



(12) PATENT

(19) NO

(11) 332827

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

### Patentstyret

---

|      |            |   |      |                           |                                |
|------|------------|---|------|---------------------------|--------------------------------|
| (21) | Søknadsnr  | 20045237  | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 2003.04.30<br>PCT/IB2003/02187 |
| (22) | Inng.dag   | 2004.11.29  | (85) | Videreføringsdag          | 2004.11.29                     |
| (24) | Løpedag    | 2003.04.30  | (30) | Prioritet                 | 2002.04.30, GB, 0209896        |
| (41) | Alm.tilgj  | 2005.01.28  |      |                           |                                |
| (45) | Meddelt    | 2013.01.21  |      |                           |                                |
| (73) | Innehaver  | MolMed SpA, Via Olgettina, 58, IT-20132 MILANO, Italia  |      |                           |                                |
| (72) | Oppfinner  | Angelo Corti, c/o Dep. of Biological and Technological Res., San Raffaele H Scientific Inst, IT-20132 MILANO, Italia<br>Flavio Curnis, c/o Dep. of Biological and Technological Res., San Raffaele H Scientific Inst, IT-20132 MILANO, Italia |      |                           |                                |
| (74) | Fullmektig | Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge   |      |                           |                                |

---

|      |                       |  |  |  |  |
|------|-----------------------|--|--|--|--|
| (54) | Benevnelse            | <b>Anvendelse av et konjugat av et cytokin og minst en tumor-targeting-enhet for fremstilling av et medikament for behandling av cancer</b>  |  |  |  |
| (56) | Anførte publikasjoner | WO 2001061017 A2<br>CURNIS F. et al., Differential Binding of Drugs Containing the NGR Motif to CD13 Isoforms in Tumor Vessels, Epithelia, and Myeloid Cells, 2002, Cancer Research, Vol. 62, s. 867-874<br>CURNIS F. et al., Enhancement of tumor necrosis factor $\zeta$ antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13), 2000, Nature Biotechnology, Vol. 18, side 1185-1190 |  |  |  |
| (57) | Sammendrag            |  |  |  |  |

Et farmasøytisk preparat omfattende et konjugat av et cytokin og en tumortargeting-enhet (TTM) og en farmasøytisk akseptorbar eksipiens, hvori cytokinet er tilstede i en mengde som ikke induserer en negativ feedbackmekanisme.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av et konjugat og minst en tumortargeting-enhet for fremstilling av et medikament for behandling av cancer.

Antitumoraktiviteten til enkelte cytokiner er godt kjent og beskrevet. Noen cytokiner er allerede blitt anvendt terapeutisk i mennesker. Cytokiner slik som IL-2 og IFN- $\gamma$  har f.eks. vist positiv antitumoraktivitet i pasienter med forskjellige typer av tumorer, slik som nyre-metastatisk karsinom, hårcellelevkemi, Kaposi sarkom, melanom, multiple myelom, og lignende. Andre cytokiner som IFN $\beta$ , tumornekrosefaktoren (TNF)  $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL-1, 4, 6, 12, 15 og kolonistimulerende faktorer (CFS'er) har vist en viss antitumoraktivitet på enkelte tumortyper.

Generelt er den terapeutiske anvendelsen av cytokiner sterkt begrenset ved deres systemiske toksisitet. TNF ble f.eks. opprinnelig oppdaget for dens kapasitet med hensyn til å indusere den hemoragiske nekrose av enkelte tumorer, og for dens *in vitro* cytotoksiske effekt på forskjellige tumorlinjer, men den er siden blitt vist til å ha sterk pro-inflammatorisk aktivitet som i tilfellet av overproduksjonstilstander påvirker menneskekroppen på en farlig måte.

Da den systemiske toksisiteten er et fundamentelt problem med bruken av farmakologisk aktive mengder av cytokiner i mennesker, er nå nye derivater og terapeutiske strategier under utvikling, med det formål å redusere de toksiske effekter av denne klassen av biologiske effektorer mens man opprettholder deres terapeutiske effektivitet.

Noen nye betraktninger er rettet mot:

- a) utviklingen av fusjonsproteiner som kan avlevere TNF inn i tumoren og øke den lokale konsentrasjon. Fusjonsproteinene som består av TNF og tumorspesifikke antistoffer er f.eks. blitt produsert;
- b) utviklingen av TNF mutanter som opprettholder den antitumorale aktiviteten og som har en redusert systemisk toksisitet. Følgelig er mutanter som er i stand til selektiv gjenkjennelse av kun en reseptor allerede blitt fremstilt;

- c) anvendelsen av anti-TNF antistoffer som er i stand til å redusere enkelte toksiske effekter av TNF uten å kompromittere dens antitumorale aktivitet. Slike antistoffer er allerede beskrevet i litteraturen;
- d) anvendelsen av TNF derivater med en høyere halveringstid (f.eks. TNF konjugert med polyetylenglykol).

Fremstillingen av TNF derivater som er i stand til selektiv targetering av tumorsetene er nylig blitt rapportert. Et fusjonsprotein er f.eks. beskrevet, som oppnådd ved å fusjonere genet for den tunge kjeden til et anti-transferrin-reseptor mAb og TNF genet, eller et fusjonsprotein av TNF med "hengsel" regionen av et monoklonalt antistoff mot det tumor-assosierte TAG72 antigenet, eller et Fv-TNF fusjonsprotein.

EP 251 494 omhandler et system for å administrere et diagnostisk eller terapeutisk middel, som omfatter: et antistoff konjugert med avidin eller streptavidin, et middel som er i stand til å kompleksdanne det konjugerte antistoff og en forbindelse som består av det diagnostiske eller terapeutiske middel konjugert med biotin, som administrerer sekvensielt og som er passende forsinket, for å tillate lokaliseringen av det terapeutiske eller diagnostiske middel gjennom biotin-streptavidin interaksjonen på targetcellen som gjenkjennes ved antistoffet. De beskrevne terapeutiske eller diagnostiske midler omfatter metallchelater, særlig chelater av radionuklider og antitumormidler med lav molekylvekt slik som cisplatinum, doksorubicin osv.

EP 496 074 omhandler en metode som tilveiebringer den sekvensielle administrering av et biotinyllert antistoff, avidin eller streptavidin og et biotinyllert diagnostisk eller terapeutisk middel. Skjønt cytotoksiske midler som ricin er nevnt generisk, er bruken som vedrører radiomerkede forbindelser stort sett angitt.

WO 95/15979 omhandler en metode for å lokalisere svært toksiske midler på cellulære targeter, basert på administreringen av et første konjugat omfattende det spesifikke targetmolekyl konjugert med en ligand eller en anti-ligand etterfulgt av administreringen av et andre konjugat som består av det toksiske middel bundet til en anti-ligand eller til liganden.

WO 99/13329 omhandler en metode for å targetrette et molekyl mot tumorale angiogeniske kar, basert på konjugeringen av det nevnte molekyl med ligander av NGR reseptorer. En rekke molekyler er blitt foreslått som mulige kandidater, men doksorubicin er kun beskrevet spesifikt. Ingen bruk av ligander av NGR reseptorer som cytokinvehikler for å indusere immunresponser er omtalt.

I WO 01/61017 beskriver den aktuelle oppfinner hvordan han overraskende har funnet at den terapeutiske indeks til bestemte cytokiner kan forbedres påfallende og deres immunoterapeutiske egenskaper kan økes ved kobling med en ligand av aminopeptidase-N reseptoren (DC13). CD13 er et transmembran glykoprotein på 150 kDa som er svært konservert i forskjellige arter. Det er uttrykt på normale celler så vel som i myeloide tumorlinjer, i det angiogene endotel og i enkelte epitel. CD13 reseptoren er vanligvis identifisert som "NGR" reseptoren, ved at dens peptidligander deler aminosyre "NGR" motivet.

Der er fremdeles imidlertid et behov for ytterligere og forbedrede farmasøytiske preparater og metoder for behandling og diagnose av cancer.

Legemiddelavlevering og penetrering inn i neoplastiske celler er kritisk for effektiviteten av tumorkjemoterapi. Man har nå funnet at targetert avlevering av pikogram-doser av cytokiner overraskende øker penetreringen av kjemoterapeutiske legemidler. Mer detaljert har man funnet at avlevering av svært lave doser av cytokiner til tumorer og det tumor-assosierte miljø som inkluderer tumorvaskulatur representerer en ny måte å unngå negative feedback-

mekanismer på og for å preservere evnen derav til å endre legemiddel-penetreringsbarrierer. Den foreliggende oppfinnelse representerer således en ny og overraskende strategi for å øke den terapeutiske indeksen av kjemoterapeutiske legemidler. I en foretrukket utførelsesform har man funnet at ved å anvende vaskulær targeting oppnådd ved kobling av TNF med CNGRC, et peptid som targeterer tumorneovaskulaturen, øker denne behandling den terapeutiske effektiviteten av doksorubicin fra 8-10 ganger, uten noe bevis på økt toksisitet. Likeledes økte vaskulær targeting effektiviteten av melfalan, et annet kjemoterapeutisk legemiddel. Synergi med kjemoterapi ble observert med 3-5 ng/kg av targetert TNF (i.p.),  $10^6$ -ganger lavere enn  $LD_{50}$  og  $10^5$ -ganger lavere enn den dosen som er nødvendig for ikke-targetert TNF. I tillegg har man også funnet at targetert avlevering av lave doser av TNF til tumorkar ikke induserer frigivelsen av oppløselige TNF reseptorer i sirkulasjon. Man har altså funnet at RGD-TNF og  $IFN\gamma$ -NGR er aktive i pikogram-området. Man har også vist at NGR-TNF øker effekten av cisplatinum. Disse resultater indikerer at avleveringen av meget små mengder av cytokiner til tumorkar representerer en ny tilnæringsmåte for å unngå negative feedback-mekanismer og for å preservere deres evne til å forandre legemiddelpenetreringsbarrierer. Vaskulær targeting på denne måten representerer en ny strategi for å øke den terapeutiske indeksen til kjemoterapeutiske legemidler.

Det er beskrevet et farmasøytisk preparat som omfatter et konjugat av et cytokin og en tumor-targeting-enhet ("tumor targeting moiety" (TTM) og en farmasøytisk akseptert bærer, fortynningsmiddel eller eksipiens, hvori cytokinet er til stede i en mengde som ikke induserer en negativ feedback-mekanisme. Cytokinet er således til stede i en mengde som ikke induserer oppløselig cytokinreseptor-frigivelse.

I henhold til et første aspekt av den foreliggende oppfinnelse er det tilveiebragt anvendelse av et konjugat at et cytokin og minst en tumor-targeting-enhet (TTM) som inneholder NGR motivet eller RGD motivet for fremstilling av et medikament for behandling av cancer, hvor konjugatet er til stede i en mengde for å tilveiebringe en dosering i området fra 1 til 50 ng/kg.

Utførelsesformer av oppfinnelsen er beskrevet i kravene 2-19.

I en utførelsesform er konjugatet til stede i en mengde for å tilveiebringe en dosering i området fra 5 til 15 ng/kg.

I en utførelsesform er cytokinet et inflammatorisk cytokin.

I en annen utførelsesform er cytokinet et kjemoterapeutisk cytokin.

Cytokinet er foretrukket valgt fra: TNF, slik som  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$ ,  $IFN\alpha$ ,  $IFN\beta$ ,  $IFN\gamma$ , IL-1, 2, 4, 6, 12, 15, EMAP II, vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF), PDGF, PD-ECGF eller et kjemokin.

I en mere foretrukket utførelsesform er cytokinet  $TNF-\alpha$ ,  $TNF-\beta$  eller  $IFN-\gamma$ , mest foretrukket  $TNF-\alpha$  eller  $TNF-\beta$ .

I en utførelsesform er TTM en bindingspartner slik som en ligand for, eller antistoff mot et tumorcelleoverflatemolekyl slik som en reseptor, markør eller annen ekstracellulær komponent.

I en annen utførelsesform er TTM en tumorvaskulatur-targeting-enhet (TVTMM), og kan være en bindingspartner slik som en ligand for, eller antistoff mot, et tumorvaskulatur-celleoverflatemolekyl slik som en reseptor, markør eller annen ekstracellulær komponent.

I en utførelsesform er TTM et antistoff eller fragment derav.

I en annen utførelsesform er TTM en ligand eller fragment derav.

I en foretrukket utførelsesform inneholder TTM NGG motivet. I en mest foretrukket utførelsesform er TTM CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, cykoCVLNGRMEC, lineær eller cyklisk CNGRC.

I en annen foretrukket utførelsesform er TTM et peptid som inneholder RGD motivet. I en utførelsesform er TTM targetert mot aminopeptidase N (CD13),  $\alpha\beta$  integrin eller  $\alpha\beta 5$  integrin.

Kombinasjoner av targeting-enheter og cytokiner er vist i tabellen under.

| <u>Cytokin</u> | <u>Targeting-enhet</u>  |
|----------------|-------------------------|
| TNF- $\alpha$  | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| TNF- $\beta$   | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IFN- $\alpha$  | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IFN- $\beta$   | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IFN- $\gamma$  | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-2           | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-12          | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| EMAP II        | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| VEGF           | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-1           | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-6           | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-12          | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| PDGF           | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| PD-ECGF        | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| CXC kjemokin   | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| CC kjemokin    | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| C kjemokin     | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-15          | RGD-INNEHOLDENDE PEPTID |
| TNF- $\alpha$  | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| TNF- $\beta$   | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IFN- $\alpha$  | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IFN- $\beta$   | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IFN- $\gamma$  | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-2           | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-12          | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| EMAP II        | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| VEGF           | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-1           | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-6           | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-12          | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| PDGF           | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| PD-ECGF        | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| CXC kjemokin   | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| CC kjemokin    | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| C kjemokin     | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| IL-15          | NGR-INNEHOLDENDE PEPTID |
| TNF- $\alpha$  | Ligand for VEGFR        |
| TNF- $\beta$   | Ligand for VEGFR        |
| IFN- $\alpha$  | Ligand for VEGFR        |
| IFN- $\beta$   | Ligand for VEGFR        |
| IFN- $\gamma$  | Ligand for VEGFR        |

|               |                  |
|---------------|------------------|
| IL-2          | Ligand for VEGFR |
| IL-12         | Ligand for VEGFR |
| EMAP II       | Ligand for VEGFR |
| VEGF          | Ligand for VEGFR |
| IL-1          | Ligand for VEGFR |
| IL-6          | Ligand for VEGFR |
| IL-12         | Ligand for VEGFR |
| PDGF          | Ligand for VEGFR |
| PD-ECGF       | Ligand for VEGFR |
| CXC kjemokin  | Ligand for VEGFR |
| CC kjemokin   | Ligand for VEGFR |
| C kjemokin    | Ligand for VEGFR |
| IL-15         | Ligand for VEGFR |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot VEGFR     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot VEGFR     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot VEGFR     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot VEGFR     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot VEGFR     |
| IL-2          | Ab mot VEGFR     |
| IL-12         | Ab mot VEGFR     |
| EMAP II       | Ab mot VEGFR     |
| VEGF          | Ab mot VEGFR     |
| IL-1          | Ab mot VEGFR     |
| IL-6          | Ab mot VEGFR     |
| IL-12         | Ab mot VEGFR     |
| PDGF          | Ab mot VEGFR     |
| PD-ECGF       | Ab mot VEGFR     |
| CXC kjemokin  | Ab mot VEGFR     |
| CC kjemokin   | Ab mot VEGFR     |
| C kjemokin    | Ab mot VEGFR     |
| IL-15         | Ab mot VEGFR     |
| TNF- $\alpha$ | HIV-tat          |
| TNF- $\beta$  | HIV-tat          |
| IFN- $\alpha$ | HIV-tat          |
| IFN- $\beta$  | HIV-tat          |
| IFN- $\gamma$ | HIV-tat          |
| IL-2          | HIV-tat          |
| IL-12         | HIV-tat          |
| EMAP II       | HIV-tat          |
| VEGF          | HIV-tat          |
| IL-1          | HIV-tat          |
| IL-6          | HIV-tat          |



|               |                             |
|---------------|-----------------------------|
| IL-12         | HIV-tat                     |
| PDGF          | HIV-tat                     |
| PD-ECGF       | HIV-tat                     |
| CXC kjemokin  | HIV-tat                     |
| CC kjemokin   | HIV-tat                     |
| C kjemokin    | HIV-tat                     |
| IL-15         | HIV-tat                     |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| TNF- $\beta$  | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| IFN- $\beta$  | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| IL-2          | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| IL-12         | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| EMAP II       | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| VEGF          | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| IL-1          | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| IL-6          | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| IL-12         | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| PDGF          | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| PD-ECGF       | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| CXC kjemokin  | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| CC kjemokin   | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| C kjemokin    | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| IL-15         | Ligand for ICAM 1,2 eller 3 |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| IL-2          | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| IL-12         | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| EMAP II       | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| VEGF          | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| IL-1          | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| IL-6          | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| IL-12         | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| PDGF          | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| PD-ECGF       | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| CXC kjemokin  | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| CC kjemokin   | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |
| C kjemokin    | Ab mot ICAM 1,2 eller 3     |

|               |                         |
|---------------|-------------------------|
| IL-15         | Ab mot ICAM 1,2 eller 3 |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| TNF- $\beta$  | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| IFN- $\beta$  | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| IL-2          | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| IL-12         | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| EMAP II       | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| VEGF          | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| IL-1          | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| IL-6          | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| IL-12         | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| PDGF          | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| PD-ECGF       | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| CXC kjemokin  | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| CC kjemokin   | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| C kjemokin    | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| IL-15         | Ligand for PECAM-1/CD31 |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| IL-2          | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| IL-12         | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| EMAP II       | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| VEGF          | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| IL-1          | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| IL-6          | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| IL-12         | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| PDGF          | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| PD-ECGF       | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| CXC kjemokin  | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| CC kjemokin   | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| C kjemokin    | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| IL-15         | Ab mot PECAM-1/CD31     |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for VCAM-1       |
| TNF- $\beta$  | Ligand for VCAM-1       |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for VCAM-1       |
| IFN- $\beta$  | Ligand for VCAM-1       |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for VCAM-1       |

|               |                     |
|---------------|---------------------|
| IL-2          | Ligand for VCAM-1   |
| IL-12         | Ligand for VCAM-1   |
| EMAP II       | Ligand for VCAM-1   |
| VEGF          | Ligand for VCAM-1   |
| IL-1          | Ligand for VCAM-1   |
| IL-6          | Ligand for VCAM-1   |
| IL-12         | Ligand for VCAM-1   |
| PDGF          | Ligand for VCAM-1   |
| PD-ECGF       | Ligand for VCAM-1   |
| CXC kjemokin  | Ligand for VCAM-1   |
| CC kjemokin   | Ligand for VCAM-1   |
| C kjemokin    | Ligand for VCAM-1   |
| IL-15         | Ligand for VCAM-1   |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot VCAM-1       |
| TNF- $\beta$  | Ab mot VCAM-1       |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot VCAM-1       |
| IFN- $\beta$  | Ab mot VCAM-1       |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot VCAM-1       |
| IL-2          | Ab mot VCAM-1       |
| IL-12         | Ab mot VCAM-1       |
| EMAP II       | Ab mot VCAM-1       |
| VEGF          | Ab mot VCAM-1       |
| IL-1          | Ab mot VCAM-1       |
| IL-6          | Ab mot VCAM-1       |
| IL-12         | Ab mot VCAM-1       |
| PDGF          | Ab mot VCAM-1       |
| PD-ECGF       | Ab mot VCAM-1       |
| CXC kjemokin  | Ab mot VCAM-1       |
| CC kjemokin   | Ab mot VCAM-1       |
| C kjemokin    | Ab mot VCAM-1       |
| IL-15         | Ab mot VCAM-1       |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for Selektin |
| TNF- $\beta$  | Ligand for Selektin |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for Selektin |
| IFN- $\beta$  | Ligand for Selektin |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for Selektin |
| IL-2          | Ligand for Selektin |
| IL-12         | Ligand for Selektin |
| EMAP II       | Ligand for Selektin |
| VEGF          | Ligand for Selektin |
| IL-1          | Ligand for Selektin |
| IL-6          | Ligand for Selektin |

|               |  |
|---------------|--|
| IL-12         | Ligand for Selektin                            |
| PDGF          | Ligand for Selektin                            |
| PD-ECGF       | Ligand for Selektin                            |
| CXC kjemokin  | Ligand for Selektin                            |
| CC kjemokin   | Ligand for Selektin                            |
| C kjemokin    | Ligand for Selektin                            |
| IL-15         | Ligand for Selektin                            |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot Selektin                                |
| TNF- $\beta$  | Ab mot Selektin                                |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot Selektin                                |
| IFN- $\beta$  | Ab mot Selektin                                |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot Selektin                                |
| IL-2          | Ab mot Selektin                                |
| IL-12         | Ab mot Selektin                                |
| EMAP II       | Ab mot Selektin                                |
| VEGF          | Ab mot Selektin                                |
| IL-1          | Ab mot Selektin                                |
| IL-6          | Ab mot Selektin                                |
| IL-12         | Ab mot Selektin                                |
| PDGF          | Ab mot Selektin                                |
| PD-ECGF       | Ab mot Selektin                                |
| CXC kjemokin  | Ab mot Selektin                                |
| CC kjemokin   | Ab mot Selektin                                |
| C kjemokin    | Ab mot Selektin                                |
| IL-15         | Ab mot Selektin                                |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| TNF- $\beta$  | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| IFN- $\beta$  | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| IL-2          | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| IL-12         | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| EMAP II       | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| VEGF          | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| IL-1          | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller        |

|               |  |
|---------------|--|
|               | ActRIB   |
| IL-6          | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| IL-12         | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| PDGF          | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| PD-ECGF       | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| CXC kjemokin  | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| CC kjemokin   | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| C kjemokin    | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| IL-15         | Ligand for ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| IL-2          | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| IL-12         | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| EMAP II       | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| VEGF          | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| IL-1          | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| IL-6          | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| IL-12         | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| PDGF          | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |
| PD-ECGF       | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB     |

|               |  |
|---------------|--|
| CXC kjemokin  | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| CC kjemokin   | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| C kjemokin    | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| IL-15         | Ab mot ActRII, ActRIIB, ActRI eller ActRIB |
| TNF- $\alpha$ | Annexin V                                  |
| TNF- $\beta$  | Annexin V                                  |
| IFN- $\alpha$ | Annexin V                                  |
| IFN- $\beta$  | Annexin V                                  |
| IFN- $\gamma$ | Annexin V                                  |
| IL-2          | Annexin V                                  |
| IL-12         | Annexin V                                  |
| EMAP II       | Annexin V                                  |
| VEGF          | Annexin V                                  |
| IL-1          | Annexin V                                  |
| IL-6          | Annexin V                                  |
| IL-12         | Annexin V                                  |
| PDGF          | Annexin V                                  |
| PD-ECGF       | Annexin V                                  |
| CXC kjemokin  | Annexin V                                  |
| CC kjemokin   | Annexin V                                  |
| C kjemokin    | Annexin V                                  |
| IL-15         | Annexin V                                  |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for CD44                            |
| TNF- $\beta$  | Ligand for CD44                            |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for CD44                            |
| IFN- $\beta$  | Ligand for CD44                            |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for CD44                            |
| IL-2          | Ligand for CD44                            |
| IL-12         | Ligand for CD44                            |
| EMAP II       | Ligand for CD44                            |
| VEGF          | Ligand for CD44                            |
| IL-1          | Ligand for CD44                            |
| IL-6          | Ligand for CD44                            |
| IL-12         | Ligand for CD44                            |
| PDGF          | Ligand for CD44                            |
| PD-ECGF       | Ligand for CD44                            |
| CXC kjemokin  | Ligand for CD44                            |
| CC kjemokin   | Ligand for CD44                            |
| C kjemokin    | Ligand for CD44                            |

|               |                 |
|---------------|-----------------|
| IL-15         | Ligand for CD44 |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot CD44     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot CD44     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot CD44     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot CD44     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot CD44     |
| IL-2          | Ab mot CD44     |
| IL-12         | Ab mot CD44     |
| EMAP II       | Ab mot CD44     |
| VEGF          | Ab mot CD44     |
| IL-1          | Ab mot CD44     |
| IL-6          | Ab mot CD44     |
| IL-12         | Ab mot CD44     |
| PDGF          | Ab mot CD44     |
| PD-ECGF       | Ab mot CD44     |
| CXC kjemokin  | Ab mot CD44     |
| CC kjemokin   | Ab mot CD44     |
| C kjemokin    | Ab mot CD44     |
| IL-15         | Ab mot CD44     |
| TNF- $\alpha$ | Osteopontin     |
| TNF- $\beta$  | Osteopontin     |
| IFN- $\alpha$ | Osteopontin     |
| IFN- $\beta$  | Osteopontin     |
| IFN- $\gamma$ | Osteopontin     |
| IL-2          | Osteopontin     |
| IL-12         | Osteopontin     |
| EMAP II       | Osteopontin     |
| VEGF          | Osteopontin     |
| IL-1          | Osteopontin     |
| IL-6          | Osteopontin     |
| IL-12         | Osteopontin     |
| PDGF          | Osteopontin     |
| PD-ECGF       | Osteopontin     |
| CXC kjemokin  | Osteopontin     |
| CC kjemokin   | Osteopontin     |
| C kjemokin    | Osteopontin     |
| IL-15         | Osteopontin     |
| TNF- $\alpha$ | Fibronektin     |
| TNF- $\beta$  | Fibronektin     |
| IFN- $\alpha$ | Fibronektin     |
| IFN- $\beta$  | Fibronektin     |
| IFN- $\gamma$ | Fibronektin     |

