



(12) PATENT

(19) NO

(11) 330913

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 19/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)
C07K 14/555 (2006.01)
C07K 14/57 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/23 (2006.01)
C12N 15/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20023833	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.02.13 PCT/EP2001/01543
(22)	Inng.dag	2002.08.13	(85)	Videreføringsdag	2002.08.13
(24)	Løpedag	2001.02.13	(30)	Prioritet	2000.02.15, IT, MI00A000249
(41)	Alm.tilgj	2002.10.15			
(45)	Meddelt	2011.08.15			
(73)	Innehaver	Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor, Via Olgettina, 60, 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			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Konjugeringsprodukt, dets anvendelse og farmasøytisk preparat inneholdende det samme.
(56)	Anførte publikasjoner	GASPARRI A. et al., "Tumor Pretargeting with Avidin...", Cancer Res., 1999, vol. 59, s.2917-2923, ISSN 0008-5472, WO 98/10795 A2, WO 99/13329 A1
(57)	Sammendrag	

Cytokinderivater i stand til homing av tumorkar og antigenpresenterende celler og anvendelse derav som antitumormidler.

Foreliggende oppfinnelse vedrører modifiserte cytokiner for anvendelse i behandling av cancer. Mere spesielt vedrører oppfinnelsen cytokinderivater som kan dirigeres ("homing") til tumorkar og antigenpresenterende celler.

5

Antitumoraktiviteten til enkelte cytokiner er vel kjent og beskrevet. Enkelte cytokiner er allerede blitt anvendt terapeutisk også i mennesker (29). Slike cytokiner som interlevkin-2 (IL-2) og interferon α (IFN α) har f.eks. vist positiv
10 antitumoraktivitet i pasienter med forskjellige typer av tumorer, som nyremetastatisk karsinom, hårcellelevkemi, Kaposi sarkom, melanomer, multiple myelomer og lignende. Andre cytokiner som IFN β , tumornekrosefaktoren (TNF) α , TNF β , IL-1,4,6,12,15 og kolonistimulerende faktorer (CFS'er) har vist
15 en viss antitumoraktivitet på noen typer av tumorer og er derfor gjenstand for videre studier.

Generelt er den terapeutiske anvendelse av cytokiner sterkt begrenset ved deres systemiske toksisitet. TNF ble f.eks.
20 opprinnelig oppdaget for dens evne til å indusere hemoragisk nekrose av enkelte tumorer (1), og for dens in vitro cytotoxiske effekt på forskjellige tumorlinjer (2), men den viste seg senere å ha en sterk pro-inflammatorisk aktivitet som, i tilfellet av overproduksjonsbetingelser, kan påvirke menneske-
25 kroppen (3) på en måte som er forbundet med fare.

Da den systemiske toksisitet er et fundamentalt problem med bruken av farmakologisk aktive mengder av cytokiner i mennesker, er nå nye derivater og terapeutiske strategier under
30 vurdering, med sikte på å redusere de toksiske effekter til denne klassen av biologiske effektorer mens deres terapeutiske effektivitet opprettholdes.

Enkelte nye tilnærminger er rettet mot:

- 35 a) utviklingen av fusjonsproteiner som kan avlevere TNF inn i tumoren og øke den lokale konsentrasjonen.
Fusjonsproteinene som består av TNF og tumorspesifikke antistoffer har f.eks. blitt produsert (4);

- b) utviklingen av TNF mutanter som opprettholder antitumor-aktiviteten og har en redusert systemisk toksisitet. Følgelig har mutanter som er i stand til selektivt å kunne gjenkjenne en reseptor (p55 eller p75) allerede blitt fremstilt (5);
- c) anvendelsen av anti-TNF antistoffer som er i stand til å redusere enkelte toksiske effekter av TNF uten å kompromittere dens antitumoraktivitet. Slike antistoffer er allerede blitt beskrevet i litteraturen (30);
- 10 d) anvendelsen av TNF derivater med en høyere halveringstid (f.eks. TNF konjugert med polyetylen glykol).

Fremstillingen av TNF derivater som er i stand til selektiv målretting mot tumorseter er nylig blitt rapportert. Et fusjonsprotein er f.eks. blitt beskrevet, oppnådd ved fusjon av genet for den tunge kjeden til et anti-transferrinreseptor mAb og TNF genet (4), eller et fusjonsprotein av TNF med "hengsel" regionen til et monoklonalt antistoff overfor det tumorassosierte TAG72 antigen (6), eller et Fv-TNF fusjonsprotein (6).

EP 251 494 omhandler et system for administrering av et diagnostisk eller terapeutisk middel som omfatter et antistoff konjugert med avidin eller streptavidin, et middel i stand til å kompleksdanne det konjugerte antistoff og en forbindelse som består av det diagnostiske eller terapeutiske middel konjugert med biotin, som administreres fortløpende og passende forsinket, for å tillate lokaliseringen av det terapeutiske eller diagnostiske middel gjennom biotin-streptavidin interaksjonen på targetcellen gjenkjent ved antistoffet. De beskrevne terapeutiske- eller diagnostiske midler omfatter metallchelater, særlig chelater av radionuklider og antitumormidler med lav molekylvekt som cis-platina, doxorubicin osv.

35 EP 496 074 omhandler en metode som tilveiebringer den fortløpende administrering av et biotinylert antistoff, avidin eller streptavidin og et biotinylert diagnostisk eller terapeutisk middel. Skjønt cytotoxiske midler som ricin er nevnt

generelt, er bruken som angår radioaktivt merkede forbindelser hovedsakelig omtalt.

5 WO 95/15979 omhandler en metode for å lokalisere svært toksiske midler på cellulære mål, 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 bestående av det toksiske middel bundet til en anti-ligand eller til liganden.

10

WO 99/13329 og WO 98/10795 omhandler en metode for målretting av et molekyl mot tumorale angiogene kar, basert på konjugeringen av nevnte molekyl med ligander av NGR reseptorer. En rekke molekyler er blitt foreslått som mulige kandidater, men 15 doxorubicin er den eneste som spesifikt er beskrevet. Ingen bruk av ligander av NGR reseptorer som cytokin-vehikler for å indusere immunresponser er omtalt.

GASPARRI A. et al., "Tumor Pretargeting with Avidin...", 20 Cancer Res., 1999, vol. 59, s. 2917-2923, ISSN 0008-5472 beskriver konjugater mellom biotin og TNF og hvordan tumor-målretting med avidin fører til økning av anti-tumor-aktiviteten til disse konjugatene.

25 Man har nå overraskende funnet at den terapeutiske indeks til visse cytokiner kan forbedres påfallende og deres immunterapeutiske egenskaper kan økes ved kobling med en ligand av aminopeptidase-N reseptor (CD13). CD13 er et trans-membran glykoprotein på 150 kDa som er omfattende konserververt i for- 30 skjellige 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.

35

I henhold til et første aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et konjugeringsprodukt av et cytokin valgt fra TNF og IFN γ og en CD13 reseptor ligand, hvori liganden er et peptid som inneholder NRG 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. Peptidet kan være direkte koblet til cytokinet eller indirekte gjennom en
5 spacer, som kan være en enkelt aminosyre, en aminosyresekvens eller en organisk rest, som 6-aminokapryl-N-hydrokysuccinimid. Koblingsprosedyrene er kjente for de fagkyndige på området og omfatter genteknologi eller kjemiske synteseteknikker.

10

Peptidliganden kobles foretrukket til cytokin-N-terminusen og minimerer således eventuell interferens ved bindingen av det modifiserte cytokin til dets reseptor. Alternativt kan peptidet være koblet til aminosyrerester som er amido- eller
15 karboksylysyrer-bindingsakseptorer, naturlig forekommende på molekylet eller innført kunstig ved hjelp av teknikker for genteknologi. Det modifiserte cytokin fremstilles foretrukket ved anvendelse av et cDNA omfattende en 5'-tilgrensende sekvens som koder for peptidet.

20

Ifølge en foretrukket utførelse, er det tilveiebragt et konjugatprodukt mellom TNF og CNGRC sekvensen. Mere foretrukket er amino-terminalen av TNF koblet til CNGRC peptidet gjennom spacer G(glysin).

25

Det oppnådde produkt (NGR-TNF) har vist seg å være mere aktivt enn TNF på RMA-T lymfom dyremodeller. Videre var dyr behandlet med NGR-TNF i stand til å forkaste ytterligere tumorigeniske doser av RMA-T eller RMA celler. Økningen i antitumoraktiviteten, sammenlignet med normal TNF, kunne observeres i
30 immunokompetente dyr, men ikke i dyr med immunsvikt. Dette indikerer at økningen i den antitumorale aktivitet av TNF konjugert med "NGR" peptider skyldes en økt immunrespons heller enn en direkte cytotoxisk aktivitet av konjugatet.

35

Det har også blitt vist at in vivo immuneffektene induisert ved NGR-TNF er direkte relatert til CD13 reseptoren. Det har f.eks. blitt observert at antistoff mot CD13 reseptoren så vel

som GNGRC liganden konkurrerer med NGR-TNF in vivo, noe som foreslår en mekanisme av reseptor-målretting ved NGR-TNF.

Den terapeutiske indeks av TNF/CD13 ligand konjugatene kan videre forbedres ved å anvende en mutant form av TNF som er i stand til selektiv binding til en av de to TNF reseptorer, p75TNFR og p55TNFR. Nevnte TNF mutant kan oppnås ved seterrettet mutagenese (5;7).

Farmakokinetikken til de modifiserte cytokiner ifølge oppfinnelsen kan forbedres ved å fremstille polyetylenglykolderivater, som tillater å forlenge plasma-halveringstiden til selve cytokinene.

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er tilveiebragt ved bifunksjonelle derivater hvor cytokinet modifisert med CD13 liganden er konjugert med antistoffer eller deres fragmenter, mot tumorantigener eller andre tumor-angiogeniske markører, f.eks. av integriner, metalloproteaser eller den vaskulære vekstfaktor, eller antistoffer eller fragmenter derav rettet mot komponenter av den ekstracellulære matriks, slik som anti-tenascin antistoffer eller anti-fibronectin EDB domener. Fremstillingen av et fusjonsprodukt mellom TNF og hengselregionen av et mAb mot det tumorassosierte TAG72 antigen uttrykt ved gastriske og ovarium adenokarsinomer har nylig blitt rapportert (6).

