

Предпосылки создания изобретения

Настоящее изобретение относится к элементам (членам) специфического связывания для фетальной изоформы фибронектина, ED-B, которая также экспрессируется во вновь образованных сосудах развивающейся опухоли, как было продемонстрировано методами иммуноцитохимии и методами направленного *in vivo* - "атаки" опухолей-мишеней. Настоящее изобретение также включает материалы и методы, относящиеся к таким членам специфического связывания.

Главной целью большинства из имеющихся видов противоопухолевой терапии является уничтожение, по возможности, большего количества клеток, из которых состоит опухоль. Ограниченный успех, который наблюдается при лечении методами химиотерапии и радиотерапии, обусловлен относительной недостаточностью в специфичности лечения и тенденцией к развитию токсического побочного действия на нормальные ткани. Одним из способов, с помощью которого может быть повышена избирательность противоопухолевой терапии, является доставка лекарственного агента к опухоли посредством связывающегося белка, обычно содержащего связывающий домен антитела, который обладает специфичностью к маркерному антигену, экспрессирующемуся на поверхности опухоли, но отсутствующему у нормальных клеток. Этот вид направленной терапии называемой, в общих чертах, "волшебной пулей", был, главным образом, продемонстрирован с помощью моноклональных антител (mAb), происходящих от грызунов и являющихся специфичными к так называемым опухолеассоциированным антигенам, экспрессируемым на клеточной поверхности. Такие mAb могут быть либо химически конъюгированы с цитотоксической молекулой (например, с токсином или лекарственным средством), либо они могут быть продуцированы в виде рекомбинантного гибридного белка, где гены, кодирующие mAb и токсин, соединены друг с другом и экспрессируются tandemно.

Метод "волшебной пули" имеет ограниченное применение, хотя он достаточно эффективен при лечении рака человека, а особенно, при направленной терапии опухолей лимфоидной ткани, где злокачественные клетки являются, в основном, легко доступными для терапевтической дозы, присутствующей в кровотоке. Однако лечение твердых опухолей остается серьезной клинической проблемой, связанной с тем, что лишь незначительная часть всей клеточной массы, преимущественно клетки, присутствующие на крайних периферических участках опухоли, подвергаются воздействию иммуноконъюгатов, присутствующих в кровотоке, где эти периферические мишени образуют так называемый "барьер сайта связывания" для внутренней части опухоли (Juweid et al., 1992,

Cancer Res. 52, 5144-5153). Внутри опухоли, архитектура тканей является, в основном, слишком плотной, чтобы соединительная строма и тесно упакованные опухолевые клетки могли допускать проникновение молекул таких размеров, как антитела. Кроме того, известно, что опухоли имеют повышенное интерстициальное давление благодаря отсутствию в них лимфатического дренирования, что также препятствует притоку экзогенных молекул. Недавно был дан обзор факторов, препятствующих внедрению терапевтических агентов в опухоли, см. Jain, R (1994), Sci. Am. 271, 58-65.

Хотя имеются очевидные ограничения при лечении твердых опухолей посредством направленной доставки опухолеассоциированных антигенов, однако, эти опухоли имеют одну общую особенность, которая обеспечивает альтернативную антигенную мишень при терапии с использованием антител. После того как опухоли достигают определенного размера, они, в основном, зависят от независимого кровоснабжения для адекватной поставки кислорода и питательных веществ, необходимых для их роста. Если это кровоснабжение будет прервано или заблокировано, то имеется реальная возможность оставить "голодными" тысячи опухолевых клеток в процессе их развития. По мере развития опухоли она подвергается переключению на ангиогенный фенотип, продуцируя при этом ряд различных ангиогенных факторов, которые действуют на близлежащие капиллярные эндотелиальные клетки, индуцируя их пролиферацию и миграцию. Структура этих вновь образованных кровеносных сосудов является в высокой степени дезорганизованной, которая по сравнению с организованной структурой капилляров в нормальной ткани имеет слепые концы и фенестрации, приводящие к кровотечению. Индуцирование ангиогенеза сопровождается стимуляцией экспрессии некоторых антигенов на поверхности клеток, многие из которых являются такими же, как и антигены сосудов нормальных тканей. Идентификация антигенов, которые являются уникальными для вновь образованных сосудов опухолей, является главным ограничивающим фактором при разработке общего лечения твердых опухолей посредством направленной на эти сосуды терапии. Антиген, который является объектом настоящего изобретения, имеет прямое отношение к решению этой проблемы.

При прогрессировании опухоли внеклеточный матрикс окружающей ткани ремоделируется посредством двух главных механизмов: (1) протеолитической деградации компонентов внеклеточного матрикса нормальной ткани и (2) *de novo* синтеза компонентов внеклеточного матрикса как опухолевыми клетками, так и клетками стромы, активированными опухоль-индуцированными цитокинами. Эти два процесса при устойчивом состоянии генерируют "опухолевый внеклеточный матрикс", который обес-

печивает более подходящее окружение для прогрессирования опухоли и который качественно и количественно отличается от внеклеточного матрикса нормальных тканей. Среди компонентов этого матрикса имеются крупные изоформы тенасцина и фибронектина (FN); причем описание этих белков как изоформ выявило их значительную структурную гетерогенность, которая имеет место на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровне (см. ниже). Одна из таких изоформ фибронектина, так называемая изоформа B+(B-FN), является объектом настоящего изобретения.

Фибронектины (FN) являются многофункциональными, высокомолекулярными гликопротеиновыми компонентами как внеклеточного матрикса, так и физиологических жидкостей организма. Они участвуют во многих различных биологических процессах, таких как установление и сохранение нормальной морфологии клеток, миграция клеток, гемостаз и тромбоз, заживление ран и онкогенная трансформация (см. обзор Alitalo et al., 1982, Yamada, 1983, Hynes, 1985, Ruoslahti et al., 1988, Hynes, 1990; Owens et al., 1986). Структурное разнообразие FN обусловлено альтернативным сплайсингом трех областей (ED-A, ED-B и IIICS) первичного транскрипта FN (Hynes, 1985, Zardi et al., 1987), что приводит к генерированию по крайней мере 20 различных изоформ, некоторые из которых дифференциально экспрессируются в опухолях и в нормальной ткани. Эти формы также регулируются тканеспецифическим и стадийспецифическим образом, и известно, что в трансформированных клетках и при озлокачивании имеет место нарушение регуляции характера сплайсинга FN-пре-mРНК (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). Фактически, изоформы FN, содержащие последовательности ED-A, ED-B и IIICS, экспрессируются на более высоком уровне в трансформированных и злокачественных опухолевых клетках, чем в нормальных клетках. В частности, изоформа FN, содержащая последовательность ED-B (изоформа B+), экспрессируется на высоком уровне в фетальных и в опухолевых тканях, а также в процессе заживления ран, однако, ее экспрессия ограничена в нормальных тканях взрослого индивидуума (Norton et al., 1987; Schwarzbauer et al., 1987; Gutman & Kornblihtt, 1987; Carnemolla et al., 1989; French-Constant et al., 1989; French-Constant & Hynes, 1989; Laitinen et al., 1991). Молекулы B+ фибронектина не обнаруживаются в зрелых сосудах, однако, они стимулируются в ангиогенных кровеносных сосудах при нормальном развитии (например, развитии эндометрия), патологическом развитии (например, при диабетической ретинопатии) и при опухолевом развитии (Castellani et al., 1994).

Последовательность ED-B имеет полный гомологичный повтор типа III, кодированный одним экзоном и содержащий 91 аминокислоту. В отличие от альтернативно сплайсированной изоформы IIICS, которая содержит клетко-специфический сайт связывания, биологическая функция изоформ A+ и B+ еще нуждается в обсуждении (Humphries et al., 1986).

Само присутствие изоформы B+ приводит к образованию опухолииндуцированного неоантигена, но помимо этого при экспрессии ED-B обычно обнаруживается криптантген в повторе 7 типа III (предшествующем ED-B), а поскольку этот эпитоп не обнаруживается в молекулах FN, которые не содержат ED-B, то из этого следует, что экспрессия ED-B индуцирует экспрессию неоантигенов как непосредственно, так и опосредованно. Этот криптантгенный сайт образует мишень для моноклонального антитела (mAb), названного BC-1 (Carnemolla et al., 1992). Специфичность и биологические свойства этого mAb были описаны в EP 0 344 134 B1, и это mAb было получено из гибридомы, депонированной в Европейской коллекции культур клеток животных, Porton Down, Salisbury, UK, под входящим номером 88042101. Антитела mAb были успешно использованы для определения локализации ангиогенных кровеносных сосудов опухолей, и не обнаруживали перекрестной реактивности со зрелым эндотелием кровеносных сосудов, что свидетельствует о возможности использования изоформ FN для осуществления направленного воздействия на образующиеся сосуды опухоли с помощью антител.

Однако в отношении специфичности mAb BC-1 имеются некоторые сомнения. Если принять во внимание тот факт, что BC-1 не распознает непосредственно изоформу B+, то встает вопрос о том, может ли в некоторых тканях эпитоп, распознаваемый BC-1, быть демаскирован в отсутствие ED-B и не будет ли это косвенно приводить к нежелательной перекрестной реактивности BC-1. Кроме того, BC-1 является строго специфическим для изоформы B+ человека, а это означает, что исследование животных на биораспределение и опухолевую локализацию BC-1 не представляется возможным. Хотя были продуцированы поликлональные антитела к рекомбинантным гибридным белкам, содержащим изоформу B+ (Peters et al., 1995), однако, они реагировали лишь с FN, который был обработан N-гликаназой для демаскировки эпитопа.

Еще одной общей проблемой, связанной с использованием мышинных моноклональных антител, является гуморальный ответ с образованием антимышних человеческих антител (HAMA) (Schroff et al., 1985; Dejager et al., 1988). HAMA-ответ имеет ряд эффектов, от нейтрализации введенного антитела, приводящего к снижению терапевтической дозы, до аллергических реакций, заболеваний крови и почечной недостаточности.

Хотя была идентифицирована поликлональная антисыворотка, реагирующая с рекомбинантным ED-B (см. выше), однако, выделение mAb с той же самой специфичностью, что и специфичность BC-1 после иммунизации мышей, является трудной задачей, поскольку последовательности белков ED-B человека и мыши обнаруживают фактически 100%-ную гомологию. Поэтому белок человека может быть похожим на аутоантиген, специфичный для мыши, который затем не будет продуцировать иммунную реакцию в ответ на этот антиген. Действительно, в течение более десяти лет интенсивного исследования в этой области, было идентифицировано лишь одно антитело mAb с непрямой реактивностью по отношению к изоформе B+ FN (BC-1), и не было выявлено ни одного антитела, непосредственно распознающего ED-B. Отсюда почти с уверенностью можно утверждать, что специфичность BC-1 направлена на криптоэпитоп, экспонируемый благодаря ED-B, а не на часть самого ED-B, который, вероятно, отсутствует в мышинном FN, а поэтому не распознается как "свое" иммунной системой мыши.

Осуществление настоящего изобретения было достигнуто с использованием альтернативной, по сравнению с используемой ранее, стратегии, в которой не требуется предварительной иммунизации фибронектином или ED-B: антитела со специфичностью к изоформе ED-B были получены в виде одноцепочечных Fv (scFv) из библиотек различных переменных областей человеческих антител, присутствующих на поверхности нитевидного бактериофага (Nissim et al., 1994; см. также WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/-06213, WO 93/11236, WO 93/-19172).

С использованием фаговой библиотеки антител, нами было также обнаружено, что специфические scFv могут быть выделены как путем прямого отбора как на рекомбинантные FN-фрагменты, содержащие домен ED-B, так и на сами рекомбинантные ED-B, при нанесении этих антигенов на твердую поверхность ("пэннинг"). Эти же самые источники антигена были также с успехом использованы для продуцирования "второй генерации" scFv с улучшенными свойствами, по сравнению с родственными клонами, в процессе "созревания аффинности". Нами было обнаружено, что выделенные scFv сильно и специфически реагируют с изоформой B+ человеческого FN без предварительной обработки N-гликаназой.

