Sigma Chemical Co), ako sa opisuje v publikácii Camemolla et al., J. Cell Biol. 108, 1139 - 1148 (1989). Natívne fragmenty FN s molekulovou hmotnosťou 110 000 (B-) a (B+) s molekulovou hmotnosťou 120 000 (obr. č. 2) sa čistili po štiepení FN, ako sa opisuje v publikácii (Borsi et al., Anal. Biochem. 192, 372 - 379 (1991)). Veľká izoforma tenaskínu-C sa čistila, ako sa opisuje v publikácii Saginati et al., Eur. J. Biochem. 205, 545 - 549 (1992)). Rekombinantné proteíny sa exprimovali a čistili, ako sa opisuje v príklade 1. SDS-PAGE a westernové blotovanie sa uskutočňuje, ako sa opisuje v publikácii Camemolla et al., J. Cell Biol. 108, 1139 - 1148 (1989).

Všetky antigény, ktoré sa užívali pri teste ELISA, sa nariadili roztokom PBS na koncentráciu v rozmedzí 50 až 100 $\mu\text{g/ml}$ a potiahli sa pri teplote 4 °C na bunky Imunodoštičiek (Nunc, Roskilde, Denmark). Nenaviazané antigény sa odstránili premytím PBS a doštičky sa potom blokovali roztokom PBS s 3 % (m/v) boviným sérovým albumínom (BSA) počas 2 hod. pri teplote 37 °C. Potom nasledovali štyri premytia roztokom PBS a 0,5 % Tween 20 (PBST). Protilátky sa potom nechali naviazať pri teplote 37 °C počas 1,5 hod.; scFv sa preinkubovali s antisérom, ktoré je určené proti sekvencii tag: mAb M2 (Kodak, New Haven CT) pre FLAG tag alebo 9E10 (ATCC, Rockville, MD) pre myc tag. Ako kontrolné protilátky sa použili mAb BC-1 a IST-6. Po štyroch premytiach roztokom PBST sa platne inkubovali počas 1 hod. pri teplote 37 °C s biotínom značenými kozími protilátkami IgG (Bio-SPA Division, Milan, Taliansko) riedenými 1 : 2000 (v roztoku PBST + 3 % BSA). Premytie sa opakovalo a pridala sa komplex

streptavidín - biotinovaná alkalická fosfatáza (Bio-SPA Division, Milan, Taliansko) (riedený 1 : 800 v roztoku PBST, ktorý obsahuje 2 mM MgCl_2) počas 1 hod. pri teplote 37 °C. Reakcia sa vyvinula s použitím tabliet fosfatázového substrátu (Sigma) v 10 % dietanolamínu, pH 9,8 a optická hustota sa odčítala pri vlnovej dĺžke 405 nm. Výsledky sú uvedené v tabuľke č. 2.

Tabuľka č. 2

	CGS-1	CGS-2	BC-1	IST-6
FN plazmy	0,07	0,04	0,09	1,73
FN W138VA	1,16	0,72	1,20	1,12
n110kD(B-)	0,03	0,01	0,05	1,20
n120 kD (B+)	0,82	0,81	1,20	0,02
rec FN7B89	1,11	1,02	1,02	0,01
rec FN789	0,01	0,01	0,05	1,25
rec ED-B	1,21	1,32	0,15	0,04
rec FN-6	0,01	0,01	0,08	0,03
tenaskín	0,01	0,02	0,06	0,02

Imunoreaktivita scFv a monoklonálnych protilátok s antigénmi odvodenými od fibronektínu sa merala testom ELISA. Hodnoty reprezentujú OD merané pri vlnovej dĺžke 405 nm po subtrakcii signálu pozadia. Dáta sú priemer zo štyroch experimentov, ktoré majú maximum 10 % štandardnej odchýlky.

Identita rôznych foriem fibronektínu používaného v experimente je nasledujúca: Plazmový FN- ľudský plazmový fibronektín; W138-VA FN = fibronektín zo supernatantov fibroblastov transformovaných SV-40 (Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987)); n110kD = domény 4 fibronektínu ošetrovaného termolýzínom bez ED-B; n120kD = domény 4 fibronektínu ošetrovaného termolýzínom s ED-B; rec FN7B89 = doména ED-B, ktorá je lemovaná príslušnými FN homológmi repetícií typu III s doménou ED-B; rec ED-B = samotný rekombinantný ED-B; rec FN6 = doména 6 rekombinantného FN.

CGS-1 a CGS-2 rozoznávajú rekombinantný peptid ED-B, rovnako ako natívne alebo rekombinantné fragmenty FN, ktoré obsahujú sekvenciu ED-B, zatiaľ čo sa nenaviažu na žiadny fragment FN, ktorému chýba ED-B. Navyše CGS-1 a CGS-2 nereaguje s tenaskínom (ktorý obsahuje 15 homológnych repetícií typu III, ako sa opisuje v publikácii Siri et al., Nucl. Acids Res 19, 525 - 531 (1991)) a s plazmovým FN, ktorý v produktoch štiepenia termolýzínom neobsahuje detegovateľné množstvo sekvencie ED-B (Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987)). Naopak CGS-1 a CGS-2 silne reaguje s FN, ktorý sa čistil z bunkovej línie W138VA transformovanej SV-40. Približne 70 až 90 % molekúl FN z tejto bunkovej línie obsahuje ED-B, ako sa

ukazuje pri štiepení termolýzínom a v experimentoch s S1 nukleázou s použitím čisteného FN a celkovej RNA, ktorá sa získala z bunkovej línie (Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987); Borsi et al., Exp. Cell Res. 199, 98 - 105 (1992b)). Špecifickosť scFvs pre ED-B komponent FN sa demonštrovala použitím rozpustného rekombinantného ED-B s cieľom inhibície viazania CGS-1 a/alebo CGS-2 na FN buniek WI38VA (dáta nie sú uvedené).

Dáta potvrdili, že CGS-1 a CGS-2 reagujú špecificky iba s derivátmi FN, ktoré obsahujú doménu ED-B. Obe majú rovnakú reaktivitu ako mAb BC-1, okrem v prípade rekombinantnej ED-B, ktorú nerozoznávajú BC-1. Intenzita získaných signálov testu ELISA, vo vzťahu k mAb kontrolám, odráža vysokú špecifickosť dvoch scFvs pre antigény obsahujúce ED-B.

Špecifickosť CGS-1 a CGS-2 sa skúmala ďalej na imunoblotoch s použitím FN z plazmy a buniek WI38V a produktov po štiepení FN termolýzínom. Po štiepení termolýzínom FN z buniek WI38VA (väčšina z nich obsahuje ED-B) vzniká fragment s molekulovou hmotnosťou 120 000 (obsahujúci ED-B) a minoritný fragment s molekulovou hmotnosťou 110 000, ktorému chýba oblasť ED-B (uvedené na obr. č. 2; Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987)). Ďalšie štiepenie domény s molekulovou hmotnosťou 120 000 generuje dva fragmenty; fragment s molekulovou hmotnosťou 85 000, ktorý obsahuje na svojom C-konci skoro celú sekvenciu ED-B a sekvenciu s molekulovou hmotnosťou 35 000 (obr. č. 2a; Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987)).

