

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. April 2005 (28.04.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/037312 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: A61K 39/395,
49/16, G01N 33/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/011654

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Oktober 2004 (15.10.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 48 319.5 17. Oktober 2003 (17.10.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; Müllerstr. 178, 13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HELDMANN, Dieter
[DE/DE]; Conradstr. 38, 13509 Berlin (DE).

(74) Anwalt: WEICKMANN & WEICKMANN; Postfach
860 820, 81635 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.



WO 2005/037312 A2

(54) Title: BINDING MOLECULES FOR THE EXTRA-DOMAIN B OF FIBRONECTIN, USED FOR THE DETECTION OF
ATHEROSCLEROTIC PLAQUES

(54) Bezeichnung: BINDEMOLEKÜLE FÜR DIE EXTRA-DOMÄNE B VON FIBRONECTIN ZUR DETEKTION VON ATHE-
ROSKLEROTISCHEN PLAQUES

(57) Abstract: The invention relates to the use of marked L19 derivatives for producing a pharmaceutical composition that is utilized
for detecting atherosclerotic plaques.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von markierten L19-Derivaten zur Herstellung einer
pharmazeutischen Zusammensetzung zur Detektion von atherosklerotischen Plaques.

Bindemoleküle für die Extra-Domäne B von Fibronectin zur Detektion von atherosklerotischen Plaques

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Bindemolekülen für die Extra-Domäne B (ED-B) von Fibronectin, beispielsweise von markierten Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten gegen die ED-B Domäne, wie etwa L19-Derivaten, als diagnostische Reagenzien zur Detektion von
10 atherosklerotischen Prozessen, insbesondere von atherosklerotischen Plaques.

Atherosklerose ist eine Veränderung der Blutgefäße, die über viele Jahre entsteht und zunächst unerkannt verläuft. Die Entwicklung einer Atherosklerose verläuft dabei über verschiedene Stufen. Kommt es zu einer
15 Verletzung der endothelialen Zellschicht der Arterienwand oder deren nicht-haftender Oberfläche infolge mechanischer oder chemischer Verletzung, so fördert die daraus resultierende Veränderung des normalen Blutflusses die Anheftung und Aggregation von Blutplättchen, insbesondere an den Ästen und Abzweigungen des Arteriengeflechts, was zur Ausbildung von
20 Blutgerinnseln, sog. Thromben, in den Arterienwänden führen kann. Mit der Zeit führt die Anhäufung von Fettstreifen, eine Ansammlung von Schaumzellen, welche sich infolge der Thrombenbildung aus Monocyten des zellulären Abwehrsystems bilden, zu einer kontinuierlichen Zelleinwanderung, Cholesterinablagerung, Ausdehnung der glatten
25 Muskulatur sowie Bildung von zusätzlichem Bindegewebe, wodurch es zu immer größeren Verletzungen kommt. Diese fortgeschrittenen Läsionen stellen schließlich die sogenannten atherosklerotischen Plaques dar, welche sich an der inneren Gefäßwand befinden, wo sie anschwellen und den Innenraum der Arterie einengen. Im weiteren Verlauf werden die
30 atherosklerotischen Plaques dann bald mit einer dicken Schicht Bindegewebe überzogen. Mit der Zeit verkalken diese Plaques und es kommt zu weiteren Veränderungen, wie z.B. Rissen oder Blutungen, die zu

- 2 -

einem teilweisen oder totalen Verschluss der Arterie führen können. Sobald kein Blut mehr fließen kann, sind die dahinter gelegenen Gewebe und Zellen von der Versorgung ausgeschlossen. Als Folge der Verengung können Herzinfarkte sowie Angina pectoris Anfälle, aber auch Schlaganfälle, Makuladegenerationen am Auge oder Thrombosen auftreten.

Die Atherosklerose entwickelt sich still und heimlich und verursacht lange keine Symptome. Erst wenn der Gefäßdurchmesser durch die fortschreitende Bildung der atherosklerotischen Plaques zunehmend reduziert wird, entstehen die Symptome langsam, aber stetig. Da bereits eingetretene Verkalkungen der atherosklerotischen Plaques nicht abgebaut werden können und den daraus resultierenden starren Arterienwänden die Elastizität nicht zurückgegeben werden kann, das Fortschreiten der Krankheit jedoch bei deren Kenntnis deutlich verlangsamt werden kann, sind einfache durchführbare Atherosklerosedetektionsverfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität von besonderer Bedeutung.

Bislang wurden verschiedene Untersuchungsmethoden zur Diagnostik der Atherosklerose entwickelt, darunter kontrastmittelverstärkte Angiographie, Mehrschicht Spiral-CT, Doppler-Sonographie, Magnetresonanztomographie und Elektronenstrahltomographie.

Die kontrastmittelverstärkte Angiographie ist eine Untersuchungsmethode, um Blutgefäße radiologisch darzustellen. Je nachdem, welches Organ oder welche Körperregion dargestellt werden soll, wird in örtlicher Betäubung eine Hohlnadel oder ein Katheter in eine Arterie, Vene oder in das Gewebe eingeführt. Danach wird ein Kontrastmittel oder Marker eingespritzt und die entsprechende Körperregion wird geröntgt. Dabei werden sowohl Arterien, Venen als auch Lymphabflussbahnen beschrieben, wodurch Rückschlüsse auf die Art und die Ausdehnung der Erkrankung möglich sind. Eine wesentliche Limitation erfährt diese Methode jedoch durch die verfügbaren Kontrastmittel und Marker. Diese ermöglichen lediglich eine relativ unspezifische Darstellung des Raumes in dem sie sich befinden, wie z.B.

