

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **234874**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **415392**

(22) Data zgłoszenia: **28.12.2015**

(51) Int.Cl.
C07K 16/22 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) **Przeciwciało formatu scFv, stanowiące inhibitor białka VEGF-C oraz jego zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
03.07.2017 BUP 14/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.04.2020 WUP 04/20

(73) Uprawniony z patentu:
UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
MONIKA BZOWSKA, Kraków, PL
MAŁGORZATA KULESZA, Pruszków, PL
RENATA MEŻYK-KOPEĆ, Kraków, PL
TOMASZ KLAUS, Brzesko, PL
BARBARA WYROBA, Kraków, PL
JOANNA BERETA, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Maciej Czarnik

PL 234874 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy nowego przeciwciała formatu scFv, stanowiącego inhibitor białka VEGF-C. W szczególności, przeciwciało według wynalazku stanowi jednołańcuchowe fragmenty ludzkich przeciwciał (scFv) wiążące się z VEGF-C i neutralizujące jego działanie. Wynalazek także dotyczy zastosowania tego inhibitora.

Stan techniki

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 śródbłónka naczyniowego C) a jego receptorami VEGFR-2 oraz VEGFR-3 (ang. vascular endothelial growth factor receptor; receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego) (Stacker SA et al. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(3): 159–72). VEGF-C należy do rodziny czynników wzrostu śródbłónka 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 śródbłónka 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). Dlatego stał się on interesującym celem potencjalnej terapii anty-limfangiogennej.

Jedną z intensywniej badanych strategii, mających na celu zahamowanie powstawania naczyń limfatycznych w trakcie progresji nowotworów, jest zastosowanie przeciwciał monoklonalnych specyficznych względem poszczególnych czynników biologicznych biorących udział w limfangiogenezie. Za najbardziej obiecujący cel tego typu terapii uznawane jest zablokowanie osi sygnałowej pomiędzy VEGF-C i VEGF-D a receptorami VEGFR-2 i VEGFR-3. Zablokowanie ścieżki sygnałowej dla VEGF-C/VEGF-D i VEGFR-3 stanowi teoretycznie bezpieczne podejście terapeutyczne, ponieważ nie powinno ono wpływać na istniejące już naczynia limfatyczne (Chachaj i Szuba 2013, op. cit.). Badania in vivo zdają się potwierdzać powyższe założenie, gdyż zablokowanie VEGFR-3 nie spowodowało żadnych ubocznych skutków dla wykształconych wcześniej naczyń limfatycznych u dorosłych myszy (Kärpänen T et al. Am J Pathol 2006; 169(2): 708–718). Warto jednak mieć na uwadze wpływ zahamowania limfangiogenezy na procesy gojenia ran czy regeneracji tkanek (za Chachaj i Szuba 2013, op. cit.).

Inhibitory procesu przekazu sygnału biologicznego przez oś VEGF-C – jego receptory są znane ze stanu techniki. Zgłoszenie PCT opublikowane jako WO2005112971 ujawnia metodę hamowania procesu angiogenezy i limfangiogenezy przez zaburzenie procesu dojrzewania białek VEGF-C i VEGF-D. Z kolei w opisie patentowym US20020164667 ujawniono sekwencje peptydów zdolnych do wiązania się z receptorem VEGFR3 i hamowania jego aktywności biologicznej, w tym zdolności do wiązania białka VEGF-C. Stan techniki obejmuje także cząsteczki oddziałujące z białkiem VEGF-C. W szczególności cząsteczkami tymi mogą być inne białka, np. rozpuszczalne receptory sVEGFR ujawnione w opisie patentowym US20140057851. Do białek oddziałujących z VEGF-C mogą należeć również przeciwciała, a zwłaszcza przeciwciała monoklonalne. Przeciwciała klasy IgG specyficzne względem VEGF-C zostało ujawnione w opisie patentowym US2011143428. W tabeli 1 przedstawiono znane ze stanu techniki przeciwciała monoklonalne o zdolności do hamowania procesu limfangiogenezy. Potencjał terapeutyczny dwóch z nich jest oceniany w badaniach klinicznych. Przeciwciała IMC-35C, zapobiegające wiązaniu VEGF-C i VEGF-D do VEGFR-3, w badaniach przedklinicznych w połączeniu z chemioterapią pozwoliło na zmniejszenie tempa progresji nowotworów szyi i głowy. Do prób klinicznych skierowane zostało również przeciwciała VGX-100, będące inhibitorem VEGF-C, które w połączeniu z przeciwciałem anti-VEGF-A hamowało wzrost guzów w modelach zwierzęcych glejaka oraz nowotworów prostaty i trzustki (za: Bzowska 2013, op. cit.). Zastosowanie strategii uwzględniającej jednocześnie wykorzystanie terapeutyków o właściwościach anty-angiogennych i anty-limfangiogennych stanowi bardzo obiecujące podejście, które może poprawić skuteczność stosowanych obecnie terapii przeciwnowotworowych.

