



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324904**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19985459	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.05.23 PCT/GB97/01412
(22)	Inng.dag	1998.11.23	(85)	Videreføringsdag	1998.11.23
(24)	Løpedag	1997.05.23	(30)	Prioritet	1996.05.24, GB, 9610967
(41)	Alm.tilgj	1999.01.22			
(45)	Meddelt	2007.12.27			
(73)	Innehaver	Philogen SrL, Via Roma, 22, I-53100 Siena, IT			
(72)	Oppfinner	Dario Neri, Zürich, CH Barbara Carnemolla, c/o Laboratory of Cell Biology Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, 16132 GENOVA, IT Annalisa Siri, Genova, IT Enrica Balza, c/o Laboratory of Cell Biology Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, 16132 GENOVA, IT Patrizia Castellani, c/o Laboratory of Cell Biology Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, 16132 GENOVA, IT Alessandro Pini, Siena, IT Luciano Zardi, c/o Laboratory of Cell Biology Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, 16132 GENOVA, IT Greg Winter, c/o MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, England, GB Giovanni Neri, Philogen S.r.l, LaLizza 7, 52100 SIENA, IT Laura Borsi, c/o Laboratory of Cell Biology Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Largo Rosanna Benzi 10, 16132 GENOVA, IT			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			
(54)	Benevnelse	Antistoff eller antistoffragment rettet mot ED-B domenenet til fibronektin, farmasøytisk sammensetning, nukleinsyre, fag, vertcelle, fremgangsmåte for fremstilling, ulike anvendelser samt diagnostisk kit			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 0 344 134 A J. H. Peters et al., Cell Adhesion and Communication, 1995, vol. 3, s. 67-89. Zang et al., Matrix Biology, 1994, Vol. 14, s. 623-633.			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet et spesifikt bindingsmedlem som er spesifikt for og som bindes direkte til ED-B onkoføtal domene til fibronektin (FN). Det er videre beskrevet materialer og fremgangsmåter for fremstilling av slike bindingsmedlemmer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører spesifikke bindingsmedlemmer for en fetal isoform av fibronectin, ED-B, som blir uttrykt i utviklende neovaskulære tumorer som demonstrert ved immunocytokjemi og ved målsøking av tumorene in vivo. Videre vedrører foreliggende oppfinnelse en farmasøytiske sammensetning, nukleinsyre, fag, verticelle, fremgangsmåte for fremstilling, ulike anvendelser samt et diagnostisk kit.

Det primære målet til de fleste eksisterende former for tumorterapi er å drepe så mange tilstedeværende celler i tumoren som mulig. Den begrensede vellykketheten som er blitt oppdaget med kjemoterapi og radioterapi vedrører den relative mangelen på spesifisitet ved behandling og tendensen for toksiske bivirkninger og på normale vev. En måte som tumorselektiviteten ved terapi kan bli forbedret på er å levere middelet til tumoren gjennom et bindingsprotein, vanligvis omfattende et bindingsdomene til et antistoff som har spesifisitet for et markørantigen uttrykt på overflaten av tumoren, men som er fraværende på normale celler. Denne formen for målsøkt terapi, betegnet "magic bullets", er blitt hovedsakelig eksemplifisert ved monoklonale antistoffer (mAb) fra gnagere som er spesifikke for såkalte tumor-assosierte antigener uttrykt på celleoverflaten. Slike mAb kan bli enten kjemisk konjugert til den cytotoxiske delen (for eksempel etoksin eller et medikament) eller kan bli produsert som et rekombinant fusjonsprotein, hvor genene kodende for mAb og toksin er koblet sammen og som blir uttrykt i tandem.

"Magic bullet" tilnærmelsen har hatt begrenset, men signifikant, effekt ved behandling av human cancer, spesielt ved målsøking av tumorer med lymfoid opprinnelse, hvor maligne celler er mest fritt mottagelige for terapeutisk dose i sirkulasjon. Behandling av faste tumorer forblir derimot et seriøst klinisk problem ved at bare en mindre andel av den totale celledmassen, hovedsakelig celler ved den ytterste periferi til tumoren, blir eksponert for terapeutiske immunkonjugater i sirkulasjon. Disse perifere målcellene fra en såkalt "bindingssete barriere" til det indre av tumoren (Juweid et al, 1992, Cancer Res. 52 5144-5153). Innenfor tumoren er vevsarkitekturen generelt for tett med fibrøs stroma og nært pakke de tumorceller for å muliggjøre penetrering av molekyler i størrelsesområdet til antistoffene. Tumorene er kjent for å ha et forhøyet interstitial trykk på grunn av mangel på lymfatisk drenering, som også vanskeliggjør innfluks av eksogene molekyler. For en oversikt av faktorer som påvirker opptaket av terapeutiske midler i tumorer se Jain, R (1994), Sci. Am. 271 58-65).

Til tross for at det er innlysende begrensninger ved behandling av faste tumorer ved målsøking av tumor-assosierte antigener, har disse tumorene et fellestrekk som

tilveiebringer et alternativt antigenisk mål for antistoffterapi. Når de er øket utover en viss størrelse er tumorene alltid avhengig av en uavhengig blodtilførsel for tilstrekkelig oksygen og næringsmidler for vedvarende vekst. Dersom denne blodtilførselen kan bli forhindret eller utelukket eksisterer det et realistisk potensiale for å sulte tusenvis av tumorceller i prosessen. Når en tumor blir utviklet gjennomgår den en endring til en angiogenisk fenotype som produserer en mengde angiogeniske faktorer som virker på ved siden av liggende kapillære endotelceller og induserer dem til å proliferere og migrere. Strukturen til disse nydannede blodårene er meget disorganisert med blinde ender og forgreninger som fører til øket lekkasje, i skarp kontrast til den ordnede strukturen til kapillærer i normalt vev. Induksjon av angiogenese er ledsaget av oppregulering av ekspresjon av visse celleoverflateantigener, og mange av disse er vanlige i vaskulaturen til normale vev. Identifisering av antigener som er unike for neovaskulaturen til tumorene er den vesentlig begrensende faktoren ved utvikling av en genetisk behandling for faste tumorer gjennom vaskulær målsøking. Antigenet som er gjenstand ifølge foreliggende oppfinnelse beskriver dette problemet direkte.

I løpet av tumorprogresjon blir den ekstracellulære matrisen til omgivende vev remodulert ved hjelp av to hovedprosesser: (1) den proteolytiske degraderingen av ekstracellulære matrisekomponenter til normalt vev og (2) denovosyntese av ekstracellulære matrisekomponenter til både tumorceller og stroma celler aktivert av tumor-induserte cytokiner. Disse to prosessene, med likvekt, danner en "tumoral ekstracellulær matrise", som tilveiebringer et mer egnet miljø for tumorprogresjon og er kvalitativt og kvantitativt forskjellig fra den til normale vev. Blant komponentene av denne matrisen er de store isoformene av tenascin og fibronectin (FN); og beskrivelsen av disse proteinene som isoformer gjenkjenner deres omfattende strukturelle heterogenisitet som blir tilveiebrakt på transkripsjonelt, post-transkripsjonelt og post-translasjonelt nivå (se nedenfor). Det er en av isoformene til fibronectin, såkalt B+ isoform (B-FN) som er gjenstand for foreliggende oppfinnelse.

Fibronektiner (FN) er multifunksjonelle, glykoproteinbestanddeler med høy molekylvekt av både ekstracellulær matrise og kroppsfluidier. De er involvert i mange forskjellige biologiske prosesser så som etablering og opprettholdelse av normal cellemorfologi, cellemigrering, hemostase og trombose, leging av sår og onkogen transformasjon (for oversikt se Alitalo et al., 1982; Yamada, 1983; Hynes, 1985; Ruoslahti et al., 1988; Hynes, 1990; Owens et al., 1986). Strukturell diversitet i FN blir tilveiebrakt ved alternativ spleising av tre regioner (ED-A, ED-B og III-CS) av primært FN transkript (Hynes, 1985; Zardi et al., 1987) for å danne minst 20 forskjellige

isoformer, hvor noen blir uttrykt i tumor og normalt vev. I tillegg til å bli regulert på en vevs- og utviklingsmessig måte er det kjent at spleisemønsteret til FN-pre-mRNA er deregulert i transformerte celler og i maligne tilfeller (Castellani et al., 1986; Borsi et al., 1987; Vartio et al., 1987, Zardi et al, 1987; Barone et al, 1989; Carnemolla et al, 1989; Oyama et al, 1989, 1990; Borsi et al, 1992b). FN isoformer inneholdende ED-A, ED-B og IIICS sekvenser blir uttrykt i høyere grad i transformerte og maligne tumorceller enn i normale celler. Spesielt FN isoformen inneholdende ED-B sekvensen (B+ isoformen), blir sterkt uttrykt i føtale og tumorvev samt i løpet av leging av sår. men er begrenset når det gjelder ekspresjon i normale vev fra voksne (Norton et al, 1987; Schwarzbauer et al, 1987; Gutman and Kornblihtt, 1987; Carnemolla et al, 1989; French-Constant et al, 1989; French-Constant and Hynes, 1989; Laitinen et al, 1991.) B+ FN molekyler er ikke detekterbare i modne årer, men oppregulerte i angiogenetiske blodårer i normal (for eksempel utvikling av endometrium), patologisk (for eksempel i diabetisk retinopati) og tumorutvikling (Castellani et al, 1994).

ED-B sekvensen er en fullstendig type III-homologi gjentakelse som blir kodet av et enkelt ekson og som omfatter 91 aminosyrer. I kontrast til alternativ spleiset IIICS isoform, som inneholder et celletype-spesifikt bindingssete, er den biologiske funksjonen til A+ og B+ isoformene fortsatt diskutabelt (Humphries et al., 1986).

Tilstedeværelse av B+ isoformen utgjør i seg selv et tumor-indusert neoantigen, men i tillegg, eksponerer ED-B ekspresjonen et normalt kryptisk antigen innenfor type III gjentakelse 7 (foranstående ED-B), på grunn av at denne epitopen ikke blir eksponert i FN molekyler som mangler ED-B, medfører det at ED-B ekspresjon induserer ekspresjon av neoantigener både direkte og indirekte. Disse kryptiske antigeniske setene danner målet for et monoklonalt antistoff (mAb) betegnet BC-1 (Carnemolla et al, 1992). Spesifisiteten og biologiske egenskaper til dette mAb er blitt beskrevet i EP 0 344 134 B1 og det kan oppnås fra hybridomen deponert til European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, Salisbury, UK med nummer 88042101. mAb er blitt vellykket anvendt for å lokalisere angiogenetiske blodårer til tumorer uten kryssreaktivitet med modent vaskulært endotelium, og illustrerer potensialet til FN isoformer for vaskulær målsøking ved anvendelse av antistoffer.

Det er fortsatt usikkerhet ved spesifisiteten til BC-1 mAb. Det faktumet at BC-1 ikke direkte gjenkjenner B+ isoformen har ført til at det er blitt stilt et spørsmål om i noen vevsepitoper gjenkjent av BC-1 kan være umaskert uten tilstedeværelse av ED-B og derfor føre indirekte til uønsket kryssreaktivitet med BC-1. BC-1 er helt spesifikk for

human B+ isoformen og det betyr at studier i dyr på biofordelingen og tumorlokalisering av BC-1 ikke er mulig. Til tross for at polyklonale antistoffer mot rekombinante fusjonsproteiner inneholdende B+ isoformen er blitt produsert (Peters et al, 1995), er de bare reaktive med FN som er blitt behandlet med N-glykanase for å demaskere epitopen.

5 Videre er det i Zang et al, Matrix biology, 1994, vol.14, side 623-633, beskrevet polyklonale antistoff med spesifisitet for canine-ED-B domenet, men hvor deglykosylering er nødvendig for binding til ED-B epitoper ved Western blot analyser.

Et ytterligere generelt problem ved anvendelse av musemonoklonale antistoffer er

10 humant anti-muse antistoff (HAMA) respons (Schroff et al, 1985; Dejager et al, 1988). HAMA responser har en rekke effekter, fra nøytralisering av administrert antistoff som fører til en redusert terapeutisk dose, til allergiske responser, serumsyke og nyrrereduksjon.

15 Til tross for at polyklonalt antisera reaktivt med rekombinant ED-B er blitt identifisert (se ovenfor) har isolering av mAb med samme spesifisitet som BC-1 etter immunisering av mus generelt vist seg å være vanskelig på grunn av humane og muse ED-B proteiner som viser omtrent 100% sekvenshomologi. De humane proteiner kan derfor se ut som et selv-antigen overfor musen som deretter ikke danner en immunrespons dertil. Etter over

20 10 år med omfattende forskning innenfor dette området er bare et enkelt mAb blitt identifisert med indirekte reaktivitet mot B+ FN isoformen (BC-1), uten gjenkjenning av ED-B direkte. Det er selvfølgelig signifikant at spesifisiteten til BC-1 er for en kryptisk epitop eksponert som en konsekvens av ED-B, i stedet for del av selve ED-B, som sannsynligvis er fraværende fra muse FN og som derfor ikke blir sett som "selv" av

25 immunsystemet til musen.

Realisering av foreliggende oppfinnelse er blitt oppnådd ved anvendelse av en alternativ strategi i forhold til den som tidligere er blitt anvendt og hvor på forhånd immunisering med fibronektin eller ED-B ikke er nødvendig. Antistoffer med spesifisitet for ED-B

30 isoformen er blitt oppnådd som en enkeltkjede Fv (scFv) fra bibliotek av humane antistoff variable regioner utvist på overflaten av filamentøse bakteriofag (Nissim et al., 1994; se også WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172).

35 Vi har funnet ved anvendelse av et antistoff fagbibliotek at spesifikke scFv kan bli isolert både ved direkte seleksjon for rekombinante FN fragmenter inneholdende ED-B domenen og på selve rekombinant ED-B når disse antigenene er belagt på en fast fase

("panning"). Disse samme kildene av antigen er også med hell blitt anvendt for å produsere "andre generasjon" scFv med forbedrede egenskaper i forhold til opphavsklonene i en fremgangsmåte for "affinitetsmodning". Vi har oppdaget at isolert scFv reagerer sterkt og spesifikt med B+ isoformen til human FN uten tidligere
5 behandling med N-glykanase.

I anti-tumor applikasjoner har humane antistoff antigen bindende domener, tilveiebrakt ifølge foreliggende oppfinnelse, den fordel at de ikke blir utsatt for HMA respons. Som eksemplifisert heri er de nyttige i immunohistokjemiske analyser av tumorvev,
10 både in vitro og in vivo. Disse og andre anvendelser er angitt heri og er innlysende for fagfolk innenfor dette fagområdet.

