

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **236281**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **415391**

(51) Int. Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

G01N 33/563 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **28.12.2015**

(54) **Przeciwciało formatu scFv, stanowiące inhibitor białka VEGF-C, sposób wyodrębniania i wykrywania VEGF-C oraz zastosowanie tego przeciwciała**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
03.07.2017 BUP 14/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
28.12.2020 WUP 21/20

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

MONIKA BZOWSKA, Kraków, PL
MAŁGORZATA KULESZA, Pruszków, PL
RENATA MĘŻYK-KOPEĆ, Kraków, PL
TOMASZ KLAUS, Brzesko, PL
BARBARA WYROBA, Kraków, PL
JOANNA BERETA, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Maciej Czarnik

PL 236281 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy przeciwciała formatu scFv, stanowiącego inhibitor białka będącego czynnikiem wzrostu śródbłonka naczyniowego C (VEGF-C). W szczególności, sekwencje białkowe według wynalazku stanowią jednołańcuchowe fragmenty ludzkich przeciwciał (scFv). Celem wynalazku jest zapewnienie cząsteczek, które mogą wydajnie i specyficznie wiązać ludzkie i mysie białko VEGF-C. Dodatkowym celem wynalazku jest dostarczenie sposobu wykrywania ludzkiego i mysiego białka VEGF-C oraz oznaczania jego ilości i/lub stężenia.

Nowotwory są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Skuteczna terapia, związana z chirurgicznym usunięciem czy też naświetlaniem guzów pierwotnych, jest często niemożliwa ze względu na migrację komórek nowotworowych z pierwotnego środowiska do innych narządów i tkanek w organizmie. Do tworzenia przerzutów nowotwory złośliwe wykorzystują zarówno naczynia krwionośne, jak i limfatyczne (Bzowska M et al., *Acta Biochim Pol* 2013, 60(3):263–75). Do tej pory centrum zainteresowania badaczy stanowiło zjawisko angiogenezy, czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych. Stało się ono głównym celem terapii hamujących przerzutowanie nowotworów, choć ich skuteczność okazała się mniejsza od spodziewanej. Jedną z wielu możliwych przyczyn niepowodzenia tego typu terapii jest zaniedbanie wpływu naczyń limfatycznych jako alternatywnej drogi ucieczki komórek nowotworowych z guza pierwotnego (Potente M et al. *Cell* 2011; 146(6): 873–87). Najbardziej obiecujący cel dla hamowania zjawiska limfangiogenezy stanowi blokada osi sygnałowej pomiędzy białkiem VEGF-C (ang. vascular endothelial growth factor C; czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego C) a jego receptorami VEGFR-2 oraz VEGFR-3 (ang. vascular endothelial growth factor receptor; receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego) (Stacker SA et al. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(3): 159–72). VEGF-C należy do rodziny czynników wzrostu śródbłonka naczyniowego, składającej się z siedmiu białek: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F oraz PlGF (ang. placental growth factor, łożyskowy czynnik wzrostu). Odkryte w 1996 roku białko VEGF-C zostało opisane jako niekowalencyjny homodimer, będący ligandem dla VEGFR-2 i VEGFR-3 (Joukov V et al. *EMBO J.* 1996; 15(7):290–298), choć niektóre doniesienia informują również o występowaniu kowalencyjnie połączonych dimerów VEGF-C (Leppänen V-M et al. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2009; 107(6):2425–2430). Jego powinowactwo względem receptorów regulowane jest przez wielostopniową obróbkę proteolityczną, podczas której siła oddziaływania kolejno powstających form VEGF-C z VEGFR-3 wzrasta. Z kolei VEGFR-2 może rozpoznawać tylko dojrzałą formę VEGF-C (Joukov V et al. *EMBO J* 1997; 16(13):3898–3911). Sekwencje dojrzałej formy ludzkiego i mysiego białka VEGF-C różnią się tylko dwoma resztami aminokwasowymi (rekordy bazy danych UniProtKB/Swiss-Prot o numerach P97953 i P49767 odpowiednio dla mysiego i ludzkiego VEGF-C). VEGFR-2 i VEGFR-3 to receptory o aktywności kinazy tyrozynowej, które w wyniku związania liganda zostają aktywowane – ulegają dimeryzacji i wzajemnej fosforylacji domen cytoplazmatycznych (Joukov 1996, op. cit.). Pod wpływem oddziaływania VEGF-C z jego receptorami może dochodzić do powstania jedynie homodimerów VEGFR-3 lub heterodimerów VEGFR-2/3 (Nilsson I et al. *EMBO J* 2010; 29(8):1377–88). Prawdopodobnie ważną rolę w osi sygnałowej pomiędzy VEGF-C a jego receptorami odgrywają również nieposiadające aktywności enzymatycznej neuropiliny, które pełnią funkcję koreceptorów dla VEGFR-2 i VEGFR-3 (Kärpänen T et al. *FASEB J* 2006; 20(9): 1462–72).

