



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **327487**

(13) **B1**

**NORGE**

(51) Int Cl.

*A61K 9/127 (2006.01)*

*A61K 45/06 (2006.01)*

*A61K 47/48 (2006.01)*

*C12N 15/88 (2006.01)*

*A61K 31/00 (2006.01)*

*A61K 38/00 (2006.01)*

**Patentstyret**

|      |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |      |                           |                              |
|------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------|------------------------------|
| (21) | Søknadsnr             | 19994413                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 1998.03.12<br>PCT/US98/04891 |
| (22) | Inng.dag              | 1999.09.10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | (85) | Videreføringsdag          | 1999.09.10                   |
| (24) | Løpedag               | 1998.03.12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | (30) | Prioritet                 | 1997.03.12, US, 820337       |
| (41) | Alm.tilgj             | 1999.11.10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |      |                           |                              |
| (45) | Meddelt               | 2009.07.13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |      |                           |                              |
| (73) | Innehaver             | The Regents of the University of California, 1111 Franklin Street, 12th Floor, CA94607-5200<br>OAKLAND, US                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |      |                           |                              |
| (72) | Oppfinner             | Donald M. McDonald, San Francisco, CA, US<br>John McClean, Redwood City, CA, US<br>O. Gavin Thurston, San Francisco, CA, US<br>Peter Baluk, San Francisco, CA, US                                                                                                                                                                                                                                                                                              |      |                           |                              |
| (74) | Fullmektig            | Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |      |                           |                              |
| (54) | Benevnelse            | <b>Kationisk liposom samt anvendelse derav</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |      |                           |                              |
| (56) | Anførte publikasjoner | EP 819758 A2 (MIXSON A.J.) 1998.01.21.<br>MORISHITA K. et al. A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression, Journal of Biological Chemistry. 1995, Vol.270, side 27948-27953.<br>PATTERSON C. et al. Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. J. Biological Chemistry. 1995, Vol.270, side 23111-23118. |      |                           |                              |
| (57) | Sammendrag            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |      |                           |                              |

Angiogene endotelceller blir selektivt oppsøkt med lipid/DNA-komplekser eller kationiske liposomer som inneholder en substans som affiserer målcellene ved å hemme eller fremme deres vekst. Et angioneoseområde kan bli nøyaktig lokalisert ved å tilføre kationiske liposomer som inneholder en påvisbar merking. Kompleksene kan omfatte nukleotidkonstruksjoner som består av promotere som blir selektivt og eksklusivt aktivert i en angiogen endotelcelles miljø.

Foreliggende oppfinnelse vedrører kationisk liposom samt anvendelse derav.

### Oppfinnelsens bakgrunn

Den foreliggende oppfinnelse kan benyttes for behandling og diagnose av en rekke ulike sykdommer og abnormaliteter. Kreft, sårtilheling og en rekke kroniske  
5 betennelsessykdommer blir generelt sett for øyeblikket behandlet direkte ved fysikalske metoder slik som kirurgisk fjerning av kreftvev, sammensying av sår og kirurgisk fjerning av betente ledd. Videre kan hver av disse bli behandlet ved kjemiske fremgangsmåter. Kjemoterapi blir benyttet for kreft, veksthormoner blir tilsatt ved sårtilheling, og antibetennelsesmedikamenter blir benyttet for å behandle  
10 kroniske betennelsestilstander. Disse og relaterte behandlinger blir generelt rettet mot å behandle de vev som er affisert av kreft, skade eller betennelse. Nåværende behandlingsteknikker for de ovennevnte problemer er beskrevet nedenfor.

### Behandlinger av kreft

15 Ordet "kreft" inkluderer et spektrum av sykdommer som varierer i behandling, prognose og mulighet for helbredelse. Teknikkene for diagnose og behandling avhenger av området der tumor oppstår, grad av spredning, områder som er involvert, den fysiologiske tilstand til pasientene og prognose. Når diagnosen er stilt, blir tumor vanligvis "gradert" i stadier, en prosess som benytter seg av kirurgiske  
20 teknikker, fysikalsk undersøkelse, histopatologisk, bildeanalyse og laboratorieanalyser for å definere sykdommens utstrekning og for å dele inn gruppen av kreftpasienter i grupper med synkende sannsynlighet for helbredelse. Slike systemer blir benyttet både for å planlegge behandling og for å bestemme prognosene til pasienten (Stockdale, F., 1996, "Principles of Kreft Patient Management." i: Scientific  
25 American Medicine, vol. 3., Dale, D.C., og Federman, D.D. (eds.), Scientific American Press, New York). Typen eller stadium til kreftsykdommen kan bestemme hvilke av de tre generelle typer av behandling som vil benyttes: kirurgi, strålingsbehandling og kjemoterapi. En aggressiv behandlingsplan som kombinerer behandlingstyper, kan også blir valgt. For dette formålet kan kirurgi benyttes for å  
30 fjerne primær tumor, og de gjenværende celler blir behandlet med strålingsbehandling eller kjemoterapi (Rosenberg, S.A., 1985, "Combined-modality therapy of kreft; what is it and when does it work?" *New Engl. J. Med.* 312: 1512-14).

Kirurgi spiller en sentral rolle i diagnosebehandling av kreft. Generelt blir en kirurgisk teknikk nødvendig for biopsi, og kirurgi kan også være den definitive behandling for mange pasienter med kreft. Kirurg blir også benyttet for å fjerne tumormasse, for å fjerne metastaser, for å behandle medisinske akutsituasjoner, og for å lindre og rehabilitere. Selv om den primære kirurgiteknikk for kreftbehandling har dreiet seg om utvikling av operative teknikker der tumorer blir fjernet under direkte visualisering, gir nåværende teknikker også mulighet for å fjerne noen tumorer ved hjelp av en endoskopi. Et hovedproblem i behandling av kreft er vurdering av den operative risiko (Stockdale, F., *supra*).

Strålingsbehandling spiller en viktig rolle både i den primære og lindrende behandling av kreft. Både teleterapi (megavolt bestrålingsbehandling) og brachyterapi (interstitiell og intrakavitetsbestråling) er i standardbruk. Elektromagnetisk stråling i form av røntgenstråler blir vanligvis benyttet i teleterapi for å behandle vanlige ondartete svulster, mens gammastråler, i form av elektromagnetisk stråling som er lignende røntgenstråler, men som sendes ut fra radioaktive isotoper av radium, kobolt og andre elementer, blir også benyttet. Strålingsterapi overfører energi til vev som begrensede energipakker, som kalles fotoner, som skader både ondartet og normalt vev at det produseres ionisering inne i celler. Målet for ionene er vanligvis DNA, strålingsbehandling benytter det faktum at strålingsskaden ikke er lik i ondartete og godartete vev - raskt delende celler er mer følsomme overfor DNA-skade enn hvilende celler (Pass, H. I, 1993, "Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use," *J. Natl. Kreft Instit.* 85: 443-56). Strålingsbehandling går sammen med både spesielle fordeler og viktige toksiske responser. Stråling foretrekkes i visse anatomiske områder (f.eks. mediastinum) der stråling kan være den eneste logiske behandlingsmetode, og stråling kan også være den eneste mulige lokale behandlingsmåte dersom tumor er til stede over større områder. Stråling kan også benyttes når pasienten mener at kirurgi ikke er akseptabelt, eller når den medisinske tilstand til pasienten gjør kirurgi umulig. Strålingsbehandling fører til vevsskade som kan gi tidlige og sene strålingseffekter. De tidlige effekter (akutt toksisitet fremkalt av strålingsbehandling) består av rød hud, avflassing, betennelse av spiserør, kvalme, hårfall og supresjon av benmargen, mens de sene effekter inkluderer nekrose av vev og fibrose, og vanligvis bestemmer den begrensede toksisitet av strålingsterapi (Stockdale, F., *supra*).

Nesten alle kjemoterapeutiske midler som er for bruk for tiden, interfererer med DNA-syntese, med produksjon av forløpere for DNA og RNA-syntese, eller med celledeling, og er derfor rettet mot prolifererende celler (Stockdale, F., "Kreft growth and chemotherapy," *supra*). Studier på tumor hos dyr og kliniske prøvinger på  
 5 mennesker har vist at kombinasjoner av medikamenter gir en høyere grad av objektive responser og lengre overlevelse enn enkelte midler (Frei, E. III, 1972, "Combination kreft therapy: presidential address," *Kreft Res.* 32: 2593-2607). Kombinasjonsbehandling med medikamenter benytter ulike virkningsmekanismer og ulikt cytotoxisk potensial av flere medikamenter, deriblant alkylerende midler,  
 10 antimetabolitter og antibiotika (Devita, V.T., et al., 1975, "Combination versus single agent chemotherapy; a review of the basis for selection of drug treatment of kreft," *Kreft* 35: 98-110). Pasientens fysiologiske tilstand, tumors vekstkarakteristika, heterogene tumorcellepopulasjoner, og multimedikaments motstandsstatus i tumor påvirker effektiviteten til kjemoterapi. Generelt er kjemoterapi ikke målrettet (selv om  
 15 disse teknikker blir utviklet, f.eks. Pastan, I., et al., 1986, "Immunotoxins," *Cell* 47: 641-648), og bivirkninger slike som benmargsdepresjon, gastroenteritt, kvalme, håravfall, lever eller lungeskade, eller sterilitet kan bli resultatet.

### Sårtilheling

20 Sårtilheling er en kompleks og vedvarende prosess som reparerer og remodelerer vev der mange ulike celletyper er involvert, noe som krever en finjustert kontroll av ulike biokjemiske reaksjonskaskader for å balansere de ulike regenerative prosesser. Sårtilheling blir vanligvis delt inn i tre faser: betennelse, proliferasjon og modning (Waldrof, H., og Fesked, J., 1995, "Wound Healing," *Adv. Dermatol.* 10: 77-  
 25 96). Prosessen omfatter vandring av ulike celletyper inn i sårregionen, vekststimulering av epitelceller og fibroblaster, dannelse av nye blodårer og dannelsen av ekstracellulær matriks. Korrekt funksjonering av disse prosesser avhenger av biologisk aktivering av ulike cytokiner (Bennett, N.T., and Schultz, G.S., 1993, "Growth factors and wound healing: biochemical properties og growth factors  
 30 and their receptors," *Am. J. Surg.* 165: 728-37). Ernæring, immunsystemet, oksygen, blodvolum, infeksjon, immunsupresjon og en nedgang i rødblodlegemer er alle viktige faktorer i sårtilheling (Withney, J.D., 1989, "Physiological Effects of tissue oxygenation on wound healing," *Heart Lung* 18: 466-474).

Kvalitet samt hastighet i sårtilheling er vanligvis avhengig av type og utstrekning av den originale skade. Tre generelle fremgangsmåter blir benyttet for å behandle sår, hver av disse er rettet mot å helbrede det skadete vev. Sårlukking blir vanligvis oppnådd ved å sy, selv om bruk av tape, stifter eller elektrokautisering  
 5 også kan benyttes (Wheeless, C. R., 1996 *Wheeless' Textbook of Orthoedics*) (Garrett, W. E. et al., 1984, *J. Hand Surg.* 9: 683-92). Hudtape og ulike suturer fremviser hver en del fordeler og en del ulemper ved primærlukking av sår. Hudtape fremkaller mindre betennelsesreaksjon, men lukker ikke de subepiteliale sårområder, mens betennelsesreaksjonen og den derav følgende arrdannelse som fremkalles av  
 10 de ulike suturer, avhenger av størrelse på suturnålen, diameter av suturmaterialet og om det er et monofilament eller en vevet sutur (Simpson, W.R., 1977, "Physiological principles of therapy in head and neck cutaneous wounds," *Laryngoscope* 87: 792-816).

I et sår bestemmer mengden mikroorganismer, organismenes virulens og  
 15 vertens antimikrobielle forsvarsmekanismer om en infeksjon vil utvikle seg. Således kan antibiotika også være av terapeutisk verdi i behandling av sår (Edlich, R. F., et al., 1986. "Antimicrobial treatment of minor soft tissue lacerations: a critical review," *Emergency Medical Clinics of North America* 4(3): 561-80). Den farmakologiske virkning til hvert antibiotikum må forstås for at man kan velge det korrekte anti-  
 20 biotikum, hvilken tilførselsvei som skal velges og for å unngå bivirkninger (Simpson, W. R., *supra*). Nylige resultater antyder at antibiotisk behandling tillater en raskere celleproliferasjon og differensiering, og således kan være til hjelp i å fremme sårtilheling (Barrow, R. E, et al., 1994, "Efficacy of cefazolin in promoting ovine tracheal epithelial repair," *Respiration* 61: 231-5; Maeder, K., et al., 1993, "Methicillinresistant  
 25 *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization in patients with spinal cord injury," *Paraplegia* 31: 639-44. Proteolytiske enzymer er også blitt benyttet i tillegg til antibiotisk behandling av kontaminerte sår (Rodeheaver, G. T, et al., 1978, "Mechanisms by which proteolytic enzymes prolong the golden period of antibiotic action," *Am. J. Surg.* 136(3): 379-82).

30 Den lokale tilførsel av ulike cytokiner, deriblant bFGF, EGF, PDGF og TFG-beta, enten alene eller sammen, kan i betydelig grad akselerere sårheling (Moulin, V., 1995, "Growth factors in skin wound healing," *Eur. J. Cell. Biol.* 68:1-7). Vekstfaktorer tiltrekker celler inn i såret, stimulerer deres proliferering, og har betydelig effekt på nedlegging av ekstracellulær matriks. Siden evnen til å

masseprodusere disse cytokiner ved hjelp av rekombinante teknikker er blitt utviklet, har mange studier demonstrert at vekstfaktorer kan forbedre vevsreparasjon i alle dets aspekter både i normale og sviktende tilhelingsmodeller (f.eks. Schultz, G.S., et al., 1987, "Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and accinia growth factor," *Science* 235: 350-2; Deuel, T. F., et al., 1991, "Growth factor and wound healing: platelet derived growth factor as a model cytokine," *Annu. Rev. Med.* 42: 567-84). Selv om preliminære kliniske forsøk har vist at vekstfaktorbehandling noen ganger har ført til statistisk signifikante forbedringer i vevsreparasjon, er det ikke klart at disse resultater er av klinisk betydning, og det er blitt antydning at nye kliniske forsøk må fokusere på å målrette vekstfaktorer for spesifikke typer av tilhelingssvikt (Greenhalgh, D. G, 1996, "The role of growth factors in wound healing," *J. Trauma* 41: 159-67).

#### Kronisk betennelse

Naturlige, humorale og cellulære immunmekanismer er alle blitt implisert i patogenesen av kroniske betennelsessykdommer (Seymour, G. J., et al., 1979, "The immunopathogenesis of progressive chronic inflammatory periodontal disease, 1979," *J. Oral Pathol*, 8: 249-65). Autoimmune sykdommer kommer fra unormaliteter i lymfocyttfunksjon. Unormal T-cellefunksjon kan være ansvarlig for sykdommer via celledmediert immunitet, og aktiviteten til hjelper T-celler i å produsere antistoff kan bidra til dannelsen av autoantistoff. Den sentrale rolle til hjelper T-celler i autoimmun-sykdommer er støttet av sammenhengen mellom mange av disse sykdommer og visse HLA-molekyler. Svikt i et eller flere trinn i vedlikehold av toleranse kunne føre til autoimmunitet (Robinson, D. R, 1996, "Immunologic Tolerance and Autoimmunity," i: Scientific American Medicine, Vol. 2, Section VI, Scientific American Press, New York, s. 1-11).

En rekke behandlingsteknikker blir benyttet i autoimmunsykdom hvorav alle er rettet mot å minske immunresponsen i det affiserte vev. For eksempel kan behandling av kronisk leddgikt, en autoimmun sykdom, benytte anti-betennelsesmidler slike som ikke-steorid anti-inflammatoriske midler (NSAIDs) eller glukokortikosteroider, midler som gir remisjon slik som gullsalter og/eller immunosuppressive medikamenter slik som syklofosamid. Ortopedisk kirurgi kan også benyttes for å bytte ut ledd som er skadet av betennelsesprosessen (se Gilliland, B. C., og Mannik, M., 1983, "Rheumatoid Arthritis" i: *Harrison's Principles of*

*Internal Medicine*, McGraw Hill, New York, s. 1977-1984). Nylige studier har antydnet muligheten av nye behandlingsteknikker som også er rettet mot det affiserte vev, slik som bruk av TNF-alfa i behandling av kronisk leddgikt (Brennan, F. M, et al., 1995, "Cytokine expression in chronic inflammatory disease," *Br. Med. Bull.* 51: 368-384).