En ytterligere utførelsesform av oppfinnelsen er tilveiebragt ved den tumorale pre-målretting med biotin/avidinsystemet. Ifølge denne tilnærming, oppnås et ternært kompleks på det tumorale antigeniske setet, på ulike stadier, som er dannet ved 1) biotinylert mAb, 2) avidin (eller streptavidin) og 3) bivalent cytokin modifisert med CD13 liganden og biotin. En rekke artikler viste at pre-målrettings-tilnærmingen, sammenlignet med konvensjonell målretting med immunokonjugater, i realiteten kan øke forholdet mellom aktivt molekyl som er dirigert til ("homed") målet og det frie aktive molekyl, med følgende reduksjon av behandlingstoksisiteten (11,10,9,8). Denne tilnærmingen ga gunstige resultater med biotinylert TNF,

som var i stand til å indusere cytotoxicitet in vitro og nedsatt tumorcellevekst under betingelser hvor normal TNF var inaktiv (14,26). Pre-målrettings-tilnærmingen kan også gjennomføres med en to-fase prosedyre ved anvendelse av et
5 bispesifikt antistoff som samtidig binder det tumorale antigen og det modifiserte cytokin. Bruk av et bispesifikt antistoff rettet mot et karsinoembryonisk antigen og TNF er nylig blitt beskrevet som et middel for TNF tumoral pre-targetering (31).

10 I henhold til en ytterligere utførelsesform, omfatter oppfinnelsen et TNF molekyl konjugert til både en CD13 ligand og et antistoff, eller et fragment derav (direkte eller indirekte via en biotin-avidin bro), på ulike TNF subenheter, hvor antistoffet eller dets fragmenter er rettet mot et antigen uttrykt
15 på tumorceller eller andre komponenter av tumor stroma, f.eks. tenascin og fibronektin EDB domene. Dette resulterer i en ytterligere forbedring av tumor-dirigering egenskapene til det modifiserte cytokin og i den sakte frigivelse av sistnevnte i tumor-mikromiljøet gjennom trimer-monomer-trimer transisjoner.
20 Som vist i tidligere arbeider, kan faktisk de modifiserte subenheter av TNF konjugater dissosiere fra målrettingskompleksene og reassosiere for å danne umodifiserte trimere TNF molekyler, som deretter diffunderer i tumor-mikromiljøet. Frigivelsen av bioaktivt TNF er blitt vist til å forekomme
25 innen 24-48 timer etter målretting (21).

Oppfinnelsen vedrører også cDNA som koder for et cytokin valgt fra TNF og IFN γ som bærer en 5' eller 3' tilgrensende sekvens som koder for en ligand av CD13 reseptoren, hvori liganden er
30 et peptid som inneholder NGR motivet.

Oppfinnelsen vedrører også en vektor for genterapi som inneholder cDNA ifølge oppfinnelsen.

35 Oppfinnelsen vedrører også et farmasøytisk preparat som inneholder en effektiv mengde av et konjugeringsprodukt ifølge oppfinnelsen, et cDNA ifølge oppfinnelsen eller en vektor ifølge oppfinnelsen, sammen med farmasøytisk aksepterbare bærere og eksipienser.

Endelig vedrører oppfinnelsen anvendelse av et konjugeringsprodukt ifølge oppfinnelsen, et cDNA ifølge oppfinnelsen eller en vektor ifølge oppfinnelsen, for fremstilling av medikamenter eller diagnostika for terapi av
5 cancer.

For anvendelse i terapi vil de modifiserte cytokiner ifølge oppfinnelsen passende være formulert i farmasøytiske preparater for oral eller parenteral administrering. Formuleringer
10 for parenteral administrering er foretrukne, og de kan omfatte injiserbare oppløsninger eller suspensjoner og væsker for infusjoner. For fremstilling av de parenterale former, vil en effektiv mengde av den aktive bestanddel oppløses eller suspenderes i en steril bærer, eventuelt med tilsetning av
15 eksipienser som solubiliserende midler, isotonisitetsmidler, preserveringsmidler, stabilisatorer, emulgeringsmidler eller dispergeringsmidler, og preparatet vil deretter fordeles i forseglede rør eller ampuller.

20 Fremstillingen av cytokiner i form av liposomer kan forbedre den biologiske aktivitet derav. Det er faktisk blitt observert at acylering av TNF aminogruppene induserer en økning i deres hydrofobisitet uten tap av biologisk aktivitet in vitro. Det er videre blitt rapportert at TNF bundet til lipider har
25 upåvirket cytotoxicitet in vitro, immunmodulerende effekter og redusert toksisitet in vivo (12,13).

Den maksimale tolererte dose av bolus TNF i mennesker er 218-410 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (32) omtrent 10-ganger lavere enn den effektive
30 dosen i dyr. Basert på data fra musemodeller mener man at en minst 10-ganger høyere dose er nødvendig for å oppnå anti-tumoreffekter i mennesker (15). I det første kliniske studium på hypertermisk isolert-lem perfusjon, ble høye responsrater oppnådd med den eneste dose på 4 mg TNF i kombinasjon med
35 melfalan og interferon γ (16). Andre arbeider viste at interferon γ kan utelates og at til og med lavere doser av TNF kan være tilstrekkelig til å indusere en terapeutisk respons (17,18). Da de to cytokiner utøver synergistiske effekter på endotelceller, vil deres kombinerte, selektive målretting

derpå sannsynligvis resultere i sterkere anti-tumoraktivitet noe som tillater overvinnelse av problemene med systemisk toksisitet som vanligvis påtreffes i cancerterapi med de samme cytokiner anvendt i kombinasjon. Det er videre kjent at TNF

5 kan nedsette barrierefunksjonen til endotel-dekk-karene, noe som således øker deres permeabilitet for makromolekyler. Ved å benytte seg av den lavere behandlingstoksisitet med de modifiserte TNF molekyler ifølge oppfinnelsen, og av deres egenskaper for dirigering til tumorkar, er en alternativ bruk

10 deres anvendelse for å øke permeabiliteten av tumorkar overfor andre forbindelser, enten for terapeutiske eller diagnostiske formål. Det modifiserte TNF kan f.eks. anvendes for å øke tumoropptaket av radioaktivt merkede antistoffer eller hormoner (tumor-avbildingsforbindelser) i radio-

15 immunoscintigrafi eller radioimmunoterapi av tumorer. Opptaket av de kjemoterapeutiske legemidler, immunotoksiner, liposomer som bærer legemidler eller gener, eller andre anti-cancerlegemidler vil alternativt også økes, slik at deres anti-tumoreffekter økes.

20

Cytokinene ifølge oppfinnelsen kan følgelig anvendes i kombinerte, separate eller sekvensielle preparater, også med andre diagnostiske eller terapeutiske substanser, for behandling eller for diagnose av cancer.

25

Et aspekt av oppfinnelsen vedrører som nevnt det cDNA som koder for de konjugerte cytokiner omtalt heri, som kan fremstilles fra cytokin cDNA ved addisjon av en 5'- eller 3'-tilgrensende DNA sekvens som koder for CD13 liganden,

30 foretrukket for peptidene for dirigering som beskrevet over. Det kombinerte cDNA kan anvendes som sådan eller etter inserasjon i vektorer for genterapi. Fremstillingen og terapeutiske anvendelser av passende vektorer er omtalt i (19).

35

BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1: Effekt av TNF og NGR-TNF på veksten av RMA-T lymfomer (a og b) og på dyrevekten (c og d).

5 dyr/gruppe ble behandlet med en enkelt dose av TNF eller NGR-TNF (i.p.), 10 dager etter tumorimplantasjon. Tumorområdeverdier på dag 14 som funksjon av dosen (b) og vekttapet etter behandling (gjennomsnitt av dager 11 og 12) (d) ble interpolert fra logaritmiske kurver. Anti-tumoreffektene induisert ved 1 µg eller 9 µg NGR-TNF på dag 14 var større enn dem induisert ved sammenlignbare mengder av TNF (P=0,024 og P=0,032, henholdsvis), mens vekttapet etter disse behandlinger var like. Pilene indikerer ekstrapolerte doser av TNF og NGR-TNF som induserer sammenlignbare effekter.

Figur 2: Effekt av mAb R3-63 og CNGRC på anti-tumoraktiviteten til NGR-TNF(a) og TNF(b).

MAb R3-63 eller CNGRC ble blandet med NGR-TNF eller TNF og administrert til RMA-T tumorbærende dyr 12 dager etter tumorimplantasjon (n=5 dyr/gruppe). I et separat forsøk (c) ble TNF og NGR-TNF koadministrert med CNGRC eller CARAC (et kontrollpeptid) til dyr som bærer 11 dager gamle tumorer (n=5). Anti-tumoreffekten for 1 µg NGR-TNF var sterkere enn den for 9 µg TNF (P=0,009, t-test på dag 20) og var signifikant inhibert ved CNGRC (P=0,035) og ved mAb R3-63 (P=0,011).

Figur 3: Effekt av begrenset tryptisk nedbrytning av NGR-TNF og TNF på deres masse(a) og anti-tumoraktivitet(b).

Trypsin-agarose ble fremstilt ved å koble 1 mg trypsin til 1 ml aktivert CH Sepharose (Pharmacia-Upjohn), i henhold til produsentens instruksjoner. NGR-TNF og TNF (170 µg hver i 300 µl 0,15 M natriumklorid, 0,05 M natriumfosfat, pH 7,3) ble blandet med 15 µl harpikksuspensjon (1:4) eller buffer alene og rotert "end-over-end" ved 37°C i den indikerte tidsperiode. De fire produkter ble filtrert gjennom en 0,22 µm Spin-X anordning (Costar, Cambridge, MA) og lagret ved -20°C inntil bruk. (a) Elektrospray-massespektrometrianalyse. Molekylmasseverdiene og de tilsvarende produkter (N-terminale sekvenser) er indikert på hver topp. Pilene på sekvensene indikerer spaltingssetet. (b) Effekt av 1 eller 3 µg NGR-TNF og TNF, inkubert uten (øvre felt) eller med (nedre felt)

trypsin, på veksten av RMA-T tumorer og dyrevekt (gjennomsnitt \pm SE for grupper behandlet med 1 og 3 μ g doser). Dyrene ble behandlet 13 dager etter tumorimplantasjon (n=5 dyr/gruppe).

5 **Figur 4: SDS-PAGE og anti-tumoraktivitet av NGR-TNF før og etter denaturering/gjenfolding.**

SDS-PAGE under ikke-reduserende betingelser (A) av human TNF (a), NGR-TNF før (b) og etter (c) denaturerings/gjenfoldings-
10 prosessen beskrevet i eksempel V.