VEGF-C pełni istotną rolę w limfangiogenezie, a zatem bierze udział w wielu różnorodnych procesach fizjologicznych i patologicznych takich jak np.: rozwój układu limfatycznego w trakcie embriogenezy, gojenie ran, przewlekłe stany zapalne, choroby autoimmunologiczne czy przerzutowanie nowotworów (Chachaj A i Szuba A [w:] *Angiogenesis and Vascularisation* Dulak J et al. (eds.); Springer Vienna 2013, pp. 27–66). VEGF-C poprzez aktywację VEGFR-3 stymuluje proliferację oraz migrację komórek śródbłonka limfatycznego, a także dostarcza im sygnał przetrwania (Mäkinen T et al. *EMBO J* 2001; 20(17):4762–4773). Ponadto, chociaż głównym pro-angiogennym czynnikiem pozostaje VEGF-A, VEGF-C także może stymulować angiogenezę przez oddziaływanie z heterodimerami VEGFR-2/3 (Nilsson 2010, op. cit.).

Głównymi czynnikami pro-limfangiogennymi o kluczowym znaczeniu w przerzutowaniu nowotworów są białka VEGF-C i VEGF-D, które indukują powstawanie nowych naczyń limfatycznych w okolicy guza przez aktywację VEGFR-3 i koreceptora neuropiliny-2 (Kärpänen 2006; op. cit.; Mandriota SJ et al. *EMBO J* 2001; 20(4):672–82; Chen Z et al. *Cancer Res* 2005; 65(19):9004–9011; Xu Y et al. *J Cell Biol* 2010; 188(1):115–30). W ten sposób komórki nowotworowe wydzielając VEGF-C zapewniają sobie drogę ucieczki do pobliskiego węzła limfatycznego, z którego mogą rozprzestrzeniać się dalej zarówno drogą limfatyczną, jak i krwionośną (Stacker SA et al. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):573–583). Zasadniczą

rolę VEGF-C w limfangiogenezie związanej z nowotworami potwierdziły eksperymenty *in vivo*, w których zablokowanie tego czynnika hamowało przerzutowanie komórek nowotworowych (Chen 2005; *op. cit.*; Wang F et al. *Exp Ther Med* 2010; 1(5):899–904).

Ocena obecności i/lub poziomu białka VEGF-C w materiale biologicznym może mieć zatem znaczenie diagnostyczne w medycynie. Opis patentowy US20100317533 ujawnia panel biomarkerów służących do diagnostyki i monitorowania przebiegu choroby nowotworowej; jednym ze składników panelu jest VEGF-C, którego obecność jest związana z potencjałem nowotworu do tworzenia przerzutów. W opisie patentowym US2012231480 został z kolei ujawniony sposób oceny diagnostycznej zmian w obrębie trzustki za pomocą pomiaru poziomu białek VEGF-A i VEGF-C oraz prostaglandyny E2.

Do oznaczania białka VEGF-C w materiale biologicznym mogą służyć m.in. przeciwciała, a zwłaszcza przeciwciała monoklonalne. Przeciwciała klasy IgG specyficzne względem VEGF-C zostało ujawnione w opisie patentowym US2011143428. Przeciwciała to cząsteczki o stosunkowo dużym rozmiarze, co może ograniczać ich stosowanie analityczne i diagnostyczne. Ponadto, produkcja przeciwciał monoklonalnych jest kosztowna (m.in. wymaga stosowania hodowli komórek eukariotycznych). Wad tych pozbawione są przeciwciała jednocłańcuchowe (ang. single-chain variable fragment, scFv), które są ok. 6 razy mniejsze od przeciwciał klasy IgG oraz mogą być wytwarzane z użyciem prokariotycznych systemów ekspresyjnych.

Ze stanu techniki znane są przeciwciała scFv specyficznie oddziałujące z białkiem VEGF-C (Rinderknecht M et al. *PLoS One* 2010; 5(8):e11941). Opisane przeciwciała posiadają jednak szereg ograniczeń. Białko wykorzystane do selekcji przeciwciał scFv pochodziło z organizmu drożdży, bowiem wytwarzane było w układzie wykorzystującym komórki *Pichia pastoris*. W związku z tym białko to charakteryzowało się m.in. wzorem glikozylacji różnym od występującego w białku VEGF-C obecnym w organizmach ssaków. Co więcej, nie została potwierdzona aktywność biologiczna białka wykorzystanego do selekcji przeciwciał scFv.