Противоопухолевое применение антиген-связывающих доменов антитела человека, используемых в настоящем изобретении, имеет то преимущество, что при таком применении не продуцируется НАМА-ответ. Кроме того, как проиллюстрировано в настоящей заявке, они могут быть использованы в иммуногистохимических анализах опухолевой ткани как *in vitro*,

так и *in vivo*. Эти и другие применения настоящего изобретения обсуждаются в настоящей заявке и будут очевидны для каждого специалиста.

Терминология

Член специфического связывания.

Этот термин относится к члену пары молекул, которые специфически связываются друг с другом. Эти члены пары специфического связывания могут иметь природное происхождение, либо они могут быть целиком или частично синтезированы. Один член из этой пары молекул имеет на своей поверхности площадь или полость, которая специфически связывается с конкретной пространственной и полярной структурой другого члена этой пары молекул, а поэтому комплементарна этой структуре. Таким образом, члены этой пары молекул обладают способностью специфически связываться друг с другом. Примерами типов пар специфического связывания являются "антиген-антитело", "биотин-авидин", "гормон-рецептор гормона", "рецептор-лиганд", "фермент-субстрат".

Антитело.

Этот термин означает иммуноглобулин, который является либо природным, либо частично или полностью синтезированным. Этот термин также означает любой полипептид или белок, имеющий связывающий домен, который является связывающим доменом антитела, или гомологичен ему. Они могут происходить от природных источников, либо они могут быть целиком или частично синтезированы. Примерами антител являются изотипы иммуноглобулинов и их изотилические подклассы; фрагменты, содержащие антигенсвязывающий домен, такой как Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; и диантитела ("diabodies").

Для продуцирования других антител или химерных молекул, которые сохраняют специфичность исходного антитела, можно использовать моноклональные и другие антитела, а также использовать технику рекомбинантных ДНК. Такая техника может предусматривать введение ДНК, кодирующей переменную область или гиперпеременную область (комплементарность-определяющую область - CDR) иммуноглобулина до константных областей, либо константные области + каркасные участки другого иммуноглобулина. См., например, EP-A-184187, GB 218863A или EP-A-239400. Гибридома или другая клетка, продуцирующая антитело, может быть подвергнута генетической мутации или другим модификациям, которые могут изменять, а могут и не изменять специфичность связывания продуцированных антител.

Антитела могут быть модифицированы различными способами, при этом термин "антитело" должен рассматриваться как любой член специфического связывания или вещество, имеющее связывающий домен с нужной специфичностью. Таким образом, этот термин охва-

тывает фрагменты антител, производные, функциональные эквиваленты и гомологи антител, включая любой полипептид, содержащий связывающий домен иммуноглобулина, независимо от того, является ли он природным или был полностью или частично синтезирован. А поэтому этот термин также включает в себя химерные молекулы, содержащие связывающий домен иммуноглобулина или его эквивалент, гибридизированный с другим полипептидом. Клонирование и экспрессия химерных антител описаны в EP-A-0120694 и EP-A-0125023.

Было показано, что фрагменты целого антитела могут осуществлять функцию связывания с антигенами. Примерами связывающих фрагментов являются (i) Fab-фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов; (ii) Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов; (iii) Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одного антитела; (iv) dAb-фрагмент (Ward et al., 1989), состоящий из VH-домена; (v) выделенные CDR-области; (vi) F(ab')₂-фрагменты, бивалентный фрагмент, состоящий из двух связанных Fab-фрагментов; (vii) одноцепочечные Fv-молекулы (scFv), где VH-домен и VL-домен связаны друг с другом посредством пептидного линкера, который позволяет этим двум доменам ассоциироваться друг с другом с образованием антигенсвязывающего сайта (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988); (viii) биспецифические одноцепочечные Fv-димеры (PCT/US 92/09965); и (ix) диантитела, мультивалентные или мультиспецифичные фрагменты, сконструированные путем слияния генов (WO 94/13804; Holliger et al., 1993).

Диантитела представляют собой мультимеры полипептидов, каждый из которых содержит первый домен, включающий связывающую область легкой цепи иммуноглобулина, и второй домен, включающий связывающую область тяжелой цепи иммуноглобулина, где указанные два домена связаны друг с другом (например, посредством пептидного линкера), но неспособны ассоциироваться друг с другом с образованием антигенсвязывающего сайта: антигенсвязывающие сайты образуются путем ассоциации первого домена одного полипептида в мультимере со вторым доменом другого полипептида в мультимере (WO 94/13804).

Если используются биспецифические антитела, то такими антителами могут быть стандартные биспецифические антитела, которые могут быть получены различными путями (Hollinger & Winter, 1993), например химическим методом, или из гибридных гибридом, либо они могут представлять собой любой из биспецифических фрагментов антитела, упомянутых выше. Вместо целых антител может оказаться предпочтительным использовать scFv-димеры или диантитела. Диантитела и scFv могут быть сконструированы так, чтобы они не содержали Fc-область, с использованием лишь

вариабельных доменов, что позволяет уменьшить эффекты антиидиотипической реакции. Другими формами биспецифических антител являются одноцепочечные "Janusins", описанные Traunecker et al., 1991).

В отличие от целых биспецифических антител могут быть также, в частности, использованы биспецифические диантитела, поскольку они могут быть легко сконструированы и экспрессированы в *E.coli*. Диантитела (и многие другие полипептиды, такие как фрагменты антител) с соответствующей специфичностью связывания могут быть легко отобраны из библиотек с использованием фогового отображения (WO 94/13804). Если одно плечо диантитела оставить неизменным, например, со специфичностью, направленной против антигена X, то можно создать библиотеку, где другое плечо будет варьироваться и можно выбрать антитело с соответствующей специфичностью.

Антигенсвязывающий домен.

Этот термин означает часть антитела, включающую область, которая специфически связывается с частью или со всем антигеном либо комплементарна части или всему антигену. Если антиген является крупным, то антитело может связываться только с определенной частью антигена, которая называется эпитопом. Антигенсвязывающий домен может быть представлен одним или несколькими вариабельными доменами антитела. Предпочтительно антигенсвязывающий домен включает вариабельную область легкой цепи (VL) антитела и вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела.

"Специфичный".

Этот термин описывает ситуацию, при которой один член пары специфического связывания не обнаруживает какого-либо значительного связывания с молекулами, не являющимися его партнерами по специфическому связыванию. Этот термин также применяется в том случае, когда, например, антигенсвязывающий домен является специфичным для конкретного эпитопа, присутствующего на ряде антигенов; причем в этом случае член специфического связывания, несущий антигенсвязывающий домен, способен связываться с различными антигенами, несущими данный эпитоп.

Функционально эквивалентная вариантная форма.

Этот термин относится к молекуле (варианту), которая, хотя и имеет структурные отличия от другой молекулы (родительской молекулы), однако, сохраняет до некоторой степени значительную гомологию, и также, по крайней мере, некоторую часть биологической функции родительской молекулы, например, способность связываться с конкретным антигеном или эпитопом. Эти варианты могут присутствовать в форме фрагментов, производных или мутантов. Вариант, производное или мутант могут быть получены путем модификации родительской

молекулы путем добавления, делеции, замены или инсерции одной или нескольких аминокислот либо путем присоединения другой молекулы. Эти модификации могут быть осуществлены на уровне нуклеотидов или белка. Так, например, кодированный полипептид может быть Fab-фрагментом, который затем присоединяют к Fc-концу от другого источника. Альтернативно, может быть присоединен маркер, такой как фермент, флуоресцеин, и т.п.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к члену специфического связывания, который является специфичным для онкофетального домена ED-B фибронектина (FN).

Члены специфического связывания настоящего изобретения связываются с доменом ED-B непосредственно. В одном из вариантов настоящего изобретения член специфического связывания после обработки фибронектина протеазным термолизинном связывается с любым или со всеми фибронектинами, содержащими ED-B. В другом варианте настоящего изобретения член специфического связывания связывается с любым или со всеми FN, содержащими гомологичные повторы типа III, которые включают домен ED-B. Известные фибронектины были идентифицированы в двух работах Carmella et al. (1989, 1992). Указание на "все фибронектины, содержащие ED-B", может рассматриваться как все идентифицированные в этих работах фибронектины, содержащие ED-B.

Член специфического связывания связывается предпочтительно с человеческим ED-B и предпочтительно с B+ FN, по крайней мере, от одного другого вида, такого как мышь, крыса и/или курица. При этом предпочтительно, чтобы член пары специфического связывания был способен связываться как с ED-B человеческого фибронектина, так и с ED-B нечеловеческого фибронектина, такого как мышинный фибронектин, что позволяет тестировать и анализировать член пары специфического связывания на модели животного.

Члены пары специфического связывания настоящего изобретения связываются с ED-B фибронектина, не конкурируя при этом с общедоступным депонированным антителом BC-1, которое еще будет обсуждаться в настоящем описании. BC-1 является строго специфичным по отношению к изоформе B+ человека. Члены пары специфического связывания настоящего изобретения не связываются с тем же самым эпитопом, что и BC-1.

Связывание члена специфического связывания настоящего изобретения с B+FN может быть ингибировано доменом ED-B.

В одном из аспектов настоящего изобретения, связывающийся домен имеет при измерении очищенного мономера константу диссоциации для ED-B FN (K_d), равную 6×10^{-8} М или менее.

В одном из аспектов настоящего изобретения связывающийся домен реагирует, т.е. способен связываться, с ED-B фибронектина без предварительной обработки ED-B фибронектина N-гликаназой.

Члены пары специфического связывания настоящего изобретения могут быть использованы в виде изолятов или в очищенной форме для получения препарата или композиции, не содержащих других членов пары специфического связывания, например, антител или фрагментов антител, или не содержащих других членов пары специфического связывания, способных связываться с ED-B фибронектина. Предпочтительно, чтобы члены специфического связывания настоящего изобретения были получены, в основном, в чистой форме. Они могут быть "моноклональными", т.е. в том смысле, что они происходят от одного клона, а не ограничиваются антителами, полученными с использованием традиционной гибридомной технологии. Как обсуждалось выше, члены пары специфического связывания настоящего изобретения могут быть получены с использованием технологии бактериофагового отображения и/или путем экспрессии в рекомбинантных, например, бактериальных, клетках-хозяевах. Моноклональный член пары специфического связывания, который прямо связывается с ED-B фибронектином, не был описан ранее.

Член специфического связывания предпочтительно включает антитело. Член специфического связывания может содержать полипептидную последовательность в форме фрагмента антитела, такого как одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). Могут быть также использованы и другие типы фрагментов антитела, такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Facb или диантитело (Winter & Milstein, 1991; WO 94/13804). Член специфического связывания может иметь форму целого антитела. Это целое антитело может представлять собой любую из форм изоформ антитела, например, IgG, IgA, IgD, IgE и IgM, и любую из форм подклассов изоформ, например, IgG1 или IgG4.

Это антитело может быть любого происхождения, например, оно может быть человеческим, мышинным, овечьим или кроличьим. Как очевидно для каждого специалиста, могут быть использованы и другие варианты. При этом предпочтительно, чтобы это антитело было человеческим. Под понятием "человеческое" антитело подразумевается антитело, которое частично или полностью происходит из библиотеки кДНК, белка или пептидов человека. Этот термин включает гуманизированные пептиды и белки, которые не происходят от человека и которые были модифицированы для сообщения молекуле антитела свойств человеческого антитела, что позволяет этой молекуле "использовать" от надзора иммунной системы человека.