T a b e l a 1. Opracowane dotychczas przeciwciała monoklonalne jako potencjalne inhibitory limfangiogenezy (Bzowska 2013, op. cit.).

Cel	Nazwa	Opis	Faza badawcza
VEGFR-3	IMC-3C5	ludzkie przeciwciała klasy IgG1; zapobiega wiązaniu VEGF-C i VEGF-D do VEGFR-3	faza 1
VEGF-C	VGX-100	ludzkie przeciwciała; blokuje wiązanie VEGF-C do VEGFR-2 i VEGFR-3	faza 1
VEGF-D	cVE199	chimeryczne przeciwciała klasy IgG1; blokuje wiązanie VEGF-D do VEGFR-3	badania przedkliniczne
VEGFR-3	2E11	zapobiega utworzeniu homodimerów VEGFR-3 oraz heterodimerów VEGFR-2/3, ale nie hamuje wiązania VEGF-C do VEGFR-3	badania przedkliniczne
neuropilina-2	-	zapobiega wiązaniu VEGF-C do neuropiliny-2	badania przedkliniczne
VEGF-C	VC2	ludzkie scFv, hamuje wiązanie VEGF-C do VEGFR-2 i VEGFR-3	badania in vitro
VEGFR-2 i VEGFR-3	-	ludzki bispecyficzny dimer scFv (ang. diabody) skierowany przeciwko VEGFR-2 i VEGFR-3; hamuje aktywację ww. receptorów	badania in vitro

Przeciwciała to cząsteczki o stosunkowo dużym rozmiarze, co może ograniczać ich stosowanie terapeutyczne (np. ze względu na niską penetrację tkanki nowotworowej). Ponadto produkcja przeciwciał monoklonalnych jest kosztowna (m.in. wymaga stosowania hodowli komórek eukariotycznych). Wad tych pozbawione są przeciwciała jednołańcuchowe (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. Ponadto, nie została ujawniona również aktywność biologiczna opisanych przeciwciał, a więc nieznan jest ich wpływ na przekaz sygnału przez VEGF-C w układach biologicznych.

Celem wynalazku jest zapewnienie cząsteczek, które mogą stanowić wydajny i specyficzny inhibitor ludzkiego i mysiego białka VEGF-C. Dodatkowym celem wynalazku jest dostarczenie specyficznego inhibitora procesu limfangiogenezy w postaci przeciwciała monoklonalnego formatu scFv hamującego aktywność biologiczną białka VEGF-C. Kolejnym celem wynalazku jest dostarczenie metody wytwarzania substancji leczniczej zawierającej białka według wynalazku, stosowanej do leczenia chorób związanych z nieprawidłową aktywnością biologiczną VEGF-C.

Istota wynalazku

Istotą wynalazku jest przeciwciała formatu scFv, stanowiące inhibitor białka VEGF-C, charakteryzujące się tym, że zawiera sekwencję aminokwasową Sekw. nr 3 albo Sekw. nr 4.

Innym aspektem wynalazku jest przeciwciała formatu scFv jak określone powyżej do stosowania jako lek w zapobieganiu i/lub leczeniu chorób i/lub stanów związanych z nieprawidłową ilością białka VEGF-C, w tym z dysfunkcją procesu limfangiogenezy.

