

Цей винахід має відношення до специфічних зв'язувальних агентів для ембріональної ізоформи фібрoneктину, ED-B, яка експресується також у новоутворюваній судинній сітці пухлин, що демонструється як результатами імунохімічних досліджень, так і спрямованою доставкою лікарського препарату до пухлин *in vivo*. Цей винахід має також відношення до матеріалів та способів, пов'язаних з такими специфічними зв'язувальними агентами.

Головною метою більшості існуючих форм терапії пухлин є забиття максимальної кількості складових клітин пухлини. Обмежений успіх, якого було досягнуто за допомогою хіміотерапії та променевої терапії, пов'язується з відносною відсутністю специфічності згаданих, способів лікування та їх схильністю до токсичного побічного впливу на нормальні тканини. Один з шляхів поліпшення пухлинної вибірковості терапії полягає у доставці лікарського засобу до пухлини за посередництвом зв'язувального білку, який, як правило, включає зв'язувальний домен антитіла зі специфічністю до маркерного антигену, який експресується на поверхні пухлини, але є відсутнім у нормальних клітин.

Прикладом цієї форми спрямованої терапії, яка позначається розпливчастим терміном "магічні кулі", були, головним чином, моноклональні антитіла (mAbs) гризунів, які є специфічними до так званих пухлиноспецифічних антигенів, експресованих на поверхні клітини. Подібні mAbs можуть хімічним шляхом кон'югуватись з цитотоксичною складовою (наприклад, токсином або лікарським засобом) або ж продукуватись, як рекомбінантний злитий білок, причому гени, які кодують згадане моноклональне антитіло та заданий токсин, зв'язуються до купи і експресуються послідовно.

Підхід "магічна куля" має обмежений, але суттєвий вплив під час лікування раку у людей, що знаходить найбільший прояв у спрямованій доставці лікарських препаратів до пухлин лімфоїдного походження, коли злоякісні клітини стають найдосажливішими для терапевтичної дози лікарського засобу, який вводять до кровообігу. Однак, лікування твердих пухлин залишається серйозною клінічною проблемою, оскільки впливу терапевтичних імунокон'югатів, які циркулюють у кровообізі, піддаються, головним чином, клітини, які знаходяться на зовнішній периферії згаданої пухлини; ці периферійні мішені утворюють так званий "бар'єр зв'язування сайту", який запобігає проникненню до внутрішньої частини пухлини [Джавід (Juwaid) та інші, 1992, *Cancer Res.* 52 5144-5153]. Тканина у межах згаданої пухлини, завдяки волокнистій стромі та компактній масі пухлинних клітин, є, як правило, занадто щільною для проникнення молекул у діапазоні розміру антитіл. Більше того, пухлини, як відомо, мають підвищений інтерстиціальний тиск завдяки відсутності лімфатичного дренажу, що також перешкоджає припливу екзогенних молекул. Див. свіжу оглядову статтю [Джен Р. (Jain R.) (1994), *Sci. Am.* 271 58-65], присвячену факторам, які впливають на включення терапевтичних засобів до пухлин.

Незважаючи на існування очевидних обмежень для лікування твердих пухлин шляхом спрямованої доставки пухлиноспецифічних антигенів, згадані пухлини все ж таки мають загальну рису, яка забезпечує альтернативну антигенну мішень для антитілотерапії. Після перевищення певного розміру, пухлини, без виключення, стають залежними від незалежного кровопостачання для адекватного забезпечення киснем та живильними речовинами для підтримки росту. У разі, якщо до цього кровопостачання можна буде втрутитись або його перекрити, це надасть реальну потенційну можливість приречення тисяч пухлинних клітин до голодування у процесі росту. Під час свого розвитку пухлина переключається на ангиогенний фенотип шляхом продукування різноманітних наборів ангиогенних факторів, які впливають на ендотеліальні клітини прилеглих капілярів з стимулюванням їх проліферації та міграції. Структура цих новоутворених кровоносних судин є вкрай неупорядкованою з численними сліпими закінченнями та норицями, наслідком чого є підвищене просочування, що явно контрастує з упорядкованою структурою капілярів у нормальній тканині. Індукування ангиогенезу супроводжується активацією експресії поверхневих антигенів певних клітин, багато з яких є спільними з судинною сіткою. Ідентифікування антигенів, які є специфічними для новоутвореної судинної сітки пухлин, є головним обмежувальним фактором для розвитку загальної терапії для твердих пухлин шляхом спрямованої доставки лікарських препаратів до судинної сітки. Згаданий антиген, який є предметом цього винаходу, має безпосереднє відношення до цієї проблеми.

Під час прогресування пухлини, позаклітинний матрикс довоколишньої тканини піддається реструктуризації через посередництво двох головних процесів: (1) протеолітична деградація складових позаклітинного матриксу нормальної тканини та (2) синтез *de novo* складових позаклітинного матриксу як пухлинними клітинами, так і клітинами, які мають відношення до стромі, активованих цитокінами, індукованими пухлиною. Два вищезгадані процеси, у сталому стані, призводять до утворення "пухлинного позаклітинного матриксу", який забезпечує більш придатне середовище для прогресування пухлини, а також якісно та кількісно відрізняється від позаклітинного матриксу нормальних тканин. Серед складових цього матриксу знаходяться великі ізоформи: тенасцин та фібрoneктин (FN); у описі цих білків, як ізоформ, визнається їх екстенсивна структурна гетерогенність, яка проявляється на транскрипційному, посттранскрипційному та посттрансляційному рівні (див. далі). Предметом цього винаходу є одна з ізоформ фібрoneктину, так звана ізоформа B+ (B-FN).

Фібрoneктини (FN) є мультифункціональними глікопротеїновими складовими великої молекулярної маси як позаклітинного матриксу, так і загальної води організму. Вони є залученими до багатьох різних біологічних процесів, наприклад, до утворення та підтримки нормальної клітинної морфології, міграції клітин, гемостазу та тромбозу, загоєння ран та пухлинного перетворення [див. оглядові статті Алітало (Alitalo) та інших, 1982; Ямада (Yamada), 1983; Гайне (Hynes), 1985; Рослаті (Ruoslahti) та інших, 1988; Гайне, 1990; Оуенс (Owens) та інші, 1986]. Структурна різноманітність фібрoneктинів обумовлена альтернативним сплайсингом трьох ділянок (ED-A, ED-B та IIICS) первинного фібрoneктинового транскрипту [Гайне, 1985; Зарді (Zardi) та інші, 1987] з утворенням, як мінімум, 20 різних ізоформ, причому експресування деяких з них відрізняється у пухлинній та нормальній тканині. Як відомо, одночасно з регулюванням, специфічним для тканин та шляху розвитку, характер сплайсингу mPNC передфібрoneктину у трансформованих клітин та злоякісних пухлин виявляється розрегульованим [Кастеллані (Castellani) та інші, 1986; Борсі (Borsi) та інші, 1987; Вартіо (Vartio) та інші, 1987; Зарді та інші, 1987; Барон (Barone) та інші, 1989; Карнемолла (Camemolla) та інші, 1989; Ояма (Oyama) та інші,

1989, 1990; Борсі та інші, 1992b). Фактично, ізоформи фібрoneктину, до складу яких входять послідовності ED-A, ED-B та IIICS, більшою мірою експресуються трансформованими клітинами та клітинами злоякісних пухлин, аніж нормальними клітинами. Зокрема, ізоформи фібрoneктину, до складу яких входить послідовність ED-B (ізоформа B+), експресуються на високому рівні ембріональними та пухлинними тканинами, а також під час загоєння ран, у той час як їх експресія нормальними тканинами дорослої особи є обмеженою [Нортон (Norton) та інші, 1987; Шварцбауер (Schwarzbauer) та інші, 1987; Гутман (Gutman) та Корнблітт (Kornblihtt), 1987; Карнемолла та інші, 1989; Френч-Констант (French-Constant) та інші, 1989; Френч-Констант та Гайне, 1989; Летінен (Laitinen) та інші, 1991]. Молекули B+FN не виявляються у зрілих судинах, однак є активованими у ангіогенних кровоносних судинах у нормальній тканині (наприклад, під час розвитку слизової оболонки матки), у тканині, у якій відбувається патологічний процес (наприклад, при діабетичній ретинопатії) та під час розвитку пухлини (Кастеллані та інші, 1994).

Послідовність ED-B є повним гомологічним повтором III типу, яка кодується окремим екзоном та де складу якої входить 91 амінокислота. У протилежність альтернативно сплайсованій ізоформі IIICS, яка включає зв'язувальний сайт, специфічний для клітинного типу, біологічна функція ізоформ A+ та B+ все ще становить предмет обговорень (Хамфріз (Humphries) та інші, 1986).

Присутність самої ізоформи B+ становить пухлиноіндукований антиген, однак, на додаток до цього, експресія ED-B експонує у повторі 7 типу III (який передусь ED-B) антиген, який, за нормальних умов, є криптантігеном; оскільки цей епітоп у молекулах фібрoneктину, позбавлених ED-B, не експонується, з цього витікає, що експресія ED-B індукує експресію неоантигенів як безпосередньо, так і опосередковано. Цей криптантігенний сайт утворює мішень для моноклонального антитіла (mAb), яке позначається, як BC-1 (Карнемолла та інші, 1992). Специфічність та біологічні властивості цього mAb було описано у EP 0344134 B1, і його можна одержати з гібридом, депозитованим у Європейській Колекції Культур Клітин Тварин, Портон Даун, Солсбері, Великобританія, під номером 88042101. Моноклональні антитіла було вдаю застосовано для визначення місцезнаходження ангіогенних кровоносних судин пухлин без перехресної реактивності зі зрілим судинним ендотелієм, що ілюструє потенціал ізоформ FN для терапії судин з застосуванням мішеневих лікарських конструкцій на основі моноклональних антитіл.

Існують, однак, деякі застереження щодо специфічності BC-1 mAb. Той факт, що BC-1 безпосередньо не розпізнає ізоформу B+, став підставою для питання про те, чи не може у деяких тканинах епітоп, розпізнаний BC-1, бути демаскованим за відсутності ED-B, і, таким чином, опосередковано викликати небажану перехресну реактивність BC-1. Більш того, BC-1 є строго специфічним для людської ізоформи B+. Це означає, що проведення досліджень на тваринах відносно біорозподілу та локалізації BC-1 у пухлині є неможливим. Незважаючи на те, що було одержано поліклональні антитіла до рекомбінантних злитих білків, до складу яких входить ізоформа B+ (Петерс (Peters) та інші, 1995), вони реагують тільки з FN, який було оброблено N-гліканазою з метою демаскування епітопу.

Додатковою загальною проблемою при застосуванні мишачих моноклональних антитіл є утворення людських антимишачих антитіл (HAMA) [Шрофф (Schroff) та інші, 1985; Деджагер (Dejager) та інші, 1988]. Наслідком утворення HAMA є цілий ряд ефектів, від нейтралізування введеного антитіла, що веде до зменшення терапевтичної дози, до алергічних реакцій, сироваткової хвороби та ниркової недостатності.

Незважаючи на те, що було ідентифіковано поліклональні антисироватки, які вступають до реакції з рекомбінантною ED-B (див. перед тим), виділення mAbs з тією ж самою специфічністю, що і у BC-1, було, як правило, завжди пов'язане з труднощами, оскільки людські та мишачі білки ED-B демонструють, фактично, 100% гомологію послідовності. Таким чином, людський білок може сприйматись мишею, як аутоантиген, внаслідок чого у неї не цей білок не виникає імунної реакції. Фактично, впродовж більше ніж десяти років інтенсивних досліджень у цій галузі, було ідентифіковано тільки одне моноклональне антитіло з опосередкованою реактивністю відносно ізоформи B-FN (BC-1) при повній відсутності прямого розпізнавання ED-B. Це майже безсумнівно свідчить про те, що специфічність BC-1 спрямована на криптичний епітоп, експонований внаслідок ED-B, а не на частину самої ED-B, яка може бути відсутня у мишачому фібрoneктіні і, внаслідок цього, не розглядатись, як "своє" імунною системою миші.