TERMINOLOGI

15

Spesifikt bindingsmedlem

Dette beskriver et medlem av et par av molekyler som har bindingsspesifisiteter for hverandre. Medlemmene av et spesifikt bindingspar kan være naturlig avledet eller helt eller delvis produsert syntetisk. Et medlem av parret av molekyler har et område på dets
20 overflate, eller et hulrom, som spesifikt binder til, og er derfor komplementært med, en spesielt romlig og polar organisering av det andre medlemmet av parret av molekyler. Medlemmer av parret har følgelig den egenskapen at de bindes spesifikt til hverandre. Eksempler på typer av spesifikke bindingspar er antigen-antistoff, biotin-avidin, hormon-hormon reseptor, reseptor-ligand, enzym-substrat.

25

Antistoff

Dette beskriver et immunoglobulin enten produsert naturlig eller delvis eller fullstendig syntetisk. Betegnelsen omfatter også et hvilket som helst polypeptid eller protein som har et bindingsdomene som er, eller er homolog med, et antistoff bindende domene.
30 Disse kan bli oppnådd fra naturlige kilder, eller de kan bli delvis eller fullstendig produsert syntetisk. Eksempler på antistoffer er immunoglobulin isotyper og deres isotypiske subklasser; fragmenter som omfatter et antigen bindende domene så som Fab, scFv, Fv, dAb, Fd og dialegemer.

35 Det er mulig å ta monoklonale og andre antistoffer og anvende teknikker for rekombinant DNA teknologi for å produsere andre antistoffer eller kimeriske molekyler som har beholdt spesifisiteten til det opprinnelige antistoffet. Slike teknikker har

innbefattet introdusering av DNA kodende for immunoglobulinvariabel regionen, eller komplementaritetsbestemmende regioner (CDR), og et antistoff mot konstante regioner, eller konstante regioner pluss skjelettregioner fra et annet immunoglobulin. Se blant annet EP-A-184187, GB 2188638A eller EP-A-239400. Et hybridom eller annen celle
 5 som produserer et antistoff kan bli utsatt for genetisk mutasjon eller andre forandringer som kan endre bindingsspesifisiteten til produserte antistoffer.

I det antistoffet kan bli modifisert på en rekke måter kan betegnelsen "antistoff" omfatte et hvilket som helst spesifikt bindingsmedlem eller forbindelse som har et
 10 bindingsdomene med nødvendig spesifisitet. Betegnelsen omfatter følgelig antistoff fragmenter, derivater, funksjonelle ekvivalenter og homologer av antistoffer, inkludert et hvilket som helst polypeptid som omfatter en immunoglobulinbindende domene, enten naturlig eller fullstendig eller delvis syntetisk. Kimeriske molekyler omfattende et immunoglobulin bindende domene, eller en ekvivalent, fusjonert til et annet polypeptid
 15 er derfor innbefattet. Kloning og ekspresjon av kimeriske antistoffer er beskrevet i EP-A-0120694 og EP-A-0125023.

Det er blitt vist at fragmenter av et helt antistoff kan utføre funksjonen med å binde antigener. Eksempler på bindingsfragmenter er (i) Fab fragmentet bestående av VL, VH, CL og CH1 domener; (ii) Fd fragmentet bestående av VH og CH1 domene; (iii) Fv
 20 fragmentet bestående av VL og VH domene til et enkelt antistoff; (iv) dAb fragmentet (Ward et al., 1989) som består av en VH domene; (v) isolerte CDR regioner; (vi) F(ab')₂ fragmenter, et bivalent fragment omfattende to koblede Fab fragmenter (vii) enkeltkjede Fv molekyler (scFv), hvori en VH domene og en VL domene er koblet med en
 25 peptidlinker som muliggjør at de to domene assosierer for å danne et antigenbindende sete (Bird et al, 1988; Huston et al, 1988) (viii) bispesifikk enkeltkjede Fv dimerer (PCT/US92/09965) og (ix) "dialeger" ("diabodies"), multivalente eller multispesifikke fragmenter konstruert ved genfusjon (WO94/13804; Holliger et al, 1993).

30 "Diabodies" er multimerer av polypeptider, hvor hvert polypeptid omfatter et første domene omfattende en bindende region av en immunoglobulin lettkjede og et andre domene som omfatter en bindende region av en immunoglobulin tungkjede, i det de to domene er koblet (for eksempel med en peptidlinker), men som ikke har evne til å
 35 assosiere med hverandre for å danne et antigen bindende sete: antigen bindende sete blir dannet ved assosiasjon av det første domenet til et polypeptid innen multimeren med det andre domenet av et annet polypeptid innenfor multimeren (WO94/13804).

Hvor bispesifikke antistoffer skal bli anvendt kan disse være konvensjonelle bispesifikke antistoffer, som kan bli fremstilt på forskjellige måter (Holliger and Winter, 1993), for eksempel fremstilt kjemisk eller fra hybride hybridomer, eller kan være
 5 hvilke som helst av de bispesifikke antistoff fragmentene nevnt ovenfor. Det kan være fordelaktig å anvende scFv dimerer eller "diabodies" istedenfor hele antistoffer. "Diabodies" og scFv kan bli konstruert uten en Fc region ved anvendelse av bare variable domener, som potensielt reduserer effektene av den anti-idiotypiske reaksjonen. Andre former for bispesifikke antistoffer innbefatter enkeltkjeden "Janusins" beskrevet i
 10 Traunecker et al., (1991).

Bispesifikke "diabodies", i motsetning til bispesifikke hele antistoffer, kan også være spesielt nyttig på grunn av at de lett kan bli konstruert og uttrykt i *E. coli*. "Diabodies" (og mange andre polypeptider så som antistoff fragmenter) med hensiktsmessige
 15 bindingsspesifisiteter kan lett bli valgt ved anvendelse av fagfremvisning (WO94/13804) fra bibliotek. Dersom en arm av "diabody" skal bli holdt konstant, blant annet med en spesifisitet rettet mot antigen X, kan et bibliotek bli dannet hvor den andre armen blir variert og et antistoff med hensiktsmessig spesifisitet selektert.

20 Antigenbindende domene

Dette beskriver den delen av et antistoff som omfatter området som spesifikt blir bundet til og som er komplementær med en del av eller et helt antigen. Hvor et antigen er stort kan et antistoff bare bli bundet til en spesiell del av antigenet, og delen er betegnet en epitop. Et antigenbindende domene kan bli tilveiebrakt av en eller flere antistoff
 25 variable domener. Det er foretrukket at et antigenbindende domene omfatter en antistoff lettkjede variabel region (VL) og en antistoff tungkjede variabel region (VH).

Spesifikt

Dette refererer til situasjonen hvor et medlem av et spesifikt bindingspar ikke ville vise
 30 noen signifikant binding til molekyler annet enn dets spesifikke bindingspartner. Betegnelsen kan også anvendes hvor for eksempel et antigen bindende domene er spesifikt for en bestemt epitop som blir båret av et antall antigener, i hvilket tilfellet det spesifikke bindingsmedlemmet som bærer den antigenbindende domenen vil kunne bli bundet til forskjellige antigener som bærer epitopen.

35

Funksjonell ekvivalent variant form

Dette refererer til et molekyl (varianten) som til tross for å ha strukturelle forskjeller med et annet molekyl (opphavet) har beholdt en betydelig homologi og også minst en viss del av den biologiske funksjonen til opphavsmolekylet, for eksempel evnen til å binde et spesielt antigen eller epitop. Varianter kan være i form av fragmenter, derivater eller mutanter. En variant, et derivat eller en mutant kan bli oppnådd ved modifikasjon av opphavsmolekylet ved addisjon, delesjon, substitusjon eller innskudd av en eller flere aminosyrer, eller ved kobling av andre molekyler. Disse forandringene kan bli dannet på nukleotid eller proteinnivå. For eksempel kan det kodede polypeptidet være et Fab fragment som deretter blir koblet til en Fc hale fra en annen kilde. Alternativt kan en markør så som et enzym, fluorescein osv. bli tilkoblet.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt et spesifikt bindingsmedlem som er spesifikt for, og binder direkte til, ED-B onkoføtal domenet til fibronektin (FN), med en dissosiasjonskonstant (K_d) for ED-B på mindre enn $6 \times 10^{-8} M$, når målt som rensed monomer.

I en utførelsesform binder et spesifikt bindingsmedlem, etter behandling av FN med proteasen termolysin, til alle FN-inneholdende ED-B. Kjente FN er identifisert i to artikler skrevet av Carnemolla et al., 1989; 1992. Referansen til "alle FN som inneholder ED-B" kan bli tatt som referanse til alle FN identifisert i disse artiklene som inneholder ED-B.

Det spesifikke bindingsmedlemmet binder fortrinnsvis human ED-B, og fortrinnsvis B+FN fra minst en annen art, så som mus, rotte og/eller kylling. Det er foretrukket at det spesifikke bindingsparmedlemmet har evne til å binde både human fibronektin ED-B og en ikke-human fibronektin ED-B, så som den fra en mus, som muliggjør testing og analysing av sbp medlemmet i en dyremodell.

Spesifikke bindingsparmedlemmer ifølge foreliggende oppfinnelse binder fibronektin ED-B uten å konkurrere med det offentlig tilgjengelige deponerte antistoffet BC-1 angitt heri. BC-1 er kun spesifikt for human B+ isoformen. Spesifikke bindingsparmedlemmer ifølge foreliggende oppfinnelse binder ikke samme epitop som BC-1.

Binding av et spesifikt bindingsmedlem ifølge foreliggende oppfinnelse til B+FN kan bli inhibert av ED-B domenet.

I en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er bindingsdomenen reaktiv med, dvs. har evne til å binde, fibronectin ED-B uten tidligere behandling av fibronectin ED-B med N-glykanase.

- 5 Spesifikke bindingsparmedlemmer ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli tilveiebrakt som isolater eller i renset form, dvs. i et preparat eller en formulering fri for andre spesifikke bindingsparmedlemmer, for eksempel antistoffer eller antistoff fragmenter, eller fri for andre spesifikke bindingsparmedlemmer som har evne til å binde fibronectin ED-B. Det er foretrukket at spesifikke bindingsmedlemmer ifølge foreliggende
- 10 oppfinnelse blir tilveiebrakt i vesentlig ren form. De kan være "monoklonale" ved at de er fra en enkelt klon, istedenfor å være begrenset til antistoffer oppnådd ved anvendelse av tradisjonell hybridomteknologi. Som angitt, kan spesifikke bindingsparmedlemmer ifølge foreliggende oppfinnelse bli oppnådd ved anvendelse av bakteriofag display teknologi og/eller ekspresjon i rekombinante, for eksempel bakterielle, vertsceller. Det
- 15 er ikke tidligere beskrevet et monoklonalt spesifikt bindingsparmedlem som direkte binder fibronectin ED-B.

- Det spesifikke bindingsmedlemmet omfatter et antistoff. Det spesifikke bindingsmedlemmet kan omfatte en polypeptidsekvens i form av et antistoff fragment så
- 20 som enkeltkjede FV (scFv). Andre typer av antistoff fragmenter kan også bli anvendt så som Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Facb eller et diabody (Winter and Milstein, 1991; WO94/13804). Det spesifikke bindingsmedlemmet kan være i form av et helt antistoff. Det hele antistoffet kan være i hvilke som helst av formene av antistoffisotyper for eksempel IgG, IgA, IgD, IgE og IgM og hvilke som helst av formene av isotype
- 25 subklassene for eksempel IgG1 eller IgG4.

- Antistoffet kan ha en hvilke som helst opprinnelse, for eksempel human, murin, ovin eller lapin. Andre avvik vil være innlysende for fagfolk innenfor dette fagområdet. Det er foretrukket at antistoffet er av human opprinnelse. Med "human" menes et antistoff
- 30 som er delvis eller fullstendig avledet fra et humant cDNA, et protein eller et peptidbibliotek. Denne betegnelsen innbefatter humaniserte peptider og proteiner av ikke-human opprinnelse som er blitt modifisert for å tilveiebringe humane karaktertrekk til antistoffmolekylet og dermed muliggjøre at molekylet forbigår motstandene i det humane immunsystemet.

- 35 Det spesifikke bindingsmedlemmet kan også være i form av et omkonstruert antistoff for eksempel et bispesifikt antistoffmolekyl (eller et fragment så som F(ab')₂) som har

en antigenbindende arm (dvs. spesifikk domene) mot fibronektin ED-B som beskrevet og en annen arm mot en annen spesifisitet, eller et bivalent eller multivalent molekyl.

I tillegg til antistoffsekvenser kan det spesifikke bindingsmedlemmet omfatte andre aminosyrer, for eksempel som danner et peptid eller et polypeptid, eller gir molekylet et annet funksjonelt karaktertrekk i tillegg til evnen til å binde antigen. For eksempel kan det spesifikke bindingsmedlemmet omfatte en markør, et enzym eller et fragment derav osv.

- 10 Det bindende domenet kan omfatte en del eller hele VH domenen kodet av et kimlinjesegment eller et omarrangert gensegment. Det bindende domenet kan omfatte en del eller hele VL kappadomenet eller et VL lambda domene.

- 15 Det bindende domenet kan omfatte en VH1, VH3 eller VH4 kim-linje gensekvens, eller en re-arrangert form derav.

- Et spesifikt bindingsmedlem ifølge foreliggende oppfinnelse kan omfatte et tungkjedevariabel region ("VH") domene avledet fra human kimlinje DP47 og sekvensen derav er vist i figur 1(a), residene 1 til 98. "DP" nomenklaturen er beskrevet i Tomlinson et al, (1992). Aminosyresekvensen til CDR3 kan være Ser Leu Pro Lys. Aminosyresekvensen til CDR3 kan være Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu. Det bindende domenet til et spesifikt bindingsmedlem ifølge foreliggende oppfinnelse kan innbefatte et VH domene som omfatter aminosyresekvensene vist i figur 1(a) for CGS1 og CGS2.

- 25 Det bindende domenet kan omfatte en lettjedevariabel region ("VL" domene) avledet fra human kimlinje DPL16 og sekvensen er vist i figur 1(b) som kodonene 1-90.

- 30 VL domenet kan omfatte en CDR3 sekvens Asn Ser Ser Pro Val Val Leu Asn Gly Val Val. VL domenet kan omfatte en CDR3 sekvens Asn Ser Ser Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val.