5 Allergi refererer til en tilstand der immunresponsen overfor miljøantigener fremkaller vevsbetennelse og organsdisfunksjon. Som i de autoimmune sykdommer antyder dagens kunnskap at en rekke komponenter av immunsystemet interagerer i allergiske sykdommer. De ulike typer allergiske sykdommer oppstår fra ulike immunologiske effektormekanismer, som fremkaller spesielle typer vevsskade (Beer, 10 D. J. et al., 1996, "Allergy," i: *Scientific American Medicine*, Vol. 2, Section VII, Scientific American Press, New York, s. 1-29). De kliniske manifestasjoner fra hver allergisk sykdom fremkalles av den immunologisk medierte betennelsesrespons i de affiserte organer eller vev (f.eks. astma fremkommer av en betennelsesreaksjon i lungene).

15 En rekke behandlingsstrategier blir benyttet for å behandle de immunmedierte allergiske sykdommer, og alle disse er rettet mot å minske immunresponsen i de betente vev. For eksempel kan i behandling av astma, terapi inkludere kontroll av miljø, farmaterapi og allergin immunoterapi (Beer, D. J., et al., 1996, "Allergy," i: *Scientific American Medicine*, Vol. 2, Section VII, Scientific 20 American Press, New York, s. 1-29). I behandling av astma er eliminering av de fremkallende agens den viktigste og mest vellykkete metode for å hindre betennelse. Det er imidlertid ofte ikke mulig å oppnå dette, og en rekke type medikamenter er derfor blitt benyttet. Disse inkluderer metylxantiner (for dilatasjon av bronkier), adrenerge stimulanter (stimulering av  $\beta$ -adrenerge reseptorer, for dilatering av 25 luftrør), glukokortikoider (for å minske betennelse i lungene), kromoner (nedregulere mastceller, minske betennelse i lungene) og anticholinergika (for dilatering av luftrør) (McFadden, E. K., Jr., og Austen, K. F., "Lung disease caused by immunologic and invironmental injury," i: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw Hill, New York, s. 1512-1519). Desensitisering eller immunoterapi med ekstrakter av de 30 mistenkte allergener er også blitt antydnet for å redusere betennelse i astma (McFadden og Austen, *op. cit.*; Jacquemin, M. G, og Saint-Remy, J. M., 1995, "Specific down-regulation of anti-allergen IgE and IgG antibodies in humans

associated with injections of allergen-specific antibody complexes." *Ther. Immunol.* 2: 41-52).

#### Nåværende behandlinger - immunologi

5 Behandlingsregimene beskrevet over har hatt varierende suksess. Selv om grad av suksess er langt fra å være perfekt i mange tilfeller, fortsetter forskning for å utvikle bedre behandlinger. Et område som viser muligheter, dreier seg om immun-systemet. Ved å benytte genetisk modifikasjon og/eller kjemisk stimulasjon, er det mulig å modifisere og/eller stimulere immunresponser slik at kroppens eget immun-  
10 system behandler sykdommene, f.eks. antistoff som ødelegger kreftceller. Denne typen behandling skiller seg fra de som er beskrevet over ved at det benyttes en biologisk prosess for å slåss mot en sykdom. Imidlertid er denne behandling fremdeles en direkte behandling, noe som betyr at antistoffene som blir dannet, direkte angriper kreftcellene.

15 Den foreliggende oppfinnelse kan benyttes for behandlinger som benytter en radikal endring sammenlignet med normale behandlinger, idet at den foreliggende oppfinnelse ikke dreier seg om å direkte affisere kreft, skadete eller betente celler.

Andre har oppfattet at, i det minste i teori, det er mulig å behandle kreft eller betennelse som er assosiert med angiogenese ved å hemme angiogenese. Et typisk  
20 eksempel på den nåværende vurdering som dreier seg om slike metoder, blir diskutert i PCT publikasjon WO 95/25543, publisert 28. september, 1995. Denne publiserte søknad beskriver hemming av angiogenese ved å tilføre et antistoff som binder seg til et antigen som man antar er til stede på overflaten av angiogene endotelialceller. Spesifikt beskriver søknaden tilførsel av et antistoff som binder til  
25  $\alpha_v\beta_3$  som er en membranreseptor som man tror medierer celle-celle og celle-ekstracellulærmatriks interaksjoner som generelt blir henvist til som celleadhesjons-hendelser. Ved å blokkere denne reseptor, håper behandlingen å hemme angiogenese og derved å behandle kreft og betennelse.

EPA2819758 beskriver kationiske liposomer omfattende DNA kodende for et  
30 anti-angiogent peptid.

Morishita et al. (1995) *J.Biol. Chem.* 270:27948 og Patterson et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:23111 beskriver promotere for vaskulær endotelial vekstfaktor reseptorer.

### Sammendrag av oppfinnelsen

Midler for levering til angiogene endotelceller er beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgende kationisk liposom, kjennetegnet

5 ved at det omfatter:

minst 5 mol% av minst et kationisk lipid;

eventuelt minst et nøytralt lipid;

og en toksisk forbindelse som ødelegger angiogene endotelceller til en tumor, hvor det kationiske liposomet har et zetapotensial høyere enn 0 mV når tilstede i  
10 fysiologisk pH.

Det er videre beskrevet anvendelse av et kationisk liposom for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av kreft i et individ, hvor det kationiske liposomet omfatter:

minst 5 mol% av minst et kationisk lipid;

15 eventuelt minst et neutralt lipid; og

en toksisk forbindelse som ødelegger angiogene endotelceller til en tumor, og hvor det kationiske liposomet har et zetapotensial høyere enn 0 mV når tilstede i fysiologisk pH.

Anvendelsen omfatter videre at nevnte kationiske lipid omfatter et skjelett og  
20 mer enn en fettsyre med 12 til 24 karbonatomer i lengde og inneholder opptil 6 ikke-metninger knyttet til skjelettet enten med acyl-eller eterbindinger.

Anvendelsen omfatter videre at nevnte liposom er for administrering ved intravaskulær injeksjon.

Videre omfatter oppfinnelsen anvendelse som angitt i krav 4 hvor nevnte  
25 individer er et pattedyr eller et menneske.

Metoden kan inkludere injeksjon, fortrinnsvis inn i det sirkulatoriske system og mer fordelaktig inn i arterier, kationiske liposomer (eller polynukleotid/lipid-komplekser) som omfatter kationiske lipider og en forbindelse som fremmer eller hemmer angiogenese og/eller inkluderer en påvisbar merking. Etter tilførsel vil de  
30 kationiske liposomer bindes selektivt til angiogene endotelceller, noe som betyr at de assosierer med angiogene endotelceller i en ratio på fem eller flere (fortrinnsvis ti ganger eller flere) mer enn de assosierer med tilsvarende, men hvilende endotelceller som ikke er involvert i angiogenese. Når liposomene (eller polynukleotid/lipidkompleksene) assosierer med angiogene endotelceller, blir de tatt

opp av endotelcellen og har deres ønskete effekt. Substansen kan ødelegge endotelcellen, stimulere til videre angiogenese, stimulere koagulasjon og/eller merke endotelcellen slik at den kan bli påvist ved hjelp av en passende fremgangsmåte.

Substansen som affiserer den angiogene endotelcelle, kan være en nukleotid sekvens, slik som DNA som kode som et protein, som - når det blir uttrykket - fremmer eller hemmer angiogenese. Nukleotidsekvensen blir fortrinnsvis inneholdt i en vektor som er koblet operativt til en promoter, der denne promoter fortrinnsvis er aktiv kun i en angiogen endotelcelle eller kan aktiviseres i disse celler ved tilførsel av en forbindelse, noe som gjør det mulig å slå genet på eller av ved aktivering av promotoren. Videre detaljer og farvefotografier som beskriver den foreliggende oppfinnelse, blir gitt i et manuskript av oppfinnerne - Thurston et al., "Cationic Liposomes Target Angiogenic Endothelial Cells in Tumors and Inflammation in Mice," *J. Clin. Invest.*, April 1, 1998.

Liposomet ifølge oppfinnelsen er videre kjennetegnet ved at nevnte kationiske lipid omfatter et skjelett og mer enn en fettsyre med 12 til 24 karbonatomer i lengde og innhold opptil 6 ikke-metninger knyttet til skjelettet enten med acyl- eller eterbindinger.

Videre omfatter oppfinnelsen at liposomet ifølge krav 1 eller 2 er kjennetegnet ved at liposomet har minst 5- ganger høyere selektivitet for angiogene endotelceller sammenlignet med korresponderende normale endotelceller.

Det kationiske liposomet kan selektivt affisere angiogene endotelceller, og derved hemme eller fremme angiogenese.

Det er mulig å selektivt affisere angiogene endotelceller på en måte som fører til lokal intravaskulær blodkoagulasjon som hindrer eller totalt blokkerer blodgjennomstrømning i en blodåre.

Ved anvendelse av det kationiske liposomet er det mulig å ødelegge en uønsket tumor.

En annen fordel ved oppfinnelsen er at oppfinnelsens kationiske liposomer kan benyttes for å hemme angiogenese som er assosiert med ondartete eller godartete tumorer som er assosiert med pågående angiogenese.

Ytterligere en annen fordel ved oppfinnelsen er at de kationiske liposomer kan benyttes til å levere forbindelser direkte i området som fremmer angiogenese og derved forsterker sårtilheling.

Ved anvendelse av det kationiske liposomet kan flere sykdomsklasser og/eller abnormaliteter blir behandlet uten at vevet som er involvert i abnormaliteten blir direkte behandlet, for eksempel ved å hemme angiogenese, blir blodtilførsel til en tumor avbrutt og tumor blir ødelagt uten at man direkte behandler tumorcellene på  
 5 noen som helst måte.

Disse og andre egenskaper, fordeler og karakteristikk ved den foreliggende oppfinnelse vil bli tydelige for de som er øvet i faget når de leser beskrivelsen som blir gitt her, sammen med de vedlagte figurer.

#### 10 Kort beskrivelse av figurene

Figurene 1-10 blir vedlagt både i fargeversjon og i en sort/hvit versjon. Dette er blitt gjort siden oppfinnelsen best blir forstått via fargebilder, der disse bilder kan være uakseptable ved nåværende PCT søknads praksiser. Fargebilder for figurene 1-10 er i US søknaden serienummer 08/820,337, arkivert 12. mars 1997, som  
 15 herved inkorporeres som referanse. Videre blir fargebilder som klart viser den større affinitet de merkete komplekser fra oppfinnelsen har for angiogene endotelceller sammenlignet med tilsvarende normale endotelceller vist i Thurston, et al., "Cationic Liposomes Target Angiogenic Endothelial Cells in Tumors and Inflammation in Mice," *J. Clin. Invest.*, 1. april 1998 (inkorporert som referanse).

20 Figur 1 er et fluorescens mikroskopbilde som viser opptak av røde fluorescerende CM-Dil-merket DDAB:kolesterol-DNA komplekser i angiogene blodårer i en follikkel i en normal museeggstokk (Skala: 60  $\mu\text{m}$ ),

Figur 2 er et fluorescens mikroskopbilde som viser opptak av røde fluorescerende CM-Dil-merket DDAB:kolesterol-DNA komplekser i angiogene  
 25 blodårer i et snitt fra en pankreatisk tumor i RIP1-Tag5 mus - blodårer farvet grønt med et fluorescerende lectin (Skala: 40  $\mu\text{m}$ ),

Figur 3 er en lavforstørrelsesfluorescensmikrograf som viser lite eller intet opptak av Texas Rødt-merket DOTAP:kolesterol-DNA komplekser (gul-oransje) i blodårene i en normal mus pankreatisk øy (Skala: 150  $\mu\text{m}$ ),

30 Figur 4 er en lavforstørrelsesfluorescensmikrograf som viser opptak av Texas Rødt-merket DOTAP:kolesterol-DNA komplekser (gul-oransje) i blodårer i en pankreatisk tumor i en TIP1-Tag2 mus (Skala : 150  $\mu\text{m}$ ),

Figur 5 er en konfokal mikrograf som viser lite eller intet opptak av Texas Rødt-merket DOTAP:kolesterolliposomer (rød-oransje) i en normal pankreatisk øy, årer ble farvet (grønne) med fluorescerende lectin (Skala: 50  $\mu\text{m}$ ),

Figur 6 viser en konfokal mikrograf med opptak av Texas Rødt-merket DOTAP:kolesterol liposomer (rød-oransje) i en pankreatisk tumor i en RIP1-Tag2 mus. Blodårer ble farvet med perfusjon med fluorescerende Lycopersicon esculentum lectin (grønt) etter at liposomer ble injisert intravenøst (Skala: 50  $\mu\text{m}$ ),

Figur 7 viser en konfokal mikrograf av opptak av Texas Rødt-merket DOTAP:kolesterol liposomer (rød-oransje) i en pankreatisk tumor i en RIP1-Tag2 mus. Blodårer ble farvet med perfusjon med fluorescent Lycopersicon esculentum lectin (grønt) etter at liposomer ble injisert intravenøst (Skala: 50  $\mu\text{m}$ ),

Figur 8 viser en konfokal mikrograf av opptak av Texas Rødt-merket DOTAP:kolesterol liposomer (rød-oransje) i en pankreatisk tumor i en RIP1-Tag2 mus. Blodårer ble farvet ved perfusjon av fluorescerende Lycopersicon esculentum lectin (grønt) etter at liposomer ble injisert intravenøst. Mulige områder med blodårevækst har intens opptak (Skala: 50  $\mu\text{m}$ ),

Figur 9 er en konfokal mikrograf som viser lite opptak av Texas Rødt-merket DOTAP:kolesterol liposomer (rød-oransje) i normale blodårer i trakea til en patogenfri mus, blodårer er farvet grønne med et fluorescerende lectin (Skala: 50  $\mu\text{m}$ ),

Figur 10 viser en konfokal mikrogram av opptak av Texas Rødt-merket DOTAP:kolesterol liposomer (rød-oransje) i angiogene blodårer i trakea til en mus som har infeksjon med *Mycoplasma pulmonis* (Skala: 50  $\mu\text{m}$ ),

Figur 11 er et bilde som viser mengde opptak av Texas Rødt-DOTAP:kolesterol liposomer i blodårer fra patogenfrie (normale) og *Mycoplasma pulmonis*-infiserte musetrakea analysert ved å måle intensitet av liposomfluorescent 4 timer etter injeksjon intravenøst. Målinger ble gjort ved av et Zeiss LSM 410 konfokalt mikroskop. Infiserte mus ble innokkulert intranasalt med *M. pulmonis*-organismer og undersøkt etter 4 uker. Stjerne viser statistisk signifikant forskjell ( $P < 0,05$ , gjennomsnitt  $\pm$  SE,  $n = 4$  mus pr. gruppe),

Figur 12 er et transmisjonselektronmikropisk bilde som viser DOTAP:kolesterol liposomer assosiert med en endotelcelle i trakea til en mus infisert med *M. pulmonis* (Skala: 50  $\mu\text{m}$ ), og

Figur 13 er et transmisjonselektronmikroskopisk bilde som viser DOTAP: kolesterol liposomer som er tatt opp av en endotelcelle i trakea til en mus infisert med *M. pulmonis* (Skala: 80  $\mu$ m).

#### 5 Detaljert beskrivelse av foretrukne utførelser

Det må forstås at som benyttet i denne spesifisering og de vedlagte krav, inkluderer entallsformene "en", "og" og "den" flertallsformer dersom ikke sammenhengen tydelig sier noe annet. Således dreier referanse for eksempel til "et liposom" seg også om blandinger og stort antall av slike liposomer, referanse til "et  
10 middel" inkluderer et stort tall av midler og blandinger av disse, og referanse til "fremgangsmåten" dreier seg om en eller flere fremgangsmåter eller trinn av typen som er beskrevet her.