Член специфического связывания может также представлять собой сконструированное антитело, например, биспецифическую молекулу антитела (или фрагмент антитела, такого как F(ab')₂), которая имеет одно антиген-связывающее плечо (т.е. специфический домен), направленное против вышеописанного ED-B фибронектина, и другое плечо, направленное против другой специфичности, либо бивалентную или мультивалентную молекулу.

Помимо последовательностей антитела, член специфического связывания может включать другие аминокислоты, например, образующие пептид, или полипептид, или аминокислоты, наделяющие эту молекулу, помимо ее способности связываться с антигеном, другими функциональными свойствами. Так, например, член специфического связывания может содержать метку, фермент или его фрагмент и т.п.

Связывающийся домен может содержать часть или весь VH-домен, кодированный сегментом зародышевой линии или сегментом реаранжированного гена. Связывающийся домен может содержать часть или весь домен VL каппа-цепи или домен VL лямбда-цепи.

Связывающийся домен может содержать VH1-, VH3- или VH4-последовательность гена зародышевой линии или его реаранжированной формы.

Член специфического связывания настоящего изобретения может содержать вариабельную область тяжелой цепи ("VH-домен"), происходящую от зародышевой линии человека DP47, последовательность, которая показана на фиг. 1(a), остатки 1-98. Номенклатура "DP" описана Tomlinson et al., (1992). Аминокислотной последовательностью CDR3 может быть Ser Leu Pro Lys. Аминокислотной последовательностью CDR3 может быть Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu. Таким образом связывающийся домен члена специфического связывания настоящего изобретения может включать VH-домен, который содержит аминокислотную последовательность, показанную на фиг. 1(a) для CGS1 и CGS2.

Связывающийся домен может содержать вариабельную область легкой цепи («VL-домен»), происходящую от зародышевой линии человека DPL16, последовательность, которая показана на фиг. 1(b), кодоны 1-90.

VL-домен может содержать CDR3-последовательность Asn Ser Ser Pro Val Val Leu Asn Gly Val Val. VL-домен может содержать CDR3-последовательность Asn Ser Ser Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val.

Члены специфического связывания настоящего изобретения могут включать функционально эквивалентные варианты последовательностей, показанных на фиг. 1; например, одна или несколько аминокислот могут быть инсертированы, делегированы, заменены или добавлены при условии, что нужные их свойст-

ва будут сохранены. Так, например, может быть заменена CDR3-последовательность, либо могут быть сделаны одна или несколько замен в каркасных участках, либо каркас может быть заменен другим каркасным участком или его модифицированной формой, при условии, что член специфического связывания будет связываться с ED-B.

Один или несколько CDR из VL- или VH-домена антигенсвязывающего домена антитела, описанного в настоящей заявке, могут быть использованы для так называемой «CDR-прививки», где одна или несколько CDR-последовательностей первого антитела находится в каркасной области последовательностей, происходящих не от этого антитела, например, от другого антитела, описанного в EP-B-0239400. CDR-последовательности для CGS1 и CGS2 показаны на фиг. 1(a) и 1(b).

Член специфического связывания настоящего изобретения может быть таким, что он будет конкурировать с антителом или scFv, описанным в настоящей заявке, за связывание с ED-B фибронектина. Конкуренция между членами связывания может быть легко проанализирована *in vitro*, например, путем присоединения специфически репортерной молекулы к одному из членов связывания, который может быть обнаружен в присутствии другого немеченного члена (членов) связывания, что позволяет обеспечивать идентификацию членов специфического связывания, которые связываются с тем же самым эпитопом или с перекрывающимся эпитопом.

Член специфического связывания настоящего изобретения может быть использован в способе, предусматривающем индуцирование или создание благоприятных условий для связывания члена специфического связывания с его эпитопом. Связывание может происходить после введения члена специфического связывания млекопитающему или грызуну, такому как мышь.

Настоящее изобретение относится к использованию члена специфического связывания, описанного выше, в качестве реагента для диагностирования опухоли. Данные, полученные при помощи экспериментальной модели животного, описанные ниже, показали, что связывающиеся члены настоящего изобретения могут быть использованы для определения локализации опухоли *in vivo*.

Предпочтительными членами специфического связывания настоящего изобретения являются такие молекулы, которые связываются с опухолями человека, например, в криостатном срезе, которые обнаруживают инвазивный или ангиогенный фенотип; и такие молекулы, которые связываются с эмбриональными тканями, например, в криостатном срезе. Это связывание может быть продемонстрировано путем иммуноцитохимического окрашивания.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения член специфического связывания не связывается или, в основном, не связывается с тенасцином, белком внеклеточного матрикса.

В другом предпочтительном варианте настоящего изобретения член специфического связывания не связывается или, в основном, не связывается с нормальной кожей человека, например, в криостатном срезе и/или, как было продемонстрировано, при иммуноцитохимическом окрашивании.

Другие варианты членов специфического связывания настоящего изобретения не связываются или, в основном, не связываются с одной или несколькими нормальными тканями (например, в криостатном срезе и/или, как было продемонстрировано при иммуноцитохимическом окрашивании), выбранными из печени, селезенки, почек, желудка, тонкой кишки, толстой кишки, яичника, матки, мочевого пузыря, поджелудочной железы, надпочечников, скелетной мышцы, сердца, легких, щитовидной железы и головного мозга.

Член специфического связывания для ED-B может быть использован *in vivo* в качестве агента для доставки, который может быть, в частности, применен для выявления присутствия и локализации опухолей, экспрессирующих домен ED-B фибронектина или ассоциированных с ним. Он может быть использован в качестве визуализирующего агента. Настоящее изобретение относится к способу определения присутствия клетки или опухоли, экспрессирующей домен ED-B фибронектина или ассоциированной с ним, где указанный способ предусматривает контактирование клеток с членом специфического связывания для обеспечения и определения связывания этого члена специфического связывания с клетками. Такой способ может быть осуществлен *in vivo* или *in vitro* на испытуемом образце клеток, удаленных из организма.

Реактивность антител в клеточном образце может быть определена любыми подходящими методами. Одним из таких методов является мечение отдельными репортерными молекулами. Эти репортерные молекулы могут непосредственно или опосредованно генерировать обнаружимые, а предпочтительно измеряемые, сигналы. Присоединение этих репортерных молекул может быть прямым или опосредованным, ковалентным, например, посредством пептидной связи, или нековалентным. Присоединение посредством пептидной связи может быть осуществлено в результате рекомбинантной экспрессии гибридного гена, кодирующего антитело и репортерную молекулу.

Одним из предпочтительных методов является ковалентная связь каждого антитела с отдельным флуорохромным, фосфорным или лазерным красителем со спектрально опреде-

ленными абсорбционными или эмиссионными свойствами. Подходящими флуорохромовыми метками являются флуоресцеин, родамин, фикоэритрин и Техасский красный. Подходящими хромогенными красителями является диаминобензидин.

Другими репортерами являются макромолекулярные коллоидальные частицы или материал, состоящий из макрочастиц, такой как латексные сферы, которые могут быть окрашенными, магнитными или парамагнитными, и биологически или химически активные агенты, которые могут прямо или опосредованно продуцировать детектируемые сигналы при визуальном наблюдении, или которые могут быть обнаружены электронными приборами, или зарегистрированы какими-либо другими методами. Такими молекулами могут быть ферменты, катализирующие реакции, которые вызывают проявление или изменение окраски либо вызывают, например, изменение электрических свойств. Они могут быть возбудимыми на молекулярном уровне так, чтобы переходы электронов между энергетическими состояниями приводили к характеристическому спектральному поглощению или эмиссии. Они могут представлять собой химические молекулы, используемые в сочетании с биосенсорами. В качестве систем для детекции могут быть использованы биотин/авидин или биотин/стрептавидин и щелочная фосфатаза.

Способ определения связывания не имеет решающего значения для настоящего изобретения, и каждый специалист способен выбрать подходящий метод в соответствии со своим опытом и общими знаниями.

Сигналы, генерируемые отдельными конъюгатами "антитело-репортер" могут быть использованы для получения количественно абсолютных или относительных данных связывания релевантного антитела в клеточном образце (нормальном или тестируемом). Кроме того, для нумерации всей клеточной популяции в образце может быть использован общий нуклеарный краситель, такой как иодид пропидия, что позволит обеспечить количественное соотношение отдельных клеточных популяций по отношению ко всем клеткам. При присоединении радионуклеотида, такого как ^{125}I , ^{111}In или $^{99\text{m}}\text{Tc}$ к антителу, в случае, если это антитело локализуется, предпочтительно в опухоли, а не в нормальных клетках, присутствие радиоактивной метки в опухолевой ткани может быть обнаружено и количественно оценено с использованием гамма-камеры. Качество полученного изображения опухоли непосредственно коррелирует с отношением сигнал:шум.

Эти антитела могут быть использованы в качестве диагностических агентов для слежения за вновь васкуляризированными опухолями и, кроме того, они могут быть использованы, например, в модифицированной форме, для дос-

тавки цитотоксических агентов или для стимуляции коагуляции во вновь образованных кровеносных сосудах, что приводит к прекращению доступа кислорода и питательных веществ в развивающуюся опухоль, и тем самым представляет непрямую форму противоопухолевой терапии.

Настоящее изобретение также относится к использованию члена специфического связывания, описанного выше, в качестве терапевтического реагента, например, при его соединении, связывании или конструировании в виде гибридного белка для сообщения ему эффекторной функции. Член специфического связывания настоящего изобретения может быть использован для направленной доставки токсина, радиоактивной метки, Т-клеток, клеток-киллеров или других молекул к опухоли, экспрессирующей нужный антиген, или ассоциированной с этим антигеном.

В соответствии с этим в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения, предусматривающим введение рассматриваемого члена специфического связывания или фармацевтической композиции, содержащей такой член специфического связывания; и к использованию указанного члена специфического связывания для изготовления лекарственного средства, предназначенного для такого введения, например, в способе изготовления лекарственного средства или фармацевтической композиции, содержащей этот член специфического связывания в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

В соответствии с настоящим изобретением рассматриваемые композиции могут быть введены индивидуумам. Под таким введением подразумевается введение предпочтительно "терапевтически эффективного количества", т.е. количества, являющегося достаточным для достижения благоприятного воздействия на пациента. Таким благоприятным воздействием на пациента можно считать, по крайней мере, улучшение по крайней мере одного из симптомов заболевания. Практически, вводимое количество, скорость и схема введения будет зависеть от природы и тяжести заболевания, подвергаемого лечению. Назначение лечения, например, выбор доз и т.п. находится в компетенции лечащего врача и других специалистов-медиков. Подходящие дозы антитела хорошо известны специалистам; см., например, Ledermann et al., (1991); Bagshawe K.D. et al. (1991).

Композиция может быть введена отдельно или в сочетании с другими лекарственными средствами, вводимыми одновременно или последовательно, в зависимости от схемы лечения.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения и композиции для использования в соответствии с настоящим изобретением могут, помимо активного ингредиента, содержать фармацевтически приемлемый носитель,

наполнитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам. Эти материалы должны быть нетоксичными и не должны снижать эффективность активного ингредиента. Выбор конкретного носителя или другого материала зависит от способа введения, который может быть пероральным или парентеральным, например, путем внутривенной инъекции.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть изготовлены в виде таблетки, капсулы, порошка или жидкой формы. Таблетка может содержать твердый носитель, такой как желатин или адьювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, вазелиновое масло, животное или растительное масло, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть также включены физиологический раствор, декстроза или другие растворы сахара, либо гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

В случае внутривенной инъекции или инъекции в пораженную область, активный ингредиент может присутствовать в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апиrogenным и имеет соответствующие рН, изотоничность и стабильность. Каждый специалист может сам с успехом получить подходящие растворы с использованием, например, изотонических носителей, таких как готовая инъекция хлорида натрия, инъекция Рингера, лактатсодержащая инъекция Рингера. Если необходимо, то в композицию могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Член специфического связывания настоящего изобретения может быть получен путем экспрессии кодирующей его нуклеиновой кислоты. Нуклеиновая кислота, кодирующая любой член специфического связывания, рассматриваемый как таковой, является одним из аспектов настоящего изобретения, поскольку используется в способе продуцирования члена специфического связывания, предусматривающем его экспрессию кодирующей нуклеиновой кислотой. Эта экспрессия может быть достигнута путем культивирования рекомбинантных клеток-хозяев, содержащих указанную нуклеиновую кислоту, в соответствующих условиях.

