

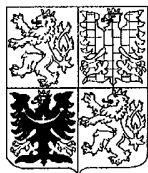
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4216

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11.05.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.05.1998 28.04.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/075338 1999/300425**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/EP99/03210**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/58570**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 16/00

A 61 K 39/395

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE
ZÜRICH, Zürich, CH;

(72) Původce:

Neri Dario, Zürich, CH;
Tarli Lorenzo, Monteriggioni, IT;
Viti Francesca, Genova, IT;
Birchler Manfred, Zürich, CH;

(74) Zástupce:

Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Specifické vazebné molekuly pro scintigrafii,
konjugáty obsahující tyto molekuly**

(57) Anotace:

Protilátky se subnanomolární afinitou specifickou pro charakteristický epitop ED-B domény fibronektinu, markeru angiogeneze. Použití radioaktivně značených vysoce-afinitních ED-B protilátek pro detekci nově tvořených krevních cév in vivo a diagnostického kitu obsahujícího uvedenou protilátku. Konjugáty obsahující uvedené protilátky a vhodné fotoaktivní molekuly (například správně vybrané fotosenzibilizační činidlo) a jejich použití pro selektivní, světlem zprostředkovaný uzavěr nově tvořených cév.

Specifické vazebné molekuly pro scintigrafii, konjugáty obsahující tyto molekuly ~~a způsoby léčby angiogenese~~

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká protilátek se subnanomolární afinitou specifickou pro charakteristický epitop ED-8 domény fibronektinu, který je markerem angiogenese. Také se týká použití radioaktivně značených vysoce-afinitních anti-ED-8 protilátek pro detekci nově se tvořících cév in vivo a diagnostických kitů obsahujících uvedené protilátky.

Dále se vynález týká konjugátů skládajících se z uvedených protilátek a vhodné fotoaktivní molekuly (například fotosenzibilizátoru) a jejich použití v detekci a/nebo koagulaci nově vytvořených krevních cév.

Dosavadní stav techniky

Nádory nemohou růst nad určitou hranici bez toho, že by se vytvořily nové cévy (bez angiogenese) a korelace mezi hustotou mikrokapilár a invazivitou nádoru byla popsána pro mnoho nádorů (Folkman, 1995, Nature Med. 1: 27-31). Kromě toho je angiogenese podkladem mnoha očních onemocnění, která vedou ke ztrátě zraku (Lee et al., Surv. Ophthalmol. 43: 245-269, 1988; Friedlander, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9764-9769, 1996). Molekuly, které mohou selektivně zaměřit markery angiogenese, umožní diagnostiku a terapii nádorů a jiných onemocnění charakterizovaných vaskulární proliferací, jako je diabetická retinopatie a makulární degenerace související s věkem. Markery angiogenese jsou exprimovány u většiny agresivních solidních nádorů a měly by být snadno přístupné pro intravenózně podané specifické ligandy (Pasqualini et al.,

1997, Nature Biotechnol. 15: 542-546; Neri et al., 1997, Nature Biotechnol. 15: 1271-1275). Cílená okluse neovaskulatury může vést k infarktu nádoru a k jeho kolapsu (O'Reilly et al., 1996), Nature Med. 2: 689-692; Huang et al., 1997, Science, 275: 547-550).

ED-B doména fibronektinu, sekvence o 91 aminokyselinách identická u myši, krysa a člověka, která je insertována alternativním sestřihem do fibronektinové molekuly, se specificky akumuluje v okolí neovaskulatury (Castellani et al., 1994, Int. J. Cancer 59: 612-618) a může představovat cíl pro molekulární intervenci. Skutečně jsme nedávno za použití fluorescenční techniky ukázali, že jednořetězcové Fv protilátkové fragmenty (scFv) proti ED-B se selektivně akumuluje v nádorových krevních cévách u myši s nádory a že afinita protilátky patrně určuje účinnost cílené vazby (Neri et al., 1997, Natur. Biotechnol. 15: 1271-1275; Mezinárodní patentová přihláška č. PCT/GB97/01412, na základě GB96/10967.3). Cílená vazba na nádor byla hodnocena 24 hodin po injekci nebo v pozdějších časových intervalech.

V oboru jsou známe různé pokusy o získání protilátek proti ED-B doméně, které by mohly být použity pro cílenou vazbu na nádor.

Peters et al. (Cell Adhesion and Communication, 1995, 3: 67-89) popisují polyklonální protilátky produkované proti antigenům neobsahujícím žádnou jinou sekvenci než intaktní ED-B doménu a ukazují, že tyto protilátky se váží přímo a specificky na tuto doménu.

Nicméně, činidla popisovaná Petersem a kol. mají řadu nevýhod: antisérum od Peterse a kol. rozpoznává ED-B(+)-FN

pouze po zpracování N-glykanasou. Toto způsobuje, že jsou tato činidla nevhodná pro aplikace jako je cílená vazba na nádory, zobrazení a terapie, protože deglykosylace nemůže být provedena in vivo. Autoři sami uvádějí, že jejich protilátky nerozpoznávají kompletní ED-B(+)-FN produkovaný savčími buňkami. Také uvádějí, že bylo nemožné produkovat monoklonální protilátky specifické pro ED-B doménu fibronektinu, i přesto, že byly produkovány protilátky proti jiným doménám fibronektinu (jako je ED-A). V oboru je dobře známo, že polyklonální protilátky jsou nepřijatelné pro výše uvedené aplikace.

I přes roky intenzivního výzkumu v této oblasti mohou být monoklonální protilátky rozpoznávající ED-B doménu fibronektinu bez ošetření N-glykanasou produkovány pouze za použití fágových zobrazovacích technik, jak jsou použity v předkládaném vynálezu.

Zang et al. (Matrix Biology, 1994, 14: 623-633) popisují polyklonální antisérum namířené proti psí ED-B doméně. Autoři předpokládají zkříženou reaktivitu s lidským ED-B(+)-FN, ačkoliv tato reaktivita nebyla testována. Nicméně, autoři popisují obtíže související s přípravou monoklonálních protilátek přímo rozpoznávajících ED-B doménu fibronektinu (strana 631). Antisérum rozpoznává ED-B(+)-FN ve Westernově přenosu pouze po zpracování N-glykanasou. Jak bylo uvedeno výše, nutnost zpracování glykanasou znemožňuje použití v aplikacích podle předkládaného vynálezu.

Rozpoznávání ED-B(+)-FN v ELISA probíhá bez nutnosti deglykosylace, ale pouze na chrupavce extrahované denaturačním činidlem (4M močovinou) a zachycené na plastu pomocí želatiny. Autoři uvádějí, že "vazba FN molekuly na želatinu navázanou na

plastový povrch ELISA plotny může nějakým způsobem vystavovat epitopy tak, že mohou být rozpoznány antisérem. Protože v aplikacích in vivo nemůže být FN denaturován a navázán na želatinu, mají monoklonální ligandy podle předkládaného vynálezu zřetelné výhody.

Japonské patenty JP02076598 a JP04169195 popisují anti-ED-B protilátky. Z těchto dokumentů není jasné, zda jsou popisovány monoklonální anti-ED-B protilátky. Kromě toho se zdá nemožné, aby jediná protilátka (jako je protilátka popisovaná v JP02076598) měla "antigenní determinantu v aminokyselinové sekvenci vzorce (1), (2) nebo (3):

- (1) EGIPIFEDFVDSSVG;
- (2) YTVTGLEPGIDYDIS;
- (3) NGGESAPTTLTQQT;

z následujících důvodů:

- (i) monoklonální protilátka by měla rozpoznávat dobře definovaný epitop;
- (ii) trojrozměrová struktura ED-B domény fibronektinu byla určena NMR spektroskopii. Segmenty (1), (2) a (3) se nacházejí na opačných stranách ED-B struktury a nemohou být vázány současně jednou monoklonální protilátkou.

Dále, pro demonstrování užitečnosti protilátek by mělo být uvedeno lokalizování nádoru, stejně jako důkaz barvení ED-B(+)-FN struktur v biologických vzorcích bez zpracování činidly degradujícími strukturu.

BC1 protilátka, kterou popisuje Carnemolla et al., 1992, J. Biol. Chem. 267: 24689-24692, rozpoznává epitop na doméně 7 FN, ale ne na ED-B doméně, která je kryptická za přítomnosti ED-B domény fibronektinu. Je striktně specifická pro člověka. Proto mají BC1 protilátka a protilátky podle předkládaného

vynálezu odlišnou reaktivitu. D8le, BC1 protilátka rozpoznává doménu 7 samotnou a doménu 7-8 fibronektinu za nepřítomnosti ED-B domény (Carnemolla et al., 1992, J. Biol. chem. 267: 24689-24692). Takové epitopy mohou být produkovány in vivo proteolytickou degradací FN molekul. Výhoda činidel podle předkládaného vynálezu spočívá v tom, že mohou lokalizovat FN molekuly nebo fragmenty pouze tehdy, pokud obsahují ED-B doménu.

Pro diagnostiku nádorů, a přesněji pro zobrazení primárních a sekundárních nádorových lézí, je imunoscintigrafie metodou volby. V tomto vyšetření jsou pacienti snímkováni vhodným přístrojem (například gamma-kamerou) poté, co jim byla injekčně podána radioaktivně značená sloučenina (například radionuklid navázaný na vhodné vehikulum). Pro scintigrafické aplikace jsou obvykle používány izotopy s krátkým poločasem emitující gamma záření, jako je technecium-99m, jod-123 nebo indium-111, jejich použití minimalizuje expozici pacienta ionizujícímu záření.

Nejčastěji používaným radionuklidem na odděleních nukleární medicíny je technecium-99m (^{99m}Tc), gamma zářič s poločasem 6 hodin. Pacienti po injekci radiofarmak na bázi ^{99m}Tc mohou být snímkováni až do 12-24 hodin po injekci; nicméně, akumulace nuklidu v lézi dříve je žádoucí.

Dále, pokud by byly dostupné protilátky schopné rychlé a selektivní lokalizace novotvořených krevních cév, tak by byly výzkumníci stimulováni k výzkumu nových vhodných molekul pro konjugování na protilátky, pro dosažení diagnostického a/nebo terapeutického účinku.

Podstata vynálezu

Vzhledem k potřebě radiofarmak schopných lokalizovat nádorové léze během několika hodin po injekci, která existuje v oboru nukleární medicíny, a vzhledem k informaci, že afinita protilátky patrně ovlivňuje její účinnost v cíleném průkazu angiogenese, je předmětem předkládaného vynálezu příprava protilátek specifických pro ED-B doménu fibronektinu s disociační konstantou v řádu subnanomolárním (pro přehled definic a měření afinity antigen-protilátka viz Neri et al., 1996, Trends in Biotechnol. 14: 465-470). Dalším předmětem předkládaného vynálezu jsou radioaktivně značené protilátky ve vhodném formátu, namířené proti ED-B doméně fibronektinu, které detekují nádorové léze již několik hodin po injekci.

V jednom aspektu vynálezu jsou tyto předměty dosaženy pomocí protilátky se specifickou afinitou k charakteristickému epitopu ED-B domény fibronektinu a se zlepšenou afinitou k uvedenému ED-B epitopu.

V dalším aspektu předkládaného vynálezu je protilátka popsána výše použita pro rychlé zacílení markerů angiogenese.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu je diagnostický jít obsahující uvedenou protilátku a jedno nebo více činidel pro detekci angiogenese.

Ještě dalším aspektem předkládaného vynálezu je použití uvedené protilátky pro diagnostiku a terapii nádorů a onemocnění, které jsou charakterizovány vaskulární proliferací.

Konečně, významný aspekt předkládaného vynálezu představují konjugáty obsahující uvedené protilátky a vhodné fotoaktivní molekuly (například správně vybrané fotosenzibilizační činidlo), a jejich použití pro selektivní světlem zprostředkovanou oklusi nově vytvořených krevních cév.

Definice:

V předkládaném vynálezu jsou použity některé termíny, které mají následující významy.

Termín "protilátka" označuje imunoglobulin, ať přirozený, nebo zcela nebo částečně připravený synteticky. Tento termín také zahrnuje jakýkoliv polypeptid nebo protein mající vazebnou doménu, která je protilátkovou vazebnou doménou nebo která je homologická k této doméně. Tyto mohou být získány z přirozených zdrojů, nebo mohou být zcela nebo částečně připraveny synteticky. Příklady protilátek jsou izotypy imunoglobulinů a podtřídy jejich izotypů; fragmenty, které obsahují vazebnou doménu pro antigen, jako je Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; a diprotilátky. Je možné použít monoklonálních nebo jiných protilátek a použít techniky rekombinantní DNA technologie pro produkci jiných protilátek nebo chimerických molekul, které si zachovávají specifitu původní protilátky. Takové techniky mohou obsahovat vložení DNA kodující variabilní region imunoglobulinu nebo komplementaritu určující regiony imunoglobulinů (CDR), konstantní regiony imunoglobulinů nebo konstantní regiony plus regiony pracovních rámců různých imunoglobulinů. Viz například EP-A-184187, GB 2188638A nebo EP-A-239400. Hybridomy nebo jiné buňky produkující protilátku mohou být podrobeny genetickým mutacím nebo jiným změnám, které mohou a nemusí měnit vazebnou specifitu produkovaných protilátek. Protože protilátky mohou