Om ikke noe annet blir definert, har alle tekniske og vitenskapelige ord benyttet her den samme betydning som vanligvis forstått av en med vanlig øvelse i  
15 faget som denne oppfinnelse tilhører. Selv om enhver fremgangsmåte eller materiale, lik eller ekvivalent med de som er beskrevet her, kan benyttes i praksis eller testing av den foreliggende oppfinnelse, blir de foretrukne metoder og materialer beskrevet her.

#### Definisjoner

20 Ordene "behandling", "behandle" og lignende blir her benyttet generelt i betydning av å fremkalle en ønsket farmakologisk og/eller fysiologisk effekt. Effekten kan være profylaktisk ved at den totalt eller delvis hindrer en sykdom eller et symptom av denne sykdom og(eller kan være terapeutisk i betydning av en delvis eller komplett stabilisering eller helbredelse av en sykdom og/eller uønsket virkning som kan komme av sykdom. "Behandling" som benyttet her, dekker enhver  
25 behandling av en sykdom hos et pattedyr, spesielt et menneske, og inkluderer:

- (a) å forebygge at sykdommen eller symptom oppstår i et subjekt som kan være predisponert overfor sykdommen eller symptomet, men som ikke hittil er blitt diagnostisert med denne,
- 30 (b) hemming av sykdomssymptomet, det vil si stoppe dens utvikling, eller
- (c) lindre sykdomssymptomet, det vil si føre til tilbakegang av sykdommen eller symptomet.

Begrepet "angiogenese" dreier seg om en prosess med vaskularisering av vev som inkluderer utvikling av nye blodårer. Angiogenese oppstår ved en av tre

mekanismer: (1) neovaskularisering, der endotelceller migrerer ut av eksisterende blodårer og begynner dannelse av nye blodårer, (2) vaskulogenese, der blodårene oppstår fra forløperceller *de novo*, eller (3) vaskulær ekspansjon, der eksisterende små blodårer øker i diameter og danner større blodårer (Blood, C. H. og Zetter, B. R, 5 1990, *Biochem. Biophys. Acta.* 1032: 89-118).

Angiogenese er en viktig prosess i normale deler av nyfødt vekst og i det kvinnelige reproduksjonssystem under vekstsyklus i corpus luteum (se Moses, M.A., et al., 1990, *Science* 248: 1408-10). Under normale forhold er alle prosesser som inkluderer nydannelse eller remodelering av eksisterende eller nye blodårer en 10 selvbegrensende prosess, og ekspansjon av de spesifikke celletyper er kontrollert og foregår sammen.

Angiogenese er også innblandet i sårtilheling og i patogenesisen til en stor mengde av kliniske sykdommer som inkluderer vevsbetennelser, artitt, astma, tumorvekst, diabetisk retinopati og andre tilstander. Kliniske manifestasjoner assosiert med 15 angiogenese blir beskrevet som angiogene sykdommer (Folkman, J. og Klagsbrun, M., 1987, *Science* 235: 442-7).

Mange eksperimenter har antydnet at vev kan produsere angiogene faktorer som fremmer angiogenese under tilstander med dårlig blodtilførsel under både normale og patologiske situasjoner. Disse faktorer og forbindelser atskiller seg i 20 cellespesifisitet og i mekanismene som de benytter for å indusere vekst av nye blodårer. Disse faktorer virker via en rekke mekanismer. For eksempel kan de indusere migrering og poliferering av endotelceller eller stimulere produksjonen av kollagenase (se Klagsbrun, M. og D'Amore, P.A., 1991, "Regulators of angiogenesis," *Ann. Rev. Physiol.* 53: 217-39. Det er en rekke bioanalyseteknikker 25 som tillater direkte bestemmelse av angiogene aktiviteter (Wilting, J., et al., 1991, "A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. Studies on the effect of carriers, PBS, angiogenin, and bFGF," *Anat. Embrol. (Berl)* 183: 259-71).

Det har vært foreslått at angiogene hemmere kan være effektive i behandling 30 av sykdommer. For eksempel kan interferens med angiogenese begrense vekst av svulster. En rekke metoder for å hemme angiogenese er blitt foreslått, deriblant (1) hemming av frisetting av angiogene faktorer, (2) nøytralisering av angiogene faktorer ved hjelp av midler slik som monoklonale antistoff, og (3) hemming av endotelcelle-responser (Folkman, J., et al., 1992, *Seminars in Kreft Biology* 3: 89-96), ved å bruke

anti-angiogene faktorer, molekyler som man vet hemmer angiogenese. En rekke slike endotelcellehemmere er blitt beskrevet, for eksempel kollagenaseinhibitor, basalmembran turnover inhibitorer, angiostatisk steroider, soppavledete inhibitorer, blodplatefaktor 4, trombospodin, medikamenter mot leddbetennelse slik som penicillamin, og alfa-interferon blant mange andre (se Folkman, J., et al, 1992, *Seminars in Kreft Biology* 3: 89-96, eksempler gis i: Stepien, H., et al., 1996, "Inhibitory effects of fumagillin and its analogue TNP-470 on the function, morphology, and angiogenesis of an oestrogen-induced prolactinoma in Fischer 344 rats," *J. Endocrinol.* 150: 99-106, Maione, T. E, et al., 1990, "Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides," *Science* 247: 77-9).

Begrepet "endotelceller" betyr de celler som laver endotele, det vil si monolaget av enkle flate celler som dekker den indre overflate i sirkulasjonssystemet. Disse celler bevarer en evne til celledeling, selv om de prolifererer meget langsomt i normale forhold, og gjennomgår celledeling kanskje bare en gang i året. Prolifilasjon av endotelceller kan demonstreres ved å bruk [<sup>3</sup>H] tymidin for å merke celler i S-fasen. I normale blodårer er delen av endotelceller som blir merket, spesielt høy ved arterienes delingspunkt, der turbulens og slitasje synes å stimulere turnover. (Gross, R. J., 1978, *The Physiology of Growth*, Academic Press, New York, s. 120-137). Normale endotelceller er hvilende, de deler seg ikke, og som sådan er de mulige å skille fra angiogene endotelceller, som beskrevet nedenfor.

Endotelceller har også evnen til å bevege seg, en prosess som er viktig i angiogenese. Endotelceller danner nye kapillærer *in vivo* der det er behov for dem, slik som under sårreparasjon eller når det er et antatt behov for dem i svulstformasjon. Dannelsen av nye blodårer blir kaldt angiogenese, og inkluderer molekyler (angiogene faktorer) som kan være mitogene eller virke som kjemoattraktanter for endotelceller (Klagsburn, *supra*). Under angiogenese kan endotelceller vandre ut fra en eksisterende kapillær for å begynne dannelsen av en ny blodåre, det vil si at cellene i en blodåre danner seg på en måte som tillater ekstensjon av den blodåren (Speidel, D. D., *Am. J. Anat.* 52: 1-79). In vitro studier har dokumentert både proliferasjon og bevegelse av endotelceller, endotelceller som er i kultur, kan proliferere og spontant utvikle kapillærrør (Folkman, J., og Haudenschild, C., 1980, *Nature* 288: 551-56).

Begrepene "angiogene endotelceller" og "endotelceller som gjennomgår angiogenese" og lignende blir benyttet om hverandre her med betydningen endotelceller (som definert over) som gjennomgår angiogenese (som definert over). Således er angiogene endotelceller endotelceller som prolifilerer med en hastighet som er

5 vesentlig større enn den normale situasjon der celledeling foregår omtrent en gang i året. Differensieringshastigheten fra normal proliferasjon av endotelceller kan være 2x, 5x eller 10x eller mer enn det sammenlignet med normal proliferasjon, og kan i stor grad variere avhengig av faktorer slik som alder og tilstand til pasienten, hvilken type tumor som er innblandet, type sår, osv. Gitt at forskjellen i proliferasjonsgrad

10 mellom normale endotelceller og angiogene endotelceller kan måles, og vurderes som biologisk signifikant, kan de to typer celler blir differensiert ved hjelp av den foreliggende oppfinnelse, det vil si angiogene endotelceller som kan skilles fra tilsvarende, normale og hvilende endotelceller ved hjelp av at de har preferensiell binding av kationiske liposomer.

15 Begrepet "korresponderende endotelceller", "normale eller hvilende endotelceller" og lignende blir benyttet for å henvise til normale, hvilende endotelceller som finnes i den samme type vev (under normale betingelser) når noen av endotelcellene gjennomgår angiogenese og noen av endotelcellene er hvilende. I sammenheng med den foreliggende oppfinnelse blir angiogene endotelceller fortrinnsvis oppsøkt,

20 og blir oppsøkt med en preferanse som er fem-ganger, fortrinnsvis ti-ganger større enn merkingen av tilsvarende hvilende endotelceller.

Begrepet "lipid" blir benyttet på den vanlige måte som et generisk ord som omfatter fett, lipider, alkohol-eter-løselige bestanddeler av protoplasma, som er uløselige i vann. Lipider omfatter fett, fettoljer, essensielle oljer, voks, steroider,

25 steroler, fosfolipider, glycilipider, sulfolipider, aminolipider, kkromolipider (lipokromer) og fettsyrer. Begrepet omfatter både naturlig forekommende og syntetisk produserte lipider. Foretrukne lipider i relasjon til den foreliggende oppfinnelse er: fosfolipider, deriblant fosfatidylcholiner og fosfatidyletanolaminer, og sfingomyeliner. Der det er fettsyrer, kan disse være 12-24 karbonatomer i lengde, med opp til 6 umettete

30 (dobbelbindinger), og koblet til bakbonet ved enten acyl eller eter bindinger. Når det er mer enn en fettsyre koblet til bakbenet, kan fettsyrene være ulike (asymmetriske), eller det kan være bare 1 fettsyrekjede til stede, f.eks. lycolecitiner. Blandete formuleringer er også mulig, spesielt når de ikke-kationiske lipider avledes fra naturlige kilder, slik som lecitiner (fosfatidylcholiner) rensset fra eggeplomme,

kalvehjerte, hjerne eller lever, eller soyabønner. Steroider og steroler, spesielt kolesterol, og steroler substituert ved 3b-posisjonen.

Begrepet "kationisk lipid" blir benyttet her for å omfatte ethvert lipid fra oppfinnelsen (som definert over) som er kationisk. Lipidet vil bli bestemt som kationisk når lipidet har en positiv ladning (ved fysiologisk pH), målt med instrumenter benyttet ved målingstidspunktet. Når det er fettsyrer til stede på det kationiske lipid, kan de være 12-24 karbonatomer i lengde, og inneholde opptil 6 umettete (dobbelt-bindinger), og koblet til bakbenet enten ved acyl eller eterbindinger, det kan også være bare en fettsyrekjede koblet til bakbenet. Når det er mer enn en fettsyre koblet til bakbenet, kan fettsyrene være ulike (asymmetriske). Blandete formuleringer er også mulige.

Begrepet "liposom" omfatter ethvert hulrom som er omgitt av et lipidbilag. Liposomer blir også beskrevet som lipidblærer. For å kunne danne et liposom, omfatter lipidmolekylene forlengte ikke-polare (hydrofobe) deler og polare (hydrofile) deler. De hydrofobe og hydrofile deler av molekylet er fortrinnsvis plassert på de to ender av en avlang molekylær struktur. Når slike lipider blir finfordelt i vann, danner de spontant membraner som refereres til som lameller. Lamellene består av to lag som hver består av et lag med lipidmolekyler med deres ikke-polare (hydrofobe) overflater rettet mot hverandre og deres polare (hydrofile) overflater rettet ut mot det vandige medium. Membranene som dannes av lipidene omfatter en del av den vandige fase på en måte som ligner den som en cellemembran har når den omfatter en celledel. Således har bilaget til et liposom likheter med en cellemembran uten at proteinkomponentene som er til stede i cellemembranen, er til stede. Som benyttet i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse, inkluderer begrepet liposom multilamellære liposomer, som vanligvis har en diameter i området 1 til 10 mikrometer, og består av fra to til hundre av konsentriske lipidbilag som alternerer med et lag med vandig fase, og også inkluderer unilamellære blærer som består av et enkelt lipidlag og vanligvis har en diameter på 20 til 100 nanometer, disse blærer kan produseres ved å utsette multilamellære liposomer for ultralyd.

Foretrukne liposomer ville være små unilamellære blærer (SUVs) som har et enkelt lipidbilag, med en diameter i området 25-200 nm.

Foretrukne polyunukleotid (som inkluderer DNA, RNA og syntetiske polynukleotidanaloger) liposomkomplekser ville bli fremstilt fra de foretrukne liposomer. Kompleksene ville bli fremstilt slik at 1 µg polynukleotid er til stede for hver 1-50 nmol

kationisk lipid. Når ekspresjon fra en DNA genekassett er det ønskete sluttprodukt, blir den optimale ratio pulynukleotid til kationisk lipid bestemt empirisk, ved å fremstille en serie med formuleringer der en standard mengde DNS blir blandet med ulike mengder kationisk liposom innenfor området som er beskrevet over. Disse  
 5 formuleringer blir deretter tilført *in vivo*, og formulering som gir den høyeste ekspresjon kan bestemmes.

Kationiske liposomer kan funksjonelt bli definert som å ha et zeta potensial på større enn 0 mV.

Begrepet "kationisk liposom" som benyttet her, ønskes å omfatte ethvert  
 10 liposom som definert over, som er kationisk. Liposomet blir bestemt å være kationisk når det er til stede i fysiologisk pH. Det må noteres at liposomet selv er enheten som blir bestemt som kationisk, noe som betyr at liposomet som har en målbar positiv ladning innenfor det fysiologiske pH, kan i et *in vivo* miljø, bli bundet til andre substanser. Disse andre substanser kan være negativt ladet og derved føre til  
 15 dannelsen av en struktur som ikke har en positiv ladning. Ladning og/eller struktur til et av den foreliggende oppfinnelses liposom i et *in vivo* miljø er ikke blitt bestemt presist. Imidlertid vil, i overensstemmelse med oppfinnelsen, et kationisk liposom fra oppfinnelsen bli produsert ved å bruke minst noen lipider som selv er kationiske. Liposomet behøver ikke å bestå bare av kationiske lipider, men må inneholde en  
 20 tilstrekkelig mengde med kationiske lipider slik at liposomet initialt har en positiv ladning når det dannes å bli plassert i et *in vivo* miljø ved fysiologisk pH.

Begrepet "nukleotid sekvens/kationisk lipid kompleks" henviser til en kombinasjon av en nukleotid sekvens som kan være en RNA eller en DNA sekvens som er kombinert med i det minste kationiske lipider som definert over og som kan  
 25 inkludere nøytrale lipider. Når DNA sekvenser og kationiske lipider blir kombinert, vil de spontant danne komplekser som ikke er klassiske liposomer. Den foreliggende oppfinnelse er spesifikt rettet mot dannelsen av spesifikke nukleotidsekvens/kationisk lipidkomplekser, der nukleotidsekvensen spesifikt er lavet for å affisere angiogene endotelceller. For eksempel kan den nukleotidsekvensen kode for et protein som  
 30 dreper angiogene endotelceller. Sekvensen er fortrinnsvis operativt koblet til en promotor som selektivt blir aktivert bare i miljøet til en angiogen endotelcelle, det vil si ikke-aktivert i en tilsvarende hvilende endotelcelle. Videre kan komplekset inkludere en sekvens som er en antisens sekvens som blokker ekspresjon av genetisk materiale i en angiogen endotelcelle, og derved gi alvorlig ødeleggelse av

operasjon til og/eller dreper den angiogene endotelcelle. DNA kan være plasmid eller lineært. Når et genprodukt blir ønsket (enten et RNA transkript i seg selv, eller translatert til et protein), er en ekspresjonskassett nødvendig, som består av en DNA promoter sekvens, og en DNA sekvens som koder for et genprodukt. Nukleotider med andre bindinger enn fosfodiester blir spesielt benyttet i antisensesteknologi.

Begrepet "assosierer med" henspiller på virkningen til kationiske liposomer fra oppfinnelsen som forbli i tilstrekkelig nærhet til angiogene endotelceller i tilstrekkelig lange tidsperioder slik at liposomet og/eller dets innhold går inn i endotelcellen.