Нуклеиновая кислота может кодировать любую аминокислотную последовательность антигенсвязывающих доменов антитела, описанных в настоящей заявке, или любую их функционально эквивалентную форму. Модификации могут быть сделаны на нуклеотидном уровне путем добавления, замены, делеции или инсерции одного или нескольких нуклеотидов, которые могут отражаться, а могут и не отражаться на аминокислотном уровне в зависимости от вырожденности генетического кода.

Системы для клонирования и экспрессии полипептида в ряде различных клеток-хозяев хорошо известны. Подходящими клетками-хозяевами являются бактерии, клетки млекопитающих, дрожжи и бакуловирусные системы. Клеточными линиями млекопитающих, подходящими для экспрессии гетерологичных полипептидов, являются клетки яичника хомячка, клетки HeLa, клетки почки детеныша хомячка, и многие другие. В основном, предпочтительным бактериальным хозяином является *E.coli*.

Экспрессия антител и фрагментов антител в прокариотических клетках, таких как *E.coli*, широко применяется специалистами. См., например, обзор Pluckthun, (1991). Экспрессия в эукариотических клетках в культуре также может быть использована специалистами как оптимальный способ продуцирования члена специфического связывания, см. обзоры, опубликованные за последнее время, например, Reff. (1993); Trill et al. (1995).

Могут быть выбраны или сконструированы подходящие векторы, содержащие соответствующие регуляторные последовательности, включая промоторные последовательности, терминаторные последовательности, сайты полиаденилирования, энхансерные последовательности, маркерные гены и, если необходимо, другие последовательности. Такими векторами могут быть плазмиды, вирусные плазмиды, например фаги или фагмиды. Более подробно см., например, Molecular Cloning. A laboratory manual: 2nd edition, Sambrook et al. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory. Многие известные методы и схемы манипуляции с аминокислотами, например, при получении нуклеиновокислотных конструкций, при мутагенезе, секвенировании, введении ДНК в клетки и экспрессии генов и при анализе белков более подробно описаны в Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992. Эти описания Sambrook et al. и Ausubel et al. вводятся в настоящую заявку посредством ссылки.

Таким образом, в другом своем аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, описанную выше. В еще одном своем аспекте настоящее изобретение относится к способу, предусматривающему введение такой нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Это введение может быть осуществлено с использованием любого подходящего метода. Для эукариотических клеток подходящими методами является трансфекция с использованием фосфата кальция или DEAE-декстрана, электропорация, трансфекция с использованием липосом и трансдукция с использованием ретровируса или другого вируса, например вируса коровьей оспы, или для клеток насекомых бакуловируса. Для бактериальных клеток подходящими методами могут служить трансформация с использованием хло-

рида кальция, электропорация и трансфекция с использованием бактериофага.

Это введение может сопровождаться индуцированием или обеспечиванием экспрессии нуклеиновой кислоты, например, путем культивирования клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии гена.

В одном из вариантов нуклеиновая кислота настоящего изобретения интегрируется в геном (например хромосому) клетки-хозяина. Эта интеграция может быть стимулирована путем включения последовательностей, которые стимулируют рекомбинацию с геномом в соответствии со стандартной техникой.

После продуцирования члена специфического связывания он может быть использован в любом из описанных здесь способов, таких как получение фармацевтического или диагностического продукта, такого как набор, который, помимо члена специфического связывания, содержит один или несколько реагентов для определения связывания этого члена с клетками, как уже обсуждалось выше.

Другие аспекты и варианты настоящего изобретения будут очевидны для каждого специалиста. Для более четкого понимания настоящего изобретения ниже представлены примеры, которые приводятся лишь в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение изобретения. В этих примерах приводятся ссылки на следующие чертежи.

На фиг. 1 показаны первичные аминокислотные последовательности VH и VL CGS-1 и CGS-2 scFv. На фиг. 1(a) показаны VH-последовательности; на фиг. 1(b) показаны VL-последовательности. CDR (1, 2 и 3) указаны. Наиболее гомологичным VH зародышевой линии для обоих scFv является сегмент DP47 семейства VH3; VL-сегментом обоих клонов является DPL16; для создания исходной библиотеки scFv использовали легкую цепь (Nissim et al., 1994). Остатки, которые отличают два клона друг от друга, подчеркнуты.

Фиг. 2: на фиг. 2A показана модель структуры домена субъединицы фибронектина (FN) человека. Показаны области варибельности III^{CS}, ED-A и ED-B, обусловленные альтернативным сплайсингом пре-мРНК FN. Кроме того, на этом чертеже показана внутренняя гомология, а также главные продукты термолитического гидролиза, содержащие ED-B (Zardi et al., 1987). На фиг. 2B проиллюстрирован электрофорез в 4-18% ПААГ с ДСН FN плазмы и FN WI38VA, а также их термолитические гидролизаты, окрашенные кумасси синим, и иммуноблоты, меченные BC-1, IST-6, CGS-1, и CGS-2. Показан негидролизированный FN плазмы (дорожка 1) и FN плазмы, гидролизированный с использованием термолитина при 1 мкг/мг FN (дорожка 3) и 10 мкг/мг FN (дорожка 4). Показан негидролизированный FN WI38VA (дорожка 2) и FN WI38VA, гидролизированный с использованием термолити-

на при 1 мкг/мг (дорожка 5), 5 мкг/мг (дорожка 6) и 10 мкг/мг (дорожка 7) FN. Номера на правой стороне указывают на главные продукты термолизинового гидролиза, показанные на фиг. 2А. Значения на левой стороне указывают на стандарты молекулярной массы в килодальтонах (кД).

Фиг. 3: на фиг. 3А показаны последовательности повтора типа III FN, содержащиеся в гибридном и рекомбинантном белках, экспрессированных в *E.coli*, а также реактивность этих белков с CGS-1 и CGS-2, и с mAb BC-1 и IST-6. На фиг. 3В показан гель, окрашенный кумасси синим и рядом иммуноблоты, зондированные CGS-1, CGS-2, BC-1 и IST-6. Нумерация дорожек соответствует нумерации пептидных конструкций в верхней части этого чертежа. Величины слева обозначают стандарты молекулярных масс в кДа.

Фиг. 4: инфракрасный формирователь изображения мыши; формирователь изображения мыши, используемый в эксперименте по определению направленной доставки, состоит из черного нефлуоресцентного бокса, снабженного вольфрамовой галогеновой лампой, фильтром возбуждения и эмиссионным фильтром, специфичных для инфракрасного флуорофора CY7, и 8-битовой монохромной CCD-камерой с компьютерным управлением.

Фиг. 5: иллюстрирует применение фрагментов флуоресцентно меченного антитела для направленной доставки к мышинной тератокарциноме F9 с использованием мономерного scFv(CGS-1) и димерного scFv(CGS-1)₂, направленного на B-FN. Димерный scFv(DI. 3)2, обладающий специфичностью связывания с лизоцимом, использовали в качестве негативного контроля.

Фиг. 6: иллюстрирует применение фрагментов флуоресцентно меченного антитела для направленной доставки к мышинной тератокарциноме F9 с использованием аффинно-зрелого scFv(CGS-2) и низкоаффинного scPv(28SI), направленного на тот же самый эпитоп B-FN. Направленная доставка обнаруживалась как в крупных опухолях (приблизительно 0,6 г), покрывшихся за 48 ч черными струпами, что частично скрывало изображение, так и в мелких опухолях (приблизительно 0,2 г).

Все документы, упомянутые в настоящей заявке, вводятся в ее описание посредством ссылки.

Список примеров

Пример 1. - Выделение человеческого scFv, специфичного к домену ED-B фибронектина человека (FN).

Пример 2. - "Созревание аффинности" человеческого scFv, специфичного к домену ED-B фибронектина человека (FN).

Пример 3. - Специфичность аффинно-зрелого scFv по отношению к ED-B-содержащим фибронектинам.

Пример 4. - Использование аффинно-зрелого scFv против ED-B в иммуноцитохимическом окрашивании срезов опухолей человека и мыши.

Пример 5. - Использование аффинно-зрелого scFv против ED-B для *in vivo*-терапии опухолей человека.

Пример 6. - Направленная иммунотерапия мышинной тератокарциномы F9, имплантированной "голым" мышам.

Пример 1. Выделение человеческого scFv, специфичного к домену ED-B фибронектина человека (FN).

Для отбора рекомбинантных антител использовали фаговую библиотеку scFv человека (Nissim et al., 1994). В качестве источника антигена для отбора использовали две различных формы изоформы ED-B, и в обоих случаях эта изоформа представляла собой рекомбинантный белок человека.

Рекомбинантные пептиды FN, содержащие повторы типа III 2-11 (B-) и 2-11 (B+), были экспрессированы в *Escherichia coli*.

Конструкцию создавали с использованием кДНК FN от клонов pFN154 (Kornblihtt et al., 1985), λ F10 и λ F2 (Carnemolla et al., 1989). кДНК-конструкции, охватывающие основания 2229-4787 (Kornblihtt et al., 1985), были встроены в вектор pQE-3/5 с использованием набора QIAexpress от Qiagen (Chatsworth, CA). Рекомбинанты 2-11 (B-) и (B+)FN-III были очищены с помощью иммуноаффинной хроматографии с использованием mAb 3E3 (Piersch-bacher et al., 1981), конъюгированного с сефарозой 4B (Pharmacia). ДНК-фрагменты для получения рекомбинантных FN-фрагментов, содержащих гомологичные повторы 7B89, 789, ED-B и FN-6 типа III, продуцировали путем амплификации посредством полимеразной цепной реакции (PCR) с использованием ДНК-полимеразы UltMa (Perkin Elmer) и с использованием кДНК от клонов 2-11 (B-) FN и 2-11 (B+) FN в качестве матрицы. Для клонирования PCR-продуктов в pQE-12 с использованием набора QIAexpress (Qiagen) были сконструированы праймеры. Затем эти продукты были трансформированы в *E.coli* и экспрессированы. Все кДНК-клоны секвенировали с использованием набора для секвенирования ДНК, содержащего секвеназу 2.0 (USB).

Рекомбинантные белки были очищены с помощью Ni-NTA-хроматографии (IMAC) в соответствии с инструкциями производителей и с использованием гексагистидиновой метки у карбокси-конца FN-фрагментов. Гибридный белок ED-B- β Gal получали путем клонирования ED-B-кДНК в бактериофаговый вектор λ gt11, в результате чего получали клон λ ED-B. Клон λ chFN60 (содержащий часть последовательности ED-B) был получен в виде гибридного белка

от клонированного pchFN60-FN курицы (Norton et al., 1987).

Для отбора фаговой библиотеки scFv человека, для каждого из двух различных рекомбинантных антигенов (7B89 и ED-B) было проведено три цикла пэннинга. Оба эти антигена наносили на иммунные пробирки (Nunc; Maxisorp, Roskilde, Denmark) на ночь при 50 мкг/мл в PBS (20 mM фосфатного буфера, 0,15M NaCl, pH 7,2). Первый антиген представлял собой рекомбинантный фрагмент фибронектина, 7B89, в котором домен ED-B был фланкирован смежными гомологичными повторами FN типа III; этот антиген наносили и выдерживали в течение ночи при 4°C. Второй используемый антиген представлял собой рекомбинантный ED-B (Zardi et al., 1987), имеющий на своем карбокси-конце гексагистиновую метку; этот белок не содержал лизиновых остатков, в результате чего концевая аминокислота первой аминокислоты была доступна для сайт-специфической ковалентной иммобилизации ED-B на реактивных ELISA-планшетах (Nunc; Covalink). Сенсибилизацию осуществляли в течение ночи при комнатной температуре.