Effekt av TNF og ikke-gjenfoldet NGR-TNF på veksten av RMA-T lymfomer (B) og på kroppsvekt (C). Effekt av humant TNF (D) og gjenfoldet NGR-TNF (bestående av >95% trimerer ved intra-
15 kjededisulfider) (E) på tumorveksten. Dyr (15 eller 5 mus/-gruppe som indikert i hvert felt) ble behandlet med en i.p. dose av TNF eller NGR-TNF, 10 dager etter tumorimplantasjon.

De etterfølgende eksempler vil illustrere oppfinnelsen ytterligere.
20

EKSEMPEL I

Fremstilling av murin TNF og NGR-TNF

25 Murin rekombinant TNF og Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF (NGR-TNF) ble fremstilt ved cytoplasmisk cDNA ekspresjon i E.coli. cDNA som koder for murin Met-TNF₁₋₁₅₆ (20) ble fremstilt ved revers transkriptase-polymerase kjedereaksjon (RT-PCR) på mRNA isolert fra lipopolysakkarid-stimulerte murine RAW-264.7
30 monocytt-makrofagceller ved anvendelse av
5'-CTGGATCCTCACAGAGCAATGACTCCAAAG-3' og
5'-TGCCTCACATATGCTCAGATCATCTTCTC-3', som 3' OG 5' primere.

Det amplifiserte fragment ble kuttet med Nde I og Bam HI (New
35 England Biolabs, Beverly, MA) og klonet i pET-11b (Novagen, Madison, WI), som på forhånd var kuttet med de samme enzymer (pTNF).

cDNA som koder for Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF₁₋₁₅₆ ble amplifisert ved PCR på pTNF ved anvendelse av 5'-GCAGATCATATGTGCAACGGCCGTTGCGGCCTCAGATCATCTTCTC-3' som 5' primer, og ovennevnte 3' primeren. Det amplifiserte fragment ble kuttet og klonet i pET-11b som beskrevet over og anvendt til å transformere BL21(DE3) E.coli celler (Novagen). Ekspressjonen av TNF og NGR-TNF ble induisert med isopropyl- β -D-tiogalaktosid i henhold til pET11b produsentens instruksjoner. Oppløselig TNF og NGR-TNF ble utvunnet fra to-liters kulturer ved bakteriell sonisering i 2 mM etylendiamintetraeddiksyre, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, etterfulgt av sentrifugering (15000 x g, 20 min., 4°C). Begge ekstrakter ble blandet med ammoniumsulfat (25% metning), fikk stå i 1 time ved 4°C og ble videre ble sentrifugert som over. Ammoniumsulfatet i supernatantene ble deretter bragt til 65% metning, fikk stå ved 4°C i 24 timer og ble ytterligere sentrifugert. Hver pellet ble oppløst i 200 ml 1 M ammoniumsulfat, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 og renses ved hydrofob interaksjonskromatografi på Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia-Upjohn) (gradienteluering, buffer A:50 mM natriumfosfat, pH 8,0, inneholdende 1 M ammoniumsulfat, buffer B:20% glyserol, 5% metanol, 50 mM natriumfosfat, pH 8,0). Fraksjoner inneholdende TNF-immunoreaktivt material (ved western blotting) ble samlet, dialysert mot 2 mM etylendiamintetraeddiksyre, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 og videre renses ved ionebytterkromatografi på DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia-Upjohn) (gradienteluering, buffer A:20 mM Tris-HCl, pH 8,0, buffer B:1 M natriumklorid, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0). Fraksjoner som inneholdt TNF-immunoreaktivitet ble samlet og renses ved gelfiltreringskromatografi på Sephacryl-S-300 HR (Pharmacia-Upjohn), pre-ekvilibrert og eluert med 150 mM natriumklorid, 50 mM natriumfosfatbuffer, pH 7,3 (PBS). Fraksjoner svarende til 40000-50000 Mr produkter ble samlet, oppdelt i prøvemengder og lagret i frossen tilstand ved -20° C. Alle oppløsninger som ble benyttet ved kromatografitrinnene ble fremstilt med sterilt og endotoksinfritt vann (Salf, Bergamo, Italy). De endelige utbytter var 45 mg TNF og 34,5 mg NGR-TNF.

Molekylvekten til rensset TNF og NGR-TNF ble målt ved elektro-spray-massespektrometri. Proteininnholdet ble målt ved anvendelse av et kommersielt proteinanalysekit (Pierce, Rockford, IL). Endotoksininnhold av NGR-TNF og TNF var henholdsvis 0,75
5 enheter/ μ g og 1,38 enheter/ μ g, som målt ved den kvantitative kromogene Lymulus Amoebocyte Lysate (LAL) testen (BioWhittaker).

Natriumdodecylsulfat-polyakrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE)
10 og western blot analyser ble gjennomført ved anvendelse av 12,5 eller 15% polyakrylamidgeler, ved standard prosedyre.

En liten mengde av TNF og NGR-TNF ble videre rensset ved affinitetskromatografi på oppløselig p55-TNF reseptor (sTNF-R1)-
15 Sepharose som følger: 5 mg rekombinant sTNF-R1 ble fremstilt som beskrevet (22) og koblet til 2 ml Activated-CH-Sepharose (Pharmacia) i henhold til produsentens instruksjoner. To separate kolonner (en ml hver) ble vasket omfattende med sterile og endotoksinfrie oppløsninger, lastet med rensset TNF
20 eller NGR-TNF i PBS og desorbent ved gradienteluering (1 time, buffer A:PBS, buffer B:0,5 M natriumklorid, 0,2 M glysin-HCl). De TNF-antigeninnholdende fraksjoner ble nøytralisert og dialysert mot steril fysiologisk oppløsning. Endotoksinfritt humant serumalbumin ble tilsatt før dialyse (0,5 mg/ml) for å
25 forhindre proteinadsorpsjon på membraner. TNF innholdet i hver fraksjon ble målt ved ELISA og cytolytisk analyse.

Ikke-reduserende SDS-PAGE av TNF viste et enkelt bånd på 17-18 kDa, som forventet for monomerisk TNF (ikke vist). Stikk i
30 strid med dette viste ikke-reduserende SDS-PAGE og western blot analyse av NGR-TNF forskjellige immunoreaktive former på 18, 36 og 50 kDa som sannsynlig svarer til to monomerer, dimerer og trimerer. Under reducerende betingelser ble de fleste av 50 og 36 kDa båndene omdannet til 18 kDa formen, som
35 viser tilstedeværelsen av NGR-TNF molekyler med disulfidbindinger mellom kjedene. 18 kDa båndet utgjør omtrent 2/3 av det totale material, mens 36 kDa utgjorde det meste av den gjenværende del. Disse elektroforesemønstre foreslår at NGR-TNF var en blanding av trimerer som utgjøres

av tre monomer-subenheter med korrekte intrakjede-disulfider (minst 50%) og hvor den gjenværende del for det meste utgjøres av trimerer med ett eller flere interkjede-disulfider. 36 kDa båndet som fremdeles observeres ved reduserende SDS-PAGE
 5 forslår at NGR-TNF også inneholdt en irreversibel denaturert dimer (omtrent 10% av totalt).

Molekylmassen av TNF og NGR-TNF monomerene var $17386,1 \pm 2,0$ Da og $17843,7 \pm 2,5$ Da, som bestemt ved elektropray-masse-
 10 spektrometri. Disse verdier svarer svært godt til massen forventet for Met-TNF₁₋₁₅₆ (17386,7 Da) og for CNGRCG-TNF₁₋₁₅₆ (17844,2 Da).

EKSEMPEL II

15

In vitro cytotoxisk aktivitet av murin TNF og NGR-TNF

Bioaktiviteten av TNF og NGR-TNF ble estimert ved standard cytolytisk analyse basert på L-M musefibroblaster (ATCC
 20 CCL1.2) som beskrevet (23). Den cytolytiske aktiviteten av TNF og NGR-TNF på RMA-T celler ble testet i nærvær av 30 ng/ml aktinomyacin D. Hver prøve ble analysert in duplo, ved tre forskjellige fortyngninger. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm SD av to-tre uavhengige analyser.

25

Den in vitro cytotoxiske aktivitet av TNF og NGR-TNF var henholdsvis $(1,2 \pm 0,14) \times 10^8$ enheter/mg og $(1,8 \pm 0,7) \times 10^8$ enheter/mg ved standard cytolytisk analyse med L-M celler. Disse resultater indikerer at CNGRCG enhetene i NGR-TNF mole-
 30 kylet ikke forhindrer folding, oligomerisering og binding til TNF reseptorer.

I et tidligere studium er det blitt vist at RMA-T celler kan drepes ved TNF i nærvær av 30 ng/ml aktinomyacin D, mens, i
 35 fravær av transkripsjonsinhibitorer, er disse celler resistente overfor TNF, selv etter flere dagers inkubasjon. Den in vitro cytotoxiske aktivitet av NGR-TNF på RMA-T celler i nærvær av aktinomyacin D var $(1,4 \pm 0,8) \times 10^8$ enheter/mg som målt ved anvendelse av TNF $((1,2 \pm 0,14) \times 10^8$ enheter/mg) som

en standard. Således var de cytotoksiske aktiviteter av NGR-TNF og TNF tilsvarende på både L-M og og RMA-T celler.

EKSEMPEL III

5

Karakterisering av den terapeutiske og toksiske aktivitet av murin TNF og NGR-TNF

Rauscher virus-indusert RMA lymfom av C57BL/6 opprinnelse, ble
10 opprettholdt in vitro i RPMI 1640, 5% føtalt bovint serum
(FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0,25 µg/ml
amfotericin B, 2 mM glutamin og 50 µM 2-merkaptoetanol. RMA-T
ble avledet fra RMA cellelinjen ved transfeksjon med et
konstrukt som koder for Thy 1.1 allelet og dyrket som
15 beskrevet (14).

B16F1 melanomceller ble dyrket i RPMI 1640, 5% FBS, 100 U/ml
penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0,25 µg/ml amfotericin B,
2 mM glutamin, 1% MEM ikke-essensiell aminosyre (BioWhittaker,
20 Europe, Verviers, Belgium).

In vivo studier på dyremodeller ble godkjent av "the Ethical
Committee of the San Raffaele H Scientific Institute" og
gjennomført i henhold til de anførte retningslinjer. C57BL/6
25 (Charles River Laboratories, Calco, Italy) (16-18 g) ble
eksponert for henholdsvis 5×10^4 RMA-T eller B16F1 levende
celler subkutant i venstre side. Ti-tolv dager etter
tumorimplantasjon ble mus behandlet i.p. med 250 µl TNF eller
NGR-TNF oppløsninger, fortynnet med endotoksinfritt 0,9%
30 natriumklorid.