Celem wynalazku jest zapewnienie cząsteczek, które mogą wydajnie i specyficznie oddziaływać z aktywnym biologicznie białkiem VEGF-C. Dodatkowym celem wynalazku jest dostarczenie metody oczyszczania, wykrywania i/lub oznaczania ilości białka VEGF-C.

Istotą wynalazku jest przeciwciało formatu scFv, stanowiące inhibitor białka VEGF-C obejmujące sekwencję aminokwasową wybraną z następującej grupy: Sekw. nr 14, Sekw. nr 15, Sekw. nr 16, Sekw. nr 17, Sekw. nr 18, Sekw. nr 19, Sekw. nr 20, Sekw. nr 21, Sekw. nr 22, Sekw. nr 23, Sekw. nr 24, Sekw. nr 25, Sekw. nr 26.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób wyodrębniania VEGF-C z roztworu, zwłaszcza roztworu wodnego, charakteryzujący się tym, że:

- (a) kontaktuje się sekwencję białkową według wynalazku z roztworem zawierającym białko VEGF-C w celu uzyskania kompleksu białkowego zawierającego sekwencję białkową według wynalazku i związane z tym przeciwciałem niekowalencyjnie białko VEGF-C;
- (b) wydziela się z roztworu uzyskany kompleks białkowy;
- (c) z uzyskanego kompleksu białkowego oddysocjowuje się białko VEGF-C;
- (d) z roztworu po dysocjacji wyodrębnia się białko VEGF-C.

Korzystnie, gdy w etapie (b) wyżej opisanego sposobu wyodrębniania VEGF-C z roztworu prowadzi się metodą chromatografii powinowactwa, przy czym jako złożę stosuje się nośnik chromatograficzny zawierający immobilizowaną sekwencję białkową według wynalazku.

W innym aspekcie, wynalazek także dotyczy sposobu wykrywania obecności VEGF-C w materiale biologicznym, charakteryzującego się tym, że:

- (a) kontaktuje się sekwencję białkową według wynalazku z materiałem biologicznym w celu uzyskania kompleksu białkowego zawierającego sekwencję białkową według wynalazku i związane z tym przeciwciałem niekowalencyjnie białko VEGF-C;
- (b) wykrywa się uzyskany kompleks białkowy za pomocą pośrednich lub bezpośrednich biochemicznych metod detekcji.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób oznaczania stężenia VEGF-C w roztworze wodnym, zwłaszcza płynie fizjologicznym, charakteryzujący się tym, że:

- (a) kontaktuje się sekwencję białkową według wynalazku z roztworem wodnym zawierającym VEGF-C w celu uzyskania kompleksu białkowego zawierającego sekwencję białkową według wynalazku i związane z tym przeciwciałem niekowalencyjnie białko VEGF-C;
- (b) oznacza się stężenie uzyskanego kompleksu białkowego za pomocą pośrednich lub bezpośrednich biochemicznych metod detekcji.

W innym aspekcie, wynalazek także dotyczy zastosowania sekwencji białkowej według wynalazku do otrzymywania preparatów białka VEGF-C.

Wynalazek obejmuje także zastosowanie sekwencji białkowej według wynalazku do wykrywania białka VEGF-C w materiale biologicznym.

Wynalazek obejmuje także zastosowanie sekwencji białkowej według wynalazku do oznaczania stężenia białka VEGF-C w roztworze wodnym.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest w przykładach realizacji nie ograniczając jego zakresu oraz na rysunku, na którym:

- fig. 1 ilustruje, że wyselekcjonowane przeciwciała monoklonalne są specyficzne zarówno względem mysiego VEGF-C (A), jak i ludzkiego VEGF-C (B);
- fig. 2 ilustruje wiązanie antygeny przez wybrane rozpuszczalne przeciwciała scFv anty-VEGF-C;
- fig. 3 ilustruje, że przeciwciała 1F2, 1F5 oraz 1F6 są specyficzne wyłącznie względem VEGF-C;
- fig. 4 ilustruje sekwencje aminokwasowe przeciwciał wyodrębnionych z biblioteki fagemidowej uzbiteżnione w postaci MSA (ang. Multi-Sequence Alignment).

P r z y k ł a d w y k o n a n i a

Wyodrębnienie fagów wykazujących ekspresję rekombinowanych przeciwciał monoklonalnych formatu scFv specyficznych względem mysiego i ludzkiego białka VEGF-C