|               |                          |
|---------------|--------------------------|
| IL-2          | Fibronektin              |
| IL-12         | Fibronektin              |
| EMAP II       | Fibronektin              |
| VEGF          | Fibronektin              |
| IL-1          | Fibronektin              |
| IL-6          | Fibronektin              |
| IL-12         | Fibronektin              |
| PDGF          | Fibronektin              |
| PD-ECGF       | Fibronektin              |
| CXC kjemokin  | Fibronektin              |
| CC kjemokin   | Fibronektin              |
| C kjemokin    | Fibronektin              |
| IL-15         | Fibronektin              |
| TNF- $\alpha$ | Kollagen type I eller IV |
| TNF- $\beta$  | Kollagen type I eller IV |
| IFN- $\alpha$ | Kollagen type I eller IV |
| IFN- $\beta$  | Kollagen type I eller IV |
| IFN- $\gamma$ | Kollagen type I eller IV |
| IL-2          | Kollagen type I eller IV |
| IL-12         | Kollagen type I eller IV |
| EMAP II       | Kollagen type I eller IV |
| VEGF          | Kollagen type I eller IV |
| IL-1          | Kollagen type I eller IV |
| IL-6          | Kollagen type I eller IV |
| IL-12         | Kollagen type I eller IV |
| PDGF          | Kollagen type I eller IV |
| PD-ECGF       | Kollagen type I eller IV |
| CXC kjemokin  | Kollagen type I eller IV |
| CC kjemokin   | Kollagen type I eller IV |
| C kjemokin    | Kollagen type I eller IV |
| IL-15         | Kollagen type I eller IV |
| TNF- $\alpha$ | Hyaluronat               |
| TNF- $\beta$  | Hyaluronat               |
| IFN- $\alpha$ | Hyaluronat               |
| IFN- $\beta$  | Hyaluronat               |
| IFN- $\gamma$ | Hyaluronat               |
| IL-2          | Hyaluronat               |
| IL-12         | Hyaluronat               |
| EMAP II       | Hyaluronat               |
| VEGF          | Hyaluronat               |
| IL-1          | Hyaluronat               |
| IL-6          | Hyaluronat               |



|               |                                |
|---------------|--------------------------------|
| IL-12         | Hyaluronat                     |
| PDGF          | Hyaluronat                     |
| PD-ECGF       | Hyaluronat                     |
| CXC kjemokin  | Hyaluronat                     |
| CC kjemokin   | Hyaluronat                     |
| C kjemokin    | Hyaluronat                     |
| IL-15         | Hyaluronat                     |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| TNF- $\beta$  | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| IFN- $\beta$  | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| IL-2          | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| IL-12         | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| EMAP II       | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| VEGF          | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| IL-1          | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| IL-6          | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| IL-12         | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| PDGF          | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| PD-ECGF       | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| CXC kjemokin  | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| CC kjemokin   | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| C kjemokin    | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| IL-15         | Ligand for FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| IL-2          | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| IL-12         | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| EMAP II       | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| VEGF          | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| IL-1          | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| IL-6          | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| IL-12         | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| PDGF          | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| PD-ECGF       | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| CXC kjemokin  | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| CC kjemokin   | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |
| C kjemokin    | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4     |

|               |                            |
|---------------|----------------------------|
| IL-15         | Ab mot FGF-1, 2, 3 eller 4 |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for IL-1R           |
| TNF- $\beta$  | Ligand for IL-1R           |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for IL-1R           |
| IFN- $\beta$  | Ligand for IL-1R           |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for IL-1R           |
| IL-2          | Ligand for IL-1R           |
| IL-12         | Ligand for IL-1R           |
| EMAP II       | Ligand for IL-1R           |
| VEGF          | Ligand for IL-1R           |
| IL-1          | Ligand for IL-1R           |
| IL-6          | Ligand for IL-1R           |
| IL-12         | Ligand for IL-1R           |
| PDGF          | Ligand for IL-1R           |
| PD-ECGF       | Ligand for IL-1R           |
| CXC kjemokin  | Ligand for IL-1R           |
| CC kjemokin   | Ligand for IL-1R           |
| C kjemokin    | Ligand for IL-1R           |
| IL-15         | Ligand for IL-1R           |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot IL-1R               |
| TNF- $\beta$  | Ab mot IL-1R               |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot IL-1R               |
| IFN- $\beta$  | Ab mot IL-1R               |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot IL-1R               |
| IL-2          | Ab mot IL-1R               |
| IL-12         | Ab mot IL-1R               |
| EMAP II       | Ab mot IL-1R               |
| VEGF          | Ab mot IL-1R               |
| IL-1          | Ab mot IL-1R               |
| IL-6          | Ab mot IL-1R               |
| IL-12         | Ab mot IL-1R               |
| PDGF          | Ab mot IL-1R               |
| PD-ECGF       | Ab mot IL-1R               |
| CXC kjemokin  | Ab mot IL-1R               |
| CC kjemokin   | Ab mot IL-1R               |
| C kjemokin    | Ab mot IL-1R               |
| IL-15         | Ab mot IL-1R               |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for CD31            |
| TNF- $\beta$  | Ligand for CD31            |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for CD31            |
| IFN- $\beta$  | Ligand for CD31            |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for CD31            |

|               |                 |
|---------------|-----------------|
| IL-2          | Ligand for CD31 |
| IL-12         | Ligand for CD31 |
| EMAP II       | Ligand for CD31 |
| VEGF          | Ligand for CD31 |
| IL-1          | Ligand for CD31 |
| IL-6          | Ligand for CD31 |
| IL-12         | Ligand for CD31 |
| PDGF          | Ligand for CD31 |
| PD-ECGF       | Ligand for CD31 |
| CXC kjemokin  | Ligand for CD31 |
| CC kjemokin   | Ligand for CD31 |
| C kjemokin    | Ligand for CD31 |
| IL-15         | Ligand for CD31 |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot CD31     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot CD31     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot CD31     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot CD31     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot CD31     |
| IL-2          | Ab mot CD31     |
| IL-12         | Ab mot CD31     |
| EMAP II       | Ab mot CD31     |
| VEGF          | Ab mot CD31     |
| IL-1          | Ab mot CD31     |
| IL-6          | Ab mot CD31     |
| IL-12         | Ab mot CD31     |
| PDGF          | Ab mot CD31     |
| PD-ECGF       | Ab mot CD31     |
| CXC kjemokin  | Ab mot CD31     |
| CC kjemokin   | Ab mot CD31     |
| C kjemokin    | Ab mot CD31     |
| IL-15         | Ab mot CD31     |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for EPHR |
| TNF- $\beta$  | Ligand for EPHR |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for EPHR |
| IFN- $\beta$  | Ligand for EPHR |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for EPHR |
| IL-2          | Ligand for EPHR |
| IL-12         | Ligand for EPHR |
| EMAP II       | Ligand for EPHR |
| VEGF          | Ligand for EPHR |
| IL-1          | Ligand for EPHR |
| IL-6          | Ligand for EPHR |

|               |                 |
|---------------|-----------------|
| IL-12         | Ligand for EPHR |
| PDGF          | Ligand for EPHR |
| PD-ECGF       | Ligand for EPHR |
| CXC kjemokin  | Ligand for EPHR |
| CC kjemokin   | Ligand for EPHR |
| C kjemokin    | Ligand for EPHR |
| IL-15         | Ligand for EPHR |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot EPHR     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot EPHR     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot EPHR     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot EPHR     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot EPHR     |
| IL-2          | Ab mot EPHR     |
| IL-12         | Ab mot EPHR     |
| EMAP II       | Ab mot EPHR     |
| VEGF          | Ab mot EPHR     |
| IL-1          | Ab mot EPHR     |
| IL-6          | Ab mot EPHR     |
| IL-12         | Ab mot EPHR     |
| PDGF          | Ab mot EPHR     |
| PD-ECGF       | Ab mot EPHR     |
| CXC kjemokin  | Ab mot EPHR     |
| CC kjemokin   | Ab mot EPHR     |
| C kjemokin    | Ab mot EPHR     |
| IL-15         | Ab mot EPHR     |
| TNF- $\alpha$ | Efrin           |
| TNF- $\beta$  | Efrin           |
| IFN- $\alpha$ | Efrin           |
| IFN- $\beta$  | Efrin           |
| IFN- $\gamma$ | Efrin           |
| IL-2          | Efrin           |
| IL-12         | Efrin           |
| EMAP II       | Efrin           |
| VEGF          | Efrin           |
| IL-1          | Efrin           |
| IL-6          | Efrin           |
| IL-12         | Efrin           |
| PDGF          | Efrin           |
| PD-ECGF       | Efrin           |
| CXC kjemokin  | Efrin           |
| CC kjemokin   | Efrin           |
| C kjemokin    | Efrin           |

|               |                |
|---------------|----------------|
| IL-15         | Efrin          |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for MMP |
| TNF- $\beta$  | Ligand for MMP |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for MMP |
| IFN- $\beta$  | Ligand for MMP |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for MMP |
| IL-2          | Ligand for MMP |
| IL-12         | Ligand for MMP |
| EMAP II       | Ligand for MMP |
| VEGF          | Ligand for MMP |
| IL-1          | Ligand for MMP |
| IL-6          | Ligand for MMP |
| IL-12         | Ligand for MMP |
| PDGF          | Ligand for MMP |
| PD-ECGF       | Ligand for MMP |
| CXC kjemokin  | Ligand for MMP |
| CC kjemokin   | Ligand for MMP |
| C kjemokin    | Ligand for MMP |
| IL-15         | Ligand for MMP |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot MMP     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot MMP     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot MMP     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot MMP     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot MMP     |
| IL-2          | Ab mot MMP     |
| IL-12         | Ab mot MMP     |
| EMAP II       | Ab mot MMP     |
| VEGF          | Ab mot MMP     |
| IL-1          | Ab mot MMP     |
| IL-6          | Ab mot MMP     |
| IL-12         | Ab mot MMP     |
| PDGF          | Ab mot MMP     |
| PD-ECGF       | Ab mot MMP     |
| CXC kjemokin  | Ab mot MMP     |
| CC kjemokin   | Ab mot MMP     |
| C kjemokin    | Ab mot MMP     |
| IL-15         | Ab mot MMP     |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for NG2 |
| TNF- $\beta$  | Ligand for NG2 |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for NG2 |
| IFN- $\beta$  | Ligand for NG2 |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for NG2 |

|               |                     |
|---------------|---------------------|
| IL-2          | Ligand for NG2      |
| IL-12         | Ligand for NG2      |
| EMAP II       | Ligand for NG2      |
| VEGF          | Ligand for NG2      |
| IL-1          | Ligand for NG2      |
| IL-6          | Ligand for NG2      |
| IL-12         | Ligand for NG2      |
| PDGF          | Ligand for NG2      |
| PD-ECGF       | Ligand for NG2      |
| CXC kjemokin  | Ligand for NG2      |
| CC kjemokin   | Ligand for NG2      |
| C kjemokin    | Ligand for NG2      |
| IL-15         | Ligand for NG2      |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot NG2          |
| TNF- $\beta$  | Ab mot NG2          |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot NG2          |
| IFN- $\beta$  | Ab mot NG2          |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot NG2          |
| IL-2          | Ab mot NG2          |
| IL-12         | Ab mot NG2          |
| EMAP II       | Ab mot NG2          |
| VEGF          | Ab mot NG2          |
| IL-1          | Ab mot NG2          |
| IL-6          | Ab mot NG2          |
| IL-12         | Ab mot NG2          |
| PDGF          | Ab mot NG2          |
| PD-ECGF       | Ab mot NG2          |
| CXC kjemokin  | Ab mot NG2          |
| CC kjemokin   | Ab mot NG2          |
| C kjemokin    | Ab mot NG2          |
| IL-15         | Ab mot NG2          |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for tenascin |
| TNF- $\beta$  | Ligand for tenascin |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for tenascin |
| IFN- $\beta$  | Ligand for tenascin |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for tenascin |
| IL-2          | Ligand for tenascin |
| IL-12         | Ligand for tenascin |
| EMAP II       | Ligand for tenascin |
| VEGF          | Ligand for tenascin |
| IL-1          | Ligand for tenascin |
| IL-6          | Ligand for tenascin |

|               |                     |
|---------------|---------------------|
| IL-12         | Ligand for tenascin |
| PDGF          | Ligand for tenascin |
| PD-ECGF       | Ligand for tenascin |
| CXC kjemokin  | Ligand for tenascin |
| CC kjemokin   | Ligand for tenascin |
| C kjemokin    | Ligand for tenascin |
| IL-15         | Ligand for tenascin |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot tenascin     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot tenascin     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot tenascin     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot tenascin     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot tenascin     |
| IL-2          | Ab mot tenascin     |
| IL-12         | Ab mot tenascin     |
| EMAP II       | Ab mot tenascin     |
| VEGF          | Ab mot tenascin     |
| IL-1          | Ab mot tenascin     |
| IL-6          | Ab mot tenascin     |
| IL-12         | Ab mot tenascin     |
| PDGF          | Ab mot tenascin     |
| PD-ECGF       | Ab mot tenascin     |
| CXC kjemokin  | Ab mot tenascin     |
| CC kjemokin   | Ab mot tenascin     |
| C kjemokin    | Ab mot tenascin     |
| IL-15         | Ab mot tenascin     |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for PD-ECGFR |
| TNF- $\beta$  | Ligand for PD-ECGFR |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for PD-ECGFR |
| IFN- $\beta$  | Ligand for PD-ECGFR |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for PD-ECGFR |
| IL-2          | Ligand for PD-ECGFR |
| IL-12         | Ligand for PD-ECGFR |
| EMAP II       | Ligand for PD-ECGFR |
| VEGF          | Ligand for PD-ECGFR |
| IL-1          | Ligand for PD-ECGFR |
| IL-6          | Ligand for PD-ECGFR |
| IL-12         | Ligand for PD-ECGFR |
| PDGF          | Ligand for PD-ECGFR |
| PD-ECGF       | Ligand for PD-ECGFR |
| CXC kjemokin  | Ligand for PD-ECGFR |
| CC kjemokin   | Ligand for PD-ECGFR |
| C kjemokin    | Ligand for PD-ECGFR |

|               |                     |
|---------------|---------------------|
| IL-15         | Ligand for PD-ECGFR |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot PD-ECGFR     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot PD-ECGFR     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot PD-ECGFR     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot PD-ECGFR     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot PD-ECGFR     |
| IL-2          | Ab mot PD-ECGFR     |
| IL-12         | Ab mot PD-ECGFR     |
| EMAP II       | Ab mot PD-ECGFR     |
| VEGF          | Ab mot PD-ECGFR     |
| IL-1          | Ab mot PD-ECGFR     |
| IL-6          | Ab mot PD-ECGFR     |
| IL-12         | Ab mot PD-ECGFR     |
| PDGF          | Ab mot PD-ECGFR     |
| PD-ECGF       | Ab mot PD-ECGFR     |
| CXC kjemokin  | Ab mot PD-ECGFR     |
| CC kjemokin   | Ab mot PD-ECGFR     |
| C kjemokin    | Ab mot PD-ECGFR     |
| IL-15         | Ab mot PD-ECGFR     |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for TNFR     |
| TNF- $\beta$  | Ligand for TNFR     |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for TNFR     |
| IFN- $\beta$  | Ligand for TNFR     |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for TNFR     |
| IL-2          | Ligand for TNFR     |
| IL-12         | Ligand for TNFR     |
| EMAP II       | Ligand for TNFR     |
| VEGF          | Ligand for TNFR     |
| IL-1          | Ligand for TNFR     |
| IL-6          | Ligand for TNFR     |
| IL-12         | Ligand for TNFR     |
| PDGF          | Ligand for TNFR     |
| PD-ECGF       | Ligand for TNFR     |
| CXC kjemokin  | Ligand for TNFR     |
| CC kjemokin   | Ligand for TNFR     |
| C kjemokin    | Ligand for TNFR     |
| IL-15         | Ligand for TNFR     |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot TNFR         |
| TNF- $\beta$  | Ab mot TNFR         |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot TNFR         |
| IFN- $\beta$  | Ab mot TNFR         |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot TNFR         |



|               |                  |
|---------------|------------------|
| IL-2          | Ab mot TNFR      |
| IL-12         | Ab mot TNFR      |
| EMAP II       | Ab mot TNFR      |
| VEGF          | Ab mot TNFR      |
| IL-1          | Ab mot TNFR      |
| IL-6          | Ab mot TNFR      |
| IL-12         | Ab mot TNFR      |
| PDGF          | Ab mot TNFR      |
| PD-ECGF       | Ab mot TNFR      |
| CXC kjemokin  | Ab mot TNFR      |
| CC kjemokin   | Ab mot TNFR      |
| C kjemokin    | Ab mot TNFR      |
| IL-15         | Ab mot TNFR      |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for PDGFR |
| TNF- $\beta$  | Ligand for PDGFR |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for PDGFR |
| IFN- $\beta$  | Ligand for PDGFR |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for PDGFR |
| IL-2          | Ligand for PDGFR |
| IL-12         | Ligand for PDGFR |
| EMAP II       | Ligand for PDGFR |
| VEGF          | Ligand for PDGFR |
| IL-1          | Ligand for PDGFR |
| IL-6          | Ligand for PDGFR |
| IL-12         | Ligand for PDGFR |
| PDGF          | Ligand for PDGFR |
| PD-ECGF       | Ligand for PDGFR |
| CXC kjemokin  | Ligand for PDGFR |
| CC kjemokin   | Ligand for PDGFR |
| C kjemokin    | Ligand for PDGFR |
| IL-15         | Ligand for PDGFR |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot PDGFR     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot PDGFR     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot PDGFR     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot PDGFR     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot PDGFR     |
| IL-2          | Ab mot PDGFR     |
| IL-12         | Ab mot PDGFR     |
| EMAP II       | Ab mot PDGFR     |
| VEGF          | Ab mot PDGFR     |
| IL-1          | Ab mot PDGFR     |
| IL-6          | Ab mot PDGFR     |

|               |                 |
|---------------|-----------------|
| IL-12         | Ab mot PDGFR    |
| PDGF          | Ab mot PDGFR    |
| PD-ECGF       | Ab mot PDGFR    |
| CXC kjemokin  | Ab mot PDGFR    |
| CC kjemokin   | Ab mot PDGFR    |
| C kjemokin    | Ab mot PDGFR    |
| IL-15         | Ab mot PDGFR    |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for PSMA |
| TNF- $\beta$  | Ligand for PSMA |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for PSMA |
| IFN- $\beta$  | Ligand for PSMA |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for PSMA |
| IL-2          | Ligand for PSMA |
| IL-12         | Ligand for PSMA |
| EMAP II       | Ligand for PSMA |
| VEGF          | Ligand for PSMA |
| IL-1          | Ligand for PSMA |
| IL-6          | Ligand for PSMA |
| IL-12         | Ligand for PSMA |
| PDGF          | Ligand for PSMA |
| PD-ECGF       | Ligand for PSMA |
| CXC kjemokin  | Ligand for PSMA |
| CC kjemokin   | Ligand for PSMA |
| C kjemokin    | Ligand for PSMA |
| IL-15         | Ligand for PSMA |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot PSMA     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot PSMA     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot PSMA     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot PSMA     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot PSMA     |
| IL-2          | Ab mot PSMA     |
| IL-12         | Ab mot PSMA     |
| EMAP II       | Ab mot PSMA     |
| VEGF          | Ab mot PSMA     |
| IL-1          | Ab mot PSMA     |
| IL-6          | Ab mot PSMA     |
| IL-12         | Ab mot PSMA     |
| PDGF          | Ab mot PSMA     |
| PD-ECGF       | Ab mot PSMA     |
| CXC kjemokin  | Ab mot PSMA     |
| CC kjemokin   | Ab mot PSMA     |
| C kjemokin    | Ab mot PSMA     |

|               |                                  |
|---------------|----------------------------------|
| IL-15         | Ab mot PSMA                      |
| TNF- $\alpha$ | Vitronektin                      |
| TNF- $\beta$  | Vitronektin                      |
| IFN- $\alpha$ | Vitronektin                      |
| IFN- $\beta$  | Vitronektin                      |
| IFN- $\gamma$ | Vitronektin                      |
| IL-2          | Vitronektin                      |
| IL-12         | Vitronektin                      |
| EMAP II       | Vitronektin                      |
| VEGF          | Vitronektin                      |
| IL-1          | Vitronektin                      |
| IL-6          | Vitronektin                      |
| IL-12         | Vitronektin                      |
| PDGF          | Vitronektin                      |
| PD-ECGF       | Vitronektin                      |
| CXC kjemokin  | Vitronektin                      |
| CC kjemokin   | Vitronektin                      |
| C kjemokin    | Vitronektin                      |
| IL-15         | Vitronektin                      |
| TNF- $\alpha$ | Laminin                          |
| TNF- $\beta$  | Laminin                          |
| IFN- $\alpha$ | Laminin                          |
| IFN- $\beta$  | Laminin                          |
| IFN- $\gamma$ | Laminin                          |
| IL-2          | Laminin                          |
| IL-12         | Laminin                          |
| EMAP II       | Laminin                          |
| VEGF          | Laminin                          |
| IL-1          | Laminin                          |
| IL-6          | Laminin                          |
| IL-12         | Laminin                          |
| PDGF          | Laminin                          |
| PD-ECGF       | Laminin                          |
| CXC kjemokin  | Laminin                          |
| CC kjemokin   | Laminin                          |
| C kjemokin    | Laminin                          |
| IL-15         | Laminin                          |
| TNF- $\alpha$ | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| TNF- $\beta$  | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| IFN- $\alpha$ | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| IFN- $\beta$  | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| IFN- $\gamma$ | Ligand for onkoføtal fibronektin |

|               |                                  |
|---------------|----------------------------------|
| IL-2          | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| IL-12         | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| EMAP II       | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| VEGF          | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| IL-1          | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| IL-6          | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| IL-12         | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| PDGF          | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| PD-ECGF       | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| CXC kjemokin  | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| CC kjemokin   | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| C kjemokin    | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| IL-15         | Ligand for onkoføtal fibronektin |
| TNF- $\alpha$ | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| TNF- $\beta$  | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| IFN- $\alpha$ | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| IFN- $\beta$  | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| IFN- $\gamma$ | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| IL-2          | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| IL-12         | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| EMAP II       | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| VEGF          | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| IL-1          | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| IL-6          | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| IL-12         | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| PDGF          | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| PD-ECGF       | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| CXC kjemokin  | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| CC kjemokin   | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| C kjemokin    | Ab mot onkoføtal fibronektin     |
| IL-15         | Ab mot onkoføtal fibronektin     |

Det vil forstås at i den ovennevnte tabell representerer betegnelsen "Ab" antistoff, og at antistoffene og ligandene inkluderer fragmenter derav.

I særlig foretrukne utførelsesformer omfatter konjugatet TNF- $\alpha$  eller TNF- $\beta$  og et NGR-inneholdende peptid, eller TNF- $\alpha$  eller TNF- $\beta$  og et RGD-inneholdende peptid. I en foretrukket utførelsesform er konjugatet i form av et fusjonsprotein.

I en annen utførelsesform er konjugatet i form av nukleinsyre.

Preparatet kan videre omfatte et annet antitumormiddel eller diagnostisk tumor-avbildingsforbindelse. Det ytterligere antitumormiddel er foretrukket doksorubicin, melfalan eller cisplatin.

Det tilveiebringes en metode for å behandle eller diagnostisere cancer som omfatter at det til en pasient med behov for det samme administreres et konjugat eller et farmasøytisk preparat i en effektiv mengde, hvori nevnte mengde ikke induserer en negativ feedback-mekanisme.

For å nå cancerceller i faste tumorer, må kjemoterapeutiske legemidler trenge inn i tumorblodkarene, krysse karveggen og til slutt migrere gjennom interstitium. Heterogen tumorperfusjon, vaskulær permeabilitet og celledensitet, og økt interstitielt trykk kan representere kritiske barrierer som kan begrense penetreringen av legemidler inn i neoplastiske celler langt fra tumorkar og følgelig effektiviteten av kjemoterapi (1). Strategier for å forbedre legemiddelpenetrering inn i tumorer er derfor av stor eksperimentell og klinisk interesse.

En voksende bevismengde foreslår at tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF), og inflammatorisk cytokin utstyrt med potent anti-tumoraktivitet, kan utnyttes for dette formål. Tilsetningen av TNF til regional isolert lem-perfusjon med melfalan eller doksorubicin har f.eks. produsert høyere responsrater i pasienter med ekstremitet-bløtvev-sarkomer eller -melanomer enn dem oppnådd med kjemoterapeutiske legemidler alene (2-6). TNF-indusert endring av endotel-barrierefunksjon, reduksjon av tumor-interstitielt trykk, økt kjemoterapeutisk legemiddelpenetrering og tumorkar-ødeleggelse menes å være viktige mekanismer i synergien mellom TNF og kjemoterapi (3, 4, 7-10). Dessverre er systemisk administrering av TNF fulgt av prohibitiv toksisitet, idet den maksimalt tolererte dosen (8-10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) er 10-50 ganger lavere enn den estimerte effektive

dosen (11, 12). På grunn av dette er systemisk administrering av TNF blitt oppgitt og den kliniske bruken av dette cytokin er begrenset til locoregionale behandlinger. Likevel har enkelte trekk ved TNF aktiviteten, særlig selektiviteten for tumor-assosierte kar og synergien med kjemoterapeutiske legemidler, fortsatt å fremme håp når det gjelder muligheten om mere oppfattende terapeutiske anvendelser (13).