Preliminære forsøk viste at anti-tumoraktiviteten ikke var
endret ved tilsetning av humant serumalbumin til TNF og NGR-
TNF oppløsninger, som en bærer. Hvert forsøk ble gjennomført
35 med 5 mus per gruppe. Tumorveksten ble målt daglig ved å måle
tumorstørrelsen med krumpassere. Tumorområdet ble estimert
ved å beregne $r_1 \times r_2$, mens tumorvolumet ble estimert ved å
beregne $r_1 \times r_2 \times r_3 \times 4/3$, hvor r_1 og r_2 er de longitudinelle
og laterale radier, og r_3 er tykkelsen på tumorer som stikker

frem fra overflaten til normal hud. Dyrene ble avlivet før tumoren nådde 1,0-1,3 cm i diameter. Tumorstørrelser er vist som gjennomsnitt \pm SE (5-10 dyr per gruppe som indikert i figurtekstene) og sammenlignet med t-test.

5

Anti-tumoraktiviteten og toksisiteten til NGR-TNF ble sammenlignet med dem til TNF ved anvendelse av RMA-T lymfom og B16F1 melanom-modeller i C57BL6 mus. Da RMA-T modellen tidligere er blitt karakterisert og anvendt for å studere anti-
10 tumoraktiviteten av TNF med forskjellige targeteringsprotokoller (26) har man besluttet å anvende denne modell også i dette studium.

Murin TNF administrert til dyr som bærer etablerte s.c. RMA-T
15 tumorer fører 24 timer senere til en reduksjon i tumormassen og hemoragisk nekrose i tumorens sentrale del, etterfulgt av en signifikant vekstutsettelse i noen få dager (26). En enkelt behandling med TNF induserer ikke fullstendig regresjon av denne tumor, selv ved doser nær LD50, da levende celler som
20 forble rundt det nekrotiske området begynte å vokse igjen noen få dager etter behandling.

I en første gruppe av eksperimenter har vi undersøkt effekten av forskjellige doser (i.p.) av TNF eller NGR-TNF på dyreoverlevelse. For å unngå for stor lidelse, ble dyrene avlivet når
25 tumordiameteren var større enn 1-1,3 cm. Letaliteten av TNF og NGR-TNF, 3 dager etter behandling, var tilsvarende (LD50, henholdsvis 60 μ g og 45 μ g) mens deres anti-tumoraktivitet var markert forskjellig (tabell 1).

16

Tabell 1. Overlevelse av mus med RMA-T lymfomer behandlet med murin TNF eller NGR-TNF

Behandling	Dyr (n)	Dose (µg)	Overlevelse (%) ^{a)} etter behandling											
			Dag 3	Dag 7	Dag 14	Dag 21	Dag 30	Dag 38 (2.eksp.) ^{b)}	Dag 62 (3.eksp.) ^{b)}	Dag 92				
5	Ingen	0	100	0										
10	TNF	1	100	20	0									
		3	100	55	0									
		9	100	55	22	11	0							
		14	100	57	14	7	0							
		9	54	55	0									
15	NGR-TNF	108	0											
		10	1	100	70	10	10	10	0					
		10	3	100	80	20	20	20	0					
		9	9	100	88	55	22	11	11	11				
		13	27	100	85	30	23	15	15	15	11			
20		9	54	33	0									
		9	108	0										

a) Dyr med tumor ble behandlet med TNF eller NGR-TNF (i.p.) 10 dager etter tumorimplantasjon. Dyrene ble avlivet når tumordiameteren overskred 1–1,3 cm.

25 b) Overlevende dyr ble eksponert igjen for 50000 RMA-T celler (2. eksponering) eller 50000 RMA (3.) ved det indikerte tidspunkt. Den svulstskapende evnen til injiserte celler ble målt på hvert tidspunkt med de 5 normale dyrene. Alle kontrolldyrene utviklet en tumor innen 10 dager (data ikke vist).

1 eller 3 µg NGR-TNF utsatte f.eks. tumorvekst mere effektivt enn 27 µg TNF, som indikerer at NGR-TNF var minst en størrelsesorden mere aktiv. Interessant, ble noen dyr helbredet med doser av NGR-TNF som var lavere enn LD50, mens ingen dyr
5 overhodet ble helbredet med TNF. Helbredede dyr avstøtte ytterligere eksponeringer for tumorfremkallende doser av enten RMA-T eller vill-type RMA celler, noe som foreslår at en enkelt behandling med NGR-TNF var i stand til å inducere beskyttende immunitet. Det skal bemerkes at økning av dosen
10 av TNF eller NGR-TNF til over 9-27 µg markert økte toksisiteten og dårlig eller overhodet ikke den terapeutiske aktivitet.

Vekttapet etter TNF behandling er et velkjent tegn på systemisk toksisitet (26). Således, for videre å sammenligne
15 effektivitets/toksisitetsforholdet mellom TNF og NGR-TNF målte vi tumorveksten og dyrevekten etter behandling. Effekten av 1 µg NGR-TNF på tumorveksten var tilsvarende eller høyere enn effekten av 9 µg TNF (fig. 1a), mens vekttapet en-to dager etter behandling var sammenlignbart med det for 1 µg TNF (fig.
20 1c). Når vi interpolerte dataene med en logaritmisk kurve i et dose-respons plot fant vi at den terapeutiske effekt av 9 µg TNF på dag 14 kan oppnås med så lite som 0,6 µg NGR-TNF (fig. 1b). I motsetning var 8,5 µg nødvendig for å inducere en sammenlignbar toksisk effekt (fig. 1d). Således er det
25 beregnede effektivitets/toksisitetsforhold for NGR-TNF under disse betingelser 14 ganger større enn det for TNF.

Tilsvarende resultater ble oppnådd med B16F1 melanom-modellen. Behandling med 1 µg NGR-TNF på dag 11 og dag 17 induserte en
30 anti-tumorrespons på dag 19 som er større enn den oppnådd med 4 µg TNF og tilsvarende den oppnådd med 12 µg TNF (data ikke vist). I motsetning til dette, var vekttapet bevirket ved 1 µg NGR-TNF markert lavere enn det bevirket ved 4 og 12 µg TNF. Behandling med 12 µg NGR-TNF førte til en enda sterkere anti-
35 tumoreffekt, mens den toksiske effekt var tilsvarende den for 12 µg TNF.

Når en tredje injeksjon ble gjennomført på dag 19 forekom enkelte dyredødsfall 1-2 dager senere i alle grupper (2 ut av

5 i gruppen behandlet med saltvann og 12 µg NGR-TNF og 1 ut av 5 i de gjenværende grupper). Det skal bemerkes at ett dyr behandlet med 12 µg NGR-TNF fullstendig avstøtte tumoren. Når dette dyret ble eksponert for en andre tumorfremkallende dose av B16F1 celler, ble en palpabel tumor utviklet etter 18 dager, mens kontrolldyrene utviklet en tumor innen 6-7 dager.

Disse resultater foreslår samlet at effektiviteten av NGR-TNF med hensyn til å inhibere tumorveksten er 10-15 ganger større enn effektiviteten av TNF mens toksisiteten er lik. Dessuten kan NGR-TNF indusere beskyttende immunresponser mere effektivt enn TNF.

EKSEMPEL IV

15

Virkningsmekanisme for NGR-TNF

Anti-mus CD13 mAb R3-63 ble rensset fra ascitiske fluider ved protein-G Sepharose kromatografi (Pharmacia-Upjohn, Uppsala, Sweden) og ble dialysert mot 0,9% natriumklorid.

Polyklonalt antiserum fra kanin ble oppnådd fra Primm srl (Milan, Italy) og rensset ved affinitetsktomatografi på protein-A-Sepharose (Pharmacia-Upjohn). CNGRC og CARAC peptider ble fremstilt som beskrevet tidligere (28).

For å tilveiebringe bevis for at den forbedrede aktiviteten til NGR-TNF er avhengig av tumor-målretting via NGR enheten har vi undersøkt om CNGRC kan delvis konkurrere med NGR-TNF in vivo aktiviteten. I denne hensikt har vi administrert NGR-TNF (1 µg) til RMA-T tumorbærende mus med eller uten et molart overskudd av CNGRC. Parallelt ble andre dyr behandlet med TNF (3 eller 9 µg), igjen med eller uten CNGRC. Som forventet, nedsatte CNGRC signifikant anti-tumoraktiviteten til NGR-TNF (fig. 2a) men ikke den til TNF (fig. 2b). Til forskjell, var et kontrollpeptid (CARAC) ikke i stand til å bevirke signifikant nedgang av NGR-TNF aktivitet (fig. 2c). Disse resultater foreslår at CNGRC konkurrerer om bindingen av NGR-TNF til en CNGRC reseptor, og understøtter hypotesen om en

målrettingsmekanisme for den forbedrede aktivitet. Det er verdt å legge merke til at CNGRC var ikke i stand til å nedsette den in vitro cytotoxiske aktivitet av NGR-TNF (data ikke vist).

5

Da det nylig er blitt rapportert at aminopeptidase N (CD13) er en reseptor for CNGRC peptider, undersøkte vi deretter bidraget hos denne reseptor i målrettingsmekanismen til NGR-TNF. I denne forbindelse har vi undersøkt effekten av et
10 anti-CD13 mAb(R3-63) på anti-tumoraktiviteten av NGR-TNF og TNF. MAb R3-63 inhiberte signifikant anti-tumoraktiviteten til NGR-TNF (fig. 2a) men ikke den til TNF (fig. 2b) som indikerer at CD13 ganske visst er kritisk involvert i anti-tumoraktiviteten til NGR-TNF. Ingen ekspresjon av CD13 på
15 RMA-T celleoverflate ble observert ved FACS analyse av dyrkede celler med mAb R3-63 (ikke vist), som foreslår at andre celler ble gjenkjent av antistoffet in vivo.

Skjønt disse data indikerer at CD13 er en viktig reseptor for
20 NGR-TNF, kan vi ikke helt utelukke at binding til andre og enda ikke identifiserte NGR reseptorer også bidrar, skjønt i lavere grad, til målrettingsmekanismen.

Preliminære forsøk av partiell proteolyse viste at Arg-Ser
25 bindingen i det N-terminale segment av TNF (rester 2-3) er svært følsom for trypsin, mens resten av molekylet er mye mere resistent. Således, for å tilveiebringe ytterligere bevis at den forbedrede aktiviteten til NGR-TNF er relatert til dens NGR enhet, har man forsøkt å kutte ut NGR domenet fra den N-terminale region til muteinet ved partiell kutting med
30 immobilisert trypsin. Denne behandling omdannet både NGR-TNF og TNF til et molekyl svarende til TNF₃₋₁₅₆ fragmentet (forventet masse 16986,2 Da, se fig. 3a for målt masse og forventede sekvenser).

