

肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項  第一款但書或  第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利  主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 1998.5.11 09/075,338

2. 美國 1999.4.28 09/300,425

3.

4.

5.

主張國內優先權（專利法第二十五條之一）：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

612-618)，且可作為分子介入的標的。事實上，近來吾人已能運用螢光技術證實，抗 ED-B 單鏈 Fv 抗體片段 (scFv) 在患有腫瘤小鼠上會選擇性聚集於腫瘤血管處，及抗體親和力會左右標的的表現，參見 [Neri et al. (1997). *Nat Biotechnol.* 15, 1271-1275] 及 [國際專利申請號 PCT / GB97/01412, based on GB96 / 10967.3]。腫瘤標定在注射後 24 小時或稍晚即可被評估。

目前已有各種不同的嘗試，試圖提高抗體與 ED-B 結構域之結合，以使其能用以標定腫瘤。

Peter 等人 (*Cell Adhesion and Communication* (1995). 3, 67-89) 發現了多株抗體培養之不含纖維網蛋白 (FN) 序列之抗原，而非含完整 ED-B 結構域之抗原，並證明其特定且直接地結合至此結構域。

然而，Peters 等人的試劑有相當多的缺點：其抗血清須經 N-聚木糖酶 (N-glycanase) 作用方可辨識 ED-B(+)-FN。這使得此試劑不適合應用在腫瘤標定、造影及治療上，因為去糖基作用 (deglycosylation) 不能在活體中進行。作者亦指出他們所製作的抗體無法辨識哺乳動物細胞所產生之完整的 ED-B(+)-FN。他們亦瞭解其無法製造出對 ED-B 結構域 R 具專一性之單株抗體，即使對其他纖維網蛋白的結構域 (如 ED-A) 已被製造出了。眾所週知，在上述的應用中，多株抗血清是無法被接受的。

經過多年的研究後，可辨識纖維網蛋白 ED-B 結構域且不須經過 N-聚木糖酶作用的單株抗體，只有本發明所使用的噬菌體表現技術能夠製造出來。

Zang 等人 (*Matrix Biology* 1994, 14: 623-633) 以狗的 ED-B 結構域製造出多株抗血清。作者希望能與人的 ED-B(+)-FN 抗體有交叉反應，但並未做試驗。然而，作者們已意識到製作一個直接可辨識纖維網蛋白 ED-B 結構域的單株抗體有其困難 (Page 631)。在西方墨點法 (Western blot) 中，抗血清只有在以 N-聚木糖酶處理後方可辨識 ED-B (+)-FN。如前所述，聚木糖酶作用使得這些試劑不適合本發明的應用。

在酵素免疫試驗中，ED-B(+)-FN 的辨認不須要去糖基化作用，但

只能在軟骨組織上，其係以變性試劑（4M 尿素）萃取之並於膠質處理的塑膠上被補捉。作者評論到「纖維網蛋白分子與在酵素免疫試驗盤之塑膠表面的膠質鍵結，或許能使抗原表位充分暴露以供抗血清辨認」。因為在活體應用上，纖維網蛋白無法被變性及與膠質結合，而本發明之單株結合物因此提供了顯著的優點。

日本專利 JP02076598 及 JP04169195 提到抗 ED-B 抗體。由文件上看，是否描述單株抗 ED-B 抗體並不是很清楚。再者，單一抗體（如在 JP02076598 所述之抗體）似乎不可能含有一個抗原決定素於式(1)、(2)或(3)之胺基酸序列：

-(1) EGIPIFEDFVDSSVGY

-(2) YTVTGLEPGIDYDIS

-(3) NGGESAPTTLTQQT

乃基於以下證據：

- i) 一個單株抗體應能辨識一個已定義之抗原表位。
- ii) 纖維網蛋白 ED-B 結構域之三維結構已透過核磁共振分光儀確定。片段(1)、(2)及(3)位於 ED-B 結構之相向位置，而無法同時與一個單株抗體結合。

此外，為了證實抗體之實用性，亦須證實其於腫瘤中的定位，如同在毋需結構干擾試劑處理之生物檢體中，ED-B(+)-FN 結構的染色證據。

BC1 抗體（參見 Carnemolla et al. 1992, J. Biol Chem, 267, 24689-24692）可辨認出纖維網蛋白之結構域 7 之抗原表位，而非 ED-B 結構域，其於 ED-B 結構域表現顯得相當模糊不明。此抗體對人類具全然專一性。因此，BC1 抗體與本發明之抗體顯出不同的反應性。甚至，BC1 抗體僅可辨認結構域 7 及缺 ED-B 結構域之結構域 7-8。這樣的抗體表位能在活體內藉由纖維網蛋白分子之蛋白水解而產生。本發明試劑之優點是只要他們具有 ED-B 結構域，他們便能夠局限在纖維網蛋白分子或片段。

對於癌症診斷，尤其對原發或續發腫瘤影像，免疫閃爍掃描為其

中一種選擇。在此方法中，病人在注射放射性同位素化合物（如連結某放射核種至一適當載體）後，以適當的裝置（如伽瑪相機）照相。對於閃爍造影之應用，為減少病人暴露在放射物質下，較常使用半衰期短的伽瑪幅射源，像鎳-99、碘-123 或鈾-111。

在核子醫學科最常使用的核種是鎳-99 (99mTc)，為半衰期 6 小時之伽馬幅射源。一般在病人注射含鎳-99 之放射性藥物後約 12 至 24 小時可照相，然而，核種很可能在更短的時間累積於病變處。

此外，如果抗體能快速、選擇性地定位於新生血管，將激勵研究人員尋找其他適合的分子來與抗體結合，以達到診斷及治療的目的。

### 【發明概述】

基於注射後可將腫瘤傷害定位數小時之放射性藥物之核子醫學需要，及抗體親和力對標定新生血管的影響，本發明之目的在於製造特別適用於纖維網蛋白之 ED-B 結構域之抗體，纖維網蛋白具有次毫微米級的解離常數(抗體-抗原親和力的定義及監測參見 Neri et al. (1996). Trends in Biotechnol. 14, 465-470)。本發明之再一目的為提供具適當形式放射性同位素抗體，針對纖維網蛋白之 ED-B 結構域，可於注射後數小時完成腫瘤偵測。

本發明的觀點之一為，上述目的可藉由對纖維網蛋白的 ED-B 結構域的特殊抗原表位具特定親和力，及對該 ED-B 抗原表位具有更佳親和力之抗體來完成。

本發明的觀點之二為，上述抗體係用於快速標定新生血管。

本發明的觀點之三為一診斷裝置，其包括該抗體及一或多種用於診斷新生血管的藥劑。

本發明的觀點之四為，該抗體係使用於診斷及治療具有血管增生特徵的腫瘤及疾病。

本發明的觀點之五為包括該抗體及一適當光活性分子（例如明智地選擇光敏物質）之結合物，及將其使用於新生血管之選擇性光媒介阻塞。

## 專門用語

本發明所用之專門用語定義如下：

### -抗體

係指一種免疫球蛋白，無論自然或部分或全部合成者。此名詞亦涵括聚肽 (polypeptide) 或具有結合結構域為抗體結構域或同原者之蛋白質。這些可由天然資源衍生出來，或部分或全部合成。抗體的例子包括同型免疫球蛋白及其同型之亞綱；片段包括抗原結合結構域，例如 Fab、scFv、Fv、dAb、Fd 及 diabody。取單株及其他抗體並使用 DNA 重組技術來製造保有原抗體特性的其他抗體或化學分子是可能的。此類技術包括導入 DNA，並將一抗體之免疫球蛋白的可變異區或互補限定區 (CDRs)，編碼到不同的免疫球蛋白的固定區或固定區加外框區。可參見 EP-A-184187、GB 2188638A 或 EP-A-239400。融合瘤 (Hybridoma) 或其他細胞產生抗體可能受到基因突變或其他變化，其可能或不能改變生成抗體的結合特性。由於抗體可由許多方法改變，『抗體』一詞應係任何特定結合成員或具有所需特性之結合結構域者。因此，該詞涵蓋抗體的抗體片段、衍生物、功能同等者及同原者，包括任何天然或部分或全部合成的，具有免疫球蛋白結合結構域之聚肽。亦包括與另一聚肽結合，含有免疫球蛋白結合結構域或等同物的特異(chimeric)分子。特異分子的培養及表示法參見 EP-A-0120694 及 EP-A-0125023。已有證明顯示完整抗體的片段亦可表現結合抗原的功能。結合片段的例子包括 (i) 由 VL、VH、CL 及 CH1 結構域組成的 Fab 片段；(ii) 由 VH 及 CH1 結構域組成的 Fd 片段；(iii) 由單一抗體之 VL 及 VH 結構域組成的 Fv 片段；(iv) 由 VH 結構域組成的 dAb 片段(Ward et al. (1989))；(v) 分離的 CDR 區；(vi) F(ab')<sub>2</sub> 片段，包括兩個相連 Fab 片段的二價片段；(vii) 單鏈 Fv 分子 (scFv)，其中一 VH 結構域及一 VL 結構域藉由一聚肽連結體相連，以使此二結構域結合形成抗原結合位址 (Bird et al. (1998) Science, 242, 423-426.; Huston et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-83)；(viii) 雙性 (bispecific) 單鏈 FV 二聚物 (PCT/US92/09965)；(ix)

『dibodies』，由基因融合的多價或多特性的片段 (W094/13804; Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 6444-6448)。Diabodies 為聚肽的多聚物，每一個聚肽包括一免疫球蛋白輕鏈的結合區，及一包括一免疫球蛋白重鏈結合區的第二結構域，此二結構域被連結 (例如被肽連結體連結)，但不能彼此結合形成抗原結合位址。抗原結合位址係由多聚物內聚肽的第一結構域與多聚物內另一聚肽的第二結構域結合形成 (W094/13804)。此處使用之雙性抗體可為傳統的雙性抗體，並可用各種方法製造 (Holliger and Winter (1993), Curr. Opin. Biotech., 4, 446-449)，例如化學製備或由混合 hybridomas 製備，或為上述之任何雙性抗體片段。較佳為，使用 scFv 二聚物或 diabodies 而非完整抗體。Diabodie 及 scFv 之建立不需 Fc 區，只使用可變異的結構域，有可能降低抗 idiotypic 反應的效果。其他形式的雙性抗體包括單鏈 CRAbs，參見 [Neri et al. (1995) J. Mol. Biol., 246, 367-373]。

#### -互補限定區 (Complementarity-determining regions)

傳統上，抗體可變異結構域的互補限定區 (CDRs) 定義為高度可變異抗體序列，包含用於辨識特定抗原的殘餘基質。本文中，我們的 CDR 定義及編號參照 [Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196, 901-917]。

#### -等功能之變異形式

係關於一分子 (變異種)，其雖與另一分子 (母株) 具有結構差異，但保存某些重要相同處，及至少某些母分子的生物功能，例如與特殊抗原或抗原表位結合的能力。變異種的形式可為片段、衍生物或突變種。變異種、衍生物或突變種可藉由加入、去除、取代或嵌入一或多個胺基酸於母分子，或與其他分子連結而獲得。這些變化可在核甘酸或蛋白質等級形成。例如，經編碼的聚肽可為 Fab 片段，再將其連結至另一來源的 Fc 尾段。或者，與酶、螢光等標記連結。例如，一抗體『A』具有纖維網蛋白於 ED-B 結構域的特殊抗原表位，則抗體『A』的等功能性變異形式可為具有不同互補限定區序列的抗體『B』，但抗體

『B』可辨認上述抗體『A』的相同抗原表位。

我們已由抗體噬菌基因庫中分離出 scFv 形式的重組抗體，特別是纖維網蛋白的 ED-B 結構域，及於組織切片中辨認 ED(+)-纖維網蛋白。這些抗體之一，E1，具有成和親和力以產生親和力更佳的抗體 H10 及 L19。抗體 L19 的纖維網蛋白的 ED-B 結構域的解離常數為次毫微莫耳濃度等級。

將具有高度親和力的 L19 及 L1.3 (特別針對一種不相關抗原的抗體，雞蛋溶菌酶) 形成放射性同位素，並注射到有腫瘤的老鼠身上。腫瘤、血液或器官的生物分布 (biodistribution) 係於不同時間點得到，並以每一公克組織所注射劑量 (%ID/g) 之百分比表示。注射後 3 小時，L19 於腫瘤的 %ID/g 較血液的 %ID/g 為佳，但作為陰性控制組的 L1.3 則不然。腫瘤與血液的比例在較長的時間點增加。此結果主張高親和力的 L19 為較有用的腫瘤標定劑，例如，對新生血管的免疫閃爍造影偵測。

#### -光敏物質

光敏物質可定義為經由在水及/或氧氣中照射產生可與生物分子反應之毒性分子 (例如單態氧 (singlet oxygen))，因此可能引起生物標的如細胞、組織及體液的傷害。

光敏物質在吸收波長大於 600nm 時特別有用。事實上，光穿透組織及體液在 600-900nm 範圍內會最大，參照 [Wan et al. (1981) *Photochem. Photobiol.* 34, 679-681]。