De vaskulære effekter av TNF tilveiebringer den logiske begrunnelsen for utvikling av en "vaskulær targeting" strategi med det formål å øke den lokale effektiviteten og muliggjøre systemisk administrering av terapeutiske doser. Man har nylig vist at targetert avlevering av TNF til tumorkar kan oppnås ved kobling av dette protein med CNGRC peptidet, en aminopeptidase N (CD13) ligand som targeterer tumor-neovaskulaturen (14). I forbindelse med det foreliggende arbeid, har man undersøkt om vaskulær targeting med lave doser av dette konjugat, betegnet NGR-TNF, kan øke penetreringen av kjemoterapeutiske legemidler i tumorer og forbedre deres effektivitet. Man viser at systemisk administrering av pikogramdoser av NGR-TNF (3-5 ng/kg) til mus, seks størrelsesordener lavere enn  $LD_{50}$ , er tilstrekkelig til å øke anti-tumoraktiviteten av melfalan og doksorubicin, uten noen indikasjon på økt toksisitet. I tillegg tilveiebringes det bevis for at vaskulær targeting med NGR-TNF kan redusere legemiddel-penetreringsbarrierer og øke mengden doksorubicin som når cancerceller. Til slutt er det vist at avlevering av minimale mengder NGR-TNF til tumorkar overvinner et annet stort problem som er forbundet med systemisk administrering av relativt høye doser av TNF, dvs. induksjon av oppløselige TNF inhibitorer.

Forskjellige foretrukne trekk og utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelse skal nå beskrives ved hjelp av eksempler.

Skjønt teknikkene som er nevnt heri generelt er vel kjent innen fagområdet, skal det spesielt vises til Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989) og Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4<sup>th</sup> Ed, John Wiley & Sons, Inc (så vel som den fullstendige versjon *Current Protocols in Molecular Biology*).

### **Negative feedback-mekanismer**

Negative feedback-mekanismer er kjent innen fagområdet og kan inkludere: oppløselig reseptor-frigivelse og induksjon av andre cytokiner, hormoner eller biologiske midler på et systemisk eller lokalt nivå slik at de direkte eller indirekte svekker aktiviteten til det targeterte cytokin anvendt ifølge oppfinnelsen. Induksjonen av oppløselige inhibitorer eller decoy reseptorer er eksempler på direkte inhibitorer. IL-10, TGF- $\beta$  eller andre anti-inflammatoriske cytokiner kan indirekte forhindre kaskaden av hendelser som utløses ved inflammatoriske cytokiner.

### **Reseptor-frigivelse**

Denne betegnelsen vedrører cellenes evne til å spalte av det ekstracellulære domenet av en cytokinreseptor og å friggi det inn i sirkulasjonen som et oppløselig produkt. I mange tilfeller er disse spaltingsprodukter fremdeles i stand til å binde deres ligander. I motsetning, binder imidlertid ikke den gjenværende delen av den membran-bundne reseptor lenger ligander og følgelig blir cellene desensibilisert overfor virkningen av et spesielt cytokin. Slike oppløselige reseptorer er blitt beskrevet for en rekke cytokiner, som inkluderer IL-4, 6, 6, IGF, TNF- $\alpha$  og IFN- $\gamma$ .

### **Konjugat**

Den foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av et konjugat som er et molekyl som omfatter minst ett targeting-protein som er koblet til i det minste cytokin dannet gjennom genetisk fusjon eller kjemisk kobling. Med "koblet til" mener man at de første og andre sekvenser er assosiert slik at den andre sekvensen er i stand

til å bli transportert ved hjelp av den første sekvensen til en targetcelle. Således inkluderer konjugater fusjonsproteiner hvori transportproteinet er knyttet til et cytokin via deres polypeptid-ryggrader gjennom genetisk ekspresjon at et DNA molekyl som koder for disse proteiner, direkte syntetiserte proteiner og koblede proteiner hvori pre-formede sekvenser er assosiert ved hjelp av et tverrbindingsmiddel. Betegnelsen anvendes også heri for å inkludere assosiasjoner, slik som aggregater, av cytokinet med targeting-proteinet. Ifølge en utførelsesform kan den andre sekvensen omfatte en polynukleotidsekvens. Denne utførelsesform kan ses som et protein/nukleinsyre-kompleks.

Den andre sekvensen kan være fra den samme arten som den første sekvensen, men er tilstede i konjugatet ifølge oppfinnelsen på en måte som er forskjellig fra den naturlige situasjonen, eller fra en annen art.

Konjugatene anvendt i den foreliggende oppfinnelse kan rettes mot en celle slik at den effektorfunksjon som svarer til polypeptidsekvensen koblet til transportsekvensen kan finne sted.

Peptidet kan kobles direkte til cytokinet eller indirekte gjennom en spacer, som kan være en enkelt aminosyre, en aminosyresekvens eller en organisk rest, slik som 6-aminocapryl-N-hydroksysuccinimid.

Peptidliganden er foretrukket forenet med cytokin-N-terminusen og minimaliserer således eventuell interferens ved bindingen av det modifiserte cytokin til dets reseptor. Alternativt kan peptidet være knyttet til aminosyrerester som er amido- eller karboksylsyre-bindingsakseptorer, som kan være naturlig forekommende på molekylet eller artfisielt insertert ved å anvende genmanipulasjonsteknikker. Det modifiserte cytokin er foretrukket fremstilt ved å anvende et cDNA som omfatter en 5'-tilgrensende sekvens som koder for peptidet.

I henhold til en foretrukket utførelsesform er der tilveiebrakt et konjugeringsprodukt mellom TNF og CNGRC sekvensen hvori amino-terminalen av TNF er knyttet til CNGRC peptidet gjennom spacer G (glycin).



## Cytokiner

Legemiddelpenetrering inn i neoplastiske celler er kritisk for effektiviteten av kjemoterapi av faste tumorer. For å nå cancerceller i faste tumorer, må kjemoterapeutiske legemidler trenge inn i blodkarene, krysse karveggen og til slutt migrere gjennom interstitium. Heterogen tumorperfusjon, vaskulær permeabilitet og celledensitet, og økt interstitielt trykk kan representere kritiske barrierer som kan begrense penetreringen av legemidler inn i neoplastiske celler og følgelig effektiviteten av kjemoterapi. Cytokiner som har effekten med å innvirke på disse faktorer er derfor anvendbare i den foreliggende oppfinnelse. En ikke-begrensede liste av cytokiner som kan anvendes i den foreliggende oppfinnelse er:  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$ ,  $IFN\alpha$ ,  $IFN\beta$ ,  $IFN\gamma$ , IL-1, 2, 4, 6, 12, 15, EMAP II, vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF), PDGF, PD-ECGF eller et kjemokin.

## TNF

TNF virker som et inflammatorisk cytokin og har effekten med å indusere forandring av den endoteliale barriererefunksjon, redusere tumor-interstitielt trykk og øke kjemoterapeutisk legemiddelpenetrering og tumorkar skade.

Det første forslag om at et tumornekrotiserende molekyl eksisterte ble fremmet når det ble observert at cancerpasienter sporadisk viste spontan regresjon av deres tumorer etter bakterieinfeksjoner. Senere studier i 1960-årene indikerte at vert-assosierte (eller endogene) mediatorer, produsert som svar på bakterieprodukter, sannsynligvis var ansvarlige for de observerte effektene. I 1975 ble det vist at en bakterielt induert sirkulerende faktor hadde sterk anti-tumoraktivitet overfor tumorer som var implantert i huden til mus. Denne faktor, betegnet tumornekrosefaktor (TNF), ble deretter isolert, klonet og funnet til å være prototypen av en familie av molekyler som er involvert med immunregulering og inflammasjon. Reseptorene for TNF og de andre membranene til TNF superfamilien utgjør også en superfamilie av relaterte proteiner.

TNF-relaterte ligander har vanligvis en rekke felles trekk. Disse trekk inkluderer ikke en høy grad av total aminosyre (aa) sekvenshomologi. Med unntak av nervevekstfaktor (NGF) og TNF-beta, er alle ligander syntetisert som type II transmembranproteiner (ekstracellulær C-terminus) som inneholder et kort cytoplasmisk segment (10-80 aa rester) og en relativt lang ekstracellulær region (140-215 aa rester). NGF, som strukturelt er ubeslektet med TNF, er kun inkludert i denne superfamilien pga. dens evne til å binde til TNFRSF lav affinitet NGF reseptoren (LNGFR). NGF har et klassisk signalsekvenspeptid og utskilles. TNF- $\beta$  har i motsetning, skjønt den også utskilles fullstendig, en primærstruktur som er mere i slekt med type II transmembranproteiner. TNF- $\beta$  kan betraktes som et type II protein med et ikke-funksjonelt, eller ineffektivt, transmembransegment. Generelt danner TNFSF medlemmer trimeriske strukturer, og deres monomerer er sammensatt av beta-kjeder som orienterer seg selv til en dobbelt-ark struktur. Som en følge av denne trimere strukturen til disse molekyler, er det foreslått at ligandene og reseptorene av TNSF og TNFRSF superfamiliene gjennomgår "clustering" under signaltransduksjon.

TNF- $\alpha$ : Human TNF- $\alpha$  er et 233 aa rest, ikke-glykosylert polypeptid som eksisterer som enten et transmembran- eller oppløselig protein. Når uttrykt som et 26 kDa membranbundet protein, består TNF- $\alpha$  av et 29 aa rest cytoplasmisk domene, et 28 aa rest transmembransegment og en 176 aa rest ekstracellulær region. Det oppløselige protein dannes ved hjelp av en proteolytisk spaltning via et 85 kDa TNF-alfa omdannende enzym (TACE), som danner et 17 kDa, 157 aa rest molekyl som normalt sirkulerer som en homotrimer.

TNF- $\beta$ /LT- $\alpha$ : TNF- $\beta$ , forøvrig kjent som lymfotoksin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) er et molekyl hvis kloning var kontemporær med den til TNF- $\alpha$ . Skjønt TNF- $\beta$  sirkulerer som et 171 aa rest, 25 kDa glykosylert peptid, er en større form blitt funnet som har en lengde på 194 aa rester. Det humane TNF- $\beta$  cDNA koder for en åpen leseramme på 205 aa rester (202 i musen), og sannsynligvis forekommer noen slags protolytisk prosessering under sekresjon. Som med TNF- $\alpha$ , eksisterer sirkulerende TNF- $\beta$  som en ikke-kovalent bundet trimer og er kjent til å binde til de samme reseptorene som TNF- $\alpha$ .

I en utførelsesform er TNF en mutant form av TNF i stand til selektiv binding til en eller flere av TNF reseptorene (Loetscher H *et al* (1993) J Biol Chem 268:26350-7; Van Ostade X *et al* (1993) Nature 361:266-9).

Mange andre inflammatoriske cytokiner har også egenskapen med å øke endotelial kar-permeabilitet, og det vil forstås at oppfinnelsen kan anvendes på slike cytokiner, sammen med midler som øker ekspresjon av slike cytokiner. Inflammatoriske cytokiner, også kjent som pro-inflammatoriske cytokiner, er en rekke polypeptider og glykoproteiner med molekylvekter mellom 5 kDa og 70 kDa. De har en stimulerende effekt på den inflammatoriske responsen. De viktigste inflammatoriske cytokiner er TNF, IL-1, IL-6 og IL-8.

En tabell over enkelte cytokiner som er klassifisert som inflammatoriske cytokiner er vist under:

## Inflammatoriske cytokiner

| Gruppe   | Individuelle cytokiner  |
|--|---|
| Endogene cytokiner                                 | IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6  |
| Opp-regulering                                     | IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\alpha$ , INF- $\beta$ ,<br>kjemokiner            |
| Stimulering av produksjon av akutt-fase reaktanter | IL-1, IL-6, IL-11, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ,<br>TGF- $\beta$ , LIF, OSM, CNTF |
| Kjemoattraktant-cytokiner                          |   |
| CXC kjemokiner                                     | IL-8, PF-4, PBP, NAP-2, $\beta$ -TG   |
| CC kjemokiner                                      | MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, MCP-2,<br>MCP-3, RANTES                     |
| C kjemokiner                                       | Lymfotaktin   |
| Stimulering av inflammatoriske cytokiner           | IL-12   |

TGF- $\beta$ : transformasjonsvekstfaktor; LIF: levkemiinhiberende faktor; OSM: oncostatin M; CNTF: ciliar nevrotrofisk faktor; PF-4: platefaktor 4; PBP: platebasisprotein; NAP-2: nøytrofilit aktiviseringsprotein 2;  $\beta$ -TG:  $\beta$ -tromboglobulin; MIP: makrofag-inflammatorisk protein; MCP: monocytt kjemoattraktant protein.

Oppreguleringen av en inflammatorisk respons utføres også ved IL-11, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , særlig ved medlemmene i kjemokin-superfamilien. TGF- $\beta$  har i noen situasjoner en rekke inflammatoriske aktiviteter som inkluderer kjemoattraktanteffekter på nøytrofiler, T lymfocytter og inaktiverede monocytter.

**IL2**

På grunn av den sentrale rollen til IL-2/IL-2R systemet i mediering av immun-responser og inflammatoriske responser, er det åpenbart at måling og manipulering av dette systemet har viktig diagnostiske og terapeutiske konse-

kvenser. IL-2 har vist seg som lovende som et anti-cancerlegemiddel på grunn av dets evne til å stimulere proliferasjon og aktivitetene av tumor-angripende LAK og TIL (tumor-infiltrerende lymfocytter) celler. Problemer med IL-2 toksisitet er imidlertid fremdeles av betydning og fortjener undersøkelse. Den foreliggende oppfinnelse tar fatt på dette problemet.

### **IL-15**

Interleukin 15 (IL-15) er et nytt cytokin som deler en rekke biologiske egenskaper med, men som mangler aminosyresekvenshomologi med, IL-2. IL-15 ble opprinnelig identifisert i medier kondisjonert ved en apenyre-epitelcellelinje (CVI/EBNA) basert på dets mitogene aktivitet på den murine T-cellelinjen, CTLL-2. IL-15 ble også uavhengig funnet som et cytokin produsert ved hjelp av en human adult T-cellelevkemicellelinje (HuT-102) som stimulerte T-celleproliferasjon og ble betegnet IL-T. Ved hjelp av dets aktivitet som en stimulator av T-celler, NK-celler, LAK-celler og TIL'er, er IL-2 for tiden i kliniske forsøk som tester dets eventuelle bruk i behandling av cancer og virus-infeksjoner. På grunn av de tilsvarende biologiske aktiviteter, bør IL-15 ha tilsvarende terapeutisk potensiale.

### **Kjemokiner**

Kjemokiner er en superfamilie av for det meste små, utskilte proteiner som virker ved leukocyttrafikkering, rekruttering og resirkulering. De spiller også en kritisk rolle i en rekke patofysiologiske prosesser slik som allergiske responser, infeksjoner og autoimmune sykdommer, angiogenese, inflammasjon, tumorvekst og hematopoetisk utvikling. Omtrent 80 prosent av disse proteiner har fra 66 til 78 aminosyrer (aa) i deres modne form. Resten er større med ytterligere aa forekommende oppstrøms for proteinkjernen som en del av et forlenget C-terminalt segment. Alle kjemokiner signalerer gjennom syv transmembran domene G-protein koblede reseptorer. Der er minst sytten kjente kjemokinreseptorer, og mange av disse reseptorer utviser tilfeldige bindings-

egenskaper hvorved en rekke forskjellige kjemokiner kan signalere gjennom den samme reseptoren.

Kjemokiner er oppdelt i subfamilier basert på konserverte aa sekvensmotiver. De fleste familiemedlemmer har minst fire konserverte cysteinrester som danner to intramolekulære disulfidbindinger. Subfamiliene er definert ved posisjonen av de første to cysteinrester:

- Alfa-subfamilien, også betegnet CXC kjemokinene, har en aa som separerer de første to cysteinrester. Denne gruppen kan videre deles opp basert på tilstedeværelsen eller fraværet av et glu-leu-arg (ELR) aa motiv umiddelbart før den første cysteinresten. Der er for tiden fem CXC-spesifikke reseptorer og de er betegnet CXCR1 til CXCR5. ELR<sup>+</sup> kjemokinene binder til CXCR2 og virker generelt som nøytrofile kjemoattraktanter og aktivatorer. ELR-kjemokinene binder CXCR3 til -5 og virker primært på lymfocytter. På tidspunktet for dette arbeid, er 14 forskjellige humane gener som koder for CXC kjemokiner blitt rapportert innen den vitenskapelige litteraturen med noe ytterligere diversitet fra alternativ spleising.
- I beta-subfamilien, også betegnet CC kjemokinene, er de første to cysteiner i nabostilling til hverandre uten noen intervenerende aa. Der er for tiden 24 distinkte humane beta-subfamiliemedlemmer. Reseptorene for denne gruppen er betegnet CCR1 til CCR11. Targetceller for forskjellige CC familiemedlemmer inkluderer de fleste typer av leukocytter.
- Der er to kjente proteiner med kjemokinhomologi som faller utenfor alfa- og beta-subfamiliene. Lymfotaktin er det ene medlemmet av gamma-klassen (C kjemokin) som har mistet de første og tredje cysteiner. Lymfotaktinreseptoren betegnes XCR1. Fraktalkin, det eneste kjente medlem av delta-klassen (CX<sub>3</sub>C kjemokin), har tre intervenerende aa mellom de første to cysteinrestene. Dette molekyl er enestående blant kjemokinene ved at det er et transmembranprotein med N-terminal kjemokindomenet fusjonert til len lang mucin-lignende stilk. Fraktalkin-Reseptoren er kjent som CX<sub>3</sub>CR1.

## **VEGF**

Den foreliggende oppfinnelse kan også anvendes på vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF). Angiogenese er en prosess for utvikling av nye blodkar fra preeksisterende vaskulatur. Den spiller en vesentlig rolle ved embryoutvikling, normal vekst av vev, sårheling, den kvinnelige reproduksjonscyklus (dvs. ovulasjon, menstrasjon og placentautvikling), så vel som en viktig rolle i forbindelse med en rekke sykdommer. Særlig interesse har fokusert på cancer, fordi tumorer ikke kan vokse ut over noen få millimeters størrelse uten å utvikle en ny blodtilførsel. Angiogenese er altså nødvendig for spredningen av veksten av tumorcellemetastaser.

En av de viktigste vekst- og overlevelsesfaktorer for endotel er VEGF. VEGF inducerer angiogenese og endotelial celleproliferasjon og den spiller en viktig rolle i regulering av vaskulogenese. VEGF er et heparin-bindingglykoprotein som utskilles som en homodimer på 45 kDa. De fleste typer av celler, men vanligvis ikke selve endotelcellene, utskiller VEGF. Siden den opprinnelige oppdagede VEGF, VEGF-A, øker vaskulær permeabilitet, var den kjent som vaskulær permeabilitetsfaktor. I tillegg bevirker VEGF vasodilatasjon, delvis gjennom stimulering av nitrogenoksyd-syntase i endotelceller. VEGF kan også stimulere cellemigrering og inhibere apoptose. Der er en rekke spleisevarianter av VEGF-A. De viktigste inkluderer: 121, 165, 189 og 206 aminosyrer (aa), som hver omfatter en spesifikk exon addisjon.

## **EMAP II**

Endotelial-Monocyt Aktiverende Polypeptid-II (EMAP-II) er et cytokin som er en antiangiogenisk faktor i tumorvaskulær utvikling, og som sterkt inhiberer tumorvekst. Rekombinant humant EMAP-II er et 18,3 kDa protein inneholdende 166 aminosyreester. EMAP II er også blitt funnet til å øke endotelial karpermeabilitet.

### **PDGF**

Det er også blitt foreslått at plate-avledete vekstfaktor (PDGF) antagonister kan øke legemiddel-opptak og terapeutiske effekter for en rekke anti-tumormidler i vanlige faste tumorer. PDGF er et cytokin på 30 kDa og frigis ved hjelp av plater i forbindelse med sår og stimulerer nærliggende celler til å vokse og reparere såret.

### **PD-ECGF**

Som navnet foreslår, ble plateavledet endotelial celle vekstfaktor (PD-ECGF) opprinnelig isolert fra plater basert på dens evne til å indusere mitose i endotelceller. Dens relaterte protein er gliostatin.

### **Targeting-enhet**

Man har funnet at den terapeutiske indeksen til cytokiner kan økes ved homing av målretting av cytokinet til tumorkar. I tillegg, siden det er kjent at tumorceller kan utgjøre en del av kledningen av tumorvaskulatur, omfatter den foreliggende oppfinnelse målretting mot tumorceller direkte så vel som deres vaskulatur. En hvilken som helst passende tumor eller tumorvaskulatur, særlig endotelcelle, targeting-enhet inneholdende NGR eller RGD motivet kan anvendes i konjugatet anvendt ifølge oppfinnelsen. Mange slike targeting-enheter er kjente og disse er innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelse. Det er beskrevet heri en targeting-enhet som er en bindingspartner, slik som en ligand, for en reseptor uttrykt ved en tumorcelle, eller en bindingspartner, slik som et antistoff, mot en markør eller en komponent av den ekstracellulære matriks assosiert med tumorceller. Det er beskrevet heri en targeting-enhet som er en bindingspartner, slik som en ligand, for en reseptor uttrykt ved tumor-assosierte kar, eller en bindingspartner, slik som et antistoff, mot en endotelial markør eller en komponent av den ekstracellulære matriks assosiert med angiogene kar. Betegnelsen bindingspartner anvendes heri i sin mest omfattende betydning og inkluderer både naturlige og syntetiske bindingsdomener. Det er beskrevet heri en bindingspartner som kan være et antistoff eller et fragment derav slik som Fab, Fv, enkelt-tråd Fv, et peptid eller en peptid-mimetika, nemlig et peptid-lignende molekyl i stand til binding til reseptoren, markør av ekstracellulær komponent av cellen.



Det etterfølgende angir et eksempel på targeting domener og reseptorer/markører.

### **CD13**

Det har overraskende blitt funnet at den terapeutiske indeksen til visse cytokiner kan forbedres markert og deres immunoterapeutiske egenskaper kan økes ved kobling med en ligand av aminopeptidase-N reseptor (CD13). CD13 er et trans-membran glykoprotein på 150 kDa som er svært konserverert i forskjellige arter. Det er uttrykt på normale celler så vel som i myeloide tumorlinjer, i det angiogene endotel og i enkelte epitel. CD13 reseptor er vanligvis identifisert som "NGR" reseptor, ved at dens peptidligander deler det aminosure "NGR" motivet. Liganden er foretrukket et rettkjedet eller cyklisk peptid omfattende NGR motivet, slik som CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, cykloCVLNGRMEC eller cykloCNGRC, eller mere foretrukket peptidet CNGRC. Ytterligere detaljer kan man finne i WO 01/61017 som er innlemmet heri ved referanse.

### **TNF reseptor**

Som med medlemmer av TNF superfamilien, deler medlemmer av TNF reseptor superfamilien (TNFRSF) også en rekke felles trekk. Spesielt er molekyler i TNFRSF alle type I (N-terminus ekstracellulær) transmembran glykoproteiner som inneholder ett til seks ligand-binding, 40 aa rest cystein-rike motiver i deres ekstracellulære domene. I tillegg er funksjonelle TNFRSF

medlemmer vanligvis trimere eller multimerer komplekser som er stabilisert ved intracystein-disulfidbindinger. Til forskjell fra de fleste medlemmer av TNFRSF, eksisterer TNFRSF medlemmene i både membran-bundne og oppløselige former. Til slutt, skjønt aa sekvenshomologi i de cytoplasmiske domener til superfamiliemedlemmene ikke overskriver 25%, er en rekke reseptorer i stand til å transduere apoptotiske signaler i forskjellige typer celler, som foreslår en felles funksjon.

**CD40:** CD40 er et 50 kDa, 277 aa rest transmembranglykoprotein som oftest er assosiert med B-celle proliferasjon og differensiering. Uttrykt på forskjellige celletyper, koder human CD40 cDNA for en 20 aa rest signalsekvens, en 173 aa rest ekstracellulær region, et 22 aa rest transmembransegment, og et 62 aa rest cytoplasmisk domene. Der er fire cystein-rike motiver i den ekstracellulære region som er forbundet med en jukstamembransekvens som er rik på seriner og threoniner. Celler som er kjent til å uttrykke CD40 inkluderer endotelceller.

**TNFR1/p55/CD120a:** TNFR1 er et 55 kDa, 455 aa rest transmembranglykoprotein som tilsynelatende er uttrykt i praktisk talt alle kjernedannede pattedyrceller. Molekylet har en 190 aa rest ekstracellulær region, et 25 aa rest transmembransegment, og et 220 aa rest cytoplasmisk domene. Både TNF- $\alpha$  og TNF- $\beta$  binder til TNFR1. Blant de mange celler som er kjent til å uttrykke TNFR1 er endotelceller.

**TNFR2/p75/CD120b:** Human TNFR2 er et 75 kDa, 461 aa rest transmembranglykoprotein som opprinnelig er isolert fra et humant lungefibroblastbibliotek. Denne reseptor består av en 240 aa rest ekstracellulær region, et 27 aa rest transmembransegment og et 173 aa rest cytoplasmisk domene. Oppløselige former av TNFR2 er blitt identifisert, som tilsynelatende er et resultat av proteolytisk spaltning ved en metalloproteinase betegnet TRRE (TNF-Receptor Releasing Enzyme). Frigivelsesprosessen synes å være uavhengig av den for oppløselige TNFR1. Blant de mange celler som er kjent for å uttrykke TNFR2 er endotelceller.