být modifikovány různými způsoby, zahrnuje termín "protilátka" jakákoliv vazebná činidla nebo substance, které obsahují vazebnou doménu s požadovanou specificitou. Proto tento termín zahrnuje fragmenty, deriváty, funkční ekvivalenty a homology protilátek, včetně jakýchkoliv polypeptidů obsahujících imunoglobulinovou vazebnou doménu, ať přirozené, nebo zcela nebo částečně připravené synteticky. Také jsou tímto termínem zahrnuty chimerické molekuly obsahující vazebnou doménu imunoglobulinu nebo její ekvivalent, fúzovanou na jiný polypeptid. Klonování a exprese chimerických protilátek je popsána v EP-A-0120694 a EP-A-0125023. Bylo prokázáno, že fragmenty celé protilátky mohou působit jako vazebné antigeny. Příklady vazebných fragmentů jsou (i) Fab fragment skládající se z VL, VH, CL a CH1 domén; (ii) Fd fragment skládající se z VH a CH1 domén; (iii) Fv fragment skládající se z VL a VH domén jedné protilátky; (iv) dAb fragment (Ward et al., 1989, Nature 9: 341, 544-546) skládající se z VH domény; (v) izolované CDR regiony; (vi) F(ab')₂ fragmenty, bivalentní fragmenty obsahující dva vázané Fab fragmenty; (vii) jednořetězcové Fv molekuly (scFV), kde jsou VH doména a VL doména navázané pomocí polypeptidové spojovací skupiny, která umožňuje asociaci dvou domén za vzniku vazebného místa pro antigen (Bird et al., (1988), Science 242: 423-426; Huston et al., (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83); (viii) bispecifické jednořetězcové FV dimery (PCT/US92/09965) a (ix) "diprotilátky", multivalentní nebo multispecifické fragmenty konstruované genovou fúzí (WO94/13804; Holliger et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448). Diprotilátky jsou multimery nebo polypeptidy, kde každý polypeptid obsahuje první doménu tvořenou vazebným regionem imunoglobulinového lehkého řetězce a druhou doménu tvořenou vazebným regionem imunoglobulinového těžkého řetězce, kde tyto dvě domény jsou navázány (například pomocí peptidové spojovací

skupiny), ale nejsou schopné vzájemné asociace tvořící vazebné místo pro antigen; vazebná místa pro antigen jsou tvořena asociací první domény jednoho polypeptidu v multimeru s druhou doménou jiného polypeptidu v multimeru (WO 94/13804). Pokud jsou použity bispecifické protilátky, tak mohou být použity běžné bispecifické protilátky, které mohou být připraveny různými způsoby uvedenými v Holliger and Winter, 1993, Curr. Opin. Biotech., 4: 446-449, například chemickou syntézou nebo z hybridních hybridomů, nebo mohou být použity jakékoliv fragmenty bispecifických protilátek, jak byly uvedeny výše. Než použití celých protilátek může být výhodnější použití scFv dimerů nebo diprotilátek. Diprotilátky a scFv mohou být připraveny bez Fc regionu, za použití pouze variabilních domén, což potenciálně snižuje efekt anti-idiotypové reakce. Mezi další formy bispecifických protilátek patří jednořetězcové CRAb, které jsou popsány v Neri et al., (1995), J. Mol. Biol. 246: 367-373).

Termín "komplementaritu určující regiony (CDR)" variabilních domén protilátky označuje ty hypervariabilní sekvence protilátky, které obsahují zbytky nutné pro specifické rozpoznávání antigenu. V tomto vynálezu používáme definici a číslování CDR uvedené v Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917.

Termín "funkčně ekvivalentní varianta" označuje molekulu (variantu), která si i přes strukturální odlišnosti od jiné molekuly (původní molekuly) uchovává významnou homologii a také alespoň nějakou biologickou funkci původní molekuly, například schopnost vazby na určitý antigen nebo epitop. Varianty mohou být ve formě fragmentů, derivátů nebo mutantů. Varianty, deriváty nebo mutanty mohou být připraveny modifikací původní molekuly adicí, delecí, substitucí nebo

insercí jedné nebo více aminokyselin, nebo vazbou na jinou molekulu. Tyto změny mohou být provedeny na nukleotidové nebo proteinové úrovni. Například, kódovaný polypeptid může být Fab fragment, který je potom navázán na Fc koncovku z jiného zdroje. Alternativně může být navázán marker jako je enzym, fluorescein atd. Například, funkčně ekvivalentní varianta protilátky "A" proti charakteristickému epitopu ED-B domény fibronektinu může být protilátka "B" s odlišnou sekvencí komplementaritu určujících regionů, ale rozpoznávající stejný epitop jako protilátka "A".

Izolovali jsme rekombinantní protilátky v scFv formě z protilátkové fágové zobrazovací knihovny, které jsou specifické pro ED-B doménu fibronektinu a které rozpoznávají ED-B(+)-fibronektin ve tkáňových řezech. Jedna z těchto protilátek, E1, byla upravována z hlediska afinity za zisku protilátek H10 a L19 se zlepšenou afinitou. Protilátka L19 má disociační konstantu pro ED-B doménu fibronektinu v řádu subnanomolárních koncentrací.

Vysoko-afinitní protilátka L19 a D1.3 (protilátka specifická pro irelevantní antigen, lysozym ze slepičích vajec) byly radioaktivně značeny a byly injikovány do myší s nádory. Biodistribuce v nádoru, krvi a orgánech byly stanoveny v různých časech a byly uvedeny jako procento injikované dávky na gram tkáně (%ID/g). Již 3 hodiny po injekci bylo pro L19 %ID/g (nádor) lepší než %ID/g (krev), ale nikoliv pro negativní kontrolní D1.3. Poměry nádor:krev se zvyšovaly při pozdějších měřeních. Tato data naznačují, že vysoce-afinitní protilátka L19 může být užitečným činidlem cíleně se vázajícím na nádory, vhodným například pro imunoscintigrafickou detekci angiogenese.

"Fotosenzibilizační činidlo" může být definováno jako molekula, která po ozáření a za přítomnosti vody a/nebo kyslíku, vyvolá tvorbu toxických molekul (například singletového kyslíku) schopných reakcí s biomolekulami, které potenciálně poškozují biologické cíle jako jsou buňky, tkáň nebo tělesné kapaliny. Fotosenzibilizační činidla jsou zejména výhodná tehdy, pokud absorbují světlo při vlnových délkách vyšších než 600 nm. Skutečně je průnik světla ve tkáních a tělesných kapalinách maximální při 600-900 nm (Wan et al., 1981, Photochem. Photobiol. 34: 679-681). Cílené podání fotosenzibilizačního činidla následované ozářením je atraktivním způsobem pro terapii onemocnění souvisejících s angiogenesí (Yarmush, M.L. et al., Antibody Targeted photolysis, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems, 10: 197-252 (1993); Rowe, P.M., Lancet 351, 1496 (1998); Levy, J., Trends Biotechnol. 13: 14-18 (1995)), zejména pro selektivní ablací oční neovaskulatury. Dostupné terapeutické modalitty, jako je laserová fotokoagulace, buď přímá nebo po podání fotosenzibilizačního činidla, jsou omezeny chyběním selektivity a obvykle vedou k poškození zdravých tkání a cév (Macular Photocoagulation Study Group, Arch. Ophthalmol. 112: 480-488, (1994; Haimovici, R. et al., Curr. Eye Res. 16: 83-90 (1997); Schmidt-Erfurt, U. et al., Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 236: 365-374 (1998)).

Z argumentů uvedených výše je zřejmé, že je mimořádně důležité objevit způsoby pro zlepšení selektivity a specifity fotosenzibilizačních činidel, například pomocí jejich konjugace na vhodné nosiče. Je pravděpodobné, že vývoj kvalitních nosičů nebude jednoduchý. Kromě toho, je pravděpodobné, že ne všechna fotosenzibilizační činidla budou vhodná k přenosu in vivo do vybraného místa. Faktory jako je chemická struktura fotosenzibilizačního činidla, jeho

rozpuštěnost, lipofilnost, přilnavost a účinnost budou pravděpodobně zásadně ovlivňovat možnost cíleného podání a účinnost konjugátů obsahujících fotosenzibilizační činidla.

Prokázali jsme, že vysoce-afinitní L19 protilátka, specifická pro ED-B doménu fibronektinu, selektivně lokalizuje nově vytvořené krevní cévy v králičím modelu oční angiogenese po systémovém podání. L19 protilátka, chemicky navázaná na fotosenzibilizační činidlo, kterým je sloučenina čtyřmocného cínu a chloru e_6 a ozářená červeným světlem, způsobuje selektivní oklusi oční neovaskulatury a navozuje apoptosu příslušných endotelových buněk. Tyto výsledky dokazují, že nové oční cévy mohou být imunochemicky odlišeny od původních očních cév in vivo a naznačují, že cílené podání fotosenzibilizačních činidel následované ozářením může být účinné v léčbě očních onemocnění způsobujících slepotu a snad i jiných patologických stavů spojených s angiogenesí.

Popis obrázků na připojených výkresech

Provedení předkládaného vynálezu jsou ilustrována na následujících výkresech, kde:

Obr. 1 ukazuje navrženou protilátkovou fágovou knihovnu;

Obr. 2 ukazuje 2D gely a westernový přenos lyzátu lidských melanomových COLO-38 buněk;

Obr. 3A, 3B a 3C ukazují imunohistochemické pokusy na glioblastoma multiforme;

Obr. 4 ukazuje analýzu stability komplexů protilátka-(ED-B);

Obr. 5 ukazuje biodistribuci radioaktivně značených protilátkových fragmentů u myší nesoucích nádory;

Obr. 6 ukazuje aminokyselinovou sekvenci L19;

Obr. 7A a 7B ukazují králičí oči s implantovanou peletou;

Obr. 8 ukazuje imunohistochemické barvení řezů z králičí rohovky;

Obr. 9 ukazuje imunohistochemické barvení řezů ze struktur králičího oka (rohovky, duhovky a spojivky) získaných za použití červeného substrátu pro alkalickou fosfatasu a hematoxylinu;

Obr. 10 ukazuje lokalizaci fluorescentně značených protilátek v oční neovaskulatuře;

Obr. 11 ukazuje makroskopický vzhled očí králíků, kterým byl injekčně podán protein navázaný na fotosenzibilizační činidlo, před a po ozáření.

Obr. 12 ukazuje mikroskopickou analýzu řezů z očních struktur králíků, kterým byl injekčně podán protein navázaný na fotosenzibilizační činidlo a kteří byli ozáření červeným světlem.

Podrobný popis obrázků

Obr. 1 ukazuje navrženou protilátkovou fágovou knihovnu.
(a) Protilátkové fragmenty jsou zobrazeny na fágu jako pIII fúze, jak je schematicky uvedeno. Ve vazebném místě protilátky (přímý pohled na antigen) je Vk CDR skelet uveden žlutě a VH

CDR skelet je znázorněn modře. Zbytky podrobené náhodné mutagenesi jsou v pozicích 91, 93, 94 a 96 V_k CDR3 (žlutě) a v pozicích 95, 96, 97 a 98 V_H CDR3 (modře). C_b atomy těchto vedlejších řetězců jsou znázorněny tmavšími barvami. Také jsou uvedeny (šedě) zbytky CDR1 a CDR2, které mohou být mutovány pro zlepšení afinity protilátky. Za použití programu RasMol (<http://www.chemistry.ucsc.edu/wipke/teaching/rasmol.html>) byly struktury scFv modelovány z pdb pole ligm (Brookhaven Protein DataBank; <http://www2.ebi.ac.uk/pcserv/pdbdb.htm>). (b) PCR amplifikace a klonovací strategie pro knihovnu. DP47 a DPK22 zárodečné templáty byly modifikovány (viz text) pro tvorbu mutací v CDR3 regionech. Geny jsou označeny obdélníčky a CDR jsou uvedeny jako očíslované obdélníčky v genech. Potom byly sestaveny V_H a V_L segmenty a byly klonovány do pDN332 fágemidového vektoru. Primery (od SEQ ID NO: 11 do SEQ ID NO: 18) použité při amplifikaci jsou uvedeny v dolní části obrázku.

Obr. 2 ukazuje: (a) barvení stříbrem 2D-PAGE lyzátu lidských melanomových COLO-38 buněk, do kterých byl vnesen rekombinantní 7B89 obsahující ED-B. Dvě 7B89 skvrny (zakroužkované) jsou způsobeny částečnou proteolýzou His-koncovky použité pro přečištění proteinu; (b) imunopřenos gelu, identického s gelem z obr. 2a, za použití anti-ED-B E1 (tabulka 1) a M2 anti-FLAG protilátek jako detekčních činidel. Jsou detekovány pouze 7B89 skvrny, což potvrzuje specifitu rekombinantní protilátky izolované ze skvrny v gelu.

Obr. 3A-3C ukazují imunohistochemické pokusy provedené na sériových řezech z glioblastomu multiforme, které ukazují typické glomerulům podobné vaskulární struktury při barvení za použití scFV E1 (A), A2 (B) a G4 (C). Měřítko: 20 μ m.

Obr. 4 ukazuje stabilitu komplexů protilátka-(ED-B). Analýza vazby scFV E1, H10 a L19 na ED-B doménu fibronektinu. (a) BIAcore sensogramy ukazující zlepšené disociační profily získané po afinitních úpravách protilátky. (b) Nativní gelová elektroforesa scFv-(ED-B) komplexů. Pouze vysoce-afinitní protilátka L19 může tvořit stabilní komplexy s fluorescentně značeným antigenem. Fluorescenční detekce byla provedena popsáním způsobem (Neri et al., (1996), BioTechniques, 20: 708-712). (c) Kompetice komplexu scFv-(ED-B-biotin) se 100-násobným molárním nadbytkem nebiotinylovaného ED-B, jak byla monitorována elektrochemoluminiscencí za použití přístroje Origen. Byl pozorován dlouhý poločas komplexu L19-(ED-B). Plné čtverečky: L19; prázdné trojúhelníčky: H10.

Obr. 5 ukazuje biodistribuci radioaktivně značených protilátkových fragmentů u myší nesoucích nádory. Biodistribuce v nádoru a v krvi, vyjádřené jako procento injikované dávky na gram, jsou umístěny do grafu v závislosti na čase. Také je uvedena relevantní orgánová biodistribuce.

Obr. 6 ukazuje aminokyselinovou sekvenci protilátky L19 obsahující těžký řetězec (VH), spojovací skupinu a lehký řetězec (VL).

Obr. 7A a 7B ukazují králičí oči s implantovanými polymerovými peletami namočenými do angiogenní substance.

Obr. 8 ukazuje imunohistochemické barvení řezů z králičí rohovky s novotvořenými cévami, za použití L19 protilátky.

Obr. 9 ukazuje imunohistochemické barvení řezů ze struktur oka za použití L19 protilátky. Specifické červená zabarvení je patrné kolo neovaskulárních struktur v rohovce (a), ale ne

okolo krevních cév v duhovce (b) a spojivce (c). Malé šipky: epitel rohovky. Relevantní krevní cévy jsou označeny velkými šipkami. Měřítka: 50 μm .