После проведения трех циклов пэннинга, элюированным фагом инфицировали клетки HB2151 E.coli, и эти клетки засевали, как описано Nissim et al., 1994. После каждого цикла отбора 95 устойчивых к ампициллину моноклональных скринировали для идентификации антиген-специфичных scFv с помощью ELISA.

Клоны, которые давали самые сильные ELISA-сигналы на антигены, использованные для пэннинга, отбирали для последующего анализа и для "созревания аффинности". Эти клоны также давали специфическое окрашивание срезов мультиформы глиобластомы и опухолей молочной железы при иммуноцитохимическом окрашивании, которое более подробно описано в примере 4.

Пример 2. "Аффинность созревания" человеческого scFv, специфичного к домену ED-B человеческого FN.

Клоны 35GE (полученные в результате отбора с 7B89) и 28SI (полученные в результате отбора лишь с использованием домена ED-B) выбирали как антитела-кандидаты для "созревания аффинности". Затем для того чтобы разнообразить легкие цепи как средство усиления аффинности, мы применили простую стратегию "созревания аффинности", основанную на рандомизации центральных шести остатков (DSSGNH) CDR3 легкой цепи с использованием вырожденных олигонуклеотидов и PCR (фиг. 1), при условии, что возможное разнообразие последовательностей составляет $20^6 = 6,4 \times 10^7$. Эта область (вместе с CDR3 тяжелой цепи) расположена в центре антиген-связывающего сайта (Padlan, 1994). Во избежание возможного влияния на отбор электростатических эффектов, мы также ввели мутацию путем замены аргинино-

вого остатка, который непосредственно предшествует последовательности из этих шести остатков, на серию.

Плазмиду от одиночной бактериальной колонии, экспрессирующую "родительский" scFv-фрагмент, подвергали PCR-амплификации с использованием праймеров LMB3 (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') и 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') (94°C [1'] - 55°C [1'] - 72°C [1'30"], 25 циклов; см. Marks et al., 1991, для выбора буферов и условий). Полученный продукт подвергали гелевой очистке (для удаления следовых количеств плазмиды, содержащей исходный ген scFv) и использовали в качестве матрицы для второй стадии амплификации с использованием праймеров LMB3 и J1-Not-FOR (5' ATT GCT TTT CCT TTT TGC GGC CGC GCC TAG GAG GGT CAG CTT GGT CCC TCC GCC 3') (94°C [1'] - 55°C [1'] - 72°C [1'30"], 25 циклов). Неочищенный PCR-продукт, который был выявлен на агарозном геле в виде одиночной полосы нужной молекулярной массы, непосредственно очищали из PCR-смеси с использованием центрифуги Spin-Bind (FMC, Rockland, ME, USA), двойного гидролиза ферментами NcoI/NotI, и лигировали в гель-очищенную и NcoI/NotI-гидролизованную фагмиду pHEN1 (Hoogenboom et al., 1991), содержащую искусственную NcoI/NotI-вставку для облегчения отделения вектора, гидролизованного два раза, от вектора, гидролизованного один раз. Этот вектор был получен с использованием плазмидного набора Maxiprep Quiagen (Chatsworth, CA, U.S.A.). Приблизительно 5 мкг гидролизованной плазмиды и вставки использовали в смеси для лигирования, которую экстрагировали один раз фенолом, один раз смесью фенола/хлороформа/изоамилового спирта (25:25:1), а затем осаждали этанолом с использованием гликогена (Boehringer Mannheim, Germany) в качестве носителя и высокоскоростной вакуумной осушки. Осадок ресуспендировали в 20 мкл воды и вводили путем электропорации в электрокомпетентные клетки TG1 E.coli (Gibson, 1984). Обычно мы использовали электрокомпетентные клетки с титром 10^9 трансформантов/мкг в случае исходных глицериновых растворов или с титром 10^{10} трансформантов/мкг в том случае свежеприготовленных электрокомпетентных клеток. Описанная выше процедура давала обычно $>10^7$ клонов.

Затем библиотеку для созревания обрабатывали так же, как библиотеку Nissim (Nissim et al., 1994), для получения фаговых частиц, которые использовали для одного цикла отбора на иммуноблоты с использованием 7B89 (10 мкг/мл) в качестве антигена, с последующим проведением цикла кинетического отбора (Hawkins et al., 1992). Эту стадию отбора осуще-

ставляли путем инкубирования биотинилированных 7B89 (10 нМ) с суспензией фага (приблизительно 10^{12} токсических единиц) в 2% молоке-PBS (2% MPBS) в первом цикле отбора в течение 5 мин, а затем с добавлением небиотинилированных 7B89 (1 мкМ), и оставляли на 30 мин для прохождения конкурентного связывания. После этого к реакционной смеси добавляли 100 мкл покрытых стрептавидином микросфер (dynabead) (Dyna: M480), предварительно блокированных в 2% MPBS, и перемешивали в течение 2 мин, после чего захватывали магнитом и поочередно промывали 10 раз промывками (PBS +0,1% Tween-20) и PBS. Фаг элюировали с микросфер 0,5 мл 100 мМ триэтиламмина. Затем раствор нейтрализовали 0,25 мл 1М Триса, pH 7,4 и использовали для инфицирования экспоненциально растущих клеток HB2151 (Nissim et al., 1994). 95 устойчивых к ампициллину одиночных колоний использовали для получения scFv-содержащих супернатантов (Nissim et al., 1994), которые были скринированы с помощью ELISA, иммуногистохимического метода и анализа BIAcore в целях идентификации наилучших связывающих агентов. Эти колонии были затем субклонированы между SfiI/NotI-сайтами экспрессирующего вектора pDN268 (Neri et al., 1996), который содержал фосфорилируемую метку, эпитоп FLAG и гексаметидиновую метку в С-конце scFv.

Моноклонии соответствующих антител, субклонированных в pDN268, культивировали при 37°C в 2 x TY, содержащем 100 мг/л ампициллина и 0,1% глюкозы. Когда оптическая плотность клеточной культуры достигала $OP^{600} = 0,8$, добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ, после чего продолжали культивировать в течение 16-20 ч при 30°C. После центрифугирования (ротор GS-3 Sorval, 7000 об./мин, 30 мин), супернатант фильтровали, концентрировали и заменяли загрузочным буфером (50 мМ фосфат, pH 7,4, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола) с использованием прибора с тангенциальным потоком Minisette (Filtron). Полученный раствор загружали на 1 мл смолу Ni-NTA (Quiagen), промывали 50 мл загрузочного буфера и элюировали буфером для элюции (50 мМ фосфат, pH 7,4, 500 мМ NaCl, 100 мМ имидазол). Очищенные антитела анализировали с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН (Laemmli, 1970) и диализовали против PBS при 4°C. Очищенные scFv-препараты затем обрабатывали с помощью гель-фильтрации с использованием аппарата для жидкостной экспресс-хроматографии (ЖЭХ), снабженного колонкой S-75 (Pharmacia), поскольку хорошо известно, что мультивалентные scFv-фрагменты могут обнаруживать ложноположительное связывание в анализе BIAcore (Jonsson et al., 1991) благодаря эффектам avidности (Nissim et al., 1994; Crothers & Metzger, 1972). Концентрацию антитела ЖЭХ-очищенных мономерных фракций

определяли спектрофотометрически в предположении, что 1 мг/мл scFv-раствора имеет оптическую плотность при 280 нм, равную 1,4 ед.

Связывание моновалентного scFv при различных концентрациях в интервале 0,1-1 мкМ в PBS оценивали на приборе BIAcore (Pharmacia Biosensor) с использованием следующих антигенов: (i) 1000 резонансных единиц (РЕ), биотинилированного рекомбинантного фрагмента 7B89 FN, иммобилизованного на покрытом стрептавидином кристалле, который был специфически связан с 250 РЕ scFv; (ii) 200 РЕ рекомбинантного ED-B, химически иммобилизованного в N-концевой аминокислоте, которая была специфически связана с 600 РЕ scFv; (iii) 3500 РЕ ED-B-богатого фибронектина W138VA (см., пример 3), который был специфически связан со 150 РЕ scFv. Кинетический анализ данных осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. Исходя из качественного BIAcore-анализа антителосодержащих супернатантов, был отобран один аффинно-зрелый вариант каждого клона scFv: клон CGS-1, полученный в результате отбора с использованием фрагмента 7B89, и CGS-2, полученный в результате отбора с использованием рекомбинантного фрагмента ED-B фибронектина. Константы скорости ассоциации (k_{on}) и константы скорости диссоциации (k_{off}) показаны в табл. 1 вместе с вычисленными константами равновесной диссоциации (K_d) как фрагмента scFv, так и исходного клона 28SI. Хотя оба клона CGS-1 и CGS-2 имеют K_d в наномолекулярном диапазоне, однако, клон CGS-2, в отличие от своего родительского клона, обнаруживает наилучшие показатели, т.е. $K_d = 1$ нМ (что лучше, чем 110 нМ), по сравнению с всеми тремя белками, тестируемыми на сенсорном кристалле (табл. 1). Это улучшение обусловлено, главным образом, константой более медленной кинетической диссоциации ($\sim 10^{-4} \text{ с}^{-1}$), измеренной с использованием препаратов мономерного антитела (не показано).

Очевидно, что стратегия созревания является общей и дает улучшенную аффинность антител против связывающегося с мальтозой белка цитохрома C; внеклеточного домена мышинного эндоглина (D.N., L. Wyder, R. Klemenz); цитомегаловируса (A.P., G. Neri, R. Botti, P.N.); нуклеарного опухолевого маркерного белка HMGI-C (A.P., P. Soldani, V. Giancotti, P.N.); и маркерной плацентарной кишечной фосфатазы опухоли яичника (M. Deonarain & A. A. Epenetos). Поэтому, очевидно, что эта стратегия является, по крайней мере, такой же эффективной, как и другие стратегии созревания (Marks et al., 1992; Low et al., 1996), а выходы антител с аналогичными аффинностями являются такими же, как у антител, происходящих от очень больших фаговых библиотек антител (Graffiths et al., 1994; Vaughan et al., 1996).

Аффинно-зрелые клоны CGS-1 и CGS-2 секвенировали, и их первичные структуры сравнивали с базой данных генов V антитела зародышевой линии человека (V-BASE), а затем транслировали с использованием программного обеспечения MacVector. Ген VH обоих клонов был наиболее гомологичен DP47 (VH3) зародышевой линии человека, и кроме того, каждый клон имел различную последовательность CDR3 VH. Ген VL обоих клонов представлял собой DPL16 зародышевой линии, используемой при конструировании набора синтетических scFv человека, описанного у Nissim et al, 1994. Последовательности CDR3 VL отличаются друг от друга в 4 из 6 рандомизированных остатков (фиг. 1b).

Таблица 1

Антиген	ED-B		7B89		CGS-2		FN W138VA		
5cFv	CGS-1	5128	CGS-2	CGS-1	5128	CGS-2	CGS-1	5128	CGS-2
$k_{off} (s^{-1})^*$	7.0×10^{-3}	2.7×10^{-2}	1.5×10^{-4}	3.9×10^{-3}	3.0×10^{-2}	2.3×10^{-4}	5.0×10^{-3}	7.1×10^{-2}	6.5×10^{-4}
$k_{on} (M^{-1} \cdot s^{-1})^*$	1.3×10^5	2.5×10^5	1.3×10^5	1.1×10^5	2.9×10^5	1.1×10^5	4.1×10^5	1.2×10^6	2.9×10^5
$K_d (M)^*$	5.4×10^{-8}	1.1×10^{-7}	1.1×10^{-9}	3.5×10^{-8}	1.0×10^{-7}	2.1×10^{-9}	1.2×10^{-8}	5.9×10^{-8}	2.4×10^{-9}

Примечания к табл. 1.