- 3 -

des Blutraumes, wodurch die Detektion der atherosklerotischen Plaques erheblich erschwert wird.

Die Mehrschicht Spiral-CT stellt eine Alternative zur
5 kontrastmittelverstärkten Angiographie dar. Neben der validen
Dokumentation verkalkter atherosklerotischer Plaques bietet sie zusätzlich
den Vorteil hochauflösender kontrastmittelverstärkter CT-Angiographie und
ermöglicht damit auch die Visualisierung unverkalkter Plaques. Erste
klinische Studien zeigen jedoch bereits deutliche Limitationen der Methode,
10 so dass ein unreflektierter klinischer Einsatz generell nicht empfohlen
werden kann.

Die Doppler-Sonographie ist eine Ultraschall-Untersuchung, bei der das
Doppler-Verfahren zum Einsatz kommt und dient der Diagnose von
15 Herzerkrankungen. Durch die Doppler-Sonographie werden Informationen
über Richtung und Geschwindigkeit des Blutflusses erhalten, wodurch
Einengungen der Hohlräume von Arterien festgestellt werden können. Eine
Visualisierung von atherosklerotischem Plaquegewebe ist hingegen mit der
Doppler-Sonographie nicht möglich.

20 Die Magnetresonanztomographie ermöglicht durch Verwendung
verschiedener Pulssequenzen eine Visualisierung von atherosklerotischem
Plaquegewebe sowie eine Gewebecharakterisierung der einzelnen
Plaquekomponenten. Der Einsatz dieser Methode zur Primärprävention
25 bedarf jedoch noch erheblicher Weiterentwicklung.

Mit der Elektronenstrahltomographie steht ein Verfahren zur Verfügung, das
eine nicht-invasive Bestimmung des Ausmaßes der koronaren
Atherosklerose erlaubt. Mittels Elektronenstrahltomographie kann somit auch
30 die Progression der koronaren Atherosklerose beurteilt werden. Ein Nachteil
der Methode ist jedoch, dass sie sehr teuer ist und der Anschaffung eines
Elektronenstrahltomographen bedarf.

- 4 -

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demzufolge ein alternatives Verfahren zur Detektion von atherosklerotischen Plaques in Arterienwänden bereitzustellen, das eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweist und eine einfache, schnelle und kostengünstige Primärprävention möglich macht.

5

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch Verwendung von Bindemolekülen gegen die ED-B von Fibronectin zur Detektion von atherosklerotischen Prozessen, insbesondere zur Detektion von atherosklerotischen Plaques, einschließlich unverkalkter oder/und verkalkter Plaques.

10

Bindemoleküle für die ED-B Domäne von Fibronectin, einer Sequenz von 91 Aminosäuren, die durch alternatives Spleißen in das Fibronectin-Molekül inseriert wird (Castellani et al. (1994), Int. J. Cancer 59, 612-618), sind bereits in WO 97/45544, WO 01/62800 und WO 03/055917 beschrieben. Bevorzugte Bindemoleküle sind Moleküle, die direkt und spezifisch an die ED-B Domäne binden, wie etwa Antikörper gegen die ED-B Domäne oder Fragmente solcher Antikörper, beispielsweise durch proteolytische Spaltung erhältliche Antikörperfragmente, z.B. Fab-, Fab'-, F(ab)₂-Fragmente etc. oder rekombinante Antikörperfragmente, z.B. einzelkettige Fv-Fragmente. Die ED-B-Bindemoleküle werden vorzugsweise als Konjugate mit für diagnostische Anwendungen geeigneten Markierungsgruppen eingesetzt.

15

20

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung des Antikörpers L19 bzw. Fragmenten dieses Antikörpers (L19-Derivate), die als Konjugate mit Markierungsgruppen vorliegen, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Detektion von atherosklerotischen Plaques. Überraschenderweise konnte mit Hilfe der der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Studien festgestellt werden, dass atherosklerotische Plaques hochspezifisch und mit hoher Sensitivität durch Bindung markierter L19-Derivate diagnostiziert werden können.

25

30

L19 ist das scFv-Fragment (scFv: single chain variable antibody fragment)

- 5 -

eines monoklonalen Antikörpers gegen die Extra-Domäne B (ED-B) von Fibronectin und weist folgende Aminosäuresequenz (SEQ ID NO. 1) auf:

(VH):

5	EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS
	SFSMSW	VRQA	PGKGLE	WVSS	ISGSSG	TTY
	ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED
	TAVYYCA	KPF	PYFDYW	GQGT	LVTVSS	

(Linker):

10	GDGSSG	GSGG	ASTG
----	--------	------	------

(VL):

	EIVLTQ	SPGT	LSLSPG	ERAT	LSCRAS	QSVS
	SSFLAW	YQQK	PGQAPR	LLIY	YASSRA	TGIP
	DRFSGS	GSGT	DFTLTIS	RLE	PEDFAV	YYCQ
15	QTGRIP	PTFG	QGTKVE	IK		

L19 ist bereits verschiedentlich im Stand der Technik erwähnt. So beschreiben Tarli et al. (Blood, Vol. 94, No. 1 (1999), S. 192-198) die Bioverteilung des hoch affinen humanen ¹²⁵I-markierten L19 in Tumortragenden Mäusen mit fortgeschrittener Angiogenese im Bereich des Tumorgewebes. Des Weiteren offenbart WO 01/62800 die Verwendung von radioaktiv markierten Konjugaten, welche das scFv-Fragment L19 umfassen, zum Nachweis und zur Behandlung von Angiogenese. Die Verwendung von markierten L19-Derivaten zur Detektion von atherosklerotischen Plaques ist
 20
 25
 hingegen im Stand der Technik weder offenbart noch nahegelegt.

Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft daher insbesondere die Verwendung eines markierten L19-Derivats,

umfassend

30 (aa) mindestens eine Antigenbindungsstelle für die Extra-Domäne B (ED-B) von Fibronectin umfassend die in Tabelle 1 gezeigten komplementaritätsbestimmenden Regionen HCDR3 und/oder LCDR3 oder eine Variante davon, welche eine Deletion,

- 6 -

- Insertion und/oder Substitution von bis zu 5 Aminosäuren in der HCDR3-Region und von bis zu 6 Aminosäuren in der LCDR3-Region aufweist, wobei die Antigenbindungsstelle dieselbe Funktion aufweist, wie das in SEQ ID NO. 1 gezeigte native L19,
- 5
- (ab) mindestens eine Antigenbindungsstelle für die Extra-Domäne B (ED-B) von Fibronectin umfassend die in Tabelle 1 gezeigten komplementaritätsbestimmenden Regionen HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 und LCDR3 oder eine Variante
- 10 davon, welche eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu 3 Aminosäuren in der HCDR1-Region, von bis zu 8 Aminosäuren in der HCDR2-Region, von bis zu 5 Aminosäuren in der HCDR3-Region, von bis zu 6 Aminosäuren in der LCDR1-Region, von bis zu 4 Aminosäuren in der LCDR2-
- 15 Region und von bis zu 6 Aminosäuren in der LCDR3-Region aufweist, wobei die Antigenbindungsstelle dieselbe Funktion aufweist, wie das in SEQ ID NO. 1 gezeigte native L19, oder
- (ac) mindestens eine Antigenbindungsstelle für die Extra-Domäne B (ED-B) von Fibronectin umfassend die in SEQ ID NO. 1
- 20 gezeigte Sequenz des nativen L19 oder eine Variation davon, welche eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu 30 Aminosäuren aufweist, wobei die Antigenbindungsstelle dieselbe Funktion aufweist, wie das in SEQ ID NO. 1 gezeigte native L19,
- 25 und gegebenenfalls
- (ba) eine Aminosäuresequenz Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 -Cys (SEQ ID NO. 2), wobei Xaa_1 , Xaa_2 und Xaa_3 unabhängig voneinander jede natürlich vorkommende Aminosäure darstellen,
- (bb) eine Aminosäuresequenz Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 -Cys- Xaa_4 (SEQ ID
- 30 NO. 3), wobei Xaa_1 , Xaa_2 , Xaa_3 und Xaa_4 unabhängig voneinander jede natürlich vorkommende Aminosäure darstellen,
- (bc) eine Aminosäuresequenz $(His)_n$ (SEQ ID NO. 4), wobei n eine

- 7 -

- ganze Zahl von 4 bis 6 ist, oder
- (bd) eine Aminosäuresequenz umfassend die in SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6 oder SEQ ID NO. 7 gezeigte Sequenz, wobei der C-Terminus von (aa), (ab) oder (ac) gegebenenfalls über eine Peptidbindung an den N-Terminus von (ba), (bb), (bc) oder (bd) gebunden ist,
- 5 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Detektion von atherosklerotischen Plaques.
- 10 Das markierte L19-Derivat umfasst im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine N-terminale Antigenbindungsstelle für die Extra-Domäne B (ED-B) von Fibronectin ausgewählt aus den Antigenbindungsstellen (aa), (ab) oder (ac) und gegebenenfalls eine C-terminale Aminosäuresequenz ausgewählt aus den Aminosäuresequenzen (ba), (bb), (bc) oder (bd), wobei die
- 15 Antigenbindungsstelle dieselbe Funktion aufweist, wie das in SEQ ID NO. 1 gezeigte native L19. Gemäß vorliegender Erfindung bedeutet dies, dass die Antigenbindungsstellen (aa), (ab) und (ac) des markierten L19-Derivats eine im wesentlichen gleiche Bindungskonstante an atherosklerotische Plaques aufweisen, wie das in SEQ ID NO. 1 gezeigte native scFv-Fragment L19.
- 20 Insbesondere vermitteln die Antigenbindungsstellen (aa), (ab) und (ac) eine Bindung zwischen dem markierten L19-Derivat und den atherosklerotischen Plaques, wobei der Komplex aus markiertem L19-Derivat und atherosklerotischem Plaque eine Dissoziationskonstante im subnanomolaren Bereich aufweist (z.B. geringer als 10^{-9} M). Vorzugsweise
- 25 liegt die Dissoziationskonstante des Komplexes aus markiertem L19-Derivat und atherosklerotischem Plaque im selben Bereich wie die in WO 99/58570 beschriebene Dissoziationskonstante des Komplexes aus L19-Derivat und dem Antigen ED-B Fibronectin.
- 30 Die Antigenbindungsstellen für die Extra-Domäne B (ED-B) von Fibronectin des markierten L19-Derivats (aa) bzw. (ab) umfassen gemäß vorliegender Erfindung die in Tabelle 1 gezeigten komplementaritätsbestimmenden Regionen HCDR3 und/oder LCDR3 bzw. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1,