Цей винахід було здійснено завдяки застосуванню альтернативної стратегії, у порівнянні до попередньо застосованих, у якій виключено необхідність попередньої імунізації фібрoneктином або ED-B: антитіла зі специфічністю до ізоформи ED-B було одержано, як одноланцюговий фрагмент Fvs (scFvs) з бібліотек варіабельних ділянок людського антитіла, які відображаються на поверхні ниткоподібного бактеріофагу [Ніссім (Nissim) та інші, 1994; див. так ж WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172].

Авторами цього винаходу, за допомогою бібліотеки фагів антитіл, було встановлено, що специфічні scFvs можуть бути виділеними як прямим селекціонуванням на рекомбінантних фрагментах FN, до складу яких входить домен ED-B, так і на самих рекомбінантних ED-B, у разі, якщо згадані антигени нанесено на тверду поверхню ("пенінг"). Ці ж самі джерела антигену було успішно використано для продукування scFvs "другого покоління" з поліпшеними властивостями відносно батьківських клонів у процесі "визрівання афінності". Авторами було встановлено, що виділені scFvs сильно та специфічно реагували з ізоформою B+ людського фібрoneктину без попередньої обробки N-гліканазою.

У разі протипухлинного застосування, людські домени зв'язування комплексів антитіло-антиген, які надаються цим винаходом, мають перевагу, яка полягає у тому, що вони не піддаються впливу людських антимишачих антитіл. На додаток до цього, як вказувалось у прикладі, наведеному перед тим, вони є придатними для проведення імунохімічного аналізу пухлинної тканини як *in vitro*, так і *in vivo*. Ці та інші застосування додатково обговорюються у цьому описі і є очевидними для пересічних фахівців у цій галузі.

#### Термінологія

##### Специфічний зв'язувальний агент

Цей термін означає члена пари молекул, які мають взаємну зв'язувальну специфічність. Згадані члени специфічної зв'язувальної пари можуть бути одержані природним шляхом або синтезуватись повністю або частково. Один з членів згаданої пари молекул має на своїй поверхні ділянку або порожнину, яка специфічно

зв'язується з і є, таким чином, комплементарною, до певної просторової та полярної структури іншого члену згаданої пари молекул. Таким чином, члени згаданої пари мають властивість специфічного взаємного зв'язування. Прикладами типів специфічних зв'язувальних пар є антиген-антитіло, біотин-авідин, рецептор комплексу гормон-гормон, рецептор-ліганд, фермент-субстрат.

#### Антитіло

Цей термін означає природний імуноглобулін або імуноглобулін, частково або повністю одержаний синтетичним шляхом. Згаданий термін означає також будь-який поліпептид або білок, який має зв'язувальний домен, який є доменом зв'язування антитіла (або гомологічним до нього). Згадані поліпептиди або білки можуть бути одержаними з природних джерел або частково/повністю продукуватись синтетичним шляхом. Прикладами антитіл є ізотипи імуноглобуліну та їх субкласи; фрагменти, які мають домен зв'язування антитіла, наприклад, Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; та половинчасті антитіла.

Можна взяти моноклональні та інші антитіла і застосувати методи генної інженерії для одержання інших антитіл або химерних молекул, які зберігають специфічність вихідного антитіла. Такі методи можуть залучати введення ДНХ, яка кодує варіабельну ділянку імуноглобуліну, або гіперваріабельні ділянки (CDRs) антитіла до константних ділянок, або константні ділянки плюс основні ділянки різних імуноглобулінів. Див., [наприклад, EP-A-184187, GB 2188638A або EP-A-239400]. Гібридома або інша клітина, яка продукує антитіло, може бути об'єктом генетичної мутації або інших змін, які можуть або можуть не змінювати зв'язувальну специфічність продукованих антитіл.

Оскільки антитіла можуть бути модифіковані різними шляхами, термін "антитіло" повинен розглядатись як такий, що означає будь-який специфічний зв'язувальний член або речовину, яка має зв'язувальний домен з необхідною специфічністю. Таким чином, цей термін означає фрагменти антитіл, їх похідні, функціональні еквіваленти або гомологи антитіл, у тому числі, будь-який поліпептид, який включає домен зв'язування імуноглобуліну (як природного, так і повністю/частково одержаного синтетичним шляхом). Сюди входять також химерні молекули, які включають домен зв'язування імуноглобуліну або його еквівалент, злиті з іншим поліпептидом. Клонування та експресію химерних антитіл описано [у EP-A-0120694 та EP-A-0125023].

Було показано, що фрагменти цілого антитіла можуть виконувати функцію зв'язувальних антитіл. Прикладами зв'язувальних фрагментів є (i) фрагмент Fab, який складається з доменів VL, VH, CL та CH1; (ii) фрагмент Fd, який складається з доменів VH та CH1; (iii) фрагмент Fv, який складається з доменів VL та VH окремого антитіла; (iv) фрагмент dAb [Йорд (Ward) та інші, 1989], який складається з домену VH; (v) ізольовані гіперваріабельні ділянки; (vi) фрагменти F(ab')<sub>2</sub>, двовалентний фрагмент, який складається з двох пов'язаних фрагментів Fab; (vii) одноланцюгові молекули Fv (scFv), де домен VH та домен VL зв'язані пептидним лінкером, який надає двом доменам можливість об'єднання з утворенням сайту зв'язування антигену [Бірд (Bird) та інші, 1988; Гастон (Huston) та інші, 1988]; (viii) біспецифічні одноланцюгові димери Fv (PCT/US92/09965) та (ix) "половинчасті антитіла", мультівалентні або мультиспецифічні фрагменти, які було сконструйовано шляхом злиття генів [WO94/13804: Голлігер (Holliger) та інші, 1993].

Половинчасті антитіла є мультимерами поліпептидів, причому кожний поліпептид включає перший домен, який складається зі зв'язувальної ділянки легкого ланцюгу імуноглобуліну, та другий домен, який складається зі зв'язувальної ділянки важкого ланцюгу імуноглобуліну; обидва згадані домени є зв'язаними (наприклад, пептидним лінкером), однак, нездатними до взаємоб'єднання з утворенням сайту зв'язування антигену: сайти зв'язування антигену утворюються шляхом об'єднання першого домену одного поліпептиду у межах згаданого мультимеру з другим доменом іншого поліпептиду у межах згаданого мультимеру [WO94/13804].

У разі необхідності застосування біспецифічних антитіл, ними можуть бути традиційні біспецифічні антитіла, які можна одержувати різноманітними шляхами [Голлігер та Вінтер (Winter), 1993], наприклад, хімічним або з гібридних гібридом, або це можуть бути будь-які фрагменти згаданих перед тим біспецифічних антитіл. Перевага може надаватись використанню scFv димерів або половинчастих антитіл, на противагу використанню повних (двовалентних) антитіл. Половинчасті антитіла та scFv можуть конструюватись без Fc ділянки, з використанням тільки варіабельних доменів, що потенційно зменшує ефекти антиідіотипової взаємодії. До інших форм біспецифічних антитіл належать одноланцюгові "Janusins", опис яких наведено [Траунекера (Trautnesker) та інших, (1991)].

Біспецифічні половинчасті антитіла, у протилежність біспецифічним повним антитілам, можуть також бути особливо придатними, оскільки вони легко конструюються та експресуються *E. coli*. Половинчасті антитіла (та багато інших поліпептидів, наприклад, фрагменти антитіл) з відповідними зв'язувальними властивостями, можуть легко відбиратись за допомогою фагового відображення [WO94/13804] з бібліотек. Якщо одне плече половинчастого антитіла повинно підтримуватись постійним, наприклад, зі специфічністю, спрямованою проти антигену X, у такому разі можна зробити бібліотеку, де інше плече є змінним, та підібрати антитіло відповідної специфічності.

#### Домен зв'язування антигену

Цей термін описує частину антитіла, до складу якого входить ділянка, яка специфічно зв'язується з та є комплементарною до частини або усього антигену. У разі, якщо антиген є великим, антитіло може зв'язуватись тільки з певною частиною згаданого антигену, яка носить назву епітопу. Домен зв'язування антигену може забезпечуватись однією або декількома варіабельними доменами антитіла. У переважному варіанті, до складу домену зв'язування антигену входить варіабельна ділянка легкого ланцюгу антитіла (VL) та варіабельна ділянка важкого ланцюгу антитіла (VH).

#### Специфічний

Цей термін означає ситуацію, коли у одного з членів специфічної зв'язувальної пари відсутнє будь-яке суттєве зв'язування з іншими молекулами, окрім тієї, яка є його специфічним зв'язувальним партнером. Цей термін застосовують також у тому разі, коли, наприклад, домен зв'язування антигену, є специфічним для певного епітопу, який переноситься численними антигенами. У цьому випадку, специфічний зв'язувальний агент, який несе домен зв'язування антигену, буде здатним до зв'язування з різними антигенами, які переносять згаданий епітоп.

Функціонально еквівалентна варіантна форма

Цей вираз означає молекулу (варіант), яка, незважаючи на структурну відмінність від іншої молекули (батьківської), зберігає деяку суттєву гомологію, а також, як мінімум, деякі біологічні функції батьківської молекули, наприклад, здатність до зв'язування з певним антигеном або епітопом. Варіанти можуть бути у формі фрагментів, похідних або мутантів. Варіант, похідна або мутант можуть бути одержані шляхом модифікування батьківської молекули додаванням, видаленням, заміщенням або введенням однієї або декількох амінокислот, або зв'язуванням іншої молекули. Ці зміни можуть здійснюватись на нуклеотидному або білковому рівні. Наприклад, закодованим поліпептидом може бути фрагмент Fab, який після цього зв'язується з хвостом Fc з іншого джерела. У альтернативному варіанті, може бути зв'язаним маркер, наприклад, фермент, флуоресцеїн і т.ін.

За цим винаходом, надається специфічний зв'язувальний агент, який є специфічним для онкоембріонального домену ED-B фібрoneктину (FN).

Специфічні зв'язувальні агенти, за цим винаходом, безпосередньо зв'язуються з доменом ED-B. За одним варіантом втілення, специфічний зв'язувальний агент зв'язується, після обробки FN протеазою термолізином, з будь-яким або усіма фібрoneктинами, до складу яких входить ED-B. За додатковим варіантом втілення, специфічний зв'язувальний агент зв'язується з будь-яким або усіма фібрoneктинами, до складу яких входять гомологічні повтори типу III, які включають домен ED-B. Відомі фібрoneктини ідентифіковано [у двох роботах Карнемолла (Carnemolla) та інших, 1989; 1992]. Посилання на "усі фібрoneктини, до складу яких входить ED-B" може розглядатись, як посилання на усі фібрoneктини, ідентифіковані у згаданих роботах, як такі, що включають ED-B.

Специфічний зв'язувальний агент, у переважному варіанті, зв'язує людський ED-B, та, у переважному варіанті, B+FN, як мінімум, одного іншого виду, наприклад, миші, пацюка та/або курчати. У переважному варіанті, згаданий член специфічної зв'язувальної пари є здатним до зв'язування як ED-B людського фібрoneктину, так і ED-B нелюдського фібрoneктину, наприклад, миші, що надає можливість випробування та аналізу члену специфічної зв'язувальної пари на тваринній моделі.

Члени специфічної зв'язувальної пари, за цим винаходом, зв'язують ED-B фібрoneктину без конкурування з загальнодоступним депозитованим антитілом BC-1, яке обговорюється у цьому описі. BC-1 є строго специфічним для людської ізоформи B+. Члени специфічної зв'язувальної пари, за цим винаходом, не зв'язують той же самий епітоп, що і BC-1.

Зв'язування специфічним зв'язувальним агентом, за цим винаходом, B+FN може пригнічуватись доменом ED-B.

За одним з аспектів цього винаходу, зв'язувальний домен, відносно ED-B FN, має постійну дисоціації ( $K_d$ )  $6 \times 10^{-8}$  М або менше, у разі визначення у формі чистого мономеру.