Do otrzymania przeciwciał wybrano metodę ekspresji fagowej opartą o wykorzystanie fagemidowej biblioteki ludzkich rekombinowanych przeciwciał formatu scFv Tomlinson I+J. Wykorzystując poliklonalne fagi przeprowadzono trzy rundy selekcyjne na immobilizowanym mysim białku VEGF-C wyprodukowanym przez ssacze komórki (antygenem było więc dojrzałe rekombinowane białko VEGF-C_{ΔNΔC}). Aktywność biologiczna białka użytego do selekcji została wcześniej potwierdzona metodami biologicznymi z wykorzystaniem hodowli komórek *in vitro*. W tym celu wykorzystano test tworzenia tubuli na podłożu zawierającym matrigel przez komórki ludzkiego śródbłona naczyń limfatycznych (ang. immortalized human Lymphatic Endothelial Cells, ihLEC) pod wpływem aktywnego biologicznie białka VEGF-C. W wyniku selekcji na antygenie uzyskano fagi wykazujące na swej powierzchni ekspresję przeciwciał zdolnych do wiązania mysiego rekombinowanego białka VEGF-C (fig. 1A). Mimo, iż selekcję fagów biblioteki przeprowadzono wykorzystując jako antygen mysie białko VEGF-C, potwierdzono, iż przeciwciała ulegające ekspresji na powierzchni wyodrębnionych fagów wiążą również ludzki VEGF-C (fig. 1B). Wyselekcjonowane przeciwciała są zatem specyficzne zarówno względem mysiego, jak i ludzkiego białka VEGF-C.

Uzyskanie rozpuszczalnych przeciwciał formatu scFv wiążących mysie i ludzkie VEGF-C

Przeciwciała ulegające ekspresji na powierzchni faga filamentowego nie jest rozpuszczalnym białkiem – jest ono produkowane jako białko fuzyjne razem z białkiem pIII, strukturalnym białkiem płaszcza faga. W celu uzyskania ekspresji rozpuszczalnych przeciwciał scFv przeklonowano sekwencję kodującą wybrane przeciwciała do wektora ekspresyjnego pETscFv. Ekspresję rozpuszczalnych przeciwciał anty-VEGF-C uzyskano w bakteriiach *E. coli* Rosetta Blue. Przeciwciała izolowano z obszaru peryplazmatycznego bakterii i oczyszczano wykorzystując metodę chromatografii powinowactwa z użyciem białka A. Na fig. 2 przedstawiono wiązanie wybranych przeciwciał monoklonalnych formatu scFv do antygeny.

Potwierdzenie specyficzności względem białka VEGF-C

Ponieważ białka należące do rodziny VEGF wykazują duże podobieństwo w obrębie sekwencji aminokwasowej, potwierdzono wykorzystując test ELISA, iż uzyskane przeciwciała 1F5, 1F6 i 1F2 rozpoznają i wiążą VEGF-C nie wykazując jednocześnie powinowactwa ani względem VEGF-A, ani względem VEGF-D (fig. 3).

Uzyskanie sekwencji przeciwciał formatu scFv wiążących mysie i ludzkie VEGF-C

Wektory fagemidowe pIT2 kodujące przeciwciała prezentowane na powierzchni wyodrębnionych fagów zostały poddane sekwencjonowaniu w celu uzyskania sekwencji aminokwasowej kodowanych przeciwciał. Otrzymane sekwencje zostały następnie uzbiteżnione w postaci MSA (ang. Multi-Sequence Alignment) i przedstawione na fig. 4. W ich obrębie można wyróżnić regiony CDR, które odpowiadają za wiązanie sekwencji białkowej do antygeny.

Poszczególne regiony CDR w sekwencji przeciwciał mogą być traktowane jako fragmenty wymienne, ponieważ jak pokazano na fig. 4 dla sekwencji przeciwciał 1F5 i 1F10 sekwencje CDRH2

i CDRH3 są identyczne, choć odpowiednie sekwencje CDRL2 i CDRL3 są różne; analogicznie sekwencje 1F5 i 1G4 posiadają identyczny fragment CDRL2, lecz różne fragmenty CDRH2, CDRH3 i CDRL3.

Ponadto, powyższe sekwencje zawierające fragmenty łańcucha ciężkiego oraz fragmenty łańcucha lekkiego mogą być poddane dalszej optymalizacji; w szczególności, można je doprowadzić do postaci pojedynczego łańcucha ciężkiego (ang. camelid heavy chain antibodies), która charakteryzuje naturalnie występujące immunoproteiny (Hamers-Casterman et al. *Nature* 1993; 363:446–448, Muyldermans S and Lauwereys M. *J Mol Recognit* 1999; 12:131–140). W takim przypadku do wiązania antygeny nie jest konieczna cała sekwencja białkowa stanowiąca przeciwciało scFv, a jedynie jej fragment (stanowiący pojedynczy łańcuch). Tym samym użycie takiego fragmentu będzie wystarczające dla zachowania zdolności sekwencji białkowej do wiązania antygeny. Zastosowanie takiej strategii optymalizacyjnej względem przeciwciał formatu scFv jest znane z literatury (Rinderknecht M et al., op. cit.).