**CD134L/OX40L:** OX40, reseptoren for OX40L, er en T-celle aktiveringsmarkør med en begrenset ekspresjon som synes å fremme overlevelsen (og kanskje forlenge immunresponsen) til CD4<sup>+</sup> T-celler på inflammasjonssteder.

OX40L viser også begrenset ekspresjon. Til nå er kun aktiverte CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-celler, B-celler og vaskulære endotelceller blitt rapportert til å uttrykke denne faktor. Den humane ligand er et 32 kDa, 183 aa rest glykosylert polypeptid som består av et 21 aa rest cytoplasmisk domene, et 23 aa rest transmembransegment, og en 139 aa rest ekstracellulær region.

### **VEGF reseptorfamilie**

Der er tre reseptorer i VEGF reseptorfamilien. De har de felles egenskapene med multiple IgG-lignende ekstracellulære domener og tyrosin kinaseaktivitet. Enzymdomenene til VEGF reseptor 1 (VEGF R1, også kjent som Flt-1), VEGF R2 (også kjent som KDR eller Flk-1), og VEGF R3 (også kjent som Flt-4) er oppdelt ved en insertert sekvens. Endotelceller uttrykker også ytterligere VEGF reseptorer, Neuropilin-1 og Neuropilin-2. VEGF-A binder til VEGF R1 og VEGF R2 og til Neuropilin-1 og Neuropilin-2. PlGF og VEGF-B binder VEGF R1 og Neuropilin-1. VEGF-C og -D binder VEGF R3 og VEGF R2. HIV-tat og peptider avledet derfra er også blitt funnet til å targetere VEGFR.

### **PDGF reseptorer**

PDGF reseptorer er uttrykt i det stromale kompartment i de fleste vanlige faste tumorer. Inhibering av stromalt uttrykte PDGF reseptorer i en rottekolon karsinom-modell reduserer det interstitielle tumorfluidtrykk og øker tumortranskapillær transport.

### **PSMA**

Prostata spesifikt membranantigen (PSMA) er også en utmerket tumor-endotelial markør, og PSMA antistoffer kan dannes.

### **Celle-adhesjonsmolekyler (CAM'er)**

Celle-adhesjonsmolekyler (CAM'er) er celleoverflateproteiner involvert i bindingen av celler, vanligvis leukocytter, til hverandre, til endotelceller, eller til ekstracellulær matriks. Spesifikke signaler produsert som svar på sår og infeksjon kontrollerer ekspresjon og aktiveringen av visse av disse adhesjonsmolekyler. Interaksjoner og responsene som deretter initieres ved binding av disse CAM'er til deres reseptorer/ligander spiller viktige roller i medieringen av de inflammatoriske reaksjoner og immunreaksjoner som utgjør en retning av kroppens forsvar mot disse krenkelser. De fleste CAM'er som til nå er karakterisert faller inn under tre generelle familier av proteiner: immunoglobulin (Ig) superfamilien, integrinfamilien eller selektinfamilien.

Et medlem av selektinfamilien av celleoverflatemolekyler, L-Selektin, består av et NH<sub>2</sub>-terminal lektin type C domene, et EGF-lignende domene, to komplement-kontrolldomener, en 15 aminosyrerest spacer, en transmembransekvens og et kort cytoplasmisk domene.

Tre ligander for L-Selektin på endotelceller er blitt identifisert, hvor alle inneholder O-glykosylert mucin eller mucin-lignende domener. Den første liganden, GlyCAM-1, er nesten utelukkende uttrykt i perifere og mesenteriske lymfeknute høy-endotelial venuler. Den andre L-Selektin ligand, opprinnelig betegnet sgp90, er nå blitt vist til å være CD34. Dette sialomucin-lignende glykoprotein, ofte anvendt som en overflatemarkør for rensing av pluripotente stamceller, viser vaskulær ekspresjon i en rekke ikke-lymfoide vev, så vel som på kapillærene til perifere lymfeknuter. Den tredje liganden for L-Selektin er MadCAM 1, et mucin-lignende glykoprotein funnet på mukosal lymfeknute høy-endotelial venuler.

P-Selektin, et medlem av selektinfamilien av celleoverflatemolekyler, består av et NH<sub>2</sub>-terminal lektin type C domene, et EGF-lignende domene, ni komplementkontrollomener, et transmembrandomene, og et kort cytoplasmisk domene.

Tetrasakkaridet sialyl Lewisx (sLex) er blitt identifisert som en ligand for både P- og E-Selektin, men P- E- og L-Selektin kan alle binde sLex og sLea under passende betingelser. P-Selektin binder også angivelig selektivt til et 160 kDa glykoprotein tilstede på murine myeloide celler og til et glykoprotein på myeloide celler, blod-neutrofiler, monocytter og lymfocytter betegnet P-Selektin glykoprotein ligand-1 (PSGL-1), en ligand som også kan binde E-Selektin. P-Selektin-mediert rulling av leukocytter kan inhiberes fullstendig ved hjelp av et monoklonalt antistoff som er spesifikt for PSLG-1 som foreslår at skjønt P-Selektin kan binde til en rekke glykoproteiner under *in vitro* betingelser, er det sannsynlig at fysiologisk viktig binding er mere begrenset. En rekke bevis indikerer at P-Selektin er involvert i adhesjonen av myeloide celler, så vel som B og en undergruppe av T-celler, til aktivert endotel.

### **Ig superfamilie CAM'er**

Ig superfamilie CAM'ene er kalsium-uavhengige transmembranglykoproteiner. Medlemmer av Ig superfamilien inkluderer de intercellulære adhesjonsmolekyler (ICAM'er), vaskulær-celle-adhesjonsmolekyl(VCAM-1), plate-endotel-celle-adhesjonsmolekyl (PECAM-1), og nerve-celle-adhesjonsmolekyl (NCAM). Hvert Ig superfamilie CAM har et ekstracellulært domene, som inneholder flere Ig-lignende intrakjede disulfid-bundne sløyfer med konserverte cysteinrester, et transmembrandomene, og et intracellulært domene som interagerer med cytoskjelettet. De binder typisk integriner eller andre Ig superfamilie CAM'er. De nevronale CAM'er har vært implisert i nevronal mønstring ("patterning"). Endotelial CAM'er spiller en viktig rolle ved immunrespons og inflammasjon.

Mere detaljert, er vaskulær celle-adhesjonsmolekyl (VCAM-1, CD106, eller INCAM-110), plateendotelcelle-adhesjonsmolekyl (PECAM-1/CD31) og intracellulære adhesjonsmolekyler 1, 2 & 3 (ICAM-1, 2 & 3) fem funksjonelt relaterte CAM/IgSF molekyler som er kritisk involvert i leukocyt-bindevev/endotelcelle-interaksjoner. Uttrykt hovedsakelig på endotelceller, regulerer disse molekyler generelt leukocyt-migrering over blodkarvegger og tilveiebringer festepunkter for utvikling av endotel under angiogenese og er egnet for targeting i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse.

Humant CD31 er et 130 kDa, type I (ekstracellulær N-terminus) transmembran-glykoprotein som tilhører den celle-adhesjonsmolekyl (CAM) eller C2-lignende subgruppen av IgSF. Det modne molekyl har en lengde på 711 aminosyre (aa) rester og inneholder en 574 aa rest ekstracellulær region, et 19 aa rest transmembransegment, og en 118 aa rest cytoplasmisk hale. I den ekstracellulære regionen, er der ni potensielle N-koblede glykosylerings seter og, med en forutsagt molekylvekt på 80 kDa, fremgår det at mange av disse seter er okkuperte. Det mest slående trekk for den ekstracellulære regionen er tilstedeværelsen av seks Ig-homologienheter som ligner C2 domenet av IgSF. Skjønt de kan variere i antall, er tilstedeværelsen av disse molekyler et felles trekk for alle IgSF adhesjonsmolekyler (ICAM-1, 2, 3 & VCAM-1).

### **Integriner**

Integriner er ikke-kovalent koblede heterodimerer av  $\alpha$  og  $\beta$  sub-enheter. Til nå er 16  $\alpha$  sub-enheter og 8  $\beta$  sub-enheter blitt identifisert. Disse kan kombinere på forskjellige måter for å danne forskjellige typer av integrinreseptorer. Ligandene for flere av integrinene er adhesive ekstracellulær matriks (ECM) proteiner slik som fibronectin, vitronectin, kollagener og laminin. Mange integriner gjenkjenner aminosyresekvensen RGD (arginin-glycin-asparaginsyre) som er tilstede i fibronectin eller de andre adhesive proteiner hvortil de binder. Peptider og proteinfragmenter som inneholder RGD sekvensen kan anvendes for å modulere aktivitetene av de RGD-gjenkjennende

integrinene. Den foreliggende oppfinnelse kan således benytte, som targeting-enheten, peptider som gjenkjennes ved integriner. Disse peptider er konvensjonelt kjent som "RGD-inneholdende peptider". Disse peptider kan inkludere peptidmotiver som er blitt identifisert som binding til integriner. Disse motiver inkluderer aminosyresekvensene: DGR, NGR og CRGDC. Peptidmotivene kan være lineære eller cycliske. Slike motiver er beskrevet mer detaljert i de etterfølgende patenter som er innlemmet heri ved referanse hva angår deres beskrivelse av et RGD peptid: US patent 5 536 814 som beskriver cyclisert CRGDCL, CRGDCA og GACRGDCLGA. US patent 4 578 079 vedrører syntetiske peptider med formel X-RGD-T/C-Y hvor X og Y er aminosyrer. US patent 5 547 936 beskriver et peptid som inkluderer sekvensen X-RGD-XX hvor X kan være en aminosyre. US patent 4 988 621 beskriver en rekke RGD-inkluderende peptider. US patent 4 879 237 beskriver et generelt peptid med formelen RGD-Y hvor Y er en aminosyre, og peptidet G-RGD-AP. US patent 5 169 930 beskriver peptidet RGDSPK som binder til  $\alpha$ v  $\beta$ 1 integrin. US patenter 5 498 694 og 5 700 908 vedrører det cytoplasmiske domenet av  $\beta$ 3 integrin sub-enheten som strengt tatt ikke er et RGD-inneholdende peptid; skjønt det inneholder sekvensen RDG. WO 97/08203 beskriver cycliske peptider som er strukturelle mimetika eller RGD-bindingsseter. US patent 5 612 311 beskriver 15 RGD-inneholdende peptider som er i stand til å bli cyclisert ved enten C-C kobling eller gjennom andre grupper slik som penicillamin eller merkaptopropionsyreanaloger. US patent 5 672 585 beskriver en generell formel som omfatter RGD-inneholdende peptider. En foretrukket gruppe av peptider er dem hvor asparaginsyreresten av RGD er derivatisert til et O-metoksytyrosinderivat. US patent 5 120 829 beskriver et RGD celle fastgjørings-fremmede bindingssete og et hydrofobisk fastgjøringsdomene. D formen er beskrevet i US patent 5 587 456. US patent 5 648 330 beskriver et cyclisk RGD-inneholdende peptid som har høy affinitet for GP Iib/IIIa.

I en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse er targeting-enheten en ligand for  $\alpha v \beta 3$  eller  $\alpha v \beta 5$  integrin.

### **Activin**

Celler som er kjent til å uttrykke ActRII inkluderer endotelceller. ActRIIB ekspresjon parallelliserer den for ActRII, og er igjen funnet i endotelceller. Celler kjent til å uttrykke ActRI inkluderer vaskulære endotelceller. ActRIB er også blitt identifisert i endotelceller.

### **Angiogenin**

Angiogenin (ANG) er et 14 kDa, ikke-glykosylert polypeptid som er betegnet for dets evne til å indusere vekst av nye blodkar.

### **Annexin V**

Annexin V er et medlem av kalsium- og fosfolipid-bindingsfamilien av proteiner med vaskulær antikoagulerende aktivitet. Forskjellige synonymer for Annexin V eksisterer: placentalt protein 4 (PP4), placentalt antikoagulerende protein I (PAP I), calphobindin I (CPB-I), kalsiumavhengig fosfolipid-bindingsprotein 33 (CaBP33), vaskulært antikoagulerende protein alfa (VACa), anchorin CII, lipocortin-V, endonexin II, og tromboplastin-inhibitor. Antallet bindingssteder for Annexin V er blitt rapportert til å være 6 - 24 x 10<sup>6</sup>/celle i tumorceller og 8,8 x 10<sup>6</sup>/celle for endotelceller.

### **CD44**

Et annet molekyl som tilsynelatende er involvert i hvitt blodlegeme adhesivhendelser er CD44, et molekyl som er ubikvitært uttrykt på både hematopoetiske og ikke-hematopoetiske celler. CD44 utmerker seg ved dets evne til å danne alternativt spleisede former, hvorav mange er forskjellige i deres aktiviteter. Denne eiendommelige fleksibilitet har ført til spekulasjon om at CD44, via dets skiftende natur, spiller en rolle ved enkelte av metodene som tumorceller benytter for å utvikle seg vellykket gjennom vekst og metastaser. CD44



er et 80-250 kDa type I (ekstracellulær N-terminus) transmembranglykoprotein. Celler kjent for å uttrykke CD44H inkluderer vaskulære endotelceller.

Der er multiple ligander for CD44, som inkluderer osteopontin, fibronectin, kollagen type I og IV og hyaluronat. Binding til fibronectin er rapportert til å være begrenset til CD44 varianter som uttrykker chondroitinsulfat, med chondroitinsulfat-fastgjøringssete lokalisert til exoner v8-v11. Hyaluronat-binding er foreslått til å være mulig for praktisk talt alle CD44 isoformer. Ett av de prinsipale bindingsseter er foreslått til å være sentrert i exon 2 og til å involvere lysin- og argininrester. Faktorer andre enn den enkle ekspresjonen av et kjent hyaluronat-bindingsmotiv synes også å være nødvendige for hyaluronatbinding. Vellykket hyaluronatbinding forenkles ved kombinasjonen av uttrykte exoner, en distinktiv cytoplasmisk hale, glykosyleringsmønstre, og aktivitetstilstanden til cellen. Således, med hensyn til dets hyaluronat-bindingsfunksjon, eksisterer en stor del av "potensiell" fleksibilitet inne i hver CD44-uttrykkende celle.

### **Fibroblast-vekstfaktor (FGF)**

Navnet "fibroblast-vekstfaktor" (FGF) er en begrensende beskrivelse for denne familie av cytokiner. Funksjonen til FGF'er er ikke begrenset til cellevekst. Skjønt noen av FGF'ene riktignok inducerer fibroblastproliferasjon, er det opprinnelige FGF molekyl (FGF-2 eller FGF basisk) nå kjent til også å inducere proliferasjon av endotelceller, kondrocytter, glatte muskelceller, melanocytter, så vel som andre celler. Den kan også fremme adipocyttdifferensiering, inducere makrofag og fibroblast IL-6 produksjon, stimulere astrocyttmigrering, forlenge nevronal overlevelse. Hittil består FGF superfamilien av 23 medlemmer, hvorav alle inneholder en konserverte 120 aminosyre (aa) kjerneregion som inneholder seks identiske, innflettede aminosyrer.

FGF-1: Human FGF-1 (også kjent som FGF sur ("acidic"), FGFa, ECGF og HBGF-1) er et 17-18 kDa ikke-glykosylert polypeptid som uttrykkes ved en

rekke celler fra alle tre "germ" lag. Bindingsmolekylet kan være en FGF reseptor. Celler kjent til å uttrykke FGF-1 inkluderer endotelceller.

FGF-2: Human FGF-2, forøvrig kjent som FGF basisk, HBGF-2, og EDGF, er et 18 kDa, ikke-glykosylert polypeptid som viser både intracellulær og ekstracellulær aktivitet. Etter sekresjon, sekvestreres FGF-2 på enten celleoverflate HS eller matriksglykosaminoglykaner. Skjønt FGF-2 utskilles som en monomer, synes celleoverflate HS til å dimerisere monomerisk FGF-2 i en ikke-kovalent side-til-side konfigurasjon som deretter er i stand til dimerisering og aktivering av FGF reseptorer. Celler som er kjent til å uttrykke FGF-2 inkluderer endotelceller.

FGF-3: Human FGF-3 er produktet av *int-2* genet [dvs. avledet fra *integrasjon region-2*, en region på muskromosom 7 som inneholder et gen (*int-2/FGF-3*) som tilfeldigvis aktiveres etter retroviral insersjon]. Molekylet syntetiseres som et 28-32 kDa, 222 aa glykoprotein som inneholder en rekke peptidmotiver. Celler som er rapportert til å uttrykke FGF-3 er begrenset til developable celler og tumorer. Tumorer kjent til å uttrykke FGF-3 inkluderer brystkarsinomer og kolon cancercellelinjer.

FGF-4: Human FGF-4 er et 22 kDa, 176 aa glykoprotein som er produktet av et developabel-regulert gen. Molekylet syntetiseres som en 206 aa prekursor som inneholder en stor, dårlig definert 30 aa signalsekvens pluss to heparin-bindingmotiver (ved aa 51-55 og 140-143). Heparin-bindingsetene relaterer direkte til FGF-4 aktivitet; heparin/heparan regulerer evnen til FGF-4 til å aktivere FGFR1 og FGFR2. Celler kjent til å uttrykke FGF-4 inkluderer både tumorceller og embryoniske celler. Dens identifikasjon i human magecancer gir grunn til en alternativ betegnelse (*/hst-1/hst*), mens dens isolering i Kaposis sarkom gir anledning til en annen (K-FGF).

### **IL-1R**

IL-1 utviser sine effekter ved binding til spesifikke reseptorer. To distinkte IL-1 reseptor-bindingsproteiner, pluss et ikke-bindingssignalerings-aksessorisk protein er blitt identifisert. Hver har tre ekstracellulære immunoglobulin-lignende (Ig-lignende) domener, som kvalifiserer dem for medlemskap i typen IV cytokinreseptorfamilien. De to reseptor-bindingsproteinene betegnes henholdsvis type I IL-1 reseptor (IL-1 RI) og type II IL-1 reseptor (IL-1 RII). Human IL-1 RI er et 552 aa, 80 kDa transmembranglykoprotein som er blitt isolert fra endotelceller.

### **RTK**

Den nye familien av reseptortyrosinkinase (RTK), Eph-reseptorene og deres ligander efriner, er blitt funnet til å være involvert i vaskulær assemblering, angiogenese, tumorigenese og metastase. Det er også vært denne klasse A Eph reseptorer og deres ligander som er økt i tumor og assosiert vaskulatur.

### **MMP**

Matriks-metalloproteinaser (MMP'er) har vært implisert i tumorvekst, angiogenese, invasjon og metastase. De er også blitt foreslått for anvendelse som tumormarkører.

### **NG2**

NG2 er et stort, integralmembran, kondroitinsulfat-proteoglykan som først ble identifisert som et celleoverflatemolekyl uttrykt ved umodne nerveceller. Deretter ble NG2 funnet til å være uttrykt ved en rekke forskjellige umodne celler så vel som flere typer tumorer med høy malignitet. NG2 er blitt foreslått som et targetmolekyl i tumorvaskulaturen. Kollagenase-1 (C1) er spesielt den dominerende matriks-metalloproteinase som er tilstede i nydannede mikrokar og tjener som en markør av neovaskularisering.

### **Onkoføtalt fibronektin**

Ekspressjonen av det onkoføtale fragment av fibronektin (Fn-f) er også blitt funnet til å være økt under angiogenese og er blitt foreslått som en markør av tumorangiogenese. I en utførelsesform er TTM et antistoff eller fragment derav mot det onkoføtale ED-B domene av fibronektin. Fremstillingen av et slikt antistoff og dets konjugering med IL-12 er beskrevet i Halin *et al* (2002) *Nature Biotechnology* 20:264-269.

### **Tenascin**

Tenascin er et matriks-glykoprotein som man ser i maligne tumorer som inkluderer hjerne- og brystcancere og melanomer. Dets ekspresjon er malign men ikke veldifferensierte tumorer og assosiasjon med blodkarene til tumorer gjør det til en viktig target for både å forstå biologien til maligne tumorer og angiogenese, men er likeledes en terapeutisk concertarget og markør.

Targeting-enheten er foretrukket et polypeptid som er i stand til binding til et tumorcelle- eller tumorvaskulatur-overflatemolekyl. Så vel som dem nevnt over kan andre slike overflatemolekyler som er kjente eller som blir tilgjengelige også targeteres ved den første sekvensen.

Det vil forstås at man kan anvende konvensjonelle proteinbindingsanalyser for å identifisere molekyler som binder til overflatemolekyler. Det vil også forstås at man kan anvende strukturell-basert legemiddeldesign for å utvikle sekvenser som binder til overflatemolekyler.

"High throughput screening", som beskrevet over for syntetiske forbindelser, kan også anvendes for å identifisere targetingmolekyler.

Denne oppfinnelse vedrører også anvendelsen av kompetitive legemiddel-screening-analyser hvori nøytraliserende antistoffer i stand til binding av en target spesifikt konkurrerer med en testforbindelse for binding til en target.

**Bindingspartner (BP)**

Targeting-enheten har generelt formen av en bindingspartner (BP) til et overflatemolekyl omfattende eller bestående av ett eller flere bindingsdomener.

**Ligander**

Targeting-enheten anvendt ifølge oppfinnelsen kan være i form av en ligand. Ligandene kan være naturlige eller syntetiske. Betegnelsen "ligand" refererer også til en kjemisk modifisert ligand. Det ene eller de flere bindingsdomener av BP kan f.eks. bestå av en naturlig ligand for en reseptor, hvis naturlige ligand kan være et adhesjonsmolekyl eller en vekstfaktorreseptorligand (f.eks. epidermal vekstfaktor), eller et fragment av en naturlig ligand som bibeholder bindingsaffinitet for reseptoren. Syntetiske ligander inkluderer designerligandene. Som anvendt heri betyr betegnelsen "designerligander" midler som høyst sannsynlig binder til reseptoren basert på deres tredimensjonale form sammenlignet med den til reseptoren.

**Antistoffer**

Det er beskrevet heri bindingsdomener avledet fra tung og lett kjede sekvenser fra en immunoglobulin (Ig) variabel region. En slik variabel region kan være avledet fra et naturlig humant antistoff eller et antistoff fra en annen art slik som et gnagerantistoff. Alternativt kan den variable region være avledet fra et manipulert antistoff slik som et humanisert antistoff eller fra et fag-display bibliotek fra et immunisert eller et ikke-immunisert dyr eller et mutagenisert fag-display bibliotek. Som et andre alternativ, kan den variable region være avledet fra et enkelt-kjede variabelt fragment (scFv). BP kan inneholde andre sekvenser for å oppnå multimerisering eller for å virke som spacere mellom bindingsdomenene eller som resulterer fra insersjonen av restriksjonssteder i genene som koder for BP, inkluderende Ig hengselsekvenser eller nye spacere og konstruerte linkersekvenser.

BP kan omfatte, i tillegg til en eller flere immunoglobulinvariable regioner, hele eller en del av en Ig tung kjede konstant region og kan således omfatte et naturlig helt Ig, et manipulert Ig, et manipulert Ig-lignende molekyl, et enkelt-kjede Ig eller et enkelt-kjede Ig-lignende molekyl. Alternativt, eller i tillegg, kan BP inneholde ett eller flere domener fra et annet protein slik som et toksin.

Som anvendt heri refererer et "antistoff" til et protein som består av ett eller flere polypeptider som i det vesentlige er kodet for av immunoglobulingener eller fragmenter av immunoglobulingener. Antistoffer kan eksistere som intakte immunoglobuliner eller som en rekke fragmenter, som inkluderer dem som er vel karakteriserte fragmenter produsert ved nedbrytning med forskjellige peptidaser. Mens forskjellige antistoff-fragmenter er definert med hensyn til nedbrytning av et intakt antistoff, vil en fagkyndig forstå at antistoff-fragmenter kan syntetiseres *de novo* enten kjemisk eller ved å anvende rekombinant DNA metodologi. Således inkluderer betegnelsen antistoff, som anvendt heri, også antistoff-fragmenter som enten er produsert ved modifikasjonen av hele antistoffer eller syntetisert *de novo* ved å anvende rekombinante DNA metodologier. Antistoff-fragmenter som er omfattet av bruken av betegnelsen "antistoffer" inkluderer, men ikke begrenset til, Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, dsFv diabody og Fd fragmenter.

Også monoklonale eller polyklonale antistoffer mot overflateproteiner er beskrevet heri. En fremgangsmåte for fremstilling av monoklonale eller polyklonale antistoffer overfor polypeptider er beskrevet.

Dersom polyklonale antistoffer er ønskelig, blir et valgt pattedyr (f.eks. mus, kanin, geit, hest osv.) immunisert med et immunogenisk polypeptid som bærer en eller flere epitoper. Serum fra immuniserte dyr samles og behandles i henhold til kjente prosedyrer. Dersom serum som inneholder polyklonale antistoffer mot en epitop inneholde antistoffer mot andre antigener, kan de poly-

klonale antistoffer renses ved immunoaffinitetskromatografi. Teknikker for å produsere og prosessere polyklonale antisera er kjent innen teknikken. For at slike antistoffer kan dannes, tilveiebringer oppfinnelsen også polypeptider ifølge oppfinnelsen eller fragmenter derav som er bundet til ("haptensised to") et annet polypeptid for anvendelse som immunogener i dyr eller mennesker.

Monoklonale antistoffer som er rettet mot bindingscelleoverflateepitoper i polypeptidene kan også lett fremstilles av fagkyndig på området. Den generelle metodologien for å danne monoklonale antistoffer ved hjelp av hybridomer er vel kjent. Udødelige antistoff-produserende cellelinjer kan dannes ved celledusjon, og også ved andre teknikker slik som direkte transformasjon av B lymfocytter med onkogenisk DNA, eller transfeksjon med Epstein-Barr virus. Paneler av monoklonale antistoffer produsert mot epitoper kan screenes for forskjellige egenskaper; dvs. for isotype og epitop affinitet.