Korzystnie, gdy choroby i/lub stany wybrane są z następującej grupy: nowotwory przerzutuujące przez naczynia limfatyczne, ostra białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna, mięsak Kaposi'ego, nowotwory odporne na leczenie anty-VEGF-A, zanik kości wywołany przez VEGF-C, degeneracja plamki żółtej związana z wiekiem, retinopatia cukrzycowa, choroby zapalne związane z nadmiernym poziomem VEGF-C, w tym: reumatoidalne zapalenie stawów i łuszczyca.

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 antygenu 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 aktywność biologiczną uzyskanych przeciwciał anty-VEGF-C analizowaną za pomocą testu tworzenia indukowanych przez VEGF-C tubuli na podłożu zawierającym matrigel;
- fig. 5 ilustruje analizę wpływu przeciwciał 1F2 i 1F5 na tworzenie indukowanych przez VEGF-C wypustek w hodowli sferoidalnej komórek ihFEC (ang. immortalized human Lymphatic Endothelial Cells, nieśmiertelne ludzkie komórki śródbłónka naczyń limfatycznych) **A.** Dla komórek inkubowanych z 1F2. **B.** Dla komórek inkubowanych z 1F5. **C.** Dla komórek inkubowanych bez scFv. **D.** Analiza wpływu przeciwciał 1F2 i 1F5 na ilość wypustek tworzonych przez komórki ihLEC po stymulacji VEGF-C. **E.** Analiza wpływu przeciwciał 1F2 i 1F5 na długość wypustek tworzonych przez komórki ihLEC po stymulacji VEGF-C.
- fig. 6 ilustruje sekwencje aminokwasowe przeciwciał wyodrębnionych z biblioteki fagemidowej uzbiteżnione w postaci MSA (ang. Multi-Sequence Alignment).

Przykład wykonania

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 biblioteki 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 opisanymi poniżej z wykorzystaniem hodowli komórek *in vitro*. 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 bakteriach *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 antygenu.

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).

Badanie aktywności biologicznej przeciwciał anty-VEGF-C

Uzyskane przeciwciała scFv 1F2, 1F5 i 1F6 zbadano również pod kątem aktywności biologicznej, to znaczy sprawdzono czy są one zdolne zahamować wywołanie efektów wynikających z aktywacji przez VEGF-C jego receptorów. W tym celu wykorzystano test tworzenia tubuli na podłożu zawierającym matrygel przez komórki ludzkiego śródbłonka naczyń limfatycznych (ang. immortalized human Lymphatic Endothelial Cells, ihLEC). Komórki ihLEC tworzą takie tubule tylko pod wpływem VEGF-C, zatem jeśli w obecności przeciwciała anty-VEGF-C nie obserwujemy tworzenia indukowanych przez VEGF-C tubuli lub jeśli proces ten jest zaburzony, można wnioskować, iż obniżona jest zdolność VEGF-C do aktywacji jego receptora/receptorów.

Zaobserwowano, iż w obecności przeciwciał scFv 1F2 lub 1F5 proces ten jest zaburzony (fig. 4), co może wskazywać, iż w obecności tego przeciwciała nie dochodzi do aktywacji receptorów dla VEGF-C.

Biologiczną aktywność wyodrębnionych przeciwciał formatu scFv specyficznych względem VEGF-C badano również za pomocą testu tworzenia wypustek z hodowli sferoidalnych. Test tworzenia wypustek z hodowli sferoidalnych komórek śródbłonka naczyń krwionośnych lub limfatycznych zawieszonych w kolagenie, to jedna z najpowszechniej używanych metod do oceny różnicowania śródbłonka i powstawania kapilar. Pod wpływem substancji stymulujących wzrost naczyń, z agregatów komórkowych powstają wypustki, co przypomina angiogenezę lub limfangiogenezę *in vivo*. Wyniki przeprowadzonych badań pokazały, iż przeciwciała 1F2 oraz 1F5 obniżają zarówno ilość, jak i długość wypustek tworzonych przez komórki ihLEC w obecności VEGF-C, co wskazuje na blokowanie aktywności biologicznej VEGF-C przez te przeciwciała.