Эксперименты были осуществлены как описано в главе "Материалы и методы".

Величины k_{off} и k_{on} определены с точностью до $\pm 30\%$, которая основана на точности определения концентрации и относится к небольшому расхождению результатов, полученных при использовании различных областей сенсограмм для проведения процедуры.

$$K_d = k_{off}/k_{on}.$$

Пример 3. Специфичность аффинно-зрелых scFv по отношению к ED-B-содержащим фибронектинам.

Иммунореактивность двух аффинно-зрелых scFv, CGS-1 и CGS-2 оценивали сначала с помощью ELISA и сравнивали непосредственно с mAb BC-1 (которые распознают изоформу B-FN) и с mAb IST-6, которые распознают только изоформы FN, не содержащие ED-B (Carnemolla et al., 1989; 1992). Характеризация этих mAb уже была проведена ранее (Carnemolla et al., 1989; 1992). Точный анализ на специфичность был затем осуществлен с использованием широкой панели фрагментов FN, полученных путем обработки термолизом, и рекомбинантных гибридных белков.

Антигены, использованные для ELISA и иммуноблоттинга, были получены следующим образом. FN очищали из плазмы человека и из кондиционированной среды клеточной линии W138VA13, как было описано ранее (Zardi et al., 1987). Очищенные FN гидролизуют термолизом (протеаза типа X; Sigma Chemical Co), как описано Carnemolla et al. (1989). Нативный 110 кДа-фрагмент (B-) FN и нативный 120 кДа-фрагмент (B+) FN (см. фиг. 2) очищали из FN-гидролизата, как описано ранее (Borsi et al.,

1991). Крупную изоформу тенасцина-С очищали, как описано Saginati et al. (1992). Рекомбинантные белки были экспрессированы и очищены, как описано в примере 1. Электрофорез в ПААГ с ДСН и Вестерн-блот-анализ проводили, как описано Carnemolla et al. (1989).

Все антигены, использованные в анализе ELISA, разводили в PBS до концентрации в пределах 50-100 мкг/мл и наносили на ночь на лунки иммунопланшета (Nunc, Roskilde, Denmark) при 4°C. Несвязанный антиген удаляли с использованием PBS, а затем планшеты блокировали с использованием PBS, содержащего 3% (мас./об.) альбумина бычьей сыворотки (BSA), в течение 2 ч при 37°C. После этого четыре раза промывали PBS, содержащим 0,05% Твин 20 (PBST). Затем антитела оставляли на 1,5 ч при 37°C для связывания; scFv предварительно инкубировали с антисывороткой, направленной против последовательности-метки: mAb M2 [Kodak, New Haven CT] для метки FLAG, или 9E10 [ATCC, Rockville, MD] для метки тус. Тестируемыми контрольными антителами были mAb BC-1 и IST-6. После четырех промывок PBST планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°C с 1:2000-разведенными (в PBST + 3%BSA) биотинилированными козьими антителами против мышиных IgG (Bio-SPA Division, Milan, Italy). Промывки повторяли и добавляли комплекс "стрептавидин-биотинилированная щелочная фосфатаза" (Bio-SPA Division, Milan, Italy) (разведенный в отношении 1:800 в PBST, содержащем 2мМ $MgCl_2$) в течение 1 ч при 37°C. Реакцию проявляли с использованием таблеток субстрата фосфатазы (Sigma) в 10% диэтанолаmine, pH 9,8 и регистрировали оптическую плотность при 405 нм. Полученные результаты приводятся ниже в табл 2.

Таблица 2

	CGS-1	CGS-2	BC-1	IST-6
FN плазмы	0,07	0,04	0,09	1,73
FN W138VA	1,16	0,72	1,20	1,12
n110 кДа(B-)	0,03	0,01	0,05	1,20
n 120кДа(B+)	0,82	0,81	1,20	0,02
рек. FN7B89	1,11	1,02	1,02	0,01
рек. FN789	0,01	0,01	0,05	1,25
рек. ED-B	1,21	1,32	0,15	0,04
рек. FN-6	0,01	0,01	0,08	0,03
Тенасцин	0,01	0,02	0,06	0,02

Иммунореактивность scFv и моноклональных антител с антигенами, происходящими от фибронектина, измеряли с помощью ELISA. Значения, представляющие ОП, измеряли при 405 нм после вычитания фонового сигнала. Данные представляют собой среднее из величин, полученных в четырех экспериментах, и показывают максимальное стандартное отклонение 10%.

Идентичность различных форм фибронектина, используемого в этом эксперименте, была следующей: FN плазмы = фибронектин плазмы человека; FN W138-VA = фибронектин от су-

пернатантов SV-40-трансформированных фибробластов (Zardi et al., 1987); n110кДа = домен 4 FN, обработанного термолизинном, без ED-B; n120кДа = домен 4 FN, обработанного термолизинном, содержащий ED-B; рек.FN7B89 = домен ED-B, фланкированный смежными гомологичными повторами FN типа III; рек. FN789 = гомологичные повторы FN типа III с доменом ED-B; рек. ED-B = один рекомбинантный ED-B; рек. FN6 = рекомбинантный домен 6 фибронектина.

Оба CGS-1 и CGS-2 распознавали рекомбинантный пептид ED-B, а также нативный или рекомбинантный фрагменты FN, содержащие последовательность ED-B, при этом они не связываются ни с одним из фрагментов FN, в котором отсутствует ED-B. Кроме того, CGS-1 и CGS-2 не реагировали с тенасцином (который содержит 15 гомологичных повторов типа III: Siri et al., 1991) и с фибронектином плазмы, который не содержит детектируемых уровней последовательности ED-B в продуктах термолизиннового гидролиза (Zardi et al., 1987). В противоположность этому, CGS-1 и CGS-2 сильно реагировали с FN, выделенным из SV40-трансформированной клеточной линии WI38VA13. Как показал термолизинновый гидролиз и эксперименты с использованием нуклеазы S1 и с использованием очищенного FN и полной РНК, полученной из этой клеточной линии (Zardi et al., 1987, Borsi et al., 1992), около 70-90% молекул фибронектина от этой клеточной линии содержат ED-B. Специфичность scFv по отношению к компоненту ED-B фибронектина была продемонстрирована, кроме того, с использованием растворимого рекомбинантного ED-B для ингибирования связывания CGS-1 и/или CGS-2 с FN на клетках WI38VA (данные не приводятся).

Данные подтверждают, что CGS-1 и CGS-2 специфически реагируют только с производными FN, которые содержат домен ED-B. Оба они обнаруживают ту же реактивность, что mAb BC-1, за исключением случая рекомбинантного ED-B, который не распознается BC-1. Интенсивность ELISA-сигналов, полученных для mAb-контроля, отражает высокую специфичность двух scFv в отношении ED-B-содержащих антигенов.

Кроме того, специфичность CGS-1 и CGS-2 исследовали на иммуноблотах с использованием FN от плазмы и клеток WI38VA и их термолизинновых гидролизатов. После термолизиннового гидролиза фибронектина от клеток WI38VA13 (большинство из которых содержит ED-B), образовывался 120 кДа-фрагмент (содержащий ED-B) и небольшой 110 кДа-фрагмент, в котором отсутствует ED-B (фиг. 2А; Zardi et al., 1987). Кроме того, гидролиз 120 кДа-домена приводил к образованию двух фрагментов: 85 кДа-фрагмента, который содержал почти всю последовательность ED-B у ее карбокси-

конца, и 35 кДа-последовательность (фиг. 2А; Zardi et al., 1987).

С левой стороны на фиг. 2В изображен куласси-окрашенный гель белковых фракций, проанализированных с помощью иммуноблоттинга. FN плазмы (дорожка 1) и термолизинновые гидролизаты белка (дорожка 3, содержащая 110 кДа-белок; и дорожка 4, содержащая гидролизированный 110 кДа-белок) не распознавались CGS-1 и CGS-2. В отличие от этого, ED-B-обогащенный FN от клеток WI38VA13 как интактный (дорожка 2), так и после нарастающего термолизиннового гидролиза (дорожки 5, 6 и 7), распознавались обоими фрагментами scFv. Наименьшим происходящим от FN фрагментом, который мог специфически распознаваться CGS-1, был 120 кДа-белок (охватывающий повторы 2-11 типа III), тогда как CGS-2 был способен распознавать 85 кДа-фрагмент, охватывающий повторы 2-7 в дополнение к N-концу ED-B (фиг. 2В; Zardi et al., 1987). Эти результаты показали, что указанные два scFv реагируют с различными эпитопами на ED-B-последовательности. Связывание CGS-2 с 85 кДа-доменом свидетельствует о том, что эпитоп для этого клона находится в аминоконце ED-B. В противоположность этому утрата связывания CGS-1 в случае гидролиза 120 кДа-домена с образованием 85 кДа свидетельствует о том, что он распознает эпитоп, локализованный ближе к карбокси-концу ED-B-молекулы.

Кроме того, точную специфичность CGS-1 и CGS-2 исследовали с помощью иммуноблоттинга с использованием рекомбинантных фрагментов FN и гибридных белков, содержащих и не содержащих последовательность ED-B. Гибридные белки FN были получены, как описано Carnemolla et al. (1989). Результаты этих экспериментов показаны на фиг. 3; связь схематической диаграммы со структурой доменов человеческого FN, см. Carnemolla et al. (1992). Полученные профили связывания, в основном, подтверждали профили, которые были получены ранее с помощью EISA и иммуноблотов на очищенном FN и протеолитически расщепленных продуктах: CGS-1 и CGS-2 сильно реагировали с ED-B-содержащими фрагментами FN (дорожки 2 и 4), но не обнаруживали реактивности с последовательностями FN, в которых отсутствовал ED-B (дорожки 1 и 3). CGS-1 не реагировал ни с человеческим (дорожка 5), ни с куриным (дорожка 6) ED-B-гибридным белком, тогда как CGS-2 сильно реагировал с обоими фрагментами (фиг. 3). Этот результат может отражать некоторые конформационные затруднения эпитопа в ED-B-содержащем FN, распознаваемом CGS-1; при этом, возможно, например, что этот эпитоп является восприимчивым к денатурации, или не является надлежащим образом представленным при фракционировании путем электрофореза в ПААГ с ДСН и переносе

на твердый носитель, такой как нитроцеллюлоза.

Эти результаты, взятые вместе, свидетельствуют о том, что CGS-1 и CGS-2 интенсивно и специфически связываются с ED-B-содержащим FN на участках, отличающихся друг от друга и отличающихся от структуры ED-B, которая распознается mAb BC-1.

Пример 4. Использование аффинно-зрелых scFv против ED-B в иммуноцитохимическом окрашивании человеческих и мышинных опухолей.

CGS-1 и CGS-2 были использованы для иммунолокализации ED-B-содержащих молекул FN в различных нормальных и опухолевых тканях человека. В качестве нормальной ткани выбирали кожу, поскольку известно, что изоформа B-FN экспрессируется в макрофагах и фибробластах в процессе заживления кожных ран (Carnemolla et al., 1989; Brown et al., 1993). Две отобранных человеческих опухоли предварительно анализировали на специфичность к окрашиванию с использованием mAb против фибронектина: множественная форма глиобластомы была подробно изучена, поскольку эндотелиальные клетки в сосудах этой опухоли находятся в состоянии высокого уровня пролиферации с прогрессирующими процессами ангиогенеза, включая экспрессию изоформ B-FN (Castellani et al., 1994). Кроме того, исследования, проведенные с использованием другой панели нормальных, гиперпластических и опухолевых тканей молочной железы человека, также свидетельствуют о наличии связи между ангиогенезом и экспрессией B-FN (Kaczmarek et al., 1994).