Na ľavej strane obr. č. 2B je Comassieovou modrou farbený gél proteínových frakcií, ktoré sa analyzovali imunoblotom. CGS-1 a CGS-2 nerozoznali plazmový FN (dráha 1) a produkt proteínu štiepeného termolýzínom (dráha 3) obsahuje proteín s molekulovou hmotnosťou 110 000 a dráha 4 obsahuje produkt štiepenia proteínu s molekulovou hmotnosťou 110 000. Naopak FN z buniek WI38VA bohatý na ED-B, oba intaktné (dráha 2) a po zvýšenom štiepení termolýzínom (dráhy 5, 6 a 7) boli rozoznávané oboma fragmentmi scFvs. Najmenší fragment získaný z FN, ktorý by mohol byť špecificky rozoznaný CGS-1, bol proteín s molekulovou hmotnosťou 120 000 (zahrnuje repetície 2 až 11 typu III), zatiaľ čo CGS-2 je schopná rozoznať fragment s molekulovou hmotnosťou 85 000, ktorý zahrnuje repetície 2 až 7 vedľa N-konca ED-B (obr. č. 2B; Zardi et al., EMBO J. 6, 2337 - 2342 (1987)). Tieto výsledky indikujú, že scFvs reagujú s odlišnými epitopmi v sekvencii ED-B. Naviazanie CGS-2 na doménu s molekulovou hmotnosťou 85 000 indikuje, že epitop tohto klonu leží na N-konci ED-B. Naopak, CGS-1 sa nenaviaže, keď je doména s molekulovou hmotnosťou 120 000 štiepená na fragment s molekulovou hmotnosťou 85 000, čo znamená, že rozoznáva epitop, ktorý sa nachádza skôr na C-konci ED-B molekuly.

Špecifickosť CGS-1 a CGS-2 sa ďalej skúmala imunoblotovaním s použitím rekombinantných fragmentov FN a fúzných proteínov, ktoré obsahujú alebo neobsahujú sekvenciu ED-B. Fúzne proteíny FN sa pripravili spôsobom, ako sa opisuje v publikácii Carnemolla et al., J. Cell Biol. 108, 1139 - 1148 (1989). Výsledky týchto experimentov sú uvedené na obr. č. 3; v publikácii Carnemolla et al., J. Biol. Chem. 24689 - 24692 (1992) sa uvádza spojenie schematického diagramu so štruktúrou domén ľudského FN. Získané väzbové profily v podstate potvrdzujú, čo sa zistilo testami ELISA a imunoblotmi s čisteným FN a produktmi proteolytického štiepenia: CGS-1 a CGS-2 silne reagovali s fragmentmi FN, ktoré obsahovali ED-B (dráha 2 a 4), ale nemajú žiadnu reaktivitu so sekvenciami FN, ktoré neobsahujú ED-B (dráhy 1 a 3). CGS-1 nereagujú ani s ľudským

(dráha 5) ani s kuracím (dráha 6) fúznym proteínom ED-B, zatiaľ čo CGS-2 reagujú silne s oboma fragmentmi (obr. č. 3). Tento výsledok môže odrážať isté konformačné obmedzenie epitopu vo FN, ktorý obsahuje ED-B a ktorý je rozoznávaný CGS-1; je napríklad možné, že epitop je citlivý k denaturácii alebo je porušený pri frakcionácii SDS-PAGE a prenosu na pevný podklad, ktorým môže byť napríklad nitrocelulóza.

Spolu tieto výsledky demonštrujú, že CGS-1 a CGS-2 sa silne a špecificky viažu na FN obsahujúci ED-B v oblastiach, ktoré sa od seba líšia a líšia sa tiež od ED-B štruktúry, ktorú rozoznávajú mAb BC-1.

Príklad 4: Použitie afinitných maturovaných anti-ED-B scFvs pri imunocytochemickom farbení ľudských a myších nádorov.

CGS-1 a CGS-2 sa používajú pri imunolokalizácii molekúl FN, ktoré obsahujú ED-B v rôznych normálnych a neoplastických ľudských tkanivách. V prípade normálneho tkaniva sa vybrala koža, pretože o B-FN izoforme sa vie, že sa exprimuje v makrofágoch a fibroblastoch počas hojenia kožných poranení (Carnemolla et al., J. Cell Biol. 108, 1139 - 1148 (1989); Brown et al., Amer. J. Pathol. 142, 793 - 801 (1993)). Pri dvoch vybraných ľudských nádoroch sa analyzovala špecifickosť farbenia pomocou antifibronektínových mAbs: detailnejšie sa študovala multiformná glioblastóma, pretože endotelálne bunky v cievach tohto nádoru sú v štádiu vysokej proliferácie so zvýšenou angiogenezou, čo zahrnuje aj expresiu izoformiem B-FN (Castellani et al., Int. J. Cancer 59, 612 - 618 (1994)). Navyše pri štúdiu s použitím odlišného panelu normálnych, hyperplastických a neoplastických tkanív ľudského prsníka sa získal ďalší dôkaz korelácie medzi angiogenezou a expresiou B-FN (Kaczmarek et al., Int. J. Cancer 58, 11 - 16 (1994)).

V tu opísaných experimentoch sa imunohistochemické farbenie CGS-1 a CGS-2 porovnávalo s farbením mAb BC-1 (ktorá rozoznáva izoformu B-FN) a s ďalšími mAb, o ktorých sa vie, že reagujú buď so všetkými známymi izoformnými variantmi FN (IST-4) alebo iba s izoformami FN, ktoré nenesú ED-B (IST-6). Charakterizácia všetkých týchto kontrolných protilátok je uvedená v publikáciách Carnemolla et al., J. Cell Biol. 108, 1139 - 1148 (1989) a Carnemolla et al., J. Biol. Chem. 24689 - 24692 (1992).