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. 6. W ich obrębie można wyróżnić regiony CDR, które odpowiadają za wiązanie sekwencji białkowej do antygenu.

Poszczególne regiony CDR w sekwencji przeciwciał mogą być traktowane jako fragmenty wymienne. 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 opłaszczane 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 anty-VEGF-C ilustruje fig. 2. Analizę przeprowadzono stosując test ELISA. Ekspresję przeciwciał anty-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 $\mu\text{g/ml}$. Wszystkie przeciwciała rozcieńczono do stężenia 5 $\mu\text{g/ml}$ 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.

Analiza aktywności biologicznej przeciwciał anty-VEGF-C będących przedmiotem wynalazku, wykonana za pomocą testu tworzenia tubuli indukowanych przez VEGF-C na podłożu zawierającym matrigel, została zilustrowana na fig. 4. Komórki ludzkiego śródbłonka naczyń krwionośnych ihLEC wysiano na płytki z podłożem matrigel i hodowano: w pożywce EGM2, w pożywce z VEGF-C o stężeniu 100 ng/ml lub odpowiednio w pożywce z VEGF-C i przeciwciałami 1F2, 1F5 lub 1F6 (8 $\mu\text{g/ml}$). Po upływie 48 godz. oceniano ilość tubuli obecnych na powierzchni matrigelu.

Wyniki przeprowadzonego testu przedstawiono na fig. 4. Na płytkach, na których prowadzono hodowlę z przeciwciałami 1F5 (fig. 4C) oraz 1F2 (fig. 4E) uzyskano wyniki zbliżone do kontroli negatywnej – bez VEGF-C (fig. 4A). Natomiast na płytce, na której prowadzono hodowlę z przeciwciałami 1F6 (fig. 4D) uzyskano wyniki zbliżone do kontroli pozytywnej – zawierającej VEGF-C (fig. 4B).

Otrzymane wyniki wskazują, że specyficzne dla VEGF-C przeciwciała 1F2 oraz 1F5 są w stanie hamować aktywność biologiczną białka VEGF-C, a tym samym działają jak jego inhibitor. Z kolei użyte w tym samym stężeniu przeciwciało 1F6, które również wydajnie wiąże VEGF-C, nie jest w stanie hamować aktywności biologicznej tego białka.

VEGF-C jest białkiem, które pobudza procesy migracji i proliferacji komórek, niezbędne dla procesu powstawania nowych naczyń limfatycznych. Takie działanie VEGF-C możliwe jest po związaniu się tego białka do receptora VEGFR2 lub VEGFR3 obecnego na komórkach śródbłonka limfatycznego. Jeśli oddziaływanie VEGF-C z jego receptorem zostanie zaburzone, na przykład w wyniku związania VEGF-C przez specyficzne przeciwciało scFv, to nie dojdzie do pobudzenia procesów biochemicznych prowadzących do stymulacji procesu limfangiogenezy, nie powstaną zatem nowe naczynia limfatyczne. Przeciwciała 1F2 i 1F5, dzięki silnemu oddziaływaniu z VEGF-C, są zdolne do zablokowania jego aktywności prolimfangiogennej i działają jak inhibitory VEGF-C, co pokazano w teście tworzenia tubuli na podłożu zawierającym matrigel.

Analizę wpływu przeciwciał 1F2 i 1F5 na tworzenie indukowanych przez VEGF-C wypustek w hodowli sferoidalnej komórek ihLEC zilustrowano na fig. 5. Do hodowli sferoidalnych komórek hLEC

dodawano przeciwciała anty-VEGF-C (1F2 lub 1F5) w stężeniu 8 $\mu\text{g/ml}$ lub sam bufor, w którym zawieszone były przeciwciała (kontrola bez scFv), a następnie VEGF-C o stężeniu 100 ng/ml. Po 24 godz. wykonano zdjęcia hodowli sferoidalnych i analizowano pod względem liczby (fig. 5D) i długości wypustek w przeliczeniu na jedną sferkę (fig. 5E).