Liposomene fra oppfinnelsen kan assosiere med angiogene endotelceller under en rekke betingelser, men assosierer mest fordelaktig med den angiogene endotelcelle under *in vivo* betingelser. Således kan liposomet modifiseres ved binding, kobling eller assosiasjon med andre molekyler eller materialer som er til stede i blodstrømmen før assosiasjon med den angiogene endotelcelle. En rekke krefter kan være ansvarlige for assosiering av liposomer med angiogene endotelceller, slik som de ikke-spesifikke interaksjoner som forekommer mellom alle typer ikke-relaterte molekyler, det vil si andre makromolekyler slik som human serum albumin og human transferin. Disse intermolekylære krefter kan klassifiseres i fire grupper som er (1) elektrostatiske, (2) hydrogenbinding, (3) hydrofobe og (4) Van der Waals-krefter. Elektrostatiske krefter forårsakes av attraksjon mellom motsatt ladete ionegrupper, slik som mellom motsatt ladete grupper på et kationisk liposom og grupper til stede på eller i den angiogene endotelcelle. Attraksjonskraften ( $F$ ) er inverst proporsjonal med kvadrat av avstand ( $d$ ) mellom ladningene. Hydrogen bindingskrefter blir dannet ved formasjon av reversible hydrogenbroer mellom hydrofibre grupper.

Oppfinnelsens liposomer kan inkludere hydrofile grupper slik som  $\text{-COOH}$  og lignende grupper kan være til stede på overflaten av endotelceller som for eksempel gruppene  $\text{-OH}$ ,  $\text{-NH}_2$ . Disse krefter er for en stor grad avhengig av tett nærhet mellom to molekyler som bærer disse grupper. Hydrofobe krefter opererer på samme måte som oljedråper i vann i å smelte sammen for å danne en stor dråpe. Således vil ikke-polare hydrofobe grupper slik som de som er til stede i oppfinnelsens liposomer, tendere til å assosiere i et vandig miljø, og kan ha tendens til å assosiere med hydrofobe grupper på overflaten av endotelcellen. Til sist er Van der Waals krefter produsert mellom molekyler som avhenger av interaksjoner mellom de ytre elektronskyer.

Begrepet "selektivt assosierer" og "selektivt målsøker" og lignende blir benyttet her for å beskrive en egenskap til oppfinnelsens kationiske liposomer som fører til at de kationiske liposomer assosierer med angiogene endotelceller i en større grad enn de kationiske liposomer assosierer med de tilsvarende enmal  
 5 endotelceller som ikke er involvert i angiogenese. I overensstemmelse med oppfinnelsen betyr selektiv eller fortrinnsvis assosiasjon at liposomet vil assosiere fem-ganger eller mer med endotelcellene som gjennomgår angiogenese, sammenlignet med de tilsvarende normale endotelceller som ikke gjennomgår angiogenese. Mer fordelaktig indikerer fortrinnsvis eller selektiv assosiasjon en ti-  
 10 ganger eller større selektivitet mellom angiogene endotelceller og tilsvarende normale endotelceller.

Begrepet "kreft" henviser på en sykdom som er karakterisert ved inadekvat celleproliferasjon. Denne forstyrrelse er klinisk mest tydelig når volumet av tumorvev hindrer funksjon av vitale organer. Begrepet som beskriver normal vevsvekst, kan  
 15 appliseres til ondartet vev siden normale og ondartete vev kan dele lignende vevs-karakteristika, både på enkelcellenivå og på vevsnivå. Kreft er like mye en sykdom av forstyrret vevsvekstregulering som ved forstyrret regulering av cellevekst. Fordoblingstid dreier seg om tiden som er krevet for et vev eller en tumor for å doble celleantall eller størrelse. Fordoblingstiden til en klinisk tydelig tumor er vanligvis  
 20 betydelig lenger enn cellyklusstiden til cellene som utgjør tumor. Imidlertid har, i motsetning til en tumor, den normale lever, hjerte eller lunge i en voksen person ikke en fordoblingstid, siden organet er i en stabil tilstand slik at celleproduksjon og celledød hastighet er like (Stockdale, F., 1996, "Kreft growth and chemotherapy," i: *Scientific American Medicine*, vol. 3, Scientific American Press, New York, s. 12-18).  
 25 Vekstkarakteristika til tumorer er slike at produksjon av nye celler overstiger celledød, en neoplastisk endring har tendens i å gi en økning i delen av stamceller som gjennomgår celledødsfornyelse, og en tilsvarende nedgang i delen som går til modning (McCulloch, E. A., et al., 1982, "The contribution of blast cell properties to outcome variation in acute myeloblastic leukemia (AML), *Blood*, 59: 601-608. I hver  
 30 tumorpopulasjon eksisterer en fordoblingstid, og en spesifikk vekstkurve kan bli etablert (Stockdale, F., *supra*). Vekstmønster i tumorer kan bli beskrevet ved hjelp av en gomperzian-kurve (Steel, G. G, 1977, *Growth kinetics of tumors*, Osford University Press, Inc., New York, s. 40), noe som indikerer at veksthastigheten under

utvikling av en tumor initial er meget rask, og deretter progressivt synker etterhvert som størrelsen øker.

#### Generelle aspekter av oppfinnelsen

5 De vedlagte figurer gir en klar visuell fremstilling av den meget selektive måte hvorpå de kationiske liposomer fra oppfinnelsen oppsøker angiogene endotelceller. En grunnleggende utførelse av oppfinnelsen inkluderer en fremgangsmåte for selektive å affisere angiogene endotelceller ved å tilføre (fortrinnsvis med injeksjon i blodårer, mer fortrinnsvis intraarteriell injeksjon) en formulering som omfatter en  
10 farmasøytisk akseptabel bærer, og kationiske liposomer som inneholder en substans eller DNA/kationiske komplekser. Substansen kan være en forbindelse som hemmer angiogenese, en forbindelse som fremmer angiogenese og/eller en påvisbar merking. De kationiske liposomer i den injiserte formulering blir deretter tillatt å gå inn i angiogene endotelceller (ved hjelp av endocytose) som dekker veggene i den  
15 angiogene blodåre. De kationiske liposomer assosierer med de angiogene endotelceller i en tilstrekkelig periode, og på en slik måte at liposomene selv og/eller inneholdet av liposomene går inn i den angiogene endotelcelle. Deretter kan forbindelsen som går inn i cellen, hemme eller fremme angiogenese, eller bare gi en merking som tillater påvisning av angiogeneområdet. Selektiviteten av oppsøkingen  
20 av angiogene endotelceller kan bli best forstått ved henvisning til de vedlagte figurer.

Figur 1 viser en del av en eggstokk fra mus som har en stor rund follikkel (gul-farvet), plassert på denne. Siden angiogenese foregår i en normal museeggstokk, vil kationiske liposomer som inneholder en påvisbar merking, assosiere med angiogene endotelceller i de voksende blodårer i follikkelen (rød-oransje). Imidlertid er det i figur  
25 1 ikke mulig å tydelig bestemme at merket bare assosieres med angiogene endotelceller, eller om det også er assosiert med alle vev i eggstokken og follikkelen.

Figur 2 er et fluorescens mikroskopbilde som viser et snitt fra en bukspytt-kjerteltumor fra en mus som hadde fått intravenøs injeksjon av kationiske liposomer (rød-oransje) fra oppfinnelsen som inneholdt en påvisbar merking. Angiogenese  
30 foregår ofte i tumorer. Dette foto gir således en viss indikasjon på at de kationiske liposomer (rød-oransje) fra oppfinnelsen assosierte spesifikt med angiogene endotelceller (grønne). Imidlertid viser disse resultater ikke dramatisk noen spesifisitet i oppfinnelsen.

En sammenligning med figurene 3 og 4 viser oppfinnelsen evne til å lokalisere et angiogeneseområde. Figur 3 er et foto som viser blodårer i normal bukspyttkjertel-vev hos en mus. Det er mye mindre merking av de normale endotelceller av tilsvarende angiogene endotelceller. Dette er klart vist ved å sammenligne figur 3 med figur 4 som er et foto fra en bukspyttkjerteltumor i en mus. Figur 4 viser klart en høy grad av oppsamling av merking (gul-oransje) som er inneholdt i de kationiske liposomer i området for svulsten. Den dramatiske forskjell mellom figurene 3 og 4 indikerer den foreliggende oppfinnelses nytteverdi i evnen til klart og tydelig å markere svulstområdet. Imidlertid er det, siden så mye av merkingen blir assosiert med de angiogene blodårene i figur 4, muligens ikke lett å oppfatte spesifisiteten til kationiske liposomer i preferensielt å merke angiogene endotelceller.

Figur 5 er et foto av blodårer (grønne) i en normal mus-bukspyttkjerteløy. Den begrensede mengde med rød-oransje farve indikerer den begrensede assosiasjon av kationiske liposomer med normale endotelceller som dekker blodårene i bukspyttkjertelvevet.

Spesifisiteten til de kationiske liposomer som inneholder en påvisbar merking, blir vist mer klart ved å sammenligne figur 5 med figur 6. Figur 6 viser klart en mye høyere grad av oppsamling av merkingen i endotelcellene til de angiogene blodårene i svulsten i musens bukspyttkjertel.

Den presise evne de kationiske liposomer har i å målsøke angiogene endotelceller, blir vist dramatisk i figurene 7 og 8. Figur 7 viser klart at det fluoriserende merke blir assosiert eksklusivt med blodårer, det vil si merkingen lekker ikke og transporteres ikke inn i de omgivende vev. Spesifisiteten blir mest dramatisk vist i figur 8 som klart fokuserer på merkete kationiske liposomer som påvises inne i angiogene endotelceller, noe som viser at merkingen er spesifikk i disse celler og ikke lekker ut eller transporteres inn i det omgivende vev.

Figurene 9 og 10 viser den samme effekt som beskrevet over, men med en annen angiogenesemodell. Figurene 1 til og med 8 ble alle tatt fra enten normalt eller kreftvev. Figurene 9 og 10 viser henholdsvis normalt og betent vev i luftrøret hos en mus. Mer spesifikt viser figur 9 de normale blodårene i luftrøret, det vil si en patogenfri musetrakea. Figur 10 viser blodårene til trakea med infeksjonsindusert angiogenese. Den høyere konstellasjon av den påvisbare merking i figur 10 er tydelig, noe som indikerer at de kationiske liposomer fra oppfinnelsen har selektivt

assosiert med angiogene endotelceller - spesifikt assosiert med endotelceller i trakea som er blitt induert til angiogenese ved en infeksjon.

Figur 11 er en kurve som viser forskjellen i spesifisitet til de kationiske liposomer mellom deres evne til å assosiere med angiogene endotelceller og tilsvarende normale endotelceller som ikke gjennomgår angiogenese. Som vist i figur 11, har de kationiske liposomer fra oppfinnelsen (i dette eksperiment) vist en omtrent 10x høyere affinitet for angiogene endotelceller, sammenlignet med tilsvarende endotelceller som ikke gjennomgår angiogenese.

Til sist viser figurene 12 og 13 hvordan oppfinnelsens kationiske liposomer kommer inn i angiogene endotelceller. I figur 12 har kationiske liposomer fått kontakt med overflaten av den angiogene endotelcelle. I figur 13 er kationiske liposomer kommet inn i den angiogene endotelcelle ved endocytose og er til stede inne i cellen.

Etter å ha beskrevet i ord og vist via figurene at oppfinnelsens kationisk liposomer er spesifikke, vil de som er øvet i faget være i stand til å produsere en rekke ulike kationiske liposomer som inneholder en rekke ulike substanser, for å bruke oppfinnelsen. For å være komplett er imidlertid det følgende en beskrivelse av kationiske liposomer og fremgangsmåtene for deres produksjon, etterfulgt av en beskrivelse av substanser som enten hemmer eller fremmer angiogenese.

## Liposomer

Liposomer kan lett dannes ved å plassere lipider (som definert over) som vil inneholde kationiske lipider (som definert over) i en vandig løsning og deretter riste løsningen i en tidsperiode mellom noen sekunder og opptil timer. Den enkle prosedyre vil spontant gi store, multilamellære liposomer eller blærer med diameter i området 1 til 10 mikrometer. Disse liposomer består av to til flere hundre konsentriske lipide bilag som kan alternere med lag av vannfase, som lipidene var til stede i. En substans slik som en forbindelse som hemmer angiogenese, fremmer angiogenese eller gir en påvisbar merking, kan inkluderes i vannfasen. Substansen er fortrinnsvis løselig i vann, eller kan i det minste lett blir dispersert i vann.

Tykkelsen til det vandige lag og således den totale mengde av vandig fase som er fanget i liposomet, avhenger av balansen mellom elektrostatiske frastøtende krefter mellom ladete lipider og Van der Waals tiltrekkende krefter mellom bilagene som en helhet. Således øker det vandige volum (og således volumet av material fanget i vannfasen) med økende proporsjon av ladete lipider i membranen og med

synkende konsentrasjon av elektrolytter (ladete ioner) i vannfasen. De små liposomer eller blærer som dannes, er unilamellære og har en størrelse i området 20 til 100 nanometer og kan produseres ved å utsette multilamellære blærer til ultralyd. Store unilamellære liposomer med en størrelse i område omtrent 0,1 til 1 µm i diameter, kan fremskaffes når lipidet blir oppløst i en organisk løsning eller i en detergent, og det oppløste middel blir fjernet ved henholdsvis fordamping eller dialyse. Fusjon av mindre unilamellære liposomer ved fremgangsmåter som krever spesielle lipider eller stringente dehydrerings-hydreringsbetingelser kan fremskaffe unilamellære blærer som er like store eller større enn celler.

For å danne kationiske liposomer fra oppfinnelsen, er det nødvendig at liposomene blir produsert med bruk av i det minste noe kationisk lipid. Imidlertid behøver ikke oppfinnelsens kationiske liposomer bestå bare av kationiske lipider. For eksempel vil bruk av omtrent 45% nøytrale lipider og 55% kationiske lipider gi kationiske lipider som er hensiktsmessige i sammenheng med oppfinnelsen, og fortrinnsvis vil målsøke angiogene endotelceller.

Tilsetning til kationiske liposomer av en substans som affiserer angiogenese og/eller en merking, består av liposomfremstilling der liposomene blir fremstilt ifølge standard teknologi der for eksempel løsninger av 1-[2-(9(X)-oktadecenouloksy)etyl]-2-(8(Z)-heptadecenyl)3-(2-hydroksyetyl) imidazoliumklorid (DOTAP), kolestereol og Texas Rødt DHPE blir blandet, fordampet til tørrhet, og lipidfilmen deretter blir rehydrert i 5% dekstrose for å gi multilamellære blærer. Disse blærer blir presset gjennom polykarbonatmembranfiltere for å gi unilamellære blærer. Liposomer og substansen som skal bli inkludert, for eksempel plasmid DNA, blir blandet sammen i en spesifikk ratio i en 5% dekstroseløsning eller i andre fysiologisk akseptable løsninger. Hensiktsmessige kationiske lipider inkluderer: DDAB, dimetyldioktadecyl ammoniumbromid [tilgjengelig fra Avanti Polar Lipids og Sigma Chemical Company], 1,2-diacyl-3-dimetylammonium-propaner (som inkluderer men ikke er begrenset til dioleoyl (DOTAP), dimyristoyl, dipalmitoyl, diseaoyl) [disse er alle tilgjengelige fra Avanti Polar Lipids] 1,2-diacyl-3-dimetylammonium-propaner (noe som inkluderer men ikke er begrenset til dioleoyl, dimyristoyl, dipalmitoyl, diseaoyl) [disse er alle tilgjengelige fra Avanti Polar Lipids] DOTMA, N-[1-[2,3-bis(oleolyloksy)]propyl]-N,N,N-trimetylammoniumklorid, DOGS, dioktadekylamidoglycylsperimin [tilgjengelig fra Promega Corporation] DC-kolesterol, 3b-[N-N',N'-dimetylaminoetan)karbamoyl] kolesterol DOSPA, 2,3-dioleoyloksy-N-(2-(sperminkarboksamido)-etyl)-N,N-dimetyl-

1-propanaminium trifluoracetat, 1,2-diacyl-sn-glycero-3-etylfosfokoliner (inkluderende, men ikke begrenset til dioleoyl (DOEPC), dilauroyl, dimyristoyl, dipalmitoyl, distearoyl, palmitoyl-oleoyl) [disse er alle tilgjengelige fra Avanti Polar Lipids], b-alanyl kolesterol, CTAB, cetyltrimetylammoniumbromid diC14-amidin, Nn-t-  
 5 butyl-N'-tetradecyl-3-tetracylamino-propioanmidin, 14Dea2, O,O'-ditetradekanoyl-N-(trimetylammonioacetyl) dietanolaminklorid, (N,N,N',N'-tetrametyl-N,N'-bis(2-hydroksyetyl)-2,3-dioleoyloksy-1,4-butandiammoniumiodid [tilgjengelig fra Promega Corporation] 1-[2-acyloksy)etyl]2-alkyl (alkenyl)-3-(2-hydroksyetyl)imidazoliniumklorid-derivater slik som 1-[2-(9(Z)-oktadekenoyloksy(etyl)-  
 10 2-(8(Z)-heptadekenyl]-3-(2-hydroksyetyl) imidazoliniumklorid (DOTIM), 1-[2-(heksadekanouloksy)etyl]-2-pentadekyl-3-(2-hydroksyetyl)imidazoliniumklorid (DPTIM), 1-[2-tetradekanoyloksy)etyl]-2-tridekyl-3-(2-hydroksyetyl)imidazoliniumklorid (DMTIM) - disse 3 lipider er beskrevet i Solodin et al, Biochem 43, 135737-13544, 1995. Dette er fra Tim Heath's lab i Wisconsin, Megabios har fått patentene for noen  
 15 av hans lipidoppfinnelser.