35

Mens kutting ikke nedsatte in vitro cytolytisk aktivitet for NGR-TNF på L-M celler ($(2,3 \pm 1,4) \times 10^8$ U/mg) ble dens in vivo anti-tumoraktivitet nedsatt til TNF nivået (fig. 3b). Det er verdt å legge merke til at toksiteten av NGR-TNF og TNF

var tilsvarende både før og etter kutting, som bedømt fra dyrets vekt tap en dag etter behandling (fig. 3b, høyre spalte), som foreslår at den NGR-avhengige målrettingsmekanismen ikke endrer toksisiteten.

5

EKSEMPEL V

Fremstilling og karakterisering av human TNF og NGR-TNF

10 Human rekombinant TNF og NGR-TNF (bestående av human TNF₁₋₁₅₇ fusjonert med C terminusen til CNGRCG) ble fremstilt ved rekombinant DNA teknologi og i alt vesentlig renset som beskrevet for murin TNF og NGR-TNF. cDNA som koder for human NGR-TNF ble fremstilt ved PCR på plasmid pET11b/hTNF inne-
15 holdende hTNF kodesekvensen (33), ved anvendelse av de etterfølgende primere:

- NGR-hTNF/1 (sense): 5' A TAT CAT ATG TGC AAC GGC CGT TGC GGC GTC AGA TCA TCdT TCT CG 3'.

20 - NGR-hTNF/2 (antisense): 5' TCA GGA TCC TCA CAG GGC AAT GAT CCC AAA GTA GAC 3'.

Det amplifiserte fragment ble kuttet og klonet i pET-11b (Nde I/BamHI) og anvendt til å transformere BL21(DE3) E.coli celler
25 (Novagen). Ekspresjonen av NGR-hTNF ble induert med isopropyl- β -D-tiogalaktosid, i henhold til pET11b produsentens instruksjoner. Oppløselig NGR-TNF ble utvunnet fra to-liters kulturer ved bakteriell sonisering i 2 mM etylendiamintetraeddiksyre, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, etterfulgt av sentrifugering
30 (15000 x g, 20 min, 4°C).

Ekstrakten ble blandet med ammoniumsulfat (35% metning), fikk stå i 1 time ved 4°C og ble ytterligere sentrifugert som over. Ammoniumsulfatet i supernatantene ble deretter bragt til 65%
35 metning, de fikk stå ved 4°C i 24 timer og ble ytterligere sentrifugert. Hver pellet ble oppløst i 1 M ammoniumsulfat, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, og renset ved hydrofob interaksjonskromatografi på Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (Pharmacia-Upjohn) (gradienteluering, buffer A: 100 mM natri-

umfosfat, pH 8,0, inneholdende 1 M ammoniumsulfat, buffer B: 70% etylenglykol, 5% metanol, 100 mM natriumfosfat, pH 8,0). Fraksjoner som inneholdt hTNF immunreaktivt material (ved ELISA) ble samlet, dialysert mot 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 og
5 videre renset ved ionebytterkromatografi på DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia-Upjohn) (gradienteluering, buffer A: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, buffer B: 1 M natriumklorid, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0). Alle oppløsninger benyttet i kromatografi-
trinnene ble fremstilt med sterilt og endotoksinfritt vann
10 (Salf, Bergamo, Italy).

Ved dette punkt ble omtrent 30 mg TNF og 32 mg NGR-TNF utvunnet fra to-liters kulturer. Ikke-redukerende SDS-PAGE viste bånd tilsvarende monomerer, dimerer og trimerer som
15 foreslår at også human NGR-TNF var en blanding av trimerer med korrekte intrakjede-disulfider og trimerer med en eller flere interkjede-disulfidbindinger (fig. 4a, felt b), som observert med murin NGR-TNF.

20 Trimerer med korrekte intrakjede-disulfidbindinger ble isolert fra denne blandingen ved hjelp av en fire-trinns denaturerings-gjenfoldingsprosess som følger: Renset human NGR-TNF ble denaturert med 7 M urea og gelfiltrert gjennom en HR Sephacryl S-300 kolonne (1025 ml) (Pharmacia) pre-ekvilibrert
25 med 7 M urea, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0. Fraksjoner svarende til monomerisk TNF ble samlet, ultrafiltrert gjennom en YM MWCO 10 kDa membran (Amicon) og gjenfoldet ved dialyse mot 33 volumdeler 2,33 M urea, 100 mM Tris-HCl, pH 8 ved 4°C (140 min) etterfulgt av 1,55 M urea, 100 mM Tris-HCl, pH 8 (140
30 min) og 1 M urea, 100 mM Tris-HCl, pH 8 (140 min). Til slutt ble produktet dialysert mot 80 volumdeler 100 mM Tris-HCl (16 timer), sentrifugert ved 13000 x g (30 min), filtrert gjennom en SFCA 0,45 µm membran (Nalgene) og gelfiltrert gjennom en HR Sephacryl S-300 kolonne (1020 ml) pre-ekvilibrert med 0,15 M
35 natriumklorid, 0,05 M natriumfosfat (PBS). Omtrent 23 mg gjenfoldet protein ble utvunnet.

Sluttproduktet var hovedsakelig monomerisk etter ikke-redukerende SDS-PAGE (fig. 4a, felt c), hadde et hydrodynamisk

volum tilsvarende det til trimer human TNF ved analytisk gelfiltrerings HPLC på en Superdex 75 HR kolonne (ikke vist), og hadde en molekylmasse på 17937,8 + 1,8 Da (forventet for CNGRCG-TNF₁₋₁₅₇, 17939,4 Da) ved elektropray-massespektrometri.

5 De in vitro cytolytiske aktiviteter til ikke-gjenfoldet og gjenfoldet NGR-TNF på mus L-M celler var henholdsvis (6,11 x 107) + 4,9 og (5,09 x 107) + 0,3 enheter/mg, mens den til rensset human TNF var (5,45 x 107) + 3,1 enheter/mg. Disse resultater foreslår at denaturerings-gjenfoldingsprosessen

10 ikke påvirker interaksjon av human NGR-TNF med den murine p55 reseptoren.

In vivo anti-tumoraktiviteten av 1 µg human NGR-TNF (ikke-gjenfoldet) var større enn den til 10 µg TNF (fig. 4B) mens

15 toksisiteten, som bedømt ved dyrets vekttap, var signifikant lavere (fig. 4C). Etter gjenfolding var 0,3 µg NGR-TNF tilstrekkelig til å indusere en anti-tumoreffekt som var sterkere enn den oppnådd med 10 µg TNF (fig. 4D, 4E).

20 Disse resultater indikerer at anti-tumoraktiviteten for human NGR-TNF er større enn den for human TNF.

Videre har vi observert at gjenfoldet human og mus NGR-TNF kan indusere signifikante anti-tumoreffekter på RMA-T-bærende mus

25 selv ved svært lave doser (1-10 ng/mus) uten noe tegn på toksiske effekter, mens TNF ikke var i stand til å indusere signifikante effekter ved disse doser (ikke vist).

EKSEMPEL VI

30

Fremstilling og karakterisering av mus NGR-IFN γ

Rekombinant murin interferon (IFN) γ fusjonert med CNGRCG (NGR-IFN γ) ble fremstilt ved rekombinant DNA teknologi, i alt

35 vesentlig som beskrevet for NGR-TNF. CNGRC domenet ble fusjonert med C terminusen av IFN γ . Dessuten ble cysteinet i stilling 134 erstattet med et serin, et methionin ble introdusert i stilling-1 for ekspresjon i E. coli celler. PCR primerne anvendt for fremstillingen av NGR-IFN γ 1-134 cDNA var:

5'-A TAT CTA CAT ATG CAC GGC ACA GTC ATT GAA AGC C (sense) og
 5'-TC GGA TCC TCA GCA ACG GCC GTT GCA GCC GGA GCG ACT CCT TTT
 CCG CTT CCT GAG GC. cDNA ble klonet i pET-11b (Nde I/BamH I)
 og anvendt til å transformere BL21(DE3) E.coli celler
 5 (Novagen). Proteinekspressjon ble induisert med isopropyl- β -D-
 tiogalaktosid, i henhold til pEt11b produsentens instruks-
 sjoner. Produktet ble rensset fra E.coli ekstrakter ved
 immunaffinitetskromatografi ved anvendelse av et anti-mus IFN γ
 mAb (AN18) immobilisert på agarose i henhold til standard
 10 teknikker. Reduserende og ikke-reduserende SDS-PAGE på slutt-
 produktet viste et enkelt bånd på 16 kDa. Elektrospray-
 massespektrometri viste en molekylvekt på 16223 + 3,6 Da
 (forventet, 1625,5 Da) svarende til murin Met-IFN γ ₁₋₁₃₄
 (C134S)CNGRC (NGR-IFN γ).

15

Den evnen som NGR-IFN γ og NGR-TNF har til å konkurrere med
 binding av et anti-CD13 antistoff til tumorassosierte kar ble
 undersøkt ved anvendelse av en immunhistokjemisk tilnærming.

20 Nye operativt fjernede prøver av human renal cellekarsinom ble
 oppnådd fra Histopathology Department of the San Raffaele H
 Scientific Institute. Snitt (5-6 μ m tykke) av Bouin-fikserte
 (4-6 timer) paraffin-innleirede prøver ble fremstilt og
 adsorbent på polylysin-belagte preparatglass. CD13 antigen
 25 ble detektert ved anvendelse av avidin-biotinkompleksmetoden
 som følger: vevssnitt ble rehydratisert ved anvendelse av
 xylener og graderte alkoholserier, i henhold til standard
 prosedyrer. Vevssnitt ble anbragt i en beholder inneholdende
 1 mM EDTA og kokt i 7 minutter ved anvendelse av en mikro-
 30 bølgeovn (1000 W). Karet ble deretter fylt på nytt med 1 mM
 EDTA og kokt igjen i 5 minutter. Vevssnittene fikk stå for
 avkjøling og ble inkubert i PBS inneholdende 0,3% hydrogen-
 peroksyd i 15 minutter for å hemme endogen peroksidase.
 Prøvene ble deretter vasket med PBS og inkubert med 10-200 μ l
 35 PBS-BSA (1 time ved romtemperatur) etterfulgt av mAb WM15
 (anti-hCD13), alene eller blandet med forskjellige konkurre-
 rende midler (se tabell 2) i PBS-BSA (over natten ved 4°C).
 Preparatglassene ble deretter vasket 3 ganger (3 minutter
 hver) med PBS og inkubert med PBS-BSA inneholdende 2% normalt

hesteserum (PBS-BSA-NHS) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) i 5 minutter. Oppløsningen ble deretter erstattet med 3 µg/ml biotinyleret heste anti-mus IgG (H+L) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) i PBS-BSA-NHS og videre inkubert i 1 time ved 5 romtemperatur. Preparatglassene ble vasket igjen og inkubert i 5 minutter med Vectastain Elite Reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA) fortynnet 1:100 i PBS. En tablett av 3,3'-diaminobenzidintetrahydroklorid (Merck, Darmstadt, Germany) ble deretter oppløst i 10 ml deionisert vann inneholdende 10 0,03% hydrogenperoksyd, filtrert gjennom en 0,2 µm membran og lagt over vevssnittene i 5-10 minutter. Preparatglassene ble vasket som over og farget igjen ("counterstained") med Harris' hematoksylin. De tumorassosierte kar ble identifisert ved "farging" av seriesnitt av vevet med et anti-CD31 mAb (mAb 15 JC/70A, anti-humant CD31, IgG1, fra DAKO, Copenhagen, Denmark).