Zo vzoriek odobratých počas operácie sa získali normálne a neoplastické tkanivá. Už skôr sa zistilo, že na presnú a citlivú detekciu molekúl, ktoré obsahujú FN, je kritická príprava a fixácia tkanív (Castellani et al., Int. J. Cancer 59, 612 - 618 (1994)). Pri imunohistochemickej analýze sa 5 µm hrubé kryostatické sekcie sušili na vzduchu a fixovali sa chladným acetónom počas 10 minút. Imunofarbenie sa uskutočnilo s použitím farbivého kitu s komplexom streptavidín-biotínalkalická fosfatáza (Bio-SPA Division, Milan, Taliansko) a naftol-AS-MX-fosforečnanu a Fast Red TR (Sigma). Ako kontrastné farbivo sa použil Gillovo hematoxylin a potom nasledovala fixácia v glycergéli (Dako, Carpinteria, CA), ako sa opisuje v publikácii Castellani et al., Int. J. Cancer 59, 612 - 618 (1994). S cieľom analyzovať špecifickosť ďalej v experimentoch, kde sa získalo pozitívne farbenie tkanív, sa špecifickosť pre ED-B demonštrovala preinkubáciou protilátok s rekombinantnou ED-B doménou, po čom nasleduje detekcia, ako sa opisuje v texte.

Výsledky týchto experimentov ukazujú, že tak CGS-1, ako CGS-2 reagujú s rovnakými histologickými štruktúrami, ako mAb BC-1. Pattern farbenia, ktorý sa získal s kožou s použitím CGS-1, CGS-2 a BC-1, odráža neprítomnosť ED-B vo FN, ktorý sa exprimoval v koži. Pri farbení sekcii invazívneho duktálneho karcinómu protilátky CGS-1,

CGS-2 a BC-1 majú distribúciu farbenia obmedzenú na hranicu medzi neoplastickými bunkami a strómou. To je v súlade so skutočnosťou, že hoci celkové FN je homogénne distribuované celou strómou nádoru, expresia B-FN je obmedzená do určitých oblastí. Sú to tie oblasti invazívneho duktálneho karcinómu, kde sa B-FN úspešne lokalizovali (v 95 % prípadov) s použitím mAb BC-1 (Kaczmarek et al., Int. J. Cancer 58, 11 - 16 (1994)).

Potvrdil sa predchádzajúci nález sfarbenia protilátok BC-1 glioblastómového multiformného nádoru. V publikácii Castellani et al., Int. J. Cancer 59, 612 - 618 (1994) sa pozoruje typický patern farbenia vaskulárnych štruktúr, ktoré sú podobné glomerulárnym, a v uvedených experimentoch sa zistilo, že protilátky CGS-1 a CGS-2 majú kvalitatívne identické výsledky.

Existuje však dôležitý rozdiel medzi CGS-1 a CGS-2 a mAb BC-1: ukázalo sa, že dva ľudské scFv sa viažu na kurací a myši B-FN, zatiaľ čo BC-1 je striktné špecifický len pre človeka. CGS-2 reagovala s kuracími embriami (dáta nie sú uvedené) a CGS-1 a CGS-2 reagovali s myšími nádormi.

Tiež sa preukázalo CGS-1 farbenie vaskulárnych štruktúr v sekciách myšieho teratokarcinómu F9. Na rozdiel od toho, všetky testované normálne myšie tkanivá (pečeň, slezina, obličky, žalúdok, tenké črevo, hrubé črevo, vaječníky, maternica, močový mechúr, pankreas, suparenálne žľazy, skeletálny sval, srdce, pľúca, štítina žľaza a mozog) majú negatívnu farbivú reakciu s protilátkami CGS-1 a CGS-2 (dáta nie sú uvedené). S použitím rekombinantnej ED-B domény, ktorá celkom inhibuje získané farbenie (dáta nie sú uvedené), sa ukázalo, že štruktúry zafarbené v sekciách teratokarcinómov F9 sú ED-B špecifické.

Príklad 5: Použitie afinitných maturovaných anti-ED-B scFvs pri *in vivo* cieleňom zavádzaní do ľudských nádorov

Pre vývoj xenoimplantovaných nádorov pri 6 až 10 týždňov starých holých myšiach (Balb-c alebo MF-1; Harlan UK), keď sa zaviedlo 1×10^7 buniek do boku jednej myši podkožnou injekciou, sa použila bunková línia SKMEL-28 ľudského melanómu. Myšiam, ktoré niesli nádory, sa aplikovala do chvostovej cievy injekcia so 100 μ l roztoku scFv1-Cy71 v PBS s koncentráciou 1 mg/ml, keď nádory dosiahli približný priemer 1 cm.

Značenie rekombinantných protilátok s CY7 sa dosiahlo pridaním 100 μ l 1M hydrogenuhličitanu sodného, pH 9,3 a 200 μ l CY7-bis-Osu (Amersham; Cat. Nr. PA17000; 2 mg/ml v DMSO) do 1 ml roztoku protilátok v PBS (1 mg/ml). Po 30 minútach pri teplote miestnosti sa do zmesi pridalo 100 μ l 1 M Tris pH=7, 4 a značené protilátky sa separovali od nezreagovaného farbiva s použitím kolón PD10 na jedno použitie Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Tieto kolóny sa uviedli do rovnováhy roztokom PBS. Eluované zelené frakcie protilátok sa koncentrovali na koncentráciu približne 1 mg/ml s použitím skúmaviek Centricon-10 (Amicon, Beverly, MA, USA). Dosiahnutý pomer značenia bol všeobecne blízko hodnote 1 molekula CY7: jedna molekula protilátok. To sa odhadlo spektroskopicky v 1 cm kvetách za predpokladu, že roztok protilátok s koncentráciou 1 mg/ml má pri vlnovej dĺžke 280 nm hodnotu absorbancie 1, 4 jednotiek. Molárny extinkčný koeficient CY7 pri vlnovej dĺžke 747 nm je 200 000 ($M^{-1}cm^{-1}$), pričom sa zanedbáva hodnota absorbcie CY7 pri vlnovej dĺžke 280 nm. Imunoreaktivita vzoriek protilátok po značení sa potvrdila posunom pásov (Neri et al., Bio/Techniques, 20, 708 - 713 (1996b)), afinitnou chromatografiou na kolóne s antigénom alebo analýzou BIAcore. Myš bola snímaná postaveným snímačom myši v pravidel-

ných časových intervaloch pri anestéze, ktorá sa dosiahla inhaláciou zmesi kyslíka/fluorotanu. S cieľom zistenia reprodukovateľnosti výsledkov sa v prípade každej vzorky študovalo 2 až 8 zvierat. Prebehli procedúry podľa projektu D. Neri UK Project Licence „Tumour Targeting“ (UK PPL 80/1056).