En alternativ teknikk involverer screening av fag-displaybiblioteker hvor f.eks. fagen uttrykker scFv fragmenter på overflaten av deres kappe med en stor variasjon av hypervariable områder (CDR'er). Denne teknikk er vel kjent innen teknikkens stand.

For formålene ifølge oppfinnelsen inkluderer betegnelsen "antistoff", dersom annet ikke er spesifikt angitt, fragmenter av hele antistoffer som bibeholder deres bindingsaffinitet for et targetantigen. Som nevnt over inkluderer slike fragmenter Fv, F(ab') og F(ab')<sub>2</sub> fragmenter, så vel som enkelt-kjede antistoffer (scFv). Videre kan antistoffene og fragmentene derav være humaniserte antistoffer, f.eks. beskrevet i EP-A-239400.

### **Screeninger**

En fremgangsmåte for screening av et middel som er i stand til å binde til et tumor- eller tumorvaskulatur-celleoverflatemolekyl er beskrevet heri idet fremgangsmåten omfatter å bringe celleoverflatemolekylet i kontakt med et middel og bestemme om det nevnte middel binder til nevnte celleoverflatemolekyl.

Som anvendt heri inkluderer betegnelsen "middel", men er ikke begrenset til, en forbindelse slik som en testforbindelse som kan oppnås fra eller som kan fremstilles ved hjelp av en hvilken som helst passende kilde, enten naturlig eller ikke. Middelet kan være designet eller oppnådd fra et bibliotek av forbindelser som kan omfatte peptider, så vel som andre forbindelser, slik som små organiske molekyler og særlig nye lederforbindelser. Middelet kan f.eks. være en naturlig substans, et biologisk makromolekyl eller en ekstrakt dannet fra biologiske materialer slik som bakterier, sopp eller animalske (særlig pattedyr) celler eller vev, et organisk eller et uorganisk molekyl, en syntetisk testforbindelse, en halv-syntetisk testforbindelse, et strukturelt eller funksjonelt mimetika, et peptid, et peptidomimetika, en derivatisert testforbindelse, et peptid spaltet fra et helt protein, eller et peptid syntetisert syntetisk (slik som f.eks. ved anvendelse av en peptidsyntetisator) eller ved hjelp av rekombinante teknikker eller kombinasjoner derav, en rekombinant testforbindelse, en naturlig eller en ikke-naturlig testforbindelse, et fusjonsprotein eller ekvivalent derav og mutanter, derivater eller kombinasjoner derav.

Middelet kan også være en aminosyresekvens eller et kjemisk derivat derav. Substansen kan til og med være en organisk forbindelse eller annet kjemikalie. Middelet kan til og med være en nukleotidsekvens, som kan være en sense-sekvens eller en anti-sensesekvens.

### **Protein**

Betegnelsen "protein" inkluderer enkelt-kjede polypeptidmolekyler så vel som multippel polypeptidkomplekser hvor individuelle bestanddels-polypeptider er koblet ved hjelp av kovalente eller ikke-kovalente midler. Betegnelsen "polypeptid" inkluderer peptider med en lengde på to eller flere aminosyrer, typisk med mer enn 5, 10 eller 20 aminosyrer.



### **Polypeptid homologer**

Det vil forstås at polypeptidsekvenser for anvendelse i oppfinnelsen ikke er begrenset til de spesielle sekvenser eller fragmenter derav men inkluderer også homologe sekvenser som er oppnådd fra en hvilken som helst kilde, f.eks. relaterte virale/bakterielle proteiner, cellulære homologer og syntetiske peptider, så vel som varianter eller derivater derav. Polypeptidsekvenser inkluderer også polypeptider som er kodet for av polynukleotider.

### **Polypeptidvarianter, derivater og fragmenter**

Betegnelsen "variant" eller "derivat" med hensyn til aminosyresekvensene ifølge oppfinnelsen inkluderer en hvilken som helst substitusjon av, variasjon av, modifikasjon av, erstatning av, delesjon av eller addisjon av en (eller flere) aminosyrer fra eller til sekvensen med den betingelse at den oppnådde aminosyresekvens foretrukket har targetingaktivitet, og har foretrukket minst 25 til 50% av aktiviteten til polypeptidene tilstede i sekvenslistene, mere foretrukket minst i alt vesentlig den samme aktiviteten.

Sekvenser kan således være modifisert for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse. Typisk gjennomføres modifikasjoner som opprettholder aktiviteten til sekvensen. Således, i en utførelsesform, kan aminosyresubstitusjoner f.eks. gjøres fra 1, 2 eller 3 til 10, 20 eller 30 substitusjoner med den betingelse at den modifiserte sekvens bibeholder minst omtrent 25 til 50% av, eller i alt vesentlig den samme aktiviteten. I en alternativ utførelsesform kan imidlertid modifikasjoner av aminosyresekvensene til et polypeptid gjøres med overlegg for å redusere polypeptidets biologiske aktivitet. Trunkerte polypeptider som for eksempel forblir i stand til binding til targetmolekyl men mangler funksjonelle effektordomener kan være anvendbare.

Generelt er foretrukket mindre enn 20%, 10% eller 5% av aminosyrerestene av en variant eller derivat endret sammenlignet med den tilsvarende region som er angitt i sekvenslistene.

Aminosyresubstitusjoner kan inkludere anvendelsen av ikke-naturlig forekommende analoger, f.eks. for å øke blodplasma-halveringstiden til et terapeutisk administrert polypeptid (se under for ytterligere detaljer vedrørende produksjon av peptidderivater for anvendelse i terapi).

Konservative substitusjoner kan f.eks. gjennomføres i henhold til den etterfølgende tabell. Aminosyrer i den samme blokken i den andre kolonnen og foretrukket på den samme linjen i den tredje kolonnen kan erstatte hverandre:

|           |                |         |
|-----------|----------------|---------|
| ALIFATISK | Ikke-polar     | G A P   |
|           |                | I L V   |
|           | Polar - uladet | C S T M |
|           |                | N Q     |
|           | Polar - ladet  | D E     |
|           |                | K R     |
| AROMATISK |                | H F W Y |

Polypeptider inkluderer også fragmenter av de ovennevnte polypeptider og varianter derav, som inkluderer fragmenter av sekvensene. Foretrukne fragmenter inkluderer dem som inkluderer en epitop. Passende fragmenter vil ha en lengde på minst omtrent 5, for eksempel 10, 12, 15 eller 20 aminosyrer. De kan også være mindre enn 200, 100 eller 50 aminosyrer i lengde. Polypeptidfragmenter av proteinene og elleliske og species-varianter derav kan inneholde en eller flere (for eksempel 2, 3, 5 eller 10) substitusjoner, delesjoner eller insersjoner, som inkluderer konservative substitusjoner. Der hvor substitusjoner, delesjoner og/eller insersjoner er blitt utført, for eksempel ved hjelp av rekombinant teknologi, er foretrukket mindre enn 20%, 10% eller 5% av aminosyrerestene som angitt i sekvenslistene endret.

Proteiner er typisk dannet ved hjelp av rekombinante midler, for eksempel som beskrevet under. De kan imidlertid også dannes ved hjelp av syntetiske midler ved å anvende teknikker som er vel kjent fra fagkyndig på området slik fast-fase syntese. Forskjellige teknikker for kjemisk syntetisering av peptider er omtalt av Borgia og Fields, 2000, TibTech 18:243-251 og beskrevet detaljert i referansene inneholdt deri.

### **Terapeutiske midler**

Peptider kan administreres terapeutisk til pasienter. Det er foretrukket å anvende peptider som ikke kun består av naturlig forekommende aminosyrer men som er blitt modifisert, f.eks. for å redusere immunogenitet, for å øke sirkulasjons-halveringstid i pasientens kropp, for å øke biotilgjengelighet og/eller for å øke effektivitet og/eller spesifisitet.

En rekke metoder er blitt anvendt for å modifisere peptider for terapeutisk anvendelse. En metode er å koble peptidene eller proteinene til en rekke polymerer, slik som polyetylenglykol (PEG) og polypropylenglykol (PPG), se f.eks. US patenter nr. 5 091 176, 5 214 131 og US 5 264 209.

Erstatning av naturlig-forekommende aminosyrer med en rekke ukodede eller modifisert aminosyrer slik D-aminosyrer og N-metylaminosyrer kan også anvendes for å modifisere peptider.

En annen metode er å anvende bifunksjonelle tverrbindingsmidler, slik som N-succinimidyl-3-(2 pyridylditio)propionat, succinimidyl-6-[3-(2 pyridylditio)-propionamido]heksanoat, og sulfosuccinimidyl-6-[3-(2 pyridylditio) propionamido]heksanoat (se US patent 5 580 853).

Det kan være ønskelig å anvende derivater av peptidene som er konformasjonsmessig begrenset. Konformasjonsmessig begrensning refererer til stabiliteten og foretrukket konformasjon av den tredimensjonale formen som inntas av et peptid. Konformasjonsmessige begrensninger inkluderer lokale begrensninger som involverer begrensning av den konformasjonsmessige mobiliteten til en enkelt rest i et peptid; regionale begrensninger som involverer begrensninger av den konformasjonsmessige mobiliteten til en gruppe av rester, hvilke rester kan danne en eventuell sekundær strukturell enhet; og globale begrensninger som involverer hele peptidstrukturen.

Den aktive konformasjon av peptidet kan stabiliseres ved en kovalent modifikasjon, slik som cyclisering eller ved innlemmelse av gamma-laktam eller andre typer av broer. Sidekjeder kan f.eks. cycliseres til ryggraden for å danne en L-gamma-laktamenhet på hver side av interaksjonsstedet. Se generelt Hruby et al., "Applications of Synthetic Peptides," in *Synthetic Peptides: A User's Guide*: 259-345 (W. H. Freeman & Co. 1992). Cyclisering kan f.eks. også oppnås ved dannelsen av cysteinbroer, kobling av amino- og karboksyterminale grupper i de respektive terminalaminosyrer, eller kobling av aminogruppen i en Lys-rest eller en relatert homolog med en karboksygruppe i Asp, Glu eller en relatert homolog. Kobling av alfa-aminogruppen i et polypeptid med epsilon-aminogruppen i en lysinrest, ved å anvende jodeddiksyreanhydrid, kan også gjennomføres. Se Wood og Wetzel, 1992, *Int'l J. Peptide Protein Res.* 39: 533-39.

En annen metode som er beskrevet i US 5 891 418 er å inkludere en metall-ion kompleksdannings-rygggrad i peptidstrukturen. Typisk er den foretrukne metall-peptid ryggraden basert på det nødvendige antall av spesielle koordinerende grupper som kreves av koordinasjonsområdet til et gitt kompleks-

dannende metallion. Generelt har de fleste metallioner som har vist seg å være anvendbare et koordinasjonstall fra fire til seks. Naturen til koordinasjonsgruppene i peptidkjeden inkluderer nitrogenatomer med amin-, amid-, imidazol- eller guanidino-funksjonaliteter; svovelatomer av tioler eller disulfider; og oksygenatomer av hydroksyfunksjonaliteter, fenoliske funksjonaliteter, karbonyl- eller karboksylfunksjonaliteter. I tillegg kan peptidkjeden eller individuelle aminosyrer endres kjemisk til å inkludere en koordinasjonsgruppe, som f.eks. oksim, hydrazino, sulfydryl, fosfat, cyano, pyridino, piperidino eller morfolino. Peptidkonstruktet kan enten være rettkjedet eller cyklisk, men et rettkjedet konstrukt er typisk foretrukket. Et eksempel på et lite rettkjedet peptid er Gly-Gly-Gly-Gly som har fire nitrogener (et  $N_4$  kompleksdannelse-system) i ryggraden som kan kompleksdanne til et metallion med et koordinasjonstall på fire.

En ytterligere teknikk for å forbedre egenskapene til terapeutiske peptider er å anvende ikke-peptid peptidomimetika. En rekke anvendbare teknikker kan benyttes for å belyse den nøyaktige strukturen til et peptid. Disse teknikker inkluderer aminosyresekvensering, røntgenkrystallografi, massespektroskopi, kjernemagnetisk resonans, spektroskopi, komputer-assistert molekylær modellering, peptid-kartlegging og kombinasjoner derav. Strukturanalyser av et peptid tilveiebringer generelt en stor mengde data som omfatter aminosyresekvensen til peptidet så vel som den tre-dimensjonale posisjonering av dets atomkomponenter. Fra denne informasjon kan ikke-peptid peptidomimetika designes til å ha de nødvendige kjemiske funksjonaliteter for terapeutisk aktivitet, men er mere stabile, f.eks. som er mindre tilbøyelige til biologisk nedbrytning. Et eksempel på denne tilnærming er tilveiebrakt i US 5 811 512.

Teknikker for kjemisk syntese av terapeutiske peptider er beskrevet i de ovennevnte referanser og er også omtalt av Borgia og Fields, 2000, TibTech 18:243-251 og beskrevet detaljert i referansene inneholdt deri.

### **Bifunksjonelle derivater**

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er tilveiebrakt ved bifunksjonelle

derivater hvori cytokiner modifisert med et TTM er konjugert med antistoffer, eller deres fragmenter, mot tumorantigener eller andre tumor-angiogene markører, f.eks. av integriner, metalloproteaser eller deres vaskulære vekstfaktor, eller antistoffer eller fragmenter derav som er rettet mot komponenter av den ekstracellulære matriks, slik som anti-tenascin antistoffer eller anti-fibronektin EDB domene. Fremstillingen av et fusjonsprodukt mellom TNF og hengselregionen av et mAb mot det tumor-assosierte TAG72 antigenet uttrykt ved gastrisk og ovarie-adenokarsinom er nylig blitt rapportert.

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er tilveiebrakt ved den tumorale pre-targeting med biotin/avidin-systemet. I henhold til denne metode, oppnås et ternært kompleks på det tumorale antigeniske setet, ved forskjellige stadier, som dannes ved 1) biotinyllert mAb, 2) avidin (eller streptavidin) og 3) bivalent cytokin modifisert med TTM og biotin. En rekke dokumenter viste at pre-targetingmetoden, sammenlignet med konvensjonell targeting med immunkonjugater, i realiteten kan øke forholdet mellom aktivt molekyl som er "homed" i target og det frie aktive molekyl, og således redusere behandlingstoksisiteten. Denne metode gir gunstige resultater med biotinyllert TNF, som var i stand til å inducere cytotoxicitet *in vitro* og nedsette tumorcelleveksten under betingelser hvori normal TNF var inaktiv. Pre-targetingmetoden kan også gjennomføres med en to-fase prosedyre ved å anvende et bispesifikt antistoff som samtidig binder tumorantigenet og det modifiserte cytokin. Anvendelsen av et bispesifikt antistoff rettet mot et karsinoembryonisk antigen og TNF er nylig blitt beskrevet som et middel for TNF tumoral pre-targeting.

I en ytterligere utførelsesform omfatter oppfinnelsen et cytokin som er konjugert til både TTM og et antistoff, eller et fragment derav (direkte eller indirekte via en biotin-avidin bro), eller forskjellige TNF sub-enheter, hvor antistoffet eller dets fragmenter er rettet mot et antigen uttrykt på tumor-celler eller andre komponenter i tumor-stroma, f.eks. tenascin og fibronektin

EDB domene. Dette resulterer i en ytterligere forbedring av tumor "homing" egenskapene til det modifiserte cytokin og i den sakte frigivelse av sistnevnte i tumormikromiljøet gjennom trimer-monomer-trimer transisjoner. De modifiserte sub-enheter av f.eks. TNF konjugater kan disassosiere fra targeting kompleksene og reassosiere for å danne umodifiserte trimere TNF molekyler, som deretter difunderer i tumor-mikromiljøet. Frigivelsen av bioaktivt TNF er også blitt vist til å forekomme innen 24-48 timer etter targeting.

Fremstillingen av cytokiner i form av liposomer kan forbedre den biologiske aktiviteten derav. Det er i realiteten blitt observert at acylering av TNF amino-gruppene induserer en økning i dens hydrofobisitet uten tap av biologisk aktivitet *in vitro*. Videre er det blitt rapportert av TNF bundet til lipider har upåvirket cytotoxicitet *in vitro*, immunomodulerende effekt og redusert toksisitet *in vivo*.

### **Polynukleotider**

Polynukleotider for anvendelse i oppfinnelsen omfatter nukleinsyresekvenser som koder for polypeptidkonjugatet. Det vil forstås av en fagkyndig på området at en rekke forskjellige polynukleotider kan kode for det samme polypeptid som et resultat av degenerasjonen av den genetiske kode. I tillegg skal det forstås at fagkyndige på området kan, ved å anvende rutineteknikker, gjennomføres nukleotidsubstitusjoner som ikke påvirker polynukleotid-sekvensen kodet for av polynukleotidene ifølge oppfinnelsen for å reflektere kodonbruken av en hvilken som helst spesiell vertsorganisme hvori polypeptidene ifølge oppfinnelsen skal uttrykkes.

Polynukleotider ifølge oppfinnelsen kan omfatte DNA eller RNA. De kan være enkelt-trådet eller dobbelt-trådet. De kan også være polynukleotider som blant dem inkluderer syntetiske eller modifiserte nukleotider. En rekke forskjellige typer av modifikasjon hva angår oligonukleotider er kjent innen tek-

nikken. Disse inkluderer metylfosfonat- og fosfortioat-ryggrader, addisjon av akridin- eller polylysin-kjeder i 3' og/eller 5' endene til molekylet. I forbindelse med den foreliggende oppfinnelse, skal det forstås at polynukleotidene beskrevet heri kan modifiseres ved en hvilken som helst metode som er tilgjengelig innen fagområdet. Slike modifikasjoner kan gjennomføres for å øke *in vivo* polynukleotiders aktivitet eller levetid.

### **Nukleotidvektorer**

Polynukleotider kan være innlemmet i en rekombinant replikerbar vektor. Vektoren kan anvendes for å replikere nukleinsyren i en kompatibel vertscelle. Således tilveiebringes en metode for å danne polynukleotider ved å introdusere et polynukleotid inn i en replikerbar vektor, introdusere vektoren inn i en kompatibel vertscelle, og dyrke vertscellen under betingelser som frembringer replikasjon av vektoren. Vektoren kan utvinnes fra vertscellen. Passende vertsceller inkluderer bakterier som *E.coli*, gjær, pattedyrcellelinjer og andre eukaryotiske cellelinjer, for eksempel insekt Sf9 celler.

Et polynukleotid i en vektor er foretrukket operabelt koblet til en kontrollsekvens som er i stand til å sørge for ekspresjonen av kodesekvensen ved hjelp av vertscellen, dvs. vektoren er en ekspresjonsvektor. Betegnelsen "operabelt koblet" betyr at de beskrevde komponenter er i et slektskap som gjør det mulig for dem å funksjonere på deres tiltenkte måte. En regulerende sekvens som er "operabelt koblet" til en kodesekvens er ligert på en slik måte at ekspresjon av kodesekvensen oppnås under betingelser som er kompatible med kontrollsekvensene.

Kontrollsekvensene kan f.eks. være modifisert ved addisjonen av ytterligere transkripsjons-regulerende elementer for å gjøre nivået av transkripsjon kontrollert ved kontrollsekvensene mere mottagelige for transkripsjons-modulatorer.



Vektorer kan transformeres eller transfekteres inn i en passende vertscelle som beskrevet under for å tilveiebringe ekspresjon av et protein. Denne prosess kan omfatte dyrking av en vertscelle transformert med en ekspresjonsvektor som beskrevet over under betingelser for å tilveiebringe ekspresjon ved hjelp av vektoren av en kodesekvens som koder for proteinet med utvinning av det uttrykte protein.

Vektorene kan f.eks. være plasmid eller virusvektorer som er utstyrt med et replikasjonsorigo, eventuelt en promoter for ekspresjon av det nevnte polynukleotid og eventuelt en regulator av promoteren. Vektorene kan inneholde ett eller flere selekterbare markørgener, f.eks. et ampicillin-resistent gen i tilfellet av et bakterielt plasmid eller et neomycin-resistent gen for en pattedyrvektor. Vektorer kan f.eks. anvendes for å transfektere eller transformere en vertscelle.

Kontrollsekvenser som er operabelt koblet til sekvenser som koder for proteinet ifølge oppfinnelsen inkluderer promotere/enhancere og andre ekspresjonsregulerings signaler. Disse kontrollsekvenser kan velges til å være kompatible med vertscellen for hvilken ekspresjonsvektoren er designet til å anvendes i. Betegnelsen "promoter" er vel kjent innen teknikken og omfatter nukleinsyre-regioner som i størrelse og kompleksitet går fra minimale promotere til promotere som inkluderer oppstrømselementer og enhancere.

Promoteren er typisk valgt fra promotere som er funksjonelle i pattedyrceller, skjønt prokaryotiske promotere og promotere som er funksjonelle i andre eukaryotiske celler kan anvendes. Promoteren er typisk avledet fra promotersekvenser av virale eller eukaryotiske gener. Den kan f.eks. være en promoter avledet fra genomet av en celle hvor ekspresjonen skal foregå. Med hensyn til eukaryotiske promotere, kan de være promotere som fungerer på en ubikvitær

måte (slik som promotere av a-aktin, b-aktin, tubulin) eller alternativt på en vev-spesifikk måte (slik promotere av genene for pyruvatkinase). Vevspesifikke promotere som er spesifikke for visse celler kan også anvendes. De kan også være promotere som responderer på spesifikke stimuli, f.eks. promotere som binder steroide hormonreseptorer. Virale promotere kan også anvendes, f.eks. "Moloney murine leukaemia virus long terminal repeat" (MMLV LTR) promoteren, "Rous sarcoma virus" (RSV) LTR promoteren eller den humane cytomegalovirus (CMV) IE promoteren.

Det kan også være fordelaktig at promoterne er induserbare slik at nivåene av ekspresjon av det heterologe gen kan reguleres under cellens levetid. Induserbar betyr at nivåene av ekspresjon oppnådd ved å anvende promoteren kan reguleres.

I tillegg kan hvilke som helst av disse promotere modifiseres ved addisjonen av ytterligere regulerende sekvenser, f.eks. enhancer-sekvenser. Kimære promotere kan også anvendes som omfatter sekvenser fra to eller flere forskjellige promotere som beskrevet over.

### **Vertsceller**

Vektorer og polynukleotider kan innføres i vertsceller for det formål og replikere vektorene/polynukleotidene og/eller uttrykke proteinet som er kodet for av polynukleotidene. Skjønt proteinene kan fremstilles ved å anvende prokaryotiske celler som vertsceller, er det foretrukket å anvende eukaryotiske celler, for eksempel gjærceller, insektsceller eller pattedyrceller, særlig pattedyrceller.

Vektorer/polynukleotider kan innføres i passende vertsceller ved å anvende en rekke kjente teknikker, slik som transfeksjon, transformasjon og elektroporering. Der hvor vektorer/polynukleotider skal administreres til dyr, er det innen teknikken kjent flere teknikker, for eksempel infeksjon ved rekombinante virale vektorer som retrovirus,

herpes simplex viruser og adenoviruser, direkte injeksjon av nukleinsyrer og biolistisk transformasjon.

### **Proteinekspresjon og rensing**

Vertsceller som omfatter polynukleotider kan anvendes til å uttrykke proteiner. Vertsceller kan dyrkes under passende forhold som tillater ekspresjon av proteinene. Ekspresjon av proteinene kan være konstitutiv slik at de produseres kontinuerlig, eller induserbar som krever en stimulans for å initiere ekspresjon. I tilfellet av induserbar ekspresjon, kan proteinproduksjon initieres når det er påkrevd ved for eksempel tilsetning av en induseringssubstans til dyrkingsmediet, for eksempel deksametason eller IPTG.

Proteiner kan ekstraheres fra vertsceller ved hjelp av en rekke kjente teknikker, som inkluderer enzymatisk, kjemisk og/eller osmotisk lysis og fysisk nedbrytning.

### **Administrering**

Proteiner kan foretrukket kombineres med forskjellige komponenter for å danne preparater. Preparatene kombineres foretrukket med en farmasøytisk akseptabel bærer, fortynningsmiddel eller eksipiens for å danne et farmasøytisk preparat (som kan være for anvendelse i mennesker eller dyr). Passende bærere og fortynningsmidler inkluderer isotoniske saltoppløsninger, f.eks. fosfat-bufret saltvann. Detaljer vedrørende eksipenser finner man i *The Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Edn, Eds Wade & Weller, American Pharmaceutical Association. Preparatet ifølge oppfinnelsen kan administreres ved direkte injeksjon. Preparatet kan formuleres for parenteral, intramuskulær, intravenøs, subkutan, intraokulær, oral eller transdermal administrering. Typisk kan hvert protein administreres i en dose i området fra 0,5 til 500 ng/kg, foretrukket i området 1 til 50 ng/kg, mere foretrukket i området 5 til 15 ng/kg.

I et alternativt aspekt tilveiebringes et farmasøytisk preparat som omfatter et konjugat, hvori konjugatet er til stede i en mengde slik at konjugatet eller en metabolitt derav tilveiebringes i blodplasmaet til de individer som skal behandles i en mengde som er høyst

omtrent 35000 ng/døgn, foretrukket omtrent 3500 ng/døgn, mer foretrukket omtrent 1000 ng/døgn.

Den ovennevnte dosering relaterer til en dosering av et individ på 70 kg. En fagkyndig på området vil lett være i stand til å modifisere den angitte dosering på et individ som har en vekt som er forskjellig fra 70 kg.