照射後的光敏物質的標定傳送在治療新生血管疾病上係一引人的途徑，參照 [Yarmush, M. L. et al. *Antibody targeted photolysis. Crit. Therap. Drug Carrier System* 10, 197-252 (1993); Rowe, P. M. *Lancet* 351, 1496 (1998); Levy, J. *Trends Biotechnol.* 13, 14-18 (1995)]，特別是選擇性摘除眼睛新生血管。可利用的治療模式，例如雷射光凝結，不是直接就是在給予光敏藥劑之後，受限於選擇性而典型的導致健康的組織及血管受傷害，參見 [Macular Photocoagulation Study Group, *Arch. Ophthalmol.* 122, 480-488 (1994); Haimovici, R. et al.,

Curr. Eye Res. 16, 83-90 (1997); Schmidt0Erfurth, U. et al.; Graef's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 236, 365-374 (1998)]。

基於上述爭議可知，發現光敏物質的選擇性及特定性是非常重要的，例如，將其結合至適當的載體分子。研發品質佳的載體分子並非簡單任務。甚至，不是所有的光敏分子都可以作為活體的媒介進入關鍵的位址。例如光敏物質的化學結構、溶解性、親脂性、黏著性及藥效等因子都可能關鍵性地影響光敏物質結合物的可標定性及功效。

我們在此證明高親和力的 L19 抗體，特別是對纖維網蛋白的 ED-B 結構域，經系統化地投藥，可在兔子的眼睛新生血管中，可選擇性定位該新形成的血管。L19 抗體，經化學結合至光敏劑 tin (IV) chloride 並以紅光照射，可選擇性阻塞眼睛新生血管，並促進對應內皮細胞的凋亡。這些結果證實了新生眼睛血管可於體內與原先存在的血管免疫化學性地被分別出來，並強烈建議照射後光敏物質的標定可有效治療結合性眼睛疾病及其他與之有關的可能疾病。

綜上所述，本發明實施例確能達到所預期之使用功效，又其所揭露之具體構造，不僅未曾見諸於同類產品中，亦未曾公開於申請前，誠已完全符合專利法之規定與要求，爰依法提出發明專利之申請，懇請惠予審查，並賜准專利，則實感德便。

### 【圖式簡單說明】

下列圖式係用以說明本發明之實施例：

第 1 圖顯示設計之抗體噬菌體基因庫；

第 2 圖顯示人類黑色素瘤 COLO-38 細胞溶解液之二維膠片及西方墨點；

第 3 圖顯示膠質母細胞瘤 multiforme 之免疫組織化學實驗；

第 4 圖顯示抗體 ED-B 複合物之穩定性分析；

第 5 圖顯示患有腫瘤之小鼠在注射放射性同位素標示之抗體斷片後於體內之分布；

第 6 圖顯示 L19 之胺基酸序列；

第 7 圖顯示植入小球體的兔子眼睛；

第 8 圖顯示兔子角膜切片之免疫組織化學分析；

第 9 圖顯示兔子眼睛結構切片（角膜、虹膜、結膜），其使用紅色鹼性磷酸酵素基質及蘇木紫染色；

第 10 圖顯示以螢光染劑標示之抗體於眼睛新生血管中；

第 11 圖顯示肉眼觀察注射蛋白質及光敏物質的兔子眼睛於照射前後之情形；

第 12 圖顯示注射蛋白質及光敏物質的兔子於紅光照射後，以顯微鏡分析兔子眼睛結構切片。

### 圖式詳細說明

第 1 圖顯示設計之抗體噬菌體基因庫。(a) 抗體片段被表現於噬菌體上之 pIII 融合如圖所示。在抗體的結合位址（以抗原的視角），Vk CDRs 脊骨是黃色，VH CDR 脊骨是藍色。隨機突變之殘餘物在 Vk CDR3 之 91、93、94 及 96 位置（黃色），在 VH CDR3 之 95、96、97 及 98 位置（藍色）。這些支鏈的鈷（Cb）原子以較暗顏色表示。另外，灰色部分為 CDR1 與 CDR2 之殘留，其可經由突變增加抗體親和力。利用 RasMol 程式（<http://www.chemistry.ucsc.edu/wipke/teaching/rasmol.html>）由 pdb 檔案建立 scFv 結構模型（Brookhaven Protein Data Bank; <http://www2.ebi.ac.uk/pcserv/pdbdb.htm>）。(b) PCR 放大及基因庫

複製策略。將 DP47 及 DPK22 (見原文) 之種株模板修改, 以使 CDRs 區域產生突變。基因以矩形表示, CDRs 則如矩形中的編號盒子。VH 及 VL 片段在 pDN332 噬菌質體 (phagemid) 的媒介中被組合及繁殖。用以放大及組合的引子列示於底部。

第 2 圖顯示二維膠片及西式墨點。(a) 人類黑色素瘤 COLO-38 細胞株之溶解液之銀染二維膠片, 其中加入重組的 ED-B-containing 7B89。此二 7B89 的點 (圈) 是由於蛋白質純化時利用 His-tag 之局部蛋白水解而來。(b) 免疫點墨膠片, 如同第 2a 圖所示者, 以抗 ED-B E1 (表一) 及 M2 抗 FLAG 抗體作為偵測劑。只有 7B89 的點被偵測到, 確認由膠片點分離之重組抗體之專一性。

第 3 圖顯示在多型性膠質母細胞瘤的連續切片上進行免疫組織化學分析, 以 scFvs E1 (A)、A2 (B) 及 G4 (C) 染色, 顯示出典型類腎小球之血管組織。比例尺: 20 微米。

第 4 圖顯示抗體-ED-B 複合物的穩定度。分析纖維網蛋白之 ED-B 結構域與 scFvs E1、H10 及 L19 之結合。(a) 生物感測儀感測圖 (BIAcore sensorgrams), 顯示由抗體之親和力成熟而改善解離分布。(b) 以電泳膠片分析 scFvs (ED-B) 複合物。只有具高親合力之 L19 抗體能與以螢光標示之抗原形成穩定的複合物。螢光偵測的方法參見 (Neri et al. (1996). *BioTechniques*, 20, 708-712)。

(c) scFv-(ED-B-biotin) 複合物與超過 100 倍莫耳之非生物素 (unbiotinylated) 之 ED-B 作競爭力測試, 以電化發光法來監測 (Origen apparatus)。可看到 L19-(ED-B) 複合物之半衰期相當長。黑色方塊: L19; 中空三角形: H10。

第 5 圖顯示注射放射性同位素標示之抗體斷片, 患有腫瘤小鼠之體內分布。

腫瘤及血液的體內分布, 以每克注射劑量的百分比表示, 對時間作圖。相關器官的體內分布也同時被報告。

第 6 圖顯示抗體 L19 之胺基酸序列, 包括重鏈 (VH), 連結物, 輕鏈 (VL)。

第 7 圖顯示在兔子眼睛植入浸泡過血管新生物質之聚合物小球體。

第 8 圖顯示兔子角膜新生血管切片以 L19 抗體作免疫組織染色。

第 9 圖顯示兔子眼睛結構以 L19 抗體染色之免疫組織分析。可見在角膜 (a) 之新生血管周圍特有的紅色，但虹膜 (b) 及結膜 (c) 周圍血管則無。小箭頭：角膜表面細胞；大箭頭：相關之血管。比例尺：50 微米。

第 10 圖顯示以螢光標示之抗體針對眼睛血管新生之免疫光學偵測。可觀察到在注射抗體連結物質 L19-Cy5 (a) 之兔子，角膜新生血管 (以箭頭標示) 有很強的螢光反應，特別是纖維網蛋白之 ED-B 結構域，但對抗體 HyHEL-10-Cy5 (b) 則否。角膜切片之免疫螢光顯微術更進一步確認 L19-Cy5 (c)，而非 HyHEL-10-Cy5 (d) 於角膜新生血管周圍定位。照片 (a、b) 約在抗體注射後 8 小時後，(c、d) 則是在抗體注射後 24 小時取出眼角膜所拍攝得。P：小球體。

第 11 圖顯示兔子以光敏複合物處理後，肉眼可見之眼睛影像。經注射 L19-PS 之兔子眼睛，照射前 (a) 及以紅光照射 16 小時後 (b)。箭頭指出凝結的新生血管，放射源照射 16 小時後，在 Cy5 螢光血管造影照片中，確認為低螢光感應區 (c)。吾人亦注意到此種結合在其他組織之血管未能觀測到，例如結膜血管。為了比較，用高螢光感應的有漏洞血管之 Cy5 螢光血管造影照片，及與之對應的未處理過之兔子眼睛彩色照片，顯示於 (d) 及 (h)。照片 (e、f、g) 類似 (a、b、c)，不過對應於注射兔子的是 ovalbumin-PS 及照射紅光。未發現凝集現象，血管造影照片顯示有漏洞血管之高螢光性。早期血管新生及以 L19-PS 注射之兔子眼睛圖示於 (i-1)。照片 (i) 為以紅光照射前及照片 (j) 為照射後 16 小時，表現出延伸性及選擇性的光誘導血管凝固物 (箭號)。在兔子安樂死後，被照射過的眼睛 (l) 立即產生血管阻塞是特別的證據，但同一兔子未被照射的眼睛 (k) 則無此現象。P：小球體。箭頭指出角膜-鞏膜交會處 (外緣)。在所有圖中，擴張的結膜血管可在邊緣上方觀察到，然而角膜血管新生則可由邊緣至小球體觀察到。

第 12 圖顯示選擇性血管阻塞之顯微分析。注射 ovalbumin-PS (a、e、i) 或 L19-PS (b、f、j)，並以放射線照射的兔子角膜的 H/E 染色切片 (a、e、b、f：未固定；i、j：以聚甲醛固定)。大箭號指出具代表性未受損 (e、i) 或完全阻塞 (f、j) 之血管。不同於以放射線照射後以 L19-PS 為媒介，角膜血管新生之選擇性阻塞及有限的周邊血管損壞 (嗜酸性) (b、f、j)，在同一隻兔子的結膜 (k) 及虹膜 (l) 都沒有顯示任何損傷。以螢光 TUNEL 試劑分析注射 L19-PS (c、g) 或 ovalbumin-PS (d、h) 受放射線照射之兔子，其切片顯示出不同數量的凋亡細胞。大箭頭指得是相關之血管組織。小箭頭指得是角膜表皮細胞。比例尺：100 微米 (a-d)；25 微米 (e-l)

下列實施例可更清楚的闡釋本發明。

### 實施例 1

#### 由噬菌體抗體基因庫分離出對纖維網蛋白之 ED-B 結構域具特定性之人類 scFv 抗體片段

利用 VH (DP47; Tomlinson et al. (1992). *J. Mol. Biol.*, 227, 776-798) 及 VL (DPK22; Cox et al. (1994). *Eur. J. Immunol.*, 24, 827-836) 種株基因 (見第 1 圖關於複製及放大策略) 複製人類抗體。使用部分變性的引子 (第 1 圖) 於 PCR 方法引領在 CDR3 上位置 95-98 之隨機突變以產生基因庫的 VH 成份。基因庫的 VH 成份也是以相同的狀況產生，係藉由引領在 CDR3 上的位置 91、93、94 和 96 之隨機突變。PCR 反應參見 (Marks et al. (1991). *J. Mol. Biol.*, 222, 581-597)。VH-VL scFv 片段是由膠片純化之 VH 及 VL 片段，以 PCR 組合成 (第 1 圖; Clackson et al. (1991). *Nature*, 352, 624-628)。以 300 單位之 NcoI 及 300 單位之 NotI 消化 30 $\mu$ g 的純化 VH-VL scFv 片段，然後連結 15 $\mu$ g 的 NcoI/NotI 消化 pDN332 噬菌質體載體。pDN332 為噬菌質體

pHEN1 之衍生物 (Hoogenboom et al. (1991). Nucl Acids Res, 19, 4133-4137), 其中 NotI 位址與基因 III 前的琥珀型密碼子之間的序列被以下序列所取代, D3SD3-FLAG-His6 標記之密碼(Neri et al. (1996). Nature Biotechnology, 14, 385-390):

NotI            D   D   D   S   D   D   D

Y   K   D   D

5'-GCG GCC GCA GAT GAC GAT TCC GAC GAT GAC TAC AAG GAC GAC

D   D   K   H   H   H   H   H   H   amber

GAC GAC AAG CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAG-3'

轉化為 TG1 大腸桿菌菌株之方法參見 (Marks et al. 1991. J. Mol. Biol., 222, 581-597), 而噬菌體的製備係根據標準步驟 (Nissim et al. (1994). EMBO J. 13, 692-698)。隨機選擇五個複製體並定序以檢查是否有普遍的污染。

重組纖維網蛋白片段 ED-B 及 7B89, 分別包括一個及四個第三型的同源複製品, 係由 pQE12 基表現載體 (Qiagen, Chatsworth, CA, U.S.A. ) 表現出 (Carnemolla et al. (1996). Int j Cancer, 68, 397-405)。

重組纖維網蛋白 ED-B 結構域之選擇, 參見 (Carnemolla et al. (1996). Int j Cancer, 68, 397-405) (Zardi et al. (1987). EMBO J., 6, 2337-2342), 是在 10nM 濃度進行, 以 biotin disulfide N-hydroxysuccinimide ester 接合之生物素抗原(試劑 B-4531; Sigma, Buchs, Swizerland; 10) 由二維膠片中溶離出, 及披覆磁珠