- Spesifikke bindingsmedlemmer ifølge oppfinnelsen kan omfatte funksjonelt ekvivalente varianter av sekvensene vist i figur 1, for eksempel en eller flere aminosyrer er blitt skutt inn, deletert, substituert eller tilsatt, dersom en egenskap som angitt heri er beholdt. CDR3 sekvensen kan blant annet bli endret, eller en eller flere forandringer kan bli utført på rammeverkkregioner, eller rammeverket kan bli erstattet med en annen

rammeverkregion eller en modifisert form, forutsatt at det spesifikke bindingsmedlemmet binder ED-B.

En eller flere CDR fra et VL eller VH domene av et antigen bindende domene til et antistoff beskrevet heri kan bli anvendt i såkalte "CDR-podning" hvor en eller flere CDR sekvenser av et første antistoff blir plassert innenfor et rammeverk av sekvenser som ikke er av det antistoffet, for eksempel av et annet antistoff, som beskrevet i EP-B-0239400. CDR sekvenser for CGS1 og CGS2 er vist i figur 1(a) og 1(b).

Et spesifikt bindingsmedlem ifølge oppfinnelsen kan være et som konkurrerer med et antistoff eller scFv beskrevet heri for binding til fibronectin ED-B. Konkurransen mellom bindingsmedlemmer kan lett bli analysert in vitro, for eksempel ved kobling av et spesifikt reportermolekyl til et bindingsmedlem som kan bli detektert i nærvær av andre ikke-koblede bindingsmedlemmer, for å muliggjøre identifikasjon av spesifikke bindingsmedlemmer som binder den samme epitop eller en overlappende epitop.

Et spesifikt bindingsmedlem ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli anvendt i en fremgangsmåte som omfatter medføring eller muliggjøring av binding av det spesifikke bindingsmedlemmet til dets epitop. Binding kan etterfølge administrering av det spesifikke bindingsmedlemmet til et pattedyr, for eksempel menneske eller gnager så som mus.

Et aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av et spesifikt bindingsmedlem som angitt ovenfor for fremstilling av et middel for anvendelse som et diagnostisk reagens for tumorer. Bevis fra dyremodelleksperimenter beskrevet nedenfor viser at bindingsmedlemmene ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige i in vivo tumorlokalisering.

Foretrukne spesifikke bindingsmedlemmer ifølge foreliggende oppfinnelse innbefatter de som blir bundet til humane tumorer, for eksempel i et kryostatsnitt, som viser en invasiv og angiogenisk fenotype og de som blir bundet til embryoniske vev, for eksempel i et kryostatsnitt. Bindingen kan bli demonstrert ved immunocytokjemisk farging.

I en foretrukket utførelsesform binder det spesifikke bindingsmedlemmet ikke, eller binder ikke spesifikt, tenascin, et ekstracellulært matriseprotein.

I en annen foretrukket utførelsesform binder det spesifikke bindingsmedlemmet ikke, eller ikke i betydelig grad, normal human hud, for eksempel i et kryostatsnitt og/eller som demonstrert ved anvendelse av immunocytokjemisk farging.

- 5 Ytterligere utførelsesformer av spesifikke bindingsmedlemmer ifølge foreliggende oppfinnelse binder ikke, eller binder ikke signifikant, til en eller flere normale vev (for eksempel i kryostatsnitt og/eller som demonstrert ved anvendelse av immunocytokjemisk farging) selektert fra lever, milt, nyre, mave, tynntarm, tykktarm, ovarie, uterus, blære, bukspyttkjertel, suprarenale kjertler, skjelettmuskel, hjerte, lunge, tyroid og hjerne.

- Et spesifikt bindingsmedlem for ED-B kan bli anvendt som et *in vivo* målsøkende middel som kan bli anvendt for spesifikt å demonstrere tilstedeværelse og beliggenhet av tumorer som uttrykker eller er assosiert med fibronectin ED-B. Det kan bli anvendt som et billeddannende middel. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en *in-vitro* fremgangsmåte for å bestemme tilstedeværelse av en celle eller tumor som uttrykker eller er assosiert med fibronectin ED-B ekspresjon i det fremgangsmåten omfatter kontakting av celler med et spesifikt bindingsmedlem som tilveiebrakt og bestemmelse av bindingen av spesifikke bindingsmedlemmer til cellene. Fremgangsmåten kan bli utført *in vitro* på en forsøksprøve av celler fjernet fra kroppen.

- Reaktivitetene til antistoffene på en celleprøve kan bli bestemt ifølge en hvilke som helst hensiktsmessig metode. Merking med individuelle reportertermolekyler er en mulighet. Reportertermolekylene kan direkte eller individuelt danne detekterbare, og fortrinnsvis målbare, signaler. Kobling av reportertermolekylene kan være direkte eller indirekte, kovalent, for eksempel via en peptidbinding eller ikke-kovalent. Kobling via en peptidbinding kan være som et resultat av rekombinant ekspresjon av et genfusjonskodende antistoff og reportertermolekyl.

- 30 En foretrukket metode er ved kovalent binding av hvert antistoff med et individuelt fluorokrom, fosfor eller en laserfarge med spektralt isolert absorpsjon eller emissjonskaraktertrekk. Egnede fluorokromer innbefatter fluoreskein, rhodamin, phycoerythrin og texas rød. Egnede kromogene fargestoffer innbefatter diaminobenzidin.

35

Andre reportertermolekyler innbefatter makromolekylære koloidalpartikler eller partikkelformig materiale så som latekskuler som er fargede, magnetiske eller

paramagnetiske og biologiske eller kjemiske aktive midler som kan direkte eller indirekte forårsake detekterbare signaler som kan observeres visuelt, detekteres elektronisk eller registrert på annen måte. Disse molekylene kan være enzymer som katalyserer reaksjoner som utvikler eller forandrer farge eller forårsaker forandringer i elektriske egenskaper. De kan være molekylært eksiterbare, så som elektroniske overganger mellom energitilstander som resulterer i karakteristiske spektralabsorpsjoner eller emisjoner. Den kan innbefatte kjemiske bestanddeler anvendt i sammenheng med biosensorer. Biotin/avidin eller biotin/streptavidin og alkaliske fosfatasedetektesjonssystemer kan bli anvendt.

10

Metode for å bestemme bindingen er ikke et trekk ifølge foreliggende oppfinnelse og fagfolk innenfor dette området har evne til å velge en egnet metode ifølge preferanser og generelle kunnskaper.

15

Signaler dannet av individuelle antistoff-reporterkonjugater kan bli anvendt for å oppnå kvantifiserbare absolutte eller relative data av relevant antistoffbinding i celleprøver (normal og test). I tillegg kan en generell nukleær farge så som propidiumiodid bli anvendt for å nummerere den totale cellepopulasjonen i en prøve og muliggjøre muligheten av kvantitative forhold mellom individuelle cellepopulasjoner og i forhold til totale celler. Når et radionukleotid så som ^{125}I , ^{111}In eller $^{99\text{m}}\text{Tc}$ er koblet til et antistoff, dersom det antistoffet fortrinnsvis blir lokalisert i tumoren istedenfor i normale vev, kan tilstedeværelse av radiomarkør i tumorvevet bli detektert og kvantifisert ved anvendelse av et gammakamera. Kvaliteten til tumorbildet oppnådd er direkte korrelert med signal:bakgrunnsstøyforholdet.

25

Antistoffer kan bli anvendt som diagnostiske midler for å oppspore nylig vaskulariserte tumorer, og kan også bli anvendt, for eksempel i modifisert form, for å levere cytotoksiske midler eller for å aktivere koagulasjonen i nye blodårer og dermed utarme utviklende tumor for oksygen og næringsmidler og utgjør en indirekte form for tumorterapi.

30

Et aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører et spesifikt bindingsmedlem som ovenfor for anvendelse som et terapeutisk middel, for eksempel når koblet, bundet eller omkonstruert som et fusjonsprotein for å inneha en effektorfunksjon. Et spesifikt bindingsmedlem ifølge oppfinnelsen kan bli anvendt for å målsøke et toksin, radioaktivitet, T-celler, drepeceller eller andre molekyler til en tumor som uttrykker eller er assosiert med antigenet av interesse.

35

- Et spesifikt bindingsmedlem kan anvendes i behandlingsmetoder som omfatter administrering av et spesifikt bindingsmedlem, som tilveiebrakt, farmasøytiske sammensetninger omfattende slike spesifikke bindingsmedlemmer, og i anvendelse av et slikt spesifikt bindingsmedlem for fremstilling av et medikament for administrering, for eksempel i en metode for å fremstille et medikament eller en farmasøytisk sammensetning omfattende formulering av det spesifikke bindingsmedlemmet med en farmasøytisk akseptabel bærer.
- De tilveiebrakte sammensetninger kan bli administrert til individer. Administreringen er fortrinnsvis i en "terapeutisk effektiv mengde", idet dette er tilstrekkelig for å være fordelaktig for en pasient. En slik fordel kan i det minste være lindring av minst et symptom. Den virkelige mengden som blir administrert, og rate og tidsforløp for administreringen, vil avhenge av karakteren og hvor alvorlig tilstanden som blir behandlet er. Foreskriving av behandling, for eksempel avgjørelser angående dosering osv. er de generelle utøverne og andre medisinske leger ansvarlige for. Hensiktsmessige doser av antistoffer er velkjent innenfor fagområdet, se Ledermann et al., (1991); Bagshawe K.D. et al. (1991).
- En sammensetning kan bli administrert alene eller i kombinasjon med andre behandlinger, enten samtidig eller sekvensielt avhengig av tilstanden som blir behandlet.
- Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen og som kan anvendes i henhold til foreliggende oppfinnelse kan omfatte, i tillegg til aktivt ingrediens, en farmasøytisk akseptabel eksipient, bærer, buffer, stabilisator eller andre materialer som er velkjente for fagfolk innenfor dette området. Slike materialer kan være ikke-toksiske og bør ikke interferere med effektiviteten til det aktive ingredienset. Den nøyaktige naturen til bæreren eller annet materiale vil avhenge av administrasjonsveien, som kan være oral, eller ved injeksjon, for eksempel intravenøs.
- Farmasøytiske sammensetninger for oral administrering kan være i tablett, kapsel, pulver eller flytende form. En tablett kan omfatte en fast bærer så som gelatin eller en adjuvant. Flytende farmasøytiske sammensetninger omfatter generelt en flytende bærer så som vann, petroleum, dyre- eller vegetabiliske oljer, mineraloljer eller syntetiske oljer. Fysiologisk saltvannsoppløsning, dekstrose eller annen sakkaridoppløsning eller glykoler så som etylenglykol, propylenglykol eller polyetylenglykol kan bli innbefattet.

For intravenøs, injeksjon eller injeksjon på påvirket område, vil det aktive ingredienset være i form av en parenteral akseptabel vandig oppløsning som er pyrogenfri og som har egnet pH, isotonisitet og stabilitet. Fagfolk innenfor dette området kan preparere egnede oppløsninger ved for eksempel anvendelse av isotoniske bærere, så som

- 5 natriumkloridinjeksjon, Ringers injeksjon, laktert Ringers injeksjon.

Konserveringsmidler, stabilisatorer, buffer, antioksidanter og/eller andre additiver kan bli innbefattet etter behov.

- Et spesifikt bindingsmedlem ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli dannet ved ekspresjon fra kodende nukleinsyre. Nukleinsyren som koder for et hvilket som helst spesifikt bindingsmedlem som selv er tilveiebrakt danner et aspekt av foreliggende oppfinnelse og det gjør også en fremgangsmåte for fremstilling av det spesifikke bindingsmedlemmet hvor fremgangsmåten omfatter ekspresjon fra kodende nukleinsyre. Ekspresjonen kan hensiktsmessig bli oppnådd ved dyrking under hensiktsmessige betingelser, av rekombinante vertsceller inneholdende nukleinsyren.
- 10
- 15

- Nukleinsyren kan kode for en hvilke som helst aminosyresekvens av antistoff antigenbindende domener beskrevet heri eller en hvilke som helst funksjonell ekvivalent form. Forandringer kan bli dannet på nukleotidnivå ved tilsetning, substitusjon, delesjon eller innskudd av en eller flere nukleotider, hvor forandringene kan eller behøver ikke å være reflektert på aminosyrenivå, avhengig av degenerasjonen til den genetiske koden.
- 20

- Systemet for kloning og ekspresjon av et polypeptid i forskjellige vertsceller er velkjent. Egnede vertsceller innbefatter bakterier, pattedyrceller, gjær og bakulovirussystemer. Pattedyrcellelinjer som er tilgjengelige innenfor fagområdet for ekspresjon av heterologt polypeptid innbefatter kinesisk hamsterovarieceller, HeLa celler, baby hamster nyreceller og mange andre. En vanlig foretrukket bakteriell vert er E. coli.
- 25

- Ekspresjon av antistoffer og antistofffragmenter i prokaryote celler så som E. coli er beskrevet innenfor fagområdet. For en oversikt se for eksempel Plückthun, (1991). Ekspresjon i eukaryote celler i kultur er også tilgjengelig for fagfolk innenfor dette området som et valg for produksjon av et spesifikt bindingsmedlem, se senere oversikter, for eksempel Reff, (1993); Trill et al. (1995).
- 30

- Egnede vektorer kan bli valgt eller konstruert, inneholdende hensiktsmessige regulatoriske sekvenser, inkludert promotorsekvenser, terminatorsekvenser, polyadenyleringssekvenser, enhancersekvenser, markørgener og andre sekvenser etter
- 35

- behov. Vektorene kan være plasmider, virale for eksempel 'fag, eller fagmid, etter behov. For ytterligere detaljer se for eksempel Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Mange kjente teknikker og protokoller for manipulering av nukleinsyre, for eksempel for fremstilling av nukleinsyrekonstruksjoner, mutagenese, sekvensering, introduksjon av DNA inn i celler og genekspresjon, og analysering av proteiner er beskrevet i detalj i Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. Eds., John Wiley & Sons, 1992. Beskrivelsen til Sambrook et al. er innkorporert heri som referanse.
- Et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en vertscelle inneholdende nukleinsyre som beskrevet heri. Et ytterligere aspekt tilveiebringer en fremgangsmåte omfattende introdusering av slik nukleinsyre inn i vertscelle. Introduksjonen kan anvende en hvilke som helst tilgjengelig teknikk. For eukaryote celler kan egnede teknikker innbefatte kalsiumfosfattransfeksjon, DEAE-dekstran, elektroporasjon. Liposom-mediert transfeksjon og transfeksjon ved anvendelse av retrovirus eller andre virus, for eksempel vaksine eller, for insektsceller, bakulovirus. For bakterielle celler kan egnede teknikker innbefatte kaliumkloridtransformasjon, elektroporasjon og transfeksjon ved anvendelse av bakteriofag.
- Introduksjonen kan bli etterfulgt av forårsaking eller muliggjøring av ekspresjon fra nukleinsyren, for eksempel ved dyrking av vertscellene under betingelser for ekspresjon av genet.
- I en utførelsesform blir nukleinsyren ifølge oppfinnelsen integrert inn i genomet (for eksempel kromosomet) til vertscellen. Integrasjonen kan bli fremmet ved inkludering av sekvenser som fremmer rekombinasjon med genomet, i henhold til standardteknikker.
- Etter produksjon av et spesifikt bindingsmedlem kan det bli anvendt for eksempel på en hvilke som helst måte beskrevet heri, så som ved dannelsen av et farmasøytisk eller et diagnostisk produkt, så som et sett omfattende i tillegg til det spesifikke bindingsmedlemmet en eller flere reagenser for bestemmelse av bindingen av medlemmet til cellene, som beskrevet.
- Ytterligere aspekter ifølge oppfinnelsen og utførelsesformer vil fremkomme for fagfolk innenfor dette området. For å forklare oppfinnelsen nærmere er følgende eksempler gitt. Det refereres videre til følgende figurer:

Figur 1 viser oppstilte aminosyresekvenser til VH og VL av scFvs CGS-1 og CGS-2. Figur 1(a) viser VH sekvensene; figur 1(b) viser VL sekvensene. CDRs (1, 2 og 3) er vist. Den mest homologe humane kimlinje VH til begge scFvs er DP47 segmentet til VH3 familien; i det VL segmentet i begge klonene er DPL16, den lette kjeden anvendt
 5 for å danne opprinnelige scFv bibliotek (Nissim et al, 1994). Residier som skjelner de to klonene fra hverandre er streket under.