Obr. 10 ukazuje imunofotodetekci fluorescentně značených protilátek detekujících oční angiogenesi. Silná fluorescentní rohovková neovaskularizace (označená šipkami) je pozorována u králíků, kterým byl injekčně podán protilátkový konjugát L19-Cy5 (a), specifický pro ED-B doménu FN, ale u králíků, kterým byl injekčně podán protilátkový konjugát HyHEL-10-Cy5 (b). Imunofluorescenční mikroskopie rohovkových řezů potvrdila, že L19-Cy5 (c), ale ne HyHEL-Cy5 (d), se vyskytuje v okolí neovaskulatury v rohovce. Řezy (a,b) byly získány 8 hodin po injekci protilátky; (c,d) byly získány za použití rohovkových řezů izolovaných od králíků 24 hodin po injekci protilátky. P, peleta.

Obr. 11 ukazuje makroskopický vzhled očí králíků, kterým byly podány konjugáty obsahující fotosenzibilizační činidlo. Oko králíka, kterému byl podán L19-PS, před (a) a 16 hodin po (b) ozáření červeným světlem. Šipka označuje koagulovanou neovaskulaturu, která byla potvrzena jako hypofluorescentní oblast v Cy5 fluoroangiogramu na obr. (c) 16 hodin po ozáření. Povšimněte si, že žádná koagulace není pozorována v jiných cévních strukturách, například v dilatovaných spojivkových cévách. Pro srovnání je uveden fluoroangiogram s hyperfluorescencí propouštějících cév a příslušná barevná fotografie neléčeného králičího oka je uvedena v (d) a (h). Obr. (e,f,g) jsou analogické s (a,b,c), ale přísluší králíkům, kterým byl injekčně podán ovalbumin-PS a kteří byly ozáření červeným světlem. Nebyla pozorována žádná koagulace a angiogram ukázal hyperfluorescenci propouštějících cév. Oči králíků v časném stadiu angiogenese, kterým byl podán L19-PS,

jsou uvedeny na (i-l). Zobrazení před (I) a 16 hodin po ozáření červeným světlem (j) ukázaly významnou a selektivní světlem indukovanou intravaskulární koagulaci (šipka). Okluse cév (šipka) je zejména zřetelná v ozářeném oku (l) králíka bezprostředně po euthanasii, ale není detekovatelná v neozářeném oku (k) stejného králíka. P, peleta. Hroty označují korneo-sklerální přechod (limbus). Na všech obrázcích jsou preexistující dilatované spojivkové cévy viditelné nad limbem, zatímco růst rohovkové neovaskulatury může být pozorován od limbu směrem k peletě (P).

Obr. 12 ukazuje mikroskopickou analýzu selektivní okluse krevních cév. H/E řezy rohovky (a,e,b,f: nefixované; i,j: fixované paraformaldehydem) králíků, kterým byl injekčně podán ovalbumin-PS (a,e,i) nebo L19-PS (b,f,j) a kteří byli ozáření. Velké šipky představují nepoškozené (e,i) nebo zcela uzavřené (f,j) krevní cévy. Oproti selektivní oklusi rohovkové neovaskulatury a omezenému perivaskulárnímu postižení (eosinofilii) způsobené L19-PS po ozáření (b,j,f), nevykazují cévy ve spojivce (k) a duhovce (l) u stejného králíka známky poškození. Fluorescentní TUNEL test ukázal různý počet apoptotických buněk v řezech od ozářených králíků, kterým byl podán L19-PS (c,g), nebo ovalbumin-PS (d,h). Velké šipky ukazují některé relevantní cévní struktury. Malé šipky ukazují rohovkový epitel. Měřítko: 100 μm (a-d) a 25 μm (e-l).

Vynález bude nyní podrobněji popsán v následujících příkladech.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Izolace lidských scFv protilátkových fragmentů specifických pr ED-B doménu fibronektinu z protilátkové fágové zobrazovací knihovny

Lidská protilátková knihovna byla klonována za použití VH (DP47; Tomlison et al., (1992), J. Mol. Biol., 227: 776-798) a Vk (DPK22; Cox et al., (1994), Eur. J. Immunol. 24: 827-836) zárodečných genů (pro strategii klonování a amplifikace viz obr. 1). VH složka knihovny byla vytvořena za použití částečně degenerovaných primerů (obráz. 1) (od SEQ ID NO: 11 do SEQ ID NO: 18) pomocí techniky na bázi PCR pro vložení náhodných mutací v pozicích 95-98 CDR3). VL složka knihovny byla připravena stejným způsobem, vložení náhodných mutací do pozic 91, 93, 94 a 96 CDR3. PCR reakce byly provedeny popsáním způsobem (Marks et al., (1991), J. Mol. Biol. 222: 581-597) VH-VL scFv fragmenty byly připraveny pomocí PCR sestavení (obráz. 1; Clackson et al., (1991), Nature 352: 624-628) z VH a VL segmentů přečištěných na gelu. 30 µg přečištěných VH-VL scFv fragmentů bylo dvojitě tráveno 300 jednotkami NcoI a NotI, potom byl získaný materiál ligován do 15 µg NotI/NcoI tráveného pDN332 fágemidového vektoru. pDN332 je derivát fágemidu pHEN1 (Hoogenboom et al., (1991), Nucl. Acids Res. 19: 4133-4137), ve kterém byla sekvence mezi NotI místem a "amber" kodonem před genem III nahrazena následující sekvencí kodující D3SD3-FLAG-His6 koncovku (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'

Transformace do TG1 kmene *E. coli* byly provedeny způsobem podle Marks et al. (1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597) a fágy byly připraveny podle standardních protokolů (Nissim et al., (1991), *J. Mol. Biol.* 222: 581-597). Náhodně bylo vybráno pět klonů a tyto byly sekvenovány pro ověření absence kontaminace.

Rekombinantní fibronectinové fragmenty ED-B a 7B89, obsahující jeden a čtyři homologické repetitivní sekvence typu III, v příslušném pořadí, byly exprimovány z expresních vektorů na bázi pQE12 (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) způsobem popsaným v literatuře (Carnemolla et al., 1992, *Int. J. Cancer* 68: 397-405).

Selekce proti rekombinantní ED-B doméně fibronektinu (Carnemolla et al., 1992, *Int. J. Cancer* 68: 397-405; Zardi et al., 1987, *EMBO J.*, 6: 2337-2342) byly provedeny při 10 nM koncentraci za použití antigenu biotinylovaného biotin-disulfid-N-hydroxysukcinimid esterem (čínidlo B-4531; Sigma, Buchs, Switzerland; 10) a eluovaného z 2D gelu, a streptavidinem potažených Dynabeads koráleků (Dynal, Oslo, Norway). Pro každé kolo panelování bylo použito 1013 fágů, v 1 ml reakční směsi. Fágy byly inkubovány s antigenem ve 2% mléku/PBS (MPBS) po dobu 10 minut. DO tohoto roztoku se přidalo 100 μ l Dynabeads (10 mg/ml; Dynal, Oslo, Norway) předem blokováných v MPBS. Po 5 minutách mísení se korálky magneticky separovaly z roztoku a 7-krát se promyly PBS-0,1% Tween20 (PBST) a 3-krát PBS. Eluce byla provedena inkubací po dobu 2 minut s 500 μ l 50 mM dithiothreitolu (DTT), pro redukci disulfidových můstků mezi antigenem a biotinem. Korálky byly znovu zachyceny a získaný roztok byl použit pro infekci exponenciálně rostoucích TG1 *E. coli* buněk. Po třech kolech panelování byl eluovaný fág použit pro infekci exponenciálně rostoucích HB2151 buněk *E. coli*, které byly umístěny na (2xTY

+ 1% glukosa + 100 µg/ml ampicilinu) - 1,5% agarové plotny. Jednotlivé kolonie byly kultivovány v 2xTY + 1% glukose + 100 µg/ml ampicilinu a byly indukovány přes noc při 30 °C 1 mM IPTG pro dosažení produkce protilátky. Vzniklé supernatanty byly vyšetřovány ELISA za použití streptavidinem potažených mikrotitračních ploten zpracovaných 10 nM biotinylovaným ED-P a anti-FLAG M2 protilátkou (IBI Kodak, New Haven, CT) jako detekčním činidlem. 32% vyšetřovaných kolonií bylo pozitivních v tomto testu a tři z nich, které měly nejsilnější ELISA signál (E1, A2 a G4), byly sekvenovány a dále charakterizovány.

ELISA testy byly provedeny za použití biotinylované ED-B získaného ze skvrny v gelu, biotinylovaného ED-B, který nebyl denaturován, ED-B navázané na sousední fibronectinové domény (rekombinantní protein obsahující 7B89 domény) a mnoha irelevantních antigenů. Protilátky E1, A2 a G4 reagovaly silně a specificky se všemi třemi proteiny obsahujícími ED-B. Tato skutečnost, spolu se skutečností, že všechny tři rekombinantní protilátky mohly být přečištěny z bakteriálních supernatantů za použití ED-B afinitní kolony, silně naznačuje, že rozpoznávají epitop přítomný v přirozené konformaci ED-B. Žádná reakce nebyla detekována pro fibronectinové fragmenty neobsahující ED-B doménu (data nejsou uvedena). Pro testování toho, zda mají protilátky izolované proti gelové skvrně dobrou afinitu k přirozenému antigenu, byla provedena interakční analýza v reálném čase za použití povrchové plasmonové rezonance na BIAcore přístroji, podle způsobu uvedeného v literatuře (Neri et al., (1997), Nature Biotechnol. 15: 1271-1275). Monomerní frakce E1, A2 a G4 scFv fragmentů se vázaly na ED-B s afinitou v rozmezí 107-108 M⁻¹ (tabulka 1).

Jako další test specificity a použitelnosti protilátky byl proveden 2D-PAGE imunopřenos, při kterém byl do gelu vnesen

lyzát lidské melanomové buněčné linie COLO-38, do kterého byla přidána minimální množství 7B89 proteinu obsahujícího ED-B (obr. 2). ScFv (E1) barvil silně a specificky pouze 7B89 skvrnu.

Protilátky E1, A2 a G4 byly použity pro imunolokalizaci fibronektinu obsahujícího ED-B (B-FN) v kryostatových řezech z glioblastoma multiforme, což je agresivní mozkový nádor s výraznou angiogenesí. Obr. 3 ukazuje sériové řezy z glioblastoma multiforme, s typickými glomerulům podobnými cévními strukturami zbarvenými červeně třemi protilátkami. Imunobarvení řezů ze vzorků glioblastoma multiforme zmrazených bezprostředně po chirurgickém odběru bylo provedeno způsobem popsaným v literatuře (Carnemolla et al., 1992, Int. J. Cancer 68: 397-405; Castellani et al., 1994, Int. J. Cancer 59: 612-618). Stručně, imunobarvení bylo provedeno za použití M2-anti-FLAG protilátky (IBI Kodak), biotinylovaných anti-myších polyklonálních protilátek (Sigma), barvicího kitu obsahujícího komplex streptavidin-biotin-alkalická fosfatasa (BioSpa, Milan, Italy) a naftol-AS-MX-fosfátu a "fast red TR" (Sigma). Gillův hematoxylin byl použit jako kontrastní barvení, po kterém následovalo umístění do glycerolu (Dako, Carpenteria, CA), jak bylo popsáno dříve (Castellani et al., 1994, Int. J. Cancer 59: 612-618).

Pomocí podobné techniky a protilátky L19 (viz další příklad) jsme mohli také specificky barvit nově vytvořené cévy indukované implantací polymerových pelet ponořených do angiogenní substance, jako je vaskulární endotelový růstový faktor nebo estery forbolu, do králičí rohovky.

Příklad 2: Izolace lidského scFv protilátkového fragmentu vážícího se na ED-B se subnanomolární afinitou

ScFv(E1) byl vybrán pro testování možnosti zlepšení jeho afinity pomocí omezeného počtu mutací CDR zbytků lokalizovaných na periférii vazebného místa pro antigen (obr. 1A). Kombinatoriálně jsme mutovali zbytky 31-33, 50, 52 a 54 VH protilátky a zobrazili jsme příslušný repertoár na filamentosním fágu. Tyto zbytky se často vyskytují v kontaktu s antigenem ve známých 3D-strukturách komplexů protilátka-antigen. Získaný repertoár 4×10^8 klonů byl selektován pro vazbu na ED-B doménu fibronektinu. Po dvou kolech panelování a po vyšetření 96 jednotlivých klonů byla izolována protilátka s 27-krát vylepšenou afinitou (H10; tabulky 1 a 2). V souladu s jinými pozorováními pro afinitně - upravené protilátky jsme pozorovali, že zlepšená afinita byla způsobena spíše pomalejší disociací z antigenu než zlepšenými kon hodnotami (Schier et al., (1996), Gene, 169: 147-155; Ito (1995, J. Mol. Biol. 248: 729-732). Předpokládá se, že lehký řetězec protilátky přispívá méně k vazebné afinitě k antigenu, což je podporováno faktem, že jak přirozené, tak syntetické protilátky bez lehkého řetězce se mohou stále ještě vázat na antigen (Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546; Hamers-Casterman et al., 1993, Nature 363: 446-448). Z tohoto důvodu jsme vybrali pro randomizaci pouze dva zbytky (32 a 50) VL domény, které jsou umístěny centrálně ve vazebném místě pro antigen (obr. 1a) a ve 3D strukturách se často vyskytují v kontaktu s antigenem. Získaná knihovna, obsahující 400 klonů, byla zobrazena na fágu a byla selektována pro vazbu na antigen. Z analýz disociačních profilů za použití interakční analýzy v reálném čase provedených pomocí BIAcore přístroje (Jonsson et al., 1991, BioTechniques, 11: 620-627) a měření k_{off} pomocí kompetičních pokusů s elektrochemiluminiscenční detekcí, byl identifikován klon (L19), který se vázal na ED-B doménu fibronektinu s $K_d = 54$ pM (tabulky 1 a 2). Pokusy s afinitními úpravami byly provedeny následujícím způsobem: Gen scFv(E1) byl amplifikován