Infračervený snímač myši sa postavil ako modifikácia fotodetekčného systému podľa publikácie Folli, et al., (1994), Cancer Res., 54, 2643 - 2649, ktorý umožňuje použitie infračerveného fluoroforu CY7. Infračervená iluminácia sa vybrala s cieľom dosiahnutia lepšej penetrácie tkaniva. Fluorescencia CY7 (vlnová dĺžka je väčšia ako 760 nm) je ľudským okom neviditeľná a je nutné použiť počítačom riadenú CCD kameru. Snímač myši sa skladá zo skrinky nafarbenej čiernou farbou a utesnenej pred vstupom svetla, vybavenej 100 W volfrámovou halogénovou lampou s excitačným filtrom s priemerom 50 mm, ktorý sa špecificky navrhol pre CY7 (Chroma Corporation, Brattleboro, VT, USA; 673 - 748 nm). Výsledný iluminálny lúč je pri dobrom priblížení homogénny v oblasti s veľkosťou 5 x 10 cm, do ktorej sa umiestnila myš na snímanie. Fluorescencia sa detegovala osembitovou monochromatickou Pulnix CCD kamerou, vybavenou C-orámovanou šošovkou a 50 mm emisným filtrom (Chroma Corporation, Brattleboro, VT, U-SA; 765 - 855 nm) a systémom ImageDok (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Tento systém obsahuje počítač vybavený pohlcovačom žiarenia a softvérom na integráciu sekvenčných obrázkov. Pri postupe spriemerňovania sa v typickom prípade snímajú tri sekvenčné obrázky v 50 ms; tento počet sa udržiava konštantný pri sériách obrázkov jedného zvieraťa, aby sa umožnilo priame porovnanie cieleňom zavádzania do nádorov v rôznych časových okamihoch. Obrázky vo formáte TIFF sa potom previedli do fajlov PICT s použitím programu Graphics Converter a spracovali sa s použitím programu MacDraw Pro na počítači Power Macintosh 7100/66.

Schéma prístroja je uvedená na obr. č. 4.

Tieto experimenty ukázali, že obidva scFv, ktoré sa nachádzajú v nádore, sa vizualizovali v makroskopickom meradle.

Mikroskopická demonštrácia cieleňia neovaskulatúry vyvíjajúceho sa nádoru s dvoma anti-ED-B scFvs je detailnejšie opísaná ďalej v texte.

Holým myšiam a/alebo myšiam SCID, ktoré nesú vo svojom boku xenoimplantované bunky SKMEL-28 ľudského melanómu alebo myšieho F9 teratokarcinómu, sa aplikovali injekciou buď neznačené fragmenty scFv s FLAG tag, alebo biotinované fragmenty scFv.

Myši sa usmrtili v rôznych časových intervaloch po injekcii, odobrali sa nádorové a nenádorové sekcie, ktoré sa potom zafarbili podľa bežného imunohistochemického protokolu s použitím buď anti-FLAG M2 protilátok (Kodak, 181), alebo detekčných činidiel založených na streptavidíne. Optimálne cieleňé zavádzanie sa všeobecne dosiahlo 12 hodín po injekcii. Ukázalo sa, že protilátky CGS1 a CGS2 sa viažu na neovaskulatúru xenoimplantovaného nádoru a myšieho teratokarcinómu.

Príklad 6: Cieleňé zavádzanie xenoimplantovaného myšieho F9 teratokarcinómu do holých myši.

Po zavedení podkožnej injekcie 4 x 10⁶ buniek myšieho F9 teratokarcinómu sa na boku holých myši vyvinuli pevné nádory. Tento nádor rastie pri myšiach veľmi rýchlo, približne po jednom týždni po injekcii dosahuje priemer 1 cm a je vysoko vaskularizovaný. Na zobrazenie cieleňého zavádzania protilátok sa použila modifikácia fotodetekčnej metódy podľa publikácie Folli, et al., (1994), Cancer Res.,

54, 2643 - 2649, ktorá umožňuje kinetické zhodnotenie cieľného zavádzania do nádoru a zmien na nádore po aplikácii protilátok pri rovnakých zvieratách v rôznych časových okamihoch, ako sa opisuje detailnejšie v texte (obr. č. 4).

S cieľom cieľného zavádzania do nádoru a uskutočnenia detekcie protilátok, scFv(CGS-1), scFv(CGS-2) a anti-lysozým scFv(D1.3) (McCafferty j., Griffiths, AD, Winter, G, Chiswell, D. J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature (London), 348, 552 - 554) boli pripojené s homodimerizačným tagom (Pack et al., (1993), Bio/Technology, 11, 1271 - 1277) subklonovaním protilátok do reštrikčných miest SfiI/NotI expresívneho vektora pGIN50. Tento vektor je odvodený z pDN268 (Neri et al., (1996b), Nature Biotechnology, 14, 385-390), v ktorom je His6 sekvencia tag nahradená sekvenciou: GGC LTD TLQ AFT DQL EDE KSA LQT EIA HLL KEK EKL EFI LAA H, ktorá obsahuje cysteinový zvyšok a amfipatický helix proteínu Fox pre kovalentnú homodimerizáciu fragmentov protilátok (Abate et al., 1990). Nedosiahla sa celková kovalentná dimerizácia: približne 30 až 50 % fragmentov protilátok tvorilo kovalentne spojené diméry.

Fragmenty protilátok sa čistili afinitnou chromatografiou na kolónach získaných spojením lysozýmu zo slepých vajec (Dl. 3) alebo 7B89 (anti-ED-B protilátky; Carnemolla et al., J. Biol. Chem. 24689 - 24692 (1992)) so sfarózou aktivovanou CNBr (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Supernatanty sa naniesli na afinitný podklad, ktorý sa potom premyl PBS, s PBS + 0,5 M NaCl a eluoval sa 100 mM Et₃N. Protilátky sa potom dialyzovali proti PBS. Protilátky sa značili spôsobom, ktorý sa opisuje v texte, a potom sa zaviedli injekciou do chvostovej cievy myši, ktoré nesú nádor. Injekcia obsahovala 100 µl roztoku scFv₁-Cy₇ v PBS a aplikovala sa v okamihu, keď nádory dosiahli priemer približne 1 cm.

Ako sa ukázalo na obr. č. 5, scFv(CGS-1) sa lokalizovali na nádore do troch dní. V tomto čase tiež zmizol nádor. Objavilo sa však tiež sfarbenie femuru. Cieľné zavádzanie protilátok CGS-1 do nádoru sa významne vylepšilo zavedením amfipatického helixu, ktorý obsahuje cysteinový zvyšok na C-konci, aby došlo k podporeniu dimerizácie protilátok (Pack et al., (1993), Bio/Technology, 11, 1271 - 1277). V skutočnosti lokalizácia dimérov scFv(CGS-2)₂ sa neprejavila podstatným zvýšením z 24 na 72 hodín. Naopak negatívna kontrola (dimerické protilátky scFv(D1,3)₂, anti-lysozýmové protilátky) má rýchle zmiznutie a nedetegovateľnú lokalizáciu na nádore alebo femure.