Figur 2: figur 2A viser en modell av domenestrukturen til en human FN subenhet. IIICS, ED-A og ED-B regionene med variabilitet, på grunn av alternativ spleising av FN pre-mRNA, er vist. Figuren indikerer også indre homologier samt hovedtermolysin
 10 spalttingsprodukter inneholdende ED-B (Zardi et al, 1987). Figur 2B viser 4-18% SDS-PAGE plasma og W138VA FN og deres termolysinspaltninger farvet med coomassie blå og immunoblot probet med BC-1, IST-6m CGS-1 og CGS-2. Uspaltet (kolonne 1) og spaltet plasma FN ved anvendelse av termolysin ved 1 µg/mg (kolonne 3) og 10
 15 µg/mg FN (kolonne 4). Uspaltet (kolonne 2) og spaltet W138VA FN ved anvendelse av termolysin med 1 µg/mg (kolonne 5), 5 µg/mg (kolonne 6) og 10 µg/mg (kolonne 7) FN. Tallene på høyre hånd indikerer hovedtermolysinspaltningsprodukter vist i figur 2A. Verdiene til venstre indikerer molekylvektsstandarder i KiloDalton (kD).

Figur 3: figur 3A viser FN type III gjentatt sekvens innbefattet i fusjonen og rekombinante proteiner uttrykt i E. coli og reaktiviteten til disse proteinene med CGS-1 og CGS-2 og med mAb BC-1 og IST-6. Figur 3B viser en coomassie blå farvet gel og i tillegg immunoblaått probet med CGS-1, CGS-2, BC-1, IST-6. Nummerering av
 20 kolonnene som tilsvare peptidkonstruksjonene i øvre del av figuren. Verdiene til
 25 venstre indikerer molekylvektstandarder i kD.

Figur 4: infrarød muse billedanner; musebilledanner anvendt for målsøking av eksperimenter bestående av en svart, ikke-fluorescensboks utstyrt med en wolfram halogenlampe, eksitasjons- og emissjonsfiltere spesifikke for CY7 infrarød fluorofoer og
 30 et data-kontrollert 8-bitt monokrom CCD-kamera.

Figur 5: målsøking av fluorescensmerkede antistoff fragmenter mot F9 murint teratocarcinom ved anvendelse av monomerisk scFv (CGS-1) og dimerisk scFv (CGS-1)₂ direkte mot B-FN. Dimerisk scFv (D1.3)₂ med en bindingsspesifitet til lysozym ble
 35 anvendt som en negativ kontroll.

Figur 6: målsøking av fluorescensmerkede antistoff fragmenter mot F9 murint teratocarcinom ved anvendelse av affinitetsmodnet scFv(CGS-2) og lavere affinitet scFv(28SI) rettet mot samme epitop til B-FN. Målsøking er detektert både i store tumorer (omtrent 0,6 g), dekket etter 48 timer med en svart hinne som delvis forstyrrer bildet, og i små tumorer (omtrent 0,2 g).

Eksempelliste

Eksempel 1 – isolering av human scFv spesifikk for ED-B domene til human FN.

Eksempel 2 – affinitetsmodning av human scFv spesifikk for ED-B domenen til human FN.

Eksempel 3 – spesifisiteten til affinitetsmodnet scFv for ED-B-inneholdende fibronektiner.

Eksempel 4 – anvendelse av affinitetsmodnet anti-ED-B scFv i immunocytochemisk farving av humane og muse tumorsnitt.

Eksempel 5 – anvendelse av affinitetsmodnet anti-ED-B scFv i in vivo målsøking av humane tumorer.

Eksempel 6 – målsøking av xenopodede murine F9 teratocarcinomer i naken mus.

Eksempel 1 – Isolering av human scFv spesifikk for ED-B domenen til human FN

Et humant scFv fagbibliotek (Nissim et al, 1994) ble anvendt for seleksjon av rekombinante antistoffer. To forskjellige former for ED-B isoform ble anvendt som en kilde for antigen for seleksjon og i begge tilfellene var isoformen rekombinant humant protein.

Rekombinante FN peptider inneholdende type III gjentakelsene 2-11 (B-) og 2-11 (B+) ble uttrykt i *Escherichia coli*.

En konstruksjon ble dannet ved anvendelse av FN cDNA fra klonene pFH154 (Kornblihtt et al 1985), λ F10 og λ F2 (Carnemolla et al, 1989). cDNA konstruksjoner, som dekker basene 2229-4787, (Kornblihtt et al, 1985) ble skutt inn i vektoren pQE-3/5 ved anvendelse av QIAexpress sett fra Qiagen (Chatsworth, CA). Rekombinantene FN-III 2-11 (B-) og (B+) ble rensset ved immunoaffinitetskromatografi ved anvendelse av mAb 3E3 (Pierschbacher et al 1981) konjugert til Sepharose 4B (Pharmacia). DNA fragmenter for preparering av rekombinante FN fragmenter inneholdende type III homologi gjentakelsene 7B89, 789, ED-B og FN-6 ble produsert ved polymerasekjedereaksjon (PCR amplifikasjon ved anvendelse av UltMa DNA polymerase (Perkin Elmer), ved anvendelse av cDNA fra klonene FN 2-11 (B+) og FN

2-11 (B-) som templat. Primerene ble spaltet for å muliggjøre kloning av PCR produkter inn i pQE-12 ved anvendelse av QIAexpress sett (Qiagen). De ble deretter overført i *E. coli* og uttrykt. Alle cDNA klonene ble sekvensert ved anvendelse av en sekvensase 2,0 DNA sekvenssett (USB).

5

Rekombinante proteiner ble renset ved Ni-NTA kromatografi (IMAC), ifølge forhandlerens instruksjoner (Qiagen), ved anvendelse av heksahistidinmarkøren med karboksyterminusen av FN fragmentene. ED-B-βGal fusjonsproteinet ble fremstilt ved kloning av ED-B cDNA inn i γgt11 bakteriofagvektor for å tilveiebringe klon γED-B.

- 10 Klon γchFN60 (inneholdende del av ED-B sekvensen) ble fremstilt som et fusjonsprotein fra klonet kylling FN pchFN60 (Norton et al, 1987).

For seleksjon av human scFv fagbibliotek ble tre runder med "panning" utført for hver av de to forskjellige rekombinante antigenene (7B89 og ED-B). Antigenene ble begge
 15 belagt på immunrør (Nunc; Maxisorp, Roskilde, Denmark) over natt med 50 µg/ml i PBS (20 med mer fosfatbuffer, 0,15 M NaCl, pH 7,2). Det første antigenet var rekombinant FN fragment 7B89 hvor ED-B domenen er flankert av ved siden av liggende type III FN homologi gjentakelser og ble belagt ved 4°C over natt. Det andre antigenet som ble anvendt var rekombinant ED-B (Zardi et al, 1987) med en
 20 karboksyterminal heksahistidinmarkør og dette proteinet inneholder ikke lysinresidier slik at den terminale aminogruppen til første aminosyre er tilgjengelig for sete-spesifikk kovalent immobilisering av ED-B til reaktive ELISA skåler (Nunc; Covalink). Beleggingen ble utført over natt ved romtemperatur.

- 25 Etter tre runder med "panning", ble eluert fag infisert i HB2151 *E. coli* celler og sådd ut som beskrevet (Nissim et al., 1994). Etter hver seleksjonsrunde ble 95 ampicillin-resistente enkeltkolonier screenet for å identifisere antigen-spesifikk scFv ved ELISA. Klonene som ga høyest ELISA signaler på antigenene anvendt for "panning" ble selektert for ytterligere analyser og for affinitetsmodning. Disse klonene ble også
 30 demonstrert å tilveiebringe spesifikk farving av snitt av glioblastom multiformer og brysttumorer ved immunocytochemisk farving, beskrevet i større detalj i eksempel 4.

Eksempel 2 – affinitetsmodning av human scFv spesifikk for ED-B domenen til human FN

- 35 Klonene 35GE (fra seleksjon med 7B89) og 28SI (fra seleksjon med ED-B domenen alene) ble selektert som kandidat antistoffer for affinitetsmodning. For å gjøre de lette kjedene forskjellige for å forbedre affiniteten ble en enkel affinitetsmodningsstrategi

utforsket basert på randomisering av de sentrale seks residiene (DSSGNH) i lett kjede CDR3 ved anvendelse av degenererte oligonukleotider og PCR (fig. 1), som tilveiebringer en potensiell sekvensdiversitet på $20^6 = 6,4 \times 10^7$. Denne regionen (sammen med CDR3 tungkjede) er beliggende i midten av antigenbindingssetet (Padlan, 5 1994). Vi muterte også argininresidiet direkte foran det seks residie lange strekket til serin, for å unngå muligheten av at elektrostatiske effekter dominerer seleksjonen.

Plasmid fra en enkelt bakteriell koloni som uttrykker "opphavs" scFv fragmentet ble PCR amplifisert med primerene LMB3 (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') og CDR3-6-VL-FOR (5' CTT GGT CCC TCC GCC GAA TAC CAC MNN MNN MNN MNN MNN MNN AGA GGA GTT ACA GTA ATA GTC AGC CTC 3') (94C [1'] – 55C [2'] – 72C [1'30"], 25 sykluser; se Marks et al., 1991, for buffere og betingelser). Det resulterende produktet ble gel-renset (for å fjerne spor av plasmidet inneholdende opprinnelig scFv gen) og anvendt som templat i et andre amplifikasjonstrinn med primerene LMB3 og J1-Not-FOR (5' ATT GCT TTT CCT TTT TGC GGC CGC GCC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC TCC GCC 3') (94C [1'] – 55C [1'] – 72C [1'30"], 25 sykluser). Det rå PCR produktet, som løp som et enkelt bånd med korrekt molekylvekt på agarosegelen, ble direkte renset fra PCR blandingen ved anvendelse av Spin-Bind (FMC, Rockland, ME, USA), dobbelt-spaltet med Nco1/Not1 og ligert inn i gel-renset Nco1/Not1-spaltet fagmid pHEN1 (Hoogenboom et al., 1991) inneholdende et narre Nco1/Not1 innskudd for å lette separasjon av dobbelt-spaltningen fra enkelt-spaltet vektor. Vektoren ble preparert med et Qiagen (Catsworth, CA, USA) plasmid maksi-prep sett. Omtrent 5 µg av spaltet plasmid og innskudd ble anvendt i ligeringsblandingen som ble ekstrahert en gang med fenol, en gang med 25 fenol/kloroform/isoamylalkohol (25:25:1), og deretter etanol-presipitert ved anvendelse av glykogen (Boehringer, Mannheim, Germany) som en bærer og speed-vac tørket. Pelleten ble resuspendert i 20 µl vann og elektroporert i elektrokompetente TG1 E. coli celler (Gibson, 1984). Vi anvendte elektrokompetente celler med et titer på 10^9 transformanter/µg dersom glycerolstammene ble anvendt, eller 10^{10} transformanter/µg med nylig-preparerte elektrokompetente celler. Dette tilveiebrakte vanligvis $>10^7$ kloner med prosedyren anvendt heri. 30

Modningsbiblioteket ble deretter prosessert som i Nissim biblioteket (Nissim et al., 1994) for å produsere fagpartikler, som ble anvendt i en seleksjonsrunde på immunorør ved anvendelse av 7B89 (10 µg/ml) som antigen, etterfulgt av en runde med kinetisk seleksjon (Hawkins et al., 1992). Dette seleksjonstrinnet ble utført ved inkubering av biotinyllert 7B89 (10 nM) med fagsuspensjon (omtrent 10^{12} t.u.) i 2% melke-PBS (2% 35

- MPBS) fra første seleksjonsrunde i 5 min. og deretter tilsetning av ikke-biotinyler 7B89 (1 μ m) og la konkurransen foregå i 30 min. 100 μ l streptavidin-belagte dynakuler (Dyna: M480) på forhånd blokkert i 2% MPBS ble deretter tilsatt til reaksjonsblandingen, blandet i 2 min. og deretter oppfanget på en magnet og vasket 10 ganger med alternerende vaskinger av (PBS + 0,1% Tween-20) og PBS. Fag ble eluert fra kulene med 0,5 ml 100 med mer trietylamin. Denne oppløsningen ble deretter nøytralisert med 0,25 ml 1M tris, pH 7,4, og anvendt for å infisere eksponensielt voksende HB2151 celler (Nissim et al., 1994). 95 ampicillin-resistente enkeltkolonier ble anvendt for å produsere scFv-inneholdende supernatanter (Nissim et al., 1994) som deretter ble screenet ved ELISA, immunohistokjemi og BIAcore for å identifisere de beste binderene. De ble deretter subklonet mellom SfiI/NotI setene til pDN268 ekspresjonsvektoren (Neri et al., 1996), som har en fosforylerbar markør, FLAG epitopen og en heksahistidinmarkør ved den C-terminale ekstremiteten til scFv.
- Enkeltkolonier av relevante antistoffer subklonet i pDN268 ble dyrket ved 37°C i 2xTY inneholdende 100 mg/l ampicillin og 0,1% glukose. Når cellekulturen nådde $OD^{600} = 0,8$, ble IPTG tilsatt til en endelig konsentrasjon på 1 med mer og veksten ble fortsatt i 16-20 timer ved 30°C. Etter sentrifugering (GS-2 Sorvall rotor, 7000 rpm, 30 min.), ble supernatanten filtrert, konsentrert og byttet til appliseringsbuffer (50 med mer fosfat, pH 7,4 500 med mer NaCl, 20 mM imidazol) ved anvendelse av en Minisette (Filtron) tangensial strømningsapparat. Den resulterende oppløsningen ble applisert på 1 ml Ni-NTA harpiks (Qiagen), vasket med 50 ml appliseringsbuffer og eluert med elueringsbuffer (50 mM fosfat, pH 7,4, 500 med mer NaCl, 100 mM imidazol). Renset antistoff ble analysert ved SDS-PAGE (Laemmli, 1970) og dialysert mot PBS ved 4°C.
- Renset scFv preparater ble ytterligere behandlet ved gelfiltrering ved anvendelse av en FPLC apparatur utstyrt med en S-75 kolonne (Pharmacia) på grunn av at det er kjent at multivalente scFv fragmenter kan utvise en kunstig god binding på BIAcore (Jonsson et al., 1991) i kraft av aviditetseffekter (Nissim et al., 1994; Crothers and Metzger, 1972). Antistoff konsentrasjon til FPLC-rensede monomeriske fraksjoner ble bestemt spektrofotometrisk ved å anta en absorbanse ved 280nm på 1,4 enheter for en 1 mg/ml scFv oppløsning.