За одним з аспектів цього винаходу, зв'язувальний домен реагує з, тобто є здатним до зв'язування з ED-B фібрoneктину без попередньої обробки згаданого ED-B фібрoneктину N-гліканазою.

Члени специфічної зв'язувальної пари, за цим винаходом, можуть надаватись у вигляді ізолятів або у очищеній формі, тобто, у вигляді препарату або лікарської форми, вільних від інших членів специфічної зв'язувальної пари, наприклад, антитіл або фрагментів антитіл, або вільних від інших членів специфічної зв'язувальної пари, здатних до зв'язування ED-B фібрoneктину. У переважному варіанті, специфічні зв'язувальні агенти, за цим винаходом, надаються у, по суті, чистій формі. Вони можуть бути "моноклональними" у тоні значенні, що походять з одного клону, у протидію обмеженню антитілами, одержаними за допомогою традиційної гібридомної технології. Як обговорювалось перед тим, члени специфічної зв'язувальної пари, за цим винаходом, можуть одержуватись за допомогою технології відображення бактеріофагу та/або експресії у рекомбінантних, наприклад, бактеріальних клітинах-хазях. Попереднього розкриття моноклонального члену специфічної зв'язувальної пари, який безпосередньо зв'язує ED-B фібрoneктину, не існує.

У переважному варіанті, до складу специфічного зв'язувального елемента входить антитіло. Специфічний зв'язувальний елемент може включати поліпептидну послідовність у формі фрагменту антитіла, наприклад, однокланцюгового Fv (scFv). Можуть бути використані фрагменти антитіл інших типів, наприклад, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, Facb або половинчасте антитіло [Вінтер та Мілстайн (Milstein), 1991; WO94/13804]. Специфічний зв'язувальний агент може бути у формі повного антитіла. Згадане повне антитіло може бути у будь-якій з форм ізотипів антитіл, наприклад, IgG, IgA, IgD, IgE та IgM, та у будь-якій з форм субкласів ізотипу, наприклад, IgG1 або IgG4.

Згадане антитіло може мати будь-яке походження, наприклад, людське, мишаче, овече або кроляче. Фахівцям у цій галузі є очевидними інші похідні. У переважному варіанті, згадане антитіло має людське походження. Термін "людське" означає антитіло, яке частково або повністю одержано з людської кДНК, білкової або пептидної бібліотеки. Цей термін включає гуманізовані пептиди або білки нелюдського походження, які було піддано модифікуванню з метою надання людських характеристик молекулі антитіла і, таким чином, надання згаданій молекулі можливості проходження захисних рівнів імунної системи людини.

Специфічний зв'язувальний агент може одержуватись також методами генної інженерії і бути, наприклад, біспецифічною молекулою антитіла (або фрагментом, наприклад, F(ab')<sub>2</sub>), яка має одне плече зв'язування антигену (тобто, специфічний домен) проти ED-B фібрoneктину, як розкривається у описі, та інше плече проти іншої специфічності або двовалентної/мультивалентної молекули.

На додаток до послідовностей антитіла, до складу специфічного зв'язувального агента можуть входити інші амінокислоти, наприклад, ті, які утворюють пептид або поліпептид, або згадана молекула може наділятися іншими функціональними характеристиками на додаток до здатності зв'язування антигену. Наприклад, згаданий специфічний зв'язувальний агент може включати мітку, фермент або його фрагмент і т.ін.

Згаданий зв'язувальний домен може включати частину або весь VH домен, який кодується сегментом ембріонального типу або сегментом реаранжованого гену. Зв'язувальний домен може включати частину або

весь VL каппа домен або VL лямбда домен.

Згаданий зв'язувальний домен може включати послідовність VH1, VH3 або VH4 ембріонального гену або її реаранжовану форму.

Специфічний зв'язувальний агент, за цим винаходом, може включати варіабельну ділянку важкого ланцюгу ("VH" домен), яка є похідною людського сегменту ембріонального типу DP47, послідовність якого представлено на Фіг.1(a), залишки 1-98. Опис номенклатури "DP" наведено [у Томлінсона (Tomlinson) та інших, (1992)]. Згадана амінокислотна послідовність CDR3 може мати наведений далі вигляд: Ser Leu Pro Lys. Згаданою амінокислотою послідовністю CDR3 може бути Gly Val Gly Ala Phe Arg Pro Tyr Arg Lys His Glu. Таким чином, згаданий зв'язувальний домен специфічного зв'язувального агента, за цим винаходом, може включати VH домен, до складу якого входять амінокислотні послідовності, представлені на Фіг.1(a) для CGS1 та CGS2.

Згаданий зв'язувальний домен може включати варіабельну ділянку легкого ланцюгу ("VL" домен), яка є похідною людського сегменту ембріонального типу DPL16, послідовність якого представлено на Фіг.1(b), як кодони 1-90.

Згаданий домен VL може включати послідовність CDR3 Asn Ser Ser Pro Val Val Leu Asn Gly Val Val. Згаданий домен VL може включати послідовність CDR3 Asn Ser Ser Pro Phe Glu His Asn Leu Val Val.

Специфічні зв'язувальні агенти за цим винаходом можуть включати функціонально еквівалентні варіанти послідовностей, наведених на Фіг.1, наприклад, одну або декілька амінокислот було введено, видалено, замінено або додано, за умови збереження властивості, яку наведено у цьому описі. Наприклад, послідовність CDR3 може бути змінена або основні ділянки можуть бути піддані одній або декільком змінам, або згадана основна ділянка може бути замінена іншою основною ділянкою або модифікованою формою, за умови, що специфічний зв'язувальний агент зв'язує ED-B.

Одна або декілька гіперваріабельних ділянок з домену VL або VH домену зв'язування антигену можуть бути використані у так званому "CDR-трансплантуванні", у якому одна або декілька CDR послідовностей першого антитіла вміщені до основної ділянки послідовностей не цього антитіла, наприклад, іншого антитіла, як розкривається [у EP-B-0239400]. CDR послідовності для CGS1 та CGS2 наведено на Фіг.1(a) та 1(b).

Специфічним зв'язувальним агентом, за цим винаходом, може бути такий агент, який конкурує з антитілом або scFv, опис яких наведено, за зв'язування з ED-B фібрoneктину. Конкурування між зв'язувальними агентами може бути легко проаналізоване *in vitro*, наприклад, міченням одного зв'язувального агента специфічною репортерною групою, яка може легко виявлятися у присутності іншого неміченого зв'язувального агента (-iv), з наданням можливості ідентифікування специфічних зв'язувальних агентів, які зв'язують той же самий епітоп або епітоп, який перекривається.

Специфічний зв'язувальний агент за цим винаходом може бути застосованим у способі, який включає спричинення або забезпечення зв'язування специфічного зв'язувального агента з його епітопом. Зв'язування може здійснюватися після введення ссавцю, наприклад, людині або гризуну, наприклад, миші, специфічного зв'язувального агента.

Цим винаходом передбачається застосування специфічного зв'язувального агента, згаданого перед тим, як діагностичного реактиву для пухлин. Експериментальні дані, одержані на тваринній моделі, опис якої наводиться далі, показують, що зв'язувальні агенти, за цим винаходом, є придатними для локалізування пухлин *in vivo*.

До переважних специфічних зв'язувальних агентів за цим винаходом належать агенти, які зв'язуються з пухлинами людини, наприклад, у кріостатних зрізах, які демонструють інвазивний або ангіогенний фенотип, а також ті, які зв'язуються з ембріональними тканинами, наприклад, у кріостатних зрізах. Зв'язування може бути продемонстроване імуноцитохімічним забарвлюванням.

У переважному варіанті втілення, згаданий специфічний зв'язувальний агент не зв'язує або суттєво не зв'язує тенасцин, білок позаклітинного матриксу.

За іншим переважним варіантом втілення, згаданий специфічний зв'язувальний агент не зв'язує або суттєво не зв'язує нормальну людську шкіру, наприклад, у кріостатному зрізі та/або як демонструється за допомогою імуноцитохімічного забарвлювання.

У додаткових варіантах втілення згадані специфічні зв'язувальні агенти, за цим винаходом, не зв'язуються або суттєво не зв'язуються з однією або декількома нормальними тканинами (наприклад, у кріостатному зрізі та/або як демонструється за допомогою імуноцитохімічного забарвлювання), відібраними, з печінки, селезінки, нирок, шлунку, тонкої кишки, товстої кишки, яєчника, матки, сечового міхура, підшлункової залози, надниркових залоз, скелетних м'язів, серця, легень, щитовидної залози та головного мозку.

Специфічний зв'язувальний агент для ED-B може використовуватись, як агент для спрямованої доставки лікарського препарату *in vivo*, який може бути застосованим для специфічного демонстрування присутності та місцезнаходження пухлин, які експресують або є пов'язаними з ED-B фібрoneктину. Він може застосовуватись, як імуносцинтиграфічний агент. Цей винахід надає спосіб визначення присутності клітини або пухлини, яка експресує або є пов'язаною з експресією ED-B фібрoneктину, причому згаданий спосіб включає контактування клітин зі специфічним зв'язувальним агентом у тому вигляді, у якому його надано, та визначення зв'язування згаданого специфічного зв'язувального агента зі згаданими клітинами. Згаданий спосіб може здійснюватись *in vivo* або *in vitro* на експериментальному зразку кліщі, видалених зі згаданого тіла.

Реактивність антитіл відносно зразку клітин може визначатись будь-якими прийнятними засобами. Однією з можливостей є мічення окремими репортерними молекулами. Згадані репортерні молекули можуть безпосередньо або опосередковано генерувати сигнали, які піддаються виявленню та, і у переважному варіанті, вимірюванню. Зв'язування репортерних молекул може бути безпосереднім або опосередкованим, ковалентним, наприклад, через пептидний зв'язок, або нековалентним. Зв'язування через пептидний зв'язок може бути результатом рекомбінантного експресування злиття генів, які кодують молекулу антитіла та репортерну молекулу.

Одним з переважних способів є ковалентне зв'язування кожного антитіла з окремим флюорохромним,

фосфорним або лазерним барвником, який посідає спектрально ізольовані характеристики поглинання або емісії. До придатних флюорохромних барвників належать флуоресцеїн, родамін, фікоеритрин та Техасський Червоний. До придатних хромогенних барвників належить діамінобензидин.

Інші репортерні групи включають макромолекулярні колоїдні частинки або матеріал у вигляді твердих частинок, наприклад, латексні кульки, які можуть забарвлюватись, є магнітними або парамагнітними та біологічно або хімічно активними агентами, які можуть безпосередньо або опосередковано викликали сигнали, які піддаються виявленню, наприклад, спостерігаються візуально, та реєструються за допомогою електронних приладів або іншим чином. Ці молекули можуть бути ферментами, які каталізують реакції, сприяють розвитку або зміні забарвлення та викликають зміни, наприклад, електричних характеристик. Вони можуть збуджуватись на молекулярному рівні з переходом електронів між енергетичними рівнями, наслідком чого є характеристичне спектральне поглинання або емісія. Вони можуть включати хімічні складові, які застосовуються у поєднанні з біосенсорами. Можуть бути застосованими системи виявлення комплексів біотин/авідин або біотин/стрептавідин та лужної фосфатази.

Спосіб визначення зв'язування не є особливістю цього винаходу і фахівцям у цій галузі надається можливість вибору придатного способу за власним уподобанням та загальним рівнем знань.

Згадані сигнали, які утворюються окремими кон'югатами антитіло-репортерна група, можуть бути використані для виведення абсолютних або відносних даних, які піддаються кількісному визначенню, щодо відповідного зв'язування антитіл у зразках клітин (нормальних та експериментальних). На додаток до цього, для кількісного визначення загальної популяції клітин може бути застосовано загальний ядерний барвник, наприклад, пропідію йодид, що забезпечує визначення кількісних співвідношень між окремими популяціями клітин та загальною кількістю клітин. У разі зв'язування радіонуклеотиду, наприклад,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  або  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  з антитілом, якщо це антитіло локалізується, переважно, у пухлині, а не у нормальних тканинах, присутність радіоізотопної мітки у пухлинній тканині може виявлятися та кількісно визначатись за допомогою гамма-камери. Якість одержаного зображення згаданої пухлини знаходиться у безпосередній залежності від співвідношення сигнал:шум.