Test ten zastosowano, aby dodatkowo potwierdzić, iż uzyskane przeciwciała 1F2 i 1F5 blokują oddziaływanie VEGF-C z jego receptorami, a tym samym blokują prolimfangiogenne właściwości VEGF-C. W obecności tych przeciwciał scFv obserwowano tworzenie mniejszej ilości wypustek przez stymulowane VEGF-C komórki hLEC w hodowli sferoidalnej.

Sekwencje przeciwciał (fig. 6) zostały ustalone za pomocą sekwencjonowania wektorów fagemi-dowych. Jako matryce do sekwencjonowania wykorzystano wyizolowane z bakterii TOP10 fagemidy 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:

>1F2_CDRH2

SIQAAGPTTD

Sekwencja nr 1b:

>1F2_CDRH3

ADWEF

Sekwencja nr 1c:

>1F2_CDRL2

GASV

Sekwencja nr 1d:

>1F2_CDRL3

ALRVPS

Sekwencja nr 2a:

>1F5_CDRH2

SILDHGQGTQ

Sekwencja nr 2b:

>1F5_CDRH3

EGTML

Sekwencja nr 2c:

>1F5_CDRL2

RASR

Sekwencja nr 2d:

>1F5_CDRL3

LRASPR

Sekwencja nr 3:

>1F2

MKYLPTAAAGLLLLAAQFAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSSIQAAGPTTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
ADWEFDYWGGTTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLASVGDRTITCRAS
QSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYGASVLC SGVPTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY
YCQQALRV PSTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Sekwencja nr 4:

>1F5

MKYLPTAAAGLLLLAAQFAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSSILDHGQGTQYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
EGTMLDYWGQTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLASVGDRTITCRAS
QSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYRASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY
YCQQLRASPRTFGQGTKVEIKRAAAHHHHHH

Zastrzeżenia patentowe

1. Przeciwciało formatu scFv, stanowiące inhibitor białka VEGF-C, **znamiennie tym**, że zawiera sekwencję aminokwasową Sekw. nr 3 albo Sekw. nr 4.
2. Przeciwciało formatu scFv, stanowiące inhibitor białka VEGF-C, jak określone w zastrz. 1 do stosowania jako lek w zapobieganiu i/lub leczeniu chorób i/lub stanów związanych z nieprawidłową ilością białka VEGF-C, w tym z dysfunkcją procesu limfangiogenezy.
3. Przeciwciało formatu scFv, stanowiące inhibitor białka VEGF-C do stosowania według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że choroby i/lub stany wybrane są z następującej grupy: nowotwory przerzutujące przez naczynia limfatyczne, ostra białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna, mięsak Kaposi'ego, nowotwory oporne na leczenie anty-VEGF-A, zanik kości wywołany przez VEGF-C, degeneracja plamki żółtej związana z wiekiem, retinopatia cukrzycowa, choroby zapalne związane z nadmiernym poziomem VEGF-C, w tym: reumatoidalne zapalenie stawów i łuszczyca.