(Dynabeads) 之抗生蛋白鏈菌素 (streptavidin) 捕捉 (Dyna1, Oslo, Norway)。在 1 毫升反應中，每次淘選使用 1013 個噬菌體。噬菌體與抗原在 2% 的牛奶/PBS (MPBS) 中培養 10 分鐘。將 100 $\mu$ l 預先凍結的磁珠 (10mg/ml; Dynal, Oslo, Norway) 加入 MPBS 溶液中。攪拌 5 分鐘後，磁珠藉磁力由溶液中分離，並以 PBS-0.1% Tween-20 (PBST) 沖洗 7 次，以 PBS 沖洗 3 次。沖提液以 500 $\mu$ l, 50nM 的雙硫蘇醣醇 (dithiothreitol, DTT) 培養 2 分鐘，來還原抗原與生物素間之雙硫鍵。磁珠再度被捕捉，而此溶液用來感染呈指數生長的 TG1 大腸桿菌。經過三次淘選，沖提出的噬菌體被用於影響 HB2151 大腸桿菌呈指數生長，並固定在 1.5% 洋菜培養基 (2 倍 TY+1% 葡萄糖+100 $\mu$ g/ml 胺青黴素)。單一殖株在 2 倍 TY+1% 葡萄糖+100 $\mu$ g/ml 胺青黴素環境下生長，並以 1 毫莫耳 IPTG、30 $^{\circ}$ C、作用一個晚上，誘導抗體表現。取其上浮液藉由酵素免疫分析法以表面塗有抗生蛋白鏈菌素的微滴定盤及 10 毫微莫耳 biotinylated-ED-B 篩選，並以抗 FLAG M2 抗體作為偵測試劑 (IBI Kodak, New haven, CT)。有 32% 篩選出的殖株為陽性反應，其中三個有很強的酵素免疫訊號 (E1, A2, G4) 被加以定序及更進一步特性化。

執行酵素免疫分析試驗利用從膠片點發現的生物素 ED-B，此蛋白未被變性，將其連結到鄰近纖維網蛋白結構域 (重組蛋白含 7B89 結構域)，及許多不相關之抗原。抗體 E1, A2, G4 及含 ED-B 之蛋白質的反應很強烈且特定。此一現象，連同這三個重組抗體可利用 ED-B 親和力管柱由細菌上浮液來純化的事實，強烈建議他們可辯認一個位於 ED-B 原生構造之抗體表位。不含 ED-B 結構域之纖維網蛋白片段未被偵測出任何反應 (數據未顯示)。

為了測試由膠片點分離的抗體是否與原生抗原有很好的親和力，

以 BIAcore 上的表面電漿共振進行即時交互作用分析，參見 (Neri et al. (1997). *Nature biotechnol.*, 15, 1271-1275)。E1、A2 及 G4 scFv 片段的單體部分與 ED-B 以 107-108 M<sup>-1</sup> 範圍的親和力內連結 (表 1)。

再進一步測試抗體的特异性及實用性，二維膠電泳 (2D-PAGE) 免疫點墨法於人類黑色素瘤細胞株 COLO-38 之溶胞液膠片上進行，再加入少量含重組 7B89 蛋白質的 ED-B (第 2 圖)。scFv (E1) 強烈且特定地將 7B89 點染色。

抗體 E1、A2 及 G4 將多重型膠質母細胞瘤之冷凍切片中含有纖維網蛋白的 ED-B 免疫局限化，其為一侵入性的腦瘤併有相當明顯的血管新生。多重型膠質母細胞瘤檢體在手術後取出，並立即冷凍在液態氮中 (Carnemolla et al. (1996). *Int. J. Cancer*, 68, 397-405; Castellani et al. (1994). *Int. J. Cancer* 59, 612-618)。簡言之，免疫染色係使用 M2-抗-FLAG 抗體 (IBI Kodak)、生物素抗小鼠多株抗體 (Sigma)、抗生蛋白鏈菌素-生物素鹼性磷酸酶複合物染色組 (BioSpa, Milan, Italy)、naphtol-AS-MX-phosphate 及 fast-red TR (SIGMA)。Grill's 蘇木紫用來作對比染色，接著以甘油膠 (Dako, Carpenteria, CA) 覆蓋封片 (Castellani et al. (1994). *Int. J. Cancer*, 59, 612-618)。

利用類似的技術及抗體 L19 (見下一實施例)，吾人亦可將新生血管作特定染色，新生血管係以移植到兔子角膜的聚合物小球體誘發產生，該小球體先浸泡於血管新生物質，如血管內皮生長素或佛波酯 (phorbol ester)。

## 實施例 2

### 分離以次毫微莫耳親和力結合至 ED-B 之人類 scFv 抗體片段

ScFv(E1)被選擇來測試以 CDR 殘餘物之有限數量突變改善其親和

力之可能性，CDR 殘餘物位於抗原結合位址周邊（第 1a 圖）。吾人同時將抗體 VH 之殘餘物 31-33，50，52 及 54 作突變，並於噬菌體絲上表現相對應的整體。這些殘餘物頻繁地與抗原在已知的抗原-抗體複合物之三維結構中接觸。整套  $4 \times 10^8$  個複製體被選取用於與纖維網蛋白之 ED-B 結構域結合。經過兩次淘選，96 個個別複製體被篩選出，一個達 27 倍親和力的抗體被分離出來（H10；表 1 及 2）。類似的情形在其他親和力成熟的抗體亦可觀察到，親和力的增進是由於與抗原的離解力變慢而非  $k_{on}$  值之增加（Schier et al. (1996). *Gene*, 169, 147-155；Ito, (1995). *J. Mol. Biol.*, 248, 729-732）。抗體的輕鏈常被認為對鍵結親和力較無貢獻，如下列二事實所證明，不論是在天然或人工合成之抗體，即使沒有輕鏈仍可與抗原結合（Ward et al. (1989). *Nature*, 341, 544-546；Hamers Casterman et al. (1993). *Nature*, 363, 446-448）。因此我們隨機選擇 VL 結構域的兩個殘餘物（32、50）與抗原接觸，殘餘物（32、50）位於抗原結合位址的中央（第 1a 圖），且通常在三維結構中被發現。此包括 400 個複製體的基因庫被表現於噬菌體及選來連結抗原。從解離分布分析及  $k_{off}$  量測鑑定出殖株（L19），並以  $K_d = 54 \text{pM}$  結合至纖維網蛋白之 ED-B 結構域（表 1 及 2）；其中解離分布分析使用 BIAcore 設備進行即時反應（Jonsson et al. (1991). *BioTechniques*, 11, 620-627）， $k_{off}$  量測使用電化發光偵測之競爭試驗。親和力成熟度實驗方法如下：scFv(E1) 基因以引子 LMB1bis (5'-GCC GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG-3') 和 DP47CDR1for (5'-GA GCC TGG CGG ACC CAG CTC ATM NNM NNM NNGCTA AAG GTG AAT CCA GAG GCT G-3') 進行 PCR 放大，以引發 VH 之 CDR1 中位置 31 至 33 的隨機突變，另以引子 DP47CDR1back (5'-ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CC-3') 和 DP47CDR2for (5'-GTC TGC GTA GTA TGT GGT ACC MNN ACT ACC

MNN AAT MNN TAG GAC CCA CTC CAG CCC CTT-3') 進行 PCR 放大，以引發 VH 之 CDR2 中位置 50、52、54 的隨機突變。ScFv 基因剩餘片段蓋過 VH 基因、連結器及 VL 基因的 3' 段，並以引子 DP47CDR2back (5'-ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG-3') 及 JforNot (5'-TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC TTG GCC GAA CG-3') 來放大 (94°C, 1 分鐘; 60°C, 1 分鐘; 72°C, 1 分鐘)。這三個 PCR 產物以膠片純化，並以引子 LMB1bis 及 JforNot 作 PCR (21) 聚合 (94°C, 1 分鐘; 60°C, 1 分鐘; 72°C, 1 分鐘)。由 PCR 混合純化出單一 PCR 產物，以 Not1/Nco1 消化並嵌入 Not1/Nco1 消化之 pDN332 載體。大約 9 $\mu$ g 載體及 3 $\mu$ g 的插入基因被用在嵌合反應之混合物，藉由酚鹽及酒精沉澱將其純化，再使之懸浮於 50 $\mu$ l 無菌水，並於 TG1 大腸桿菌細胞電子元件中電穿孔 (electroporate)。親和力成熟的基因庫包括  $4 \times 10^8$  個複製體。噬菌體抗體粒子之製造參見 (Nissim et al. (1994). EMBO J., 13, 692- 698)，被用在表面塗覆 7B89 之免疫管，進行第一次篩選 (Carnemolla et al. (1996). Int. J. Cancer, 68, 397-405)。選定的噬菌體用於生物素 ED-B 之第二次淘選，接著以抗生蛋白鏈菌素塗抹之磁珠來捕捉 (Dynal, Oslo, Norway; 見前段敘述)。經選擇後，約 25% 的複製體在可溶性酵素免疫檢驗試劑呈陽性 (關於實驗步驟見前面章節)。從酵素免疫分析中呈陽性之候選者，我們更進一步以 BIAcore 辨認出具最低 koff 之抗體 (H10; 表 1) (Jonsson et al. (1991). Bio Techniques, 11, 620-627)。

基因 scFv(H10) 以引子 LMB1bis 及 DPKCDR1for (5'-G TTT CTG CTG GTA CCA GGC TAA MNN GCT GCT GCT AAC ACT CTG ACT G) 進行 PCR 放大，誘導 VL 之 CDR1 上位置 32 的隨機突變 (編號參見 Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196, 901-917)，同時以引子 DPKCDR1back

(5'-TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CC-5') 及 DPKCDR2for (5'-GCC AGT GGC CCT GCT GGA TGC MNN ATA GAT GAG GAG CCT GGG AGC C-3') 引導 VL 之 CDR2 上位置 50 的隨機突變。ScFv 基因餘下部分以寡核苷酸 DPKCDR2back (5'-GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC-3') 及 JforNot 放大 (94°C, 1 分鐘; 60°C, 1 分鐘; 72°C, 1 分鐘)。這三個產物將被組合消化及複製到 pDN332 中, 用在重鏈的突變發展。基因庫在 3%BSA 中與生物素 ED-B 培養 30 分鐘, 接著以塗覆有抗生蛋白鏈菌素之微滴定盤捕捉 10 分鐘。噬菌體以 20mM 的 DTT 溶液沖提, 並用於呈指數生長的 TG1 大腸桿菌。

藉由酵素免疫染色及 BIAcore 分析 ED-B 上浮液中 96 個複製體鑑定出複製體 L19。抗 ED-B 之 E1、A2、G4、H10 及 L19 之 scFv 抗體片段選擇性地染色於侵犯型腫瘤切片之新生血管 (第 3 圖)。

上述之抗 ED-B 抗體片段接著在 1 公升的 2x TY 培養基中植入一個單一新鮮菌落, 方法參見 (Pini et al. (1997). *J. Immunol. Meth.*, 206, 171-182), 片段並於 CNBr 活化的瓊脂糖凝膠 (sepharose) 管柱 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 上進行親和力純化, 該片段已先連結至 10mg 含 7B89 重組蛋白之 ED-B (Carnemolla et al. (1996). *Int. J. Cancer*, 68, 397-405)。滴入樣本後, 以 50 毫升平衡緩衝液沖洗管柱 (PBS, 1mM EDTA, 0.5M NaCl)。抗體片段接著以 100 毫莫耳的三乙胺溶離出, 並立刻以 1 毫莫耳 HEPES, pH=7 中和, 並在 PBS 中透析。BIAcore 親和力測試係以純化的抗體進行, 如前述 (Neri et al. (1997). *Nature Biotechnol.*, 15, 1271-1275) (第 4 圖)。用螢光劑標示重組 ED-B 之 N 端 (Carnemolla et al. (1996). *Int j Cancer*, 68, 397-405; Neri et al. (1997). *Nat Biotechnol.*, 15, 1271-1275) 及紅外線螢光 Cy5 (Amersham) 進行 Band-shift 分析 (Neri et al. (1996). *Nature*

管柱，接著計量流動及沖提液的放射活性。裸鼠（12週大，瑞士裸鼠，雄性）於皮下移植鼠科 F9 畸胎癌（Neri et al. (1997). Nat Biotechnol., 15, 1271-1275），將含 3 $\mu$ g（3-4 微居里）scFv 之 100 $\mu$ l 鹽水注射於此裸鼠。腫瘤大小約 50-250mg，因腫瘤太大其中心會壞死。然而標的試驗進行於較大腫瘤（300-600mg）所得結果相同。每一個時間點使用三隻動物。小鼠以人道的方式死亡，將器官稱重並計量放射活性。器官標的結果是以每一公克組織之抗體注射劑量之百分比來表示（%注射計量/公克）。scFv（L19）迅速經血液由腎臟排出，不同於傳統的抗體它不會累積於肝臟或其他器官。注射 3 小時後，每克腫瘤組織約 8%的劑量，接下來的數值下降是因為腫瘤在 24-48 小時內增加了 2 倍。腫瘤：血液比值在注射 L19 後 3、5 及 24 小時分別為 1.9、3.9 及 11.8，但陰性對照抗體皆小於 1.0。