PCR za použití primerů LMB1bis (5'-GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG-3') (SEQ ID NO: 1) a DP47CDR1for (5'-GA GCC TGG CGG ACC CAG CTC ATM NNM NNM NNGCTA AAG GTG AAT CCA GAG GCT G-3') (SEQ ID NO: 2) pro vložení náhodných mutací do pozic 31-33 v CDR1 VH (pro číslování: 28), a s primery DP47CDR1back (5'-ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CC-3') (SEQ ID NO: 3) a DP47CDR2for (5'-GTC TGC GTA GTA TGT GGT ACC MNN ACT ACC MNN AAT MNN TGA GAC CCA CTC CAG CCC CTT-3') (SEQ ID NO: 4) pro náhodnou mutaci pozic 50, 52, 54 v CDR2 VH. Zbývající fragment scFv genu, v rozsahu 3'-části VH genu, peptidové spojovací skupiny a VL genu, byl amplifikován za použití primerů DP47CDR2back (5'-ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG-3') (SEQ ID NO: 5) a JforNot (5'-TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC TTG GCC GAA CG-3') (SEQ ID NO: 6) (94 °C, 1 minuta, 60 °C, 1 minuta, 72 °C, 1 minuta). Tři získané PCR produkty byly přečištěny na gelu a byly sestaveny PCR (21) za použití primerů LMB1bis a JforNot (94 °C, 1 minuta, 60 °C, 1 minuta, 72 °C, 1 minuta). Získaný jediný PCR produkt byl přečištěn z PCR směsi, byl dvojitě tráven NotI/NcoI a byl ligován do NotI/NcoI tráveného vektoru pDN332. V ligační směsi bylo použito přibližně 9 µg vektoru a 3 µg insertu, směs byla přečištěna fenolizací a srážením ethanolem, byla resuspendována v 50 µl sterilní vody a byla elektroporována do elektrokompetentních TGI buněk E. coli. Získaná afinitně - upravená knihovna obsahovala 4×10^8 klonů. Protilátkové -fágové částice, získané popsáním způsobem (Nissim et al., 1994, EMBO J., 13: 692-698) byly použity pro první kolo selekce na imunoškumavce potažené 7B89 (Carnemolla et al., 1996, Int. J. Cancer 68: 397-405). Selektované fágy byly použity pro druhé kolo panelování provedené s biotinylovanou ED-B, po kterém následoval zachycení na magnetických korálkách potažených streptavidinem (Dynal, Oslo, Norway; viz předchozí odstavec). Po selekci bylo přibližně 25% klonů pozitivních v solubilním ELISA testu (pro

protokol pokusu viz předchozí kapitolu). Z kandidátů pozitivních v ELISA jsme dále identifikovali jeden klon (H10, tabulka 1) s nejnižší hodnotou k_{off} podle BIAcore analýzy (Jonsson et al., 1991, BioTechniques, 11: 620-627).

Gen scFV(H10) byl amplifikován PCR za použití primerů LMB1bis a DPKCDR1for (5'-G TTT CTG CTG GTA CCA GGC TAA MNN GCT GCT GCT AAC ACT CTG ACT G-3') (SEQ ID NO: 7) pro vložení náhodných mutací do pozice 32 v CDR1 VL (pro číslování: Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917), a s primery DPKCDR1back (5'-TTA GCC TGG TAC CAG CAG AAA CC-3') (SEQ ID NO: 8) a DPKCDR2for (5'-GCC AGT GGC CCT GCT GGA TGC MNN ATA GAT GAG GAG CCT GGG AGC C-3') (SEQ ID NO: 9) pro vložení náhodné mutace v pozici 50 v CDR2 VL. Zbývající část scFv genu byla amplifikována za použití oligonukleotidů DPKCDR2back (5'-GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC-3') (SEQ ID NO: 10) a JforNot (94 °C, 1 minuta, 60 °C, 1 minuta, 72 °C, 1 minuta). Tři získané PCR produkty sestaveny, tráveny a klonovány do pDN332 stejně, jak bylo popsáno výše pro mutagenesi těžkého řetězce. Získaná knihovna byla inkubována s biotinylovanou ED-B ve 3% BSA po dobu 30 minut a potom byla zachycena na streptavidinem potažené mikrotitrační plotně (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) během 10 minut. Fágy byly eluovány 20 mM roztokem DTT (1,4-dithio-DL-threitol, Fluka) a byly použity pro infikování exponenciálně rostoucích TG1 buněk. Analýza vazby supernatantů z 96 kolonií na ED-B pomocí ELISA a BIAcore umožnila identifikaci klonu L19. Anti-ED-B E1, G4, A2, H10 a L19 scFv protilátkové fragmenty selektivně barvily nově vytvořené cévy v řezech z agresivních nádorů (obr. 3).

Výše uvedené fragmenty anti-ED-B protilátek byly potom produkovány inokulací jedné čerstvé kolonie do 1 litru 2xTY

media, jak bylo popsáno v literatuře (Pini et al., 1997, J. Immunol. Meth. 206: 171-182) a byly afinitně přečištěny na sepharosové koloně aktivované CNBr (Pharmacia, Uppsala, Sweden), ve které bylo navázáno 10 mg 7B89 rekombinantního proteinu obsahujícího ED-B (Carnemolla et al., 1996, Int. J. Cancer 68: 397-405). Po naplnění byla kolona promyta 50 ml rovnovážného pufru (PBS, 1 ml EDTA, 0,5 M NaCl). Protilátkové fragmenty byly potom eluovány 100 mM triethylaminem, ihned byly neutralizovány 1 M Hepes, pH 7 a byly dialyzovány proti PBS. Afinitní měření pomocí BIAcore byla provedena s přečištěnými protilátkami, způsobem uvedeným v literatuře (Neri et al., 1997, Natur. Biotechnol. 15: 1271-1275) (obr. 4). Analýza posunu proužků byla provedena způsobem uvedeným v literatuře (Neri et al., 1996, Natur. Biotechnol. 14: 385-390), za použití rekombinantní ED-B fluorescenčně značené na N-konci (Carnemolla et al., 1996, Int. J. Cancer 68: 397-405; Neri et al., 1997, Natur. Biotechnol. 15: 1271-1275) infračerveným fluoroforem Cy5 (Amersham) (obr. 4). BIAcore analýza neumožňuje přesné stanovení kinetických parametrů pro pomalé disociační reakce, z důvodů možného opakovaného navázání, základní nestability a dlouhých časů měření nutných pro zjištění toho, že disociační fáze probíhá podle jednoho exponenciálního profilu. Proto jsme provedli měření kinetické disociační konstanty k_{off} pomocí kompetičních pokusů (Neri et al., 1996, Trends in Biotechnol. 14: 465-470) (obr. 4). Stručně, anti-ED-B protilátky (30 nM) byly inkubovány s biotinylovanou ED-B (10 nM) po dobu 10 minut, za přítomnosti M2 anti-FLAG protilátky (0,5 µg/ml) a polyklonálního anti-myšího IgG (Sigma), který byl přede značen ruteniovým komplexem, jak je popsáno v literatuře (Deaver, D.R., 1995, Nature 377: 758-760). Do tohoto roztoku byla v paralelních reakcích v různou dobu přidávána nebiotinylovaná ED-B (1 µM). Potom byly přidány streptavidinem potažené Dynabeads, ředěné v

Origen Assay pufru (Deaver, D.R., 1995, Nature 377: 758-760) (20 μ l, 1 mg/ml) a získané směsi byly analyzovány za použití ORIGEN analyzátoru (IGEN Inc., Gaithersburg, MD, USA). Tento přístroj detekuje elektrochemoluminiscenční signál (ECL), který koreluje s množstvím scFv fragmentu, který zůstává navázaný na biotinylovanou ED-B na konci kompetiční reakce. Graf ECL signálu versus kompetiční doba dává profil, který může být upraven pro jedinou exponenciální křivku s charakteristickou konstantou k_{off} (obr. 4, tabulka 2).

Příklad 3: Zaměření nádorů pomocí vysoce afinitního radioaktivně značeného scFv specifického pro ED-B doménu fibronektinu

Radioaktivním jodem značené scFv(L19) nebo scFv(D1.3) (irelevantní protilátka specifická pro lysozym slepičích vajec) byly intravenosní injekcí podány myším s podkožně implantovaným myším F9 teratokarcinomem, rychle rostoucím agresivním nádorem. Biodistribuce protilátek byly stanoveny v různých časech (obr. 4). ScFv(L19) a scFv(D1.3) byly afinitně přečištěny na antigenní koloně (Neri et al., 1997, Nature Biotechnol. 15: 1271-1273) a byly radioaktivně značeny jodem-125 za použití Iodogen metody (Pierce, Rockford, IL, USA). Radioaktivně značené protilátkové fragmenty si zachovávaly >80% imunoreaktivitu, jak bylo určeno vnesením radioaktivně značené protilátky do antigenní kolony, po kterém následovalo stanovení radioaktivity v první a druhé výtokové frakci. Holým myším (Swiss holé myši stáří 12 týdnů, samci) s podkožně implantovaným F9 myším teratokarcinomem koloně (Neri et al., 1997, Nature Biotechnol. 15: 1271-1273) byly injekčně podány 3 μ g (3-4 μ Ci) scFv ve 100 μ l salinickém roztoku. Velikosti nádorů byly 50-250 mg, protože větší nádory mají tendenci ke vzniku nekrotického centra. Nicméně, při pokusech o zaměření

větších nádorů (300-600 mg) bylo dosažen v podstatě stejných výsledků. Pro každý čas byla použita tři zvířata. Myši byly utraceny humánním způsobem a jejich orgány byly zváženy a byla stanovena jejich radioaktivita. Výsledky pro reprezentativní orgány jsou vyjádřeny jako procento injikované dávky protilátky na gram tkáně (% ID/g) ScFv(L19) je rychle eliminován z krve ledvinami; oproti běžným protilátkám se neakumuluje v játrech ani jiných orgánech. 8% injikované dávky na gram tkáně se lokalizuje v nádoru již tři hodiny po injekci; následné snížení této hodnoty je způsobeno skutečností, že nádor zdvojuje svou velikost během 24-48 hodin. Poměry nádor:krev v 3, 5 a 24 hodině po injekci jsou 1,9, 3,9 a 11,8, v příslušném pořadí, pro L19, ale vždy nižší než 1,0 pro protilátku sloužící jako negativní kontrola.

Radioaktivně značený scFv(L19) se přednostně lokalizuje v nádorech již několik hodin po injekci, což ukazuje na jeho použitelnost pro imunoscintigrafickou detekci angiogenese u pacientů.

Příklad 4: Anti-ED-B protilátky selektivně barví nově vytvořené oční krevní cévy.

Angiogenese, tvorba nových krevních cév z preexistujících cév, je charakteristickým procesem, který je příčinou mnoha onemocnění, včetně nádorů a většiny očních onemocnění vedoucích ke ztrátě zraku. Schopnost selektivně rozpoznat a okludovat neovaskulaturu přinese nové diagnostické a terapeutické možnosti.

Zkoumali jsme, zda je B-FN specifickým markerem oční angiogenese a zda mohou protilátky rozpoznávající B-FN selektivně rozpoznávat oční neovaskulární struktury in vivo po

systémovém podání. Pro tento účel jsme stimulovali angiogenesi v králičí rohovce, která umožnila přímé pozorování nově vytvořených očních cév, pomocí chirurgické implantace pelet obsahujících vaskulární endotelový růstový faktor nebo ester forbolu (obr. 7). Sukralfatové (laskavý dar od Merck, Darmstad, Germany)/hydronové pelety obsahující buď 800 ng vaskulárního endotelového růstového faktoru (Sigma) nebo 400 ng forbol-12-myristat, 13-acetatu ("PMA", Sigma) byly implantovány do rohovky samic králíků plemene New Zealand White, způsobem popsaným v literatuře (D'Amato, R.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4082-4085, 1994). Angiogenese byla indukována oběma faktory. Králíci byly sledováni denně. Při použití obou indukčních činidel byly nově vytvořené krevní cévy silně pozitivní na ED-B při imunohistochemické vyšetření. Pro všechny další pokusy byly použity PMA pelety. Imunohistochemická vyšetření ukázala, že L19 silně barví neovaskulaturu indukovanou v králičí rohovce (obr. 8, 9a), ale ne pre-existující krevní cévy oka (obr. 9b,c) a jiné tkáně (data nejsou uvedena). Imunohistochemická vyšetření byla provedena způsobem popsaným v literatuře (Carnemolla, B. et al., Int. J. Cancer, 68: 397-405, 1996).

Příklad 5: Lidský protilátkový fragment L19, který se váže na ED-B se subnanomolární afinitou, rozpoznává oční angiogenesi in vivo

Za použití modelu angiogenese na králičí rohovce, který byl popsán v předešlém příkladu, a imunofotodetekční techniky (Neri, D. et al., Nature Biotechnol. 15: 1271-1275, 1997), jsme prokázali, že L19, chemicky navázaný na červený fluorofor Cy5, ale nikoliv protilátkový fragment (HyHEL-10)-Cy5, namířený proti irelevantnímu antigenu (obr. 10a,b), selektivně rozpoznává oční angiogenesi po intravenosní injekci.

Fluorescenční barvení rostoucích očních cév bylo jasně detekovatelné při použití L19 ihned po injekci a přetrvávalo po dobu alespoň dvou dnů, analogicky s předešlými pozorováními pro nádorovou angiogenesi. Následná imunofluorescenční mikroskopická analýza řezů z rohovky provedená ex vivo potvrdila lokalizaci L19, ale ne HyHEL-10, okolo vaskulárních struktur (obr. 10c,d). Průkaz rozpoznávání oční neovaskularizace protilátkou, společně s reaktivitou anti-B-FN protilátek u různých druhů, nabádá k dalším klinickým výzkumům. Imunofluorescenční zobrazení může být vhodné pro časnou detekci oční angiogenese u rizikových pacientů, dříve než se léze stanou manifestními při fluoroangiografii.

Některé metodologické podrobnosti:

Pro vyšetření imunofluorescence ex vivo a pro některá H/E barvení byly rohovky fixovány ve 4% paraformaldehydu v PBS před ponořením. Pokusy fluorescenční fotodetekce byly provedeny na králících zklidněných Acepromazinem v dávce 5 mg/kg. Pro pokusy cíleného rozpoznávání bylo 3,5 mg scFv(L19)₁-Cy5_{0,66} a 2,8 mg scFv(HyHEL-10)₁-Cy5_{0,83} injikováno intravenosně každému králíkovi (doba injekce = 15 minut). Silná fluorescence v rohovkové neovaskulatuře byla pozorována ihned po injekci L19, ale ne HyHEL-10, a přetrvávala několik hodin. V dalším testu na specificitu byl králíkům injekčně podán den předem scFv(HyHEL-10)-Cy5 a králíkům negativním při fotodetekci byl další den injikován scFv(L19)-Cy5 a bylo pozorováno silné fluorescenční barvení rohovkových nově vytvořených cév.