Rysunki

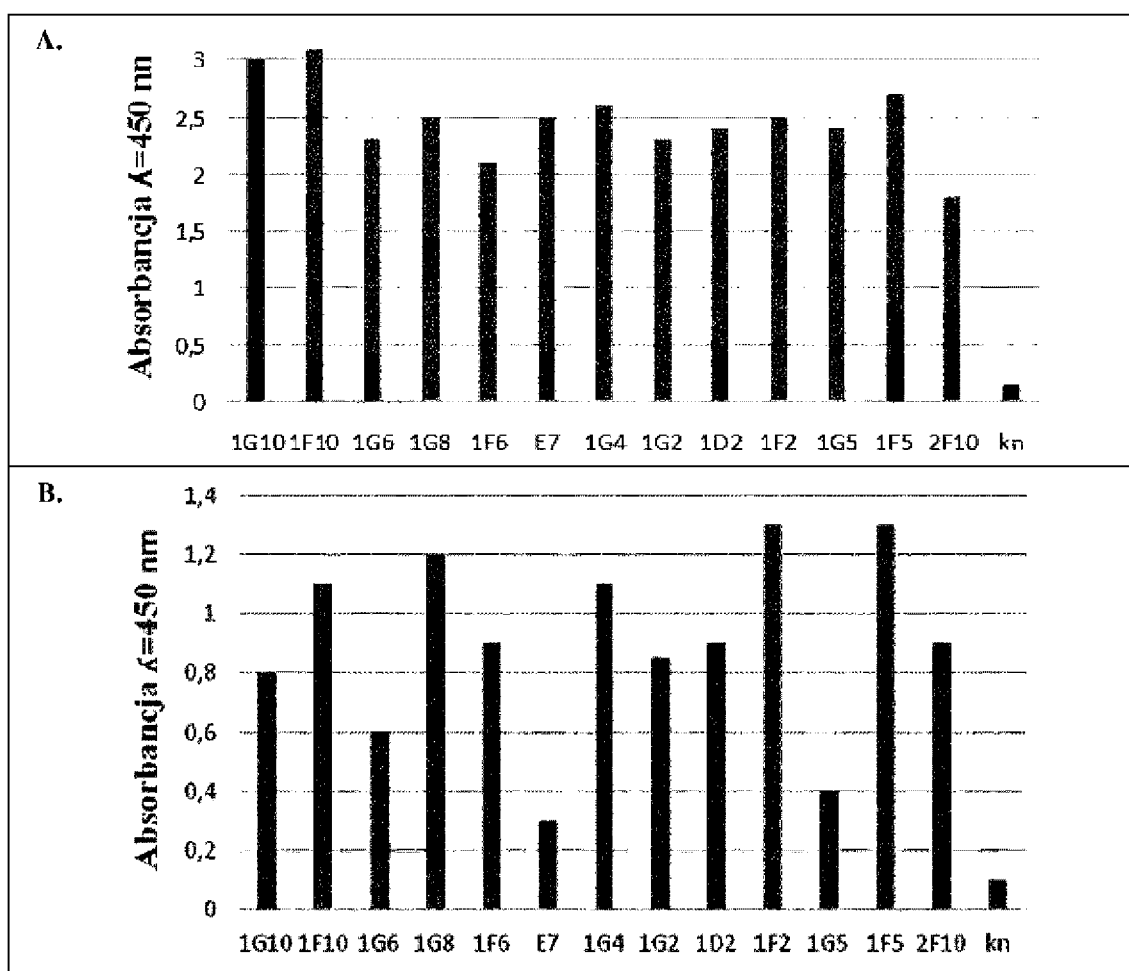


Fig. 1

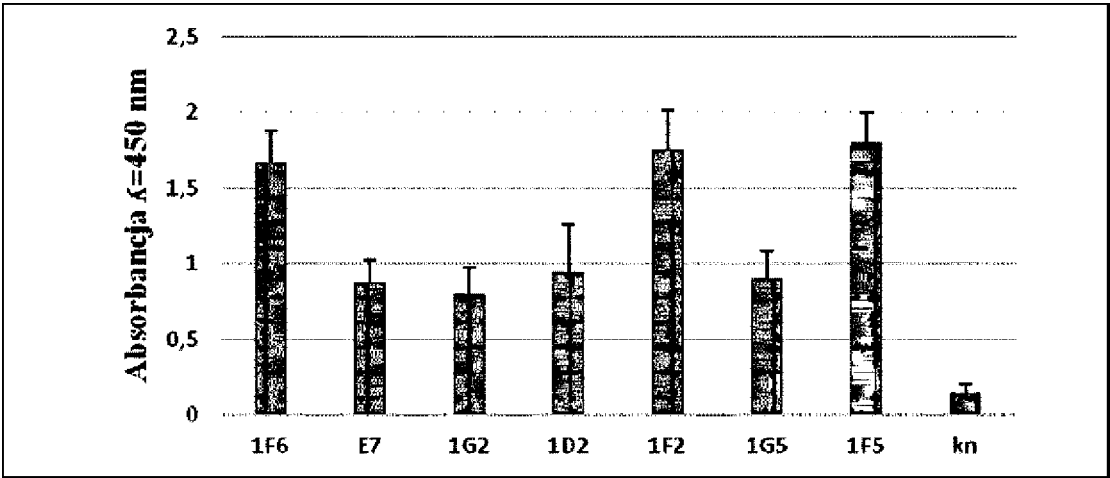


Fig. 2

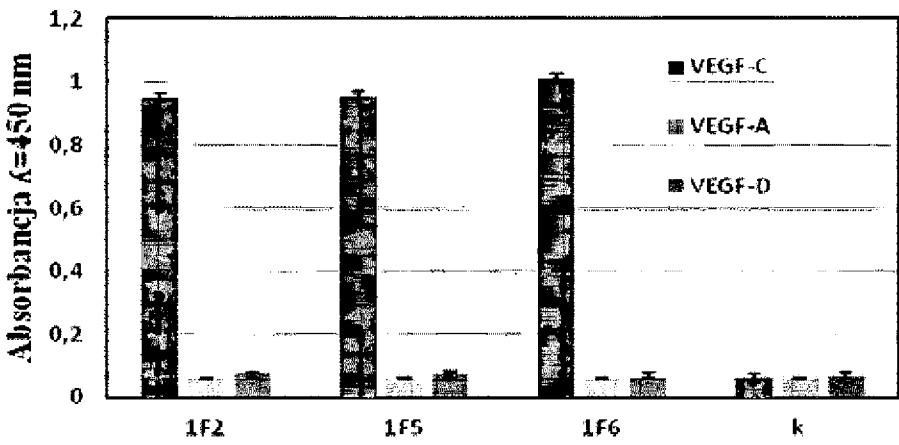