同位素標示 scFv（L19）在注射後數小時優先選擇集中於腫瘤處，因此建議可用在偵測病人血管新生之免疫閃爍造影。

#### 實施例 4

##### 抗 ED-B 抗體選擇性染色新形成眼睛血管

由先前存在的血管形成的新生血管，係一潛藏許多疾病的特殊過程，包括癌症及大部分導致失明的眼睛疾病。選擇性標定及阻塞新血管將有利於診斷及治療。

我們研究 B-FN 是否為眼睛新生血管的特定標記，及經由系統化投藥，以抗體辨識 B-FN 是否可選擇性地活體（in vivo）標定眼睛新生血管結構。為達此目的，我們刺激兔子的角膜生長新血管，並可直接觀察新的血管，由手術植入含有血管內皮細胞生長因子或巴豆醇酯的球體（第 7 圖）。硫化雙糖的鋁鹽（sucrafate；Merck, Darmstadt, Germany）/含有 800ng 血管內皮細胞生長因子（Sigma）或 400ng 巴豆

醇 12-肉荳蔻脂 13-醋酸酯 (“PMA”, Sigma) 的循環加熱球體被植入紐西蘭白雌兔的角膜，過程參照[D’Amato, R. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4082-4085 (1994)]。以兩種因子引發新生血管，並每日監測兔子。由兩種因子形成的新血管在免疫組織化學 (immunohistochemical) 中為強 ED-B-陽性。在所有進一步的實驗中皆使用 PMA 球體。免疫組織化學研究顯示 L19 強烈染色兔子角膜中的新生血管 (第 8 及 9a 圖)，而非原先存在的眼睛血管 (第 9b 及 c 圖)，或其他組織 (未顯示資料)。免疫組織化學之實施參照[Carnemolla, B. et al., Int. J. Cancer 68, 397-405 (1996)]所述。

#### 實施例 5

#### 人類抗體片段 L19，結合至具有次毫微莫耳親和力之 ED-B，活體標定眼睛新生血管

使用前一實施例所述之兔子角膜模式，及一免疫光偵測 (Immunophotodetection) 方法[Neri, D. et al., Nature Biotechnol. 15, 1271-111275 (1997)]，我們證實了 L19 可藉由靜脈注射選擇性地標定眼睛新生血管，L19 化學性地結合至紅色螢光 Cy5，而非抗體片段(HyHEL-10)-Cy5 不相關的抗原 (第 10a 及 b 圖)。生長的眼睛血管的螢光染色可於注射 L19 後，立即清晰地被偵測，並保存至少兩天，類似先前新生血管的腫瘤觀察。後續以體外 (ex vivo) 免疫螢光顯微鏡分析角膜切片確認 L19 的位置，而非血管結構周圍的 HyHEL-10 (第 10c 及 d 圖)。根據抗體選擇性標定眼睛新生血管的證明，及抗 B-FN 抗體於不同物種的反應性，可確保未來的臨床研究。在以螢光血管攝影 (fluoroangiography) 發現傷害變明顯之前，免疫螢光影像有利於早期偵測風險型病患的眼睛新生血管。

部分方法之詳細說明：

對於體外免疫螢光及某些 H/E 染色，角膜在包埋前被固定於 4% 聚甲醛 (in PBS) 中。接受螢光偵測實驗的兔子被投予鎮靜劑 Acepromazin (5mg/kg)。對於標定實驗，將 3.5mg 的 scFv (L19)<sub>1</sub>-Cy5<sub>0.66</sub> 及 2.8g 的 scFv(HyHEL-10)<sub>1</sub>-Cy5<sub>0.83</sub> 以靜脈注射至每一隻兔子 (注射時間 15 分鐘)。角膜中心血管之強螢光可於注射 L19 後立即觀察到，而非 HyHEL-10，並保留數小時。作為額外的特殊試驗，前一天注射 scFv(HyHEL-10)-Cy5 並於螢光偵測中呈陰性的兔子，於第二天注射 scFv(L19)-Cy5，並在角膜新生血管中顯示出強烈螢光染色。

對於螢光偵測，係以裝設有 Cy5-激發濾光片 (Chroma, Brattleboro, VT, U.S.A.) 之鎢絲鹵素燈 (model schott KL 1500; Zeiss, Jena, Germany) 來照射眼睛，燈具有二光導引裝置，其端點距眼睛約 2 公分。螢光之偵測係使用冷卻式 C-5985 單色 CCD 相機 (Hamamatsu, Hamamatsu-City, Japan)，其裝設有 C-mount Canon Zoom Lens (V6x16; 16-100mm; 1:19) 及 50mm 直徑的 Cy5 發射濾光片 (Chroma)，並距離被照射的眼睛 3~4 公分。收集時間 (Acquisition time) 為 0.4 秒。

Cy5 螢光血管攝影實驗係使用相同的實驗裝置，但靜脈注射 0.25mg Cy5-Tris (Cy5-NHS 與 tris[hydroxymethyl]aminomethane 之中間產物，注射時間 5 秒)。收集時間為 0.2 秒。

抗體片段為 scFv 形式。ScFv(L19) 及 scFv(HyHEL-10) 的純化，及其以花青染料的 N-hydroxysuccinimide (NHS) 酯類標定過程，可參照 [Neri, D. et al., Nature Biotechnol. 15, 1271-1275 (1997); R., et al. (1999) Structure, 7, 381-390]。抗體：Cy5 於兩種抗體的標記比例分別為 1.5:1 及 1.2:1。Cy5-NHS 係購自 Amercham Pharmacia Biotach (Zurich, Switzerland)，卵蛋白素 (ovalbumin) 係購自 Sigma (Buchs, Switzerland)。

於標記反應後，藉使用與 50mM 磷酸，pH 7.4，100mM NaCl (PBS) 達平衡之 MPD-10 管柱 (AmershamPharmacia Biotech)，抗體結合物由未被結合的紅色螢光或光敏物質中被分離。抗體結合物的免疫反應性係以抗原管柱 [Neri, D. et al., Nature Biotechnol. 15, 1271-1275 (1997)] 之親和力色層分析來監測，結果皆大於 78%。免疫結合物係以十二硫酸鹽聚丙稀醃凝膠電泳法分析，並以 MW=30'000 Dalton (purity<sup>3</sup> 90%) 之區帶位移。

### 實施例 6

人類抗體片段 L19，化學結合至光敏物質 Sn (IV) chlorine e6，選擇性地標定眼睛新生血管，並以照射紅光來傳達其阻塞現象

為測試選定血管之摘除是否可藉由抗體-媒介標定完成，我們讓兔子注射 L19 抗體片段或不相關的蛋白質，其位置不限於光敏物質 tin (IV) chlorine e6 (以下稱 PS) 連結的新生血管 (卵蛋白素)。被注射的動物以紅光 (light dose = 78 J/cm<sup>2</sup>) 照射眼睛。代表性的結果如第 11 圖所示。於 16 小時照射後，一肉眼可見明顯的差異，在以 L19-PS 處理的兔子上被觀察到，其具有角膜新生血管的凝結，而非結膜或其他眼睛結構的血管。具有 indocyanine fluorophore Cy5 (第 11c 圖) 的螢光血管攝影確認了血管阻塞為特殊的低螢光區。相反地，在未照射而無新生血管形成的眼睛中則觀察到高螢光區 (第 11d 及 h 圖)。以肉眼觀察經 ovalbumin-PS 處理的兔子的照射血管，無論使用檢眼器或 Cy5 螢光血管攝影，結果皆無變化 (第 11e 至 g 圖)。在早期的角膜新生血管中，照射被標定的 L19-PS 結合物的效果如第 11i 至 l 圖所示。選擇性地凝結血管在活體動物上肉眼可見 (第 11i 及 j 圖)，甚且於動物安樂死後亦立即清楚可見 (第 11k 及 l 圖)。

以顯微技術進一步研究光動力 (photodynamic) 傷害。照射後，

血管阻塞可藉由標準蘇木紫/曙紅(standard hematoxylin/eosin; H/E) 染色技術來偵測非固定及以聚甲醛固定的角膜切片，其係以 L19-PS 處理的動物(第 11b、f 及 j 圖)，而非以 ovalbumin-PS 處理(第 11a、e 及 i 圖)。以感光結合物標定的角膜細胞凋亡(apoptosis)於螢光染色(TUNEL assay)中清晰可見(第 11c 及 g 圖)，但在陰性控制組中幾乎偵測不到(第 11d 及 h 圖)。血管中內皮細胞的凋亡如第 11g 圖所示之放大倍數圖。藉由螢光染色(TUNEL assay)(未圖示之)或 H/E 染色(第 11k 及 l 圖)，可觀察到經處理動物的虹膜、鞏膜及結膜的血管未受損。

對於方便使用光擴散器或纖維光學技術照射之眼睛疾病，及其他與新生血管相關的病理，新生血管的選擇性光動力摘除有利於其治療。本研究的結果清楚證明眼睛新生血管可被選擇性地阻塞，而不傷及原先存在的血管及正常組織。

部分方法之詳細說明：

在連結至兔子的抗鼠多株抗體(Sigma)後，Tin(IV)chlorine e6 以其效力、可溶性及特徵自光敏物質中被選用。這些免疫結合物藉由紅色血液細胞的標定光分解來篩選，紅色血液細胞披覆一單株抗體，為特殊的人類 CD47(#313441; Pharmingen, San Diego CA, U.S.A.)。Tin(IV)chlorine e6 之製備參照[Lu, X.M. et al., J. Immunol. Method 156, 85-99 (1992)]。為連結至蛋白質，tin(IV)chlorine e6 於室溫下於二甲基甲醯胺中，與超過 10 倍莫耳的 EDC (N'-3-dimethylaminopropyl-N-ethylcarbodiimide hydrochloride; Sigma) 及 NHS (N-hydroxysuccinimide; Sigma) 混合。產生的活化混合物再加入到 8 倍體積的蛋白質溶液(1 mg/ml)中，並於室溫下培養 1 小時。

於標定反應後，與 50mM 磷酸，pH 7.4，100mM NaCl (PBS) 達平衡之 PD-10 管柱 (AmershamPharmacia Biotech) 被用於將抗體結合物由未被結合的紅色螢光或光敏物質中分離。抗體結合物的免疫反應性監測如先前實施例所述。

於光殺滅 (photokilling) 實驗中，將兔子靜脈注射 12mg 的 scFv (L19) 1-tin (IV) chlorine e6<sub>0.8</sub> 或 38mg 的 ovalbumin-tin (IV) chlorine e6<sub>0.36</sub>，且實驗期間留置於黑暗中。注射 8 小時後，將兔子以 ketamin (35mg/kg) / xylazine (5 mg/kg) / acepromazin (1 mg/kg) 麻醉，而雙眼之一以 Schott KL1500 的鎢絲鹵素燈照射 13 分鐘，鎢絲鹵素燈裝設有 Cy5 濾光片 (Chroma) 及兩個光導引裝置，其端點距離眼睛約 1 公分。照射區域約為 1cm<sup>2</sup>，照射功率密度為 100 mW/cm<sup>2</sup>，使用 SL818 光偵測器 (Newport Corp., Irvine, CA, U.S.A.) 監測。被照射的動物並無不適跡象。作為預防性措施，照射後的兔子施以止痛劑 (buprenorphine 0.03 mg/kg)。為監測光殺滅效果，檢測眼睛係使用檢眼器及眼底 (fundus) 照相機 KOWA SL-14 (GMP SA, Rennens, Lausanne, Switzerland)。5 隻兔子的每一隻皆以 tin (IV) chlorine e6 結合物處理並照射單眼，另一眼則作為內部陰性控制組。作為額外的控制，只有兩隻被照射兔子未投予感光結合物。

兔子以過劑量麻醉藥麻醉後，立刻將眼睛摘除，去除角膜，再放入組織石臘包埋機 (Tissue Tek, Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) 中並冷凍。對於體外免疫螢光及某些 H/E 染色，角膜在包埋之前以 4% 聚甲醛 (in PBS) 固定。5 $\mu$ m 的冷凍切片 (cryostat section) 則供進一步的顯微分析。螢光染色 (fluorescent TUNEL assay) 之實施係根據製造廠商的指示 (Roche Diagnostic, Rotkreuz, Switzerland)。

表 2:

抗 ED-B scFv 片段之親和力

植株	$K_{on} (s^{-1}M^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})^B$	$k_{off} (s^{-1})^C$	$K_d (M)^*$
A2	$1.5 \times 10^5$	$2.8 \times 10^{-3}$	–	$1.9 \times 10^{-8}$
G4	$4.0 \times 10^4$	$3.5 \times 10^{-3}$	–	$8.7 \times 10^{-8}$
E1	$1.6 \times 10^5$	$6.5 \times 10^{-3}$	–	$4.1 \times 10^{-8}$
H10	$6.7 \times 10^4$	$5.6 \times 10^{-4}$	$9.9 \times 10^{-5}$	$1.5 \times 10^{-9}$
L19	$1.1 \times 10^5$	$9.6 \times 10^{-5}$	$6.0 \times 10^{-4}$	$5.4 \times 10^{-11}$

\*)  $K_d = k_{off} / k_{on}$ 。對於高親和力之結合物 H10 及 L19，因負電荷的羧酸化固態右旋糖基質 (negatively-charged carboxylated solid dextran matrix) 的影響，由 BIAcore 實驗所得之  $k_{off}$  值不足信賴；因此由競爭實驗 (見實驗程序) 所檢測之  $k_{off}$  來計算  $K_d$ 。 $k_{off}$  為動力解離常數； $k_{on}$  為動力結合常數； $K_d$  為解離常數。<sup>B</sup> 係由 BIAcore 測得；<sup>C</sup> 係與電化發光偵測競爭而測得。根據濃度測定值的精密度，數值準確度為  $\pm 50\%$ 。