Doseringen per døgn er beregnet ved å oppdele dosen som skal administreres til individet med den forventede doseringsperiode i døgn. Den forventede doseringsperiode vil typisk være perioden inntil neste administrering, den perioden som dosen skal ha effekt eller den perioden hvor det er påkrevd at dosen har effekt.

Preparatet kan utformes slik at administrering derav daglig, ukentlig eller en gang i måneden vil tilveiebringe den ønskelige daglige dosering. Det vil forstås at preparatet passende kan formuleres for administrering mindre hyppig, slik som hver 2, 4, 6, 8, 10 eller 12 time.

Polynukleotider/vektorer som koder for polypeptidkomponentene kan administreres direkte som et nakent nukleinsyrekonstrukt, foretrukket ytterligere omfattende flankesekvenser som er homologe med vertscelle-genomet.

Opptaket av nakne nukleinsyrekonstrukter i pattedyrceller økes ved en rekke kjente transfeksjonsteknikker som f.eks. dem som inkluderer anvendelsen av transfeksjonsmidler. Eksempler på disse midler inkluderer kationiske midler (f.eks. kalsiumfosfat og DEAE-dekstran) og lipofektanter (f.eks. lipofectam og transfectam). Typisk blandes nukleinsyrekonstrukter med transfeksjonsmiddelet for å produsere et preparat.

Polynukleotidet eller vektoren er foretrukket kombinert med en farmasøytisk akseptert bærer eller fortynningsmiddel for å danne et farmasøytisk preparat. Passende bærere og fortynningsmidler inkluderer isotoniske saltoppløsninger, f.eks. fosfatbufret saltvann. Preparatet kan være formulert for parenteral, intramuskulær, intravenøs, subkutan, intraokulær eller transdermal administrering.

Administreringsrutene og doseringsforskrifter som beskrevet skal kun være en veiledning da en fagkyndig lett vil kunne bestemme den optimale administreringsrute og doseringsforskriftene for en hvilken som helst pasient og lidelse.

### **Virale vektorer**

Foretrukket administreres konjugatet ved å anvende en viral vektor, mer foretrukket en retroviral vektor.

### **Retroviruser**

Den retrovirale vektor for anvendelse i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse kan være avledet fra eller kan være avledbar fra et hvilket som helst passende retrovirus. Et stort antall forskjellige retroviruser er blitt identifisert. Eksempler inkluderer: murint levkemivirus (MLV), humant immunsviktivirus (HIV), simian immunsviktivirus, human T-celle levkemivirus (HTLV), equine infeksiøs anemivirus (EIAV), mus mammar-tumorvirus (MMTV), Rous sarkomavirus (RSV), Fujinami sarkomavirus (FuSV), Moloney murint levkemivirus (Mo-

MLV), FBR murint osteosarkomvirus (FBR MSV), Moloney murint sarkomvirus (Mo-MSV), Abelson murint leukemivirus (A-MLV), Avian myelocytomatosevirus-29 (MC29) og Avian erythroblastosevirus (AEV). En detaljert liste over retroviruser vil man finne i Coffin *et al.*, 1997, "retroviruses", Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763.

Detaljer vedrørende denne genomiske strukturen til enkelte retroviruser vil man finne innen den kjente teknikk. Som et eksempel, kan detaljer vedrørende HIV og Mo-MLV bli funnet fra NCBI Genbank (henholdsvis genom aksjesjonsnr. AF033819 og AF033811).

Retroviruser kan generelt opp deles i to kategorier: nemlig "enkel" og "kompleks". Retroviruser kan til og med oppdeles videre i syv grupper. Fem av disse grupper representerer retroviruser med onkogen potensial. De gjenværende to grupper er lentivirusene og spumavirusene. En oversikt over disse retroviruser er angitt i Coffin *et al.*, 1997 (*ibid*).

Lentivirusgruppen kan ytterligere oppdeles i "primat" og "ikke-primat". Eksempler på primat-lentiviruser inkluderer humant immunsviktivirus (HIV), det middel som fører til humant immunsviktsyndrom (AIDS), og simian immunsviktivirus (SIV). Den ikke-primat lentivirale gruppen inkluderer prototypen "slow virus" visna/maedivirus (VMV), så vel som det relaterte kaprin artritt-encefalittvirus (CAEV), equine enfeksiøst anemivirus (EIAV) og det mere nylig beskrevne felint immunsviktivirus (FIV) og bovint immunsviktivirus (BIV).

Avendelsen av vektorer for avleveringen av et konjugat i form av en nukleotidsekvens til en hematopoetisk stamcelle (HSC) er også beskrevet heri.

Genoverføring involverer avlevering til targetceller, slik som HSC'er, av en ekspresjonskassetten som består av en eller flere nukleotidsekvenser og sekvensene som kontrollerer deres ekspresjon. Dette kan gjennomføres *ex vivo* ved en prosedyre hvori kassetten overføres til celler i laboratoriet og de modifiserte cellene administreres deretter til en recipient. Alternativt kan genoverføring gjennomføres *in vivo* ved en prosedyre hvori ekspresjonskassetten overføres direkte til celler i et individ. I begge strategier, er overføringsprosessen vanligvis understøttet av en vektor som hjelper til med å avlevere kassetten til det passende intracellulære sted.

Benmarg har vært den tradisjonelle kilden for HSC'er for transduksjon, og nyere studier har foreslått at stamceller fra perifert blod eller navlestrengsblodceller kan være like gode eller bedre enn targetceller (Cassel *et al* 1993 *Exp Hematol* 21: 585-591; Bregni *et al* 1992 *Blood* 80: 1418-1422; Lu *et al* 1993 *J Exp Med* 178: 2089-2096).

#### **Ytterligere anticancermedler**

Konjugatet anvendt ifølge oppfinnelsen kan anvendes i kombinasjon med ett eller flere andre aktive midler, slik som ett eller flere cytotoxiske legemidler. I et aspekt omfatter således metoden administrering av en annen farmasøytisk bestanddel, slik som et cytotoxisk legemiddel, enten i kombinert doseringsform med konjugatet eller i en separat doseringsform. Slik separat cytotoxisk legemiddeldoseringsform kan inkludere fast oral, oral oppløsning, sirup, eliksir, injiserbar, transdermal, transmukosal eller annen doseringsform. Konjugatet og den andre aktive farmasøytiske bestanddel kan kombineres i en doseringsform eller tilføres i separate doseringsformer som kan anvendes sammen eller påfølgende.

Eksempler på cytotoksiske legemidler som kan anvendes i den foreliggende oppfinnelse inkluderer: alkyleringslegemidlene slik som cyklofosfamid, ifosfamid, klorambucil, melfalan, busulfan, lomustin, karmustin, klormetin (mustin), estramustin, treosulfan, tiotepa, mitobronitol; cytotoksiske antibiotika som doksorubicin, epirubicin, aklarubicin, idarubicin, daunorubicin, mitoksantron (mitozantron), bleomycin, daktinomycin og mitomycin; antimetabolitter som metotreksat, kapecitabin, cytarabin, fludarabin, kladribin, gemcitabin, fluorouracil, raltitrexed, merkaptopurin, tegafur og tioguanin; vinka-alkaloider som vinblastin, vinkristin, vindesin og vinorelbin, og etoposid; andre neoplastiske legemidler som amsakrin, altretamin, crisantaspase, dakarbazin og temozolomid, hydroksykarbamid (hydroksyurea), pentostatin, platinaforbindelser som inkluderer: karboplatin, cisplatin og oksaliplatin, porfimer-natrium, prokarbazin, razoxan, taksaner som inkluderer: docetaxel og paklitaxel, topoisomerase I inhibitorer som inkluderer: irinotekan og topotekan, trastuzumab og tretinoin.

I en foretrukket utførelsesform er det ytterligere cytotoksiske legemiddel doksorubicin, melfalan eller cisplatin.

Konjugatet anvendt ifølge oppfinnelsen kan også anvendes for å anvende permeabiliteten av tumorceller og kar for forbindelser for diagnostiske formål. Konjugatet kan f.eks. anvendes for å øke tumoropptaket av radioaktivt merkede antistoffer eller hormoner (tumor-avbildingsforbindelser) i radioimmuncintigrafi eller radioterapi av tumorer.

### **Figurer og eksempler**

Den foreliggende oppfinnelse vil bli ytterligere beskrevet under henvisning til de etterfølgende eksempler og figurer hvori:



**Fig. 1 Effekt av mTNF og NGR-mTNF på tumorvekst og kroppsvekt hos dyr som bærer RMA-T lymfomer.**

Dyr som bærer RMA-T tumorer (5 mus/gruppe) ble behandlet i.p. med NGR-mTNF eller mTNF på dag 12 etter tumorimplantasjon (A) eller på dag 10, 11 og 12 (B), i to separate forsøk (forsøk 1 og forsøk 2). Tumorvolumer i forsøk 1 (A) og forsøk 2 (B) og dyrekroppsvekt i forsøk 1 (C) 1-4 døgn etter behandling er gitt. Pilspissene i felt C indikerer behandlingstiden.

**Fig. 2 Sirkulerende nivåer av sTNF-R2 og deres rolle i regulering av aktiviteten av NGR-mTNF og NGR-hTNF.**

Felt A: serumnivåer av sTNF-R1 og sTNF-R2 i B16F1 tumorbærende mus 1 time etter behandling med forskjellige doser av NGR-mTNF eller mTNF. Dyr (3 mus/gruppe) ble behandlet på dag 6.

Felt B: effekt av anti-sTNF-R2 mAb 6G1 på anti-tumoraktiviteten av NGR-mTNF. MAb 6G1 (100 µg) ble administrert til dyr som bærer B16F1 tumorer på dag 5 og 8. En time senere ble hvert dyr behandlet med NGR-mTNF ved de indikerte doser, og 2 timer senere med melfalan (90 µg, 5 mus/gruppe).

Felt C: effekt av NGR-hTNF og hTNF på veksten av RMA-T tumorer. Mus ble behandlet med forskjellige doser av hvert cytokin på dag 11. N.S.: ikke signifikant (*t*-test).

**Fig. 3 Effekt av melfalan, alene (A) eller i kombinasjon med NGR-mTNF (C) eller mTNF (D), på tumorvekst (A-D) og kroppsvekt (E-F) i mus som bærer B16F1 melanom.**

Dyrene ble behandlet (i.p.) med legemidlene og dosene indikert i hvert felt (5 dyr/gruppe) på dag 4, 7 og 9 etter tumorimplantasjon (indikert med piler).

**Fig. 4 Effekt av forskjellige doser av doksorubicin, alene (hvite stolper) eller i kombinasjon med NGR-mTNF (sorte stolper) på tumorveksten (A, B), kroppsvekt (C, D) og overlevelse (E) hos mus som bærer B16F1 melanomer.**

Legemidlene ble administrert til dyrene (5 mus/gruppe i.p.) 5 dager etter tumorimplantasjon.

**Fig. 5 TNF reseptorers rolle i den synergistiske aktiviteten av NGR-mTNF og melfalan.**

Felt A: effekt av mAb V1q (et anti-mTNF nøytraliserende antistoff) på anti-tumoraktiviteten av melfalan i kombinasjon med NGR-mTNF i B16F1 modellen. Legemidlene ble administrert på dag 5. Mab V1q og NGR-TNF ble forblandet og inkubert i 1 time før injeksjon inn i dyrene.

Felt B: effekt av melfalan i kombinasjon med NGR-hTNF ved de indikerte dosene.

**Fig. 6 Effekt av NGR-mTNF på penetreringen av doksorubicin i B16F1 og RMA-T tumorer.**

Felt A: lyst område (øvre felt) og fluorescens (nedre felt) mikroskopi av B16F1 celler inkubert *in vitro* med 100 µg/ml doksorubicin (30 min., 37°C).  
Innføyd: forening av lyst område og fluorescensavbildinger.

Felt B: stabilitet av B16F1 fluorescenssignalet etter *in vitro* behandling med doksorubicin. B16F1 celler ble inkubert med forskjellige doser av doksorubicin i dyringsmedium (30 min., 37°C), vasket med 0,9% natriumklorid og fiksert med 4% formaldehyd. Cellene ble deretter inkubert i 0 timer eller 24 timer i dyringsmedium ved 4°C, vasket igjen og analysert ved FACS.

Felt C, F: representativ FACS analyse av celler utvunnet fra B16F1 (C) eller RMA-T (F) tumorer 2 timer etter *in vitro* administrering av doksorubicin alene (320 µg) eller i kombinasjon med NGR-mTNF (0,1 ng). Stiplede linjer indikerer fluorescensintervallet som betraktes som positivt.

Felt D, G: gjennomsnitt  $\pm$  SE fluorescens av B16F1 (D) eller RMA-T (G) celler utvunnet fra tumorer.

Felt E, H: gjennomsnitt  $\pm$  SE av positive celler utvunnet fra B16F1 (E) RMA-T (H) tumorer.

Statistisk analyse ved hjelp av to-halet *t*-test,  $P < 0,05$  (\*).

**Fig. 7 Skjematisk fremstilling av de hypotetiske interaksjoner av lave (A), moderate (B) og høye (C) doser av NGR-TNF med oppløselige og membran-reseptorer i normale kar (CD13-negativ) og i tumorassosierte kar (CD13-positiv).**

Sorte piler indikerer TNF reseptor-signalering eller ekstracellulær domenefrigivelse.

**Fig. 8 Effekt av RGD-TNF på tumorvekst (Fig. 8A) og kroppsvekt (Fig. 8B) hos dyr som bærer RMA-T.**

**Fig. 9 Effekt av en enkelt behandling (pil) med IFN $\gamma$ -NGR på veksten av RMA lymfomtumor i C57B6 mus (Fig. 9A & Fig. 9C) og på dyrets vekt (Fig. 9B).**

**Fig. 10 Effekt av NGR-TNF og cisplatin på RMA tumorer i C57/BL6 mus.**

#### **Eksempel 1 - Tumorcellelinjer og reagenser.**

Mus B16F1 melanom og RMA-T lymfom-celler ble dyrket som beskrevet tidligere (14, 15). MAb 6G1 (rotte anti-p75 mTNF reseptorantagonist) ble fremstilt og karakterisert som beskrevet tidligere (16, 17). MAb V1q (rotte anti-mTNF) som ble fremskaffet av Dr. D. Mannel (University of Regensburg, Germany). Melfalan (Alkeran) ble oppnådd fra Glaxo-Wellcome (London, Great Britain). Doksorubicin (Adriplastina) ble oppnådd fra Pharmacia-Upjohn (Milan, Italy).

### Eksempel 2 - Fremstilling av human og murin TNF og NGR-TNF.

Human og murin TNF og NGR-TNF (bestående av TNF fusjonert med C-terminus av CNGRCG) ble fremstilt ved rekombinant DNA teknologi og rensset fra *E. coli* celleekstrakter, som beskrevet (14). Alle oppløsninger anvendt i kromatografitrinnene ble fremstilt med sterilt og endotoksin-fritt vann (Salf, Bergamo, Italy). Proteinkonsentrasjon ble målt med et kommersielt protein-kvantifiseringsanalysekit (Pierce, Rockford, IL). *In vitro* cytolytisk aktivitet av human TNF (hTNF), estimert fra en standard cytolytisk analyse med L-M musefibroblaster (18), var  $5,4 \times 10^7$  enheter/mg, mens den for rensset NGR-hTNF var  $1,4 \times 10^8$  enheter/mg. Den cytolytiske aktiviteten av murin TNF (mTNF), var  $7,6 \times 10^7$  enheter/mg, mens den for NGR-mTNF var  $9,1 \times 10^7$  enheter/mg. De hydrodynamiske volumer av NGR-mTNF, NGR-hTNF og mTNF var tilsvarende dem til hTNF, et homotrimerisk protein (19), ved gelfiltreringskromatografi på en Superdex 75 HR kolonne (Pharmacia, Sweden). Elektrospray massespektrometri av hvert produkt bestemte de etterfølgende molekyllmasser: NGR-hTNF,  $17937,6 \pm 1,9$  Da (forventet for CNGRCG-hTNF<sub>1-157</sub> monomerer, 17939,4 Da); hTNF,  $17349 \pm 1,3$  (forventet for hTNF<sub>1-157</sub>, 17350,7); NGR-mTNF,  $17841,16 \pm 2,5$  (forventet for CNGRCG-mTNF<sub>1-156</sub>, 17844,2), mTNF,  $17384,9 \pm 2$  (forventet for Met-mTNF<sub>1-156</sub>, 17386,7). Endotoksininnholdet for hvert produkt, målt ved å anvende den kvantitative kromogene limulus amøbocyt-lysate (LAL) testen (BioWhittaker), var: NGR-hTNF, 0,079 enheter/μg; hTNF, 0,117 enheter/μg; NGR-mTNF, 0,082 enheter/μg; mTNF, 1,61 enheter/μg.

**Eksempel 3 - *In vivo* studier.**

Studier på dyremodeller ble godkjent av the Ethical Committee of the San Raffaele H Scientific Institute og gjennomført i henhold til foreskrevne retningslinjer. C57BL/6 mus (Charles River Laboratories, Calco, Italy) som veide 16-18 g fikk subkutan injeksjon i den venstre siden av  $5 \times 10^4$  RMA-T eller B16F1 levende celler; 4-12 dager senere ble musene behandlet med TNF eller NGR-TNF oppløsninger (100  $\mu$ l) som 2 timer senere ble etterfulgt av administrering av melfalan eller dokсорubicinoppløsning (100  $\mu$ l). Dersom ikke spesifikt angitt, ble alle legemidlene administrert intraperitonealt (i.p.). Alle legemidlene var fortynnet med 0,9% natriumklorid, inneholdende 100  $\mu$ g/ml endotoksin-fritt humant serumalbumin (Farma-Biagini, Lucca, Italy), unntatt dokсорubicin, som var fortynnet med 0,9% natriumklorid alene. Tumorvekst ble målt daglig ved å måle tumorene med kalipere som tidligere beskrevet (20). Dyrene ble avlivet før tumorene nådde en diameter på 1,0-1,5 cm. Tumorstørrelsen er vist som gjennomsnitt  $\pm$  SE (5 dyr/gruppe).

**Eksempel 4 - Oppløselig TNF reseptor analyser.**

Oppløselig p55-TNF reseptor (sTNF-R1) og oppløselig p75-TNF reseptor (sTNF-R2) i dyreserum ble målt ved å anvende Quantikine M kit (R & D Systems, Minneapolis, MN 55413).

**Eksempel 5 - Deteksjon av dokсорubicin i tumorer.**

C57/BL6 mus som bærer B16F1 eller RMA-T tumorer (diameter, 0,5-1 cm) ble behandlet med eller uten NGR-m TNF (0,1 ng, i.p.), og ble 2 timer senere behandlet med dokсорubicin (320  $\mu$ g, i.p.). Etter 2 timer ble dyrene avlivet og tumorene ble skåret ut. Hver tumor ble veid, disaggregert, resuspendert i kald fosfatbufret saltoppløsning (PBS) og filtrert gjennom 70  $\mu$ m filtere. Cellene ble resuspendert med kald PBS (50 ml), sentrifugert (1500 opm, 10 min., 4°C), resuspendert i kald PBS (2,5 ml/g tumorvev) og blandet med nylaget PBS

inneholdende 8% formaldehyd (2,5 ml/g vev). Cellene ble lagret i mørket ved 4°C over natten, og deretter analysert ved FACS. FACScan (Becton-Dickinson) ble kalibrert med celler utvunnet fra ubehandlede tumorer. Hver prøve ble deretter analysert ved å anvende FL-3 filteret og Cell Quest software.

### **Eksempel 6 -Dose-respons kurver av NGR-mTNF og mTNF i murine lymfom- og melanom-modeller.**

Anti-tumoraktiviteten av NGR-mTNF og mTNF ble først karakterisert i fravær av kjemoterapeutiske legemidler. For å sammenligne dose-respons kurvene for NGR-mTNF og mTNF utførte man en rekke forsøk som er basert på enkelt eller gjentatt administrering (i.p.) av forskjellige doser av NGR-mTNF og mTNF (fra 0,01 til 10000 ng) til RMA-T lymfom- eller B16F1 melanom-bærende mus. Murin TNF utsatte tumorveksten når administrert ved høye doser (10000 ng) (Fig. 1A); men ingen effekter ble induert ved doser lavere enn 100 ng, verken med enkle (Fig. 1A) eller gjentatte administreringer (Fig. 1B). NGR-mTNF var markert mere potent. I dette tilfellet ble det observert anti-tumoreffekter selv med doser helt ned til 0,01 ng (Fig. 1A, B). Dose-respons kurven var imidlertid mere kompleks. Effekten av 10 ng var f.eks.

overraskende lavere enn den for 0,01-0,1 ng og 1000-10000 ng. En klokkeformet dose-respons kurve ble observert i flere andre forsøk gjennomført i RMA-T modellen så vel som i B16F1 melanommodellen (ikke vist). Disse resultater foreslår at 1) effektiviteten av lave doser av NGR-mTNF er markert høyere enn den til mTNF, og 2) at doser av NGR-mTNF større enn 1-10 ng aktiverer negative feed-back mekanismer som inhiberer dens potensielle anti-tumoraktivitet.

**Eksempel 7 - Nanogram-doser av NGR-TNF, men ikke pikogram, inducerer oppløselig TNF reseptorfrigivelse.**

Beskyttelsesmekanismene som er ansvarlig for den klokke-formede dose-respons kurven for NGR-mTNF ble deretter undersøkt. Da eksogent administrert TNF kan inducere oppløselig TNF reseptor (sTNF-Rs) frigivelse *in vivo* (21), ble det antatt at den lavere effektiviteten av 10 ng NGR-TNF var relatert til induksjonen av sTNF-R1 og/eller sTNF-R2 og følgelig til nøytralisering av dens interaksjon med membranreseptorer.

For å teste denne hypotesen, målte man nivåene av sTNF-R1 og sTNF-R2 i serum til tumorbærende mus som var samlet 1 time etter administrering av forskjellige doser av mTNF og NGR-mTNF. Som forventet induserte begge produkter sTNF-R2 frigivelse men ikke sTNF-R1 frigivelse, ved doser som er større enn 4 ng (Fig. 2A).

For å måle om sTNF-R2 frigivelse regulerer aktiviteten av NGR-mTNF, ko-administrerte man dette cytokin med mAb 6G1, et antagonist anti-sTNF-R2 antistoff som forhindrer bindingen av mTNF til oppløselig og membran murin TNF-R2 (16). Anti-tumoraktiviteten av 10 ng NGR-mTNF ble potensiert ved mAb 6G1 (Fig. 2B), som var overensstemmende med hypotesen om at sTNF-R2 spiller en rolle i inhiberingen av anti-tumoreffekten av NGR-mTNF.

For videre å understøtte denne hypotesen ble *in vivo* dose-respons kurven av NGR-mTNF sammenlignet med den til NGR-hTNF, idet man utnytter det faktum at humant cytokin ikke kan binde murin sTNF-R2 (22). Man fant at dose-respons kurven av NGR-hTNF ikke var klokke-formet og at 10 ng NGR-hTNF er like aktiv som 1 ng (Fig. 2C). Det er også bemerkelsesverdig at 1 ng var tilstrekkelig til å indusere den maksimale anti-tumoreffekten. Dette kan foreslå at reseptorbinding på kar kan oppnås med svært lave blodnivåer av NGR-hTNF.

Sett under ett, foreslår resultatene fra disse forsøk på det sterkeste at NGR-mTNF og mTNF, ved doser som er større enn 4 ng, induserer frigivelse av sTNF-R2 i mengder som er tilstrekkelig til å inhibere deres anti-tumoraktivitet.

#### **Eksempel 8 - Pikogramdoser av NGR-mTNF er tilstrekkelig til å øke den terapeutiske effekten av melfalan og doksorubicin.**

Man undersøkte deretter om targetert avlevering av lave doser av NGR-mTNF til tumorkar kunne øke anti-tumoraktiviteten av kjemoterapeutiske legemidler. Disse forsøk ble gjennomført i B16F1 modellen, et spontant muse-melanom som er karakterisert ved utilstrekkelig immunogenitet og lav sensitivitet for melfalan. Melfalan (90 µg) var ikke i stand til å påvirke veksten av tumorer når injisert alene (Fig. 3A). Likeledes var mTNF (0,1 ng alene, i.p.) praktisk talt inaktiv, mens den samme dosen av NGR-mTNF beskjedent utsatte tumorveksten (Fig. 3B, øvre felt). Kombinasjonen av melfalan med 0,1 ng NGR-mTNF induserte sterkere anti-tumoreffekter enn de enkelte midler, som indikerer en synergistisk virkning (Fig. 3C). Kombinasjonen av melfalan med 0,1 ng NGR-mTNF var betydelig mere effektiv enn kombinasjonen med 5000 ng mTNF (Fig. 3C-D). Denne synergismen ble observert selv når NGR-mTNF (0,1 ng) ble injisert i.v. (ikke vist).

To tilsvarende forsøk ble gjennomført med doksorubicin i B16F1 modellen. Dyr ble behandlet i fem døgn etter tumorimplantasjon med eller uten NGR-



mTNR og, 2 timer senere, med forskjellige doser av dokсорubicin (20-320 µg, i.p.). I begge forsøk var effekten av dokсорubicin pluss NGR-mTNF sterkere enn den for dokсорubicin alene (Fig. 4A, B, E), som indikerer at NGR-mTNF markert forbedrer effektiviteten av dette legemiddel. Effekten av dokсорubicin (40 µg) pluss NGR-mTNF (0,1 ng) var f.eks. sterkere enn den til 320 µg dokсорubicin alene (Fig. 4B), mens effekten av dokсорubicin (20 µg) pluss NGR-mTNF var lavere (Fig. 4A). Fra disse resultater anslår man at aktiviteten av dokсорubicin forsterkes 8-10 ganger ved hjelp av NGR-mTNF.