Pro fluorescenční detekci byly oči ozářeny wolframovou halogenovou lampou (model Schott KL1500; Zeiss, Jena, Germany) vybavenou Cy5 excitačním filtrem (Chroma, Brattleboro, VT,

USA) a dvěma světelnými kanály, jejichž konce byly umístěny přibližně 2 cm od oka. Fluorescence byla detekována chlazenou C-5985 monochromatickou CCD-kamerou (Hamatsu, Hamatsu-City, Japan), vybavenou C-upevněnou Canon Zoom čočkou (V6x16; 16-100 mm, 1: 1,9) a Cy5 emisním filtrem o průměru 50 mm (Chroma), umístěným ve vzdálenosti 3-4 cm od ozařovaného oka. Akviziční časy byly 0,4 s.

Cy5 fluoroangiografické pokusy byly provedeny se stejným vybavením, ale s intravenosní injekcí 0,25 mg Cy5-Tris (produkt reakce mezi Cy5-NHS a tris(hydroxymethyl)-aminomethanem; doba injekce = 5 minut). Akviziční časy byly 0,2 s.

Protilátkové fragmenty byly ve formě scFv. Přečištění scFv(L19) a scFv(HyHEL-10) a jejich značení N-hydroxysukcinimidovými estery (NHS) indokyaninu bylo popsáno v literatuře (Neri, D. et al., Nature Biotechnol. 15: 1271-1275, 1997; Fattorusso, R. et al., 1999, Structure 7: 381-390). Poměry protilátka: Cy5 při značení byly pro tyto dvě protilátky 1,5:1 a 1,2:1, v příslušném pořadí. Cy5-NHS bylo zakoupeno od Amersham Pharmacia Biotech (Zurich, Switzerland) a ovalbumin od Sugma (Buchs, Switzerland).

Po značení byly protilátkové konjugáty separovány od neinkorporovaného fluoroforu nebo fotosenzibilizátoru za použití PD-10 kolon (Amersham Pharmacia Biotech) uvedených do rovnováhy v 50 mM fosfátu, pH 7,4, 100 mM NaCl, (PBS). Imunoreaktivita protilátkových konjugátů byla měřena afinitní chromatografií na antigenních kolonách (Neri, D. et al., Nature Biotechnol. 15: 1271-1275, 1997) a ve všech případech byla > 78%. Imunokonjugáty byly analyzovány elektroforesou na

dodecylsíran sodný-polyakrylamidových gelech a migrovaly jako proužek o MW = 30000 Daltonů (čistota ³ 90%).

Příklad 6: Lidský protilátkový fragment L19, chemicky konjugovaný na fotosenzibilizační činidlo, kterým byl chlorin čtyřmocného cínu e₆, selektivně rozpoznává angiogenesi a způsobuje oklusi nově vytvořených cév při ozáření červeným světlem

Pro testování toho, zda může být pomocí selektivního rozpoznávání protilátkou dosaženo selektivní ablace cév, jsme injikovali králíkům L19 protilátkový fragment nebo irelevantní protein, který se nevychytává v nově vytvořených cévách (ovalbumin), navázané na fotosenzibilizační činidlo, kterým byl chlorin čtyřmocného cínu e₆, (které je zde označováno jako "PS"). Oči zvířat, kterým byla podána injekce, byly ozářeny červeným světlem (dávka = 78 J/cm²). Reprezentativní hodnoty jsou uvedeny na obr. 11. Nápadný makroskopicky odlišný nález byl pozorován 16 hodin po ozáření u králíků ošetřených L19-PS (obrázky 11a,b), s koagulací rohovkové neovaskulatury, ale nikoliv cév ve spojivce či jiných očních strukturách. Fluoroangiografie s indokyaninovým fluoroforem Cy5 (obrázek 11c) potvrdila uzávěr cév, který se projevil jako charakteristické hypofluorescentní oblasti. Naopak, hyperfluorescentní oblasti byly pozorovány v propouštějící neovaskulatuře v neozářených očích (obrázky 11d,h). Žádné makroskopické alterace nebyly pozorovány v ozářených cévách králíků ošetřených ovalbuminem-PS (obrázky 11e-g), ani oftalmoskopicky, ani při Cy5 fluoroangiografii. Efekt ozáření cíleně podaného L19-PS konjugátu při časných stádiích rohovkové angiogenese je uveden na obr. 11i-l. Selektivně koagulované krevní cévy byly makroskopicky viditelné u živých

zvířat (obr. 11i,j) a byly ještě zřetelnější u zvířat bezprostředně po utracení (obr. 11k,l).

Fotodynamické poškození bylo dále zkoumáno pomocí mikroskopických technik. Po ozáření mohla být okluse cév detekována standardními technikami barvení hematoxylinem/eosinem (H/E) jak v nefixovaných, tak v paraformaldehydem fixovaných řezech z rohovky zvířat léčených L19-PS (obr. 11b,j,f), ale ne zvířat léčených ovalbuminem-PS (obr. 11a,e,i). Apoptosa v části rohovky cíleně rozpoznané konjugátem obsahujícím fotosenzibilizační činidlo byla jasně viditelná ve fluorescenčním TUNEL testu (obr. 11c,g), ale byla špatně detekovatelná u negativních kontrol (obr. 11d,h). Vyšší zvětšení ukázalo apoptosu endotelových buněk v cévních strukturách (obr. 11g). Ani v TUNEL testu (není ukázáno), ani H/E barvením (obr. 11k,l) nebylo detekováno žádné poškození krevních cév v duhovce, skleře či spojivce léčených zvířat.

Selektivní fotodynamická ablace neovaskulatury bude přínosem pro léčbu očních onemocnění a jiných patologických stavů souvisejících s angiogenesí, které jsou přístupné pro ozáření pomocí světelných difuzérů nebo optických vláken. Výsledky této studie jasně ukazují, že oční neovaskulatura může být selektivně okludována bez poškození preexistujících krevních cév a normálních tkání.

Některé technické podrobnosti:

Sloučenina čtyřmocného cínu a chloru e_6 byla vybrána z různých fotosenzibilizačních činidel pro svou účinnost, rozpustnost a specifitu po navázání na králičí anti-myší polyklonální protilátku (Sigma). Tyto imunokonjugáty byly testovány na cílenou fotolýzu červených krvinek potažených monoklonální protilátkou specifickou pro lidský CD47 (č.

313441A; Pharmingen, San Diego, CA, USA). Sloučenina čtyřmocného cínu a chloru e_6 byla připravena způsobem popsáným v literatuře (Lu, X.M. et al., J. Immunol. Methods, 156: 85-99, 1992). Pro vazbu na proteiny byla sloučenina čtyřmocného cínu a chloru e_6 (2 mg/ml) mísená po dobu 30 minut při teplotě okolí v dimethylformamidu s 10-násobným molárním nadbytkem EDC (N'-3-dimethylaminopropyl-N-ethylkarbodiimid, hydrochlorid, Sigma). a NHS (N-hydroxysukcinimid, Sigma). Vzniklá aktivovaná směs se potom přidala do 8-násobného objemu proteinového roztoku (1 mg/ml) a provedla se inkubace při teplotě okolí po dobu 1 hodiny.

Po značení byly protilátkové konjugáty separovány od neinkorporovaného fluoroforu nebo fotosenzibilizátoru za použití PD-10 kolon (Amersham Pharmacia Biotech) uvedených do rovnováhy v 50 mM fosfátu, pH 7,4, 100 mM NaCl, (PBS). Imunoreaktivita protilátkových konjugátů byla měřena způsobem popsáným v předchozím příkladu.

V pokusech týkajících se fotodestrukce bylo králíkům podáno intravenosně 12 mg scFv(L19)₁- sloučeniny čtyřmocného cínu a chloru e_6 (0,8) nebo 38 mg ovalbuminu₁ - sloučeniny čtyřmocného cínu a chloru e_6 (0,36), a králíci byly drženi v temnu po dobu trvání pokusu. 8 hodin po injekci byly králíci uvedeni do anestezie ketaminem (35 mg/kg/ xylazinem (5 mg/kg)/ acepromazinem (1 mg/kg)) a jedno ze dvou očí bylo ozařováno po dobu 13 minut Schott KL 1500 wolframovou halogenovou lampou vybavenou Cy5 excitačním filtrem (Chroma) a dvěma světelnými kanály, jejichž konce byly umístěny přibližně 1 cm od oka. Ozářená plocha byla přibližně velikosti 1 cm² a ozáření bylo provedeno dávkou 100 mW/cm², jak byla změřena SL818 fotodetektorem (Newport Corp. Irvine, CA, USA). Nebylo pozorováno žádné známky diskomfortu po ozáření. Preventivně

králíci dostali po ozáření analgetika (buprenorfin 0,03 mg/kg). Pro sledování fotodestrukce byly oči vyšetřovány oftalmoskopem a byly fotografovány za použití "fundus" kamery KOWA SL-14 (GMP SA, Rennens, Lausanne, Switzerland). Pět králíků bylo ošetřeno konjugátem obsahujícím sloučeninu čtyřmocného cínu a chloru e_6 a ozářeno pouze na jedno oko, zatímco druhé oko sloužilo jako vnitřní negativní kontrola. Jako další kontrola byly použity dva králíci, kteří byly pouze ozářeni, ale nebyl jim podán žádný konjugát s fotosenzibilizátorem.

Ihned po utracení králíků nadměrnou dávkou anestetika byly bulby enukleovány, rohovky byly odstraněny, byly ponořeny do Tissue Tek (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) a zmrazeny. Pro imunofluorescenční vyšetření ex vivo a pro některé H/E barvení byly rohovky fixovány ve 4% paraformaldehydu v PBS před tím, než byly ponořeny do Tissue Tek. Kryostatové řezy průměru 5 μ m byly použity pro další mikroskopickou analýzu. Fluorescenční TUNEL testy byly provedeny podle návodu výrobce (Roche Diagnostic, Rotkreutz, Switzerland).

Tabulka 1: Sekvence vybraných anti-ED-B protilátkových klonů

Klon	VH řetězec			VL řetězec		
	31-33*	50-54*	95-98*	32*	50*	91-96*
A2	SYA	AISGSG	GLSI	Y	G	NGWYPW
G4	SYA	AISGSG	SFSF	Y	G	GGWLPLY
E1	SYA	AISGSG	FPFY	Y	G	TGRIPP
H10	SFS	SIRGSS	FPFY	Y	G	TGRIPP
L19	SFS	SIRGSS	FPFY	Y	Y	TGRIPP

Relevantní aminokyselinové pozice (*: číslování podle Tomlinson et al., 1995, EMBO J., 14: 4628-4638) protilátkových klonů izolovaných z navržených syntetických knihoven. Jednopísmenné aminokyselinové kódy jsou použity podle standardního IUPAC názvosloví.

Tabulka 2: Afinity anti-ED-B scFv fragmentů

Klon	$k_{on} (s^{-1}M^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})^B$	$k_{off} (s^{-1})^C$	$K_d (M)^*$
A2	1.5×10^5	2.8×10^{-3}	-	1.9×10^{-8}
G4	4.0×10^4	3.5×10^{-3}	-	8.7×10^{-8}
E1	1.6×10^5	6.5×10^{-3}	-	4.1×10^{-8}
H10	6.7×10^4	5.6×10^{-4}	9.9×10^{-5}	1.5×10^{-9}
L19	1.1×10^5	9.6×10^{-5}	6.0×10^{-6}	5.4×10^{-11}

*) $K_d = k_{off}/k_{on}$. Pro vysoce-afinitní ligandy H10 a L19 nejsou hodnoty k_{off} z BIAcore analýzy dostatečně přesné z důvodu vlivu negativně nabitě karboxylované pevné dextranové matrice; K_d hodnoty jsou proto vypočítány z měření K_{off} získaných v kompetičních pokusech (viz příklady). k_{oo} , kinetická disociační konstanta; k_{on} , kinetická asociační konstanta; k_d , disociační konstanta. B = měření na BIAcore; C = měření pomocí kompetice s elektrochemiluminiscenční detekcí. Hodnoty jsou přesné pro +/- 50%, podle přesného stanovení koncentrace.

Seznam sekvencí

- <110> EUDGENOESSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE ZURICH
- <120> Specifické vazebné molekuly pro scintigrafii, konjugáty obsahující tyto molekuly a způsoby léčby angiogenese
- <130> 1900PTEP
- <140>
- <141>
- <150> US 09/075338
- <151> 1998-05-11
- <150> US
- <151> 1999-04-28
- <160> 21
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Arteficiální sekvence
- <220>
- <223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: LMB1bis
- <400> 1

gcggcccagc cggccatggc cgag

24

- <210> 2
- <211> 54
- <212> DNA
- <213> Arteficiální sekvence
- <220>
- <223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DP47CDR1for
- <400> 2

gagcctggcg gaccagctc atmnmmnmnm ngctaaaggt gaatccagag gctg

54

- <210> 3
- <211> 23

<212> DNA
<213> Arteficiální sekvence
<220>
<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DP47CDR1back
<400> 3

atgagctggg tccgccaggc tcc

23

<210> 4
<211> 60
<212> DNA
<213> Arteficiální sekvence
<220>
<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DP47CDR2for
<400> 4

gtctgcgtag tatgtggtac cmnnactacc mnnaatmnt gagaccact ccagcccctt 60

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Arteficiální sekvence
<220>
<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DP47CDR2back
<400> 5

acatactacg cagactccgt gaag

24

<210> 6
<211> 53
<212> DNA
<213> Arteficiální sekvence
<220>
<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: JforNot
<400> 6

tcattctcga cttgcggcgc ctttgatttc caccttggtc ctttgccga acg

53

<210> 7
<211> 47
<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DPKCDR1for