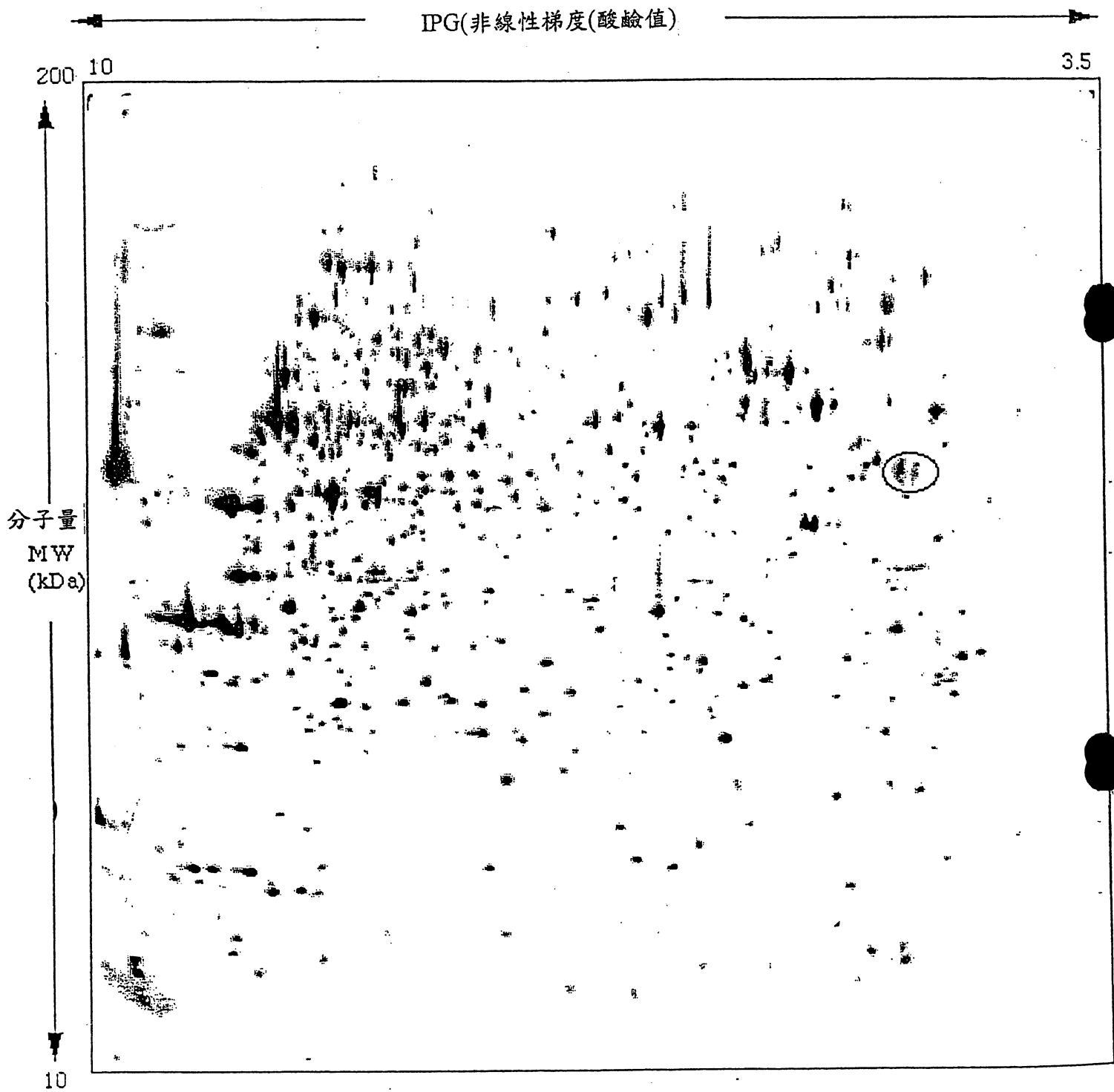
### 伍、中文發明摘要：

本發明係關於包含用於閃爍造影術之特定結合分子且其可應用於治療新生血管病變的組合物，其中含抗體特別對纖維網蛋白 (fibronectin) 之 ED-B 結構域 (domain) 之特殊抗原表位具有次毫微莫耳級 (sub-nanomolar) 之親和力，而此纖維網蛋白可作為新生血管之標記。本發明亦關於以放射形同位素高親和力之抗 ED-B 抗體於偵測體內新生血管之用途，及包含上述抗體之診斷裝置。

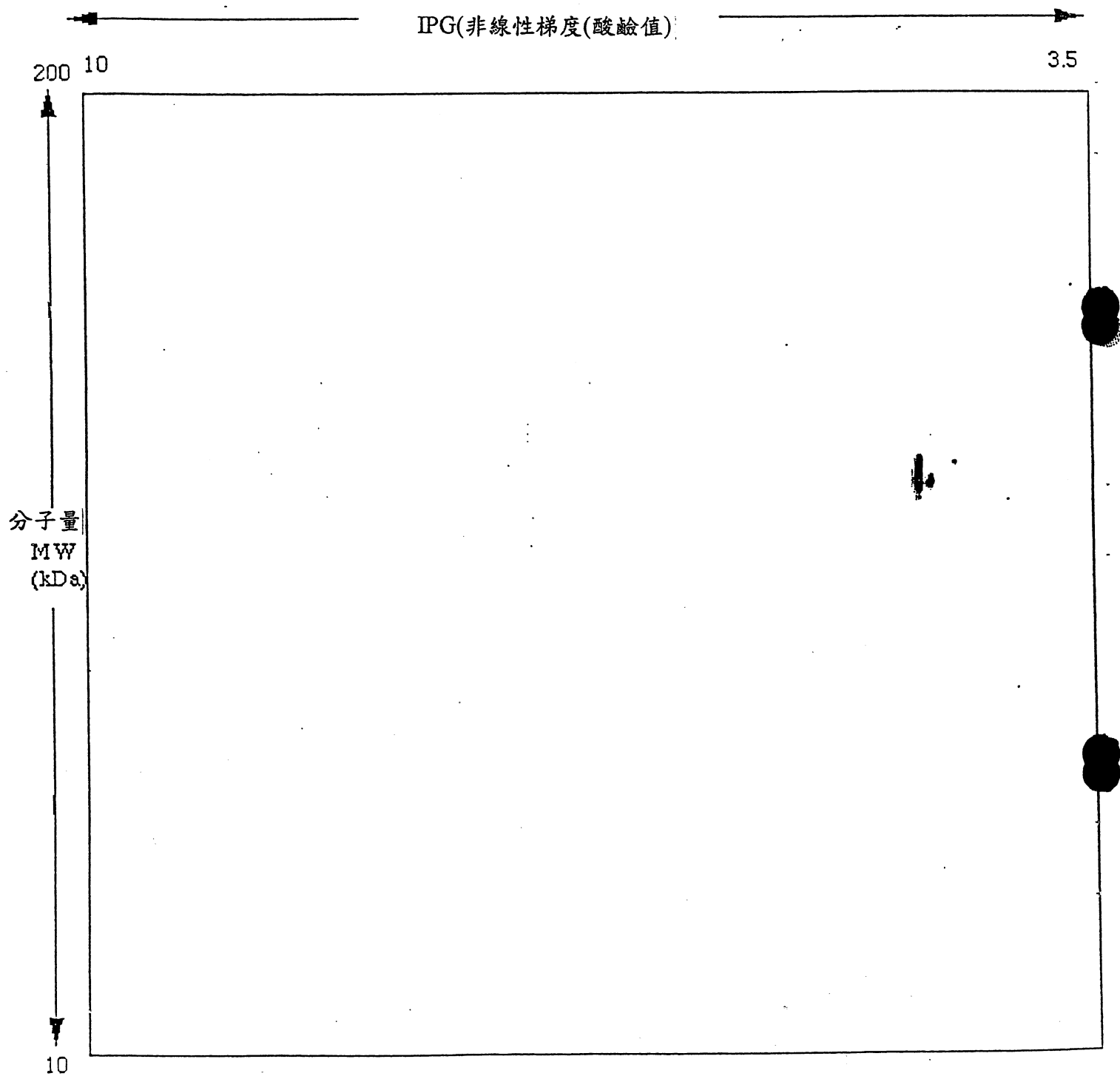
再者，本發明尚關於組合物，其包括上述之抗體及一適當之光活性分子 (例如光敏物質)，及將其使用於新生血管之選擇性光媒介阻塞。

### 陸、英文發明摘要：

The present invention relates to antibodies with sub-nanomolar affinity specific for a characteristic epitope of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis. Furthermore, it relates to the use of radiolabeled high affinity anti ED-B antibodies for detecting new-forming blood vessels in vivo and a diagnostic kit comprising comprising said antibody. Furthermore, it relates to conjugates comprising said antibodies and a suitable photoactive molecules (e.g. a judiciously chosen photosensitizer), and their use for the selective light-mediated occlusion of new blood vessels.