ScFv(28SI) má slabé ciele do nádoru po 6 hodinách (dáta nie sú uvedené), ale nebolo delegované po 24 hodinách alebo neskôr (obr. č. 6). Afinitná maturácia vedie k vylepšeniu cieľného zavádzania; potom scFv(CGS-2) sa ciele zavádza do malých a veľkých F9 nádorov s vysokou účinnosťou, keď sa vyskytuje ako monomér (obr. č. 6) alebo dimér (dáta nie sú uvedené). Po dvoch dňoch sa zistilo, že v nádore pretrvávajú 2 % injektovanej dávky protilátok na gram nádoru v prípade scFv(CGS-2) monoméru a v prípade scFv(CGS-2) diméru to sú 3 až 4 %. Dávka zavedená do nádoru pomocou scFv(CGS-2) bola tiež vyššia než v prípade scFv(CGS-1) (obrázky č. 5 a 6) a koreluje s ich afinitou (tabuľka č. 1). ScFv(28SI) a scFv(CGS-1) sa javia byť náchylné k proteolytickému štiepeniu a majú vysoké pohltie pečou (obr. č. 6), zatiaľ čo protilátky scFv(CGS-1) sú podstatne viac stabilné a sú menej pohltované pečou (obr. č. 5).

ZOZNAM SEKVENCÍ

(1) VŠEOBECNÉ INFORMÁCIE:

(i) PRIHLASOVATEL:

- (A) MENO: PHILOGENS. r. l.
- (B) ULICA: Via Roma 22
- (C) MESTO: SIENA
- (E) ŠTÁT: TALIANSKO
- (F) PSČ: 53100

(ii) NÁZOV VYNÁLEZU: PROTILÁTKY PROTI ED-B DOMÉNE FIBRONEKTÍNU, ICH KONŠTRUKCIA A POUŽITIE

(iii) POČET SEKVENCÍ: 12

(iv) STROJOVO ČITATEĽNÁ FORMA:

- (A) TYP MÉDIA: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC kompatibilný
- (C) OPERAČNÝ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTVÉRE: Patentin Release # 1. 0, Verzia # 1. 90 (EPO)

(v) ÚDAJE O PRIHLÁŠKE:

ČÍSLO PRIHLÁŠKY: PCT/GB97/01412

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 4 aminokyseliny
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 1:

Ser Leu Pro Lys

1

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 12 aminokyselín
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 2:

Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu
1 5 10

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 17 párov báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: cDNA

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 3:

CAGGAAACAG CTATGAC

17

(2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 51 párov báz
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: cDNA

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 4:

CTGGTCCCT CGCCGAATA CGACMNMNMN MNMNMNMNMN NNAGAGGAGT
TACAGTAATA GTCAGCCTC

68

2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 54 párov báz
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: cDNA

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 5:

ATTGCTTTTC CTTTTTCGG CGCGCCTAG GACGGTCAGC TTGCTCCCTC CGCC 54

2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 43 aminokyselín
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: cDNA

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 6:

Gly Gly Cys Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Phe Thr Asp Gln Leu Glu
 1 5 10 15
 Asp Glu Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala His Leu Leu Lys Glu
 20 25 30
 Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala His
 35 40

2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 8 aminokyselín
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 7:

Pro Val Val Leu Asn Gly Val Val
 1 5

2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 8 aminokyselín
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: peptid

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 8:

Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val
 1 5

2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 113 aminokyselín
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: proteín

(vi) ZDROJ PÔVODU

(B) KMEŇ: CGS1

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 9:

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Pro Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Arg

2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 121 aminokyselín
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: proteín

(vi) ZDROJ PÔVODU

(B) KMEŇ: CGS2

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 10:

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

2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 109 aminokyselín
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
 (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: proteín

(vi) ZDROJ PÔVODU

(B) KMEŇ: CGS1

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 11:

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

2) INFORMÁCIE O SEQ ID NO: 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 109 aminokyselín
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) DRUH REŤAZCA: jednoduchý
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) DRUH MOLEKULY: proteín

(vi) ZDROJ PÔVODU

- (B) KMEŇ CGS2

(xi) OPIS SEKVENCIE: SEQ ID NO: 12:

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

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaná protilátka alebo jej fragment, ktorá je špecifická k onkofetálnej doméne ED-B fibronektínu (FN) a priamo sa na ňu viaže, kde táto protilátka alebo fragment má disociačnú konštantu K_d pre ED-B nižšiu než 6×10^{-8} M, merané ako vyčistený monomér.

2. Izolovaná protilátka alebo jej fragment podľa nároku 1, ktorá obsahuje väzbovú doménu antigénu protilátky ľudského pôvodu.

3. Izolovaná protilátka alebo jej fragment podľa nároku 1, ktorá sa viaže na všetky FN obsahujúce ED-B po spracovaní FN proteázou termolizínom.

4. Izolovaná protilátka alebo jej fragment podľa nároku 1, ktorá sa viaže na B-FN bez spracovania B-FN N-glykanázou.

5. Izolovaná protilátka alebo jej fragment podľa nároku 1, ktorá má variabilnú oblasť ťažkého reťazca (VH) so sekvenciou odvodenou od ľudskej zárodočnej línie DP47, kodón 1 Glu až kodón 98 Arg vrátane na obr. 1, a sekvenciu CDR3 Ser Leu Pro Lys.

6. Izolovaná protilátka alebo jej fragment podľa nároku 1, ktorá má variabilnú oblasť ťažkého reťazca (VH) so sekvenciou odvodenou od ľudskej zárodočnej línie DP47, kodón 1 Glu až kodón 98 Arg vrátane na obr. 1, a sekvenciu CDR3 Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu.

7. Izolovaná protilátka alebo jej fragment podľa nároku 1, ktorá má variabilnú oblasť ľahkého reťazca (VL) so sekvenciou odvodenou od ľudskej zárodočnej línie DPL16, kodón 1 Ser až kodón 90 Ser vrátane na obr. 1, a zvyšok sekvencie CDR3 ako Pro Val Val Leu Asn Gly Val Val.

8. Izolovaná protilátka alebo jej fragment podľa nároku 1, ktorá má variabilnú oblasť ľahkého reťazca (VL) so sekvenciou odvodenou od ľudskej zárodočnej línie DPL16, kodón 1 Ser až kodón 90 Ser vrátane na obr. 1, a zvyšok sekvencie CDR3 ako Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val.

9. Izolovaná protilátka alebo jej fragment podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, kde táto protilátka alebo fragment zahŕňa molekulu scFv.

10. Izolovaná protilátka alebo jej fragment podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 8, kde táto protilátka alebo fragment zahŕňa dimérnu molekulu scFv.

11. Izolovaný fragment protilátky podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 až 8.

12. Farmaceutická kompozícia, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahŕňa izolovanú protilátku alebo jej fragment podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11 v účinnom množstve v spojení s farmaceuticky prijateľným nosičom.

13. Nukleová kyselina, ktorá kóduje izolovanú protilátku alebo jej fragment podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11.