- 8 -

LCDR2 und LCDR3. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind die komplementaritätsbestimmenden Regionen HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 und LCDR3 wie folgt definiert:

5 Tabelle 1

Region⁽¹⁾	CDR-Länge⁽²⁾ (in Aminosäuren)	Sequenz	Maximale (bevorzugte) Variationen
HCDR1	5	S F S M S (SEQ ID NO. 8)	3 (2,1)
HCDR2	17	S I S G S S G T T Y Y A D S V K G (SEQ ID NO. 9)	8 (7,6,5,4,3,2,1)
HCDR3	7	P F P Y F D Y (SEQ ID NO. 10)	5 (4,3,2,1)
LCDR1	12	R A S Q S V S S S F L A (SEQ ID NO. 11)	6 (5,4,3,2,1)
LCDR2	7	Y A S S R A (SEQ ID NO. 12)	4 (3,2,1)
LCDR3	10	C Q Q T G R I P P T (SEQ ID NO. 13)	6 (5,4,3,2,1)

⁽¹⁾HCDRx: komplementaritätsbestimmende Region x der schweren Antikörperkette; LCDRx: komplementaritätsbestimmende Region x der leichten Antikörperkette.

⁽²⁾CDR-Länge: Länge der komplementaritätsbestimmenden Region.

10

Neben den in Tabelle 1 definierten komplementaritätsbestimmenden Regionen, können die Antigenbindungsstellen für die Extra-Domäne B (ED-B) von Fibronectin des markierten L19-Derivats (aa) bzw. (ab) auch Varianten dieser Regionen umfassen. Erfindungsgemäß umfasst eine Variante der HCDR1-Region eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu 3 Aminosäuren in der HCDR1-Region, d.h. eine Deletion, Insertion

15

- 9 -

und/oder Substitution von 1, 2 oder 3 Aminosäuren in Bezug auf die in
Tabelle 1 gezeigte Sequenz (SEQ ID NO. 8). Eine Variante der HCDR2-
Region umfasst eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu 8
Aminosäuren in der HCDR2-Region, d.h. eine Deletion, Insertion und/oder
5 Substitution von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8 Aminosäuren in Bezug auf die in
Tabelle 1 gezeigte Sequenz (SEQ ID NO. 9). Zudem umfasst eine Variante
der HCDR3-Region eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu
5 Aminosäuren in der HCDR3-Region, d.h. eine Deletion, Insertion und/oder
Substitution von 1, 2, 3, 4 oder 5 Aminosäuren in Bezug auf die in Tabelle 1
10 gezeigte Sequenz (SEQ ID NO. 10). Eine Variante der LCDR1-Region
umfasst hingegen eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu 6
Aminosäuren in der LCDR1-Region, d.h. eine Deletion, Insertion und/oder
Substitution von 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 Aminosäuren in Bezug auf die in Tabelle
1 gezeigte Sequenz (SEQ ID NO. 11). Des Weiteren umfasst eine Variante
15 der LCDR2-Region eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu
4 Aminosäuren in der LCDR2-Region, d.h. eine Deletion, Insertion und/oder
Substitution von 1, 2, 3 oder 4 Aminosäuren in Bezug auf die in Tabelle 1
gezeigte Sequenz (SEQ ID NO. 12). Eine Variante der LCDR3-Region
umfasst eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu 6
20 Aminosäuren in der LCDR3-Region, d.h. eine Deletion, Insertion und/oder
Substitution von 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 Aminosäuren in Bezug auf die in Tabelle
1 gezeigte Sequenz (SEQ ID NO. 13).

Die Antigenbindungsstelle für die Extra-Domäne B (ED-B) von Fibronectin
25 des markierten L19-Derivats (ac) umfasst gemäß vorliegender Erfindung die
in SEQ ID NO. 1 gezeigte Sequenz des nativen L19 oder eine Variation
davon, welche eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu 30
Aminosäuren aufweist, d.h. eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,
30 24, 25, 26, 27, 28, 29 oder 30 Aminosäuren in Bezug auf die in SEQ ID NO.
1 gezeigte Sequenz.

Die Aminosäuresequenzen (ba), (bb) bzw. (bc) des markierten L19-Derivats

- 10 -

umfassen die Sequenzen Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys (SEQ ID NO. 2), Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄ (SEQ ID NO. 3) bzw. (His)_n (SEQ ID NO. 4).

5 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Aminosäuresequenz (ba) Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys (SEQ ID NO. 2) die Sequenz Gly-Gly-Gly-Cys (SEQ ID NO. 14) oder Gly-Cys-Gly-Cys (SEQ ID NO. 15). Besonders bevorzugt ist die Sequenz Gly-Gly-Gly-Cys (SEQ ID NO. 14).

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Aminosäuresequenz (bb) Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄ (SEQ ID NO. 3) die Sequenz Gly-Gly-Gly-Cys-Ala (SEQ ID NO. 16) oder Gly-Cys-Gly-Cys-Ala (SEQ ID NO. 17). Besonders bevorzugt ist die Sequenz Gly-Gly-Gly-Cys-Ala (SEQ ID NO. 16).