Resultatene er oppsummert i tabell 2. Som vist ble bindingen av WM15 til tumorassosierte kar inhibert med et overskudd av 20 NGR-TNF, NGR-IFN γ og CNGRC, men ikke med andre kontrollreagenser som mangler NGR motivet. Dette foreslår at NGR bindingssetet på CD13 sterisk overlapper med WM15 epitopen. I motsetning til dette var NGR-TNF ikke i stand til å konkurrere med bindingen av 13C03 til epitelceller.

25

Vi har således konkludert med at NGR enheten av NGR-IFN γ og NGR-TNF kan interagere med en CD13 form gjenkjent ved mAb WM15 på tumorassosierte kar. Dessuten indikerer disse resultater at CNGRC motivet er funksjonelt enten når koblet til N- 30 terminusen eller til C-terminusen av et cytokin.

Tabell 2. Binding av WM15 til nyrecellecancer-snitt i nærvær av forskjellige konkurrenter

	Konkurrent	Binding av WM15 til tumorassosierte kar
5	Ingen	+
	NGR-TNF (25 µg/ml)	-
	NGR-IFN γ (50 µg/ml)	-
	CNGRC (100 µg/ml)	-
	TNF (25 µg/ml)	+
10	Humant serumalbumin (25 µg/ml)	+
	Syntetisk CgA(60-68) (100 µg/ml)	+

^a Konkurrenten, i PBS inneholdende 2% BSA, ble tilsatt i blokkeringsstrinnet og blandet med det primære antistoff.

^b mAb WM15 (anti-humant CD13, IgG1) var fra Pharmingen (San Diego, CA),
 15 det syntetiske peptidet CgA(60-68) svarer til kromogranin A fragmentet 60-68.

EKSEMPEL VII

20

Målrettet avlevering av biotinylert NGR-TNF til tumorer ved anvendelse av anti-tumor antistoffer og avidin (pre-målretting)

25 Det etterfølgende eksempel illustrerer muligheten for "dobbel" målretting av TNF, basert på kombinasjonen av et tumor-dirigeringsantistoff og peptidet CNGRC.

30 Et biotin-NGR-TNF konjugat ble fremstilt ved å blande NGR-TNF med D-biotinyl-6-aminokapronsyre-N-hydroksysuccinimidester (Società Prodotti Antibiotici S.p.A, Milan, Italy), i 1 M natriumkarbonatbuffer, pH 6,8 (3 timer ved romtemperatur) (21). Reaksjonen ble blokkert med 1 M Tris-HCl, pH 7,5.

35 Konjugatet ble karakterisert ved massespektrometri og funnet til å inneholde 1 biotin/trimer (i gjennomsnitt). C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Italy) ble deretter ekspos-

nert for 5×10^4 RMA-T levende celler subkutant i venstre side. Når tumorområdet nådde 40 mm^2 , ble musene behandlet ved påfølgende injeksjoner av biotinylert antistoff, avidiner og biotin-TNF i henhold til en "tre-dagers" protokoll som

5 tidligere beskrevet (26). Vi injiserte: $40 \mu\text{g}$ biotin-mAb 19E12 (i.p., trinn I), $60 \mu\text{g}$ avidin og $60 \mu\text{g}$ streptavidin etter henholdsvis 18 og 19 timer (i.p., trinn II), $3 \mu\text{g}$ biotin-NGR-TNF, 24 timer senere (i.p., trinn III). Hver forbindelse ble

10 fortennet med en steril 0,9% natriumkloridoppløsning. I kontrollforsøket, ble avidin og streptavidin utelatt. Hvert forsøk ble gjennomført med 5 mus/gruppe. Tumorveksten ble målt daglig ved å måle tumorstørrelsen med krumpassere. Tumorområdene før og 10 dager etter behandling var henholdsvis

15 $39 \pm 4 \text{ mm}^2$ og $8 \pm 5 \text{ mm}^2$, i gruppen behandlet med mAb 19E12-biotin/avidin/streptavidin/biotin-NGR-TNF (5 dyr/gjennomsnitt \pm SE). I kontrollgruppen (behandlet med mAb 19E12-biotin/-biotin-NGR-TNF alene) var tumorområdene før og 10 dager etter behandling henholdsvis $40 \pm 4 \text{ mm}^2$ og $20 \pm 6 \text{ mm}^2$, som indikerer at pre-målretting med tumor-dirigeringsantistoff og avidin har

20 økt aktiviteten av NGR-TNF.

REFERANSER

1. Carswell, E. A., et al., An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975. 72:3666-70.
2. Helson, L., et al., Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature* 1975. 258:731-732.
3. Tracey, K. J., and A. Cerami. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1993. 9:317-43.
4. Hoogenboom, H. R., et al., Construction and expression of antibody-tumor necrosis factor fusion proteins. *Mol. Immunol.* 1991. 28:1027-37.
5. Loetscher, H., et al., Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75kDa TNF receptors. *J. Biol. Chem.* 1993. 268:26350-7.
6. Yang, J., et al., A genetically engineered single-chain FV/TNF molecule possesses the anti-tumor immunoreactivity of FV as well as the cytotoxic activity of tumor necrosis factor. *Mol. Immunol.* 1995. 32:873-81.
7. Van Ostade, X., et al., Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor. *Nature* 1993. 361:266-9.
8. Paganelli, G., et al., Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigenpositive patients. *Cancer Res.* 1991. 51:5960-6.
9. Paganelli, G., et al., Clinical application of the avidin-biotin system for tumor targeting. In D. Goldenberg (Ed. *Cancer therapy with radiolabeled antibodies*. CRC Press, Boca Raton, 1995. P. 239-253.
10. Modorati, G., et al., Immunoscintigraphy with three step monoclonal pretargeting technique in diagnosis of uveal melanoma: preliminary results. *Br. J. Ophthalmol.* 1994. 78:19-23.
11. Colombo, P., et al., Immunoscintigraphy with anti-chromogranin A antibodies in patients with endocrine/neuroendocrine tumors. *J. Endocr. Invest.* 1993. 16:841-3.

12. Debs, R. J., et al., Liposome-associated tumor necrosis factor retains bioactivity in the presence of neutralizing anti-tumor necrosis factor antibodies. *J. Immunol.* 1989. 143:1192-7.
13. Debs, R. J., et al., Immunomodulatory and toxic effects of free and liposome-encapsulated tumor necrosis factor alpha in rats. *Cancer Res.* 1990. 50:375-80.
14. Moro, M., et al., Tumor cell targeting with antibody-avidin complexes and biotinylated tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 1997. 57:1922-8.
15. Schraffordt Koops, et al., Hyperthermic isolated limb perfusion with tumour necrosis factor and melphalan as treatment of locally advanced or recurrent soft tissue sarcomas of the extremities. *Radiotherapy & Oncology* 1998. 48:1-4.
16. Lienard, D., et al., In transit metastases of malignant melanoma treated by high dose rTNF alpha in combination with interferon-gamma and melphalan in isolation perfusion. *World Journal of Surgery* 1992. 16:234-40.
17. Hill, S., et al., Low-dose tumour necrosis factor alpha and melphalan in hyperthermic isolated limb perfusion. *Br. J. Surg.* 1993. 80:995-7.
18. Eggermont, A. M., et al., Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. *Ann. Surg.* 1996. 224:756-65.
19. Mizuguchi, H., et al., Tumor necrosis factor alpha-mediated tumor regression by the in vivo transfer of genes into the artery that leads to tumor. *Cancer Res.* 1998. 58:5725-30.
20. Pennica, D., et al., Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1985.

82:6060-4.

21. Corti, A., et al., Tumor targeting with biotinylated tumor necrosis factor alpha: Structure activity relationships and mechanism of action on avidin pretargeted tumor cells. *Cancer Res.* 1998. 58:3866-3872.

22. Corti, A., et al., Up-regulation of p75 Tumor Necrosis Factor alpha receptor in *Mycobacterium avium*-infected mice. *Infect. Immun.* 1999, 67:5762-5767.

23. Corti, A., et al., Tumor necrosis factor (TNF) alpha quantification by ELISA and bioassay: effects of TNF alpha-soluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubations. *J. Immunol. Meth.* 1994. 177:191-198.

24. Ljunggren, H. G., and K. Karre. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 1985. 162:1745-59.

25. Celik, C., et al., Demonstration of immunogenicity with the poorly immunogenic B16 melanoma. *Cancer Res.* 1983. 43:3507-10.

26. Gasparri, A., et al., Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor alpha in mouse models. *Cancer Res.* 1999. 59:2917-23.

27. Palladino, M. A., Jr., et al., Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: induction of tumor-specific immunity. *J. Immunol.* 1987. 138:4023-32.

28. Arap, W., et al., Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998. 279:377-80.

29. Fiers, W. Biologic therapy with TNF: preclinical studies. In V. De Vita, S. Hellman, and S. Rosenberg Eds). *Biologic therapy of cancer: principles and practice.* J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1995. P.

295-327.

30. Rathjen, D. A., et al., 1992. Selective enhancement of the tumour necrotic activity of TNF alpha with monoclonal antibody. *Brit. J. Cancer* 65:852.

31. Robert, B., et al., 1996. Cytokine targeting in tumors using a bispecific antibody directed against carcinoembryonic antigen and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res.* 56:4758.

32. Fraker, D.L., Alexander, H.R. & Pass, H.I., 1995. Biologic therapy with TNF: systemic administration and isolation-perfusion. In *Biologic therapy of cancer: principles and practice*, De Vita, V., Hellman, S. & Rosenberg, S. (eds) pp. 329-345. J.B. Lippincott Company: Philadelphia.