14. Fág, ktorý kóduje izolovanú protilátku alebo jej fragment podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11.

15. Hostiteľská bunka *in vitro* transformovaná alebo transfekovaná nukleovou kyselinou podľa nároku 13.

16. Izolovaná protilátka alebo jej fragment podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11 na použitie v terapii.

17. Použitie izolovanej protilátky alebo jej fragmentu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11 na výrobu liečiva na ciele zavádzanie do nádorov.

18. Použitie izolovanej protilátky alebo jej fragmentu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11 na výrobu prostriedku na zobrazovanie nádorov.

19. Spôsob výroby izolovanej protilátky alebo jej fragmentu podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa exprimuje nukleová kyselina podľa nároku 13 v hostiteľskej bunke *in vitro* za vzniku uvedenej protilátky alebo jej fragmentu.

20. Spôsob výroby izolovanej protilátky alebo jej fragmentu podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že a) knižnica protilátok alebo ich fragmentov, exprimovaných vo fagu, sa testuje rekombinantným fibronektínovým fragmentom obsahujúcim doménu ED-B odvodeným od fibronektínového proteínu, b) pozitívnymi klonmi sa infikujú hostiteľské bakteriálne bunky, c) pozitívne fágové klony sa podrobia procesu afinitnej maturácie, d) kroky (a) a (b) sa opakujú, pričom dochádza k selekcii pozitívnych klonov so zlepšenou afinitou k antigénu, e) hostiteľské bunky sa infikujú pozitívnymi klonmi a z týchto hostiteľských buniek sa čistia molekuly protilátky.

21. Spôsob podľa nároku 20, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že stupeň (a) zahŕňa testovanie knižnice fragmentov protilátok, kde fragmenty protilátok sú molekuly scFv.

22. Spôsob podľa nároku 20, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že molekuly scFv zahŕňajú väzbovú doménu antigénu protilátky ľudského pôvodu.

23. Spôsob podľa nároku 20, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že stupeň (a) zahŕňa testovanie rekombinantnými antigénmi 7B89 alebo ED-B.

24. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 20 až 23, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že nukleová kyselina pozitívneho klonu sa použije na produkciu požadovanej protilátky alebo jej fragmentu, kódovaných touto nukleovou kyselinou, expresiou v hostiteľskej bunke *in vitro*, pričom požadovaná protilátka alebo jej fragment zahŕňa väzbovú doménu antigénu, ktorá je špecifická k onkofetálnej doméne ED-B fibronektínu (FN) a priamo sa na ňu viaže.

25. Spôsob podľa nároku 24, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že požadovaná protilátka je vo forme úplnej protilátky.

26. Spôsob podľa nároku 24, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že požadovaný fragment protilátky je vo forme molekuly scFv.

27. Diagnostický kit, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že zahŕňa izolovanú protilátku alebo jej fragment podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 11 a jedno alebo viac činidiel, ktoré umožňujú stanovenie väzby tejto protilátky alebo fragmentu na bunky.

9 výkresov

Obrázok č. 1(a)

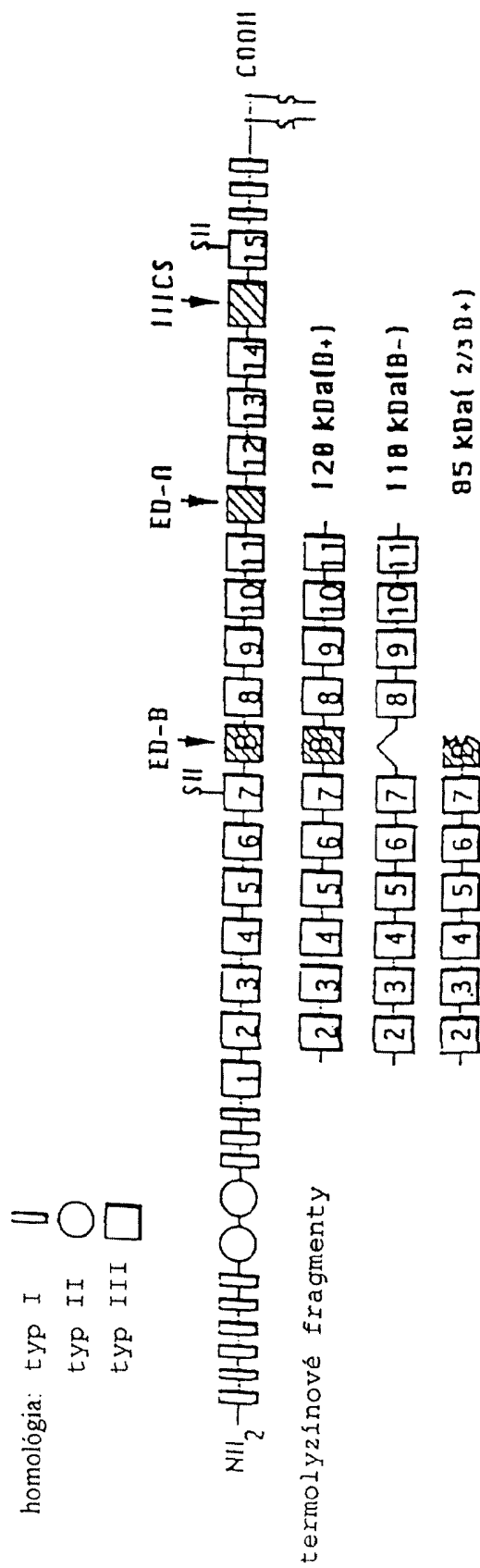
	CDR1			CDR2				
	10	20	30	40	50	60		
CGS1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA V SGFTFS							
CGS2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA D SGFTFS							
	SYAMS			WVRQAPGKGLEWS				
	SYAMS			WVRQAPGKGLEWS				
				AISGGSGSTYYADSVKG				
				AISGGSGSTYYADSVKG				
CDR3								
	70	80	90	98				
CGS1	RFTISRINSQNTLYLQ N SLRAEDTAVYYCAR							
CGS2	RFTISRINSQNTLYLQ N SLRAEDTAVYYCAR							
	SLEK			WQQGILVTISR				
	GAGAFRPYRKIE			WQQGILVTISR				

obrázok č. 1 (b)