Згадані антитіла можуть використовуватись як діагностичні агенти для відслідковування пухлин з новоутвореними судинними сітками, а також застосовуватись, наприклад, у модифікованій формі, для доставки цитотоксичних агентів або для ініціювання коагуляції у межах нових кровоносних судин, завдяки чому вони позбавляють пухлину, яка розвивається, кисню та живильних речовин і, завдяки цьому, становлять собою опосередковану форму терапії пухлин.

Цей винахід передбачає також застосування згаданого перед тим специфічного зв'язувального агенту, як терапевтичного засобу, наприклад, у разі одержання його методами генної інженерії або шляхом поєднання або зв'язування, у вигляді злитого білку, який посідає ефекторну функцію. Специфічний зв'язувальний агент, за цим винаходом, може застосовуватись для спрямованої доставки токсину, радіоактивного елементу, Т-клітин, клітин-вбивць або інших молекул до пухлини, яка експресує або пов'язана з необхідним антигеном.

Відповідно до цього, додаткові аспекти цього винаходу надають способи лікування, які включають введення специфічного зв'язувального агенту у вигляді, у якому його надано, фармацевтичних композицій, до складу яких входить такий специфічний зв'язувальний агент, та використання такого специфічного зв'язувального агенту при виготовленні медикаменту для введення, наприклад, у способі виготовлення медикаменту або фармацевтичної композиції, який включає поєднання згаданого специфічного зв'язувального агенту з фармацевтично прийнятним наповнювачем.

За цим винаходом, передбачені композиції можуть бути введені людям. Введення, у переважному варіанті, здійснюється у "терапевтично ефективній кількості", причому згадана кількість є достатньою для благотворного впливу на пацієнта. Таким благотворним впливом може бути, як мінімум, поліпшення, як мінімум, одного симптому. Фактична введена кількість, швидкість та часовий графік введення будуть залежати від природи та тяжкості стану, який піддається лікуванню. Призначення лікування, наприклад, прийняття рішень відносно дозування і т.ін., знаходиться у межах відповідальності лікарського персоналу та лікаря. Відповідні дози антитіла є добре відомими у цій галузі; [див. Ледерманн (Ledermann) та інші, (1991); Бегшо К.Д. (Bagshawe K.D.) та інші, (1991)].

Композиція може вводиться самостійно або у поєднанні з іншими засобами лікування, одночасно або послідовно, що залежить від стану, який піддається лікуванню.

До складу фармацевтичних композицій за цим винаходом та для застосування за цим винаходом, на додаток до активного інгредієнту, може входити фармацевтично прийнятний наповнювач, носій, буфер, стабілізатор або інші речовини, добре відомі фахівцям у цій галузі. Такі речовини не повинні бути токсичними і не повинні зашкоджувати ефективності активного інгредієнту. Точна природа носія або іншої речовини буде залежати від шляху введення, який може бути пероральним або ж введення може здійснюватись шляхом впорскування, наприклад, внутрішньовенного.

Фармацевтичні композиції, призначені для перорального введення, можуть бути у таблетованій, капсульованій, порошковій або рідинній формі. До складу таблетки може входити твердий носій, наприклад, желатина або ад'ювант. До складу рідинних фармацевтичних композицій, як правило, входить рідкий носій, наприклад, вода, нафта, таринна або рослинна олія, мінеральне або синтетичне масло. Вони можуть включати фізіологічний сольовий розчин, декстрозу або інший сахаридний розчин, або гліколі, наприклад, етиленгліколь, пропіленгліколь або поліетиленгліколь.

Згаданий активний інгредієнт, призначений для внутрішньовенного впорскування або впорскування до місця захворювання, може бути у формі парентерально прийнятного водного розчину, вільного від пірогенів, який має відповідний рН, ізотонічність та стійкість. Пересічні фахівці у цій галузі цілком спроможні приготувати придатні розчини з застосуванням, наприклад, ізотонічних носіїв, наприклад, фізіологічного розчину для впорскувань, розчину Рінгера для впорскувань, лактатного розчину Рінгера для впорскувань. За потребою, можуть включатись консерванти, стабілізатори, буфери, антиоксиданти та/або інші добавки.

Специфічний зв'язувальний агент, за цим винаходом, може бути одержаним шляхом експресування з

кодувальної нуклеїнової кислоти. Нуклеїнова кислота, яка кодує будь-який специфічний зв'язувальний агент у вигляді, у якому він надається, становить один з аспектів цього винаходу; те ж саме стосується і способу одержання специфічного зв'язувального агенту, який включає експресування його з кодувальної нуклеїнової кислоти. Експресія може традиційно забезпечуватись шляхом культивування рекомбінантних клітин-хазяїв, які вміщують відповідну нуклеїнову кислоту, за відповідних умов.

Нуклеїнова кислота може кодувати будь-яку з амінокислотних послідовностей доменів зв'язування комплексу антитіло-антиген, опис яких наведено, або будь-яку функціонально еквівалентну форму. Зміни можуть здійснюватись на нуклеотидному рівні шляхом додання, заміщення, видалення або введення одного або декількох нуклеотидів, причому згадані зміни можуть або можуть не відображатись на амінокислотному рівні у залежності від виродженості генетичного коду.

Системи клонування та експресування поліпептиду у різноманітних клітинах-хазяях є добре відомими. До придатних клітин-хазяїв належать бактерії, клітини ссавців, дріжджі та бакуловірусні системи. До ліній клітин ссавців, доступних у цій галузі для експресування гетерологічного пептиду, належать клітини яєчника китайського хом'ячка, клітини HeLa, клітини нирок молодого хом'ячка та багато інших. Традиційним переважним бактеріальним хазяїном є *E. coli*.

Експресія антитіл та фрагментів антитіл у прокаріотичних клітинах, наприклад, *E. coli*, є добре розробленою у цій галузі. Огляд див., [наприклад, у Плактан (Pluckthun), (1991)]. Експресія у еукаріотичних клітинах у культурі також є доступною для фахівців у цій галузі, як факультативний варіант продукування специфічного зв'язувального агенту; див. свіжі огляди, [наприклад, Рефф (Ref), (1993); Трілл (Trill) та інші, (1995)].

Придатні вектори, до складу яких входять, відповідно, регуляторні послідовності, у тому числі, промоторні послідовності, кінцеві послідовності, поліаденілювальні послідовності, енхансерні послідовності, маркерні гени та інші послідовності, можуть вибиратись або конструюватись. Вектори можуть бути плазмідами, векторами на основі вірусу, наприклад, бактеріофагами або фазмідами, відповідно. Докладніше, [див., наприклад, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: друге видання, Сембрук (Sambrook) та інші, 1989, видавництво Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Багато відомих способів та протоколів маніпулювання нуклеїновими кислотами, наприклад, під час виготовлення генно-інженерних конструкцій з нуклеїновими кислотами, мутагенезу, секвенування, введення ДНК до клітин, експресування генів та аналізу білків докладно описано [у Short Protocols in Molecular Biology, друге видання, видавець Озбел (Ausubel) та інші, видавництво John Wiley & Sons, 1992]. Згадані роботи Сембрука та інших, а також Озбела та інших включено до цього опису посиланням.

Таким чином, додатковим аспектом цього винаходу надається клітина-хазяїн, яка вміщує нуклеїнову кислоту, як розкривається у цьому описі. Наступним додатковим аспектом надається спосіб, який включає введення згаданої нуклеїнової кислоти до клітини-хазяїна. Згадане введення може здійснюватись будь-яким придатним способом. У разі еукаріотичних клітин, до придатних способів належать трансфекція фосфатом кальцію, діетиламіноетилцелюлозою-декстраном, електропорація, ліпосомоопосередкована трансфекція та трансдукція з застосуванням ретровірусу або іншого вірусу, наприклад, коров'ячої віспи, або, у разі клітин комах, бакуловірусу. У разі бактеріальних клітин, до придатних способів належать трансформація хлоридом кальцію, електропорація та трансфекція за допомогою бактеріофагу.

Після згаданого введення може спричинюватись або здійснюватись експресія зі згаданої нуклеїнової кислоти, наприклад, шляхом культивування клітин-хазяїв за умов експресування згаданого гену.

За одним з варіантів втілення, згадана нуклеїнова кислота за цим винаходом інтегрується до згаданого геному (наприклад, хромосоми) згаданої клітин 4-хазяїна. Процес інтегрування може активізуватись завдяки включенню послідовностей, які стимулюють рекомбінування зі згаданим геномом, відповідно до стандартних способів.

Після продукування специфічного зв'язувального агенту, він може застосовуватись, наприклад, будь-яким чином, який розкривається у цьому описі, наприклад, при виготовленні фармацевтичного або діагностичного продукту, наприклад, набору, до складу якого, на додаток до згаданого специфічного зв'язувального агенту, входить один або декілька реактивів для визначення зв'язування згаданого агенту з клітинами, як обговорювалось.

Додаткові аспекти цього винаходу та варіанти втілення будуть зрозумілими фахівцям у цій галузі. З метою повного розуміння цього винаходу далі наводяться приклади, які носять виключно ілюстративний, а ні в якому разі не обмежувальний характер. Посилання робляться на наступні фігури:

На Фіг.1 показано впорядковано розміщені амінокислотні послідовності VH та VL одноланцюгових фрагментів scFvs CGS-1 та CGS-2. На Фіг.1(a) показано послідовності VH; на Фіг.1(b) показано послідовності VL. Позначені CDRs (1, 2 та 3). Найгомологічнішим сегментом людського ембріонального типу VH до обох фрагментів scFvs є сегмент DP47 сімейства VH3; сегментом VL обох клонів є DPL16, легкий ланцюг, який було використано для одержання бібліотеки вихідного scFv [Ніссім та інші, 1994]. Підкреслено залишки, якими взаємовідрізняються два згадані клони.

Фіг.2: На Фіг.2A показано модель структури домену субодиниці людського FN. Позначено ділянки варіабельності IIICS, ED-A та ED-B, обумовлені альтернативним сплайсингом перед-mPHK FN. На згаданій Фіг. позначено також внутрішні гомології, а також головні продукти розщеплення термолізином, до складу яких входить ED-B [Зарді та інші, 1987]. На Фіг.2B показано електрофореграми плазми у поліакриламідному гелі у присутності 4-18% додецилсульфату натрію, а також WI38VA FN та їх термолізинових гідролізатів, забарвлених барвником Кумасі світло-синім та імуноблоти з застосуванням, як зондів, BC-1, IST-6, CGS-1 та CGS-2. Нерозщеплен їй (смуга 1) та розщеплений FN плазми з застосуванням термолізину у дозі 1мкг/мг FN (смуга 3) та 10мкг/мг FN (смуга 4). Нерозщеплений (смуга 2) та розщеплений WI38VA FN з застосуванням термолізину у дозі 1мкг/мг (смуга 5), 5мкг/мг (смуга 6) та 10мкг/мл (смуга 7) FN. Цифрами на правій стороні вказано головні продукти розщеплення термолізином, показані на Фіг.2A. Значеннями зліва вказано стандарти молекулярної маси у кілодальтонах (kD).

Фіг.3: На Фіг.3А показано повторні послідовності FN типу III, які входять до складу злитих та рекомбінантних білків, експресованих у *E. coli* та реактивність згаданих білків відносно CGS-1 та CGS-2, а також відносно mAbs BC-1 та IST-6. На Фіг.3В показано гель, забарвлений барвником Кумасі світло-синім, та імуноблоти з застосуванням, як зондів, CGS-1, CGS-2, BC-1, IST-6. Індексуювання смуг відповідає індексуванню пептидних конструкцій у верхній частині фігури. Значеннями зліва вказано стандарти молекулярної маси у кілодальтонах.