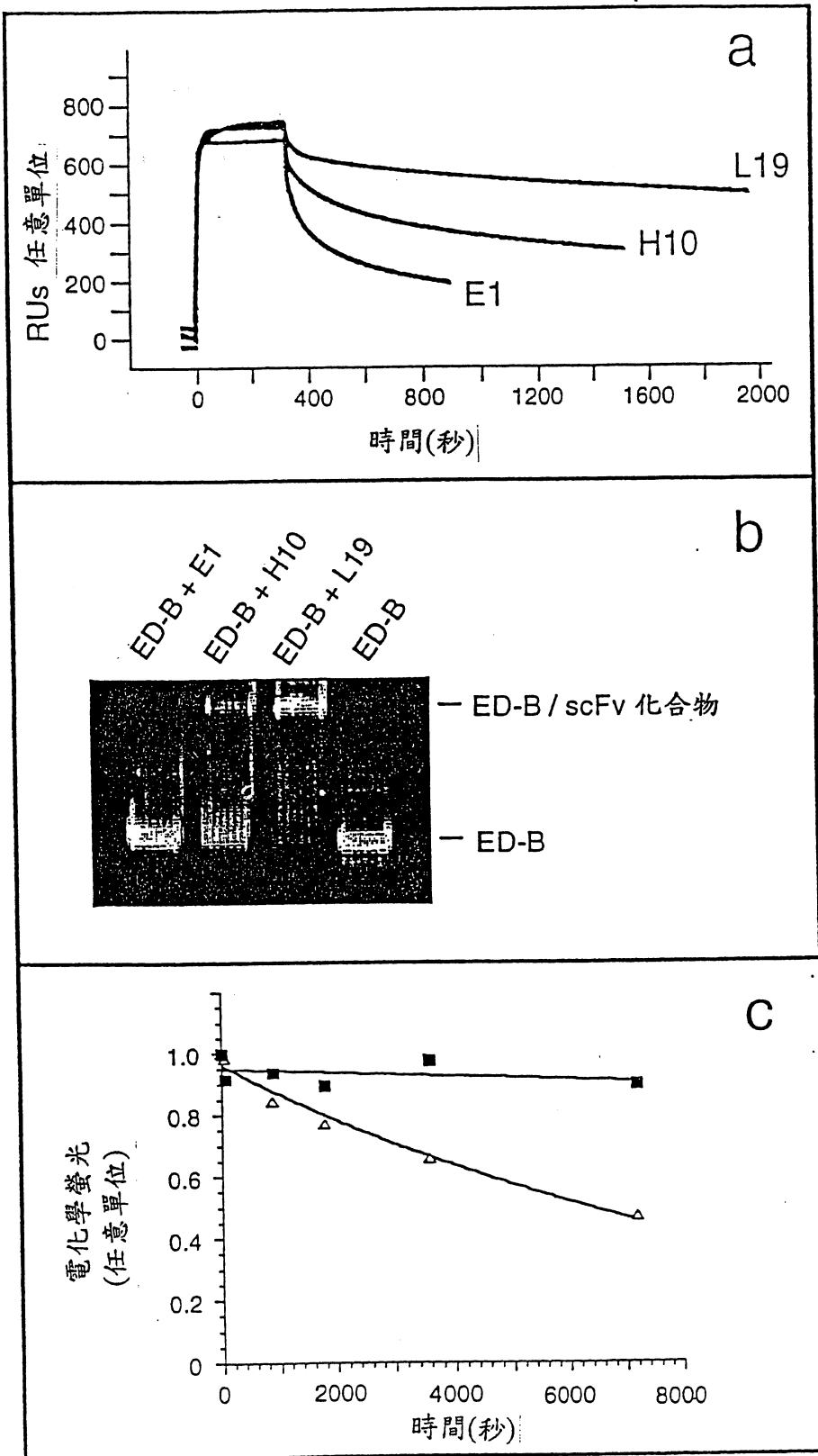


第二 A 圖

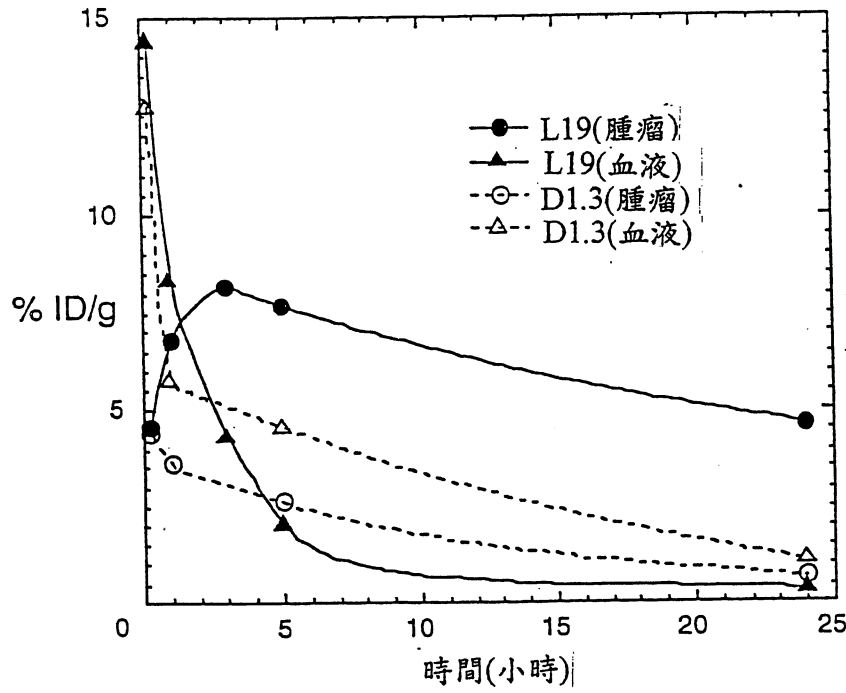


第二 B 圖





第 四 圖



時間(h)	%ID/g							scFv (D1.3)	
	腎	脾	肺	肝	腦	血液	腫瘤	Blood	Tumor
0.25	26.4 ± 4.7	5.4 ± 0.4	15.1 ± 5.1	5.7 ± 0.6	0.4 ± 0.04	14.4 ± 2.6	4.6 ± 1.0	12.7 ± 0.1	4.4 ± 0.4
1	19.2 ± 3.9	3.8 ± 0.3	9.8 ± 0.9	2.8 ± 0.3	0.3 ± 0.1	8.3 ± 0.9	6.9 ± 2.4	5.7 ± 0.7	3.6 ± 1.0
3	8.1 ± 1.6	2.0 ± 0.3	5.0 ± 1.4	1.7 ± 0.02	0.2 ± 0.01	4.3 ± 0.3	8.2 ± 4.2	---	---
5	4.2 ± 1.1	1.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2	1.3 ± 0.3	0.1 ± 0.02	2.0 ± 1.6	7.7 ± 2.5	4.6 ± 1.2	2.6 ± 1.5
24	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.2 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.4 ± 0.1	4.7 ± 0.6	1.1 ± 0.5	0.7 ± 0.4

第五圖

VH

E V Q L L E S G G G	L V Q P G G S L R L	S C A A S G F T F S
S F S M S W V R Q A	P G K G L E W V S S	I S G S S G T T Y Y
A D S V K G R F T I	S R D N S K N T L Y	L Q M N S L R A E D
T A V Y Y C A K P F	P Y F D Y W G Q G T	L V T V S S

鏈結子

G D G S S G G S G G A S T G

VL

E I V L T Q S P G T	L S L S P G E R A T	L S C R A S Q S V S
S S Y L A W Y Q Q K	P G Q A P R L L I Y	Y A S S R A T G I P
D R F S G S G S G T	D F T L T I S R L E	P E D F A V Y Y C Q
Q T G R I P P T F G	Q G T K V E I K	