2,3-dialkylloksypropylkvaternareammoniumforbindelsederivater, som inneholder en hydrokalkyldel på det kvaternære amin, slik som:  
 1,2-dioleoyl-3-dimetyl-hydroksyetyl ammoniumbromid (DORI),  
 1,2-dioleyloksypropyl-3-dimetyl-hydroksyetyl ammoniumbromid (DORIE),  
 20 1,2-dioleyloksypropyl-3-dimetyl-hydroksypropyl ammoniumbromid (DORIE-HP),  
 1,2-dioleyloksypropyl-3-dimetyl-hydroksybutyl ammoniumbromid (DORIE-HB),  
 1,2-dioleyloksypropyl-3-dimetyl-hydroksypentyl ammoniumbromid (DORIE-HPe),  
 1,2-dimyristyloksypropyl-3-dimetyl-hydroksyletyl ammoniumbromid (DMRIE),  
 1,2-dipalmityloksypropyl-3-dimetyl-hydroksyletyl ammoniumbromid (DPRIE),  
 25 1,2-disteryloksypropyl-3-dimetyl-hydroksyletyl ammoniumbromid (DSRIE) - disse lipider ble utviklet av Vical, Felgner, et al., J. Biol. Chem. 260, 2550-2561, 1994.

Kationiske liposomer blir fremstilt fra de kationiske lipidene selv, eller i blanding med andre lipider, spesielt nøytrale lipider slik som:

30 **Kolesterol**

1,2-diacyl-sn-glycero-3-fosfoetanolaminer (inkluderende, men ikke begrenset til dioleoyl (DOPE), en stor familie med derivater er tilgjengelige fra Avanti Polar Lipids),

1,2-diacyl-sn-glycero-3-fosfocholiner (en stor familie med derivater er tilgjengelige fra Avanti Polar Lipids),

NB Man kan inkludere at asymmetriske fettsyrer, både syntetiske og naturlige, og blandete formuleringer for de ovenfor beskrevne diacylderivater.

5 Liposomene av typen beskrevet over og av andre typer som vil være kjent for de som er øvet i faget, kan benyttes i den foreliggende oppfinnelse med liposomene som inneholder en substans som enten hemmer eller fremmer angiogenese og/eller inkluderer en påvisbar merking. Et eksempel på oppfinnelsens liposomer er kationiske liposomer som inneholder en lipidløselig eller vannløselig substans som  
10 hemmer angiogenese. Imidlertid kan lipidløselige forbindelser være i lipidbilaget. Det følgende gir en beskrivelse av angiogenesehemmere. Det må imidlertid bli notert at andre vil være kjent av de som er øvet i faget, og/eller vil bli utviklet etter den foreliggende oppfinnelse, og at slike inhibitorer av angiogenese også enkelt kan brukes i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse.

15

#### Midler som hemmer angiogenese

Heparin er en stimulator av angiogenese, og heparin antagonister kan blokke angiogene responser. Protamin, som er et heparinbindende protein, fremviser anti-angiogene egenskap. (Taylor, S. og Folkman, J., 1982, "Protamine is an inhibitor of  
20 angiogenesis," *Nature*, 297, 307), men kan ikke brukes klinisk siden det er kjent for å fremkalle anafylaktiske reaksjoner når det blir tilført til mennesker. Et annet anti-angiogent middel er det heparinbindende protein, Major Basic Protein, som også er meget toksisk og således ikke er praktisk i human bruk. Basert på den høye grad av oppsøkende selektivitet som oppnås med den foreliggende oppfinnelse, kan disse  
25 og andre forbindelser som hemmer angiogenese, men som man mener er for toksiske for å benyttes terapeutisk i mennesker, likevel være brukbare siden de kan brukes i meget små mengder.

Blodplatefaktor 4 (PF4) fremviser både heparinbindingsaktivitet og anti-angiogene egenskaper, og siden denne faktor ikke er så toksisk som de andre  
30 heparinantagonister, kan den være klinisk brukbar. Kjemiske modifikasjoner av PF4 som fremvist i US pat. 5,112,946, øker PF4's antiangiogene egenskaper. Disse modifikasjoner inkluderer produksjonen av PF4 analoger modifisert i deres fire aminogrupeer med fluorscein-isotiocyanat, PF4 mutanter med spesifikt endrete strukturelle sammensetninger av proteinet, og produksjon av PF4 fragmenter som

bevarer de anti-angeogene egenskaper. Spesielt har et syntetisk peptid på 13 aminosyrer som tilsvarer den karboksyterminale del av PF4, fremvist potent angio-statisk aktivitet.

En rekke stereoider er blitt funnet å hemme angiogenese. Denne anti-angiogene aktivitet blir potensiert ved tilsetning av heparin eller relaterte molekyler (Folkman, J., Weisz, P.B., et al., 1989, "Control of angiogenesis with syntetic heparin substitutes," *Science* 243, 1490-3). De såkalte "angiostatiskke steroider", slik som tetrahydrokortison, har evnen til å blokkere angiogenese *in vivo*. Spesifikt er 6 $\alpha$ -fluor-17,21-dihydroksy-16 $\beta$ -metyl-pregna-4,9-(11)-dien-3,20-dion blitt benyttet som et potent angeostatisk steroid.

Medikamenter som modulerer kollagen metabolisme, er blitt påvist å hemme angiogenese. Analoger av aminosyren prolin hemmer spesifikt kollagensyntese og hemmer angiogenese *in vivo*. Spesifikt har L-acetidin-2-karboksytsyre (LACA), *cis*-hydroksyprolin (CHP), D,L-3,4-dehydroprolin (DHP), og tioprolin (TP) hver anti-angiogenaktivitet i nedadgående rekkefølge (Ingber, D., og Folkman, J., 1988 "Inhibition of angiogenesis through modulation of collagen metabolism," 1988, *Lab. Invest.* 59, 44-51). Hver av disse analoger protensierer også de anti-angiogene effekter til angiostatiskke steroider og heparin.

Humant trombospondin, et glykoprotein som finnes i blodplaters alfa granula, hemmer angiogenese i trimere eller monomere eller fragmentformer, som fremvist i US pat. 5,192,744. Hver av dem fungerer i glykoselert form, og de forventes å virke i sine uglykosylerte former. De angiogenese-hemmende egenskaper er til stede etter at det heparinbindende domene fjernes, dette domene er assosiert med aminoenden og fjerning av blodplatebindingsdomenet som finnes på karboksylenden til det monomere protein.

Peptider som fremviser lamininaktivitet, blokkerer angiogenese og hindrer dannelse av overskudd av blodårer i vev. Spesifikke peptider med slik aktivitet er: 1) tyrosin-isoleucin-glycin-serin-arginin, 2) prolin-aspartin-serin-glycin-arginin, og 3) cystein-aspartat, prolin-glycin-tyrosin-isoleucin-glycin-serin-arginin. Disse peptider blir forventet å vedlikeholde deres anti-angiogene aktivitet i form av cykliske peptider.

Andre eksempler på angiogenese-hemmende substanser inkluderer ekstrakter fra bruskvev som viser kollagenaseaktivitet, protein avledet fra netthinnepigment endotelceller (Arch, Opfthamol, 103, 1870 (1985), anti-kreftfaktor induisert

fra dyrkede bruskceller (Takigawa, M. og Suzuki, F., 1988, "Establishment of clonal cell lines producing cartilage-derived anti-tumor factor (CATF), *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, 33, 1803-7), anti-inflammatoriske medikamenter slik som indometacin (Peterson, H. I., 1986, "Tumor angiogenesis inhibition by prostaglandin cythease inhibitors," *Antikreft Res.*, 6, 251-3), ribonuklease inhibitorer (Shapiro, R., og Vallee, B. L., 1987, "Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin," *PNAS* 84, 2238-41), komplekser av svovel polysakarid og peptidglykan (f.eks. JPA-S63(1988)-119500), gullpreparater for behandling av leddgikt, herimucin A (JPA-S63(1988)-295509) og fumagillin eller fumagillol derivater. En rekke fumagillol derivater har angiogenese-hemmende egenskaper, som henvist i US pat. 5,202,352. De ovenfor gitte referanser blir inkorporert som referanser for å beskrive og opplyse om angiogenese-hemmere.

#### Angiogene faktorer

En rekke biologiske forbindelser stimulerer angiogenese. Angiogenin er blitt vist å være en potent angiogen faktor i kylling CAM eller kanin hornhinne. Angiotrofin, en faktor som er isolert i perifere blodmonocyter, er en annen angiogen forbindelse som er blitt foreslått å spille en rolle i normal sårtilheling (*Biochemistry* 27, 6282 (1988)). Andre faktorer som medvirker i sårtilheling, slik som fibrin, induserer også vaskularisering.

En annen klasse av angiogenese-mediatorer er polypeptid angiogene faktorer, slik som vekstfaktorer, deriblant syre og basiske fibroblast vekstfaktorer (FGFs), transformerende vekstfaktor alfa (TFG- $\alpha$ ) og blodplate-derivert vekstfaktor (PDGF). Hver av disse molekyler er blitt vist å kunne indusere angiogenese *in vivo*. Andre lignende molekyler som viser angiogen aktivitet, er vaskulær endotel vekstfaktor (VEGF), tumor nekrosefaktor alfa (TFN- $\alpha$ ), transformerende vekstfaktor beta (TGF- $\beta$ ) og de heparinbindende vekstfaktorer (HBGFs).

Andre angiogene faktorer er blitt beskrevet i tillegg til de polypeptide angiogene faktorer. Prostaglandiner E<sub>1</sub> og E<sub>2</sub>, som er lipid-avledete angiogene faktorer, er velkjente betennelsescelletiltrekkere med angiogene egenskaper (*J. Natl. Kreft Inst.* 69, 475-482 (1982)). Nikotinamid gir også en angiogen respons når den

testes i kylling hornhinne eller i en kylling CAM analyse (*Science* 236, 843-845 (1987)).

#### Påvisbare merkinger

Oppfinnelsens kationiske liposomer kan benyttes for å levere påvisbare merkinger av enhver type. Merkene er enten løselige i lipidet som brukes for å lave liposomene, eller de er løselig, eller i det minste dispersgerbare, i vann eller en vandig løsning slik som i en vandig saltløsning eller vandig dekstroseløsning. Merkingen kan være en radioaktiv merking, fluorescerende merking, histokjemisk eller immunohistokjemisk påvisbare substanser, eller en påvisbar farge. Merket kan være til stede i en hvilken som helst passende mengde, og kan inkluderes i eller bli bundet med liposomet, enten ved seg selv eller sammen med en substans som hemmer eller fremmer angiogenese.

#### Dosering

Mengde av angiogen inhibitor eller simulator som tilføres til en pasient (som kan være hvilket som helst dyr med sirkulatorisk system med endotelceller som gjennomgår angiogenese), vil variere avhengig av en rekke faktorer. For eksempel vil det være nødvendig å tilføre betydelig større mengder til mennesker enn til mindre dyr. Mengde angiogen inhibitor eller stimulator vil avhenge av størrelse, alder, kjønn, vekt og tilstand hos pasienten, samt også potens til forbindelsen som blir tilført. Etter å ha opplyst at det er betydelig variasjon hva angår dosene, blir det antatt at de som er øvet i faget, kan, ved hjelp av den foreliggende beskrivelse, enkelt bestemme passende dosemengder ved først å tilføre svært små mengder og deretter gradvis øke dosen til de ønskete resultater blir oppnådd. Selv om dosemengden vil variere i betydelig grad basert på faktorer som beskrevet over, gjør rent generelt den foreliggende oppfinnelse det mulig å tilføre betydelig mindre mengder av enhver forbindelse, sammenlignet med leveringsystemer som målsøker de omliggende vev, f.eks. sikter mot tumorcellene selv.

#### Nukleotidsekvens/kationiske lipidkomplekser

Når nukleotidsekvenser som inkluderer DNA og RNA sekvenser blir kombinert med lipider, danner de to komplekser. Ved å velge de spesielle mengder av nukleotidsekvenser og lipider og ved å velge spesielle lipidtyper, er det mulig å

danne komplekser som ikke aggregerer sammen *in vitro*. Generell informasjon som dreier seg om dannelsen av slike komplekser, er beskrevet i PCT publikasjon WO 93/12240, publisert 24. juni 1993, som herved inkorporeres som referanse, for spesifikt å opplyse om og beskrive dannelsen av nekleotidsekvens/lipidkomplekser.

- 5 Hva angår den foreliggende oppfinnelse, er nekleotidsekvensene spesielt bygget opp for å affisere angiogene endotelceller, og ikke påvirke andre celler og spesifikt ikke påvirke andre tilsvarende endotelceller, det vil si hvilende endotelceller. DNA-sekvensene benyttet i samband med den foreliggende oppfinnelse er operativt koblet til promotere, og disse promotere er spesielt planlagt slik at ekspresjon av
- 10 nekleotidsekvensen blir oppnådd bare i en angiogen endotelcelle. For det første kan promoteren være en aktiverbar promoter som kan bli aktivert etter at sekvensen er blitt avlevert til en angiogen endotelcelle. Mer fordelaktig er promoteren planlagt slik at den blir aktivert i det spesielle miljø i en angiogen endotelcelle. Det er en rekke naturlig forekommende fenomener som forekommer i en angiogen endotelcelles
- 15 miljø, som ikke forekommer i tilsvarende miljø hos en hvilende endotelcelle. Ved å benytte forskjellen mellom disse to typer celler, kan promoteren spesifikt bli bygget opp slik at den blir aktivert bare når en angiogen endotelcelle er til stede.

Transkripsjon fra DNA-kassetter kan være begrenset til en enkel eller en begrenset mengde celletyper ved å bruke en spesifikk genpromoter. Endotelceller

20 uttrykker selektivt en rekke proteiner, hvor genene og deres promotere er blitt karakterisert. Genpromoteren for vaskulær endotel vekstfaktor (VEGF)-reseptorer flt-1 og flk-1, genpromoteren for von Willibrand faktor (VWF), og genpromoteren for "tie"-familien er blitt funnet å delegere selektiv ekspresjon i endotelceller når de er blitt koblet med reporter genkonstruksjoner. De følgende publikasjoner blir sitert for å

25 opplyse om og beskrive promotere som er aktivert i angiogene endotelceller.