Фіг.4: Мишачий тепловізор; мишачий тепловізор, який було використано у експериментах з цілеспрямованою доставкою препарату, складається з чорної, нефлуоресцентної коробки, спорядженої вольфрамовою галогеновою лампою, фільтрами збудження та емісії, специфічними для інфрачервоного флуорофору CY7 та контрольованою комп'ютером 8-бітовою монохромною цифровою відеокамерою.

Фіг.5: Спрямована доставка мічених флуоресцентним барвником фрагментів антитіла до мишачої тератокарциноми F9 за допомогою мономерного scFv (CGS-1) та димерного scFv (CGS-1)<sub>2</sub>, спрямованих на B-FN. Димерний scFv (D1.3)<sub>2</sub> зі зв'язувальною специфічністю до лізоциму було використано, як негативний контроль.

Фіг.6: Спрямована доставка мічених флуоресцентним барвником фрагментів антитіла до мишачої тератокарциноми F9 за допомогою афінно зрілого scFv (CGS-2) та нижчого за рівнем афінності scFv (28SI), спрямованих на один епітоп B-FN. Цілеспрямовану доставку виявлено як у великих пухлинах (приблизно, 0,6 грама), які через 48 годин вкрились кіркою чорного кольору, яка частково погіршує зображення, так і у невеликих пухлинах (приблизно, 0,2 грама).

Усі згадані документи включено до цього опису як посилання.

Перелік Прикладів

Приклад 1 - Виділення людських scFvs, специфічних для домену ED-B людського FN.

Приклад 2 - Визрівання афінності людських scFvs, специфічних для домену ED-B людського FN.

Приклад 3 - Специфічність афінно зрілих scFvs для фібронектинів, до складу яких входить ED-B.

Приклад 4 - Застосування афінно зрілих анти-ED-B scFvs при імуністохімічному забарвлюванні зрізів людських та мишачих пухлин.

Приклад 5 - Застосування афінно зрілих анти-ED-B scFvs при спрямованій доставці препарату до людських пухлин *in vivo*.

Приклад 6 - Спрямована доставка препарату до ксенотрансплантованої мишачої тератокарциноми F9 у "голий" мишей.

Приклад 1 - Виділення людських scFvs, специфічних для домену ED-B людського FN.

Для селекції рекомбінантних антитіл було використано бібліотеку людського scFv фагу [Hiccam (Nissim) та інші, 1994]. Як джерело антигену для селекції, було використано дві різні форми ED-B ізоформи і у обох випадках згаданою ізоформою був рекомбінантний білок людини.

Рекомбінантні FN пептиди, до складу яких входили повтори типу III 2-11(B-) та 2-11(B+) було експресовано у *Escherichia coli*.

Конструкцію було виготовлено з використанням кДНК FN клонів pFN154 [Корнблітт (Kornblihtt) та інші, 1985],  $\lambda$ F10 та  $\lambda$ F2 [Карнемолла та інші, 1989]. Генно-інженерні конструкції на основі кДНК, стягувальні основи 2229-4787 [Корнблітт та інші, 1985] було введено до згаданого вектору pQE-3/5 за допомогою набору QIAexpress від компанії Qiagen (Четсворт, Каліфорнія). Рекомбінанти FN-III 2-11 (B-) та (B+) було очищено засобами імуніафінної хроматографії з застосуванням mAb 3E3 [Піршбахер (Pierschbacher) та інші, 1981], кон'югованого до Сефарози 4В (компанія Pharmacia). Фрагменти ДНК для одержання фрагментів рекомбінантного FN, до складу яких входили гомологічні повтори типу III 7B89, 789, ED-B та FN-6, були одержані ампліфікацією за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (PCR) з застосуванням ДНК-полімерази UltMa (компанія Perkin Elmer). Матрицею служила кДНК клонів FN 2-11(B+) та FN 2-11 (B-). Праймери було призначено для забезпечення можливості клонування PCR продуктів до pQE-12 за допомогою набору QIAexpress (компанія Qiagen). У подальшому вони трансформувались до *E. coli* та експресувались. Усі клони кДНК було секвеновано за допомогою набору для секвенування ДНК Sequenase 2.0 (компанія USB).

Рекомбінантні білки було очищено шляхом хроматографування (смола Ni-NTA, компанія IMAC) у відповідності до інструкцій виробника (компанія Qiagen) з застосуванням гексагістидинової мітки на карбоксильному кінці FN фрагменту. Злитий білок ED-B- $\beta$ Gal було одержано шляхом клонування кДНК ED-B до вектору на основі бактеріофагу  $\lambda$ gt11 з одержанням клону  $\lambda$ ED-B. Клон  $\lambda$ chFN60 (до складу якого входила частина послідовності ED-B) було одержано, як злитий білок з клонованого курячого FN pchFN60 [Нортон та інші, 1987].

Для селекції бібліотеки людського scFv фагу, кожен з двох різних рекомбінантних антигенів (7B89 та ED-B) було піддано трьом циклам пенінгу. Пробірки для імуніологічних досліджень (компанія Nunc; Maxisorp, Роскілд, Данія) було сенсibilізовано обома антигенами впродовж ночі у концентрації 50мкг/мл у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS) (20мМ фосфатного буферу, 0,15M NaCl, pH7.2). Першим згаданим антигеном був фрагмент рекомбінантного FN 7B89, домен ED-B якого фланкується прилеглими гомологічними повторами FN типу III; його було сенсibilізовано при 4°C впродовж ночі. Другим згаданим антигеном була рекомбінантна ED-B [Зарді та інші, 1987] з гексагістидиновою міткою на карбоксильному кінці; цей білок це має у своєму складі лізинівих залишків, завдяки чому кінцева аміногрупа першої згаданої амінокислоти є доступною для сайтспецифічної ковалентної іммобілізації ED-B до реактивних планшетів, призначених для здійснення імунферментного твердофазного аналізу (ELISA) (компанія Nunc; Covalink). Сенсibilізацію здійснювали впродовж ночі при кімнатній температурі.

Після трьох циклів пенінгу елюйований фаг вводили до клітин *E. coli* HB2151 і висівали, як описано [Hiccam та інші, 1994]. Після кожного циклу селекції відбирали 95 стійких до ампіциліну окремих колоній для ідентифікування антигенспецифічних scFvs засобами ELISA. Клоні, які під час постановки ELISA давали максимальні сигнали на антигени, які було використано для пенінгу, відбирали для подальшого аналізу та для визрівання афінності. Було показано також, що згадані клони забезпечують специфічне забарвлення зрізів



поліморфної гліобластоми та пухлин грудної залози під час імуноцитохімічного забарвлення, докладніший опис якого наведено у Прикладі 4.

Приклад 2 - Визрівання афінності людських scFvs, специфічних для домену ED-B людського FN.

Клони 35GE (після селекції за допомогою 7B89) та 28SI (після селекції за допомогою тільки домену ED-B) було відібрано, як претендентні антитіла на визрівання афінності. З метою урізноманітнення легких ланцюгів, як засобу поліпшення афінності, автори цього винаходу дослідили просту стратегію визрівання афінності, засновану на рандомізуванні шести центральних залишків (DSSGNH) легкого ланцюгу CDR3 з застосуванням вироджених олігонуклеотидів та полімеразно-ланцюгової реакції (PCR) (Фіг.1), за умови потенційної різноманітності послідовностей  $20^6 = 6,4 \times 10^7$ . Ця ділянка (разом з важким ланцюгом CDR3) знаходиться у центральній частині антигензв'язувального сайту [Падлен (Padlan), 1994]. Автори також піддали мутації аргініновий залишок, який безпосередньо передує ділянці з шести залишків, з одержанням серину для запобігання можливості домінування електростатичних ефектів під час селекції.

Плазмиду з окремої бактеріальної колонії, яка експресує "батьківський" scFv фрагмент, було піддано PCR ампліфікації з праймерами LMB3 (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') та CDR3-6-VL-FOR (5' CTT GGT CCC TCC GCC GAA TAC CAC MNN MNN MNN MNN MNN MNN AGA GGA GTT ACA GTA ATA GTC AGC CTC 3') (94C [1']-55C [1']-72C [1']30"), 25 циклів; відносно буферів та умов, [див., Маркс (Marks) та інші, 1991]. Одержаний продукт піддавали очищенню методом імуносорбції у лунках з гелем (з метою видалення слідових кількостей згаданого плазмиду, до складу якого входить вихідний scFv ген) та використовували, як матрицю на другому етапі ампліфікації з праймерами LMB3 та JI-Not-FOR (5' ATT GCT TTT CCT TTT TGC GGC CGC GCC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC TCC GCC 3') (94C [1']-55C [1']-72C [1']30"), 25 циклів). Неочищений продукт PCR, який давав одну смугу правильної молекулярної маси на агарозному гелі, видаляли очищенням безпосередньо з суміші, одержаної після проведення полімеразно-ланцюгової реакції, за допомогою центрифуги Spin-Bind (компанія FMC, Рокленд, Мен, США), піддавали подвійному розщепленню за допомогою NcoI/NotI та лігували до фазміди pHENI, яку було очищено методом імуносорбції у лунках з гелем та розщеплено за допомогою NcoI/NotI [Хугенбум (Hooogenboom) та інші, 1991], до складу якої входила імітаційна вставка NcoI/NotI, для полегшення відокремлення вектору, який було розщеплено двічі, від вектору, який розщеплювався тільки один раз. Згаданий вектор одержували за допомогою набору Plasmid maxi-prep компанії Qiagen (Четсворт, Каліфорнія, США). У суміші до лігування було використано, приблизно, 5мкг розщепленої плазмиди та вставки. Згадану суміш екстрагували один раз фенолом, один раз сумішшю фенолу/хлороформу/ізоамілового спирту (25:25:1), після чого осаджували етанолом з застосуванням глікогену (компанія Boehringer, Мангейм, Німеччина), як носію, та сушили за допомогою експрес-вакуумної сушарки. Одержаний осад ресуспендували у 20мкл води та піддавали електропорації у електрокомпетентних клітинах TG1 E. coli [Гібсон (Gibson), 1984]. Автори цього винаходу використовували, як правило, електрокомпетентні клітини у титрі  $10^9$  трансформантів/мкг, у разі застосування концентрованих розчинів гліцерину, або  $10^{10}$  трансформантів/мкг, у разі застосування свіжовиготовлених електрокомпетентних клітин. У разі застосування процедури, опис якої наведено, вихід, як правило, складав  $>10^7$  клонів.

Після цього бібліотеку визрівання було піддано такій же самій обробці, як і у разі бібліотеки Ніссіма [Ніссім та інші, 1994] з метою одержання фагових частинок, які було застосовано для одного циклу селекції на пробірках для імунологічних досліджень, з використанням 7B89 (10мкг/мл), як антигену, після чого було здійснено наступний цикл кінетичної селекції [Хокінс (Hawkins) та інші, 1992]. Цей етап селекції було здійснено шляхом інкубування біотинільованого 7B89 (10нМ) з суспензією фагу (приблизно,  $10^{12}$  туберкулінових одиниць) у 2% суміші молока-забуференого фосфатом фізіологічного розчину (2% MPBS) з першого циклу селекції впродовж 5 хвилин з наступним додаванням небіотинільованого 7B89 (1мкМ) з витриманням дня проходження конкурівання впродовж 30 хвилин. Після цього до згаданої реакційної суміші додавали 100мкл кульок, вкритих стрептавідином (Dyna: M480), попередньо блокованих у 2% MPBS, перемішували впродовж 2 хвилин, після чого фіксували за допомогою магніту і 10 разів поперемінно промивали (PBS+0,1% Твін-20-буферу) та PBS. Частинок фагу елюювали зі згаданих кульок за допомогою 0,5мл 100мМ триетиламіну. Після цього одержаний розчин нейтралізували 0,25мл 1М Трис-буферу, pH7,4 і використовували для інфікування клітин HB2151, які знаходились у фазі експоненційного росту (Ніссім та інші, 1994). 95 стійких до ампіциліну окремих колоній було використано для одержання супернатантів, які вміщували scFv [Ніссім та інші, 1994]. Одержані супернатанти перевіряли за допомогою ELISA, імуногістохімічними методами та на установці BIAcore з метою ідентифікування найкращих зв'язувальних агентів. Після цього згадані зв'язувальні агенти субклонували між сайтами SfiI/NotI вектору експресії pDN268 [Нері (Neri) та інші, 1996], до якого додавали мітку, яка піддається фосфорилуванню, епітоп FLAG та гексагістидинову мітку на С-кінцевий край scFv.