- Binding av monovalent scFv ved forskjellige konsentrasjoner i 0,1-1 μ m området i PBS ble målt på en BIOcore maskin (Pharmacia Biosensor), ved anvendelse av følgende antigener (i) 1000 resonansenheter (RU) av biotinyler rekombinant FN fragment 7B89 immobilisert på en streptavidinbelagt chip, som ble bundet spesifikt av 250 RU scFv; (ii) 200 RU rekombinant ED-B, kjemisk immobilisert ved den N-terminale

aminogruppen, som var bundet spesifikt av 600 RU scFv; (iii) 3500 RU ED-B-rik fibronektin WI38VA (se eksempel 3), som ble bundet spesifikt av 150 RU scFv. Kinetikk analyser av data ble utført ifølge forhandlerens instruksjoner. På grunnlag av kvalitativ BIAcore analyser av antistoff-inneholdende supernatanter ble en affinitets-

5 modnet versjon av hver scFv klon selektert: klon CGS-1 fra seleksjon med 78B9 fragmentet og CGS-2 fra seleksjon med ED-B rekombinant FN fragment. Assosiasjonsratekonstantene (k_{on}) og dissosiasjonsratekonstantene (k_{off}) er vist i tabell 1, sammen med beregnede likevektsdissosiasjonskonstanter (K_d) til både scFv og opprinnelig klon 29SI. Til tross for at både CGS-1 og CGS-2 klonene hadde k_d i det

10 nanomolare området viste klon CGS-2 den beste forbedringen i forhold til opphavsklonen en K_d på 1 nM (forbedret fra 110 nM) med hensyn på alle tre proteinene testet på sensor chip (tabell 1). Forbedringen var hovedsakelig forårsaket av en saktere kinetisk dissosiasjonskonstant ($\sim 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), som målt med monomeriske antistoffpreparater (ikke vist).

15 Modningsstrategien ser ut til å være generell, og har tilveiebrakt affinitetsforbedrede antistoffer for maltose bindende protein, cytokrom C, den ekstracellulære domenen til murin endoglin (D.N., L. Wyder, R. Klemenz), cytomegalovirus (A.P., G. Neri, R. Botti, P.N.), nukleær tumormarkør HMGI-C protein (A.P., P. Soldanim V. Giacotti, P.N.) og

20 ovarietumormarkørplacental alkalisk fosfatase (M. Deonarian and A.A. Epenetos). Strategien ser derfor ut til å være minst like effektiv som andre modningsstrategier (Marks et al., 1992; Low et al., 1996), og tilveiebringer antistoffer med lignende affiniteter som de som er blitt avledet fra meget store fagantistoff bibliotek (Griffiths et al., 1994; Vaughan et al., 1996).

25 Affinitetsmodnede kloner CGS-1 og CGS-2 ble sekvensert og oppstilt i en database av humane kimlinjeantistoff V gener (V-BASE) og deretter translatert ved anvendelse av MacVector programvare. VH genet til begge klonene var mest homologe med human kimlinje DP47 (VH3), og i tillegg hadde hver klon en annen VH CDR3 sekvens (figur

30 1). VL genet til begge klonene var DPL16 kimlinjen anvendt i konstruksjon av humant syntetisk scFv repertoar beskrevet i Nissim et al, 1994. VL CDR3 sekvensene var forskjellige ved fire av seks randomiserte residier (figur 1b).

TABELL I

5 Kinetikk og dissosiasjonskonstanter til monomeriske scFv fragmenter CGS-1 og CGS-2 overfor ED-B domene-inneholdende proteiner

Antigen:	CGS-1	ED-B			7B89			FN W138VA	
ScFv:		S128			S128			S128	CGS-2
$K_{off}(s^{-1})^*$	$7,0 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-3}$	$7,1 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^{-4}$
$K_{on}(M^{-1} \cdot s^{-1})^*$	$1,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$
$K_d(M)^*$	$5,4 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-9}$	$3,5 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-9}$	$1,2 \times 10^{-8}$	$5,9 \times 10^{-8}$	$2,4 \times 10^{-9}$

Tekst til tabell 1

Eksperimenter ble utført som beskrevet under materialer og metoder.

- k_{off} og k_{on} verdiene er nøyaktige med +/- 30%, på grunnlag av nøyaktigheten av konsentrasjonsbestemmelser og i relasjon til de noe forskjellige resultatene oppnådd når forskjellige regioner av sensogrammer blir anvendt i tilpasningsprosedyren $k_d = k_{off}/k_{on}$.

Eksempel 3 – Spesifisitet til affinitetsmodnet scFv for ED-B-inneholdende fibronektiner

Immunreaktiviteten til to affinitetsmodnede scFv, CGS-1 og CGS-2 ble vurdert innledningsvis av ELISA og sammenlignet direkte med mAb BC-1 (som gjenkjenner B-FN isoform) og mAb IST-6, som bare gjenkjenner FN isoformene som mangler ED-B (Carnemolla et al., 1989; 1992). Karakterisering av disse mAb er tidligere blitt rapportert (Carnemolla et al, 1989; 1992). Finspesifisitetsanalyser ble deretter utført ved anvendelse av et omfattende panel av FN fragmenter avledet av termolysinbehandling og rekombinante fusjonsproteiner.

Antigener anvendt for ELISA og immunblotting ble dannet som følger. FN ble rensset fra human plasma og fra kondisjonert medium av WI38VA13 cellelinje som tidligere rapportert (Zardi et al, 1987). Renset FN ble spaltet med termolysin (protease type X; Sigma Chemical Co.) som beskrevet av Carnemolla et al (1989). Nativ FN 110kD (B-) og nativ FN 120kD (B+) fragmenter (se figur 2) ble rensset fra en FN spaltning som tidligere rapportert (Borsi et al, 1991). Stor isoform av tenascin-C ble rensset som beskrevet av Saginati et al (1992). Rekombinante proteiner ble uttrykt og rensset som beskrevet i eksempel 1. SDS-PAGE og Western blotting ble utført som beskrevet av Carnemolla et al (1989).

Alle antigenene anvendt i ELISA ble fortynnet i PBS til mellom 50-100 µg/ml og belagt ved 4°C over natt på immuno-skål brønner (Nunc, Roskilde, Danmark). Ubundet antigen ble fjernet med PBS og skålene ble deretter blokkert med PBS inneholdende 3% (w/v) bovin serumalbumin (BSA) i 2 t. Ved 37°C. Dette ble etterfulgt av fire vask med PBS inneholdende 0,05% Tween 20 (PBST). Antistoffer ble deretter bundet ved 37°C i 1,5 t; scFv ble preinkubert med et antiserum rettet mot tag sekvensen: mAb M2 [Kodak, New Haven CT] for FLAG tag eller pE10 [ATCC, Rockville, MD] for myc tag. Testrede kontrollantistoffer var mAb BC-1 og IST-6. Etter fire vask med PBST ble skålene inkubert i 1 time ved 37°C med 1:2000 fortynnet (i PBST+3% BSA) biotinylert geite anti-muse IgG (Bio-SPA Division, Milano, Italia). Vaskingene ble gjentatt og streptavidin-biotinylert alkalisk fosfatasekompleks (Bio-SPA Division, Milano, Italia) ble tilsatt (1:800 fortynnet i PBST inneholdende 2 mM MgCl₂) i 1 time ved 37°C. Reaksjonen ble utviklet ved anvendelse av fosfatase substrat tabeller (Sigma) i 10% dietanolamin, pH 9,8 og optisk tetthet ble avlest ved 405 nm. Resultatene er presentert nedenfor i tabell 2.

TABELL 2

	CGS-1	CGS-2	BC-1	IST-6
plasma FN	0,07	0,04	0,09	1,73
W138VA FN	1,16	0,72	1,20	1,12
n110 kD (B-)	0,03	0,01	0,05	1,20
n120 kD (B+)	0,82	0,81	1,20	0,02
rec FN7B89	1,11	1,02	1,02	0,01
rec FN789	0,01	0,01	0,05	1,25
rec ED-B	1,21	1,32	0,15	0,04
rec FN-6	0,01	0,01	0,08	0,03
tenascin	0,01	0,02	0,06	0,02

- 5 Immunoreaktivitet til scFv og monoklonale antistoffer med fibronectin-avledede antigener målt ved ELISA. Verdiene representerer OD målt ved 405 nm etter subtrahering av bakgrunnssignal. Dataene er gjennomsnittet av fire eksperimenter som viser maksimalt 10% standardavvik.
- 10 Identiteten til forskjellige former av fibronectin anvendt i eksperimentet er som følger: plasma FN = human plasma fibronectin; W138-VA FN = fibronectin fra supernatanter til SV40-transformerte fibroblaster (Zardi et al, 1987); n110kD = termolysin behandlet FN domene 4, uten ED-B; n120kD = termolysin behandlet FN domene 4, inneholdende ED-B; rec FN7B89 = ED-B domene flankert av ved siden av liggende type III FN
- 15 homologi gjentakelser; rec FN789 = type III FN homologi gjentakelser med en ED-B domene; rec ED-B = kun rekombinant ED-B; rec FN6 = rekombinant FN domene 6.

- Både CGS-1 og CGS-2 gjenkjente rekombinant ED-B peptid, samt alle native eller rekombinante FN fragmenter inneholdende ED-B sekvensen, i det de ikke ble bundet til
- 20 FN fragmenter som mangler ED-B. I tillegg reagerte ikke CGS-1 og CGS-2 med tenascin (som omfatter 15 type III homologigjentakelser: Siri et al, 1991) og plasma FN, som ikke inneholder detekterbare nivåer av ED-B sekvensen i termolysin spaltningsproduktene (Zardi et al, 1987). Derimot reagerte CGS-1 og CGS-2 sterkt med FN rensset fra SV40-transformert cellelinje W138VA. Omtrent 70-90% av FN
- 25 molekyler fra denne cellelinjen inneholder ED-B, som vist ved termolysinspaltning og S1 nukleaseeksperimenter ved anvendelse av rensset FN og total RNA preparert fra cellelinjen (Zardi et al, 1987; Borsi et al. 1992). Spesifisiteten til scFv for ED-B

komponenten til FN ble demonstrert ytterligere ved anvendelse av oppløselig rekombinant ED-B for å inhibere binding av CGS-1 og/eller CGS-2 til FN fra WI28VA cellene (data ikke vist).

- 5 Dataene bekrefter at CGS-1 og CGS-2 bare reagerer spesifikt med FN derivater som inneholder ED-B domenen. De viser begge samme reaktivitet som mAb BC-1, med unntagelse av i tilfellet med rekombinant ED-B, som ikke ble gjenkjent av BC-1. Intensiteten til ELISA signalene oppnådd i forhold til mAb kontrollene reflekterer den høye spesifisiteten til de to scFv for ED-B-inneholdende antigener.
- 10 Spesifisiteten til CGS-1 og CGS-2 ble undersøkt ytterligere på immunoblot ved anvendelse av FN fra plasma og WI38CVA celler, og termolysinspaltninger derav. Ved termolysinspaltning danner FN fra WI38VA cellene (hvor hoveddelen inneholder ED-B) et 120 kD fragment (inneholdende ED-B) og et mindre 110kD fragment som mangler
- 15 ED-B (figur 2A; Zardi et al, 1987). Ytterligere spaltning av 120kD domenen danner to fragmenter: et 85kD fragment som inneholder nesten hele ED-B sekvensen og dets karboksyterminus, og en 35kD sekvens (figur 2A; Zardi et al, 1987).

- På venstre side av figur 2B er det vist en coomassie farvet gel av proteinfraksjoner
- 20 analysert ved immunoblotting. Plasma FN (kolonne 1) og termolysin spaltninger av proteinet (kolonne 3, inneholdende 110 kD protein, og kolonne 4, inneholdende spaltet 110 kD protein) ble ikke gjenkjent av CGS-1 og CGS-2. I kontrast til dette ble ED-B-rik FN fra WI38VA celler, begge intakt (kolonne 2) og etter økende termolysinspaltning (kolonnene 5, 6 og 7) gjenkjent av begge scFv fragmenter. Det minste FN-avledede
- 25 fragmentet som kunne bli gjenkjent spesifikt av CGS-1 var 120 kD proteinet (som dekker type III gjentakelsene 2-11), idet CGS-2 kunne gjenkjenne 85 kD fragmentet som dekker gjentakelsene 2-7 i tillegg til N-terminusen til ED-B (figur 2B; Zardi et al, 1987). Disse resultatene indikerer at de to scFv er reaktive mot bestemte epitopr innenfor ED-B sekvensen. Binding av CGS-2 til 85 kD domenen indikerer at epitopen
- 30 for denne klonen ligger i aminotermiusen til ED-B. Tap av CGS-1 binding når 120 kD domenen blir spaltet til 85 kD demonstrerer at den gjenkjenner en epitop beliggende mer mot karboksyterminusen av ED-B molekylet.