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Aminosäuresequenz (bc) (His)_n (SEQ ID NO. 4) die Sequenz (His)₆ mit n gleich 6 (SEQ ID NO. 18).

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der N-Terminus von (aa), (ab) oder (ac) gegebenenfalls über eine Peptidbindung mit dem C-Terminus einer Linkeraminosäuresequenz verbunden ist. Vorzugsweise weist die Linkeraminosäuresequenz eine Länge von bis zu 30 Aminosäuren, bevorzugt bis zu 25 Aminosäuren und besonders bevorzugt bis zu 22 Aminosäuren auf. Besonders bevorzugt ist
25 die Linkeraminosäuresequenz die in SEQ ID NO. 19 gezeigte Sequenz ist.

Gemäß vorliegender Erfindung umfassen besonders bevorzugte markierte L19-Derivate die in SEQ ID NO. 1 (natives L19), SEQ ID NO. 20 (AP38), SEQ ID NO. 21 (AP39), SEQ ID NO. 22 (L19-GlyCysGlyCys), SEQ ID NO.
30 23 (L19-GlyCysGlyCysAla), SEQ ID NO. 24 (ZK225293), SEQ ID NO. 25 (ZK217691/217695), SEQ ID NO. 26 (ZK210917) und SEQ ID NO. 27 (ZK248219/248220) gezeigten Sequenzen.

Das Bindemolekül für die ED-B-Domäne liegt vorzugsweise in Form eines Konjugats mit einer Markierungssubstanz vor. Als Markierungssubstanzen sind sämtliche für diagnostische Anwendungen, insbesondere diagnostische Anwendungen *in vivo* geeigneten Markierungssubstanzen, geeignet, 5 beispielsweise radioaktive Markierungssubstanzen oder für nicht radioaktive Nachweismethoden, z.B. für Magnetresonanzverfahren geeignete Markierungssubstanzen.

Verfahren zur Einführung von Markierungssubstanzen in Polypeptide, Peptide und insbesondere scFv-Fragmente sind im Stand der Technik gut 10 bekannt. Vorzugsweise ist das Bindemolekül mit einem Radioisotop, z.B. einem Radioisotop von Iod (I), Indium (In), Technetium (Tc) und Rhenium (Re) markiert. Besonders bevorzugt sind die Radioisotope ^{125}I , ^{111}In , ^{186}Re , ^{188}Re , $^{94\text{m}}\text{Tc}$ oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Antikörperfragment, z.B. ein L19-Derivat in reduzierter Form, verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „reduzierte Form“, dass das Fragment in monomerer Form und nicht etwa in durch intermolekulare Disulfidbrücken vermittelter dimerer oder multimerer Form 20 vorliegt. Vorzugsweise wird die reduzierte Form des Antikörperfragments durch Zugabe eines geeigneten Reduktionsmittels erhalten. Geeignete Reduktionsmittel sind im Stand der Technik gut bekannt und umfassen TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) und 1,4-Dimercapto-2,3-butandiole.

25 Des Weiteren sieht die vorliegende Erfindung vor, dass die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich zu dem Bindemolekül gegebenenfalls physiologisch verträgliche Hilfsmittel, Träger und/oder Verdünnungsmittel enthält. Geeignete Hilfsmittel, Träger und/oder 30 Verdünnungsmittel sind dem Fachmann im Bereich der pharmazeutischen Chemie bestens bekannt.

Vorzugsweise erfolgt die Detektion der atherosklerotischen Plaques im

- 12 -

Rahmen der vorliegenden Erfindung durch Injizieren der pharmazeutischen Zusammensetzung, welche das ED-B-Bindemolekül umfasst, in eine Vene und/oder Arterie eines zu untersuchenden Patienten und Detektieren des an die atherosklerotischen Plaques – falls vorhanden – gebundenen markierten ED-B-Bindemoleküls. Wird ein Radioisotop-markiertes Bindemolekül verwendet, so kann die Detektion durch Szintigraphie erfolgen. Durch die frühzeitige Detektion von atherosklerotischen Plaques gemäß vorliegender Erfindung kann Herzinfarkten sowie Angina pectoris Anfällen, aber auch Schlaganfällen, Makuladegenerationen am Auge oder/und Thrombosen vorgebeugt werden.

Des Weiteren wird die vorliegende Erfindung durch Figur 1 und die nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

15 **Beispiele**

Beispiel 1: Herstellung von L19-Derivaten

Die Herstellung von L19-Derivaten erfolgt wie in WO 03/055917 beschrieben, auf deren Inhalt hierin Bezug genommen wird.

Beispiel 2: Markierung der L19-Derivate mit Hilfe von Radioisotopen

Die Herstellung markierter L19-Derivate erfolgt wie in WO 03/055917 beschrieben, auf deren Inhalt hierin Bezug genommen wird.

Beispiel 3: Untersuchung der Bindung verschiedener, markierter L19-Derivate an atherosklerotische Gefäßproben von WHHL-Kaninchen in einer speziellen *in vitro* Perfusionsapparatur

Zur Untersuchung der Eignung verschiedener, markierter L19-Derivate wurde eine *in vitro* Perfusionsapparatur (Ussing-Kammer) verwendet. Diese

- 13 -

Perfusionsapparatur enthielt Gefäßproben aus der Aorta von WHHL-Kaninchen (*Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits*).