Som konklusjon foreslår disse resultater at pikogram-doser av NGR-TNF er tilstrekkelig til å forbedre responsen av tumorer på både melfalan og dokсорubicin.

**Eksempel 9 - Lave doser av NGR-mTNF er ikke toksiske og øker ikke toksisiteten til melfalan.**

For å vurdere effektivitets/toksisitets-forholdet for hver behandling, målte man dyrets kroppsvekt daglig og dyrets overlevelse etter behandling. Mens terapeutiske doser av mTNF (10000 ng) induserte markert tap av kroppsvekt i RMA-T bærende dyr (Fig. 1C, venstre), bevirket terapeutiske doser av NGR-mTNF (0,01-1 ng) ikke tap av kroppsvekt (Fig. 1C, høyre). Dessuten økte verken NGR-mTNF eller mTNF (1 ng hver) letaliteten av 200 µg melfalan i mus som bærer RNA-T tumoren (Tabell 1).

**Tabell 1. Effekt av mTNF og NGR-mTNF på toksisiteten av melfalan (høy dose) i tumor-bærende mus<sup>a</sup>**

| <b>Behandling</b>   | <b>Antall mus i live</b>        |
|---------------------|---------------------------------|
|                     | <b>3 dager etter behandling</b> |
| Ingen               | 5/5 (100%)                      |
| Melfalan            | 7/10 (70%)                      |
| Melfalan + mTNF     | 8/10 (80%)                      |
| Melfalan + NGR-mTNF | 8/10 (80%)                      |

<sup>a</sup>C57BL6 mus, som bærer 11-dager gamle tumorer, ble behandlet (i.p.) med 1 ng NGR-mTNF eller mTNF og, 2 timer senere, med 200 µg melfalan.

I B16F1 modellen, bevirket terapeutiske doser av NGR-mTNF (0,1 ng) ikke til tap av kroppsvekt, selv når kombinert med melfalan (Fig. 3E). I motsetning forårsaket melfalan kombinert med terapeutiske doser mTNF (5 µg) markert tap av kroppsvekt (Fig. 3F). I tillegg økte NGR-mTNF (0,1 ng) ikke tapet av kroppsvekt bevirket ved høye doser av doksorubicin (Fig. 4C-D).

Disse resultater foreslår av pikogram-doser av NGR-mTNF øker responsen av tumorer på melfalan og doksorubicin uten tegn på økt toksisitet.

**Eksempel 10 - TNF-R1 aktivering er nødvendig og tilstrekkelig for synergismen mellom NGR-TNF og kjemoterapeutiske legemidler.**

Mekanismene ved synergismen mellom lave doser av NGR-mTNF og kjemoterapi ble deretter undersøkt.

For å fastslå om disse mekanismene er avhengig av TNF-Rs aktivering testet man effekten av mAbV1q, et nøytraliserende anti-mTNF antistoff, på anti-tumoraktiviteten av NGR-mTNF (0,1 ng) i kombinasjon med melfalan (90 µg). MAb V1q inhiberte, i det minste delvis, anti-tumoraktiviteten av disse legemidler i B16F1 modellen (Fig. 5A). Dette forslår at interaksjon mellom TNF enheten og TNF-Rs er kritisk for aktiviteten av konjugatet.

Rollen til TNF-R1 og TNF-R2 ble deretter studert. I denne hensikt evaluerte man effekten av melfalan i kombinasjon med 0,01 ng eller 0,1 ng NGR-hTNF, en TNF-R1 spesifikk agonist (22). Effekten av melfalan i B16F1 modellen ble potensierte ved NGR-hTNF (Fig. 5B) som foreslår at TNF-R1 aktivering er tilstrekkelig for synergismen.

#### **Eksempel 11 - Synergien mellom NGR-TNF og kjemoterapi er ikke avhengig av tumorcellecytotoksisitet.**

For å fastslå om synergismen avhenger direkte av cytotoxicitet mot tumorceller målte man effekten av hver forbindelse, alene eller i kombinasjon, på dyrkede B16F1 celler. Verken melfalan eller NGR-mTNF, alene eller i kombinasjon, drepte disse cellene i en 48 timers *in vitro* analyse (ikke vist).

Likeledes økte NGR-mTNF ikke den cytotoxicke aktiviteten av doksorubicin *in vitro* (ikke vist). Disse resultater forslår at synergismen som observert *in vivo* ikke er direkte avhengig av cytotoxicke effekter mot tumorceller og peker på en indirekte rolle av en komponent i tumor-stroma, f.eks. endotel-kledning av tumorkar.

#### **Eksempel 12 - NGR-TNF øker penetreringen av doksorubicin i murine melanomer og lymfomer.**

Man undersøkte deretter om NGR-mTNF kunne øke penetreringen av kjemoterapeutiske legemidler i tumorer. Med dette formål ble mengden av doksorubicin som hadde penetrert B16F1 og RMA-T tumorer målt, 2 timer etter administrering, idet man utnyttet de fluorescerende egenskapene til dette lege-

middel (23). Innledende forsøk viste at kjernen til B16F1 cellene ble fluorescerende etter at disse cellene er eksponert for doksorubicin *in vitro* (Fig. 6A). Fluorescenssignalet er dose-avhengig og stabilt i minst 24 timer, når cellene er fiksert med formaldehyd og holdt ved 4°C, som målt ved hjelp av FACS (Fig. 6B). Fluorescensintensiteten av tumorceller utvunnet fra dyr etter behandling er således en indikasjon på mengden av doksorubicin som har penetrert tumorer. Det ble observert at 0,1 ng NGR-mTNF, administrert 2 timer før doksorubicin, økte fluorescensintensiteten og prosentandelen av positive celler utvunnet fra både B16F1 og RMA-T tumorer, 2 timer etter behandling (2-5-ganger, Fig. 6C-H). Dette foreslår at NGR-mTNF økte antallet celler som ble nådd med doksorubicin så vel som den intracellulære mengden av legemiddel.

#### **Eksempel 13 – Effekt av RGD-TNF på tumorer**

C57/BL6 mus som bærer RMA-T tumorer (5 mus/gruppe) ble behandlet intraperitonealt med melfalan alene, eller i kombinasjon med RGD-TNF eller NGR-TNF. Effekten på tumorvolum er vist i Fig. 8a og effekten på dyrets vekt er vist i Fig. 8B. Disse resultater viser at RGD-TNF også er aktiv i pikogramområdet.

#### **Eksempel 14 – Effekt av IFN $\gamma$ -NGR på tumorer**

C57/BL6 mus som bærer RMA lymfom-tumorer ble behandlet med eller uten IFN $\gamma$  (3 ng) eller IFN $\gamma$ -NGR (3 ng). Etter 21 dager ble dyrene avlivet. Resultatene for tumorvolum og for dyrenes vekttap fremgår av Figurer 9A og 9B. I tillegg ble C57/BL6 mus som bærer RMA lymfom-tumorer behandlet med eller uten IFN $\gamma$  (3 ng), IFN $\gamma$ -NGR (3 ng), IFN $\gamma$ -NGR (3 ng) pluss anti-CD13 R3-63 mAb (25  $\mu$ g) eller IFN $\gamma$ -NGR (3 ng) pluss mAb 19E12 (50  $\mu$ g). mAb 19E12 er et irrelevant IgG anvendt som en negativ kontroll i forsøket. Resultatene viser at IFN $\gamma$ -NGR er aktive i pikogramområdet.

### **Eksempel 15 – Pikogram-doser av NGR-TNF er tilstrekkelig til å øke den terapeutiske effekten av cisplatinum.**

Det ble undersøkt om targetert avlevering av lave doser av NGR-TNF til tumorkar kunne øke anti-tumoraktiviteten av anti-cancerlegemiddelet, cisplatinum. Disse forsøk ble gjennomført i C57/BL6/N mus som bærer RMA-T tumorer med innledende alder på 8 uker. Musene ble behandlet med eller uten cisplatinum eller NGR-mTNF med behandling på dag 10. Resultatene er vist i Fig. 10. I denne figuren er Cys = Cisplatin Teva oppløsning 0,5 mg/ml; NGR = NGR-mTNF. Fortynningsmiddelet var HAS 100 mg/ml i NaCl 0,9%.

Resultatene forslår av pikogram-doser av NGR-TNF er tilstrekkelige til å øke den terapeutiske effekten av cisplatinum.

### **Oppsummering av fordeler**

Forandring av vaskulær permeabilitet og interstitialt trykk, endotelcelleskade og fibrinavsetning er viktige mekanismer for anti-tumoraktiviteten av TNF, enten alene eller i kombinasjon med kjemoterapeutiske legemidler. Etter infusjon i dyr eller pasienter kan TNF også indusere negative feedback-mekanismer som nøytraliserer de fleste av disse effekter. TNF, selv ved moderate doser, kan f.eks. indusere frigivelsen av oppløselige p55 og p75 TNF reseptorer som kan forhindre dens interaksjon med membranreseptorer (21, 24). Skjønt disse oppløselige inhibitorer kan beskytte kroppen mot de skadelige effekter av dette cytokin, kan de også forhindre dets anti-tumoraktivitet og vil kunne forklare, delvis, behovet for høyere doser av TNF for effektiv terapi. I dette arbeid ble det postulert at homing av lave doser av TNF til tumorkar representerer en ny strategi for å unngå toksiske reaksjoner så vel som negative feedback-mekanismer, mens man preserverer dens synergisme med kjemoterapi. For å verifisere denne hypotese, har man undersøkt anti-tumoraktiviteten av høye og lave doser av NGR-mTNF og mTNF, som går fra pikogram til mikrogrammengder, i to murine modeller basert på subkutane RMA-T lymfom- og B16F1 melanom-tumorer. Studiet ble gjennomført ved å anvende disse cytokiner alene eller i kombinasjon med melfalan eller doksorubicin. Mens mTNF

var praktisk talt inaktive i disse modeller ved lavere doser enn 100-1000 ng, fant man at NGR-mTNF, selv alene, kunne inducere anti-tumoreffekter med doser så lave som 0,01-0,1 ng. Da  $LD_{50}$  verdiene for mTNF og NGR-mTNF er tilsvarende og svarer til omtrent 50.000 ng i RMA-T tumor-bærende mus (14), indikerer disse resultater at effektivitets/toksisitets-forholdet av NGR-mTNF er  $10^4$ - $10^5$  ganger større enn det til mTNF.

Administrering av minimale mengder NGR-mTNF (0,1 ng) til tumor-bærende dyr potensierte anti-tumoraktiviteten av melfalan og doksorubicin uten bevis på økt toksisitet, som bedømt ved tumormassereduksjon, dyreoverlevelse og vekt-tap etter behandling. Dette foreslår at NGR-mTNF forbedrer den terapeutiske indeksen av disse legemidler. Det er verdt å legge merke til at  $5 \times 10^4$ -ganger større doser av mTNF var nødvendig for å øke effekten av melfalan til sammenlignbare nivåer, som bevirket et markert tap av kroppsvekt.

Det faktum at både melfalan og doksorubicin i doser som i realiteten er inaktive i B16F1 modellen reduserte tumorvekst når kombinert med NGR-mTNF indikerer at disse legemidler virker synergistisk. Studier på virkningsmekanismen viste at synergismen er avhengig av interaksjonen av NGR-mTNF med TNF-R1 på stromaceller, mest sannsynlig endotelceller, og mye mindre på tumorceller. I tillegg har man funnet at vaskulær targeting med NGR-mTNF forbedrer cytotoxisk legemiddelpenetrering i tumorer. Som det er verdt å legge merke til, økte NGR-mTNF både prosentandelen av cancerceller som kan nås med doksorubicin i løpet av 2 timer så vel som den intracellulære mengden av legemiddel, som foreslår at NGR-TNF kan forandre legemiddel-penetreringsbarrierer. Tidligere studier viste at TNF raskt øker endotel permeabilitet (25, 26), og kan nedsette interstitielt fluidtrykk (8) som man mener er viktige barrierer for legemiddelpenetrering i tumorer (1). Disse mekanismer øker om mulig konvektiv transport av legemidler gjennom tumorkarveggen og interstitium, som til slutt resulterer i økt legemiddeloptak av tumorceller. Tidspunkt for administrering er likeledes kritisk for disse mekanismer, da TNF også kan

indusere intravaskulær koagulasjon (27) som fører til karokklusjon og reduksjon av tumorperfusjon. I henhold til dette ble det observert at effekten av melfalan var høyere når dette legemiddel ble administrert 2 timer etter NGR-TNF enn etter 6 timer (data ikke vist).

Hypotesen om at vaskulær targeting kunne unngå negative feedback-mekanismer, vanligvis assosiert med TNF terapi, understøttes ved observasjon om at pikogram-doser av NGR-mTNF ikke induserer oppløselig reseptor-frigivelse, mens både NGR-mTNF og mTNF raskt induserer frigivelsen av sTNF-R2 inn i sirkulasjonen ved doser som er større enn 4-10 ng. Disse nivåer av sTNF-R2 inhiberte det meste av anti-tumoraktiviteten av 10 ng NGR-mTNF og kan forklare den paradoksale observasjon av 10 ng er mindre aktiv enn 0,1 ng. Likeledes ble en stor andel av indiserte molekyler raskt kompleksdannet ved sTNF-Rs og deres aktivitet ble blokkert.

De molekylære mekanismer som danner grunnlaget for den selektive interaksjon av lave doser av NGR-mTNF med tumorblodkar er blitt delvis klarlagt. Man har nylig vist at forskjellige CD13 isoformer er uttrykt i tumor-assosierte kar, i epitel og i myeloide celler, og at NGR domenet av NGR-TNF selektivt gjenkjenner en CD13 isoform assosiert med tumorkar (28). Man har derfor gått ut fra at lave blodnivåer av NGR-mTNF raskt kan interagere med CD13-positive endotelceller på grunn av høy-aviditet multivalent binding som involverer både CD13 og TNF-Rs, og lite eller overhodet ikke med CD13-negative endotelceller i normale kar, på grunn av lavere aviditet. En skjematisk fremstilling av disse konsepter og av de hypotetiske interaksjoner av NGR-TNF med oppløselige og membran-reseptorer er vist i Fig. 7.

Man har også funnet at RGD-TNF og IFN $\gamma$ -NGR er aktive i pikogram-området. Man har også vist av NGR-TNF øker effekten av cisplatinum.

Som konklusjon har man funnet at targetert avlevering av pikogram-doser av cytokiner til tumorkar øker anti-tumoraktiviteten til kjemoterapeutiske legemidler i mus uten å indusere oppløselig reseptorfrigivelse. Gitt at CNGRC motivet er forventet å targetere murine så vel som humane tumorassosierte kar (29), foreslår våre resultater at kombinasjonen av lave doser av targeterte cytokiner med anti-cancerlegemidler kan øke deres terapeutiske indeks i humane pasienter.



## Referanser

1. Jain, R.K. 1994. *Sci Am.* 271:58-65.
2. Lienard, D., et al. 1992 *J. Clin. Oncol.* 10:52-60.
3. Eggermont, A.M., et al. 1996. *J. Clin. Oncol.* 14:2653-2665.
4. Lejeune, F.J. 1995. *Eur. J. Cancer.* 31A:1009-1016.
5. Fraker, D.L., et al. 1996. *J. Clin. Oncol.* 14:479-489.
6. Rossi, C.R., et al. 1999. *Cancer.* 86:1742-1749.
7. van der Veen, A.H., et al. 2000. *Br. J. Cancer.* 82:973-980.
8. Kristensen, C.A., et al. 1996. *Br. J. Cancer.* 74:533-536.
9. Suzuki, S., et al. 1990. *Int. J. Cancer.* 46:1095-1100.
10. de Wilt, J.H., et al. 2000. *Br. J. Cancer.* 82:1000-1003.
11. Fiers, W. 1995. Biologic therapy with TNF: preclinical studies. *In* Biologic therapy of cancer: principles og practice. V. De Vita, S. Hellman, og S. Rosenberg, editors. J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 295-327.
12. Fraker, D.L., H.R. Alexander, og H.I. Pass. 1995. Biologic therapy with TNF: systemic administration og isolation-perfusion. *In* Biologic therapy of cancer: principles og practice. V. De Vita, S. Hellman og S. Rosenberg, editors. J.B. Lippincott Company, Philadelphia 329-345.
13. Corti, A., og F. Marcucci. 1998. *J. Drug Targ.* 5:403-413.
14. Curnis, F., Aet al. 2000. *Nat. Biotechnol.* 18:1185-1190.
15. Moro, M., et al. 1997. *Cancer Res.* 57:1922-1928.
16. Corti, A., et al. 1999. *Infect Immun.* 67:5762-5767.
17. Pelagi, M., et al. 2000. *Eur. Cytokine Net.* 11:580-588.
18. Corti, A., et al. 1994. *J. Immunol. Meth.* 177:191-198.
19. Smith, R.A., og C. Baglioni. 1987. *J. Biol. Chem.* 262:6951-6954.
20. Gasparri, A., et al. 1999. *Cancer Res.* 59:2917-2923.
21. Aderka, D., et al. 1998. *J. Clin. Invest.* 101:650-659.
22. Tartaglia, L.A., et al. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:9292-9296.
23. Luk, C.K., og I.F. Tannock. 1989. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:55-59.
24. Sella, A., et al. 1995. *Cancer Biother.* 10:225-235.

25. Brett, J., et al. 1989. *J. Exp. Med.* 169:1977-1991.
26. Goldblum, S.E., og W.L. Sun. 1990. *Am. J. Physiol.* 258:L57-67.
27. Clauss, M., et al. 1992. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by TNF: insights into the role of endothelium in the host response to inflammatory stimuli. *In Tumour necrosis factors: the molecules og their emerging roles in medicine.* B. Beutler, editor, Raven Press, New York. 49-63.
28. Curnis, F., et al. 2002. *Cancer Res.*:62:867-874.
29. Arap, W., et al. 1998. *Science.* 279:377-380.

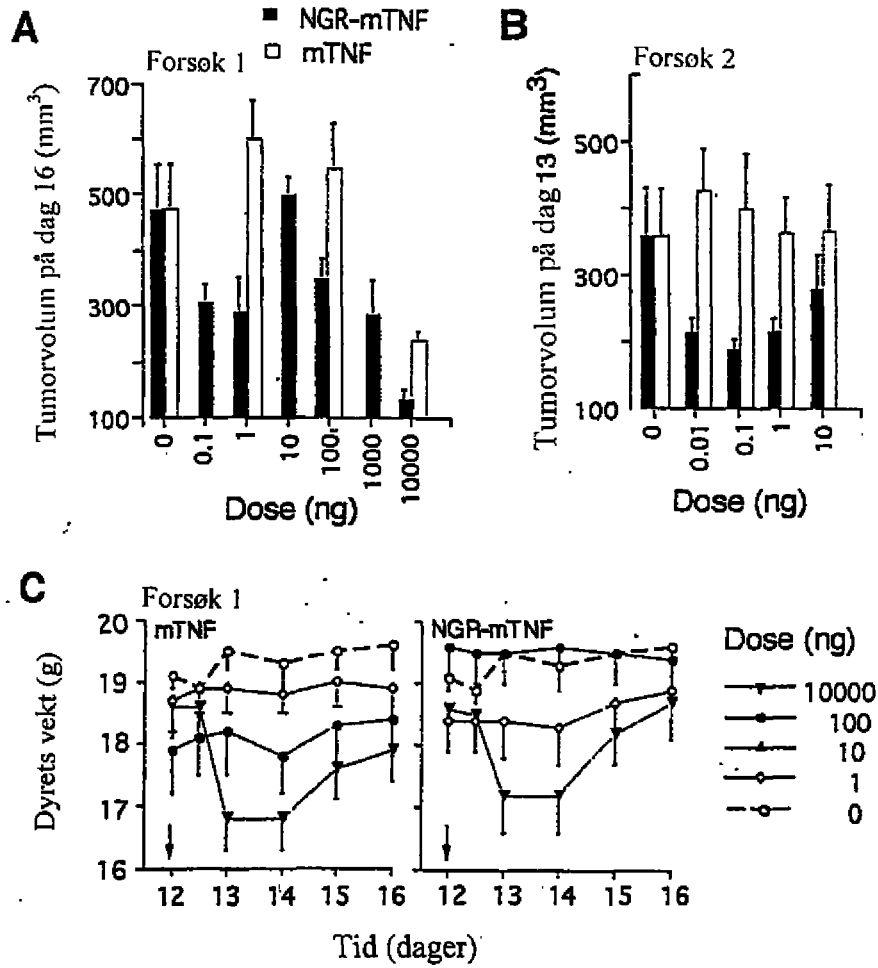
**PATENTKRAV**

1.      Anvendelse av et konjugat av et cytokin og minst en tumor-targeting-enhet (TTM) som inneholder NGR motivet eller RGD motivet for fremstilling av et medikament for behandling av cancer, hvor konjugatet er til stede i en mengde for å tilveiebringe en dosering i området fra 1 til 50 ng/kg.
  
2.      Anvendelse som angitt i krav 1, hvor konjugatet er til stede i en mengde for å tilveiebringe en dosering i området fra 5 til 15 ng/kg.
  
3.      Anvendelse som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvor cytokinet er et inflammatorisk cytokin.
  
4.      Anvendelse som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvor cytokinet er et kjemoterapeutisk cytokin.
  
5.      Anvendelse som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvor cytokinet er TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-1, 2, 4, 6, 12, 15, EMAP II, vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF), PDGF, PD-ECGF eller et kjemokin.
  
6.      Anvendelse som angitt i krav 5, hvor cytokinet er TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  eller IFN- $\gamma$ .
  
7.      Anvendelse som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvor TTM er en tumor-vaskulatur targeting-enhet(TVTM).
  
8.      Anvendelse som angitt i krav 7, hvor TVTM er en bindingspartner av en tumor-vaskulatur-reseptor, markør, eller annen ekstracellulær komponent.
  
9.      Anvendelse som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 6, hvor TTM er en bindingspartner av en tumorreseptor, markør eller annen ekstracellulær komponent.
  
10.     Anvendelse som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvor TTM inneholder NGR motivet.

11. Anvendelse som angitt i krav 10, hvor TTM er CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, cykloCVLNGRMEC, lineær eller cyklisk CNGRC.
12. Anvendelse som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvor TTM er targetrettet mot aminopeptidase N (CD13),  $\alpha\beta3$  integrin eller  $\alpha\beta5$  integrin.
13. Anvendelse som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvor cytokinet er koblet til nevnte TTM gjennom en spacer.
14. Anvendelse som angitt i krav 13, hvor nevnte spacer er en enkelt aminosyre, en aminosyresekvens eller en organisk rest.
15. Anvendelse som angitt i krav 13, hvor cytokinet er TNF og TTM er CNGRC og hvor TNF er koblet til CNGRC gjennom spaceren G (glycin).
16. Anvendelse som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvor konjugatet er i form av et fusjonsprotein.
17. Anvendelse som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 16, hvor konjugatet er i form av en nukleinsyre.
18. Anvendelse som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvor medikamentet administreres samtidig med, sekvensielt med og separat med et annet antitumormiddel eller diagnostisk tumoravbildingsforbindelse.
19. Anvendelse som angitt i krav 18, hvor det ytterligere antitumormiddel er doksorubicin, melfalan eller cisplatin.