- Den fine spesifisiteten til CGS-1 og CGS-2 ble undersøkt ytterligere ved
- 35 immunoblotting ved anvendelse av rekombinante FN fragmenter og fusjonsproteiner med eller uten ED-B sekvensen. FN fusjonsproteinene ble dannet som beskrevet av Carnemolla et al (1989). Resultater av disse eksperimentene er vist i figur 3, for

assosiasjon av det skjematisk diagrammet til strukturen av domenene av human FN, se Carnemolla et al, 1992. De oppnådde bindingsprofilene bekreftet det som tidligere var blitt funnet ved ELISA og immunoblotter på rensset FN og proteolytiske spaltningssprodukter: CGS-1 og CGS-2 ble var sterkt reaktive med ED-B-inneholdende FN fragmenter (kolonnene 2 og 4), men viste ingen reaktivitet mot FN sekvenser som mangler ED-B (kolonne 1 og 3). CGS-1 reagerte verken med human (kolonne 5) eller kylling (kolonne 6) ED-B fusjonsprotein, mens CGS-2 reagerte sterkt med begge fragmentene (figur 3). Dette resultatet reflekterer visse konformasjonsmessige begrensninger på epitopen i ED-B-inneholdende FN gjenkjent av CGS-1. Det er mulig for eksempel at epitopen er følsom overfor denaturering eller ikke blir presentert riktig når separert ved SDS-PAGE og overført til en fast bærer så som nitrocellulose.

Samlet demonstrerer disse resultatene at CGS-1 og CGS-2 bindes sterkt og spesifikt til ED-B-inneholdende FN, ved regioner som er spesielle i forhold til hverandre og i forhold til ED-B strukturen som blir gjenkjent av mAb BC-1.

Eksempel 4 – Anvendelse av affinitetsmodnet anti-ED-B scFv i immunocytochemisk farving av humane og muse tumorer.

CGS-1 og CGS-2 er begge blitt anvendt for å immunolokalisere ED-B inneholdende FN molekyler i forskjellige normale og neoplastiske humane vev. For normale vev ble hud valgt på grunn av at B-FN isoformen er kjent for å bli uttrykt i makrofager og fibroblaster i løpet av kutan sårleging (Carnemolla et al, 1989; Brown et al, 1993). De to valgte humane tumorene er tidligere blitt analysert for spesifisitet ved farving med anti-fibronektin mAb: glioblastom multiform er blitt studert i detalj på grunn av at endotelialcellene i årene til denne tumoren er i en sterk proliferativ tilstand med økte angiogenetiske prosesser inkludert ekspresjon av B-FN isoformene (Castellani et al, 1994). Studier som anvender et omfattende panel av normale, hyperplastiske og neoplastiske humane brystvev har tilveiebrakt ytterligere bevis på en korrelasjon mellom angiogenese og B-FN ekspresjon (Kaczmarek et al, 1994).

For eksperimentene beskrevet heri er immunohistokjemisk farving av CGS-1 og CGS-2 blitt sammenlignet med den til mAb BC-1 (som gjenkjenner B-FN isoformen) og andre mAb kjent for å reagere enten med alle kjente FN isoformvarianter (IST-4) eller bare overfor FN isoformer som mangler ED-B (IST-6). Karakterisering av alle disse kontrollantistoffene er tidligere blitt rapportert (Carnemolla et al, 1989; 1992).

Normale og neoplastiske vev ble oppnådd fra prøver tatt iløpet av kirurgi. Det er allerede blitt bestemt at preparering og fiksering av vev er kritisk for nøyaktig og sensitiv deteksjon av FN-inneholdende molekyler (Castellani et al, 1994). For immunhistokjemi ble 5 µm tykke kryostatsnitt lufttørket og fiksert i kald aceton i 10 minutter. Immunofarving ble utført ved anvendelse av et streptavidin-biotin alkalisk fosfatasekompleks farvesett (Bio-SPA Division, Milano, Italia) og naftol-AS-MX-fosfat og Fast Red TR (Sigma). Gills hematoksylin ble anvendt som en motfarve, etterfulgt av applisering i glycergel (Dako, Carpenteria, CA) som tidligere beskrevet av Castellani et al, 1994. For å analysere spesifisitet ytterligere i eksperimenter hvor positiv farving av vev ble oppnådd ble spesifisitet for ED-B demonstrert ved preinkubasjon av antistoffer med rekombinant ED-B domene, etterfulgt av deteksjon som tidligere beskrevet.

Resultatene av disse eksperimentene viste at både CGS-1 og CGS-2 reagerer med samme histologiske strukturer som mAb BC-1. Farvingsmønsteret oppnådd med hud ved anvendelse av CGS-1, CGS-2 og BC-1 reflekterer fravær av ED-B fra FN uttrykt i dermis. Ved farving av invasive ductal carcinomsnitt viste CGS-1, CGS-2 og BC-1 en begrenset farvefordeling, begrenset til grensen mellom neoplastiske celler og stroma. Dette er i samsvar med det faktumet at til tross for at total FN blir homogent fordelt i tumorstroma blir ekspresjon av B-FN bekreftet til visse regioner, og det er disse områdene som tidligere er blitt vellykket lokalisert (i 95% av tilfellene) i invasive ductale carcinomer ved anvendelse av mAb BC-1 (Kaczmarek et al, 1994).

Tidligere funn ved farving av BC-1 av glioblastom multifforme tumorer er blitt bekreftet. Castellini et al (1994) har observert et typisk mønster for farving av glomerulære-lignende vaskulære strukturer, og i våre eksperimenter er CGS-1 og CGS-2 blitt vist å tilveiebringe kvalitativt identiske resultater.

Det er derimot en viktig forskjell mellom CGS-1 og CGS-2 og mAb BC-1: de to humane scFv er blitt demonstrert å bli bundet til både kylling og muse B-FN, mens BC-1 kun er human-spesifikk. CGS-2 reagerte med kyllingembryoer (data ikke vist) og både CGS-1 og CGS-2 reagerte med musetumorer.

CGS-1 farving av vaskulære strukturer på snitt av murine F9 teratocarcinomer er også blitt vist. I kontrast til dette viste alle testede normale musevev (lever, milt, nyre, mave, tynntarm, tykktarm, ovarie, livmor, blære, bukspyttkjertel, suprarenale kjertler, skjelettmuskel, hjerte, lunge, thyroide og hjerne) en negativ farvingsreaksjon med CGS-1 og CGS-2 (data ikke vist). Strukturer farvet i F9 teratocarcinom snitt ble vist å

være ED-B spesifikke ved anvendelse av rekombinant ED-B domene for å fullstendig inhibere oppnådd farving (data ikke vist).

- 5 Eksempel 5 – Anvendelse av affinitetsmodnet anti-ED-B scFv ved in vivo målsøking av humane tumorer.

Human melanomacellelinje SKMEL-28 ble anvendt for å utvikle xenografttumorer i 6-10 uker gamle nakne mus (Balb-c eller MF-1; Harlan UK), ved injisering av 1×10^7 celler/mus subkutan i en flanke. Mus som bærer tumorer blir injisert i halevenen med 100 μ l 1 mg/ml scFv₁-Cy7₁ oppløsning i PBS når tumorene hadde nådd en diameter på omtrent 1 cm.

Merking av rekombinante antistoffer mot CY7 ble oppnådd ved tilsetning av 100 μ l 1M natriumbikarbonat. PH=9,3 og 200 μ l CY7-bis-Osu (Amersham; Cat. Nr. PA17000; 2 mg/ml i DMSO) til 1 ml antistoffoppløsning i PBS (1 mg/ml). Etter 30 min. ved romtemperatur ble 100 μ l 1M tris, pH = 7,4, tilsatt til blandingen og merket antistoff ble separert fra ikke-reagert farvestoff ved anvendelse av PD10 kolonner (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) ekvilibrert med PBS. Eluerte grønne antistoff-
20 fraksjoner ble konsentrert til omtrent 1 mg/ml ved anvendelse av Centricon-10 rør (Amicon, Beverly, MA, USA). Oppnådd merkingsforhold var generelt nær opptil et molekyl CY7: et molekylantistoff. Dette ble vurdert spektroskopisk med 1 cm kuvetter ved å anta at en 1 mg/ml antistoffoppløsning gir en absorpsjon på 1,4 enheter ved 280 nm, slik at molekyllær ekstinksjonskoeffisient til CY7 ved 747 nm er $200'000 \text{ (M}^{-1} \text{cm}^{-1})$
25 og ved at man ser bort fra CY7 absorpsjonen ved 280 nm. Immunreaktiviteten til antistoffprøvene etter merkingen ble bekreftet enten ved bånd-skift (Neri et al., 1996b), ved affinitetskromatografi på en antigenkolonne eller ved BIAcore analyser. Det ble tatt bilde av mus med en hjemmesnekret muse-billeddanner med jevne tidsintervaller under anestesi ved inhalering av en oksygen/fluorotanblanding. To til åtte dyr ble studert i hver
30 prøve for å bekrefte reproduserbarheten av resultatene. Prosedyrene ble utført ifølge UK Project Licence "Tumor Targeting" til D. Neri (UK PPL 80/1056).

Infrarød muse-billeddanner ble dannet som en modifikasjon av fotodeteksjonssystemet til Folli et al. (1994), som muliggjør anvendelse av infrarød fluoroform CY7. Infrarød
35 belysning ble valgt for å oppnå bedre vevspenetrering. Fluorescensen til CY7 (>760 nm) er usynlig for mennesker og krever anvendelse av et data-kontrollert CCD-kamera. Muse-billeddanneren besto av en svartmalt, lys-tett boks utstyrt med en 100W wolfram

halogenlampe utstyrt med et 50 mm diameter eksitasjonsfilter spesielt konstruert for CY7 (Chroma Corporation, Brattleboro, VT, USA; 673-748 nm). Den resulterende belyningsstrålen er omtrent homogen over et område på 5 x 10 cm størrelse hvor musen ble plassert for billeddannelse. Fluroescens ble detektert ved hjelp av et 8-bit monokrom Pulnix CCD-kamera, utstyrt med en C-mount linse og et 50 m m
 5 emissjonsfilter (Chroma Corporation, Brattleboro, VT, USA; 765-855nm), og interfaset med ImageDOK system (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Dette systemet består av en datamaskin, utstyrt med en "frame-grabber" og programvare for oppfangning og integrering av sekvensielle bilder. Tre sekvensielle bilder ervert i 50 ms ble vanligvis
 10 anvendt i gjennomsnittsprosessen; og antallet ble holdt konstant i en serie bilder av et dyr for å muliggjøre en direkte sammenligning av tumormålsøking ved forskjellige tidspunkter. Bilder i TIFF format ble deretter omdannet til PICT filer ved anvendelse av programmet Graphics Converter, og utviklet ved anvendelse av programmet MacDraw Pro med en Power Macintosh 7100/66 datamaskin.

15

En skjematisk beskrivelse av konstruksjonen av denne apparuten er vist i figur 4.

Disse eksperimentene demonstrerer at begge scFv var lokalisert til tumoren når visualisert på et makroskopisk nivå.

20

Mikroskopisk demonstrering av målsøking av neovaskulaturen til utviklende tumorer med to anti-EDB scFv ble beskrevet som følger.

Nakne mus og/eller SCID mus som bærer enten et xenopodet SKMEL-28 humant melanom eller et muse F9 teratocarcinom i en planke ble injisert med enten umerkede
 25 scFv fragmenter med FLAG tag, eller biotinylerte scFv fragmenter.

Mus ble ofret ved forskjellige tidspunkter etter injeksjon og tumor og ikke-tumor snitt som ble oppnådd ble farvet med konvensjonelle immunohistokjemiske protokoller ved
 30 anvendelse av enten anti-FLAG M2 antistoff (Kodak, 181) eller streptavidin-baserte deteksjonsreagenser. Optimal målsøking ble generelt oppnådd 12 timer etter injeksjon. Både CGS1 og CGS2 ble demonstrert å binde neovaskulaturen til både xenopodet human tumor og murin teratocarcinom.

35

Eksempel 6 – Målsøking av xenopodede murine F9 teratocarcinomer i nakne mus

Vi utviklet faste tumorer i flanken til nakne mus ved subkutan injeksjon av 4×10^6 murine F9 teratocarcinomceller. Denne tumoren vokser meget hurtig i mus og når 1 cm diameter iløpet av omtrent 1 uke etter injeksjon og er sterkt vaskularisert. For å billedanne målsøkingen av antistoffene anvendte vi en modifikasjon av fotodeteksjonsmetodologien til Folli et al (1994), som muliggjør en kinetisk vurdering av tumormålsøkingen og antistoff fjerning på samme dyret bileddannet ved forskjellige tidspunkter, som beskrevet i detalj ovenfor (se figur 4).

For målsøking til tumoren og lette deteksjonen av antistoffene ble scFv(CGS-1), scFv(CGS-2) og anti-lysozym scFv(D1.3) (McCafferty et al., 1990) koblet med en homodimeriserings markør (Pack et al., 1993) ved subkloning av antistoffene i Sfi1/Not1 setene til ekspresjonsvektor pGIN50. Denne vektoren er et derivat av pDN268 (Neri et al., 1996b), hvor His6 sekvensen til markøren blir erstattet av sekvensen: GGC LTD TLQ AFT DQL EDE KSA LQT EIA HLL KEK EKL EFI LAA H, som inneholder et cysteinresidie og amfipatisk heliks til Fos proteinet for kovalent homodimerisering av antistoff fragmentene (Abate et al. 1990). Fullstendig kovalent dimerisering ble ikke oppnådd: omtrent 30-50% av antistoff fragmentene besto av kovalentlig-koblede dimerer.

Antistoff fragmenter ble rensset ved affinitetskromatografi på kolonner oppnådd ved kobling av høneegg lysozym (D1.3) eller 7B89 (anti-ED-B antistoffer; Carnemolla et al., 1996) til CNBr-aktivert Sepharose (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Supernatantene ble applisert for affinitetsbæreren som deretter ble vasket med PBS, med PBS + 0,5 M NaCl og eluert med 100 mM Et3N. Antistoffene ble deretter dialysert mot PBS.