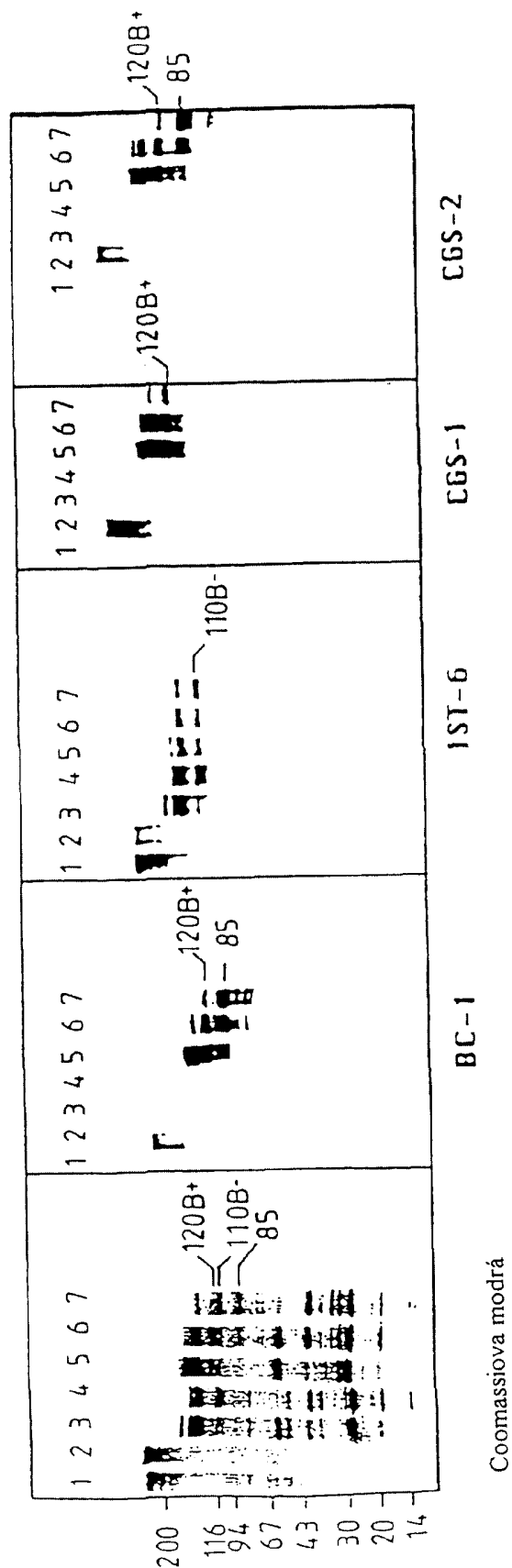
	CDR1					CDR2				
	10	20	30	40	50					
CGS1	SSELTQDPAVSVALGQIVRITC QGDSLRSYAS WYQKFGQAPVLVTY GKNRPS									
CGS2	SSELTQDPAVSVALGQIVRITC QGDSLRSYAS WYQKFGQAPVLVTY GKNRPS									

	CDR3				
	60	70	80	90	100
CGS1	GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYC NSSPYVLN Q W FGGIKLTVLG				
CGS2	GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYYC NSSPEEHL N W FGGIKLTVLG				

Obrázok č. 2 (a)



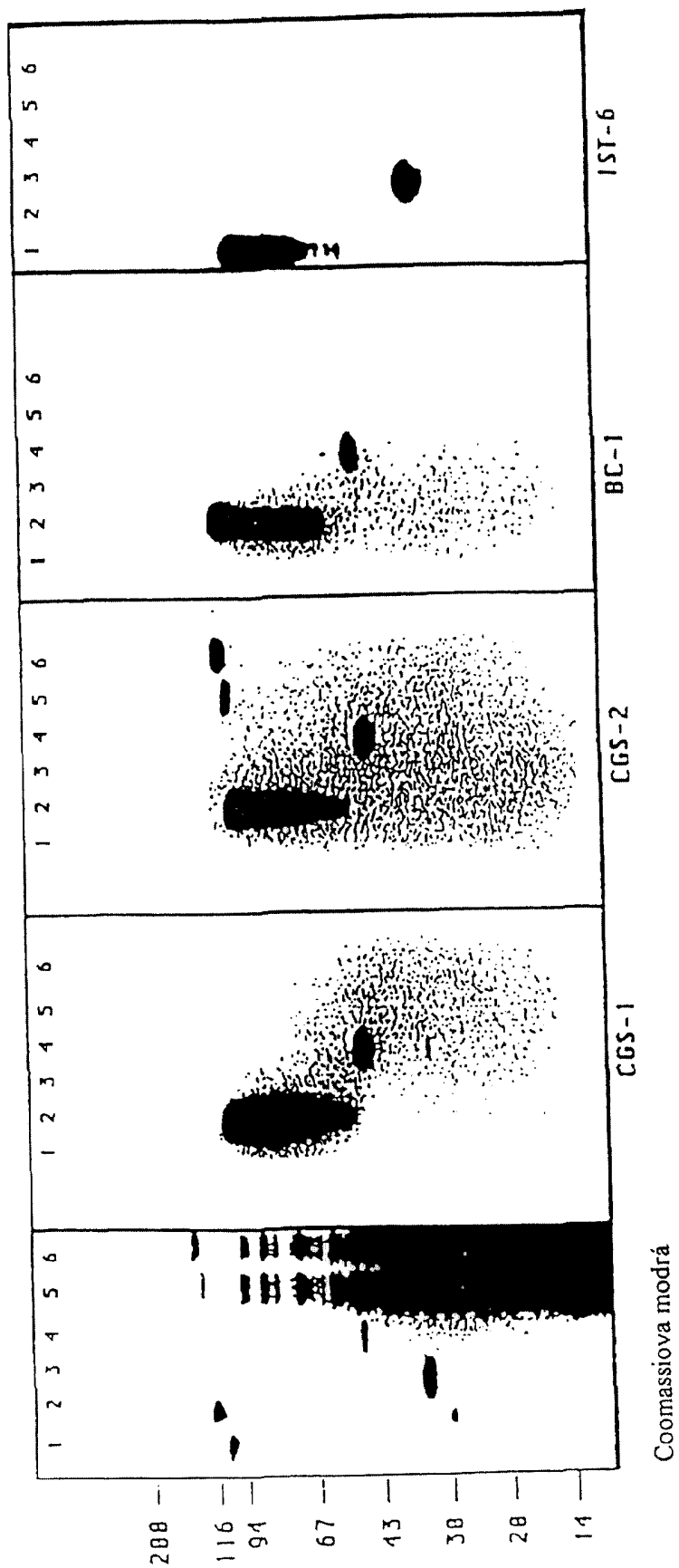
Obrázok č. 2 (b)