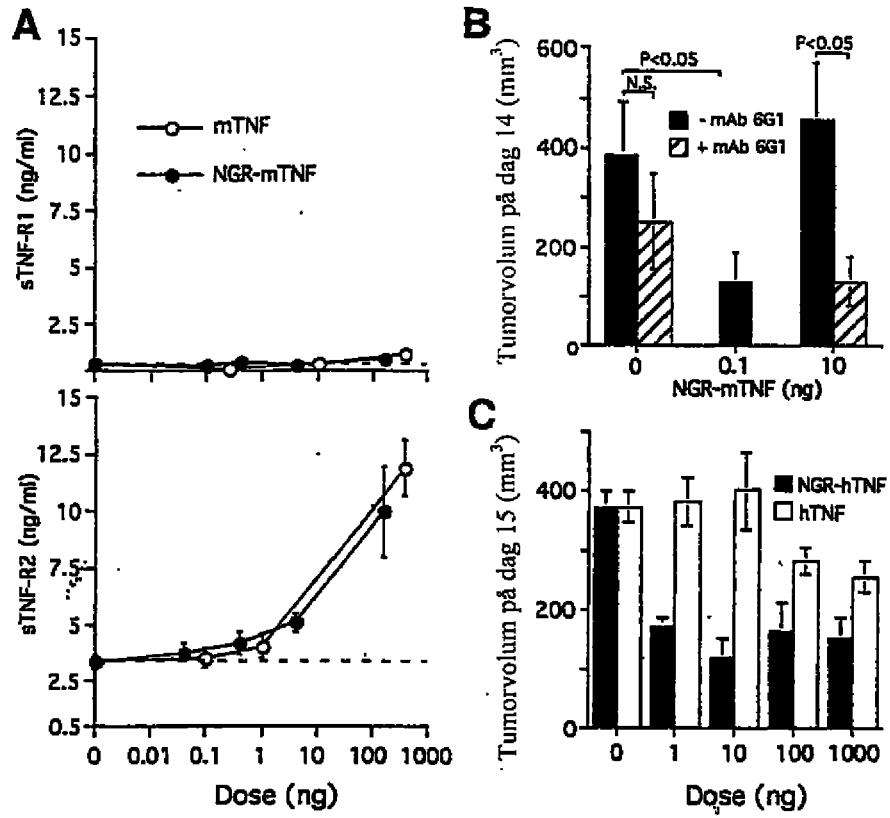
1/10

FIGUR 1



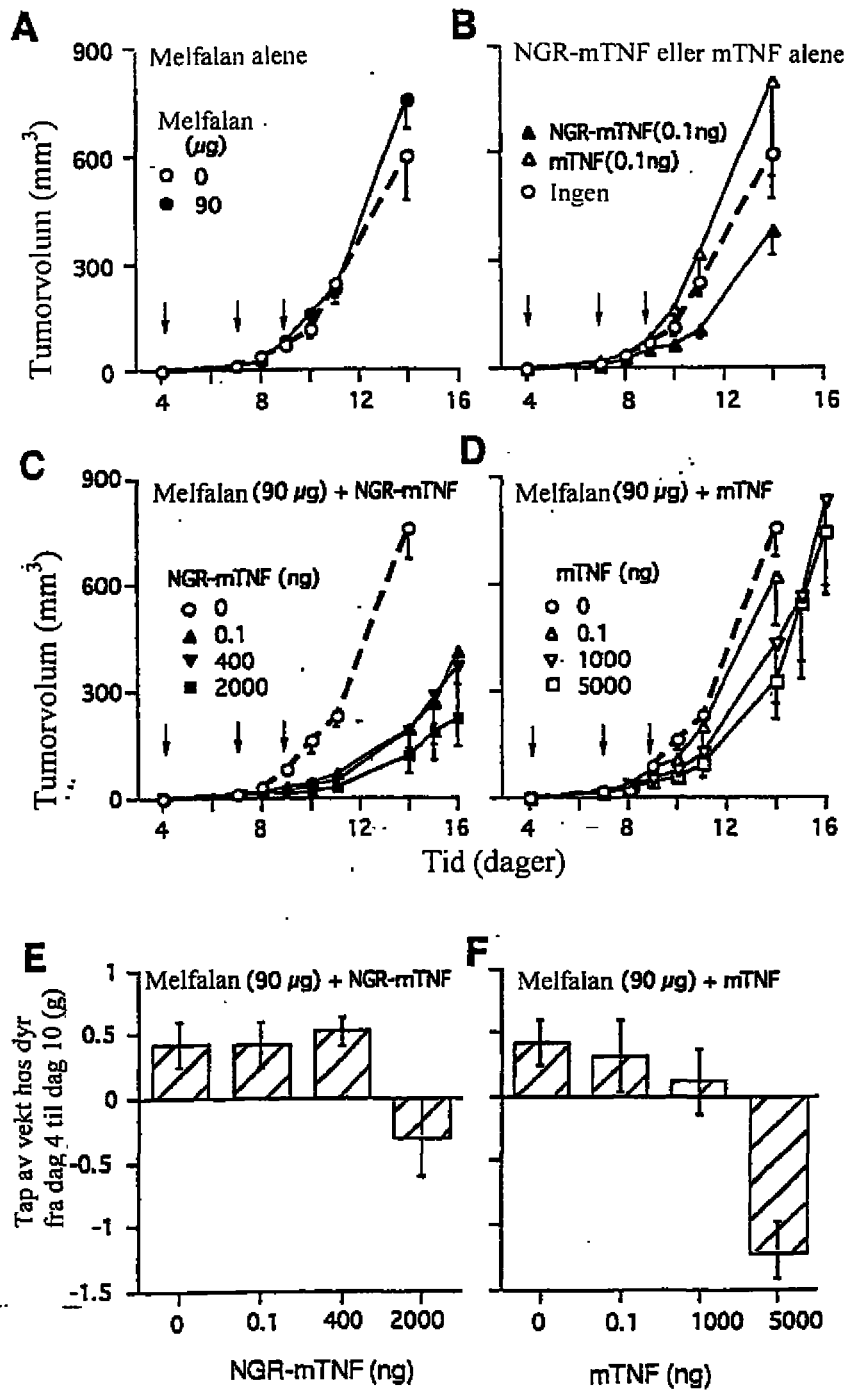
2/10

FIGUR 2



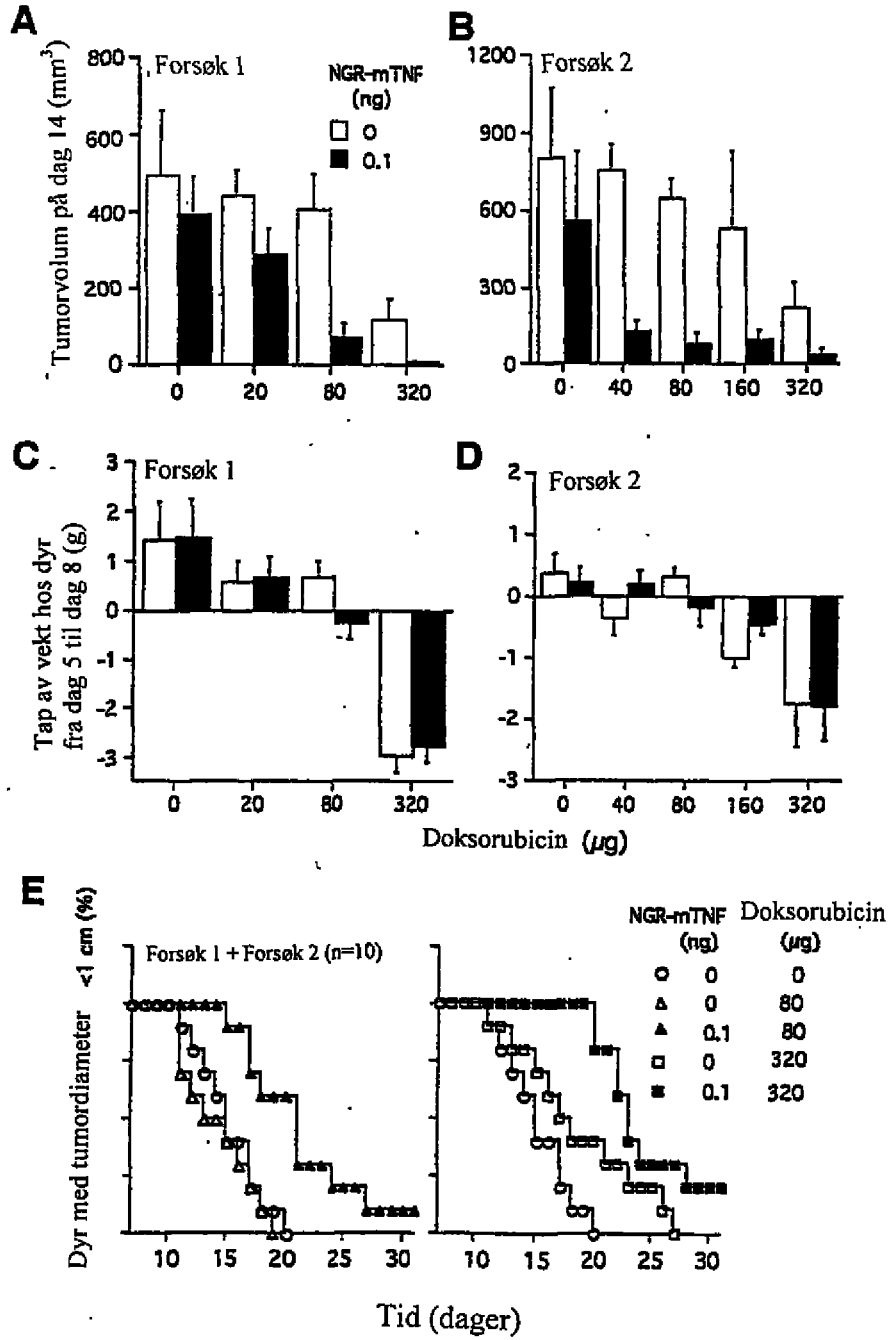
3/10

FIGUR 3



4/10

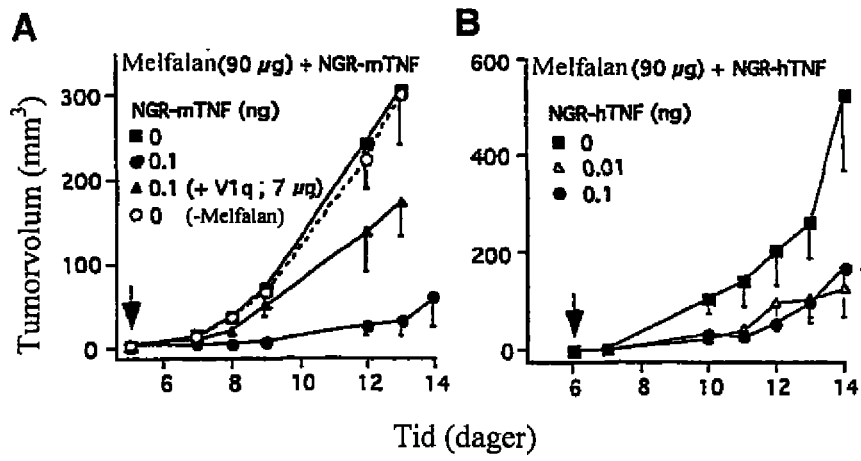
FIGUR 4





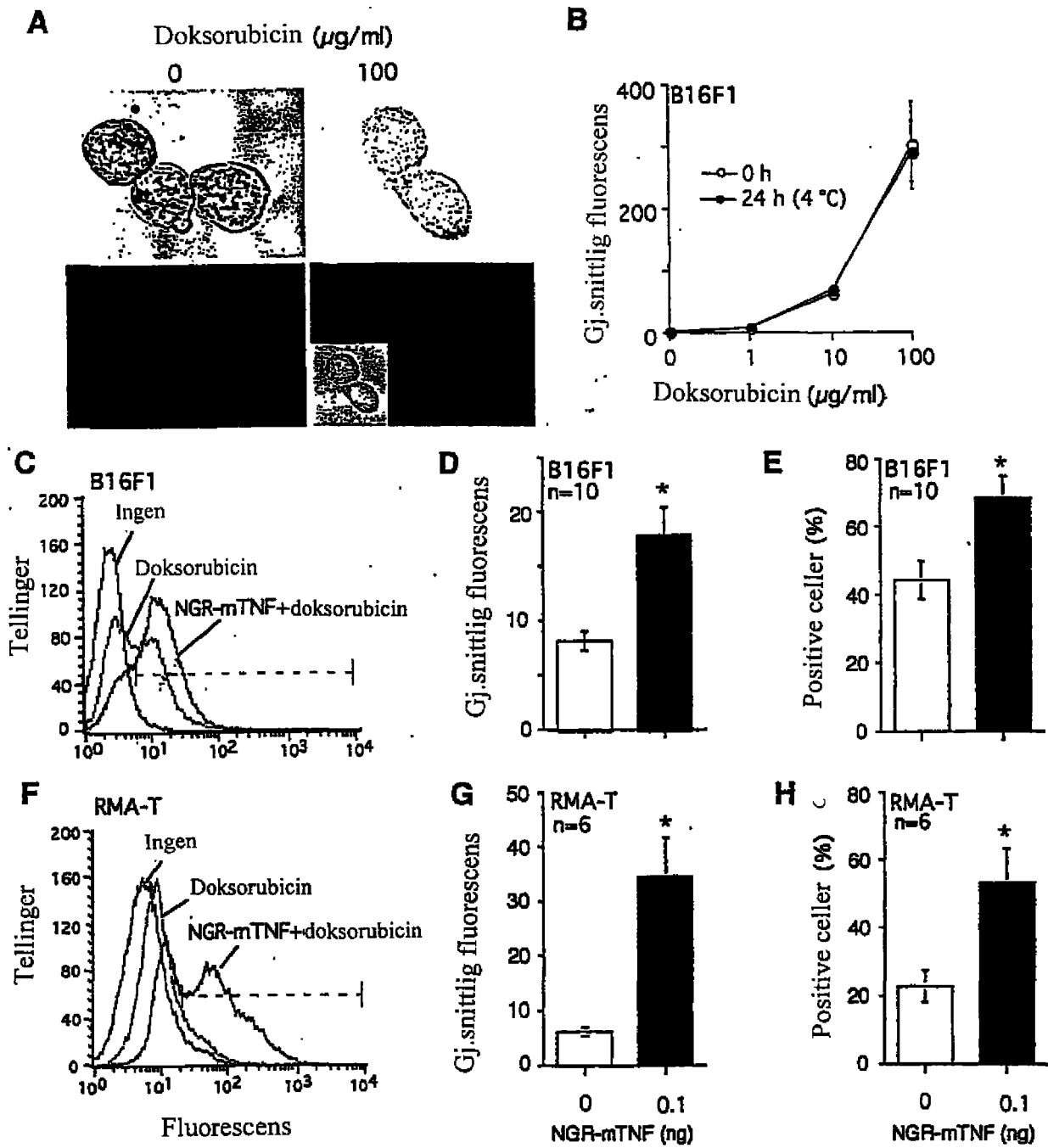
5/10

FIGUR 5



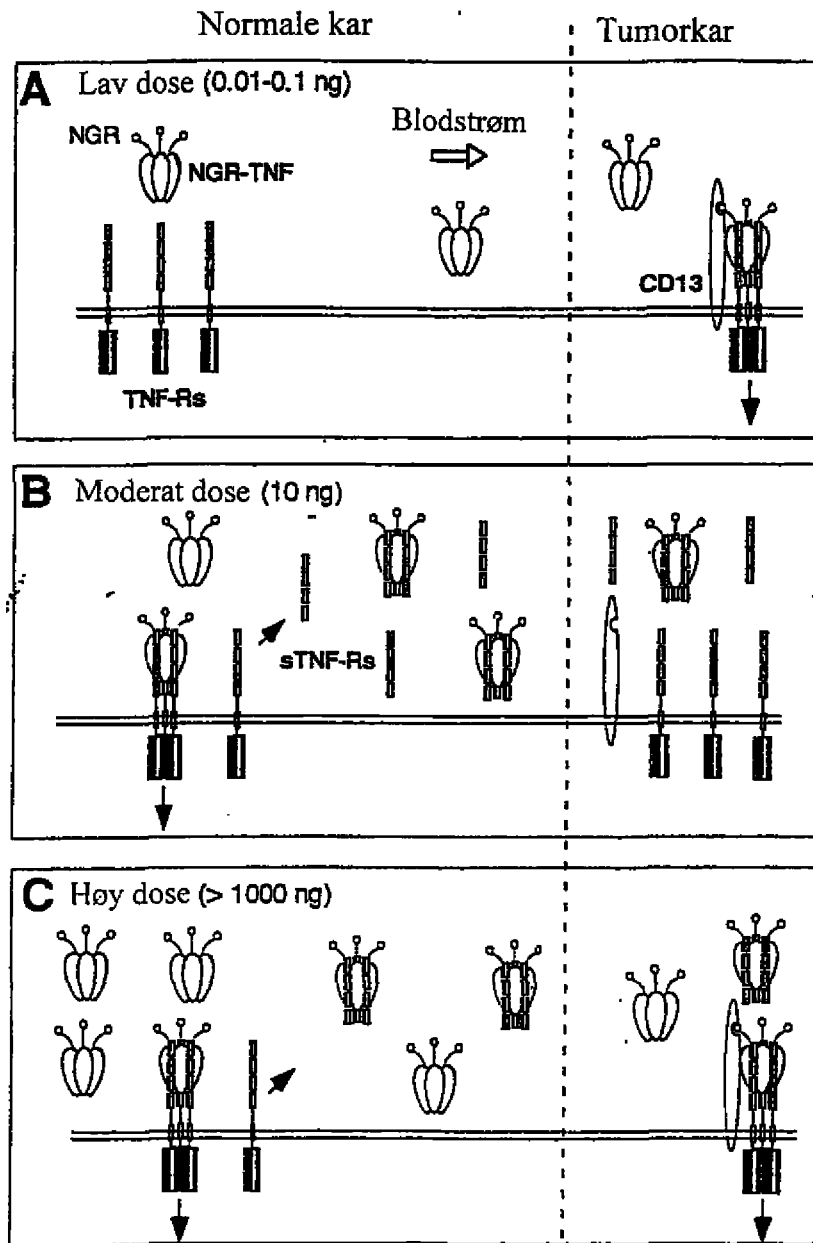
6/10

FIGUR 6



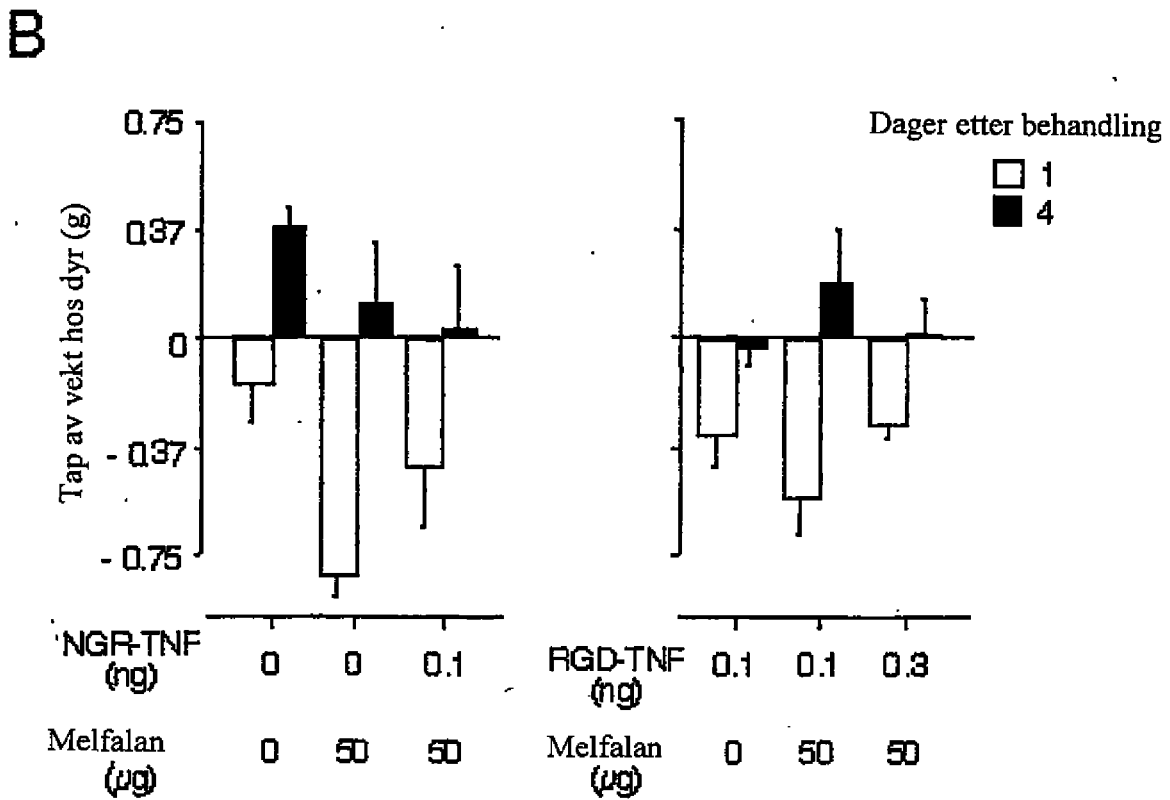
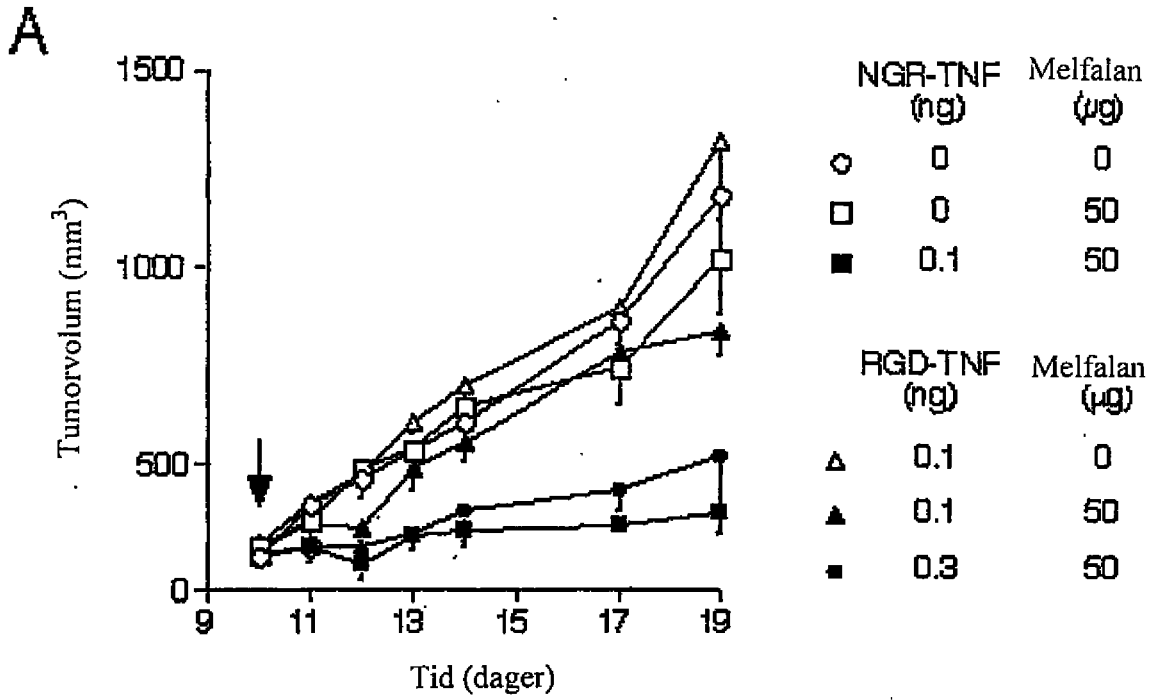
7/10

FIGUR 7



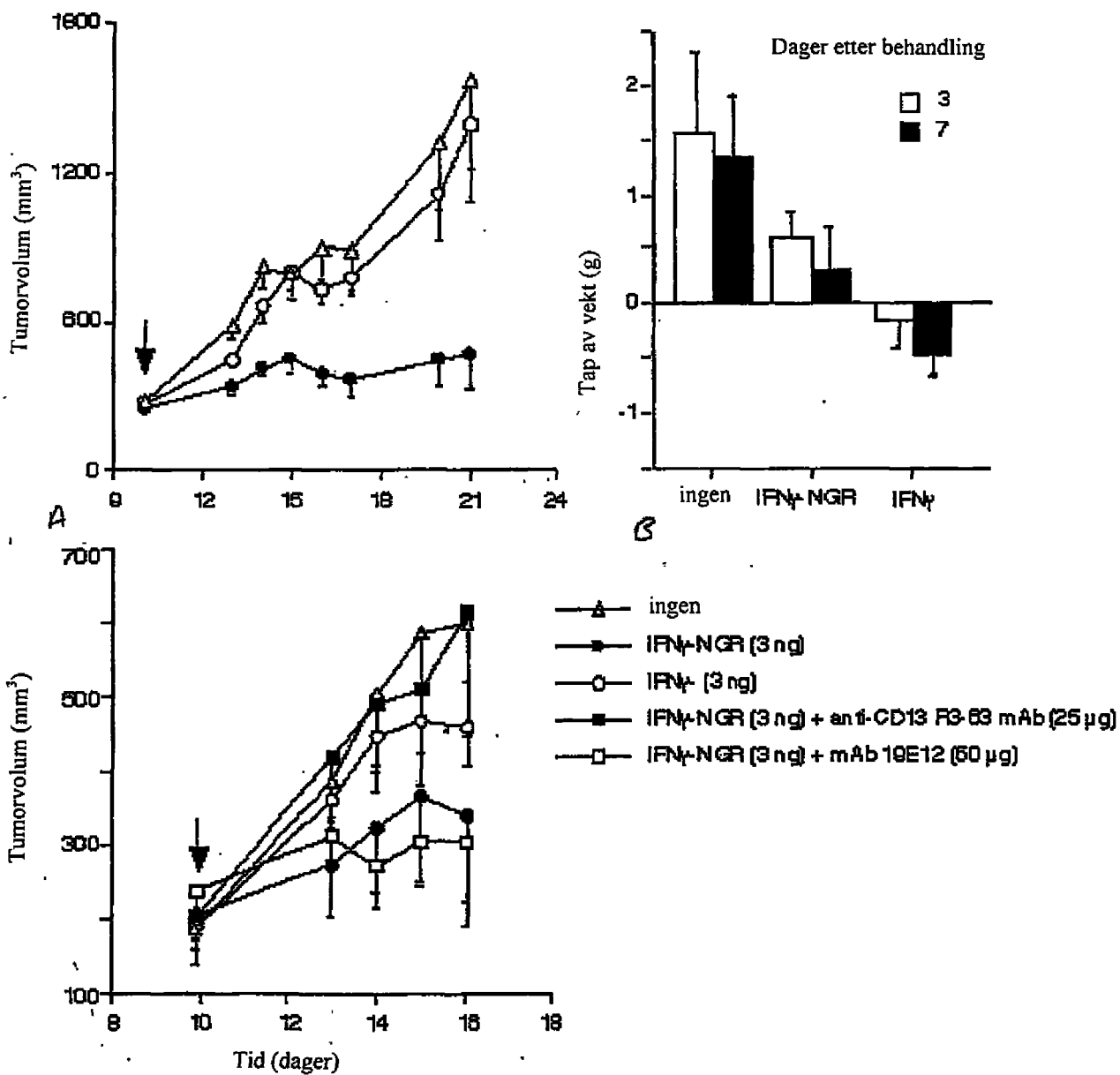
8/10

FIGUR 8



9/10

FIGUR 9



10/10

FIGUR 10