抗體 L19 之胺基酸序列

第 六 圖



第九天/一號兔子/左眼/n C |



第九天/一號兔子/右眼/高 VEGF |



第九天/二號兔子/左眼 PMA |



第九天/二號兔子/左眼/低 VEGF |



第九天/三號兔子/左眼/高 VEGF |



第九天/三號兔子/右眼/高 PMA |

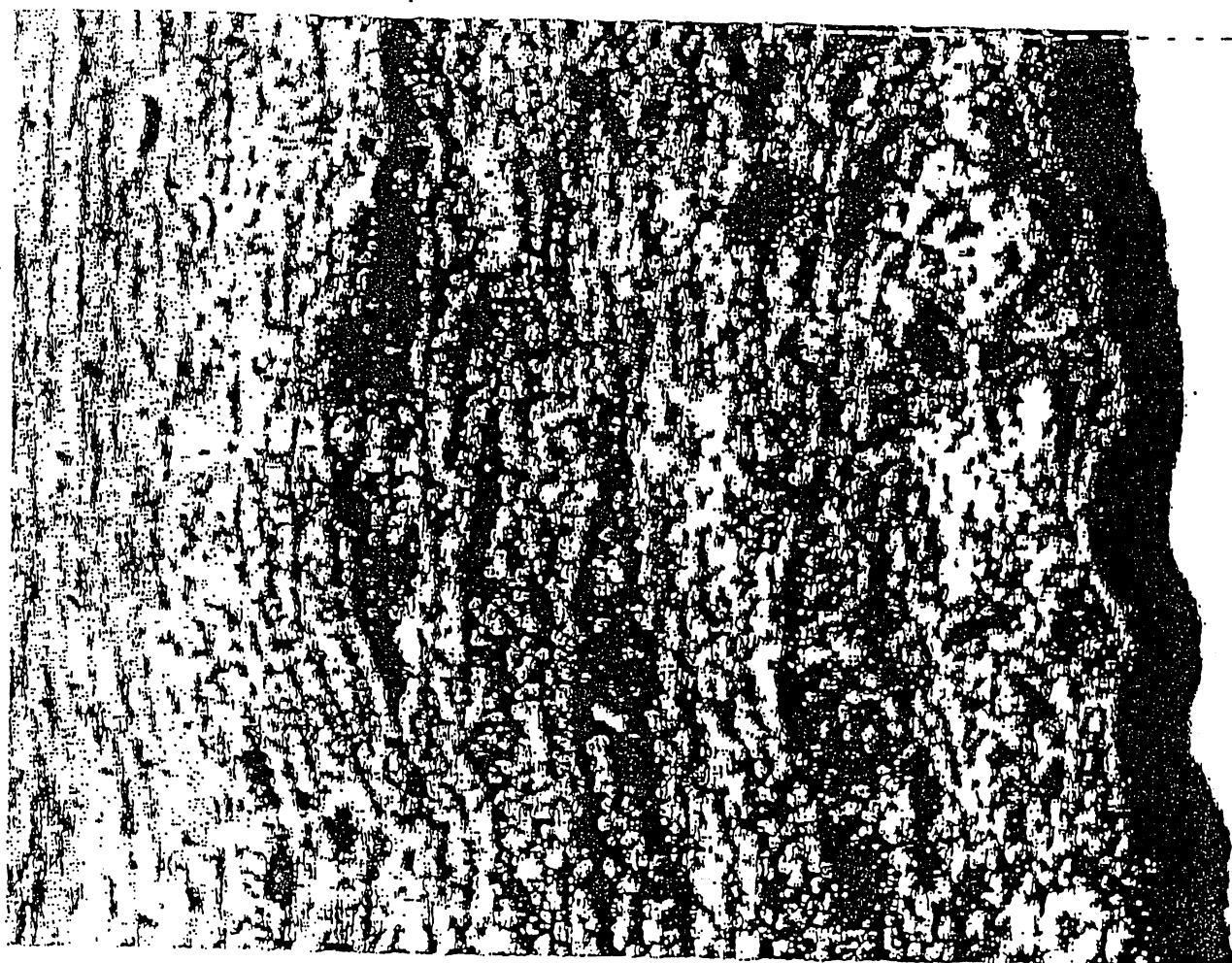


第九天/四號兔子/左眼/PMA |

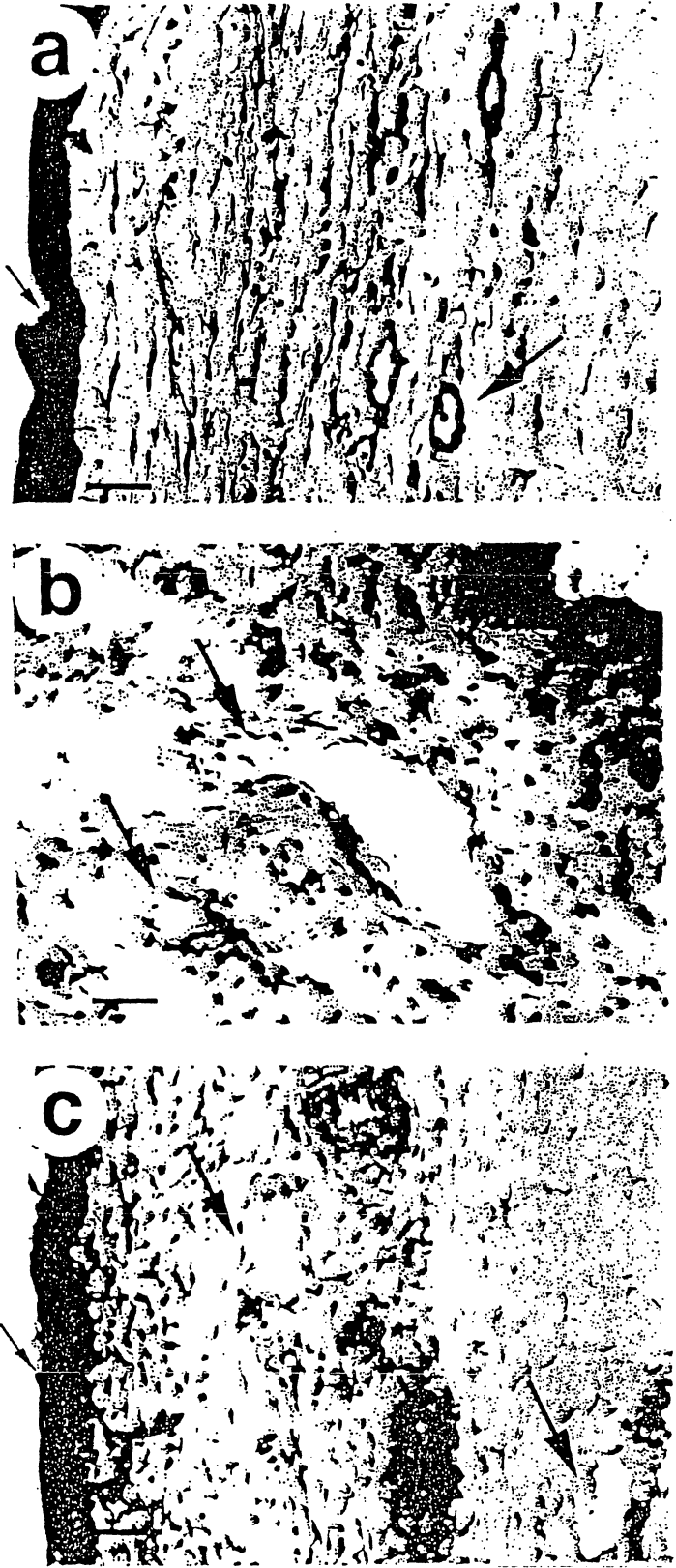


第九天/四號兔子/右眼/n C |

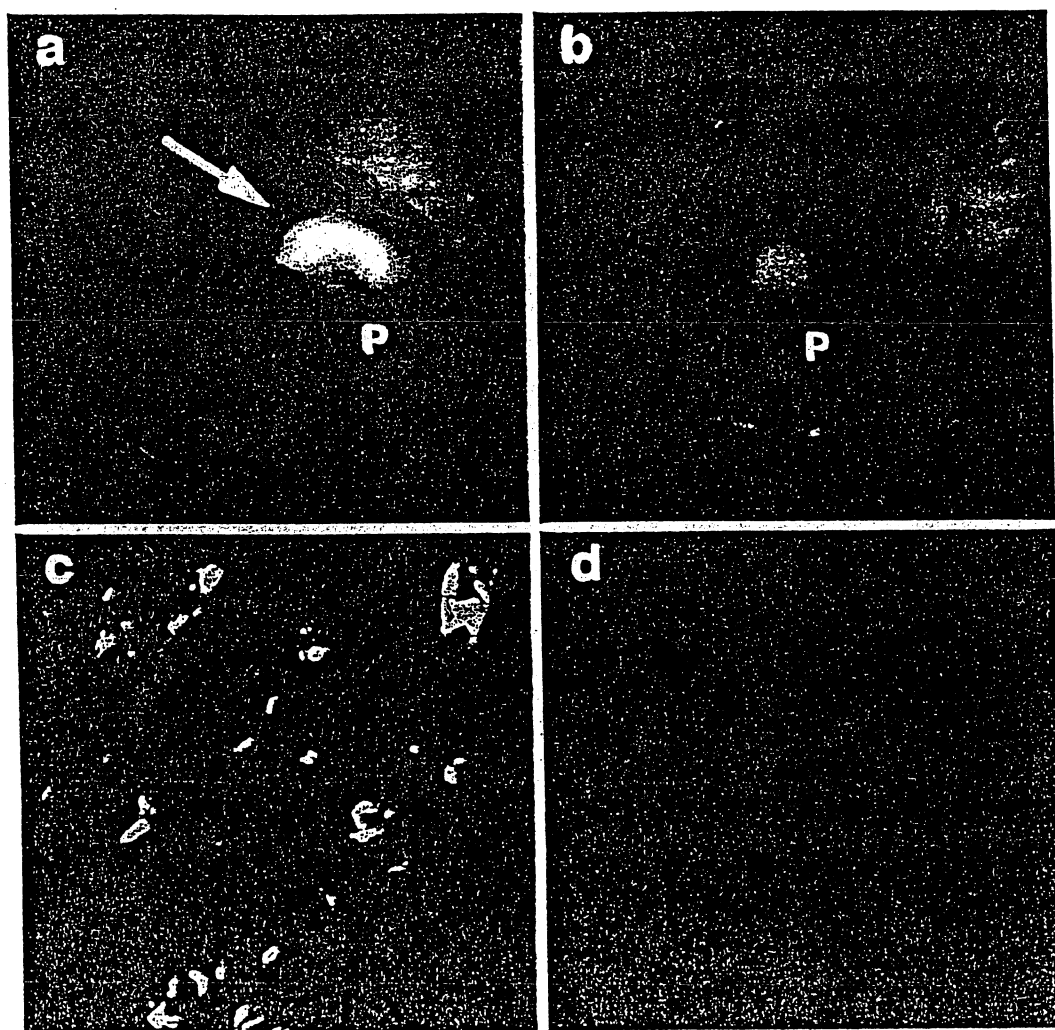
第 七 圖



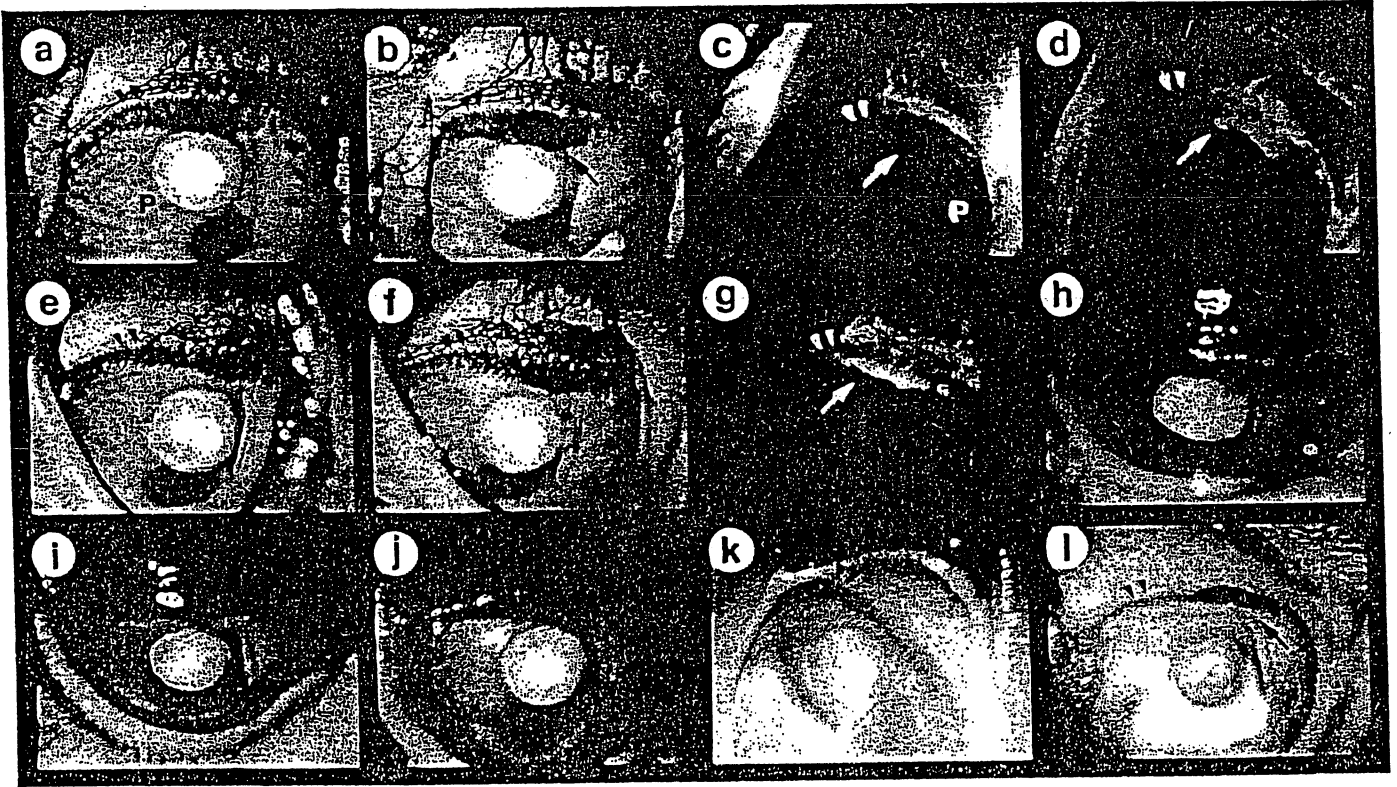
第 八 圖



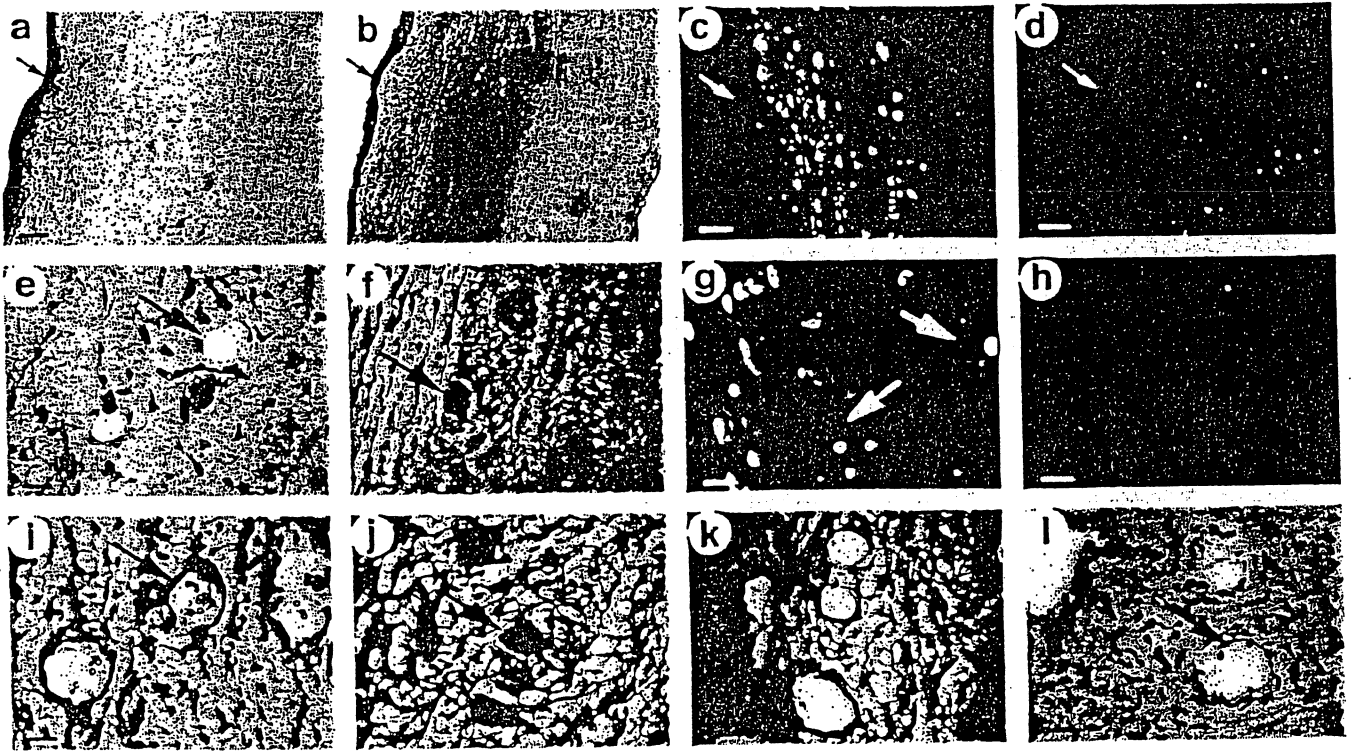
第九圖



第十圖



第十圖



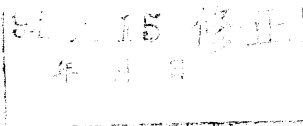
第十二圖

**柒、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第(一)圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

**捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**



# 發明專利說明書

中文說明書替換頁(94年2月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：088107648

※ 申請日期：88.01.10

※IPC 分類：C12K 1/00

## 壹、發明名稱：(中文/英文)

包含用於閃爍造影術之特定結合分子且其可應用於治療新生血管病變的組合物

## 貳、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士蘇黎士愛德吉諾席茲技術學院

代表人：(中文/英文)

安德瑞司 可路堤

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士 蘇黎克 CH-8092, 瑞密斯特芮思 101 號

國籍：(中文/英文)

瑞 士

## 參、發明人：(共4人)

姓 名：(中文/英文)

1.丹尼爾 乃瑞 2.羅芮諾 塔利

3.法蘭西斯嘉 維堤 4.曼福蘭德 伯其樂

住居所地址：(中文/英文)

1.瑞士 蘇黎克 CH-8049 英畢斯布西斯戴格 22 號

2.義大利 蒙特瑞吉尼 53035 維亞 阿巴地亞 20 號

3.義大利 珍諾娃 16151 維亞 巴泰格利尼 16 號

4.瑞士 蘇黎克 CH-8004 安萬德斯翠思 66 號

國籍：(中文/英文)

1.義大利 2.義大利 3.義大利 4.瑞士

## 玖、發明說明：

### 【發明所屬技術領域】

本發明係關於包含用於閃爍造影術之特定結合分子且其可應用於治療新生血管病變的組合物，其中所含抗體特別對纖維網蛋白 (fibronectin) 之 ED-B 結構域 (domain) 之特殊抗原表位具有次毫微莫耳級 (sub-nanomolar) 之親和力，而此纖維網蛋白可作為新生血管之標記。本發明亦關於以放射形同位素高親和力之抗 ED-B 抗體於偵測體內新生血管之用途，及包含上述抗體之診斷裝置。

再者，本發明尚關於結合物，其包括上述之抗體及一適當之光活性分子 (例如光敏物質)，及其於新生血管的偵測及/或凝結之用途。

### 【發明背景】

腫瘤若無新血管形成 (血管新生)，則其生長將會受到限制，已有報告顯示，在許多腫瘤中，微血管的密度與腫瘤之侵犯有相當的關聯 (Folkman (1995). *Nature Med.*, 1, 27-31)。此外，血管新生為眼睛病變導致失明的主因 [ (Lee et al. (1998). *Surv. Ophthalmol.*, 43, 245-269) ; (Friedlander et al. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 9764-9769) ]。可選擇性標定新生血管之分子將增加對具有血管增生特徵之腫瘤或其他疾病之診療機會，例如，糖尿病引起之視網膜病變及老年黃斑部病變。新生血管的標誌表現在大多數具侵略性的固體腫瘤上，並可由經靜脈注射所產生之特定結合物得知 [ (Pasualini et al. (1997). *Nature Biotechnol.*, 15, 542-546) ; (Neri et al. (1997). *Nature Biotechnol.*, 15, 1271-1275) ]。標的新生血管之阻塞可使得腫瘤梗塞及萎陷 [ (O'Reilly et al. (1996). *Nature Med.*, 2, 689-692) ; (Huang et al. (1997). *Science*, 275, 547-550) ]。

纖維網蛋白之 ED-B 結構域為小鼠、大鼠及人類相同之 91 個胺基酸序列，其藉由選擇接合而嵌入纖維網蛋白分子中，特別是聚集在新血管組織周圍 (Castellani et al. (1994). *Int. j. Cancer* 59,



Biotechnology, 14, 385-390) (第 4 圖)。BIAcore 分析因再鍵結的影響、基準線不穩定及長的測量時間，使得其在緩慢的解離反應之動態參數無法很精確；長的測量時間係用以確認解離相符合單一指數分布。因此我們以競爭實驗來測量動態解離常數  $k_{off}$  (Neri et al. (1996). Trends in Biotechnol., 14, 465-470) (第 4 圖)。簡言之，抗 ED-B 抗體 (30nM) 與生物素 ED-B (10nM) 在有 M2 抗-FLAG 抗體 (0.5 $\mu$ g/ml) 及多株抗-小鼠免疫球蛋白 G 以鈾標示之複合物存在時，培養 10 分鐘，如前述 (Deaver, (1995). Nature, 377, 758-760)。對此溶劑進行平行反應，在不同的時間加入 unbiotinylated ED-B (1  $\mu$ M)。以抗生蛋白鏈菌素塗覆於表面的磁珠稀釋於 Origen 緩衝液 (Deaver, (1995). Nature, 377, 758-760) (20  $\mu$ l, 1mg/ml) 此混合物以 ORIGEN 分析儀分析 (IGEN Inc. Gaithersburg, MD, U.S.A.)。本儀器偵測電化發光 (ECL) 訊號，其與競爭反應結束時仍與 scFv 片段鍵結的數量有關。ECL 訊號對應競爭時間所作之圖符合具有特徵常數  $k_{off}$  之單一指數分布 (第 4 圖，表 2)。