Для экспериментов, описанных выше, иммуногистохимическое окрашивание CGS-1 и CGS-2 сравнивали с окрашиванием mAb BC-1 (которое распознает изоформу B-FN) и других mAb, о которых известно, что они реагируют либо со всеми известными вариантами изоформы FN (IST-4), либо только с изоформами FN, у которых отсутствует ED-B (IST-6). Характеризация всех этих контрольных антител была описана ранее (Carnemolla et al., 1989; 1992).

Нормальные и опухолевые ткани были получены из образцов, взятых в процессе хирургической операции. Было уже установлено, что получение и фиксация тканей имеет решающее значение для точного и чувствительного способа обнаружения FN-содержащих молекул (Castellani et al., 1994). Для иммуногистохимии 5 мкм толстых криостатных срезов сушили воздухом и фиксировали в холодном ацетоне в течение 10 мин. Иммуноокрашивание осуществляли с использованием набора для окрашивания, содержащего комплекс "стрептавидин-биотинилированная щелочная фосфатаза" (Bio-SPA Division, Milan, Italy), а также нафтол-AS-MX-фосфата, и Fast Red TR (Sigma). Для контрастного окрашивания использовали гематоксилин Гилла, который затем помещали в глицерель

(Dako, Carpenteria, CA), как было ранее описано в работе Castellani et al., 1994. Кроме того, для анализа на специфичность в экспериментах, где было получено позитивное окрашивание тканей, специфичность для ED-B была продемонстрирована путем предварительного инкубирования антител с рекомбинантным доменом ED-B, а затем путем детекции, как было описано ранее.

Результаты этих экспериментов явно указывают на то, что CGS-1 и CGS-2 реагируют с теми же гистологическими структурами, что и mAb BC-1. Характер окрашивания, полученный на коже с использованием CGS-1, CGS-2 и BC-1, свидетельствует об отсутствии ED-B от FN, экспрессированного в дерме. При окрашивании инвазивных срезов карциномы протоков, CGS-1, CGS-2, и BC-1 обнаруживали ограниченное распределение окрашивания, которое ограничивалось границей между опухолевыми клетками и стромой. Это соответствует тому факту, что хотя весь FN однородно распределен по всей строме опухоли, однако, экспрессия B-FN ограничивается несколькими областями, и ранее, с использованием mAb BC-1, было успешно определено, что эти площади локализованы (в 95% случаев) в инвазивной карциноме протоков (Kaczmarek et al., 1994).

Были подтверждены предварительные результаты BC-1-окрашивания множественной формы глиобластомы. Castellani и др. (1994) наблюдали типичную картину окрашивания гломерулярноподобных сосудистых структур, и в наших экспериментах было показано, что CGS-1 и CGS-2 дают количественно идентичные результаты.

Однако имеется важное отличие между CGS-1 и CGS-2, и mAb BC-1, а именно, было продемонстрировано, что два человеческих scFv связываются с куриным B-FN и мышинным B-FN, тогда как BC-1 является строго специфическим для человека. CGS-2 реагирует с куриными эмбрионами (данные не указаны), а CGS-1 и CGS-2 реагируют с мышинными опухолями.

Было также показано CGS-1-окрашивание сосудистых структур на срезах мышинной тератоканциномы F9. В противоположность этому, все протестированные нормальные мышинные ткани (печень, селезенка, почки, желудок, тонкая кишка, толстая кишка, яичник, матка, мочевой пузырь, поджелудочная железа, надпочечники, скелетная мышца, сердце, легкое, щитовидная железа и головной мозг) обнаруживали негативную реакцию окрашивания с использованием CGS-1 и CGS-2 (данные не показаны). С использованием рекомбинантного домена ED-B для полного ингибирования окрашивания, было показано, что структуры, окрашенные в срезах тератоканциномы F9, являются специфическими к ED-B (данные не показаны).

Пример 5. Использование аффинно-зрелых scFvs против ED-B для *in vivo*-нацеливания на человеческие опухоли.

Клеточную линию меланомы человека SKMEL-28 использовали для развития имплантированных опухолей у "голых" мышей возрастом 6-10 недель (BALB-с или MF-1; Harlan UK) путем подкожного инъектирования 1×10^7 клеток/мышь в бок животного. Когда опухоли у мышей достигали диаметра приблизительно 1 см, то этим мышам инъектировали в хвостовую вену 100 мкл/мл раствор scFv₁-Cy7₁ в PBS.

Мечение рекомбинантных антител CY7 осуществляли путем добавления 100 мкг 1M бикарбоната натрия, pH 9,3 и 200 мкг CY7-бис-OSu (Amersham; кат. № PA17000; 2 мг/мл в ДМСО) к 1 мл раствора антитела в PBS (1 мг/мл). После выдерживания в течение 30 мин при комнатной температуре к смеси добавляли 100 мкл 1M Триса, pH 7,4 и меченное антитело отделяли от непрореагировавшего красителя с использованием одноразовых переносных колонок PD10 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), уравновешенных PBS. Элюированные зеленые фракции антитела концентрировали до приблизительно 1 мг/мл с использованием пробирок Centricon-10 (Amicon, Beverly, MA, USA). При этом достигаемая степень мечения составляла примерно одна молекула CY7 на одну молекулу антитела. Это было определено спектроскопически с использованием 1 см-кюветты в предположении, что 1 мг/мл-раствор антитела дает оптическую плотность 1,4 ед. при 280 нм, а коэффициент молярной экстинкции CY7 при 747 нм составляет 200000 ($M^{-1}cm^{-1}$), и в предположении, что абсорбцией CY7 при 280 нм можно пренебречь. Иммунореактивность образцов антитела после мечения подтверждали либо по сдвигу полосы (Neri et al., 1996b), либо путем аффинной хроматографии на колонке с антигеном, либо путем ВІАscore-анализа. Изображение мышей получали с использованием самонастраивающегося формирователя изображения для мышей в регулярные интервалы времени, под анестезией путем ингаляции смеси кислорода/фторэтана. Для каждого образца исследовали от двух до восьми животных в целях оценки воспроизводимости результатов. Эти процедуры осуществляли в соответствии с UK Project Licence "Tumour Targeting", изданного D.Neri (UK PPL 80/1056).

Инфракрасный формирователь изображения для мышей был сконструирован в виде модификации системы фотодетектора Folli et al. (1994), которая позволяет использовать флуорофор CY7, излучающий в инфракрасном диапазоне. Инфракрасное излучение было выбрано в целях достижения лучшей проницаемости тканей. Флуоресценция CY7 (>760 нм) невидима для человеческого глаза и требует использования CCD-камеры, управляемой компьютером. Формирователь изображения для мышей состоит из окрашенной в черный цвет светонепроницаемой камеры, снабженной вольфрамовой галогеновой лампой в 100 Вт и фильтром возбуж-

дения, специально сконструированным для CY7 (Chroma Corporation, Brattleboro, VT, USA; 673-748 нм). Полученный луч освещения является, с достаточным приближением, гомогенным на площади размером 5x10 см, на которой помещают мышь для получения ее изображения. Флуоресценцию детектировали с использованием 8-битовой монохроматической CCD-камеры Pulnix, снабженной С-собирающей линзой и 50 мм эмиссионным фильтром (Chroma Corporation, Brattleboro, VT, USA; 765-855 нм) и соединенной посредством интерфейса с системой ImageDOK (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Эта система состоит из компьютера, снабженного схемой воспроизведения стоп-кадра и программным обеспечением для фиксации и интеграции последовательных изображений. Три последовательных изображения, полученных через 50 мс каждое, обычно использовали в процессе усреднения; это число оставалось постоянным для серии изображения одного животного, что позволяло проводить прямое сравнение результатов нацеливания на опухоль в различные интервалы времени. Затем изображения в TIFF-формате были преобразованы в PICT-файлы с использованием программы Graphics Converter и усовершенствованы с использованием программы MacDraw Pro для компьютера Power Macintosh 7100/66.

Схематическая конструкция этого устройства в общих чертах изображена на фиг. 4.

Эти эксперименты продемонстрировали, что оба scFv были локализованы в опухоли при их визуализации на микроскопическом уровне.

Микроскопическая иллюстрация результатов нацеливания на вновь образованные сосуды развивающейся опухоли с использованием двух scFv против ED-B подробно описана ниже.

"Голым" мышам и/или мышам SCID, которым в один бок была имплантирована меланوما человека SKMEL-28 или мышьяная тератокарцинома F9, инъектировали либо немеченные scFv-фрагменты с меткой FLAG, либо биотинилированные scFv-фрагменты.

После введения инъекции мышей умерщвляли в различные периоды времени и получали срезы опухолевых и неопухолевых тканей, которые затем окрашивали в соответствии со стандартной схемой иммуногистохимии с использованием либо антитела M2 против FLAG (Kodak, 181), либо детектирующих реагентов на основе стрептавидина. Оптимальное направленное достижение мишени наблюдалось через 12 часов после инъекции. Было продемонстрировано, что оба CGS-1 и CGS-2 связываются с новообразованными сосудами как имплантированной человеческой опухоли, так и мышьяной тератокарциномы.

Пример 6. Нацеливание на имплантированную мышьяную тератокарциному F9 у "голых" мышей.

Нами были выращены твердые опухоли в боку у "голых" мышей путем подкожной инъекции 4×10^6 клеток мышинной тератокарциномы F9. У мышей эти опухоли росли очень быстро, и примерно через одну неделю после инъекции они достигали диаметра 1 см и высокой степени васкуляризации. Для того чтобы проиллюстрировать направленную доставку антител к опухоли, мы использовали модифицированную методику фотодетекции Folli et al., (1994), которая позволяет проводить кинетическую оценку направленного достижения опухоли-мишени и уровня выведения антитела на том же самом животном, изображенным в различные интервалы времени, как было подробно описано выше (см. фиг. 4).

Для направленного достижения опухоли-мишени и для облегчения детекции антител, к scFv(CGS-1), scFv(CGS-2) и scFv(D1.3) против лизоцима (McCafferty et al., 1990) была присоединена гомодимеризирующая метка (Pack et al., 1993) путем субклонирования антител в Sfil/NotI-сайты экспрессирующего вектора pGIN50. Этот вектор является производным pDN268 (Neri et al., 1996b), где His6-последовательность метки заменена последовательностью: CGC LTD TLQ AFT DQL EDE KSA LQT EIA HLL KEK EKL EFI LAA H, которая содержит цистеиновый остаток и амфипатическую спираль белка Fos для ковалентной гомодимеризации фрагментов антитела (Abate et al., 1990).

Полная ковалентная димеризация не была достигнута: из ковалентно связанных димеров состояло примерно 30-50% фрагментов антитела.

Фрагменты антитела очищали с помощью аффинной хроматографии на колонках, приготовленных путем связывания лизоцима куриного яйца (D1.3) или 7B89 (антитела против ED-B; Carnemolla et al., 1996) с CNBr-активированной сефарозой (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Супернатанты загружали на аффинные носители, которые затем промывали PBS, PBS+0,5M NaCl и элюировали 100 mM Et3N. После этого антитела диализовали против PBS.

Эти антитела метили, как описано выше, а затем, когда опухоли у мышей достигали диаметра приблизительно 1 см, в хвостовую вену этих мышей инъектировали 100 мкл раствора scFv₁-Cy7₁ в PBS.