Hatva, E., et al, 1996, "Flk-1- as a target for tumor growth inhibiton," Kreft Res. 56: 3540-5;

Strawn, L. M., et al., 1996, "Flk-1 as a target for tumor growth inhibition," Kreft Res. 56; 3450-5;

- 30 Millauer, B., et al., 1996, "Dominant-negative inhibiton of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo," Kreft Res. 56; 1615-20;

Sato, T. N., el al., 1996, "Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation," Nature 376: 70-4;

Ozaki, K., et al., 1996, "Use of von Willebrand factor promoter to transduce suicidal gene to human endothelial cells, HUVEC," Human Gene Therapy: 13 483-90;

5 Ronicke, V., et al., 1996, "Characterization of the endothelium-specific murine vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter," Circulation Res. 79: 277-85;

Shima, D. T., et al., 1996, "The mouse gene for vascular endothelial growth factor, Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences," J. Biol., Chem. 271: 10 3877-8;

Morishita, K., et al., 1995, "A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression," J. Biol. Chem. 270: 27948-53;

15 Patterson, C., et al., 1995, "Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor," J. Biol. Chem. 270: 23111-8;

Korhonen, J., et al., 1995, "Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo," Blood 86: 1828-35.

20 NB Ozaki referansen beskriver en annen effektiv tilnærming, der herpes simpleks-virus tymidin kinase (TK) blir uttrykket i endotelceller, med etterfølgende behandling med promedikamentet fra gancsiklovir.

Alternativt kan nukleotidsekvensen være en antisens sekvens, som vil binde seg til sekvenser som må bli uttrykket i en angiogen endotelcelle, noe som derved blokkerer ekspresjonen av naturlig forekommende sekvenser i en angiogen endotel-  
25 celle som er nødvendig for at den cellen skal overleve.

#### Dannelse av blodkoagel

Et annet aspekt ved oppfinnelsen som kan utføres ved å bruke liposomer eller nukleotidsekvens/lipidkomplekser, dreier seg om dannelsen av blodkoagel. Spesifikt  
30 består dette i at liposom eller komplekset ved oppfinnelsen blir konstruert slik at det har en effekt på angiogene endotelceller som resulterer i dannelsen av blodkoagler i de angiogene blodårer. Blodkoaglene hindrer tilførsel av næringsstoffer og oksygen til den gjenværende del av blodåren, noe som fører til at blodåren dør og derved avliver det omliggende vev.

Det grunnleggende eksperiment med å danne blodkoagler i tumorvaskulatur for å eliminere en uønsket tumor, er blitt utført med å bruke antistoff som er rettet mot tumorvaskulaturen. Den foreliggende oppfinnelse kunne oppnå forbedrete resultater ved å bruke kationiske lipider der lipidene inneholder et middel som fremmer de kaskadereaksjoner som fører til dannelse av blodpropper. For eksempel kunne kationiske liposomer fra oppfinnelsen bli konstruert slik at de omfattet human vevsfaktor (TF) som er den viktigste initierende reseptor for de trombotiske blodkoagulasjonskaskader.

Tumorceller er avhengig av blodtilførsel. Den lokale blokkade av tumorvaskulaturen vil føre til et skred av tumorcelledød. Det vaskulære endotel i tumoren er i direkte kontakt med blodet. Tumorceller selv er imidlertid på utsiden av blodstrømmen og generelt sett vanskelig tilgjengelig for mange materialer som blir injisert i blodsirkulasjonen. Dette aspekt, samt også andre aspekter av oppfinnelsen, fungerer spesielt godt i og med at cellene som blir målsøkt, er de angiogene endotelceller som selv ikke er transformert, det vil si er celler som ikke forventes å få mutasjoner som gjør dem resistente mot terapi. Tumorellene gjennomgår betydelige mutasjoner, og slike mutasjoner fører ofte til at cellene er resistente mot terapi. Resultatet med henblikk på å senke tumorstørrelse ved bruk av antistoffrettet målsøking er blitt beskrevet av andre som følger: Burrows, F. J., og P. E. Thorpe. Eradication of large tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature, *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8996-9000, 1993. Huang, X., G. Molema, S. King, L. Watkins, T. S. Endginton, og P. E. Thorpe, Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature, *Science* 275: 547-550, 1997.

For å få gjennomført dannelse av blodkoagler i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse, er det fordelaktig å danne et DNA/kationisk lipidkompleks. Komplekset vil inkludere DNA som koder for et protein slik som human vevsfaktor, et protein som er en viktig initierende reseptor for de trombotiske (blodlevrings) kaskader. Genet som koder for TF, er fortrinnsvis operativt koblet til en promoter som blir aktivert i miljøet til en angiogen endotelcelle, og ikke aktivert i miljøet til en hvilende endotelcelle. Således vil de kationiske lipider i komplekset forårsake at komplekset assosierer med angiogene endotelceller. Deretter vil komplekset bringes inn i de angiogene endotelceller, og DNA i komplekset vil bli uttrykket. Det uttrykkelige protein vil initiere blodkoagulasjonskaskaden. Når blodkoagler blir dannet

i blodåren, vil videre levering av oksygen og næring til de omgivende tumorceller være avsluttet. Deretter vil tumorcellene dø. Variasjoner av human vevsfaktor, slik som trunkert human vevsfaktor (tTF) kan også bli benyttet for å initiere koagulasjon. Genetisk materiale som koder for tTF og andre faktorer er kjent (se referanse av  
 5 Huang, et al og publikasjonene som er sitert der).

### Eksperimentelle modeller av angiogenese

Den foreliggende oppfinnelse ble forenklet ved bruk av gnagermodeller for angiogenese. Kronisk inflammatoriske sykdommer slik som astma og brokitt  
 10 induserer vevs- og vaskulær ommodellering i slimhinnen i luftveiene. For å lære om patogenesen av kronisk luftveisbetennelse, ble en modell benyttet der kronisk betennelse og vevsmodellering forekommer i trakea hos rotter og mus. Angiogenese utvikles i slimhinnen i luftveien som resultat av infeksjon med *Mycoplasma pulmonis*. I denne modell forårsaker *Mycoplasma pulmonis* organismer  
 15 en vedvarende infeksjon i epitelet i trakea og bronkier. Slimhinnen i luftveien hos rotter som er infisert med *M. pulmonis*, har en rekke spesifikke abnormaliteter; 1) fortykkelse av epitel og lamina propria, 2) endringer i den cellulære sammensetning av epitelet, 3) angiogenese, 4) øket sensitivitet av de angiogene blodårer overfor den inflammatoriske mediator substans P i relasjon av plasma, 5) substans P-indusert  
 20 lekkasje fra kapillærer og venyler, og 6) øket antall reseptorer for substans P (NK1 reseptorer) på kapillære endotelceller. I denne modell blir angiogenese fremdrevet av kronisk betennelse, og blodårene er mer følsomme for betennelsesmediatorer.

Studier som benytter perfusjon av lektiner for å farve innsiden av endotelcelle-overflaten, demonstrerte området for angiogenese hos rotter etter infeksjon med *M. pulmonis*. En rekke kapillærlignende årer er til stede i slimhinnen i trakea hos  
 25 infiserte rotter, og disse årer lekker etter at den inflammatoriske mediatorsubstans P blir injisert intravenøst.

Hos mus fremkaller *M. pulmonis* en akutt lungebetennelse som når sin topp 6-9 dager etter innokkulering, etterfulgt av vedvarende infeksjon av luftveiene.  
 30 Responsen hos mus overfor infeksjon med *M. pulmonis* er svært avhengig av musestammen: for eksempel viser C3H-stammer høyere mortalitet og større reduksjon av cytokinet tumornekrosefaktor- $\alpha$  enn C57BL-stammene gjør. Noen aspekter av ommodellering av slimhinnen, slik som hyperplasi av epitel er blitt beskrevet i luft-

veiene hos mus som er infisert med *M. pulmonis*. Hos C57BL/6-mus som er infisert via nasal innokkulering av *M. pulmonis*, øker antall blodårer i trakea dramatisk, tydeligvis via vekst av nye kapillærer. I denne stamme er trakeas slimhinnevaskulatur ikke lenger planar, og små blodårer vokser vertikalt på slimhinneplanet. En rekke

5 antatte vaskulære utskudd finnes i regioner med øket vaskularitet. Således produserer infeksjon av C57BL/6-mus med *M. pulmonis* en kronisk luftveisbetennelse med proliferering av endotel, vaskulær ommodellering, og angiogenese. I motsetning gir nasal innokulasjon av *M. pulmonis* hos C3H/HeNCr-mus at antallet vaskulære endotelceller i trakeas slimhinne øker, men antall blodårer

10 blir uendret. Denne økete vaskularitet er ikke forårsaket av en økning i lengde eller antall blodårer, men av en økning av blodårediameter, og denne økning i blodårestørrelse er forårsaket av en fordobling av antall endotelceller. Størrelsen av de individuelle endotelceller i infiserte trakear øker ikke betydelig. Nivået av sirkulerende antistoff mot *M. pulmonis* er lik i de to musestammer. Således

15 produserer infeksjon av C3H/HeNCr-mus med *M. pulmonis* kronisk luftveisinfeksjon med vaskulær remodelering og endotelcelleproliferasjon, men ikke en signifikant økning i antall blodårer, mens det i C57BL/6-mus finnes endotel proliferasjon og nye blodårer.

I en annen modell oppstår angiogenese i tumorer som forårsaker av transgen

20 ekspresjon av det SV40 virale onkogen. Den "RIP-Tag" transgene musemodell gir muligheten for å studere de fenotypiske endringer i angiogene endotelceller i en vel karakterisert progresjon fra normalt vev til tumorer. I "RIP-Tag" transgene musemodeller er onkogenet fra SV-40 viruset, stort T antigen (Tag) drevet av en region av rottens insulinpromoter (RIP). Når dette blir ført inn i musens genom, induserer dette

25 konstrukt ekspresjon av Tag spesifikt i pankreatisk øyes  $\beta$ -celler, som i omtrent 400 øyer som er spredt gjennom bukspyttkjertelen. Alle øyer i bukspyttkjertelen til disse mus uttrykker Tag, imidlertid utvikles øyene normalt til omtrent 6 ukers alder. Etter dette tidspunkt blir omtrent 50% av øyene hyperplastiske. Imidlertid utvikler en liten del av disse hyperplastiske øyer (mindre enn 5%) særlig til svulster etter omtrent 10

30 uker. Denne flaskehals i tumordannelse synes å overvinnes når en øy oppnår evnen til å indusere angiogenese, derfor har denne tumorgenese-fasen fått benevnelsen "den angiogene bryter". En lignende angiogen bryter synes også å eksistere i andre modeller av tumordannelse hos mus, som og også i en rekke humane svulster.

Således gir RIP-Tag modellen et godt karakterisert grunnlag for å studere progresjon av angiogenese i svulster.

### Eksempler

5 De følgende eksempler blir beskrevet for å gi til de som har normal kompetanse i faget, en komplett angivelse og beskrivelse av hvordan kationiske liposomer laves, og hvordan metoden for å benytte slike liposomer skal utføres. Det er lagt vekt på å sikre nøyaktige opplysninger med henblikk på tall som er benyttet (f.eks. mengde, temperatur o.l.), men noen eksperimentelle feil og avvik må  
10 forventes. Om det ikke er angitt noe annet, er deler angitt som deler pr. vekt, molekylvekt er vekt av gjennomsnitt molekylvekt, temperatur er i Celsius-grader, og trykk er ved eller nær atmosfæretrykk. Det bør noteres at hvert av eksemplene beskrevet nedenfor representerer et antall eksperimenter som ble utført med prosedyrene og resultatene slått sammen. Det vil forstås av de som er øvet i faget,  
15 at ikke hvert eneste eksperiment skal gi positive resultater. Imidlertid tror vi at den følgende beskrivelse gir korrekt fremstilling av resultatene som ble oppnådd.

### Eksempel 1

#### Fordeling av kationiske lipider hos normale mus

20 Liposomer og/eller plasmid DNA ble merket og den cellulære fordeling av de merkete komplekser ble bestemt ved ulike tidspunkter etter intravenøs injeksjon. Eksperimentene ble utført på patogenfrie mus, (20-25 g kroppsvekt) av begge kjønn.

Kationiske små unilamellære blæreliposomer ble fremstilt fra de kationiske lipider DDAB eller DOTAP og nøytrale lipidet DOE eller kolesterol, merket med  
25 Texas Rødt eller den røde fluorescerende karbocyanin-farve DiL eller CM-Dil, og i noen tilfeller kompleksbundet til plasmid DNA som inneholdt et reportergen slik som lusiferase eller  $\beta$ -galaktosidase. Endotelceller ble merket ved bruk av det fluorescerende plantelectin fluorescein-*Lycopersicon esculentum*. Monocyt/makrofag ble merket ved hjelp av fluorescerende kuler (Duke, 500 nm).  
30 Cellekjerne ble merket med DAPI, YO-PRO, eller Hoechst 33342 farve.

Fluorescerende liposomer eller liposom-DNA komplekser som inneholdt 10-60  $\mu$ g DNA i opptil 300  $\mu$ l ble injisert i ikke-anestetiserte muse via halevenen. I noen eksperimenter ble 500 nm fluorescerende kuler injisert etter kompleksene. Fra

5 minutter til 24 timer etter dette ble dyrene bedøvet med natriumfenemal og deretter perfusert gjennom den venstre hjerteventrikkel med fikseringsmidlet (1% paraformaldehyd i fosfatbufret saltvann) etterfulgt av det fluorescerende lectin for å merke endoteloverflaten i blodårene. Etter perfusjonen ble vev fjernet og enten

5 montert hele eller skåret i snitt ved hjelp av en Vibratome eller en vevskutter. I tillegg ble noen prøver forberedt for elektronmikroskopisk analyse. Vevene ble undersøkt med epifluorescens mikroskopi eller med konfokal mikroskopi. I tillegg ble noen prøver studert med stransmisjonselektronmiskroskopi.

Resultater: Hos mus som ble undersøkt fra 5 minutter til 24 timer etter

10 injeksjonen var liposomer merket med CM-Dil eller Dil eller liposom-DNA komplekser høyest konsentrert i lungene. Videre var de mest tallrike i endotelceller i kapillærer i alveolene. Fluorescensen i alveolære kapillærer var uniformt fordelt i alle lunge-lappene i begge sider. I tillegg var noe CM-Dil eller Dil fluorescens i intravaskulære monocytt/makrofager.

15 Etter lungene hadde lever og milt den høyeste mengde med merkete liposomer eller komplekser. I disse organer lokaliserte CM-Dil eller Dil fluorescens sammen med de fluorescerende kuler. I leveren var fluorescens fra CM-Dil eller Dil og kuler i Kupffer-celler. I milten var de i makrofager.

Eggstokkene hadde også blodårer som var sterkt merket med CM-Dil eller Dil-

20 merkete liposomer eller komplekser. Spesifikt ble det funnet at endotelcellene i angiogene blodårer i store follikler og gule legemer hos eggstokk hos mus tok opp CM-Dil eller Dil-merkete DDAB:kolestrol(liposomer eller)-DNA komplekser med høy affinitet etter intravenøs injeksjon. Disse observasjoner ble dokumentert fotografisk (figur 1). Andre blodåret i eggstokkene inneholdt relativt få merkete

25 komplekser. Disse resultater ble benyttet for å avlede at angiogene endotelceller preferensielt tar opp liposomer og liposom-DNA komplekser, det vil si at de kationiske liposomer som ble benyttet i eksperimentene, hadde mye større sjanse for å assosiere med endotelceller som gjennomgikk angeogenese, sammenlignet med tilsvarende endotelceller som ikke gjennomgikk angeogenese.

30 Merkete liposomer eller komplekser var også svært hyppige i endotelceller i de høye endoteliale venyler (HEV) i lymfeknuter eller Peyerske flekker i tynntarmen, mens de var mer sjeldne i endotelceller i kapillærene til disse lymfoide organer. Merkete liposomer eller komplekser var også tallrike i kapillære endotelceller i den fremre hypofyselapp, i hjertemuskel, i mellomgulvet, binyrebark og fettvev.

Merkete liposomer eller komplekser var hyppige i monocyt/makrofager som var bundet til venyler i urinblæren, livmor og eggleder. Noen venyler inneholdt et stort antall av merket monocyt/makrofager. I tillegg var en liten del av endotelcellene i arterioler, kapillærer og venyler i disse organer også merket.