Antistoffene ble merket som beskrevet ovenfor og ble deretter injisert i halevenen til tumor-bærende mus med 100 μ l 1 mg/ml scFv₁-Cy7₁ oppløsning i PBS, når tumorene hadde nådd en diameter på omtrent 1 cm.

Som vist i figur 5, scFv(CGS-1) lokalisert i tumoren i opptil 3 dager, var det i tillegg hurtig fjerning fra tumoren iløpet av denne perioden. Det var derimot også en viss farving av låret. Målsøkende ytelse til CGS-1 til tumoren ble drastisk forbedret ved introdusering av en amfipatisk heliks inneholdende et cysteinresidie med C-terminusen for å fremme antistoff dimerisasjonen (Pack et al., 1993). Lokalisering av dimerisk

scFv(CGS-2)₂ så ikke ut til å i betraktelig grad bli redusert fra 24 til 72 timer. I kontrast til dette viste en negativ kontroll (dimerisk antistoff scFv(D1.3)₂, anti-lysozym antistoff) en hurtig fjerning og ingen detekterbar lokalisering på tumoren eller låret.

- 5 ScFv (28SI) viste svak tumormålsøking etter 6 timer (ikke vist), men ingen var detekterbare etter 24 timer eller senere (figur 6). Affinitetsmodning førte til forbedret målsøking og scFv(CGS-2) målsøkte små og store F9 tumorer effektivt, enten som monomer (figur 6) eller dimer (ikke vist). Etter 2 dager ble det oppdaget at prosent injisert dose av antistoff pr gram tumor var omtrent 2 for scFv(CGS-2) monomeren og
- 10 3-4 for scFv (CGS-29 dimeren. Dosen levert til tumoren ved scFv (CGS-2) var også høyere enn for scFv(CGS-1) (figurene 5 og 6), og korrelerer med deres respektive affiniteter (tabell 1). Både scFv(28SI) og scFv(CGS-2) så ut til å bli utsatt for proteolytisk spaltning og viser høyt leveropptak (figur 6), mens scFv (CGS-1) antistoffer var betydelig mer stabile og viste lavere leveropptak (figur 5).

Referanser:

- Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992; Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition.
- 5 Alitalo et al. Adv. Cancer Res. 37, 111-158 (1982).
- Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922.
- Barone et al. EMBO J. 8, 1079-1085 (1989).
- Bird et al, Science, 242, 423-426, (1988).
- Borsi et al. J. Cell. Biol. 104, 595-600 (1987).
- 10 Borsi et al. Anal. Biochem. 192, 372-379 (1991).
- Borsi et al. Int. J. Cancer 52, 688-692 (1992a).
- Borsi et al. Exp. Cell Res. 199, 98-105 (1992b).
- Brown et al. Amer. J. Pathol. 142, 793-801 (1993).
- Carnemolla et al. J. Cell Biol. 108, 1139-1148 (1989).
- 15 Carnemolla et al. J. Biol. Chem 268:24689-24692 (1992).
- Castellani et al. J. Cell. Biol. 103, 1671-1677 (1986).
- Castellani et al. Int. J. Cancer 59, 612-618 (1994).
- Crothers et al. Immunochemistry 9, 341-357 (1972).
- DeJager et al (1988) Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 29:377.
- 20 Folli, et al (1994), Cancer Res., 54, 2643-2649.
- Ffrench-Constant et al. J. Cell Biol. 109, 903-914 (1989).
- Ffrench-Constant et al. Development 106, 375-388 (1989).
- Gibson TJ (1984) PhD thesis. (University of Cambridge, Cambridge, UK).
- 25 Griffiths, et al. (1994), EMBO J. 13, 3245-3260.
- Gutman and Kornblihtt. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84, 7179-7182 (1987).
- Hawkins et al. J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992).
- Holliger et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, 1993).
- 30 Holliger, P. and Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993).
- Hoogenboom et al. Nucl. Acids Res 19, 4133-4137 (1991).
- Humphries et al. J. Cell Biol. 103, 2637-2647 (1986).
- Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, (1988)
- 35 Hynes Ann. Rev. Cell Biol. 1, 67-90 (1985).

- Jain RK. *Sci. Am.* 271, 58-65 (1994).
- Jonsson et al. *BioTechniques* 11, 620-627 (1991).
- Juweid et al. *Cancer Res* 52, 5144-5153 (1992).
- Kaczmarek et al. *Int. J. Cancer* 58, 11-16 (1994).
- 5 Kornblihtt et al. *EMBO J.* 4, 1755 (1985).
- Laitinen et al. *Lab. Invest.* 64, 375-388 (1991).
- Ledermann J.A. et al. (1991) *Int J. Cancer* 47: 659-664; Low et al (1996), *J. Mol. Biol.*, 260, 359-368.
- Marks et al (1991), *J. Mol. Biol.*, 222, 581-597.
- 10 Marks et al, (1992), *Bio/Technology*, 10, 779-783.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature (London)*, 348, 552-554.
- Neri et al (1996a), *Bio/Techniques*, 20, 708-713.
- Neri et al (1996b), *Nature Biotechnology*, 14, 385-390.
- 15 Nissim et al. *EMBO J.* 13, 692-698 (1994).
- Norton and Hynes. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4297-4307 (1987).
- Owens et al. *Oxf. Surv. Eucaryot. Genes* 3, 141-160 (1986).
- Oyama et al. *J. Biol. Chem.* 10331-10334 (1989).
- Oyama et al. *Cancer Res.* 50, 1075-1078 (1990).
- 20 Pack et al (1993), *Bio/Technology*, 11, 1271-1277.
- Peters et al. *Cell Adhes. Commun.* 3, 67-89 (1995).
- Pierschbacher et al. *Cell* 26, 259-267 (1981).
- Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991).
- Reff, M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576.
- 25 Ruoslahti. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 375-413 (1988).
- Saginati et al. *Eur J. Biochem.* 205, 545-549 (1992).
- Schwarzbauer et al. *EMBO J.* 6, 2573-2580 (1987).
- Schroff et al, 1985 *Cancer Res* 45: 879-885.
- Siri et al. *Nucl. Acids Res.* 19, 525-531 (1991).
- 30 Tomlinson I.M. et al, (1992) *J. Mol. Biol.* 227: 776-798.
- Traunecker et al, *Embo Journal*, 10, 3655-3659, (1991).
- Trill J.J. et al. (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560.
- Vartio et al. *J. Cell Science* 88, 419-430 (1987).
- Vaughan et al (1996), *Nature Biotechnol.*, 14, 309-314.
- Ward, E.S. et al., *Nature* 341, 544-546 (1989).
- 35 Winter, G and C. Milstein, *Nature* 349, 293-299, 1991.

W094/13804 Yamada. Ann. Rev. Biochem. 52, 761-799 (1983).
Zardi et al. EMBO J. 6, 2337-2342 (1987).

SEKVENSLISTE

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: PHILOGEN S.r.l.**
- (B) STREET: Via Roma 22**
- (C) CITY: SIENA**
- (E) COUNTRY: ITALY**
- (F) POSTAL CODE (ZIP): 53100**

(ii) TITLE OF INVENTION: ANTIBODIES TO THE ED-B DOMAIN OF FIBRONECTIN, THEIR CONSTRUCTION AND USES

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 12

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk**
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible**
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS**
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)**

(v) CURRENT APPLICATION DATA:

APPLICATION NUMBER: PCT/GB97/01412

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 4 amino acids**
- (B) TYPE: amino acid**
- (C) STRANDEDNESS: single**
- (D) TOPOLOGY: linear**

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

Ser Leu Pro Lys

1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 12 amino acids**
- (B) TYPE: amino acid**
- (C) STRANDEDNESS: single**
- (D) TOPOLOGY: linear**

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 17 base pairs**
- (B) TYPE: nucleic acid**
- (C) STRANDEDNESS: single**
- (D) TOPOLOGY: linear**

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

CAGGAAACAG CTATGAC

17

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 51 base pairs**
- (B) TYPE: nucleic acid**
- (C) STRANDEDNESS: single**
- (D) TOPOLOGY: linear**

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

CTTGGTCCCT CCGCCGAATA CCACMNNMNN MNNMNNMNNM NNAGAGGAGT
TACAGTAATA GTCAGCCTC

69

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 54 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

ATTGCTTTTC CTTTTTGCGG CCGCGCCTAG GACGGTCAGC TTGGTCCCTC CGCC

54

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 43 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

Gly	Gly	Cys	Leu	Thr	Asp	Thr	Leu	Gln	Ala	Phe	Thr	Asp	Gln	Leu	Glu
1				5				10						15	
Asp	Glu	Lys	Ser	Ala	Leu	Gln	Thr	Glu	Ile	Ala	His	Leu	Leu	Lys	Glu
			20					25					30		
Lys	Glu	Lys	Leu	Glu	Phe	Ile	Leu	Ala	Ala	His					
			35				40								

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 8 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

Pro	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Val	Val
1				5			

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH:** 8 amino acids
- (B) TYPE:** amino acid
- (C) STRANDEDNESS:** single
- (D) TOPOLOGY:** linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH:** 113 amino acids
- (B) TYPE:** amino acid
- (C) STRANDEDNESS:** single
- (D) TOPOLOGY:** linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(B) STRAIN: CGS1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser 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 Arg Ser Leu Pro Lys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Arg

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 121 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(B) STRAIN: CGS2

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

Glu Val Gln Leu Val 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 Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser 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 Arg Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
115 120

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 109 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(B) STRAIN: CGS1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Pro Val Val Leu Asn Gly
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 100

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 109 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(B) STRAIN: CGS2

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Ser Pro Phe Glu His Asn Leu
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

P a t e n t k r a v

1.

Isolert antistoff eller antistofffragment, k a r a k t e r i s e r t

- 5 v e d at nevnte antistoff eller antistofffragment er spesifikt for og binder direkte til ED-B onkoføtaldomenet til fibronektin (FN), med en dissosiasjonskonstant (K_d) for ED-B på mindre enn $6 \times 10^{-8} M$, når målt som renset monomer.

2.

- 10 Isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte antistoff eller antistofffragment omfatter et antistoff-antigenbindende domene av human opprinnelse.

3.

- 15 Isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte antistoff eller antistofffragment binder til alle FN-inneholdende ED-B etter behandling av FN med proteasen termolysin.

- 20 4.

Isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte antistoff eller antistofffragment binder til B-FN uten behandling av B-FN med N-glykanase.

- 25 5.

Isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte antistoff eller antistofffragment har en variabel tung (VH) kjederegion med sekvens utledet fra human kimcellelinje DP47, kodon 1 Glu - kodon 98 Arg inkludert i Figur 1, og CDR3-sekvensen Ser Leu Pro Lys.

30

6.

Isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte antistoff eller

- 35 antistofffragment har en variabel tung (VH) kjederegion med sekvens utledet fra human kimcellelinje DP47, kodon 1 Glu - kodon 98 Arg inkludert i Figur 1, og CDR3-sekvensen Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu.

7.

Isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte antistoff eller
antistofffragment har en variabel lett (VL) kjederegion med sekvens utledet fra human
5 kimcellelinje DPL16, kodon 1 Ser - kodon 90 Ser inkludert i Figur 1, og resterende
CDR3-sekvens som Pro Val Val Leu Asn Gly Val Val.

8.

Isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til krav 1,

10 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte antistoff eller
antistofffragment har en variabel lett (VL) kjederegion med sekvens utledet fra human
kimcellelinje DPL16, kodon 1 Ser - kodon 90 Ser inkludert i Figur 1, og den resterende
CDR3-sekvensen som Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val.

15 9.

Isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til
8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte antistoff eller
antistofffragment omfatter et scFv-molekyl.

20 10.

Isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til
8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte antistoff eller
antistofffragment omfatter et dimerisk scFv-molekyl.

25 11.

Isolert antistofffragment i henhold til et hvilket som helst av kravene 5 til 8.

12.

Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
30 omfatter et isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til et hvilket som helst av
kravene 1 til 11 i en effektiv mengde, i konjunksjon med en farmasøytisk akseptabel
eksipient.

13.

35 Nukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at den koder for et
isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til
11.

14.

Fag, k a r a k t e r i s e r t v e d at den koder for et isolert antistoff eller antistoffragment i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 11.

5 15.

Vertscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er in vitro transformert eller transfektert med en nukleinsyre i henhold til krav 13.

16.

10 Et isolert antistoff eller antistoffragment i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 11 for anvendelse i terapi.

17.

15 Anvendelse av et isolert antistoff eller antistoffragment i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 11, for fremstilling av et medikament for målretting mot tumorer.

18.

Anvendelse av et isolert antistoff eller antistoffragment i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 11, for fremstilling av et middel for avbildning av tumorer.

20

19.

Fremgangsmåte for fremstilling av et isolert antistoff eller antistoffragment i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter ekspresjon av en nukleinsyre i henhold til krav 13 i en vertscelle in vitro for å produsere nevnte antistoff eller antistoffragment.

25

20.

Fremgangsmåte for fremstilling av et isolert antistoff eller antistoffragment i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter følgende trinn:

30

- a) screening av et antistoffragmentbibliotek uttrykt i fag med et rekombinant fibronektinfragment inneholdende ED-B-domenet avledet fra fibronektinproteinet, hvor antistoffragmentene er scFv-molekyler;
- b) infisering av vertsbakterieceller med positive kloner;
- 35 c) underlegge positive fagkloner en affinitetsmodningsprosess;
- d) repetere trinnene a) og b) for å velge positive fagkloner med økt affinitet for antigen;

- e) infisere vertsceller med positive kloner og rense antistoffmolekyler fra nevnte vertsceller.

21.

- 5 Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte scFv-molekyler omfatter et antistoff-antigen bindingsdomene av human opprinnelse.

22.

- 10 Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t v e d at trinn a) omfatter screening med rekombinante antigener 7B89 eller ED-B.

23.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 20 til 22,

- 15 k a r a k t e r i s e r t v e d at nukleinsyren til en positiv klon anvendes i produksjon ved ekspresjon i en vertscelle in vitro av et produkt antistoff eller antistofffragment kodet av nukleinsyren, hvor produktantistoffet eller antistofffragmentet omfatter et antistoff-antigenbindende domene som er spesifikt for og binder direkte til ED-B onkoføtaldomenet til fibronektin (FN).

20

24.