5 Diese WHHL-Kaninchen entwickeln aufgrund eines genetischen Defekts in bestimmten Abschnitten der Aorta atherosklerotische Plaques. Gefäßproben aus diesen atherosklerotischen Abschnitten der Aorta wurden deshalb als Modell für die Krankheit Atherosklerose beim Menschen eingesetzt. Als Vergleichskontrolle wurden jeweils aus dem gleichen Kaninchen Gefäßproben aus nicht atherosklerotischen Abschnitten der Aorta verwendet.

10

Die Gefäßproben wurden in der Gefäßapparatur derart positioniert, dass das jeweilige zu untersuchende markierte L19-Derivat nur an der luminalen Seite der Aorta binden konnte. Eine Lösung des markierten L19-Derivats wurde dabei mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min perfundiert. Die Perfusion wurde über 20 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Volumen des Perfusionskreislaufes betrug 9 ml. In diesem Volumen war das markierte erfindungsgemäße L19-Derivat in der in Tabelle 2 angegebenen Menge enthalten.

20 Nach abgeschlossener Perfusion wurde die an die atherosklerotischen Plaques der Aorta gebundene Menge des zu untersuchenden markierten L19-Derivates mit Hilfe eines γ -Counters (γ -Kamera Elscint SP4 HR) bestimmt. Aus dem Verhältnis der Menge des gebundenen markierten L19-Derivates an die atherosklerotischen und nicht-atherosklerotischen Abschnitte der Aorta ergibt sich der Bewertungsfaktor des jeweiligen markierten L19-Derivates.

30

Tabelle 2

Zu untersuchendes L19-Derivat:	Verwendete Menge und Markierung:
ZK225293	0,3375 pmol mit 0,61 MBq ¹²⁵ I markiert
ZK212667	0,482 pmol mit 0,945 MBq ¹²⁵ I markiert
ZK2176691/217695	584,775 pmol mit 1,61 MBq ¹¹¹ In markiert
ZK210917	283,68 pmol mit 1,5 MBq ¹¹¹ In markiert
ZK217052/217053	72,648 pmol mit 3,0 MBq ^{99m} Tc markiert

Beispiel 3.1: Untersuchung des ¹²⁵I-markierten L19-Derivates ZK225293

- 5 Die Untersuchung der Eignung von ZK225293 (SEQ ID NO. 24) wurde wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Der in der Untersuchung ermittelte Bewertungsfaktor für ZK225293 betrug 4,5. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt das hervorragende Potential des markierten L19-Derivates zum Nachweis atherosklerotischer Plaques und damit zur
- 10 Diagnose von Atherosklerose in Arterien.

Beispiel 3.2: Untersuchung des ¹²⁵I-markierten L19-Derivates ZK212667

- 15 Die Untersuchung der Eignung von ZK212667 (L19; SEQ ID NO. 1) wurde wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Der in der Untersuchung ermittelte Bewertungsfaktor für ZK212667 betrug 2,8. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt das hervorragende Potential des markierten L19-Derivates zum Nachweis atherosklerotischer Plaques und damit zur
- 20 Diagnose von Atherosklerose in Arterien.

Beispiel 3.3: Untersuchung des ¹¹¹In-markierten L19-Derivates ZK217691/217695

- 25 Die Untersuchung der Eignung von ZK217691/217695 (SEQ ID NO. 25) wurde wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Der in der Untersuchung ermittelte Bewertungsfaktor für ZK2176691/217695 betrug 8,7. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt das hervorragende Potential des markierten L19-

- 15 -

Derivates zum Nachweis atherosklerotischer Plaques und damit zur Diagnose von Atherosklerose in Arterien.

5 **Beispiel 3.4: Untersuchung des ¹¹¹In-markierten L19-Derivates ZK210917**

Die Untersuchung der Eignung von ZK210917 (SEQ ID NO. 26) wurde wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Der in der Untersuchung ermittelte Bewertungsfaktor für ZK210917 betrug 3,4. Das Ergebnis dieser
10 Untersuchung zeigt das hervorragende Potential des markierten L19-Derivates zum Nachweis atherosklerotischer Plaques und damit zur Diagnose von Atherosklerose in Arterien.

15 **Beispiel 3.5: Untersuchung des ^{99m}Tc-markierten L19-Derivates ZK217052/217053**

Die Untersuchung der Eignung von ZK217052/217053 (SEQ ID NO. 21) wurde wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Der in der Untersuchung ermittelte Bewertungsfaktor für ZK217052/217053 betrug 4,8. Das Ergebnis
20 dieser Untersuchung zeigt das hervorragende Potential des markierten L19-Derivates zum Nachweis atherosklerotischer Plaques und damit zur Diagnose von Atherosklerose in Arterien.

25 **Beispiel 4: Untersuchung der Bildgebung von atherosklerotischen Plaques mithilfe des ^{99m}Tc-markierten L19-Derivates ZK248219/248220 an WHHL-Kaninchen *in vivo***

Die Untersuchung der Eignung von ZK248219/248220 (SEQ ID NO. 27) wurde *in vivo* an einem WHHL-Kaninchen durchgeführt. Diese WHHL-Kaninchen entwickeln aufgrund eines genetischen Defekts in bestimmten
30 Abschnitten der Aorta atherosklerotische Plaques und wurden daher als Modell für die Krankheit Atherosklerose beim Menschen eingesetzt.