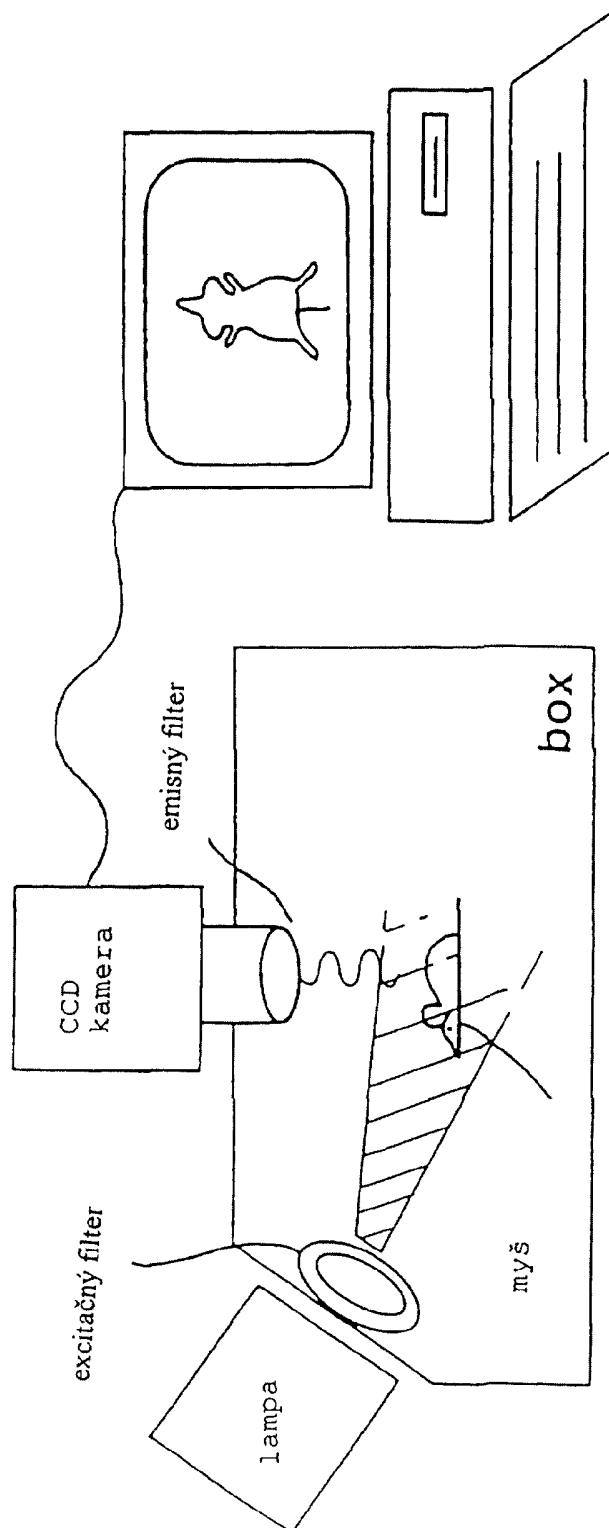
Obrázok č. 3A

1		rec FN 2-11 (B-)	CGS-1	CGS-2	BC-1	IST-6
2		rec FN 2-11 (B+)	+	+	+	-
3		rec FN 7-9 (B-)	-	-	-	+
4		rec FN 7-9 (B+)	+	+	+	-
5		fúzny protein λ ED-B	-	+	-	-
6		fúzny protein λ chFN 60	-	+	-	-

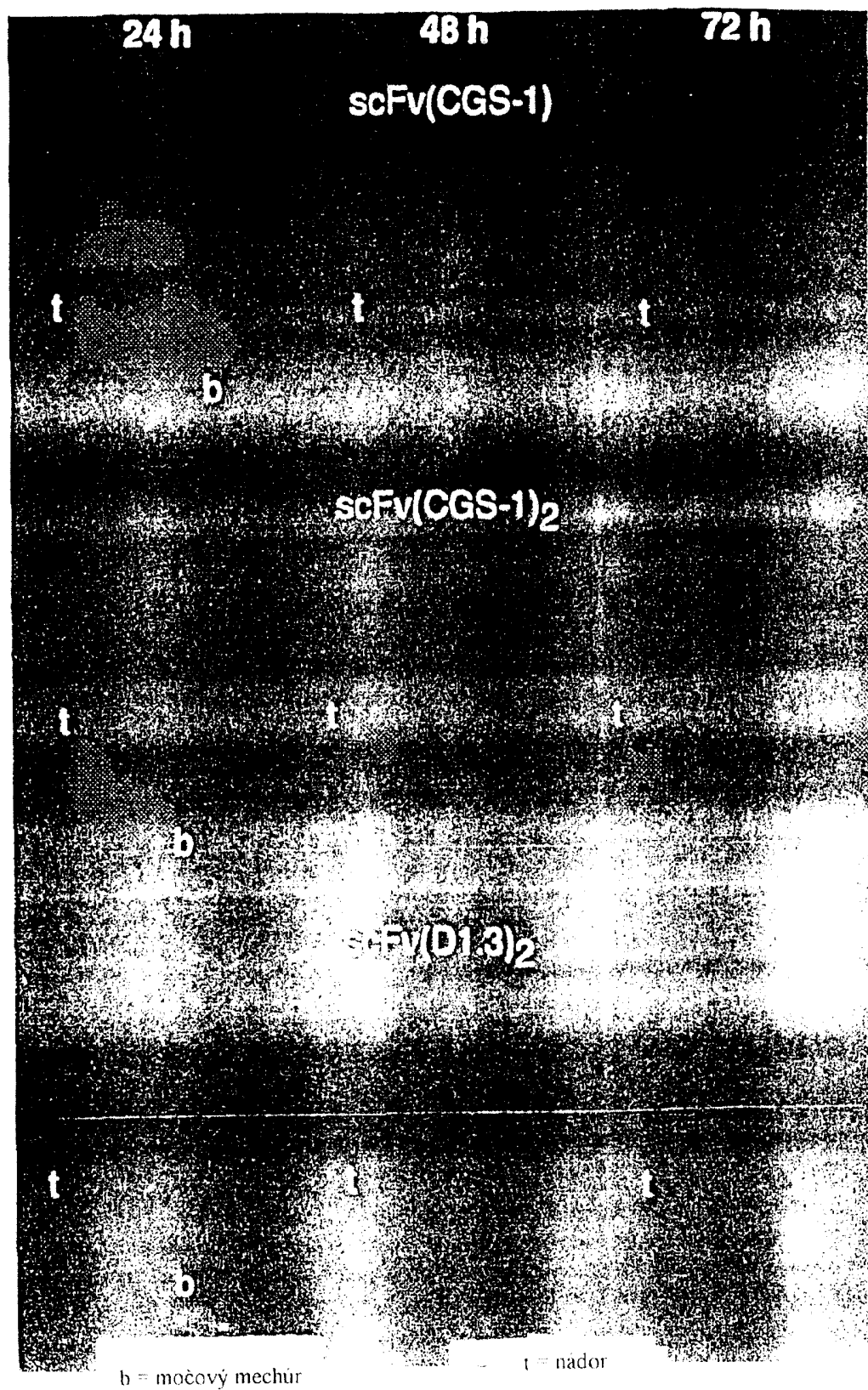
Obrázok č. 3B



Obrázok č. 4



Obrázok č. 5



obrázok č. 6