Fremgangsmåte ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at produktantistoffet er i form av et helt antistoff.

25 25.

Fremgangsmåte ifølge krav 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at produktantistofffragmentet er i form av et scFv-molekyl.

26.

- 30 Diagnostisk kit, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter et isolert antistoff eller antistofffragment i henhold til et hvilket som helst av kravene 1 til 11 og en eller flere reagenser som muliggjør bestemmelse av bindingen av nevnte antistoff eller antistofffragment til celler.

FIG. 1(a)

	CDR1				CDR2	
	10	20	30	40	50	60
CGS1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFS SYAMS WWRQAPGKCLEW/S AI9CGSGSTYYADSVKG					
CGS2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFS SYAMS WWRQAPGKCLEW/S AI9CGSGSTYYADSVKG					

	CDR3			
	70	80	90	98
CGS1	RFTISRINSKNTILYLQMNSLRRAEDTAVVYCAR SLRK WQQGILVIVSR			
CGS2	RFTISRINSKNTILYLQMNSLRRAEDTAVVYCAR GAGAFREYRKHE WQQGILVIVSR			

FIG. 1(b)

	10	20	30	40	50
CGS1	SSELITQDP	PAVSVALGQIVRITC	QEDSLRSYYAS	WYQOKFGQAPVLVIY	CKNRPS
CGS2	SSELITQDP	PAVSVALGQIVRITC	QEDSLRSYYAS	WYQOKFGQAPVLVIY	CKNRPS

	60	70	80	90	100
CGS1	GIPDRFGSSSGNIPASLTITTCQAQAEDEADYYC	NSSPFWLNGW	FCGGIKLIVLG		
CGS2	GIPDRFGSSSGNIPASLTITTCQAQAEDEADYYC	NSSPFEHNLW	FCGGIKLIVLG		

NH_2 — — COOH

Termolysinfragmenter :

	120 kDa(8+)
	110 kDa(8-)
	85 kDa(2/3 8+)

Termolysinfragmenter :

FIG. 2B

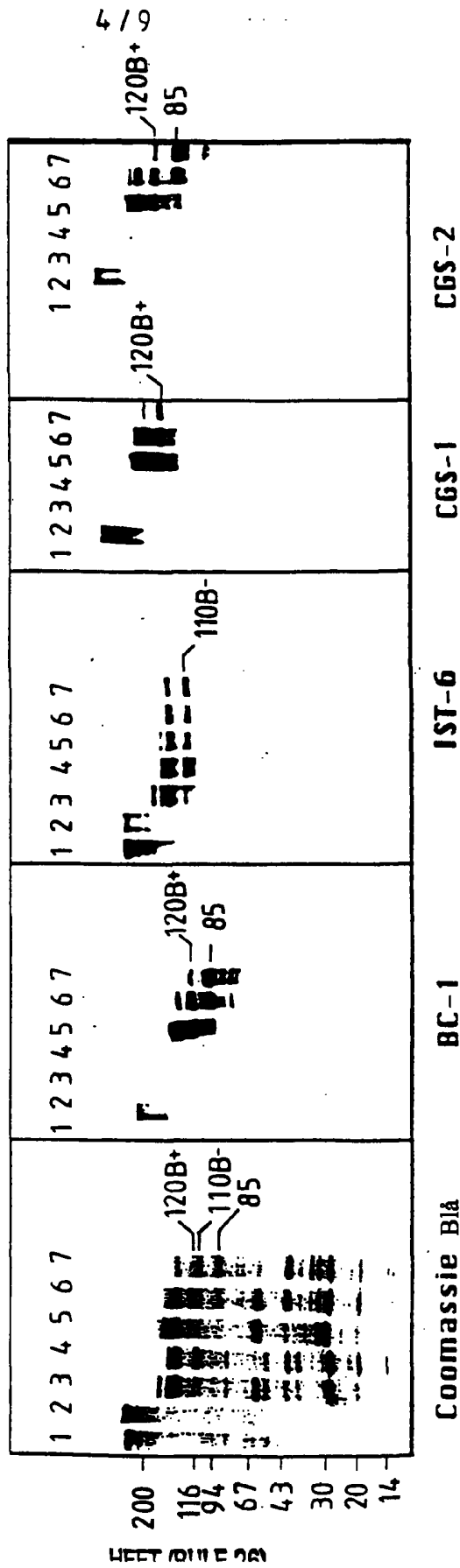


FIG. 3A

		CGS-1	CGS-2	BC-1	IST-6	
1		-	-	-	+	5/9
2		+	+	+	-	
3		-	-	-	+	
4		+	+	+	-	
5		-	+	-	-	
6		-	+	-	-	

FIG. 3B

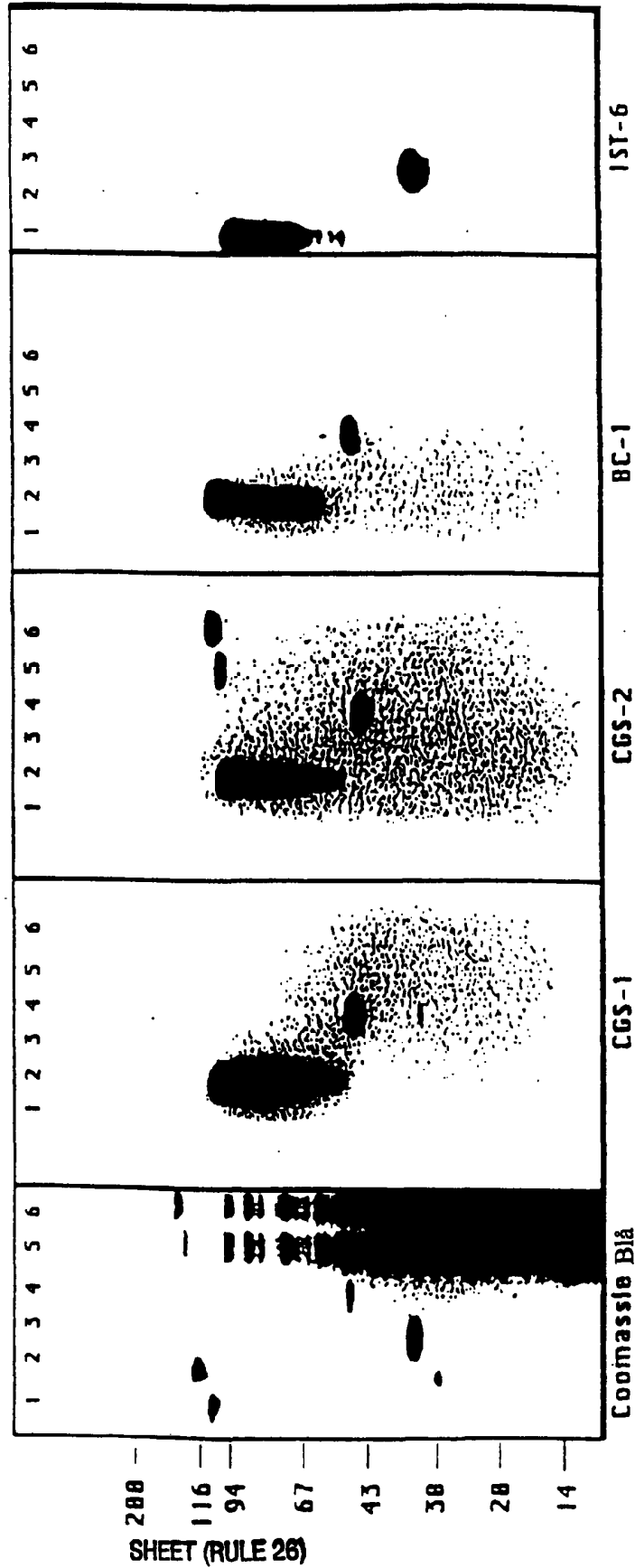


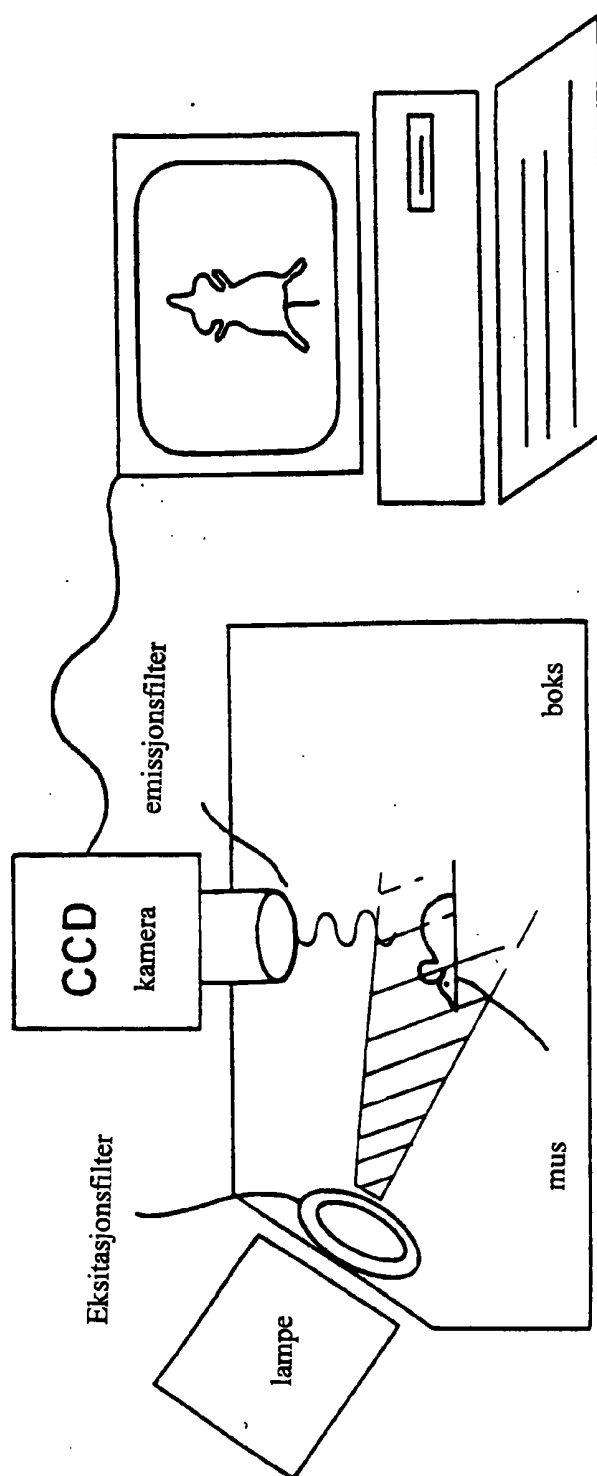
FIG. 4

FIG. 5

8 / 9

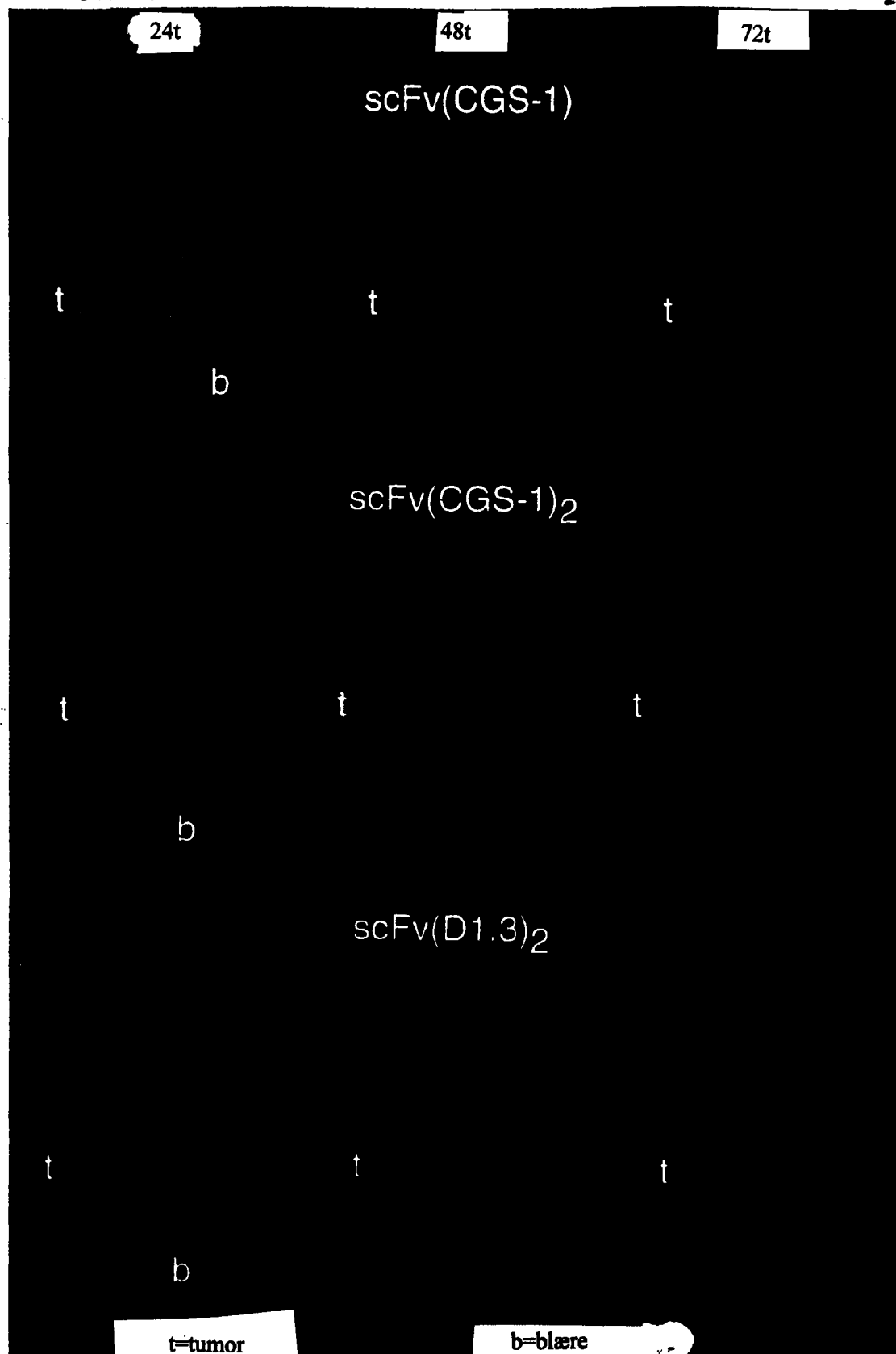


FIG. 6