<400> 7

gtttctgctg gtaccaggct aamngctgc tgtaacact ctgactg

47

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DPKCDR1back

<400> 8

ttagcctggg accagcagaa acc

23

<210> 9

<211> 46

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DPKCDR2for

<400> 9

gccagtggcc ctgctggatg cmnntagat gaggagcctg ggagcc

46

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DPKCDR2back

<400> 10

gcatccagca gggccactgg c

21

<210> 11

<211> 45

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DP47baNco

<400> 11

gcggcccagc atgccatggc cgaggtgcag ctgttgagct ctggg

45

<210> 12

<211> 55

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: CDR3for

<400> 12

ggttccctgg cccagtagt caaamnnmnn mnnmnnnttc gcacagtaat atacg

55

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: VHpullth

<400> 13

gcggcccagc atgccatggc cgag

24

<210> 14

<211> 66

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: Jassm

<400> 14

cccgtaccg ccactggacc catcgccact cgagacggtg accaggggtc cctggcccca 60

gtagtc

66

<210> 15

<211> 62

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DPK22asm

<400> 15

gatgggtcca gtggcggtag cgggggcgcg tcgactggcg aaattgtgtt gacgcagtct 60
cc 62

<210> 16

<211> 63

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: DPK3for

<400> 16

caccttggtc ccttgccga acgtmnnccg mnnmnnacm nntgctgac agtaatacac 60
tgc 63

<210> 17

<211> 56

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: Jfornot

<400> 17

gagtcattct cgacttgccg ccgctttgat ttccaccttg gtcccttggc cgaacg 56

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Arteficiální sekvence

<220>

<223> Popis arteficiální sekvence: PCR primer: VLPullth

<400> 18

gatgggtcca gtggcggtag cggg 24

<210> 19

<211> 116

<212> PRT

<213> VH protilátky specifické pro ED-B doménu fibronektinu
 <400> 19

Glu Val Gln Leu Leu 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 Phe

20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr 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 Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> protilátková spojovací skupina

<400> 20

Gly Asp Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Ser Thr Gly

1 5 10

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> VL protilátky specifické pro ED-B doménu fibronektinu
<400> 21

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20

25

30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35

40

45

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65

70

75

80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro

85

90

95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Protilátka se specifickou afinitou pro charakteristický epitop ED-B domény fibronektinu, kde uvedená protilátka má afinitu k uvedenému ED-B epitopu v subnanomolárních koncentracích.
2. Protilátka podle nároku 1, kde uvedená protilátka rozpoznává ED-B(+) fibronektin.
3. Protilátka podle nároku 1, kde uvedená protilátka je v scFv formátu.
4. Protilátka podle nároku 3, kde uvedená protilátka je rekombinantní protilátka.
5. Protilátka podle nároku 3, jejíž afinita je zlepšena vložením omezeného počtu mutací v jejích zbytcích CDR.
6. Protilátka podle nároku 5, kde zbytky jsou zbytky 31-33, 50 a 52 a 54 VH a dva zbytky 32 a 50 VL domény, které byly mutovány.
7. Protilátka podle nároku 1, kde uvedená protilátka se váže na ED-B doménu fibronektinu s K_d 54 pM.
8. Protilátka podle nároku 1 mající následující aminokyselinovou sekvenci:

VH

EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
SFSMSWVRQA PGKGLEWVSS ISGSSGTTY
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED
TAVYYCAKPF PYFDYWGQGT LVTVSS

(SEQ ID NO:19)

spojovací skupina

GDGSSGGSGGASTG

(SEQ ID NO:20)

VL

**EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY YASSRATGIP
DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ
QTGRIPPTFG QGTKVEIK**

(SEQ ID NO: 21)

9. Protilátka podle nároku 1, kde uvedená protilátka je funkčně ekvivalentní varianta L19.

10. Protilátka podle nároku 9, kde uvedená protilátka je radioaktivně značená.

11. Protilátka podle nároku 10, kde uvedená protilátka je značená radioaktivním jodem.

12. Použití protilátky se specifickou afinitou pro charakteristický epitop ED-B domény fibronektinu, která má zlepšenou afinitu k uvedené ED-B doméně, pro rychlé cílené zaměření markerů angiogenese.

13. Použití podle nároku 12, které je určeno pro imunoscintigrafickou detekci angiogenese.

14. Použití podle nároku 13, které je určeno pro detekci onemocnění charakterizovaných vaskulární proliferací, jako je diabetická retinopatie, stařecká makulární degenerace nebo nádory.

15. Použití podle nároku 12, ve kterém protilátka lokalizuje příslušné tkáně během tří až čtyř hodin, nejlépe během 3 hodin, po injekci.

16. Diagnostický kit obsahující protilátku se specifickou afinitou pro charakteristický epitop ED-B domény fibronektinu, kde uvedená protilátka má zlepšenou afinitu k uvedené ED-B doméně, a jedno nebo více činidel nutných pro detekci angiogenese.

17. Použití protilátky se specifickou afinitou pro charakteristický epitop ED-B domény fibronektinu, kde uvedená protilátka má zlepšenou afinitu k uvedené ED-B doméně, pro diagnostiku a terapii nádorů a onemocnění charakterizovaných vaskulární proliferací.

18. Konjugáty v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahují protilátku podle nároku 1 a molekulu schopnou indukovat koagulaci krve a uzavření krevní cévy.

19. Konjugáty podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že molekulou schopnou indukovat koagulaci krve a uzavření krevní cévy je fotoaktivní molekula.

20. Konjugáty podle nároku 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že fotoaktivní molekulou je fotosenzibilizační činidlo.

21. Konjugáty podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že fotosenzibilizační činidlo absorbuje světlo vlnové délky větší než 600 nm.

22. Konjugáty podle nároku 21 v y z n a č u j í c í s e

t í m, že fotosenzibilizační činidlo je derivát sloučeniny čtyřmocného cínu s chlorem e_6 .

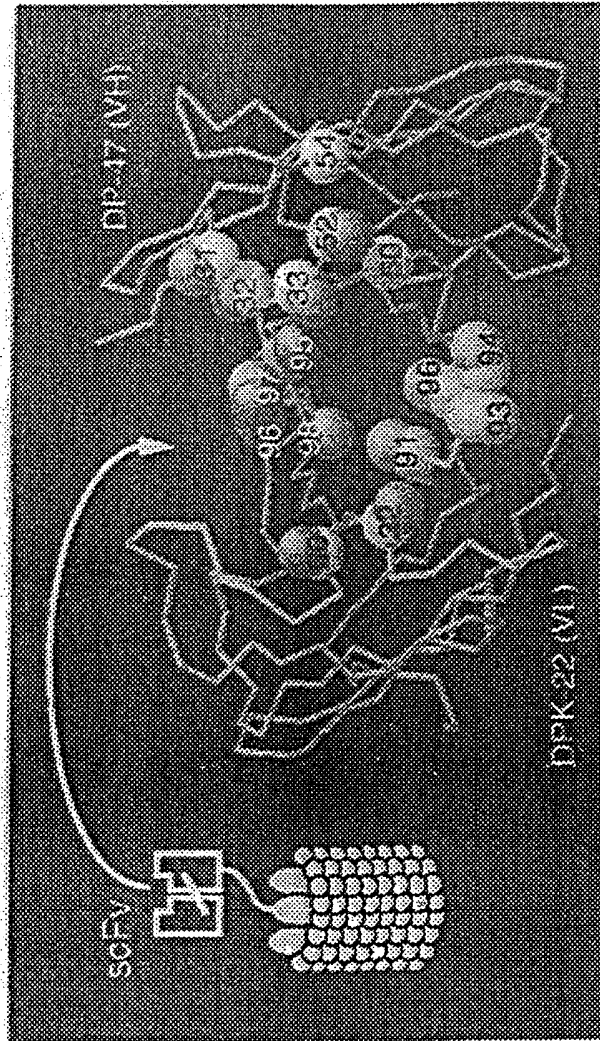
23. Použití konjugátu podle nároku 18 pro přípravu injekčního prostředku pro léčbu patologických stavů souvisejících s angiogenesí.

24. Použití podle nároku 23, ve kterém je patologický stav související s angiogenesí způsoben nebo spojen s oční angiogenesí.

13.11.00

PV 2000-4216

1/17

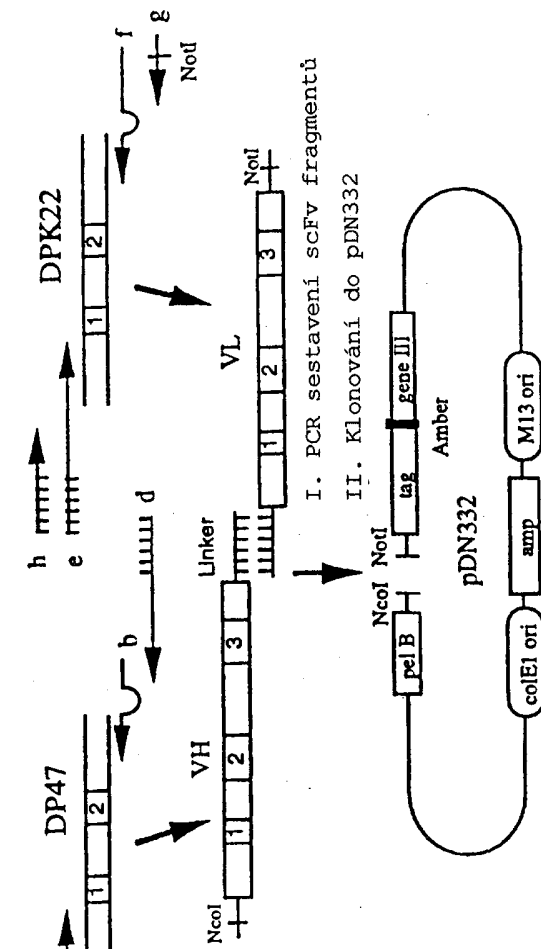


Obr. 1

A)

Obr. 1

B)



VH primery

- a DP47baNco
- b CDR3for
- c VHpullth
- d Jassm

2/17

GCG GCC CAG CAT GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG (SEQ ID NO:11)

GGT TCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA MNN MNN MNN TTT CGC ACA GTA

ATA TAC G (SEQ ID NO:12)

GCG GCC CAG CAT GCC ATG GCC GAG (SEQ ID NO:13)

CCC GCT ACC GCC ACT GGA CCC ATC GCC ACT CGA GAC GGT GAC CAG GGT

TCC CTG GCC CCA GTA GTC (SEQ ID NO:14)

VL primery

- e DPK22assm
- f DPK3for
- g Jfornot
- h pullth

GAT GGG TCC AGT GGC GGT AGC GGG GGC GCG TCG ACT GGC GAA ATT GTG

TTG ACG CAG TCT CC (SEQ ID NO:15)

CAC CTT GGT CCC TTG GCC GAA CGT MNN CGG MNN MNN ACC MNN CTG CTG

ACA GTA ATA CAC TGC (SEQ ID NO:16)

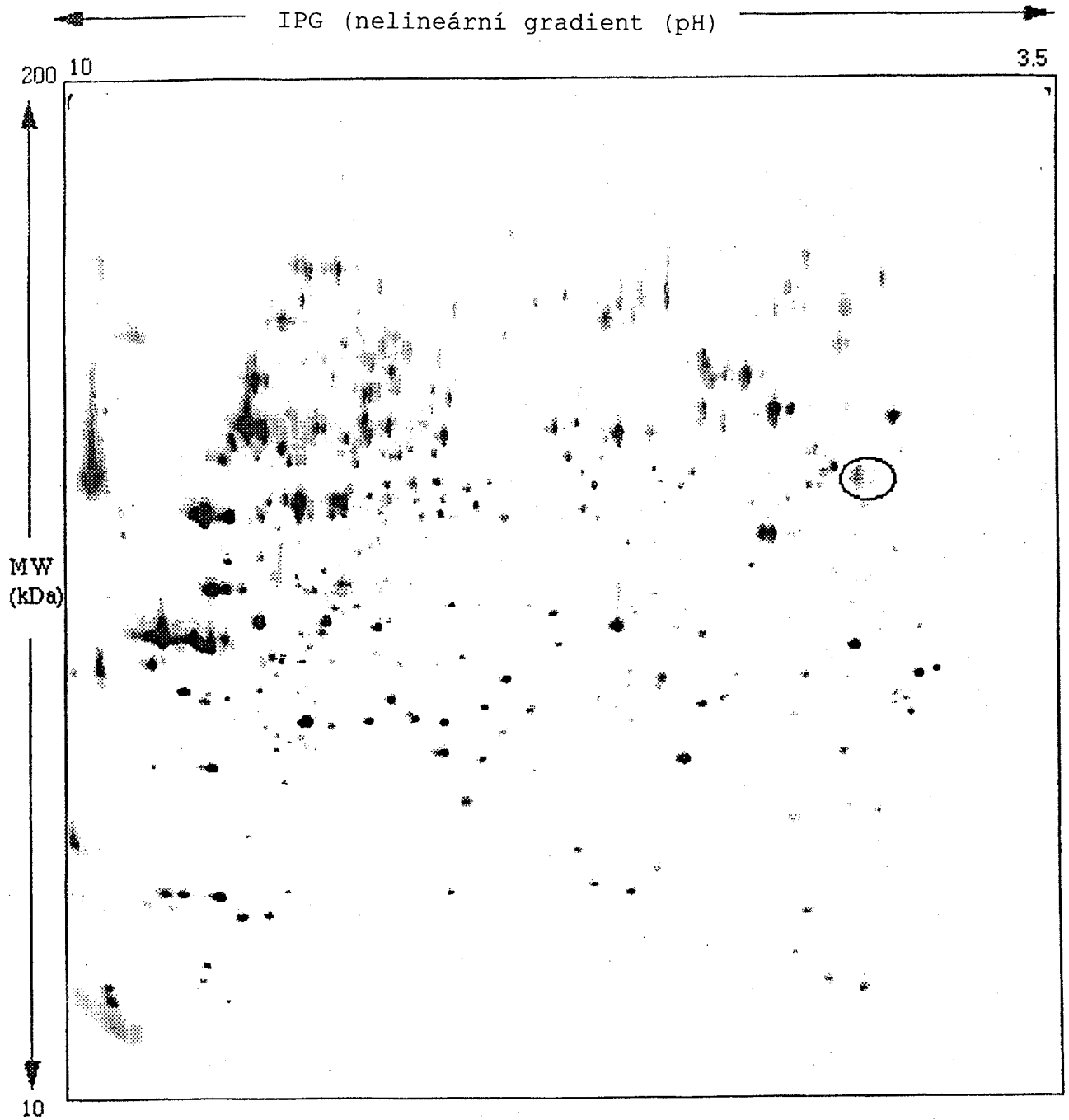
GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC TTG GCC

GAA CG (SEQ ID NO:17)

GAT GGG TCC AGT GGC GGT AGC GGG (SEQ ID NO:18)