Fig. 3

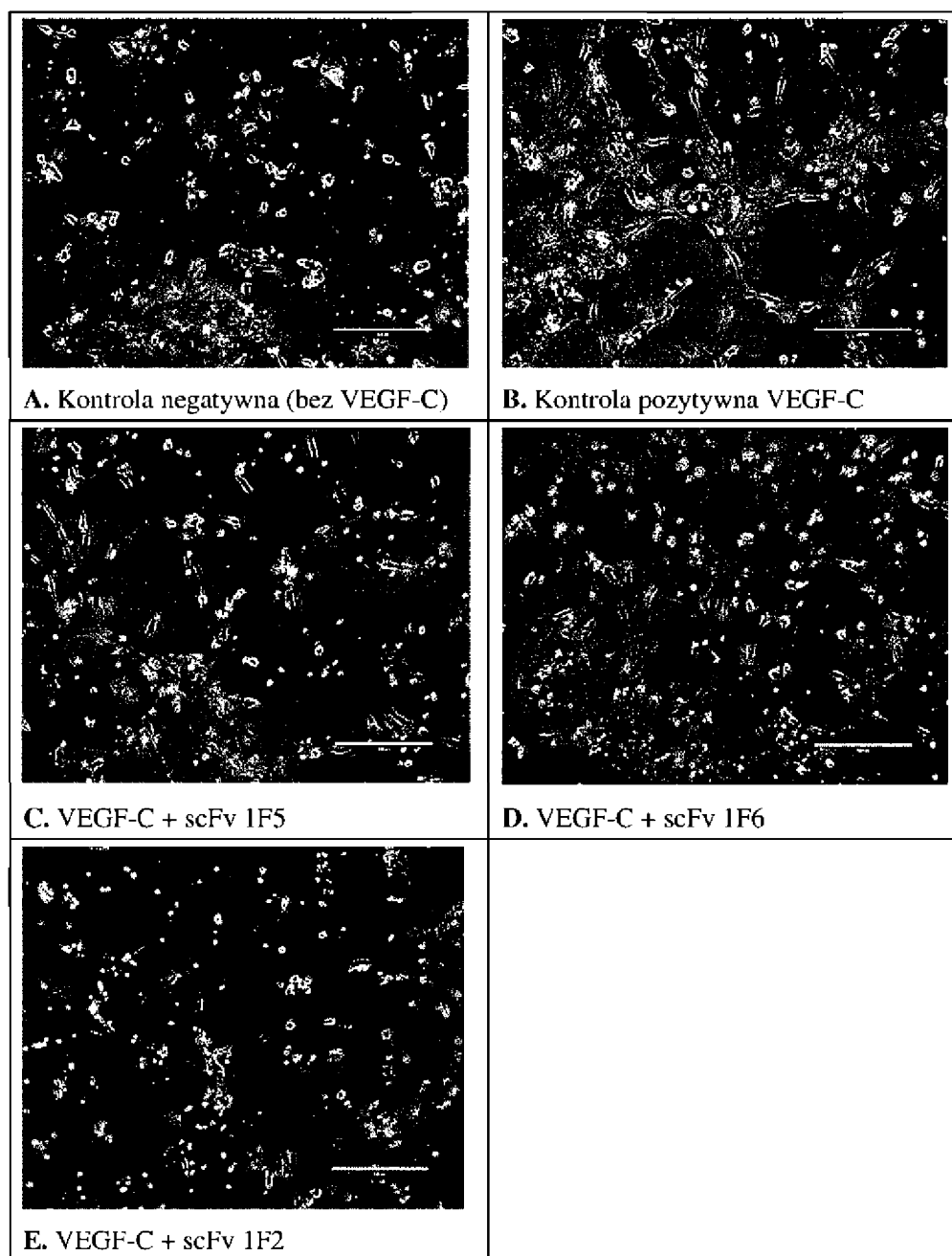
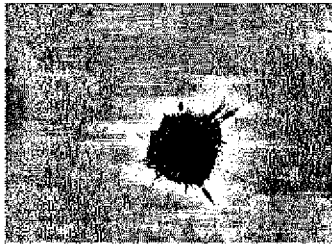
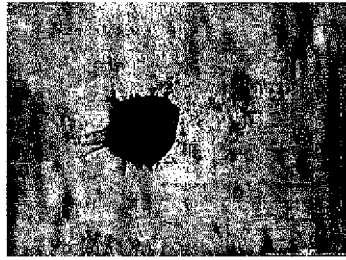