Relativt få merket liposomer eller komplekser var assosiert med kapillære endotelceller i den bakre hypofyselapp, nyremargen, tarmtotter (ileum), bukspyttkjertel og binyremarg. Nesten ingen merket liposomer eller komplekser ble funnet i endotelceller i hjernen, skjoldbruskkjertel, nyrebark, øyer i bukspyttkjertel, luftrør eller bronki, med unntak av tilfeldige monocyt/makrofage.

Konklusjoner: Formuleringen av DM-Dil eller Dil-merket DDAB:kolesterol liposomer eller liposom-DNA komplekser som ble benyttet i disse studier målsøkte tre hovedcelletyper: endotelceller, makrofager og monocytter. Opptak av liposomer eller komplekser var spesifikt for visse organer og året. De fleste ble tatt opp av kapillære endotelceller i lunge og makrofager i lever og milt. Kapillære endotelceller i eggstokken, fremre hypofyselapp, hjerte, mellomgulv, binyrebark og fettvev ble også målsøkt. Blodåret som tok opp liposomer eller komplekser i eggstokken, representerte angiogeneseområder. I tillegg ble HEV i lymfeknuter og tynntarm Peyerske flekker målsøkt. Målsøking av endotelceller eller makrofager i andre organer var mindre hyppig og mer varierende. Blodårer i hjernen, skjoldbruskkjertel, nyrebark, trakea og bronki ble ikke målsøkt.

I tillegg dokumenterte eksperimentene at liposomene eller kompleksene ikke lekket ut av vaskulaturet i de fleste organer. Selv om de ble funnet i ekstravaskulære celler i milten, som har blodårer som har endotel som ikke er kontinuerlige, gikk de ikke ut av årene i andre organer.

Til slutt indikerer effektive opptak av kationiske liposomer og liposom-DNA komplekser av blodårer i de store eggstokkfollikler og de gule legemer at endotelcellene i angiogene blodårer var områder med preferensielt opptak.

## Eksempel 2

Opptak av DDAB:kolesterol(liposom eller)-DNA komplekser i RIP-Tag5 mus

Resultatene av eksperimentene beskrevet i eksempel 1 antydte at angiogene blodårer i eggstokkfollikler og gule legemer effektivt tok opp kationiske liposomer og liposom-DNA komplekser. Således ble et eksperiment utført for å bestemme om

endotelceller i angiogene blodårer i svulster tok opp kationiske liposomer eller liposom-DNA komplekser effektivt.

Den transgene RIP-tag5 svulstmodell, som beskrevet i den eksperimentelle musemodellseksjonen, Hanahan, D. Heritable formation of pancreatic beta-cell  
 5 tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315: 115-22, 1985, Hanahan, D., og J. Folkman. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-64, 1996, ble benyttet. I denne modell som er benevnt RIP-Tag, blir onkogenet fra SV-40 viruset, stort T antigen (Tag) drevet av en region av rottens insulinpromoter (RIP).

10 Når dette blir innført i musens genom, induserer dette konstrukt ekspresjon av T-antigenet spesifikt i bukspyttkjertelens øyers  $\beta$ -celler.

En viktig egenskap ved denne modell er at ulike stadier av tumorutvikling, og derfor ulike stadier av angiogenese er til stede samtidig i hver RIP-Tag5 mus. Selv om alle de 300-400 øyer uttrykker T-antigenet, utviklet øyene seg normalt i  
 15 begynnelsen. Imidlertid er omtrent halvparten hyperplastiske etter 6 uker, og av disse utvikler en liten del seg til svulster ved 10 ukers alder. Tumorgenese synes å foregå samtidig med begynnelsen av angiogenese. Denne omdanning er blitt benevnt den "angiogene bryter" Folkman, J., K. Watson, D. Ingber, og D. Hanahan, Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia, *Nature* 339: 58-61, 1989, Hanahan D., og J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the  
 20 angiogenic switch during tumorigenesis *Cell* 86; 353-64, 1996. En lignende angiogen bryter synes å eksistere i andre musemodeller av tumordannelse samt også i flere humane tumorer, Hanahan, D., og J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell* 86: 353-64, 1996.

25 Metoder og materialer ble benyttet som i eksempel 1. Spesifikt ble CM-Dil eller Dil-merkete DDAB:kolesterol liposomer injisert intravenøst i en RIP-Tag5 mus med tumor, og DM-Dil eller Dii-merket DDAB:kolesterol-DNA komplekser ble injisert intravenøst i en annen RIP-Tag5 mus. Fordeling av liposomer eller komplekser i angiogene blodårer i bukspyttkjerteløycellesvulster ble undersøkt 24 timer etter  
 30 injeksjon, og ble sammenlignet med fordeling i blodårer i bukspyttkjerteløyer hos normale mus.

Resultater: To nye observasjoner ble gjort: 1) liposomene eller kompleksene ble tatt opp av endotelceller i angiogene blodårer uten å lekke ut av endotelet, og (2)

det endosomale opptak av liposomer eller komplekser var større i endotelceller i angiogene blodårer enn i endotelceller som var i normale blodårer i bukspyttkjerteløyer (figur 2 er fra en vevsprøve).

Konklusjoner: Dette eksperiment ga resultater som er i overensstemmelse med et foretrukket opptak av DDAB:kolesterol liposomer eller liposom-DNA komplekser av angiogene blodårer. Før eksperimentet ble repetert, ble (1) fluorescensintensiteten til liposom-DNA kompleksene øket, (2) fremgangsmåtene for å lokalisere opptaksområdene av kationiske liposomer og liposom-DNA komplekser i svulster hos RIP-Tag mus ble forbedret, og (3) mer kunnskap og struktur og funksjon av angiogene blodårer i bukspyttkjerteløyecellesvulster hos RIP-Tag5 mus ble oppnådd.

### Eksempel 3

#### Opptak av DOTAP:kolesterol-DNA komplekser i RIP-Tag2 mus

Formål: Fluorescensintensiteten av liposom-DNA kompleksene hadde blitt øket ved å bruke Texas Rød-DHPE i stedet for Dil, fremgangsmåten for å preparere bukspyttkjertelen til RIP-Tag2 mus for å lokalisere opptaksområder for de fluorescerende kationiske liposom-DNA komplekser ble forbedret, og strukturen og funksjonen av de angiogene blodårer i bukspyttkjertelens øyecelle svulster i RIP-Tag2 mus hadde blitt studert. Med disse forbedringer ble så eksperimenter av typen beskrevet i eksempel 2 utført for å bestemme hvorledes kationiske liposomer og lipid-DNA komplekser ble tatt opp.

Fremgangsmåter: Kationiske DOTAP:kolesterol små unilamellære blæreliposomer, merket med Texas Rød-DHPE, ble fremstilt. Liposom-DNA komplekser ble fremstilt i en total lipid:DNA ratio på 24:1 (nmol/μg) i 5% glukose, ved å bruke 60 μg plasmid DNA i 300 μl. Kompleksene (300 μl) ble injisert i halevenen og ikke-anesteserte transgene RIP1-Tag2 C57BL/6 mus og ikke-anesteserte normale C57BL/6 mus.

Fire timer etter injeksjonen av komplekser ble musene anestesert med intra-peritoneal injeksjon av Nembutal 50 mg/kg. Vaskulaturen ble fiksert med perfusjon av 1% paraformaldehyd gjennom den oppadgående aorta, og den indre overflate av blodårene ble farvet ved hjelp av perfusjon av grønt fluroescerende lectin, Thurston, G., P. Baluk, A. Hirata og D. M. McDonald, Permeability-unrelated changes revealed

at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding, *Am J Physiol* 271: H2547-2561, 1996. Hele vevsprøver eller vibratomsnitt ble montert i Vectashield, og blodårer ble undersøkt ved hjelp av Zeiss Axiophot fluorescens mikroskop eller a Zeiss LSM 410 konfokalt mikroskop utstyrt med en krypton-argon laser og optimali-  
 5 serte fotomultipliserende rør. Bilder ble tatt på Kodak Ektachrom film (ASA 400) eller som digitale konfokalbildefiler.

Resultater: Eksperimentet viste tydelig det aktive opptak av de Texas Rødt-merkete DOTAP:kolesterol-DNA komplekser inn i angiogene endotelceller i bukspyttkjertelsvulster i RIP1-Tag2 musene. Opptak av tumorårer oversteg betydelig opptak  
 10 av disse komplekser av de tilsvarende endotelceller i de normale bukspyttkjerteløyer (sammenlign figurene 3 og 4).

Tumorene ble lett skilt fra omgivende vev på grunn av deres kraftige merking av deres blodårer med de røde fluorescerende liposomkomplekser. Vaskulaturens geometri i tumorene var variabel, og rangerte fra mønstre som er typiske for  
 15 normale øyer til et tett, forvridt anastomoserende nettverk av sinusoidale årer som var tydelig større og mer tettpakket enn de i normale øyer. I det siste tilfellet lignet vaskulaturen på den i gule legemer i eggstokker. Merkinsintensiteten av årer i svulster var grovt sett relatert til størrelsen på svulsten. De største svulster hadde den mest utbredte merking.

Noen blodårer i små til gjennomsnitts store svulster hadde fokale og  
 20 aneurysme-lignende utvidelser. Disse områder var spesielt tydelige på grunn av tilstedeværelse av uvanlig mange flekker merket med Texas Rødt, som ble antatt å være endosomer. Texas Rød-merkingen av disse områdene var større enn i den som ble funnet i naboblodårer. Det syntes som om disse strukturer kunne være  
 25 kapillære utskudd. Strukturene ble ikke funnet i store svulster som hadde en tett og kompleks vaskulatur, der blodårene var merket uniformt og kraftig.

Det ble ikke funnet tegn på lekkasje av Texas Rødt-merkete komplekser i svulster. Det ble heller ikke funnet Texas Rødt-merkete komplekser i klumpene med ekstravaskulære røde blodlegemer i svulstene. Den kraftige merking av  
 30 tumorvaskulaturen lignet den funnet i gule legemer i eggstokker under de tidlige utviklingsstadier.

#### Eksempel 4

Opptak av kationiske liposomer og liposom-DNA komplekser

av angiogene blodårer i svulster og kronisk betennelse.

Formål: Eksperimenter av typen beskrevet i eksempel 3 ble utført for å utvide observasjoner til andre engiogenese-modeller. Disse eksperimenter dreide seg også om spørsmålet om DNA måtte være til stede for at kationiske liposomer skulle målsøke angiogene blodårer. Fire dyremodeller av angiogenese ble undersøkt med henblikk på om det var et preferensielt opptak av DOTAP:kolesterol liposomer eller liposom-DNA komplekser inn i de angiogene blodårer.

Modeller: RIP1-Tag2 tumormodell. Transgene C57BL/6 mus ble produsert og fenotypen karakterisert ved fødsel ved hjelp av PCR analyse. Musemodellen er beskrevet over.

HPV svulstmodell. Transgene HPV (Humant papillomvirus) mus ble produsert, og fenotypekarakterisert ved fødsel ved hjelp av PCR analyse. Ikke-transgene kullkamerater ble benyttet som kontroller. I denne modell blir onkogene fra det humane papillomvirus drevet av en region av keratin 14 promoteren. Når det blir innført i musegenomet, vil dette kornstrukt inducere ekspresjon av HPV spesifikt i hudceller. Alle grangene mus utvikler dysplasi som er fulgt av angiogenese i huden i det øvre brystregion og i ørene, og en liten del utvikler svulster.

*Mycoplasma pulmonis* infeksjonsmodell hos mus. Denne infeksjon resulterer i kronisk luftveisbetennelse, fulgt av angiogenese i slimhinnen i luftveiene. Etter anestesi (87 mg/kg ketamin og 13 mg/kg xylazin injisert intraperitonealt) ble patogen-frie, 8 uker gamle hannkjønn og hunkjønn C3H/HeNCr eller C57BL/6 mus (begge fra Charles River) innokkulert intranasalt med  $3 \times 10^4$  kolonidannende enheter av *Mycoplasma pulmonis* (stamme 5782C-UAB CT7) i et volum på 50 µl. Patogenfrie mus fungerte som kontroller og ble innokkulert med steril kjøttsuppe. Infiserte og kontrollmus ble oppbevart i separate bur under barrierebetingelser. Serumnivå av antistoff rettet mot *M. pulmonis* ble målt ved eksperimentets slutt (Microbiological Associates, Bethesda MD). Mus ble studert 1 til 8 uker etter infeksjon.

*Mycoplasma pulmonis* infeksjonsmodell i rotter. Som hos mus, fører denne infeksjon til kronisk luftveissykdom, hvor en av karakteristika er angiogenese i luftveisslimhinnene. Etter anestesi (40 mg/kg ketamin og 8 mg/kg xylazin injisert intraperitonealt), ble patogen-frie, 8 uker gamle, Wistar hannrotter (fra Charles River) innokkulert intranasalt hver dag i tre etterfølgende dager med *Mycoplasma pulmonis*, 5782C4-stammen, i et volum på 200 µl. Patogenfrie rotter som var

innokkulert med kjøttssuppe, fungerte som kontroll. Infiserte og kontrollrotter ble oppbevart i separate bur under barrierebetingelser. Serumnivåer av antistoff mot *M. pulmonis* og andre patogener ble målt ved slutten av eksperimentet (Microbiological Associates, Bethesda MD).

- 5 Metoder: Kationiske DOTAP:kolesterol liposomer, merket med Texas Rødt-DHPE, ble fremstilt som beskrevet under eksempel 3. Liposomer ble injisert inn i en halevene hos mus i en dose på 360 nmol total lipid i et volum på 100 µl i 5% glukose. Rotter ble infisert via lårvenen. Liposom-DNA komplekser ble fremstilt ved en total lipid:DNA ratio på 24:1 i 5% glukose, ved å bruke 60 µg plasmid DNA i 200-300 µl.
- 10 Liposomer eller komplekser (200-300 µl) ble injisert i en halevene og ikke-anesteserte RIP-Tag2, HPV eller *M. pulmonis*-infiserte mus. Ikke-transgene, patogenfrie mus ble benyttet som kontroller.

- 20 minutter eller 4 timer etter injeksjonen ble musene eller rottene anestesert ved intraperitoneal injeksjon av Nembutal 50 mg/kg. Vaskulaturen ble fiksert ved
- 15 perfusjon av 1% paraformaldehyd gjennom den oppadstigende aorta, og den indre overflate av vaskulaturen ble farvet med perfusjon av grønt fluorescerende lectin, Thurston, G., P. Baluk, A. Hirata og D. M. McDonald. Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. *Am J Physiol* 271: H2547-2562, 1996. Hele vevsbiter eller Vibratome-snitt ble montert i
- 20 Vectashield, og blodårer ble undersøkt med et Zeiss fluorescensmikroskop eller ved konfokal mikroskopi.

- Mengden av opptak av fluorescerende liposomer eller komplekser ble kvantifisert ved hjelp av konfokal mikroskopi. I korthet ble en serie på 12 konfokale bilder separert av 2,5 µm i fokal (z) aksen samlet i den fremre del av trakea i
- 25 fluorescein og Texas Rødt-kanalene ved å bruke en 20x NA 0,6 linse (Zeiss) og med standardiserte settinger av det konfokale knappenålhulls størrelse, fotomultipliserrørs forsterkning og laserkraft. Projeksjoner ble generert fra billedserien som viste blodårene (fluorescein-L. esculentum) og liposomer (Texas Rødt) hver for seg. Ved å bruke det konfokale dataprogram ble regioner på omtrent 200 µm<sup>2</sup> i området definert
- 30 på blodårebildene, deretter ble gjennomsnittlig fluorescens av de tilsvarende regioner på liposombildet målt. Bakgrunnsintensitet ble bestemt ved å måle fluorescent i utvalgte områder ved siden av blodårene. Målingene ble gjort på 25

blodårer pr. trakea og 4 trakear i hver gruppe ( $n = 4$ ). Signifikans av forskjeller ble vurdert ved hjelp av Student's  $t$  test.