- 16 -

Dem Versuchstier (3,4 kg Körpergewicht) wurde in Narkose (Rompun/Ketavet (1:2), 1 ml/kg Körpergewicht i.m.) 41 MBq des ^{99m}Tc-markierten L19-Derivates ZK248219/248220 in die Ohrtrandvene appliziert. Über einen Zeitraum von 5 h wurden mit dem γ -Counter (γ -Kamera Elscint SP4 HR) Ganzkörperszintigramme aufgenommen. Nach 5 h wurde das Versuchstier getötet und seine Aorta autoradiographisch untersucht, um die genaue Verteilung der an der Aorta gebundenen Aktivität zu bestimmen.

Das Ergebnis der Bildgebungs-Untersuchung zeigt bis zum Zeitpunkt *post injectionem* eine deutliche Darstellung des Aortabogens. Die autoradiographische Untersuchung belegt, dass im Aortabogen des Versuchstieres eine um den Faktor 12 höhere Aktivitätskonzentration als in den Plaque-freien, abdominalen Aortabereichen vorliegt. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt also ganz deutlich das hervorragende Potential des markierten L19-Derivates ZK248219/248220 zur Diagnose atherosklerotischer Plaques.

Ansprüche

1. Verwendung von Bindemolekülen gegen die Extra-Domäne B von
5 Fibronectin zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung
zur Detektion von atherosklerotischen Plaques.

2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass die Bindemoleküle ausgewählt werden aus Antikörpern und
Fragmenten davon.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
15 dass die Bindemoleküle eine Markierungsgruppe tragen.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dass die
Bindemolekülen ausgewählt werden aus 19-Derivaten,
umfassend
20 (aa) mindestens eine Antigenbindungsstelle für die Extra-Domäne B
(ED-B) von Fibronectin umfassend die in Tabelle 1 gezeigten
komplementaritätsbestimmenden Regionen HCDR3 und/oder
LCDR3 oder eine Variante davon, welche eine Deletion,
Insertion und/oder Substitution von bis zu 5 Aminosäuren in der
25 HCDR3-Region und von bis zu 6 Aminosäuren in der LCDR3-
Region aufweist, wobei die Antigenbindungsstelle dieselbe
Funktion aufweist, wie das in SEQ ID NO. 1 gezeigte native
L19,
(ab) mindestens eine Antigenbindungsstelle für die Extra-Domäne B
30 (ED-B) von Fibronectin umfassend die in Tabelle 1 gezeigten
komplementaritätsbestimmenden Regionen HCDR1, HCDR2,
HCDR3, LCDR1, LCDR2 und LCDR3 oder eine Variante

- 18 -

- davon, welche eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu 3 Aminosäuren in der HCDR1-Region, von bis zu 8 Aminosäuren in der HCDR2-Region, von bis zu 5 Aminosäuren in der HCDR3-Region, von bis zu 6 Aminosäuren in der LCDR1-Region, von bis zu 4 Aminosäuren in der LCDR2-Region und von bis zu 6 Aminosäuren in der LCDR3-Region aufweist, wobei die Antigenbindungsstelle dieselbe Funktion aufweist, wie das in SEQ ID NO. 1 gezeigte native L19, oder
- 5 (ac) mindestens eine Antigenbindungsstelle für die Extra-Domäne B (ED-B) von Fibrinectin umfassend die in SEQ ID NO. 1 gezeigte Sequenz des nativen L19 oder eine Variation davon, welche eine Deletion, Insertion und/oder Substitution von bis zu 30 Aminosäuren aufweist, wobei die Antigenbindungsstelle dieselbe Funktion aufweist, wie das in SEQ ID NO. 1 gezeigte native L19,
- 10 und gegebenenfalls
- (ba) eine Aminosäuresequenz Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys (SEQ ID NO. 2), wobei Xaa₁, Xaa₂ und Xaa₃ unabhängig voneinander jede natürlich vorkommende Aminosäure darstellen,
- 20 (bb) eine Aminosäuresequenz Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄ (SEQ ID NO. 3), wobei Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ und Xaa₄ unabhängig voneinander jede natürlich vorkommende Aminosäure darstellen,
- (bc) eine Aminosäuresequenz (His)_n (SEQ ID NO. 4), wobei n eine ganze Zahl von 4 bis 6 ist, oder
- 25 (bd) eine Aminosäuresequenz umfassend die in SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6 oder SEQ ID NO. 7 gezeigte Sequenz,
- wobei der C-Terminus von (aa), (ab) oder (ac) gegebenenfalls über eine Peptidbindung an den N-Terminus von (ba), (bb), (bc) oder (bd)
- 30 gebunden ist.