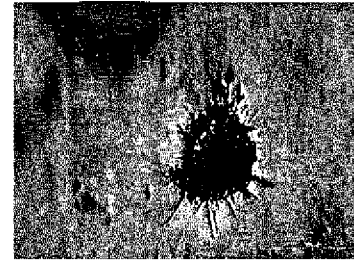
Fig. 4



A. Komórki inkubowane z 1F2

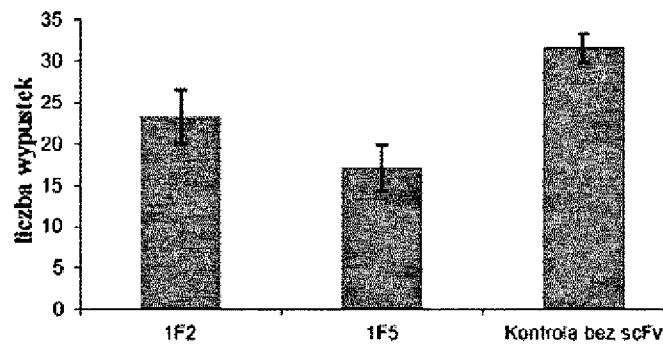


B. Komórki inkubowane z 1F5



C. Komórki inkubowane bez scFv

D.



E.

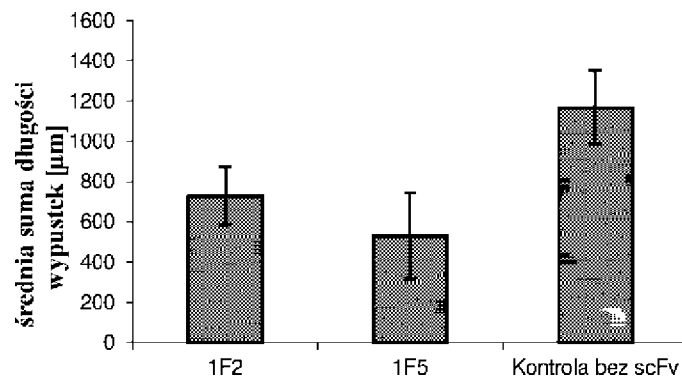


Fig. 5



Fig. 6