### 實施例 3

以高親和性同位素標示之 scFv 標定腫瘤，其中 scFv 對纖維網蛋白的 ED-B 結構域具特定性

放射碘 scFv (L19) 或 scFv (D1.3) (不相關的抗體，對雞蛋溶菌酶具特定性) 以靜脈注射於皮下植入鼠科 F9 畸胎瘤之小鼠，F9 畸胎瘤是一種生長快速的侵犯型腫瘤。由不同時間點得到抗體的生物分布狀況 (第 4 圖)。親和性抗原管柱純化 ScFv (L19) 與 scFv (D1.3) (Neri et al. (1997). Nat Biotechnol., 15, 1271-1275) 及利用 Iodogen 法標示放射性同位素碘-125 (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.)。同位素標示之抗體仍保持大於 80% 免疫活性，注入同位素標示之抗體至抗原

表 1：

選定抗 ED-B 抗體殖株的序列

殖株	VH 鏈				VL 鏈	
	31-33*	50-54*	95-98*	33*	50*	92-97*
A2	SYA	AISGSG	GLSI	Y	G	NGWYPW
G4	SYA	AISGSG	SFSF	Y	G	GGWLPY
E1	SYA	AISGSG	FPFY	Y	G	TGRIPP
H10	SFS	SIRGSS	FPFY	Y	G	TGRIPP
L19	SFS	SISGSS	FPFY	Y	Y	TGRIPP

由設計合成基因庫分離出的抗體殖株的相關胺基酸位置 (\*：編號係根據 Tomlinson et al. (1995) EMBO J., 14, 4628-4638)。單胺基酸碼 (code) 之使用係根據 IUPAC 命名法。

**拾、申請專利範圍**

1. 一種用於治療新生血管疾病的組合物，其含有對纖維網蛋白 (fibronectin) 之 ED-B 結構域中獨特抗原決定區具有特定親合性之分離抗體，其中該抗體可辨認 ED-B(+) 纖維網蛋白，其中該抗體對該 ED-B 抗原決定區之親和力為次毫微分子級，且其中該抗體包含 L19 scFv 抗體分子之可變異結構域，其具有如下之胺基酸序列：

EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS
SFSMSWVRQA	PGKGLEWVSS	ISGSSGTTY
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED
TAVYYCAKPF	PYFDYWGQGT	LTVVSS
GDGSSGGSGGASTG	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT
LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
YASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE

PEDFAVYYCQ QTGRIPPTFG QGTKVEIK，或係 L19 之等

- 功能性變異形式，其中 L19 具有前述胺基酸序列。
2. 如申請專利範圍第 1 項的組合物，其中該抗體係以 54 pM 之 Kd 結合該纖維網蛋白之 ED-B 結構域。
3. 如申請專利範圍第 1 項的組合物，其中該抗體包含 SEQ ID NO:19 之 VH 結構域。
4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項的組合物，其中該抗體包含 SEQ ID NO:21 之 VL 結構域。
5. 如申請專利範圍第 1 項的組合物，其中該抗體包含 L19 之片段、變異體或突變種。

6. 如申請專利範圍第1至3項中任一項的組合物，其中該抗體為scFv形式。
7. 如申請專利範圍第1至3項中任一項的組合物，其中該抗體係一完整抗體。
8. 如申請專利範圍第1至3項中任一項的組合物，其中該抗體以放射性同位素示蹤。
9. 如申請專利範圍第1至3項中任一項的組合物，其中該抗體以放射性碘化示蹤。
10. 一種可用於快速標定新生血管疾病的組合物，其含有對纖維網蛋白之ED-B結構域中獨特抗原決定區具有特定親合性之分離抗體，其中該抗體可辨認ED-B(+)纖維網蛋白，其中該抗體對該ED-B抗原決定區之親和力為次毫微分子級，且其中該抗體包含L19 scFv抗體分子之可變異結構域，其具有如下之胺基酸序列：

EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS
SFSMSW	VRQA	PGKGLE	WVSS	ISGSSG	TTY
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED
TAVYYCA	KPF	PYFDY	WGQGT	LVT	VSS
GDGSSG	GGASTG	EIVLT	QSPGT	LSLSP	GERAT
LSCRAS	QSVS	SSYLAW	YQQK	PGQAP	RLLIY
YASSRAT	GIP	DRFSGS	GGSGT	DFTLT	ISRLE

PEDFAVYYCQ QTGRIPPTFG QGTKVEIK，或係L19之等功能性變異形式，其中L19具有前述胺基酸序列。

11. 如申請專利範圍第10項的組合物，係用於新生血管疾病

之免疫閃爍造影偵測。

12. 如申請專利範圍第10項的組合物，係用於偵測以血管增生為特徵之疾病。
13. 如申請專利範圍第12項的組合物，其中該疾病係選自由下列疾病所組成之群：糖尿病視網膜病變、與年齡有關的黃斑病變及腫瘤。
14. 一種用於偵測新生血管疾病的診斷套組，其含有對纖維網蛋白之ED-B結構域中獨特抗原決定區具有特定親合性之分離抗體，其中該抗體可辨認ED-B(+)纖維網蛋白，其中該抗體對該ED-B抗原決定區之親和力為次毫微分子級，且其中該抗體包含L19 scFv抗體分子之可變異結構域，其具有如下之胺基酸序列：

EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS
SFSMSWVRQA	PGKGLEWVSS	ISGSSGTTY
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED
TAVYYCAKPF	PYFDYWGGQT	LVTVSS
GDGSSGGSGGASTG	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT
LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
YASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE

PEDFAVYYCQ QTGRIPPTFG QGTKVEIK，或係L19之等功能性變異形式，其中L19具有前述胺基酸序列。

15. 一種抗體用於製備診斷新生血管之診斷劑之用途，其中該抗體可辨認ED-B(+)纖維網蛋白，其中該抗體對該ED-B抗原決定區之親和力為次毫微分子級，且其中該抗體包含

L19 scFv抗體分子之可變異結構域，其具有如下之胺基酸序列：

EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS
SFSMSWVRQA	PGKGLEWVSS	ISGSSGTTY
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED
TAVYYCAKPF	PYFDYWGQGT	LTVVSS
GDGSSGGSGGASTG	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT
LSCRASQSVS	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY
YASSRATGIP	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE

PEDFAVYYCQ QTGRIPPTFG QGTKVEIK，或係L19之等功能性變異形式，其中L19具有前述胺基酸序列。

16. 如申請專利範圍第15項之用途，其中該診斷劑係用於診斷以血管增生為特徵之疾病。
17. 如申請專利範圍第16項之用途，其中該疾病係選自由下列疾病所組成之群：糖尿病視網膜病變、與年齡有關的黃斑病變及腫瘤。
18. 一種抗體用於製備治療新生血管之藥劑之用途，其中該抗體可辨認ED-B(+)纖維網蛋白，其中該抗體對該ED-B抗原決定區之親和力為次毫微分子級，且其中該抗體包含L19 scFv抗體分子之可變異結構域，其具有如下之胺基酸序列：

EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS
SFSMSWVRQA	PGKGLEWVSS	ISGSSGTTY
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED

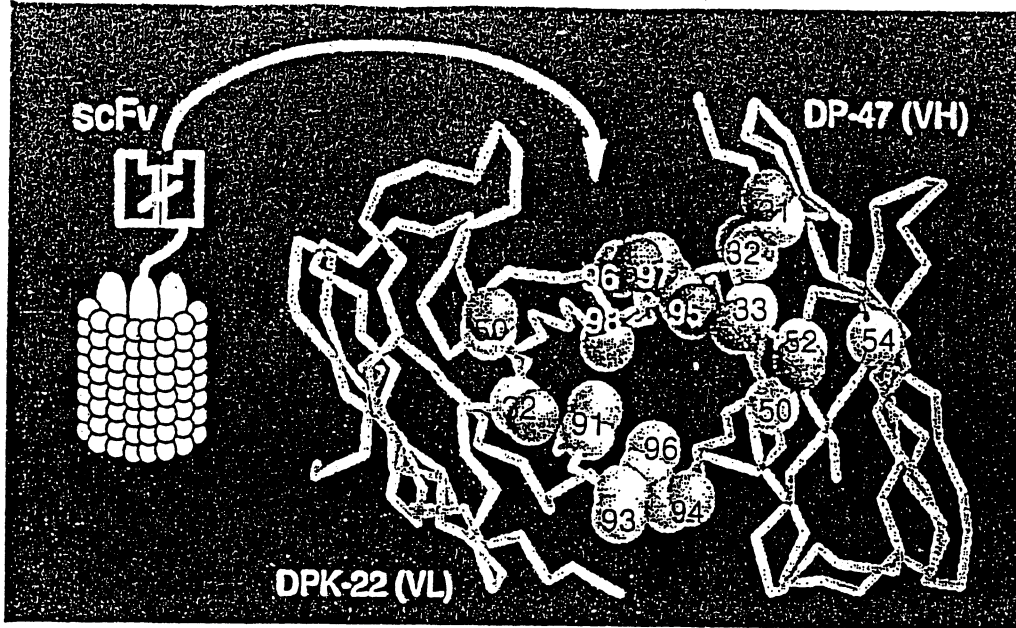
TAVYYCAKPF                      PYFDYWGQGT                      LVTVSS  
 GDGSSGGSGGASTG              EIVLTQSPGT                      LSLSPGERAT  
 LSCRASQSVS                      SSYLAWYQQK                      PGQAPRLLIY  
 YASSRATGIP                      DRFSGSGSGT                      DFTLTISRLE  
 PEDFAVYYCQ QTGRIPPTFG QGTKVEIK，或係L19之等

功能性變異形式，其中L19具有前述胺基酸序列。

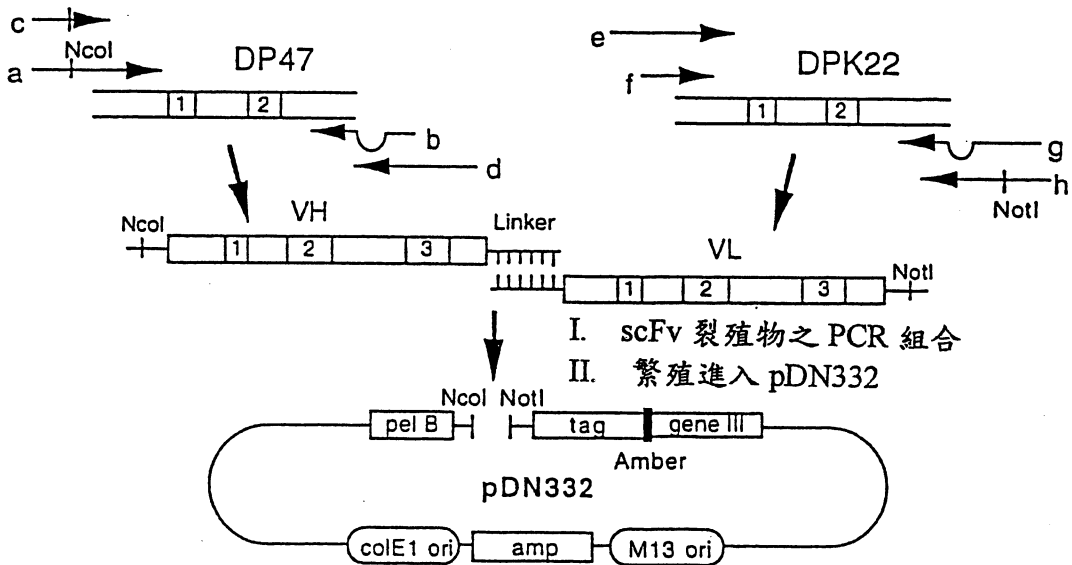
19. 如申請專利範圍第18項之用途，其中該藥劑係用於治療以血管增生為特徵之疾病。
20. 如申請專利範圍第19項之用途，其中該疾病係選自由下列疾病所組成之群：糖尿病視網膜病變、與年齡有關的黃斑病變及腫瘤。
21. 如申請專利範圍第1至3項中任一項的組合物，其中該抗體含一可導致血液凝結及血管阻塞之分子。
22. 如申請專利範圍第21項的組合物，其中可導致血液凝結及血管阻塞之分子係一光活性分子。
23. 如申請專利範圍第22項的組合物，其中該光活性分子係一光敏物質。
24. 如申請專利範圍第23項的組合物，其中該光敏物質之吸收波長大於600nm。
25. 如申請專利範圍第24項的組合物，其中該光敏物質係tin (IV) chlorine e6之衍生物。
26. 如申請專利範圍第25項的組合物，其係呈用於治療與新生血管疾病有關之病變之可注射組合物形態。
27. 如申請專利範圍第26項的組合物，其中該與新生血管疾

病有關之病變係由眼睛新生血管疾病所引起或與眼睛新生血管疾病有關。

A)



B)



VH 引子

a	DP47baNco	GCG GCC CAG CAT GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG
b	CDR3for	GGT TCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA MNN MNN MNN MNN TTT CGC ACA GTA ATA TAC G
c	VHpullth	GCG GCC CAG CAT GCC ATG GCC GAG
d	Jassm	CCC GCT ACC GCC ACT GGA CCC ATC GCC ACT CGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA GTA GTC

VL 引子

e	DPK22assm	GAT GGG TCC AGT GGC GGT AGC GGG GGC GCG TCG ACT GGC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC
f	DPK3for	CAC CTT GGT CCC TTG GCC GAA CGT MNN CGG MNN MNN ACC MNN CTG CTG ACA GTA ATA CAC TGC
g	Jfornot	GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC TTG GCC GAA CG
h	pullth	GAT GGG TCC AGT GGC GGT AGC GGG