13.11.00

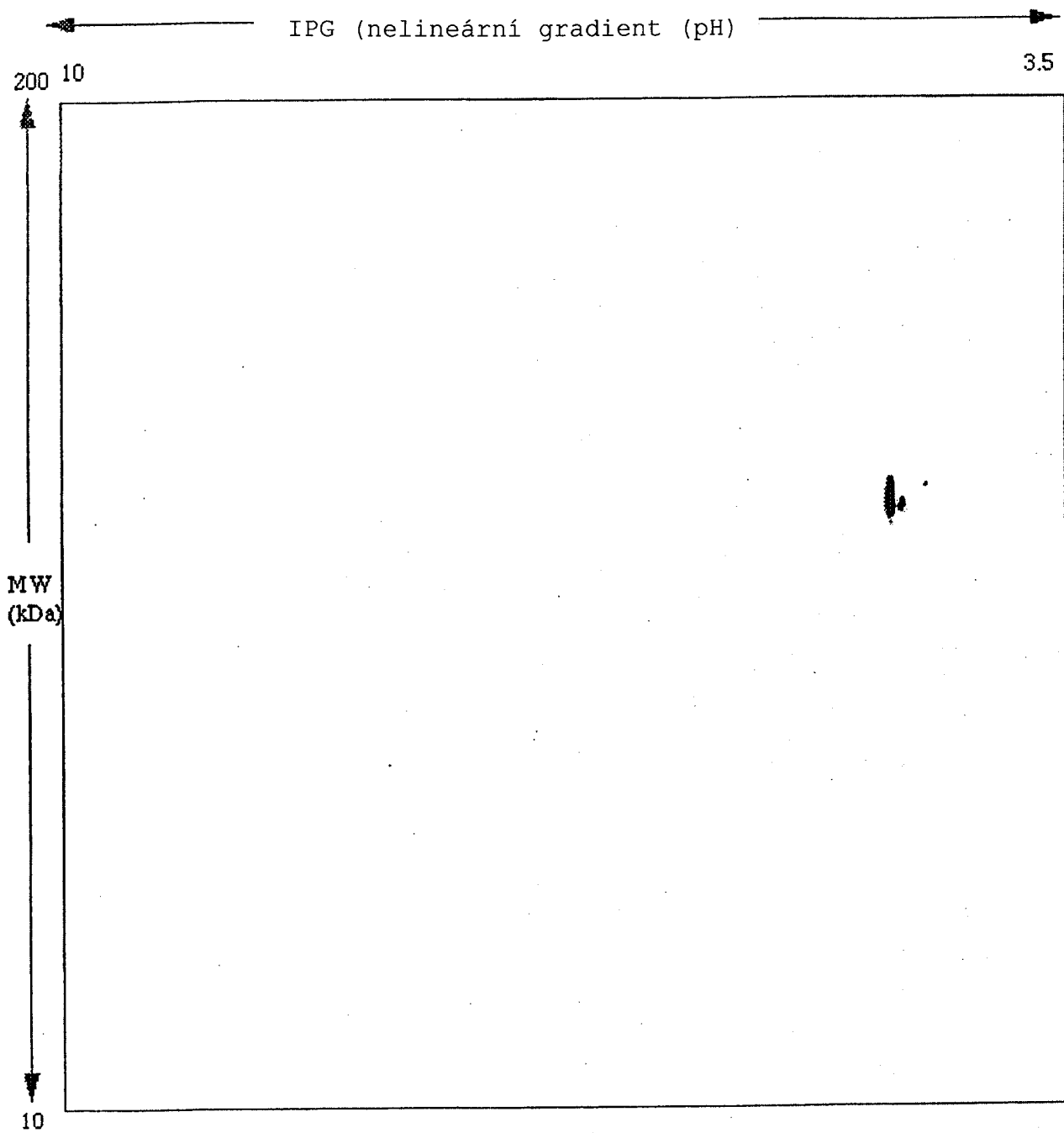
3/17



Obr. 2A

13.11.00

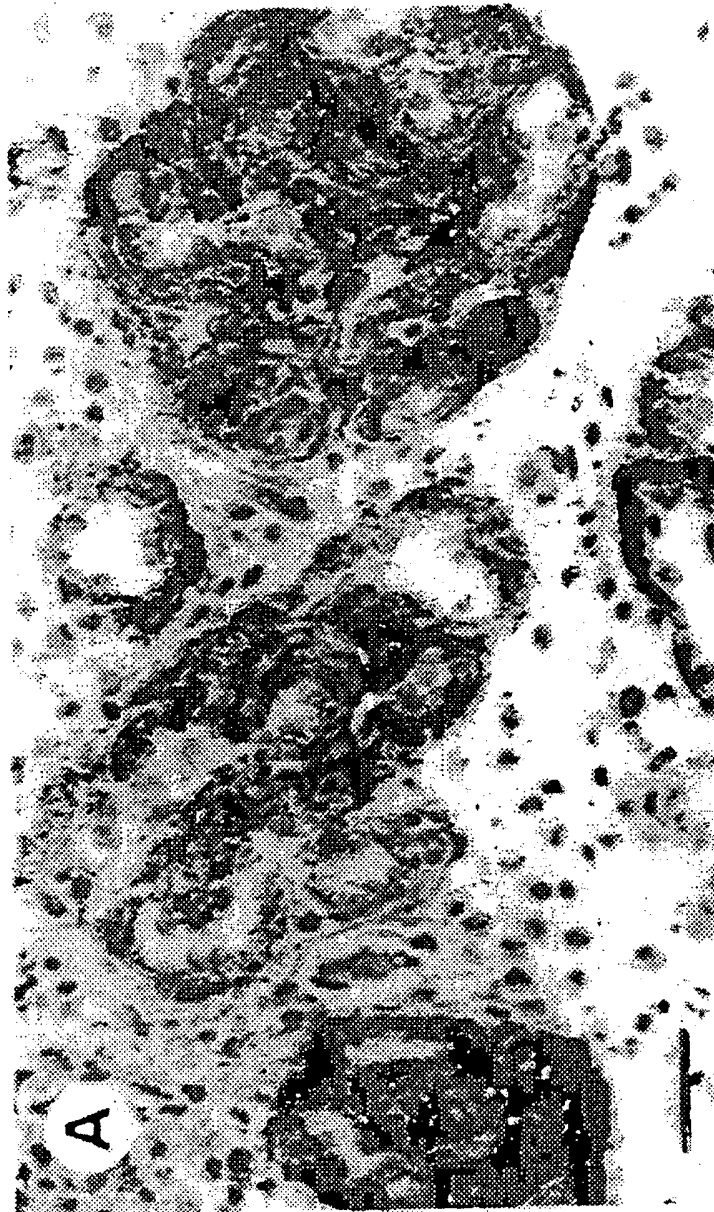
4/17



Obr. 2B

13.11.00

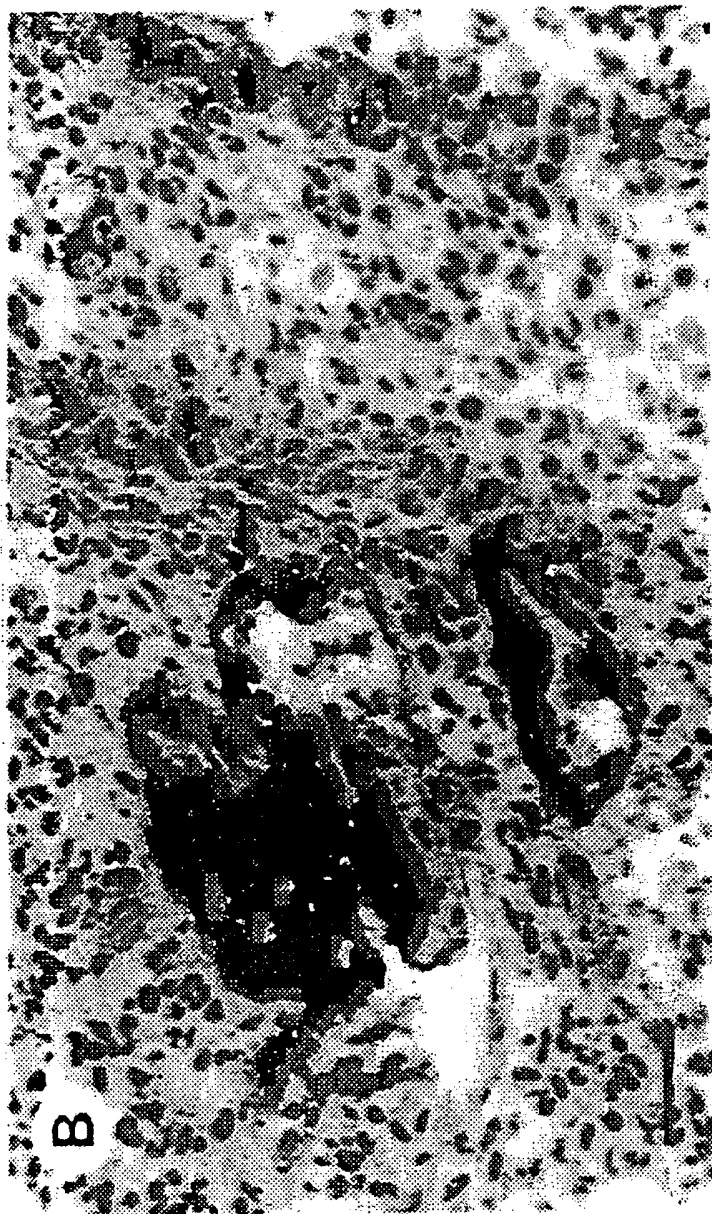
5/17



Obr. 3A

13.11.00

6/17



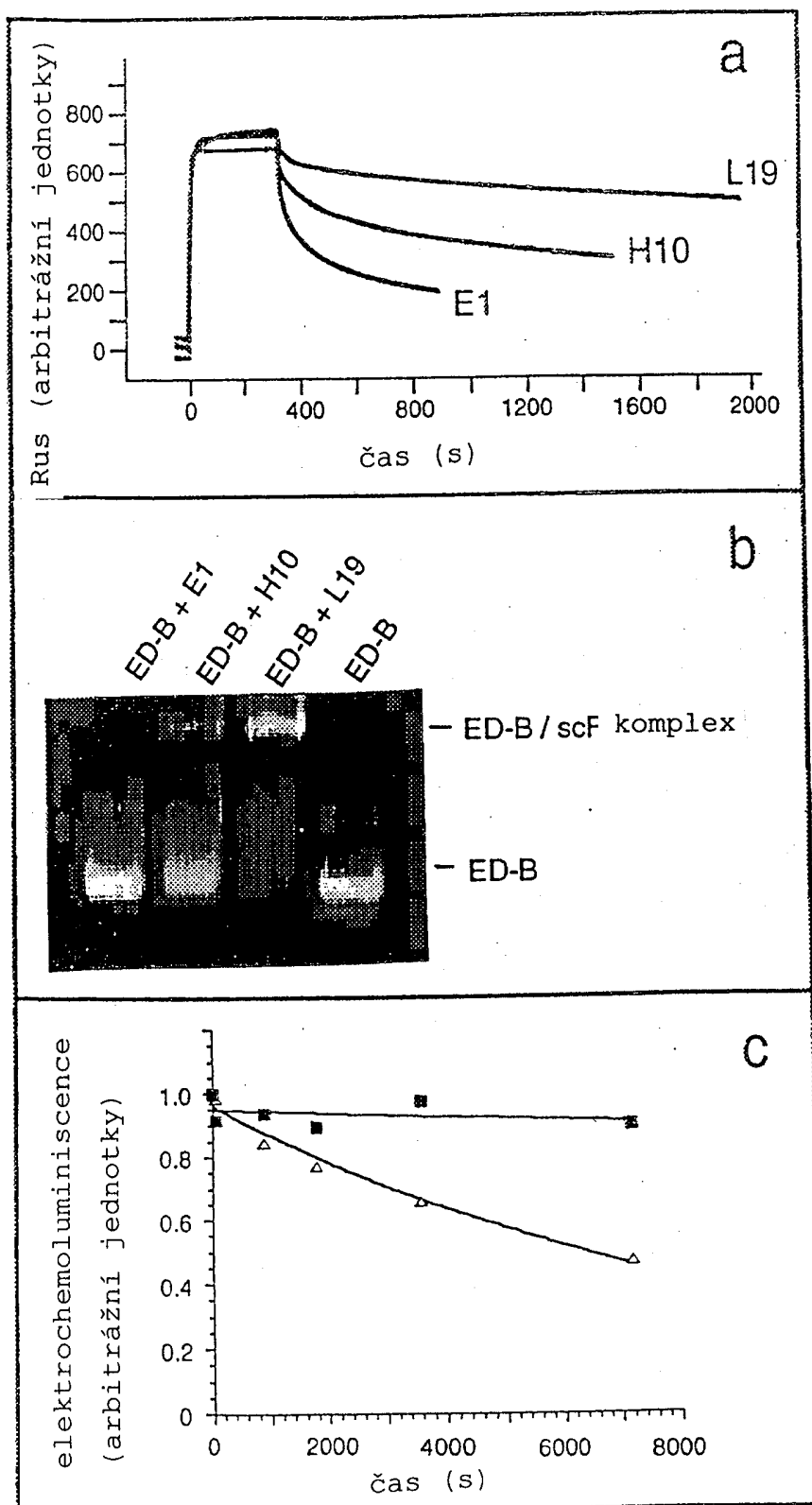
Obr. 3B

13.11.00

7/17



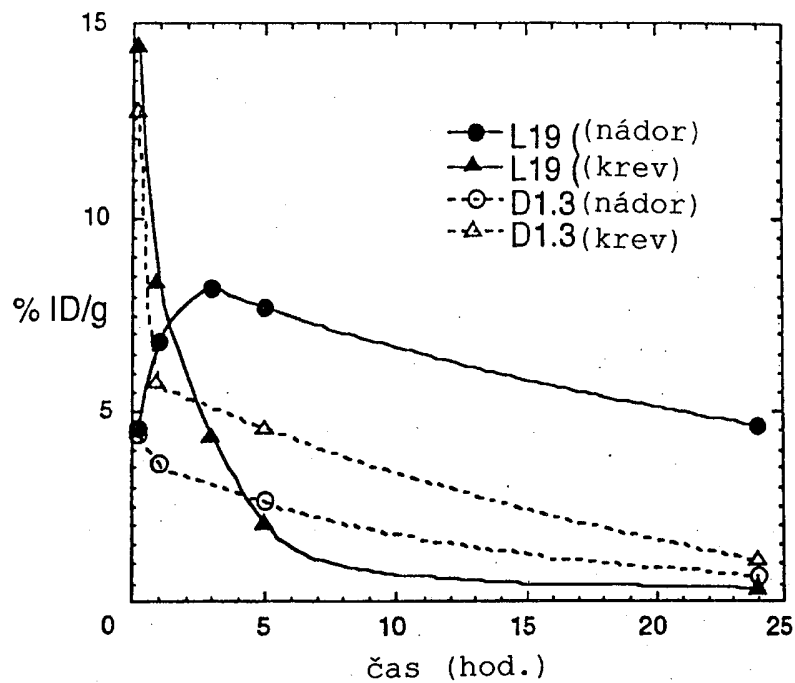
Obr. 3C



Obr. 4

13.11.00

9/17



čas(h)	h	scFv (L19)							scFv (D1.3)	
		ledviny	slezina	plíce	játra	mozek	krev	nádor	krev	nádor
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 ± 1.1	12.7 ± 0.1	4.4 ± 1.4
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	2.1 ± 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 ± 0.3	0.2 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.4 ± 0.1	4.7 ± 0.6	1.1 ± 0.5	0.7 ± 0.4