Wyselekcjonowane przeciwciała monoklonalne są specyficzne zarówno względem mysiego, jak i ludzkiego VEGF-C, jak przedstawiono odpowiednio na fig. 1A i 1B. Analizę przeprowadzono wykorzystując test ELISA. Płytki opłaszczone antygenami (mysim lub ludzkim VEGF-C) inkubowano z wyodrębnionymi fagami i fagiem niewiążącym VEGF-C, kontrola negatywna kn. Uzyskany wynik potwierdza, że 1) przeciwciała są zdolne do rozpoznania i specyficznego wiązania mysiego białka VEGF-C i ludzkiego białka VEGF-C oraz 2) przeciwciała mogą być stosowane do wykrywania VEGF-C zarówno w próbkach mysich, jak i w materiale ludzkim.

Wiązanie antygeny przez wybrane rozpuszczalne przeciwciała scFv anti-VEGF-C ilustruje fig. 2. Analizę przeprowadzono stosując test ELISA. Ekspresję przeciwciał anti-VEGF-C uzyskano w bakteriach *E. coli* Rosetta blue. Przeciwciała izolowano z obszaru peryplazmatycznego bakterii. Przeciwciała wiązano do antygeny immobilizowanego do płytki przeznaczonej do testów ELISA. Detekcji scFv związanych do antygeny dokonano wykorzystując roztwór białka L-HRP (białko L znakowane peroksydazą chrzanową), ponieważ wiąże się ono z łańcuchem lekkim scFv. kn oznacza przeciwciało niespecyficzne względem VEGF-C. Uzyskany wynik potwierdza, że do wiązania białka VEGF-C są zdolne nie tylko przeciwciała ulegające ekspresji na powierzchni wyselekcjonowanych fagów, ale również odpowiadające im rozpuszczalne przeciwciała, które wyprodukowano wykorzystując bakteryjny system ekspresji oparty o wektor pETscFv.

Wybrane przeciwciała 1F2, 1F5 oraz 1F6 zostały zbadane pod kątem specyficzności oddziaływania z VEGF-C (fig. 3). Analizę przeprowadzono z zastosowaniem testu ELISA. Płytkę pokryto białkiem VEGF-C, VEGF-A i VEGF-D w stężeniu 2 µg/ml. Wszystkie przeciwciała rozcieńczono do stężenia 5 µg/ml w buforze PBS zawierającym 3% albuminy wołowej. Detekcji scFv związanych do antygeny dokonano za pomocą białka L-HRP. K – kontrolne przeciwciała scFv specyficzne dla białka innego niż VEGF-C. Uzyskany wynik potwierdza, że otrzymane przeciwciała scFv są specyficzne wyłącznie względem białka VEGF-C. Białko VEGF-C jest bardzo podobne do innych białek rodziny VEGF (na przykład do VEGF-A lub VEGF-D), a zatem przeciwciała te są bardzo cennym narzędziem służącym do specyficznej detekcji i wybiórczego wiązania VEGF-C.

Sekwencje przeciwciał (fig. 4) zostały ustalone za pomocą sekwencjonowania wektorów fagemydowych. Jako matryce do sekwencjonowania wykorzystano wyizolowane z bakterii TOP10 fagemydy pIT2 zawierające sekwencje poszczególnych wyselekcjonowanych przeciwciał. W procesie sekwencjonowania wykorzystano startery LMB3 (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') i pHEN (5' CTA TGC GGC CCC ATT CA 3'). Do analiz uzyskanych sekwencji wykorzystano programy znajdujące się na platformie internetowej Mobyle@Pasteur (revseq, transeq, needle), ClustalX oraz Jalview.

Sekwencje

Sekwencja nr 1a:

1D2_CDRH2

AIDSKGSFTV

Sekwencja nr 1b:

>1D2_CDRH3

EGLRF

Sekwencja nr 1c:

>1D2_CDRL2

HASH

Sekwencja nr 1d:

>1D2_CDRL3

GPIDPQ

Sekwencja nr 2a:

>1E7_CDRH2

AISAQGTSTL

Sekwencja nr 2b:

>1E7_CDRH3

KYHMF

Sekwencja nr 2c:

>1E7_CDRL2

HAST

Sekwencja nr 2d:

>1E7_CDRL3

RRAMPT

Sekwencja nr 3a:

>1F2_CDRH2

SIQAAGPTTD

Sekwencja nr 3b:

>1F2_CDRH3

ADWEF

Sekwencja nr 3c:

>1F2_CDRL2

GASV

Sekwencja nr 3d:

>1F2_CDRL3

ALRVPS

Sekwencja nr 4a:

>1F5_CDRH2

SILDHGQGTQ

Sekwencja nr 4b:

>1F5_CDRH3

EGTML

Sekwencja nr 4c:

>1F5_CDRL2

RASR

Sekwencja nr 4d:

>1F5_CDRL3

LRASPR

Sekwencja nr 5a:

>1F6_CDRH2

SITGHGSTTE

Sekwencja nr 5b:

>1F6_CDRH3

EGAVF

Sekwencja nr 5c:

>1F6_CDRL2

QASS

Sekwencja nr 5d:

>1F6_CDRL3

TARYPD

Sekwencja nr 6a:

>1F10_CDRH2

SILDHGQGTQ

Sekwencja nr 6b:

>1F10_CDRH3

EGTML

Sekwencja nr 6c:

>1F10_CDRL2

YASS

Sekwencja nr 6d:

>1F10_CDRL3

PSVGPK

Sekwencja nr 7a:

>1G2_CDRH2

DIQPKGATN

Sekwencja nr 7b:

>1G2_CDRH3

STNQF

Sekwencja nr 7c:

>1G2_CDRL2

PASQ

Sekwencja nr 7d:

>1G2_CDRL3

QFRNPV

Sekwencja nr 8a:

>1G4_CDRH2

SIAAQGSPTA

Sekwencja nr 8b:

>1G4_CDRH3

EGTNF

Sekwencja nr 8c:

>1G4_CDRL2

RASR

Sekwencja nr 8d:

>1G4_CDRL3

PASWPP

Sekwencja nr 9a:

>1G5_CDRH2

SITQGGTLTQ

Sekwencja nr 9b:

>1G5_CDRH3

PGLAF

Sekwencja nr 9c:

>1G5_CDRL2

GASA

Sekwencja nr 9d:

>1G5_CDRL3

TSRRPK

Sekwencja nr 10a:

>1G6_CDRH2

TITDSGYQTL

Sekwencja nr 10b:

>1G6_CDRE3

EALHF

Sekwencja nr 10c:

>1G6_CDRL2

HASR

Sekwencja nr 10d:

>1G6_CDRL3

LPPSPK

Sekwencja nr 11a:

>1G8_CDRH2

SITHKGGLTQ

Sekwencja nr 11b:

>1G8_CDRE3

EGAPF

Sekwencja nr 11c:

>1G8_CDRL2

AASS

Sekwencja nr 11d:

>1G8_CDRL3

SYSTPN

Sekwencja nr 12a:

>1G10_CDRH2

TIALDGQRTN

Sekwencja nr 12b:

>1G10_CDRH3

HWAPF

Sekwencja nr 12c:

>1G10_CDRL2

TASS

Sekwencja nr 12d:

>1G10_CDRL3

LAQFPP

Sekwencja nr 13a:

>2F10_CDRH2

HIMQSGYTTV

Sekwencja nr 13b:

>2F10_CDRH3

YSPKF

Sekwencja nr 13c:

>2F10_CDRL2

VASQ

Sekwencja nr 13d:

>2F10_CDRL3

AQEPPS

Sekwencja nr 14:

>1D2

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSAIDSKGSFTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
EGLRFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYHASHLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY
YCQQGPIDPQTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 15:

>1E7

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSAISAQGTSTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
KYHMFYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYHASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY
YCQQRAMPPTTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 16:

>1F2

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSSIQAAGPTTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
ADWEFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASVLQSGVPTRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY
YCQQALRVPSTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 17:

>1F5

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSSILDHGQGTQYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
EGTMLDYGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATY
YCQQLRASPRTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 18:

>1F6

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSSITGHGSTTEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
EGAVFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYQASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATY
YCQQTARYPDTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 19:

>1F10

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSSILDHGQGTQYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
EGTMLDYGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATY
YCQQPSVGPKTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 20:

>1G2

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDIQPKGTATNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
STNQFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQITQSPSSLSASVGDRV TITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYPASQLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATY
YCQQQFRNPVTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 21:

>1G4

MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSSIAAQGSPTAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
EGTNFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATY
YCQQPASWPPTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 22:

>1G5

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSSITQGGTLTQYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
PGLAFDYWGQGTlVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY
YCQQTSRRPKTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 23:

>1G6

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSTITDSGYQTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
EALHFDYWGQGTlVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYHASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY
YCQQLPPSPKTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 24:

>1G8

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSSITHKGLTQYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
EGAPFDYWGQGTlVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY
YCQQSYSTPNTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 25:

>1G10

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSTIALDGQRTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
HWAPFDYWGQGTlVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY
YCQQLAQFPPTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 26:

>2F10

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSHIMQSGYTTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
YSPKFDYWGQGTlVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
QSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYVASQLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATY
YCQQAQEPPSTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Zastrzeżenia patentowe