Окремі колонії відповідних антитіл, субклонуваних у pDN268, вирощували при 37°C на планшетах 2xT<sub>Y</sub>, які вміщували 100мг/л ампіциліну та 0,1% глюкози. Коли культури клітин досягали рівня оптичної густини OD<sup>600</sup>=0,8, на планшети додавали середовище IPTG до кінцевої концентрації 1мМ і культивування продовжували на протязі 16-20 годин при 30°C. Після центрифугування (центрифуга GS-3 Sorvall rotor, 7000об/хв, 30 хвилин), одержаний супернатант фільтрували, концентрували та вносили до буферу насичення (50мМ фосфату, pH7,4, 500мМ NaCl, 20мМ імідазолу) за допомогою пристрою з дотичною течією Minisette (компанія Filtron). Одержаний розчин наносили на 1мл смоли Ni-NTA (компанія Qiagen), промивали 50мл буферу насичення та елюювали за допомогою елюювального буферу (50мМ фосфату, pH7,4, 500мМ NaCl, 100мМ імідазолу). Одержане очищене антитіло аналізували за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію [SDS-PAGE) (Леммлі (Laemmli), 1970] та діалізували проти PBS при 4°C. Очищені препарати scFv піддавали додатковому очищенню методом імуносорбції у лунках з гелем за допомогою хроматографічної установки для рідинної хроматографії швидкого розділення (FPLC), обладнаної колонкою S-75 (компанія Pharmacia), оскільки відомо, що мультівалентні scFv фрагменти можуть демонструвати штучне добре зв'язування на установці BIAcore [Джонссон (Jonsson) та інші, 1991] внаслідок ефектів авідності [Ніссім та інші, 1994; Крозерс (Crothers) та Мецгер (Metzger), 1972]. Концентрація антитіл у FPLC-очищених мономерних фракціях визначалась спектрофотометрично з

прийняттям рівня поглинання при 280нм 1,4 одиниці для 1мг/мл scFv розчину. Зв'язування моновалентного scFv у різних концентраціях у діапазоні 0,1-1мкМ у PBS вимірювали на установці BIAcore (компанія Phamacia Biosensor) з застосуванням наступних антигенів: (i) 1000 резонансних одиниць (RU) біотинільованого фрагменту 7B89 рекомбінантного FN, імобілізованого на стружці, сенсibilізованій стрептавідином, який специфічно зв'язувався 250 EU scFv; (ii) 200 RU рекомбінантного ED-B, хімічно імобілізованого на N-кінцевій аміногрупі, який специфічно зв'язувався 600 RU scFv; (iii) 3500 RU ED-B-збагаченого фібрoneктину WI38VA (див. Приклад 3), який специфічно зв'язувався 150 RU scFv. Кінетичний аналіз даних здійснювали за інструкціями виробника. На основі якісного аналізу супернатантів, які вміщували антитіла, здійсненого на установці BIAcore, було відібрано по одному варіанту кожного scFv клону з визрілою афінністю: клон CGS-1 з селекції, яку було здійснено за допомогою фрагменту 7B89, та клон CGS-2 з селекції, яку було здійснено за допомогою фрагменту ED-B рекомбінантного FN. У Таблиці 1 наведено константи швидкості асоціації ( $k_{on}$ ) та константи швидкості дисоціації ( $k_{off}$ ), разом з вирахованими константами рівноважної дисоціації ( $K_d$ ) для обох scFvs та вихідного клону 28SI. Незважаючи на те, що константи рівноважної дисоціації обох клонів CGS-1 та CGS-2 знаходяться у наномольному діапазоні, клон CGS-2 продемонстрував більше поліпшення, порівняно зі своїм батьківським клоном ( $K_d=1нМ$ ) (поліпшення з 110нМ), відносно усіх трьох білків, які було випробувано на сенсорній стружці (Таблиця 1). Згадане поліпшення було обумовлене, головним чином, константою уповільненої кінетичної дисоціації ( $\sim 10^{-4} s^{-1}$ ), яка визначалась за допомогою препаратів мономерних антитіл (не показано).

Стратегія визрівання, здається, є загальною і вона дозволила одержати антитіла з поліпшеною афінністю проти білку, який зв'язує мальтозу, цитохрому С, позаклітинного домену мишачого ендогліну (D.N., Л.Вайдер (L.Wyder), Р.Клеменц (R.Klemenz)), цитомегаловірусу (A.P., Г.Нері (G.Neri), Р.Ботті (R.Botti), P.N.), ядерного пухлинного маркерного білку HMGI-C (A.P., П.Солдані (P.Soldani), В.Джанкотті (V.Giancotti), P.N.) та маркеру пухлин яєчника - плацентарної лужної фосфатази (М.Донарен (M.Deonarin) та А.А.Епенетос (A.A.Epenetos)). Згадана стратегія, таким чином, здається, щонайменше, такою ж ефективною, як і інші стратегії визрівання [Маркс та інші, 1992; Лоу (Low) та інші, 1996] і надає антитіла, афінність яких наближається до афінності антитіл, одержаних з дуже великих бібліотек комплексів фаг-антитіло [Гриффітс (Griffiths) та інші, 1994; Bogen (Vaughan) та інші, 1996].

Афінно зрілі клони CGS-1 та CGS-2 секвенували та піддали порівняльному аналізу з базою даних генів антитіл V людського ембріонального типу (V-BASE), після чого трансклювали за допомогою програми MacVector. Ген VH обох клонів був найбільш гомологічним до людського ембріонального DP47 (VH3), і, на додаток, кожний клон мав різні послідовності VH CDR3 (Фіг.1). Згаданим геном VL обох клонів був ембріональний DPL16, який використовувався під час конструювання людського синтетичного набору scFv, опис якого наведено у [Ніссіма та інших, 1994]. VL CDR3 послідовності відрізнялись одна від одної у чотирьох з шести рандомізованих залишків (Фігура 1b).

Таблиця 1

Кінетичні константи та константи дисоціації мономерних фрагментів scFv CGS-1 та CGS-2 відносно білків, до складу яких входить домен EP-B

Антиген:	ED-B			7B89			FN WI38VA		
ScFv:	CGS-1	SI28	CGS-2	CGS-1	SI28	CGS-2	CGS-1	SI28	CGS-2
$k_{off}(s^{-1})^*$	$7,0 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-3}$	$7,1 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^{-4}$
$k_{on}(M^{-1}s^{-1})^*$	$1,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$
$K_d(M)^*$	$5,4 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-9}$	$3,5 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-9}$	$1,2 \times 10^{-8}$	$5,9 \times 10^{-8}$	$2,4 \times 10^{-9}$

Експерименти здійснювали, як описано у розділі "Матеріали та Методи".

\*Значення  $k_{off}$  та  $k_{on}$  мають точність  $\pm 30\%$ , на основі точності визначення концентрацій та у зв'язку з незначною різницею результатів, які було одержано при використанні різних ділянок сенсограми для процедури підбору.  $K_d = k_{off}/k_{on}$ .

Приклад 3 - Специфічність афінно зрілих scFvs для фібрoneктинів, до складу яких входить ED-B.

Імунореактивність двох афінно зрілих scFvs, CGS-1 та CGS-2 спочатку оцінювали за допомогою ELISA і порівнювали безпосередньо з mAb BC-1 (яке розпізнає ізоформу B-FN) та mAb IST-6, яке розпізнає тільки ізоформи FN, які не мають ED-B [Карнемолла та інші, 1989; 1992]. Характеристики цих mAbs повідомлялись раніше [Карнемолла та інші, 1989; 1992]. У подальшому було проведено п'ять аналізів на специфічність з використанням численної групи фрагментів FN, які було одержано шляхом обробки термолізином, та рекомбінантних злитих білків.

Згадані антигени, які було використано для ELISA та імуноблотингу, були одержані наступним чином. FN очищали з людської плазми та з кондиціонованого живильного середовища лінії клітин WI38VA13, як повідомлялось раніше [Зарді та інші, 1987]. Очищені фібрoneктики розщеплювали термолізином (протеаза типу X; компанія Sigma Chemical Co.), як повідомлялось [Карнемолла та іншими (1989)]. Фрагменти нативного FN 110 кілодальтон (B-) та нативного FN 120 кілодальтон (B+) (див. Фіг.2) очищали з FN перевару, як повідомлялось раніше [Борсі та інші, 1991]. Велику ізоформу тенасцину-С очищали, як повідомлялось [Сагінаті (Saginati) та іншими (1992)]. Рекомбінантні білки експресували та очищали, як описано у Прикладі 1. SDS-PAGE та вестерн-блотинг здійснювали, [як описано Карнемолла та іншими (1989)].

Усі антигени, які було використано у ELISA, розводили у PBS до концентрації 50-100мкг/мл та сенсibilізували при 4°C впродовж ночі у лунках планшету Immuno-Plate (компанія Nunc, Роскілд, Данія).

Незв'язаний антиген видаляли разом з PBS, після чого планшети блокували PBS, до складу якого входило 3% (у відношенні маси до об'єму) сироваткового альбуміну великої рогатої худоби (BSA), впродовж 2 годин при 37°C. Після цього планшети чотири рази промивали PBS, до складу якого входило 0,05% Твін-буферу 20 (PBST). Після цього антитіла зв'язувались при 37°C впродовж 1,5 годин; scFvs попередньо інкубували з антисироваткою, спрямованою проти послідовності мітки: mAb M2 [компанія Kodak, Нью Хейвен, Коннектикут] для мітки FLAG або 9E 0 [Американська колекція типових культур, Роквіл, Меріленд] для мітки мус. Контрольними перевіреними антитілами були mAbs BC-1 та IST-6. Після чотирьох промивок PBST, планшети інкубували впродовж 1 години при 37°C з розведеним 1:2000 (у PBST+3% BSA) біотинільованим козячим антимишачим IgG (компанія Bio-SPA Division, Мілан, Італія). Згадані промивки було повторено, і впродовж 1 години при 37°C додавали комплекс стрептавідин-біотинільована лужна фосфатаза (розведення 1:800 у PBST, до складу якого входить 2mM MgCl<sub>2</sub>) (компанія Bio-SPA Division, Мілан, Італія). Згадану реакцію здійснювали з застосуванням таблетованого фосфатазного субстрату (компанія Sigma) у 10% діетаноламіні, pH 9,8; оптичну густину визначали при 405nm. Результати представлено далі у Таблиці 2.

Таблиця 2

	CGS-1	CGS-2	BC-1	IST-6
FN плазми	0,07	0,04	0,09	1,73
WI38VA FN	1,16	0,72	1,20	1,12
n110 kD (B-)	0,03	0,01	0,05	1,20
n120 kD (B+)	0,82	0,81	1,20	0,02
rec FN7B89	1,11	1,02	1,02	0,01
rec FN789	0,01	0,01	0,05	1,25
rec ED-B	1,21	1,32	0,15	0,04
rec FN-6	0,01	0,01	0,08	0,03
Тенасцин	0,01	0,02	0,06	0,02

Імунореактивність scFv та моноклональних антитіл з антигенами, одержаними з фібрoneктину, визначали за допомогою ELISA. Наведені значення представляють оптичну густину, визначену при 405nm після віднімання фонового сигналу. Вказані дані представляють собою середнє для чотирьох експериментів з максимальним 10% середнім квадратичним відхиленням.

Ідентичність різних згаданих форм фібрoneктину, які було використано у експерименті, виглядає наступним чином: FN плазми; фібрoneктин плазми людини; WI38-VA FN фібрoneктин з супернатантів фібробластів, трансформованих SV40 [Зарді та інші, 1987]; n110kD=оброблений термолізином домен FN 4 без ED-B; n120kD=оброблений термолізином домен FN 4, до складу якого входить ED-B; rec FN7B89=домен ED-B, фланкований прилеглими гомологічними повторами FN типу III; rec FN 789=гомологічні повтори FN типу III з доменом ED-B; rec EB-B=тільки рекомбінантний ED-B; rec FN6=flOMeH 6 рекомбінантного FN.