Obr. 5

VH
 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCASGFTFS
 SFSMSWVRQA PGKGLEWVSS ISGSSGTTY
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED
 TAVYYCAKPF PYFDYWGQGT LVTVSS
 (SEQ ID NO:19)

spojovací skupina

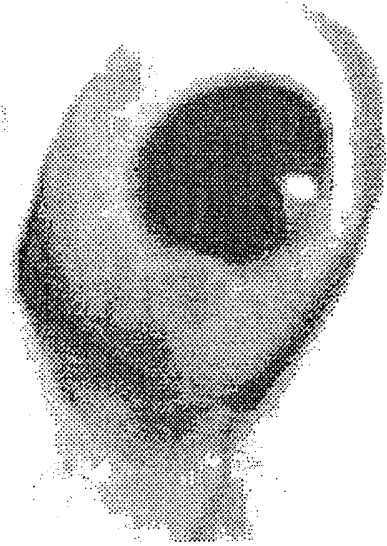
GDSSGGSGASTG

(SEQ ID NO:20)

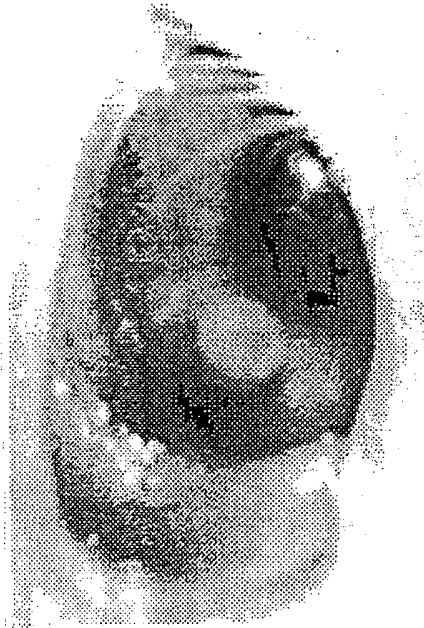
VL
 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
 SSYLAWYQQK PGQAPRLIY YASSRATGIP
 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVY CQ
 QTGRIPPTFG QGTKVEIK
 (SEQ ID NO:21)



den 9/králík 2/vpravo/VEGF :



den 9/králík 1/vpravo/VEGF



den 9/králík 1/vlevo/nc

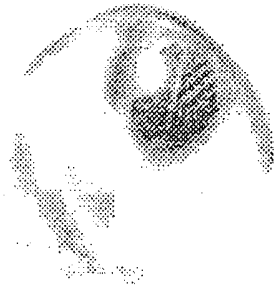


den 9/králík 2/vlevo/PMA

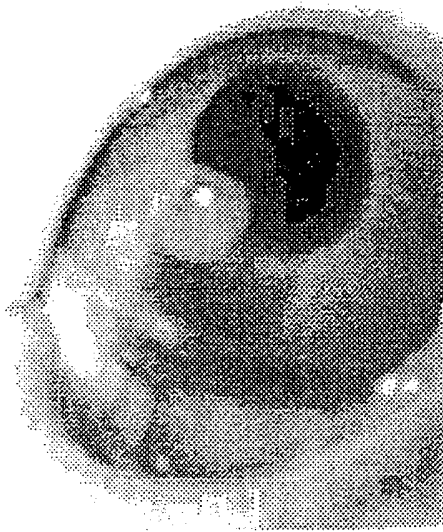
Obr. 7B



den 9/králík 3/vlevo/VEGF



den 9/králík 3/vpravo/PMA



den 9/králík 4/vlevo/PMA



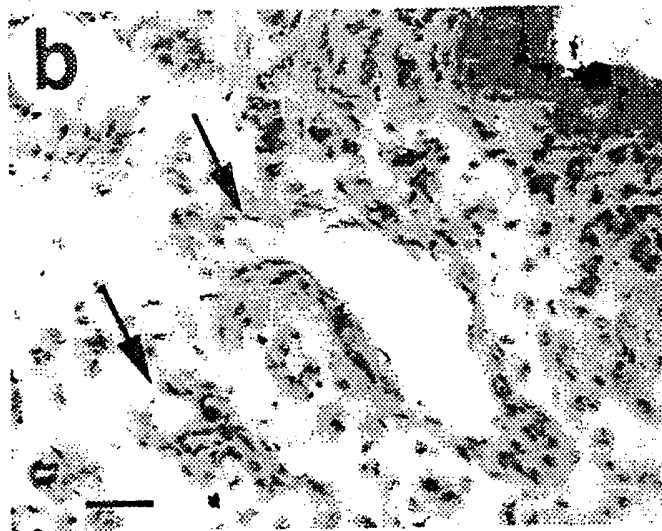
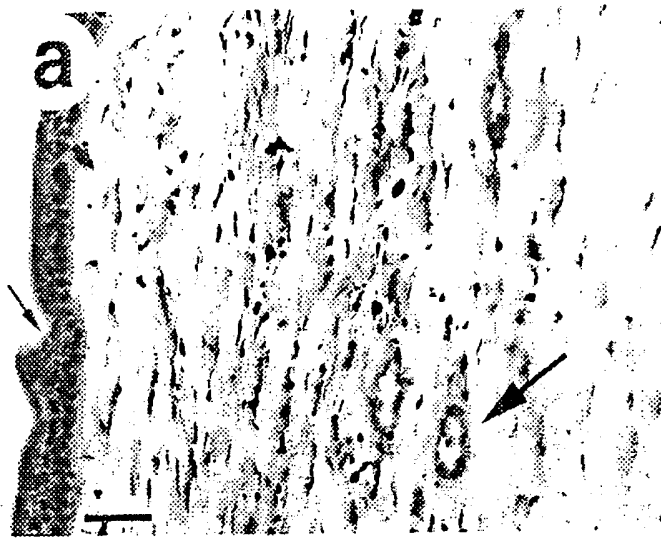
den 9/králík 4/vpravo/nC

13.11.00

13/17



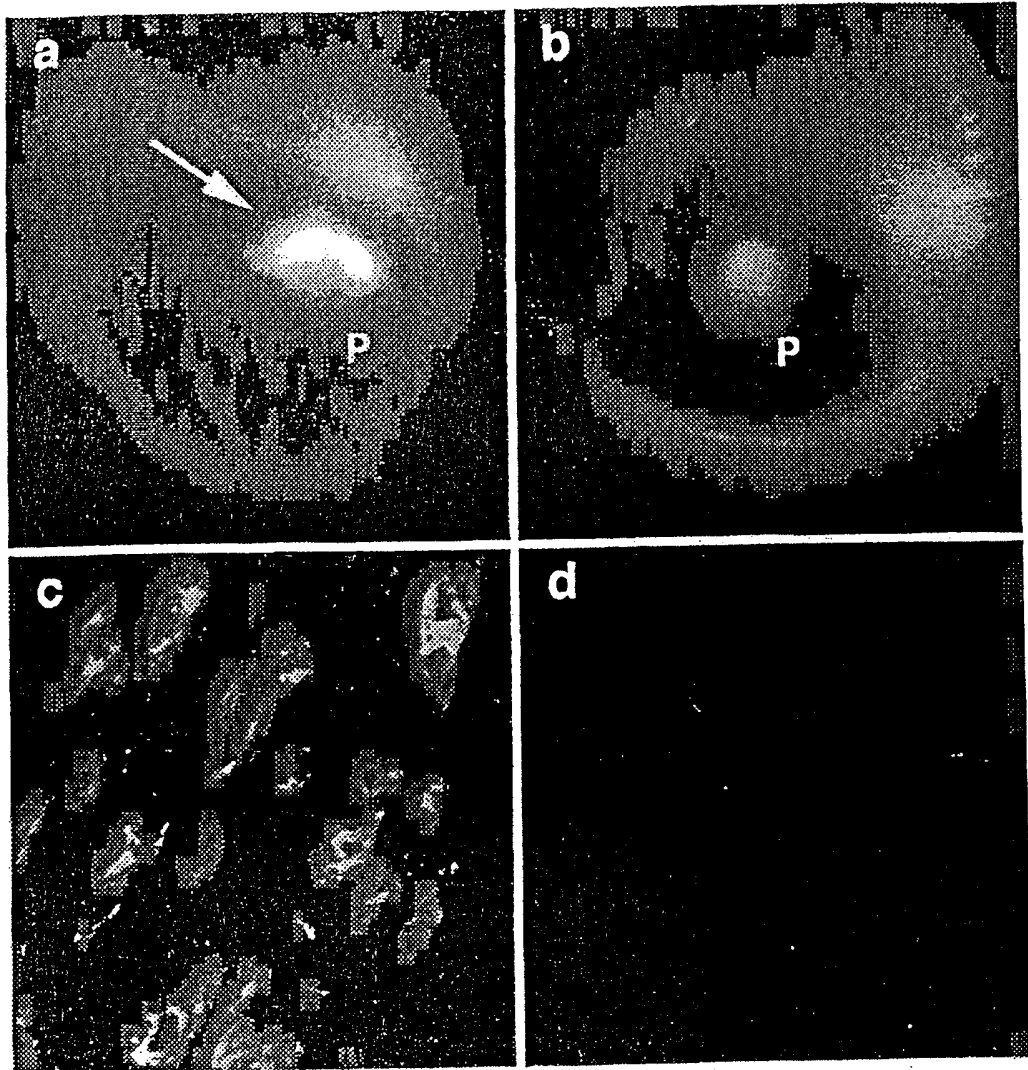
Obr. 8



Obr. 9

13.11.00

15/17



Obr. 10

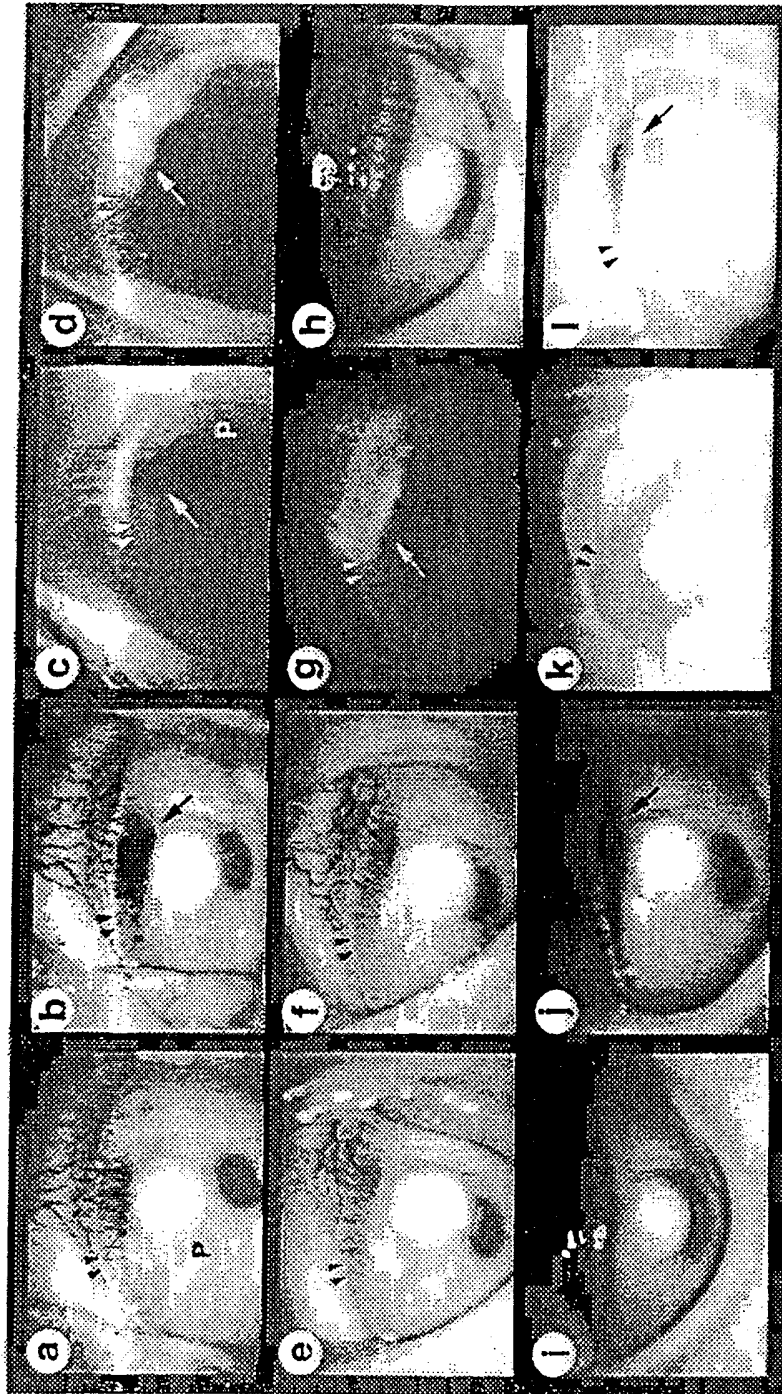


Fig. 12