1. Przeciwciało formatu scFv, stanowiące inhibitor białka VEGF-C obejmujące sekwencję aminokwasową wybraną z następującej grupy: Sekw. nr 14, Sekw. nr 15, Sekw. nr 16, Sekw. nr 17, Sekw. nr 18, Sekw. nr 19, Sekw. nr 20, Sekw. nr 21, Sekw. nr 22, Sekw. nr 23, Sekw. nr 24, Sekw. nr 25, Sekw. nr 26.
2. Sposób wyodrębniania VEGF-C z roztworu, zwłaszcza roztworu wodnego, **znamienny tym**, że:
 - (a) kontaktuje się przeciwciało określone w zastrz. 1 z roztworem zawierającym białko VEGF-C w celu uzyskania kompleksu białkowego zawierającego przeciwciało określone w zastrz. 1 i związane z tym przeciwciałem niekowalencyjnie białko VEGF-C;
 - (b) wydziela się z roztworu uzyskany kompleks białkowy;
 - (c) z uzyskanego kompleksu białkowego oddysocjowuje się białko VEGF-C;
 - (d) z roztworu po dysocjacji wyodrębnia się białko VEGF-C.
3. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że w etapie (b) wyodrębnianie prowadzi się metodą chromatografii powinowactwa, przy czym jako złożo stosuje się nośnik chromatograficzny zawierający immobilizowane przeciwciało określone w zastrz. 1.
4. Sposób wykrywania obecności VEGF-C w materiale biologicznym, **znamienny tym**, że:
 - (a) kontaktuje się przeciwciało określone w zastrz. 1 z materiałem biologicznym w celu uzyskania kompleksu białkowego zawierającego przeciwciało określone w zastrz. 1 i związane z tym przeciwciałem niekowalencyjnie białko VEGF-C;
 - (b) wykrywa się uzyskany kompleks białkowy za pomocą pośrednich lub bezpośrednich biochemicznych metod detekcji.
5. Sposób oznaczania stężenia VEGF-C w roztworze wodnym, zwłaszcza płynie fizjologicznym, **znamienny tym**, że:
 - (a) kontaktuje się przeciwciało określone w zastrz. 1 z roztworem wodnym zawierającym VEGF-C w celu uzyskania kompleksu białkowego zawierającego przeciwciało określone w zastrz. 1 i związane z tym przeciwciałem niekowalencyjnie białko VEGF-C;
 - (b) oznacza się stężenie uzyskanego kompleksu białkowego za pomocą pośrednich lub bezpośrednich biochemicznych metod detekcji.
6. Zastosowanie przeciwciała określonego w zastrz. 1 do otrzymywania preparatów białka VEGF-C.
7. Zastosowanie *in vitro* przeciwciała określonego w zastrz. 1 do wykrywania białka VEGF-C w materiale biologicznym.
8. Zastosowanie przeciwciała określonego w zastrz. 1 do oznaczania stężenia białka VEGF-C w roztworze wodnym.