Як CGS-1, так і CGS-2 розпізнають рекомбінантний ED-B пептид, а також усі нативні або рекомбінантні FN фрагменти, до складу яких входить послідовність ED-B, у той же час вони не зв'язуються з жодним з FN фрагментів, позбавленим ED-B. Крім того, CGS-1 та CGS-2 не реагують з тенасцином (до складу якого входить п'ятнадцять гомологічних повторів типу III: [Cipi (Siri) та інші, 1991] та FN плазми, який не містить рівнів послідовності ED-B, які піддаються виявленню, у продуктах розщеплення термолізином [Зарді та інші, 1987]. У протилежність цьому, CGS-1 та CGS-2 активно реагують з FN, очищеним з лінії клітин WI38VA, трансформованих SV40. До складу майже 70-90% FN молекул з цієї лінії клітин входить ED-B, як показують результати експериментів з розщепленням термолізином та нуклеазою S1 з застосуванням очищеного FN та повної РНК, одержаної зі згаданої лінії клітин [Зарді та інші, 1987; Борді та інші, 1992]. Специфічність згаданих scFvs до компоненту ED-B FN було додатково продемонстровано застосуванням розчинного рекомбінантного ED-B для пригнічення зв'язування CGS-1 та/або CGS-2 з FN на клітинах WI38VA (дані не наведено).

Наведені дані підтверджують те, що CGS-1 та CGS-2 специфічно реагують тільки з тими похідними FN, до складу яких входить домен ED-B. Вони демонструють такий же самий рівень реакційної здатності, що і mAb BC-1, за виключенням випадку з рекомбінантним ED-B, який не було розпізнано BC-1. Згадана інтенсивність одержаних сигналів ELISA відносно контрольних mAb відображає високу специфічність двох scFvs до антигенів, до складу яких входить ED-B.

Специфічність CGS-1 та CGS-2 було додатково досліджено на імуноблотах з використанням FN з плазми та клітин WI38VA та їх термолізинових переварів. У разі розщеплення термолізином, FN з клітин WI38VA (до складу більшості з яких входить ED-B) утворює фрагмент з молекулярною масою 120 кілодальтон (до складу якого входить ED-B), та легший фрагмент з молекулярною масою 120 кілодальтон, до складу якого ED-B не входить [Fig.2A; Зарді та інші, 1987]. У разі додаткового розщеплення домену з молекулярною масою 120 кілодальтон утворюється два фрагменти: фрагмент з молекулярною масою 85 кілодальтон, до складу якого, на карбоксильному кінці, входить послідовність ED-B майже у повному об'ємі, та послідовність з молекулярною масою 35 кілодальтон [Fig.2A; Зарді та інші, 1987].

На лівій стороні Fig.2B представлено гелевий блок (забарвлений Кумасі) білкових фракцій, аналізованих засобами імуноблотингу. FN плазми (смуга 1) та термолізинові перевари білку (смуга 3, яка вміщує білок з молекулярною масою 110 кілодальтон, та смуга 4, яка вміщує розщеплений білок з молекулярною масою 110 кілодальтон) не були розпізнані CGS-1 та CGS-2. У протилежність цьому, FN клітин WI38VA, збагачений ED-B, як інтактний (смуга 2), так і після інтенсивного розщеплення термолізином (смуги 5, 6 та 7), був розпізнаний обома scFv фрагментами. Найменшим FN-похідним фрагментом, який може бути специфічно розпізнаний CGS-1, був білок з молекулярною масою 120 кілодальтон (зі стягувальними повторами 2-11 типу III включно), у той час, як CGS-2, на додаток до N-кінця ED-B, був здатен розпізнати стягувальні повтори 2-7 фрагменту з молекулярною масою 85 кілодальтон [Fig.2B; Зарді та інші, 1987]. Ці результати свідчать про те, що два scFvs

реагують з різними епітопами у межах послідовності ED-B. Зв'язування CGS-2 з доменом, який має молекулярну масу 85 кілодальтон, вказує на те, що епітоп для цього клону знаходиться на амінокінці ED-B. У протилежність цьому, втрата зв'язування CGS-1 у разі розщеплення домену з молекулярною масою 120 кілодальтон до домену з молекулярною масою 85 кілодальтон демонструє те, що він розпізнає епітоп, який знаходиться ближче до карбоксильного кінця молекули ED-B.

Тонку специфічність CGS-1 та CGS-2 було додатково досліджено за допомогою імуноблотингу з застосуванням фрагментів рекомбінантного FN та злитих білків з або без послідовності ED-B. Злиті білки FN було одержано, як описано [Карнемолла та іншими (1989)]. Результати цих експериментів представлено на Фіг.3; для ототожнення схематичної діаграми зі структурою доменів людського FN, див. Карнемолла та інші, 1992. Одержані профілі зв'язування, по суті, підтверджують те, що раніше було встановлено за допомогою ELISA та імуноблотів на очищеному FN та продуктах протеолітичного розщеплення: CGS-1 та CGS-2 активно реагували з фрагментами FN, до складу яких входив ED-B (смуги 2 та 4), однак, не проявляли реактивності відносно послідовностей FN, позбавлених ED-B (смуги 1 та 3). CGS-1 не реагував ні з людським (смуга 5), ні з курячим (смуга 6) злитим білком ED-B, у той час, як CGS-2 активно реагував з обома фрагментами (Фіг.3). Ці результати можуть відображати певні конформаційні обмеження епітопу FN, до складу якого входить ED-B, розпізнаного CGS-1; можливо, наприклад, що епітоп є чутливим до денатурування або некоректно представлений у разі фракціонування засобами SDS-PAGE та перенесення та тверду підкладку, наприклад, нітроцелюлозу.

Наведені результати, якщо їх взяти разом, демонструють, що CGS-1 та CGS-2 міцно та специфічно зв'язуються з фібронектинами, до складу яких входить ED-B, на ділянках, які відрізняються одна від одної та відрізняються від структури ED-B, яка розпізнається mAb BC-1.

Приклад 4 - Застосування афінно зрілих анти-ED-B scFvs при імуногістохімічному забарвлюванні зрізів людських та мишачих пухлин.

CGS-1 та CGS-2 було використано для імунолокалізації молекул FN, до складу яких входив ED-B, у різних нормальних та неопластичних тканинах людини. Шкіру було обрано, як нормальну тканину, оскільки відомо, що під час загоєння поранень шкіри у макрофагах та фібробластах експресується ізоформа B-FN [Карнемолла та інші, 1989; Браун (Brown) та інші, 1993]. Дві обрані людські пухлини раніше було аналізовано на специфічність забарвлювання антифібронектинними mAbs: поліморфну гліобластому докладно вивчали, оскільки клітини ендотелію у судинах цієї пухлини знаходяться у стані активної проліферації з активізованими ангіогенетичними процесами, у тому числі, експресією B-FN ізоформ [Кастеллані та інші, 1994]. На додаток до цього, дослідження, які було проведено на численній групі нормальних, гіперпластичних та неопластичних тканин грудної залози людини, надали додаткові свідчення на користь кореляції між ангіогенезом та експресією B-FN [Качмарек (Kaczmarek) та інші, 1994].

Для експериментів, опис яких наведено, імуногістохімічне забарвлювання CGS-1 та CGS-2 порівнювали з імуногістохімічним забарвлюванням mAb BC-1 (яке розпізнає B-FN ізоформу) та інших mAbs, які, як відомо, реагують або з всіма відомими варіантами FN ізоформи (IST-4), або тільки з FN ізоформами, які є позбавленими ED-B (IST-6). Про визначення характеристик усіх згаданих контрольних антитіл раніше повідомлялось [Карнемолла та інші, 1989; 1992].

Нормальні та неопластичні тканини було одержано зі зразків, які відбирались під час хірургічного втручання. Встановлено, що приготування та фіксація тканин є критичною для точного та чутливого виявлення молекул, до складу яких входить FN [Кастеллані та інші, 1994]. Призначені для імуногістохімічних досліджень кріостатні зрізи товщиною 5мкм підсушували у повітрі та фіксували у холодному ацетоні впродовж десяти хвилин. Імунозабарвлювання здійснювали за допомогою набору для забарвлювання, до складу якого входить комплекс стрептавідину-біотину та лужної фосфатази (компанія Bio-SPA Division, Мілан, Італія), нафтолу-АБ-МХ-фосфату та барвника "Міцний Червоний" (Fast Red TR) (компанія Sigma). Для контрастного забарвлювання було застосовано гематоксилін Джілла з наступним вміщенням до гліцергелю (компанія Dako, Карпентерія, Каліфорнія), як повідомлялось раніше Кастеллані та іншими, 1994. З метою додаткового аналізування специфічності у експериментах з позитивним забарвлюванням тканин, специфічність до ED-B було продемонстровано попереднім інкубуванням антитіл з рекомбінантним ED-B доменом з наступним визначенням, як описувалось перед тим.

Результати цих експериментів, у цілому, показують, що CGS-1 та CGS-2 реагують з тими ж самими гістологічними структурами, що і mAb BC-1. Картина забарвлювання, яку було одержано у разі використання шкіри з CGS-1, CGS-2 та BC-1, відображає відсутність ED-B у FN, експресованому у дермі. Під час забарвлювання зрізів тканини інвазивного раку ендокринних залоз, CGS-1, CGS-2 та BC-1 продемонстрували обмежений розподіл забарвлення, яке обмежується ділянкою між неопластичними клітинами та стромою. Це співпадає з даними про те, що, незважаючи на однорідний розподіл загального об'єму FN у стромі пухлини, експресія B-FN обмежується певними ділянками, і ними виявляються ті ж самі ділянки, які було попередньо успішно локалізовано (у 95% випадків) при інвазивному раці ендокринних залоз за допомогою mAb BC-1 [Качмарек та інші, 1994].

Було підтверджено попередні дані, одержані під час забарвлювання BC-1 пухлини поліморфної гліобластоми. Кастеллані та інші (1994) спостерігав типозу картину забарвлювання гломерулоподібних судинних структур, і у наших експериментах було показано, що CGS-1 та CGS-2 забезпечують якісно ідентичні результати.

Існує, однак, важлива різниця між CGS-1 та CGS-2, та mAb BC-1: було показано, що два людські scFvs зв'язуються як з курячим, так і з мишачим B-FN, у той час, як BC-1 є строго людськоспецифічним. CGS-2 реагував з курячими зародками (дані не наведено), а CGS-1 та CGS-2 реагували з мишачими пухлинами.

Було продемонстровано також забарвлювання CGS-1 судинних структур на зрізах мишачої тератокарциноми F9. У протилежність до цього, усі нормальні мишачі тканини, які було піддано випробуванням (печінка, селезінка, нирки, шлунок, тонка кишка, товста кишка, яєчники, матка, сечовий міхур, підшлункова залоза, надниркові залози, скелетні м'язи, серце, легені, щитовидна залоза та головний мозок),

продемонстрували негативну забарвлювальну реакцію з CGS-1 та CGS-2 (дані не наведено). Завдяки використанню рекомбінантного ED-B домену для повного пригнічення одержаного забарвлення було показано, що структури, забарвлені на зрізах тератокарциноми F9, є ED-B специфічними (дані не наведено).

Приклад 5 - Застосування афінно зрілих анти-ED-B scFvs при спрямованій доставці препарату до людських пухлин *in vivo*.

Лінію клітин SKMEL-28 меланоми людини було використано для індукування ксенотрансплантованих пухлин у "голих" мишей віком 6-10 тижнів (лінія Balb-c або MF-1; компанія Harlan, Великобританія) шляхом підшкірного впорскування до одного боку  $1 \times 10^7$  клітин/мишу. Мишам, у яких з'явилися пухлини, через хвостову вену впорскували 100мкл 1мг/мл розчину scFv<sub>1</sub>-CY7<sub>1</sub> у PBS після того, як діаметр пухлин досягав, приблизно, 1см.