Как показано на фиг. 5, scFv(CGS-1) был локализован на опухоли за период времени, составляющий до 3 дней, хотя он также быстро выводился из опухоли в течение этого периода времени. Однако наблюдалось также некоторое окрашивание бедра. Быстрота доставки CGS-1 к опухоли была резко увеличена путем введения амфипатической спирали, содержащей цистеиновый остаток у C-конца, что стимулировало димеризацию антитела (Pack et al., 1993). Действительно, за период от 24 до 72 ч, значитель-

ного снижения локализации димерного scFv(CGS-2)₂ не наблюдалось. В противоположность этому, негативный контроль (димерное антитело scFv(D1.3), антитело против лизоцима, обнаруживал быстрое выведение и не обнаруживал детектируемой локализации на опухоли или бедре.

Через 6 ч наблюдалась слабая направленная доставка scFv(28SI) к опухоли (не показано), а через 24 ч или позже, она вовсе не обнаруживалась (фиг. 6). "Созревание аффинности" приводило к гораздо лучшей доставке к мишени; например, scFv(CGS-2) эффективно осуществлял доставку как к небольшим, так и к крупным опухолям F9 независимо от того, являлся он мономером (фиг. 6) или димером (не показан). Было установлено, что через два дня процент инъектированной дозы антитела на один грамм опухоли составлял около 2 для мономера scFv(CGS-2) и 3-4 для димера scFv(CGS-2). Доза, доставляемая к опухоли фрагментом scFv(CGS-2), была также выше дозы для scFv(CGS-1) (фиг. 5 и 6) и коррелировала с их соответствующими аффинностями (табл. 1). Однако очевидно, что оба scFv(28SI) и scFv(CGS-2) подвержены протеолитическому расщеплению и обнаруживают высокую степень поглощения печенью (фиг. 6), тогда как антитела scFv(CGS-1) были значительно более стабильными и обнаруживали более низкое поглощение печенью (фиг. 5).

Список литературы

- Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992; Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition.
- 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).
- 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).
- Carnemolla et al. J. Biol. Chem. 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.

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).

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).

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).

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).

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.

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.

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).

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.

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).

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).

Winter G. and Milstein C. *Nature* 349, 293-299, 1991.

WO 94/13804 Yamada. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 761-799 (1983)

Zardi et al. *EMBO J.* 6, 2337-2342 (1987).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения специфического элемента связывания, представляющего собой антитело или фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где указанный антигенсвязывающий домен антитела выделен из синтетического молекулярного набора и специфичен по отношению к онкофетальному домену ED-B фибронектина (FN) и непосредственно связывается с ним, причем указанный способ включает

а) скрининг фаговой библиотеки фрагментов антитела, экспрессирующей фрагменты антитела человека рекомбинантным антигеном, происходящим из белка фибронектина;

б) инфицирование бактериальных клеток-хозяев позитивными клонами;

в) осуществление процесса аффинного созревания позитивных фаговых клонов;

г) повторение стадий а) и б) для отбора позитивных фаговых клонов с повышенной аффинностью к антигену;

д) инфицирование клеток-хозяев позитивными клонами и выделение молекул антитела из указанных клеток-хозяев.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что на стадии а) фаговые клоны подвергают скринингу рекомбинантными антигенами 7B89 или ED-B.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота позитивного клона используется в получении путем экспрессии в клетке-хозяине продукта в виде антитела или фрагмента антитела, кодируемого нуклеиновой кислотой, причем указанный продукт в виде антитела или фрагмента антитела содержит антигенсвязывающий домен антитела, специфичный по отношению к онкофетальному домену ED-B фибронектина (FN) и непосредственно связывающийся с ним.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что продукт-антитело находится в виде цельного антитела.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что продукт-фрагмент антитела находится в виде молекулы scFv.

6. Выделенный специфичный элемент связывания, представляющий собой антитело или фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий домен антитела, где указанный антигенсвязывающий домен антитела выделен из синтетического молекулярного набора и специфичен по отношению к онкофетальному домену ED-B фибронектина (FN) и непосредственно связывается с ним.

7. Специфичный элемент связывания по п.6, отличающийся тем, что указанный специфичный элемент связывания представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности, происходящей из зародышевой линии человека DP47 (кодон 1 Glu - кодон 98 Arg включительно на фиг. 1), и последовательность CDR3 Ser-Leu-Pro-Lys.

8. Специфичный элемент связывания по п.6, отличающийся тем, что указанный специфичный элемент связывания представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности, происходящей из зародышевой линии человека DP47 (кодон 1 Glu - кодон 98 Arg включительно на фиг. 1), и последовательность CDR3 Gly-Val-Gly-Ala-Phe-Arg-Pro-Tyr-Arg-Lys-His-Glu.

9. Специфичный элемент связывания по п.6, отличающийся тем, что представляет собой переменную область легкой цепи (VL) последовательности, происходящей из зародышевой

линии человека DPL16 (кодон 1 Glu - кодон 90 Ser включительно на фиг. 1), и остальную часть последовательности CDR3, а именно, Pro-Val-Val-Leu-Asn-Gly-Val-Val.

10. Специфичный элемент связывания по п.6, отличающийся тем, что представляет собой переменную область легкой цепи (VL) последовательности, происходящей из зародышевой линии человека DPL16 (кодон 1 Glu - кодон 90 Ser включительно на фиг. 1), и остальную часть последовательности CDR3, а именно, Pro-Phe-Glu-His-Asn-Leu-Val-Val.

11. Специфичный элемент связывания по п.6, отличающийся тем, что представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) последовательности, происходящей из зародышевой линии человека DP47 (кодон 1 Glu - кодон 98 Arg включительно на фиг. 1), и последовательность CDR3.

12. Специфичный элемент связывания по любому из пп.6-11, отличающийся тем, что при исследовании в виде очищенного мономера имеет константу диссоциации (K_d) для ED-B FN, составляющую 6×10^{-8} М или менее.

13. Специфичный элемент связывания по любому из пп.6-12, отличающийся тем, что указанный специфичный элемент связывания является фрагментом антитела.

14. Специфичный элемент связывания по любому из пп.6-11, отличающийся тем, что указанный элемент связывания содержит молекулу scFv.

15. Специфичный элемент связывания по п.14, отличающийся тем, что указанный элемент связывания содержит димерную молекулу scFv.

16. Специфичный элемент связывания по любому из пп.6-12, отличающийся тем, что указанный специфичный элемент связывания содержит цельное антитело.

17. Нуклеиновая кислота, кодирующая специфичный элемент связывания, охарактеризованный в любом из пп.6-16.

18. Фаг, содержащий нуклеиновую кислоту, охарактеризованную в п.17, и способный кодировать специфичный элемент связывания, охарактеризованный в любом из пп.6-15.

19. Клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная нуклеиновой кислотой, охарактеризованной в п.17.

Список последовательностей

(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 CTTTTTCGG CGCGGCCTAG 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 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 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
100 105

(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:

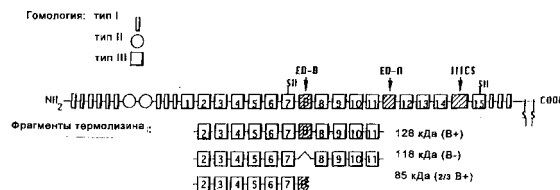
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30
Ser Trp Tyr Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Ser Ser Gly 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

CDR1 CDR2
CGS1 QVQVSEGGGLVQGGSLRLSCNAGFTFS SYMS WRPQAPGKLEWVS AISCSSGSGTYNDISVKG
CGS2 EVQVSEGGGLVQGGSLRLSCNAGFTFS SYMS WRPQAPGKLEWVS AISCSSGSGTYNDISVKG
CDR3
CGS1 RPTISRNSQNTLYLQNSLRADTVVYCAR SLEK WQQTILVIVER
CGS2 RPTISRNSQNTLYLQNSLRADTVVYCAR QGAFREYKLE WQQTILVIVER

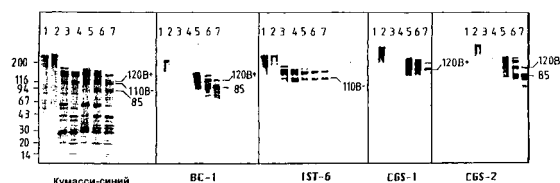
Фиг. 1(a)

CDR1 CDR2
CGS1 SSELTDQPAVSVALQTVRITC QQSLRSYVAS WYQKFGQAPVLVITY GKNRPS
CGS2 SSELTDQPAVSVALQTVRITC QQSLRSYVAS WYQKFGQAPVLVITY GKNRPS
CDR3
CGS1 GIPRFQSSSSQNASLITTRQAQAEADYVC NSSPVLNGLV FGGIKLIVLG
CGS2 GIPRFQSSSSQNASLITTRQAQAEADYVC NSSPFLNGLV FGGIKLIVLG

Фиг. 1(b)



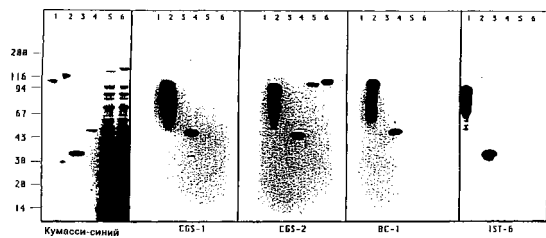
Фиг. 2A



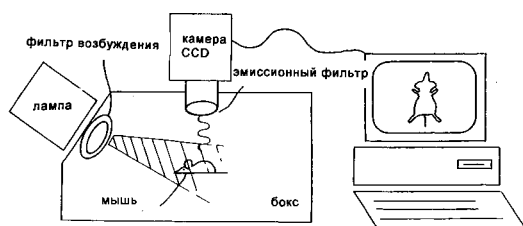
Фиг. 2B

	CGS-1	CGS-2	BC-1	IST-6
гес FN 2-11 (B-)	-	-	-	+
гес FN 2-11 (B+)	+	+	+	-
гес FN 7-9 (B-)	-	-	-	+
гес FN 7-9 (B+)	+	+	+	-
гибридный белок 1, ED-B	-	+	-	-
гибридный белок 2, chFN 60	-	+	-	-

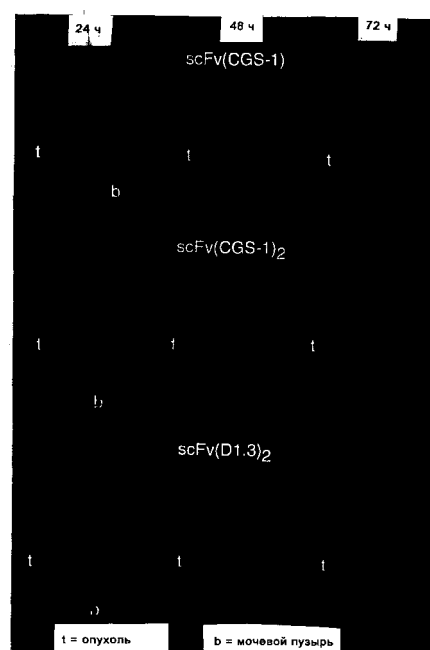
Фиг. 3А



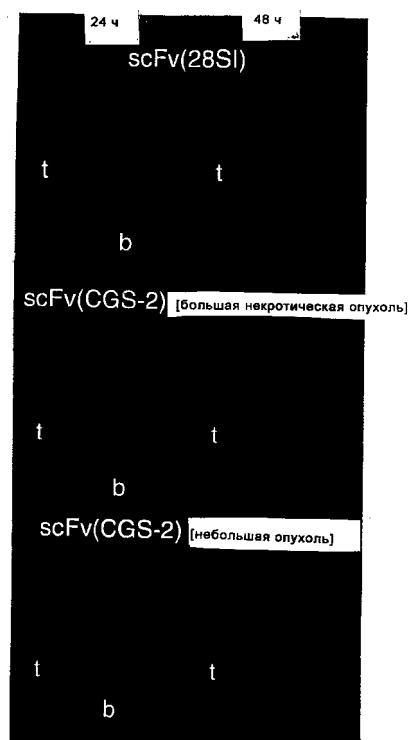
Фиг. 3В



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