Rysunki

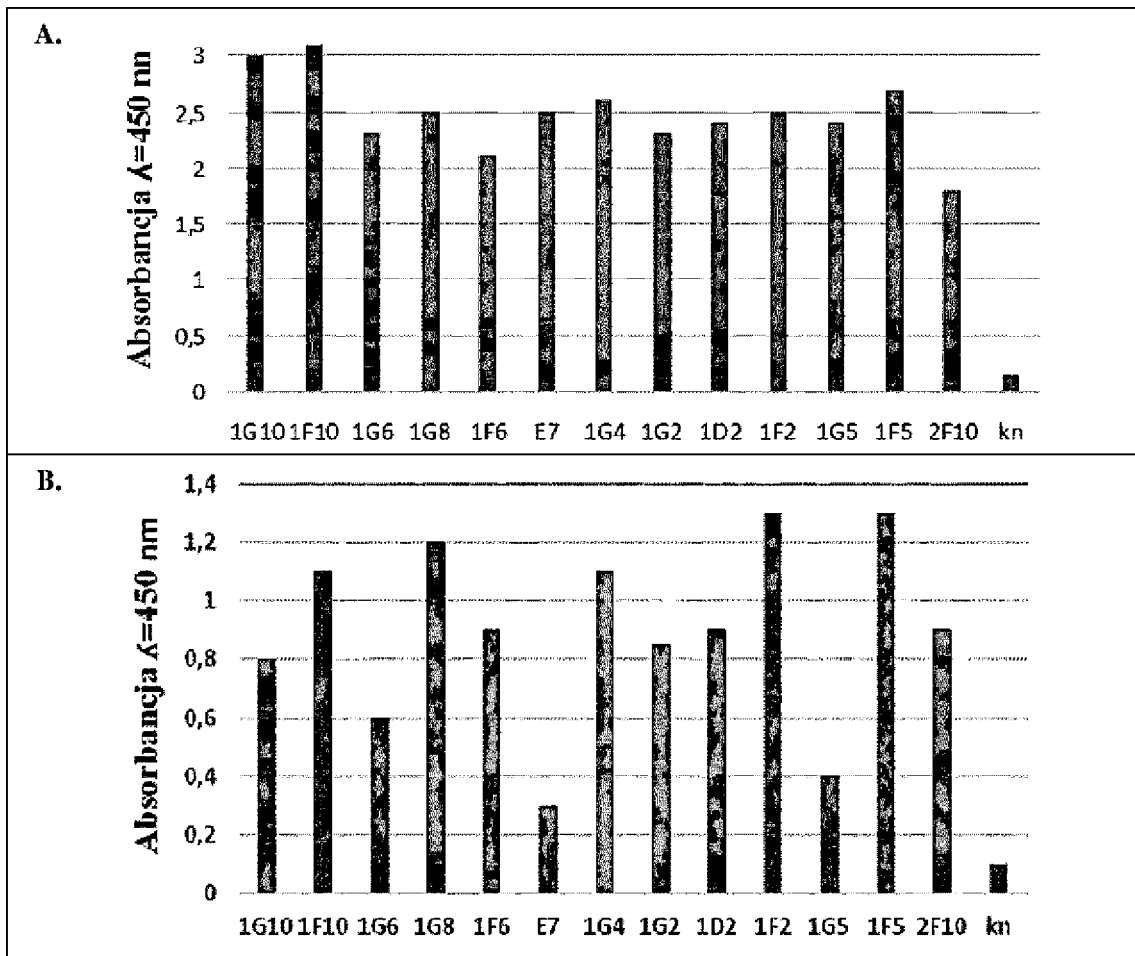


Fig. 1

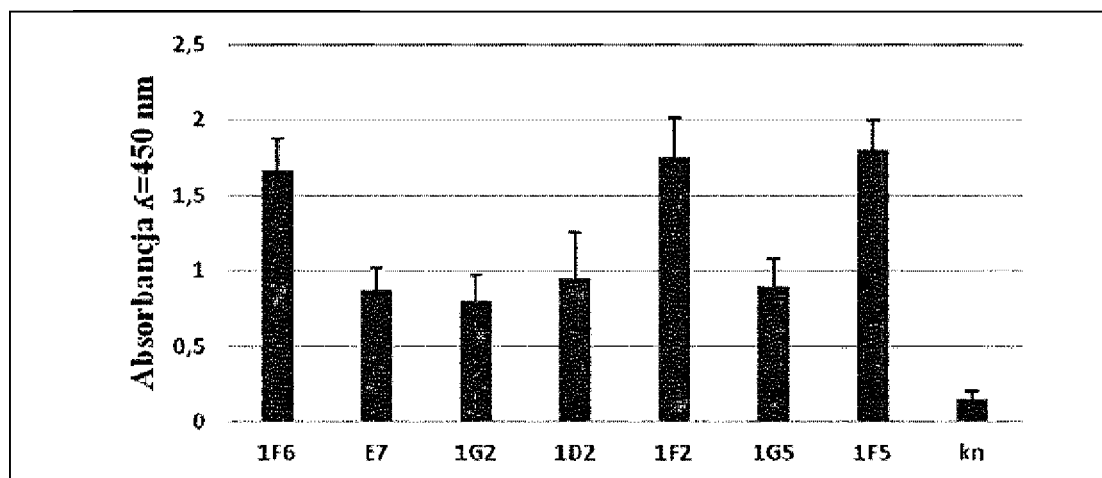


Fig. 2

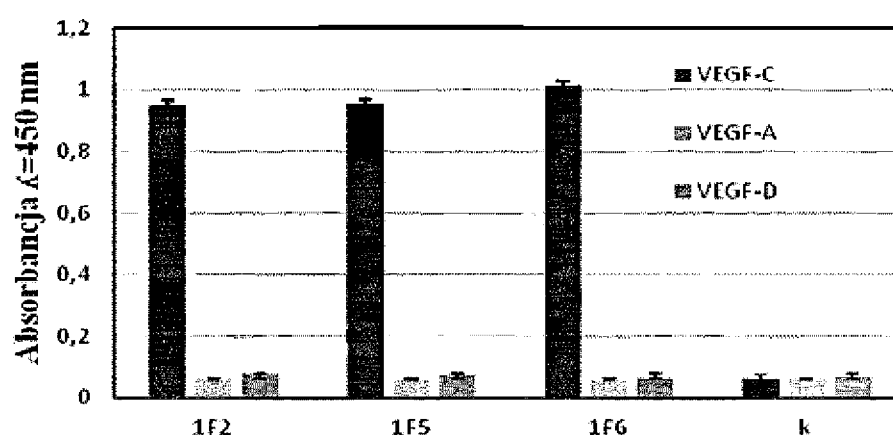


Fig. 3