33. Pennica, D., et al., 1984. Human tumor necrosis factor: precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 321, 724-729.

PATENTKRAV

1. Konjugeringsprodukt, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et produkt mellom et cytokin valgt fra TNF eller IFN γ og en ligand av CD13 reseptoren, hvori liganden er et peptid som inneholder NGR motivet.
2. Konjugeringsprodukt som angitt i krav 1, hvori nevnte cytokin er TNF α eller TNF β .
3. Konjugeringsprodukt som angitt i krav 1, hvori nevnte peptid er valgt fra gruppen som omfatter CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, NGRAHA, GNGRG, cykloCVLNGRMEC, lineær eller cyklisk CNGRC.
4. Konjugeringsprodukt som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvori cytokinet er koblet til peptidet gjennom en spacer.
5. Konjugeringsprodukt som angitt i krav 4, hvori cytokinet er TNF og peptidet er lineær eller cyklisk CNGRC og hvori amino-terminalen av TNF er koblet til peptidet gjennom spaceren glycin.
6. Konjugeringsprodukt som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvori cytokinet er derivatisert med polyetylenglykol eller en acylrest.
7. Konjugeringsprodukt som angitt i ett eller flere av de foregående krav, hvori cytokinet videre er konjugert med et antistoff eller et fragment derav, rettet mot et tumor antigen, en tumor-angiogenisk markør eller en komponent av den ekstracellulære matriks.
8. Konjugeringsprodukt som angitt i krav 7, hvor cytokinet er TNF og er konjugert til både en ligand av CD13 reseptoren

og et antistoff eller et fragment derav på forskjellige TNF subenheter, hvori antistoffet eller fragmentet derav er rettet mot et tumor antigen, en tumor-angiogenisk markør eller en komponent av den ekstracellulære matriks, og hvori liganden av CD13 reseptoren er et peptid som inneholder NGR motivet.

9. cDNA,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for et cytokin valgt fra TNF og IFN γ som bærer en 5' eller 3' tilgrensende sekvens som koder for en ligand av CD13 reseptoren, hvori liganden er et peptid som inneholder NGR motivet.

10. cDNA som angitt i krav 9, hvori CD13 liganden er et peptid som angitt i krav 3.

11. cDNA som angitt i krav 9, hvori CD13 liganden er et peptid som angitt i krav 5.

12. Vektor for genterapi,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder cDNA som angitt ett eller flere av kravene 9-11.

13. Farmasøytisk preparat,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder en effektiv mengde av et konjugeringsprodukt som angitt i ett eller flere av kravene 1-8, et cDNA som angitt i ett eller flere av kravene 9-11 eller en vektor som angitt i krav 12, sammen med farmasøytisk aksepterbare bærere og eksipienser.

14. Preparat som angitt i krav 13, som er i form av en injiserbar oppløsning eller suspensjon eller en væske for infusjoner.

15. Preparat som angitt i krav 13 eller 14, som er i form av liposomer.

16. Anvendelse av et konjugeringsprodukt som angitt i ett eller flere av kravene 1-8, et cDNA som angitt i ett eller flere av kravene 9-11 eller en vektor som angitt i krav 12, for fremstilling av medikamenter eller diagnostika for terapi av cancer.

17. Anvendelse som angitt i krav 16 i kombinasjon med andre antitumormidler eller diagnostiske tumor-avbildingsforbindelser.

SEKVENSLISTE

<110> Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor

<120> Modified cytokines for use in cancer therapy

<130> modcyt

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 1

ctggatcctc acagagcaat gactccaaag

30

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 2

tgctcacaat atgctcagat catcttctc

29

<210> 3

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 3

gcagatcata tgtgcaacgg ccgttgcggc ctcagatcat cttctc

46

2

<210> 4
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 4
 atatcatatg tgcaacggcc gttgcggcgt cagatcatct tctcg 45

<210> 5
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 5
 tcaggatcct cacagggcaa tgatcccaaa gtagac 36

<210> 6
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

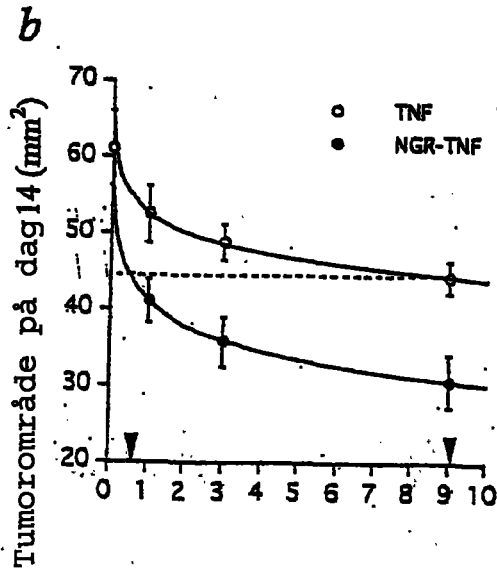
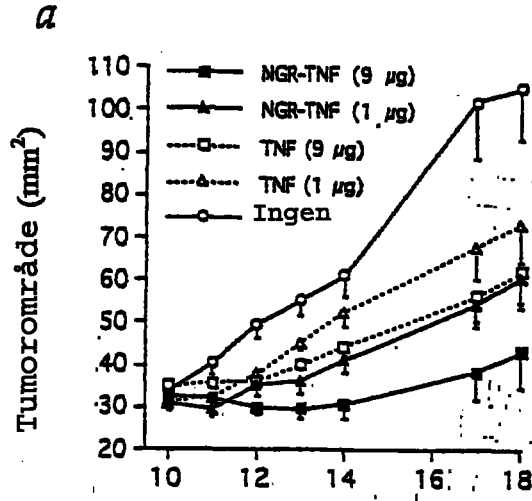
<400> 6
 atatctacat atgcaaggca cagtcattga aagcc 35

<210> 7
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

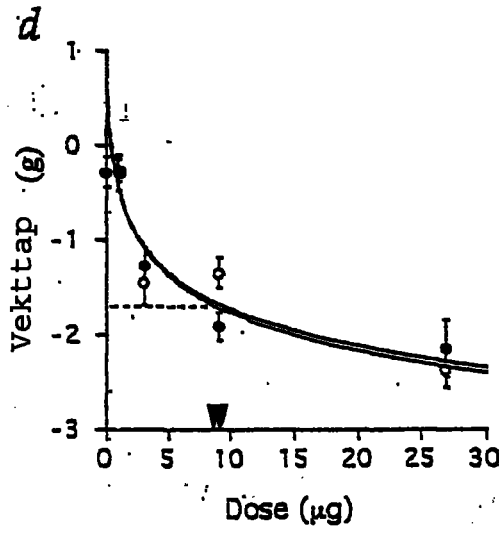
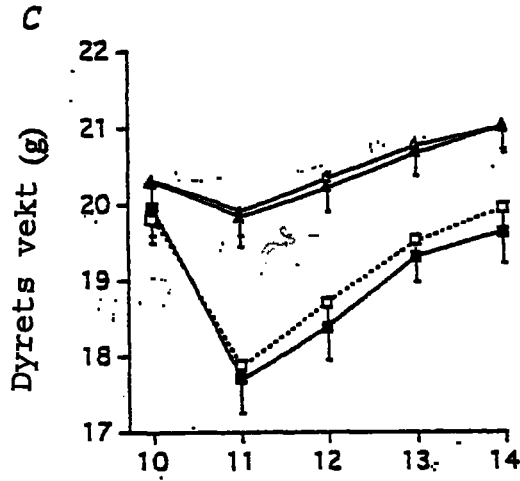
<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 7
 tcggatcctc agcaacggcc gttgcagccg gagcgactcc tttccgctt
 cttgagggc 58

FIGUR 1

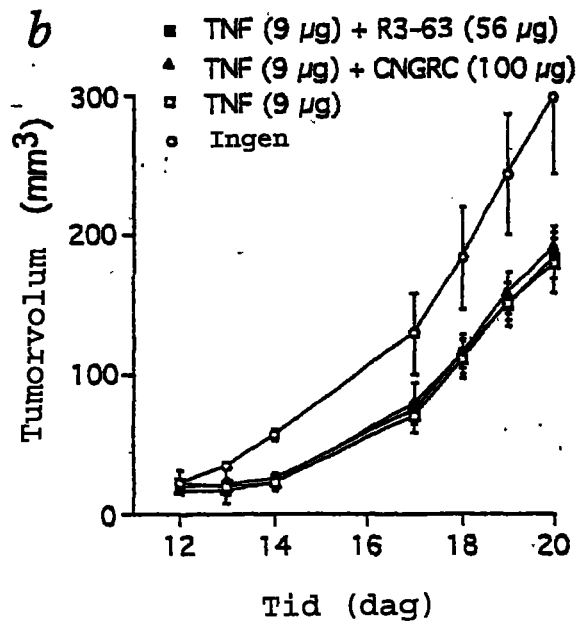
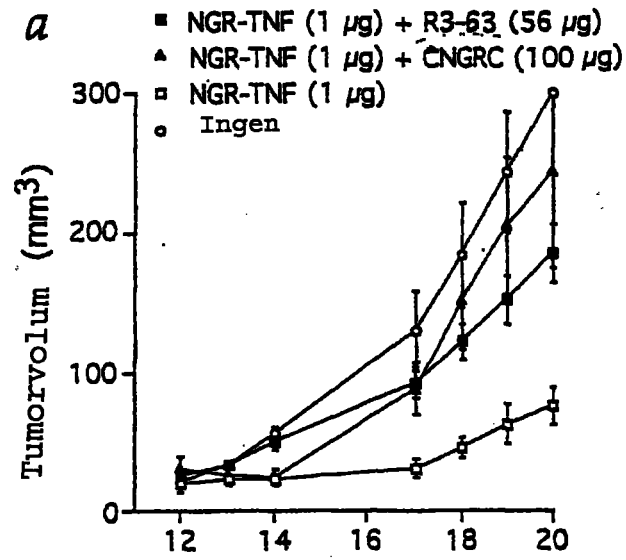