Мічення рекомбінантних антитіл CY7 забезпечувалось шляхом додавання 100мкл 1М розчину бікарбонату натрію, pH=9,3, та 200мкл розчину CY7-bis-OSu (компанія Amersham; номер за каталогом PA17000; 2мг/мл у диметилсульфоксиді (DMSO)) до 1мл розчину антитіл у PBS (1мг/мл). Через 30 хвилин при кімнатній температурі до згаданої суміші додавали 100мкл 1М. Трис-буферу, pH=7,4 і мічене антитіло відокремлювали від фарбнику, який не прореагував, за допомогою змінних колонок PD10 (компанія Pharmacia Biotech, Піскатавей, Нью Джерсі, США), урівноважених PBS. Елюйовані фракції антитіла зеленого кольору концентрували, приблизно, до 1мг/мл за допомогою центрифужних склянок Centricon-10 (компанія Amicon, Беверлі, Массачусетс, США). Співвідношення мічення, яке було досягнуто, наближалось, звичайно, до рівня одна молекула CY7:одна молекула, антитіла. Це визначалось спектрофотометрично з 1см кюветами, за умови, що 1мг/мл розчин антитіла дає поглинання 1,4 одиниці при 280нм, що молярний коефіцієнт погашення CY7 при 747нм складає 200000 ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) та нехтуючи поглинанням CY7 при 280нм. Імунореактивність зразків антитіл після мічення було підтверджено або зміщенням смуги (Heri (Neri) та інші, 1996b), або афінним хроматографуванням на колонці з антигеном, або аналізом на установці BIAcore. Зображення мишей одержували за допомогою саморобного тепловізора через регулярні проміжки часу з анестезуванням тварин, яке забезпечувалось вдиханням суміші кисню/фторотану. Кожну пробу перевіряли на двох-восьми тваринах для підтвердження відтворюваності результатів. Згадані процедури здійснювали згідно до Ліцензії на Дослідження (Великобританія) "Спрямована доставка лікарського препарату до пухлини", яку було видано на ім'я Д. Нері (UK PPL 80/1056).

Згаданий тепловізор представляв собою модифікацію системи фотодетектування [Фоллі (Folli) та інших (1994)], яка забезпечувала використання інфрачервоного фторофору CY7. Інфрачервоне освітлення було обрано з метою забезпечення кращого проникнення до тканин. Флуоресценція CY7 (>760нм) є невидимою для людини і потребує використання контрольованої комп'ютером цифрової відеокамери. Згаданий мишачий тепловізор представляє собою пофарбовану у чорний колір світлонепроникну коробку, споряджену 100Вт вольфрамовою галогеновою лампою та фільтром збудження діаметром 50мм, спеціально розробленим для CY7 (компанія Chroma Corporation, Бреттлборо, Вермонт, США; 673-748нм). Освітлювальний промінь, з великим рівнем наближення, забезпечував однорідне освітлення площини 5x10см, на якій розміщували мишу, призначену для візуалізації. Флуоресценцію приймали за допомогою 8-бітної монохромної цифрової відеокамери Pulnix, спорядженої телескопічним об'єктивом та 50мм фільтром для пропускання флуоресценції (компанія Chroma Corporation, Бреттлборо, Вермонт, США; 765-855нм), яку було сполучено з системою ImageDOK (компанія Kinetic Imaging Ltd., Ліверпуль, Великобританія). Згадана система включала комп'ютер, споряджений пристроєм для введення та реєстрування кадрів зображення та програмою для введення та інтегрування послідовних зображень. Для процесу усереднення використовували, як правило, три послідовні зображення з 50мс проміжками часу; зазначена кількість постійно витримувалась під час одержання зображень однієї тварини для забезпечення можливості безпосереднього порівняння спрямованої доставки лікарського препарату до пухлини у різні моменти часу. Після цього зображення у форматі теплобачення (TIFF) перетворювали на візуалізовані файли (PICT) за допомогою програми Graphics Converter та піддавали обробці на комп'ютері Power Macintosh 7100/66 за допомогою програми MacDraw Pro.

Схематичне зображення конструкції згаданого апарату представлено на Фіг.4.

Ці експерименти показали, що обидва scFv під час візуалізації на макроскопічному рівні знаходились у пухлині.

Мікроскопічну демонстрацію спрямованої доставки лікарського препарату до новоутвореної судинної сітки пухлин, які розвивались, за допомогою двох анти-EDB scFvs було здійснено наступним чином.

"Голим" мишам та/або мишам з важким комбінованим імунodefіцитом (SCID), які мали ксенотрансплантовану людську меланому SKMEL-28 або мишачу тератокарциному F9 на одному боці, впорскували немічені scFv фрагменти з міткою FLAG або біотинільовані scFv фрагменти.

Мишей забивали через різні проміжки часу після впорскування, одержували зрізи пухлинної та непухлинної тканини, які забарвлювали згідно до традиційних імуногістохімічних протоколів за допомогою анти-FLAG M2 антитіла (компанія Kodak, 181) або реактивів для виявлення на основі стрептавідину. Оптимального рівня спрямованої доставки лікарського препарату до пухлини досягали, як правило, через 12 годин після впорскування. Було продемонстровано, що CGS-1 та CGS-2 зв'язувались з новоутвореною судинною сіткою як ксенотрансплантованої людської пухлини, так і мишачої тератокарциноми.

Приклад 6 - Спрямована доставка препарату до ксенотрансплантованої мишачої тератокарциноми F9 у "голих" мишей.

Автори цього винаходу індукували тверді пухлини на боках "голих" мишей шляхом підшкірного впорскування  $4 \times 10^6$  клітин мишачої тератокарциноми F9. Згадана пухлина у мишей росте дуже швидко, досягає діаметру 1см, приблизно, через один тиждень після впорскування і має добре розвинуту судинну сітку. З метою візуалізації спрямованої доставки препарату до пухлини, авторами цього винаходу була використана модифікація методології фотодетектування Фоллі та інших (1994), яка надає можливість кінетичної оцінки процесу спрямованої доставки препарату до пухлини та виведення антитіла на тій же самій тварині, яка візуалізується через різні проміжки часу, як докладно було описано перед тим (див. Фіг.4).

З метою спрямованої доставки препарату до згаданої пухлини та полегшення виявлення антитіл, scFv(CGS-1), scFv(CGS-2) та анти-лізоцимної scFv(D1.3) [МакКафферті (McCafferty) та інші, 1990] було помічено гомодимеризаційною міткою [Пек (Pack) та інші, 1993] шляхом субклонування згаданих антитіл у сайтах Sf1/Not1 вектору експресії pGIN50. Цей вектор є похідним pDN268 (Непі та інші, 1996b), у якого послідовність His6 згаданої мітки заміщено наступною послідовністю: GGC LTD TLQ AFT DQL EDE KSA LQT EIA HLL KEK EKL EFI LAA H, до складу якої входить цистеїновий залишок та амфіпатична спіраль білку Fos для ковалентної гомодимеризації фрагментів антитіл [Ейбот (Abate) та інші, 1990]. Повної ковалентної димеризації досягти не вдалось: до складу, приблизно, 30-50% фрагментів антитіл входили ковалентно зв'язані димери.

Фрагменти антитіла очищали за допомогою афінної хроматографії на колонках, які було одержано шляхом зв'язування лізоциму курячих яєць (D1.3) або 7B89 (анти-ED-B антитіла; Карнемолла та інші, 1996) з СКВ-активованою сефарозою (компанія Pharmacia Biotech, Піскатавей, Нью Джерсі, США). Супернатанти вводили до афінних підкладок, які після цього промивали PBS, PBS+0,5M NaCl та елюювали 100mM Et3N. Після цього згадані антитіла діалізували проти PBS.

Згадані антитіла мітили, як описано перед тим, після чого впорскували до хвостової вени мишей, які мали пухлини, з 100мкл 1мг/мл розчину scFv<sub>1</sub>-CY<sub>7</sub> у PBS, коли діаметр пухлин досягав, приблизно, 1см.

Як показано на Фіг.5, scFv(CGS-1) виявляли у пухлині впродовж, приблизно, трьох днів, незважаючи на те, що впродовж того ж самого періоду часу спостерігалось також його активне виведення зі згаданої пухлини. Однак мало місце також деяке забарвлювання стегнової кістки. Спрямована доставка CGS-1 до пухлини значно поліпшувалась завдяки введенню амфіпатичної спіралі, до складу якої входив цистеїновий залишок на С-кінці для стимулювання димеризації антитіла [Пек та інші, 1993]. І дійсно, локалізація димерного scFv(CGS-2)<sub>2</sub> з 24 до 72 годин, здавалось, суттєво не зменшувалась. У протилежність до цього, негативний контроль (димерне антитіло scFv(D1.3)<sub>2</sub>, анти-лізоцимне антитіло) демонстрував швидке видалення без локалізації, яка піддавалась би виявленню, у пухлині або стегновій кістці.

ScFv (28SI) демонструвало незначне проникнення до пухлини через 6 годин (не показано), і зовсім не виявлялось через 24 години або пізніше (Фіг.6). Визрівання афінності забезпечувало значне поліпшення спрямованої доставки згаданого антитіла до пухлини: так, scFv(CGS-2) ефективно досягало малих та великих пухлин F9, незважаючи на те, було воно мономером (Фіг.6) або димером (не показано). Через два дні було встановлено, що відсоток впорскуваної дози антитіла на грам пухлини складав, приблизно, 2 у разі scFv(CGS-2) мономеру та 3-4 у разі scFv(CGS-2) димеру. Доза, доставлена до пухлини scFv(CGS-2), також перевищувала дозу, доставлену scFv(CGS-1) (Фіг.5 та 6), і добре корелювала з відповідними афінностями (Таблиця 1). Здається, однак, що scFv(28SI) та scFv(CGS-2) є схильними до протеолітичного розщеплення і демонструють високий рівень засвоєння печінкою (Фіг.6), у той час, як антитіла scFv(CGS-1) були значно більш стійкими та демонстрували нижчий рівень засвоєння печінкою (Фіг.5).

#### Довідкова література

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, Imiunoconjugates 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. Inununochemistry 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).  
 Pliickthun, 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, *Einbo 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 C Milstein, *Nature* 349, 293-299, 1991.  
 WO94/13804 Yamada. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 761-799 (1983).  
 Zardi et al. *EMBO J.* 6, 2337-2342 (1987).

FIG. 1(a)

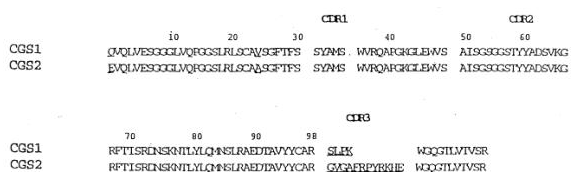


FIG. 1(b)

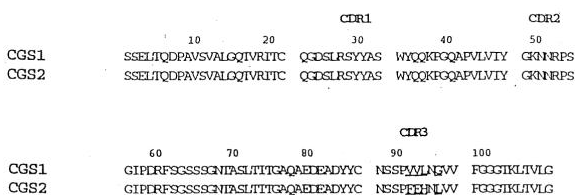


FIG. 2A

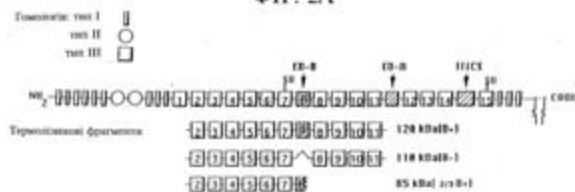
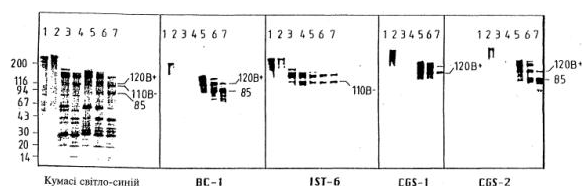


FIG. 2B







ФІГ. 6