5. Verwendung nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Aminosäuresequenz Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys die Sequenz Gly-Gly-Gly-Cys (SEQ ID NO. 14) oder Gly-Cys-Gly-Cys (SEQ ID NO. 15) ist.
6. Verwendung nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Aminosäuresequenz Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Cys-Xaa₄ die Sequenz Gly-Gly-Gly-Cys-Ala (SEQ ID NO. 16) oder Gly-Cys-Gly-Cys-Ala (SEQ ID NO. 17) ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass n in der Aminosäuresequenz (His)_n 6 (SEQ ID NO. 18) ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass der N-Terminus von (aa), (ab) oder (ac) gegebenenfalls über eine Peptidbindung mit dem C-Terminus einer Linkeraminosäuresequenz verbunden ist.
9. Verwendung nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Linkeraminosäuresequenz eine Länge von bis zu 30 Aminosäuren aufweist.
10. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Linkeraminosäuresequenz die in SEQ ID NO. 19 gezeigte Sequenz ist.

- 20 -

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass das markierte L19-Derivat die in SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 20,
SEQ ID NO. 21, SEQ ID NO. 22, SEQ ID NO. 23, SEQ ID NO. 24,
5 SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 26 oder SEQ ID NO. 27 gezeigte
Sequenz umfasst.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass das Bindemolekül mit einem Radioisotop markiert ist.
13. Verwendung nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Radioisotop ausgewählt ist aus Radioisotopen von Iod (I),
15 Indium (In), Technetium (Tc) und Rhenium (Re).
14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Radioisotop ^{125}I , ^{111}In , ^{186}Re , ^{188}Re , $^{94\text{m}}\text{Tc}$ oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ist.
20
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Bindemoleküle aus Antikörperfragmenten, insbesondere
L19-Derivaten in reduzierter Form, ausgewählt werden.
25
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich
physiologisch verträgliche Hilfsmittel, Träger und/oder
30 Verdünnungsmittel enthält.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Zusammensetzung zur Injektion in eine Vene und/oder
Arterie eines Patienten vorgesehen ist.
- 5
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Zusammensetzung ein zur Detektion geeignetes radioaktiv
markiertes Bindemolekül enthält.
- 10
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 18 zur Prävention von
Herzinfarkten sowie Angina pectoris Anfällen, aber auch
Schlaganfällen, Makuladegenerationen am Auge oder Thrombosen.
- 15
20. Verfahren zur Detektion von atherosklerotischen Plaques, umfassend
das Verabreichen eines Bindemoleküls gegen die Extra-Domäne B
von Fibronectin in einer diagnostisch ausreichenden Menge an einen
zu untersuchenden Patienten, insbesondere einen humanen
Patienten, und Bestimmen der Lokalisation des Bindemoleküls in den
Blutgefäßen des Patienten.
- 20

Figur 1

SEQ ID NO.	Bezeichnung	Sequenz
1	L19 oder ZK212667 (natives scFv-Fragment L19)	EVQLLES GGGLVQP GGSLR LSCAASGFTFSSFSMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSSGT TYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKFPYFDYW GQGTLVTV SSGDGSSGGSGGASTGEIV LTQSPGTL SLSPGERATLS CRASQSVSSSFLAWYQQKP GQAPRLLIYYASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQTGRIPPTFG QGTKVEIK
2	Aminosäuresequenz (ba)	Xaa ₁ -Xaa ₂ -Xaa ₃ -Cys
3	Aminosäuresequenz (bb)	Xaa ₁ -Xaa ₂ -Xaa ₃ -Cys-Xaa ₄
4	Aminosäuresequenz (bc)	(His) _n
5	Aminosäuresequenz (bd)	AAADDDSDDDYKDDDDK
6	Aminosäuresequenz (bd)	AAADDDSDDDYKDDDDKH HHHHH
7	Aminosäuresequenz (bd)	SGGSGGPRAAPEVYAFAT PEWPGSRDKRTLACLIQNF MPEDISVQWLHNEVQLPD ARHSTTQPRKTKGSGFFV FSRLEVTRAWEQKDEFIC RAVHEAASPSQTVQRAVS VNPESSRRGGC
8	HCDR1	SFSMS
9	HCDR2	SISGSSGTTYYADSVKG
10	HCDR3	PFYFDY
11	LCDR1	RASQSVSSSFLA
12	LCDR2	YASSRA
13	LCDR3	CQQTGRIPPT

Figur 1 (Fortsetzung)

14	bevorzugtes (ba)	Gly-Gly-Gly-Cys
15	bevorzugtes (ba)	Gly-Cys-Gly-Cys
16	bevorzugtes (bb)	Gly-Gly-Gly-Cys-Ala
17	bevorzugtes (bb)	Gly-Cys-Gly-Cys-Ala
18	bevorzugtes (bc)	(His) ₆
19	Linkeraminosäuresequenz	M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A
20	AP38	L19-GlyGlyGlyCys
21	AP39 (exprimiert in <i>E. coli</i>) oder ZK217052/217053	L19-GlyGlyGlyCysAla
22		L19-GlyCysGlyCys
23		L19-GlyCysGlyCysAla
24	ZK225293	M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A - L19 - A A A D D D S D D D Y K D D D D K H H H H H H
25	ZK217691/217695	M X D T P A - L19 - S G G S G G P R A A P E V Y A F A T P E W P G S R D K R T L A C L I Q N F M P E D I S V Q W L H N E V Q L P D A R H S T T Q P R K T K G S G F F V F S R L E V T R A E W E Q K D E F I C R A V H E A A S P S Q T V Q R A V S V N P E S S R R G G C
26	ZK210917	M X D T P A - L19
27	AP39 (exprimiert in <i>P. pastoris</i>) oder ZK248219/248220	L19-GlyGlyGlyCysAla