FIGUR 1



3/9

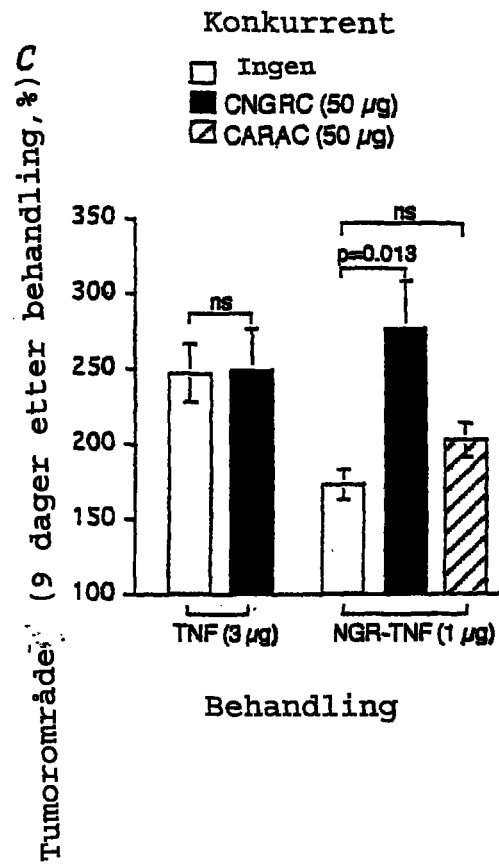
FIGUR 2



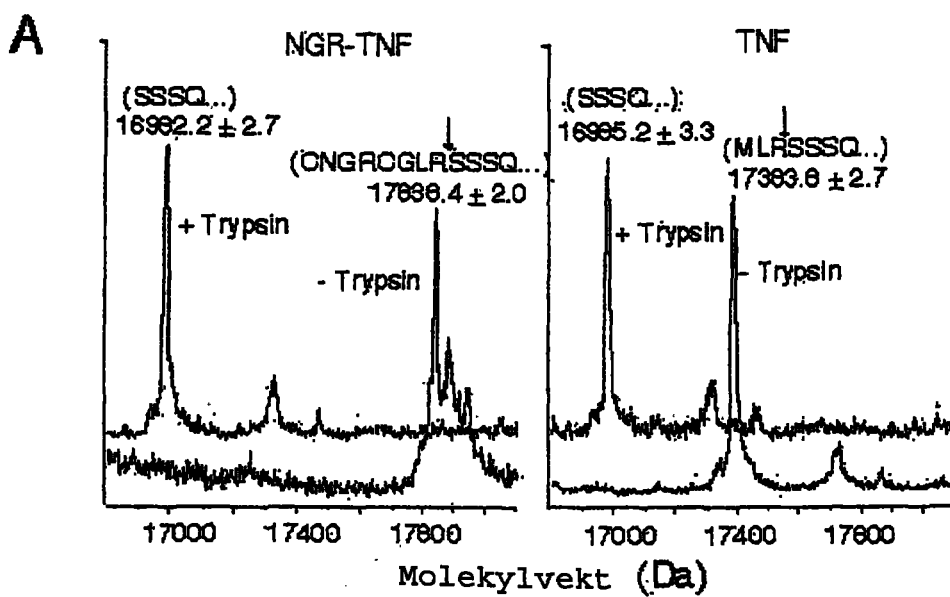
*

4/9

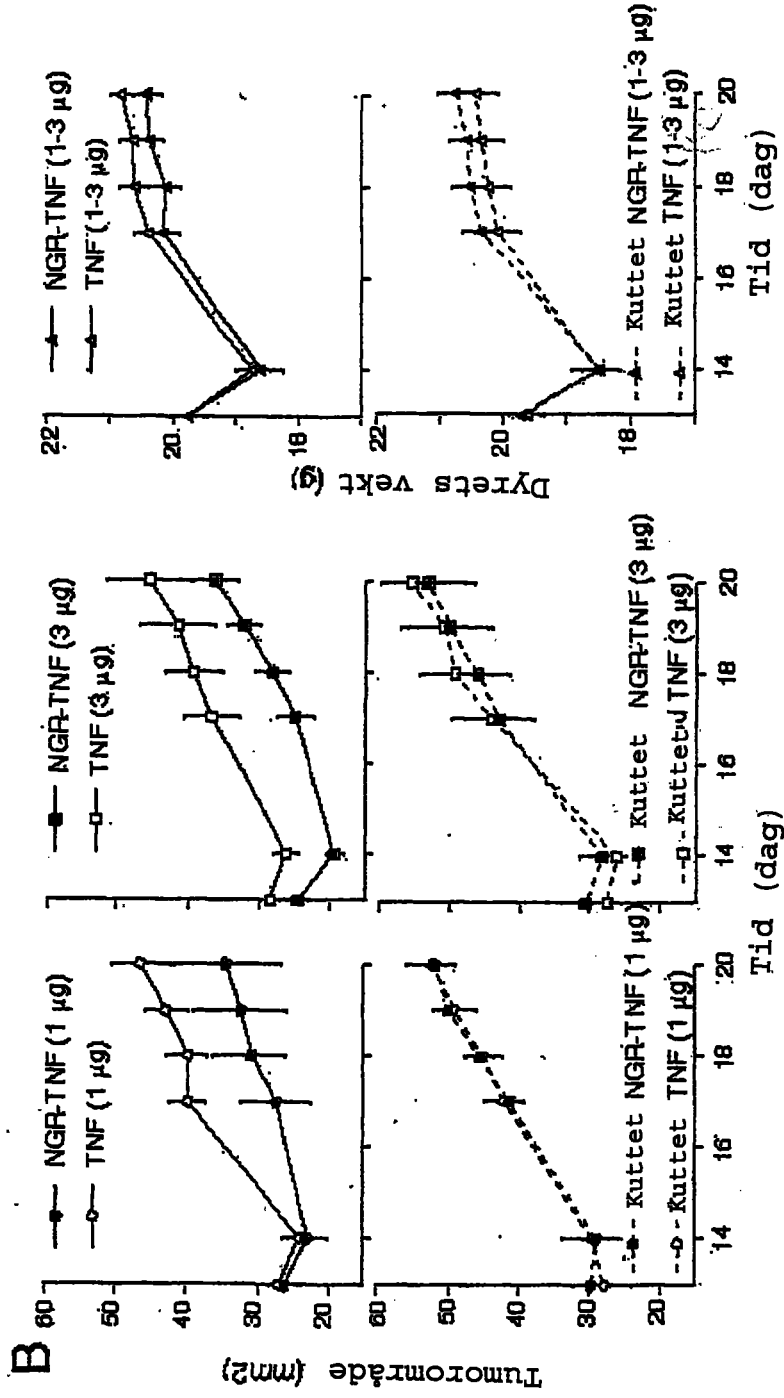
FIGUR 2



FIGUR. 3



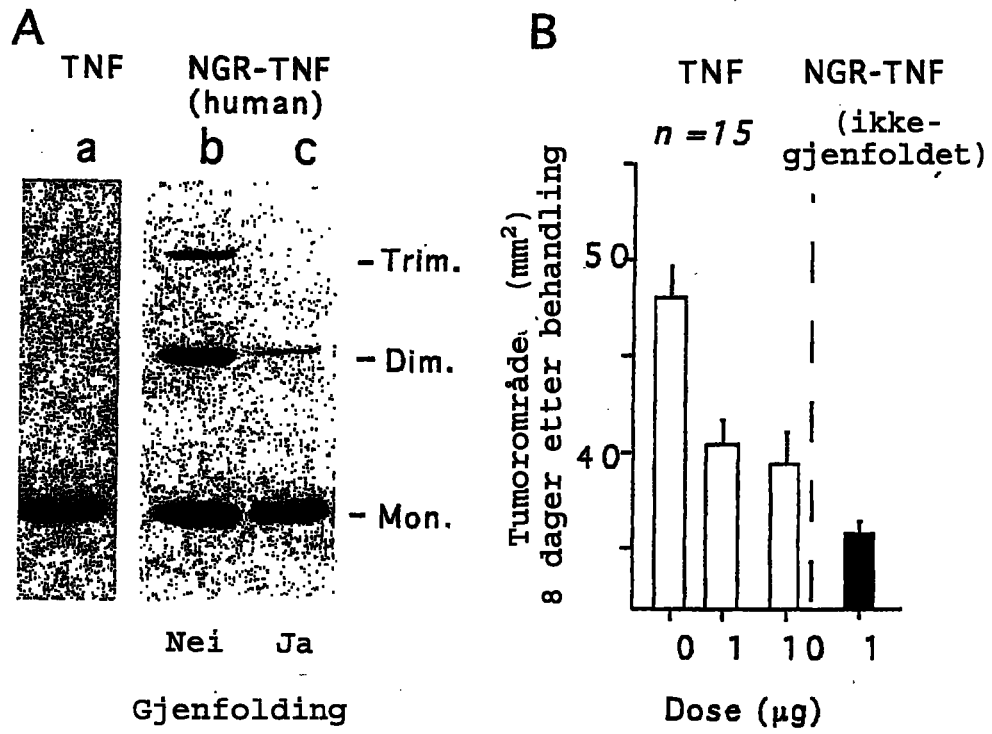
FIGUR 3



B

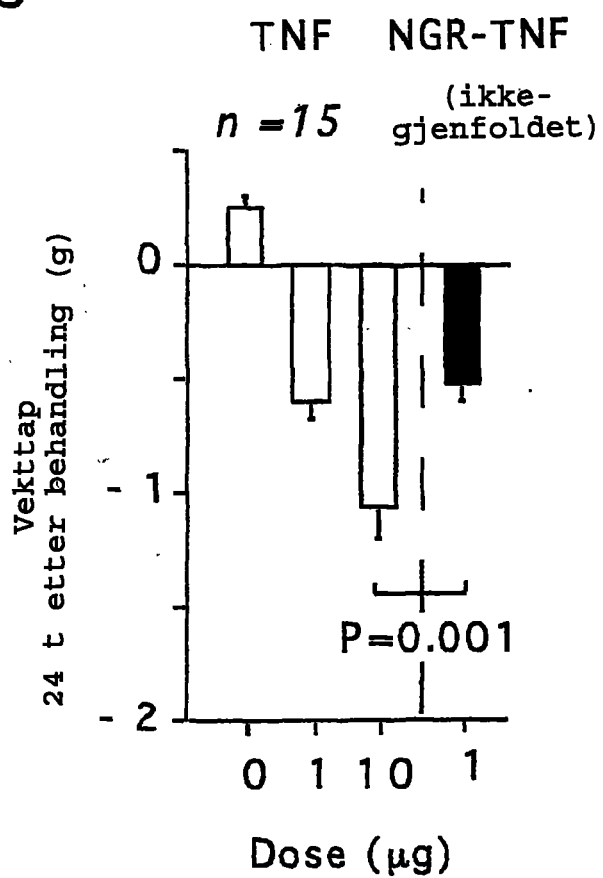
7/9

FIGUR 4



FIGUR 4

C



9/9

FIGURE 4