Vev som var forberedt for transmisjonselektronmikroskopi, ble behandlet som tidligere beskrevet, McDonald, D. M. Endothelial gaps and permeability of venules of rat tracheas exposed to inflammatory stimuli, *Am. J. Physiol.* 266: L61-L-83, 1994. I korthet ble perfusjon med primært fiksativ (3% glutaraldehyd i 75 mM kakodylatbuffer, pH 7,1, pluss 1% sukrose, 4% PVP, 0,05%  $\text{CaCl}_2$  og 0,075%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i 5 minutter ved romtemperatur ble etterfulgt av perfusjon med sekundært fiksativ (3% glutaraldehyd i kakodylatbuffer 75 mM, pH 7,1, som inneholdt 0,05%  $\text{CaCl}_2$ , 1% sukrose og 4% PVP) i 5 minutter. Vevene ble tillatt å fikserte in situ i 1 time ved romtemperatur og deretter fjernet og oppbevart over natten i sekundært fiksativ ved 4°C. Vev ble trimmet med et barberblad eller kuttet med en vevskutter, post-fiksert i osmium (2%  $\text{OsO}_4$  i 100 mM kakodylatbuffer, pH 7,4 i 18 t. ved 4°C), vasket i  $\text{H}_2\text{O}$  (18 t. ved 4°C) og farvet en bloc med uranylacetat (vandig, 37°C i 48 t.). Vev ble deretter dehydrert gjennom aceton, infiltrert og innstøpt i epoksyresin. Ultratynne snitt ble kuttet med en ultramikrotom, montert på enkelt-slot prøverammer, og undersøkt med et Zeiss EM-10 elektronmikroskop.

Resultater: Eksperimentene viste at Texas Rødt-merkete DOTAP:kolesterol liposomer, i fravær av DNA, selektivt målsøkte angiogene endotelceller i svulster i RIP1-Tag2 mus, lignende tidligere funn med Texas Rødt-merkete DOTAP:kolesterol-DNA komplekser og Dil-merkete DDAB:kolesterol-DNA komplekser. Dette og følgende eksperimenter på transgene RIP1-Tag2 mus bekreftet at opptaket av kationiske liposomer av angiogene blodårene i hyperplastiske øyer og svulster klart overskrider det som sees i de tilsvarende normale blodårer (figurene 5, 6, 7 og 8). I noen blodårer i hyperplastiske øyer og små svulster ble liposomer tatt opp av endotelceller som bare var til stede i fokale områder (figur 8), mens opptaket i større svulster var mer generalisert (figur 6). Fokale opptaksregioner ble antatt å være mulige områder der nye blodårer vokste (figur 8).

På grunn av denne egenskap hos kationiske liposomer eller liposom-DNA komplekser hadde disse den potensielle praktiske nytte at de selektivt kunne levere substanser til angiogene endotelceller, og det syntes ønskelig å bestemme om denne egenskap hos angiogene endotelceller i svulster også var til stede i endotelceller ved andre områder med patologisk angiogenese. Dette spørsmål ble

studert i eksperimenter der opptaket av Texas Rødt-merkete DOTAP:kolesterol liposomer i angiogene endotelceller ble undersøkt i trakea hos mus med *Mycoplasma pulmonis* infeksjon, som fremkaller kronisk luftveisbetennelse, og der en av karakteristikaene er angeogenese (sammenlign figurene 9 og 10). Angiogene endotelceller i regioner med kronisk betennelse ble funnet å være områder med uvanlig høyt opptak av kationiske liposomer (figur 10). Spesifikt hadde blodårer i trakea hos mus infisert med *M. pulmonis* et uvanlig høyt opptak. Konfokal mikroskopisk måling av angiogene blodårer viste at de infiserte mus hadde 20- til 30-ganger høyere opptak enn kontroller (figur 11). Noen angiogene årer hadde 100 ganger høyere opptak. Konfokale- og elektronmikroskopiske studier av angiogene endotelceller i mus infisert med *M. pulmonis* antydte at kationiske liposomer først assosierte med (figur 12) og deretter ble internalisert inn i endosomer (figur 13).

På samme måte ble kationiske liposomer effektivt tatt opp av angiogene blodårer i eggstokkfollikler og gule legemer hos mus, i dysplastisk hud hos transgene HPV mus, og i trakea hos rotter med angiogenese fremkalt av *M. pulmonis* infeksjon.

Konklusjoner: Disse eksperimenter bekreftet at kationiske liposomer og liposom-DNA komplekser fortrinnsvis målsøker de angiogene endotelceller i svulster og i områder med kronisk betennelse.

Den nåværende oppfinnelse blir vist og beskrevet her i det som vurderes som de mest praktiske og foretrukne utførelser. Det blir imidlertid forstått at avvik kan bli gjort fra disse, som er innenfor oppfinnelsens område, og at selvfølgelig modifikasjoner vil være mulige for en som er øvet i faget, etter å ha lest denne beskrivelse.

## Bibliografi

De følgende dokumenter er sitert med bokstaver og tall i teksten beskrevet over.

- A. US pat. nr. 4,897,355
- B. US pat. nr. 4,394,448
- C. US pat. nr. 5,328,470
- D. WO93/12240
- E. WO91/06309
- F. Huang, et al., Kreft Res. 52, 5135 (1992),
- G. Rosenecker, et al., PNAS 93, 7236 (1996),

- H. Abdi, et al., *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 31, 310 (1995),  
 I. Chonn, et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 698 (1995),  
 J. Green, et al., *Adv. Esp. Med. Biol.* 383, 83 (1995),  
 K. Hung, et al., *Gene* 159, 65 (1995),  
 5 L. Ledley, et al., *Hum. Gene Ther.* 6, 1129 (1995),  
 M. Mori, et al., *Kreft Chemother. Pharmacol.* 35, 447 (1995),  
 N. Volm, et al., *Curr. Opin. Oncol.* 7, 429 (1995),  
 O. Litzinger, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 99 /1994),  
 P. Northfelt, et al., *Drugs* 48, 569 (1994),  
 10 Q. Oku, et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.* 11, 231 (1994),  
 R. Gabizon, et al., *Ann Biol. Clin (Paris)* 51, 811 (1993),  
 S. Huang, et al., *Am. J. Pathol.* 143, 10 (1994),  
 T. Mori, et al., *Pharm. Res.* 10, 507 (1993),  
 U. Priebe, et al., *Pharmacol, Ther.* 60, 215 (1993),  
 15 V. Straubinger, et al., *J. Natl, Kreft Inst. Monogr.* 69 (1993),  
 W. Fidler, et al., *World J. Surg.* 16, 270 (1992),  
 X. Rowlinson-Busza, et al., *Curr. Opin. Oncol.* 4, 1142 (1992),  
 Y. Sugarman, et al., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 12, 231 (1992),  
 Z. Pak, et al., *Biotherapy* 3, 55 (1991),  
 20 AA. De Smidt, et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 7, 99 (1990),  
 BB. Papahadjopoulos, et al., *Prog. Clin. Biol. Res.* 343, 85 (1990),  
 CC. Shibata, et al., *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 30, 342 (1990),  
 DD. Hughes, et al., *Kreft Res.* 49, 6214 (1989),  
 EE. Shibata, et al., *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 29, 696 (1989),  
 25 FF. Freeman, et al., *Kreft* 58, 573 (1986),  
 GG. Zolotareva, et al., *Eksp. Onkol.* 8, 28 /1986),  
 HH. Caride, et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1, 121 (1985),  
 II. Yatvin, et al., *Med. Phys.* 9, 149 (1982),  
 JJ. Liposomes, *A Practical Approach*, edited by Nev, R.R.C., IRL Press, 1994,  
 30 KK. Liposomes, *From Physics to Applications*, Lasic, D.D., Elsevier, 1993,  
 LL. Thurston, et al., "Cationic Liposomes Target Angiogenic Endothelial Cells in Tumors and Inflammation in Mice," *J. Clin. Invest.*, April 1, 1998.

Litteratur som er sitert i eksemplene:

1. Arfors, K.-F., G. Rutili, og E. Svensjö. Microvaskular transport of macromolecules in normal and inflammatory conditions. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 463: 93-103, 1979.
2. Baluk, P., og D. M. McDonald. The  $\beta_2$ -adrenergic receptor agonist formoterol reduces microvaskular leakage by inhibiting endothelial gap formation. *Am. J. Physiol.* 266: L461-L468, 1994.
3. Bowden, J. J., A. Garland, P. Baluk, P. Lefevre, E. Grady, S. R. Vigna, N. W. Bunnett og D. M. McDonald. Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 91: 8946-8968, 1994.
4. Brigham, K., B. Meyrick, B. Christman, M. Magnuson, G. King og L. C. Berry. *In vivo* transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle. *Am. J. Med. Sci.* 298: 278-281, 1989.
5. Christenson, L. K., og R. L. Stouffer. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Edocrinology* 137: 367-374, 1996.
6. Conary, J. T., R. E. Parker, B. W. Christman, R. D. Faulks, G. A. King, B. O. Meyrick and K. L. Brigham. Protection of rabbit lungs from endotoxin injury by *in vivo* hyperexpression of the prostaglandin G/H synthase gene. *J. Clin. Invest.* 93: 1834-1840, 1994.
7. Folkman, J., K. Watson, D. Ingber og D. Hanahan. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61, 1989.
8. Hanahan, D. Heritable formation of Pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315: 115-22, 1985.
9. Hanahan, D., og J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-64, 1996.
10. Lundberg, J. M., og A. Saria. Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and irritants. *Nature* 302: 251-253, 1983.

11. Majno, G., og G. E. Palade. Studies on inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopis study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11: 571-604, 1961.
12. McDonald., D. M. Neurogenic inflammation in the rat trachea. I. Changes in venules, leucocytes, and epithelial cells, *J. Neurocytology* 17; 583-603, 1988.
13. MacDonald, D. M. The ultrastructure and permeability of tracheobronchial blood vessels in health and disease. *Eur. J. Respir. Dis.* 3 (Suppl. 12): 572s.-585s., 1990.
14. McDonald, D. M. Endothelial gaps and permeability of venules of rat tracheas exposed to flammatory stimuli. *Am. J. Physiol.* 266: L61-L83, 1994.
15. McDonald, D. M. og A. Goldfein. The relation of lutein cell Golgi apparatus morphology to ovarian protgesterone secretion during the rat estrous cycle. *Anat. Rec.* 151: 381, 1965.
16. McDonald, D. M., K. Seiki, M. Prizant og A. Goldfein. Ovarian progesterone secretion in relation to the lutein cell Golgi apparatus during rat estrous cycle. *Endocrinology* 85: 236-243, 1969.
17. Nobel, E.G., D. Gordon, Z. Y. Yang, L. Xu, H. San, G. E. Plautz, B. Y. Wu, C. Gao, L. Huang og G. J. Nabel. Gene transfer *in vivo* with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum. Gene Ther.* 3: 649-56, 1992.
18. Philip, R., D. Liggitt, M. Philip, P. Dazin og R. J. Debs. *In vivo* gene delivery: Efficient transfection of T lymphocytes in adult mice. *J. Biol. Chem.* 268; 16087, 1993.
19. Thurston, G., P. Baluk, A. Hirata, P. Dazin og D. M. McDonald. Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. *Am J Physiol* 271: H2547-2562, 1996.
20. Tsukada, K., T. Matsushima og N. Yamanaka. Neovascularization of the corpus luteum of rats during the estrus cycle. *Pathol Int* 46: 408-416, 1996.
21. Umeno, E., J. A. Nadei og D. M. McDonald. Neurogenic inflammation of the rat trachea: fate of neutrophils that adhere to venules. *J. Appl. Physiol.* 69: 2131-2136, 1990.
22. Zhu, N., D. Liggitt, Y. Liu og R. Debs. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 261: 209-211, 1993.

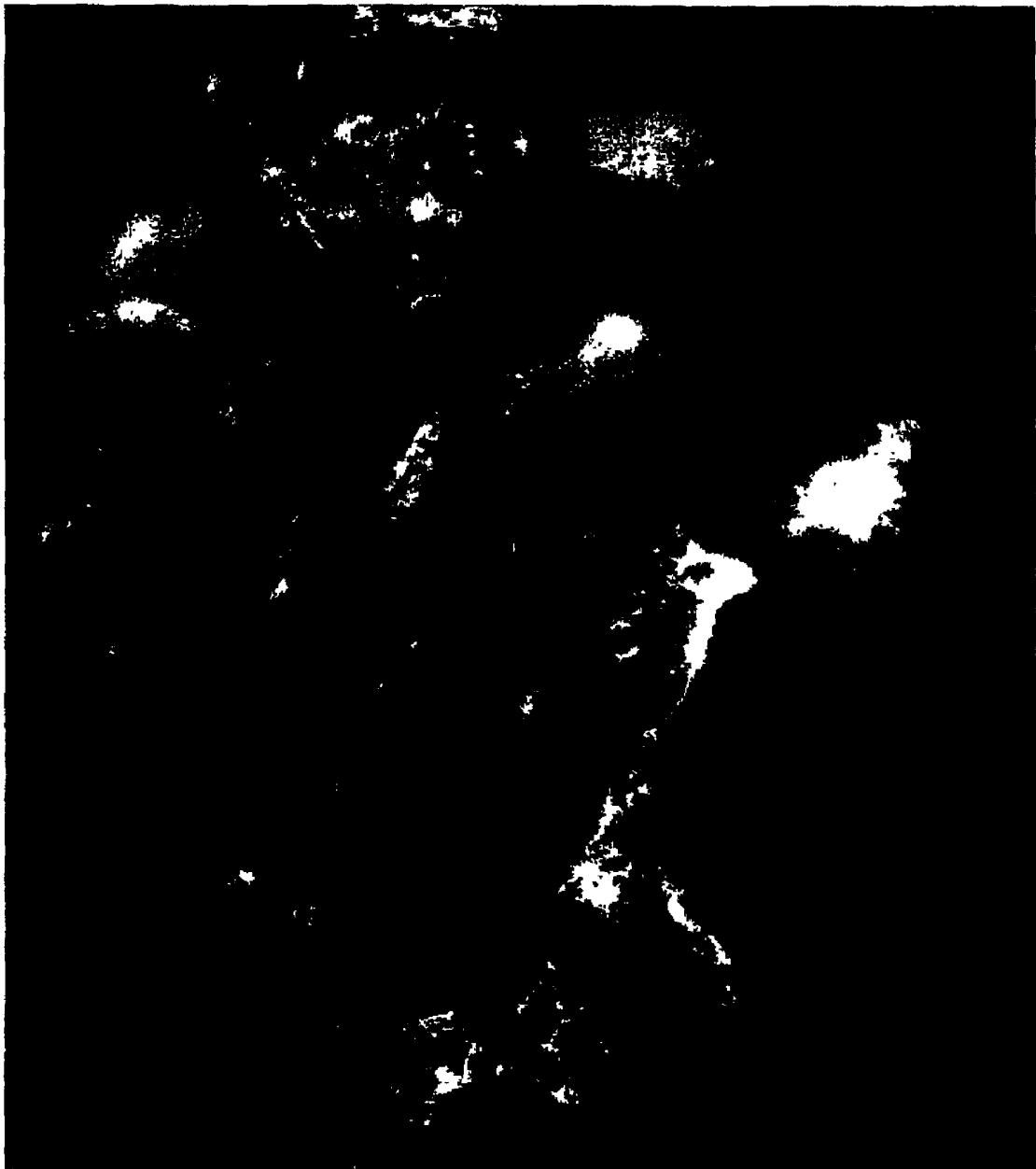
23. Bowden, J. J., T. R. Schoeb, J. R. Lindsey og G. M. McDonald.  
Dexamethasone and oxytetracycline reverse the potentiation of neurogenic inflammation in airways of rats with *Mycoplasma pulmonis* infection. Am J. Respir Crit Care Med 150: 1391-401, 1994.
24. McDonald, D. M. Infections intensify neurogenic plasma extravasation in the airway mucosa. Am Rev Respir Dis 146: S40-4, 1992.
25. McDonald, D. M. Upregulation of tachykinin reseptors in an animal model of chronic airway inflammation. Pulmonary Pharmacology 8: 203-205, 1995.
26. McDonald, D. M., T. R. Schoeb og J. J. Lindsey. *Mycoplasma pulmonis* infections cause long-lasting potentiation of neurogenic inflammation in the respiratory tract of the rat. J Clin Invest 87: 787-99, 1991.

## PATENTKRAV

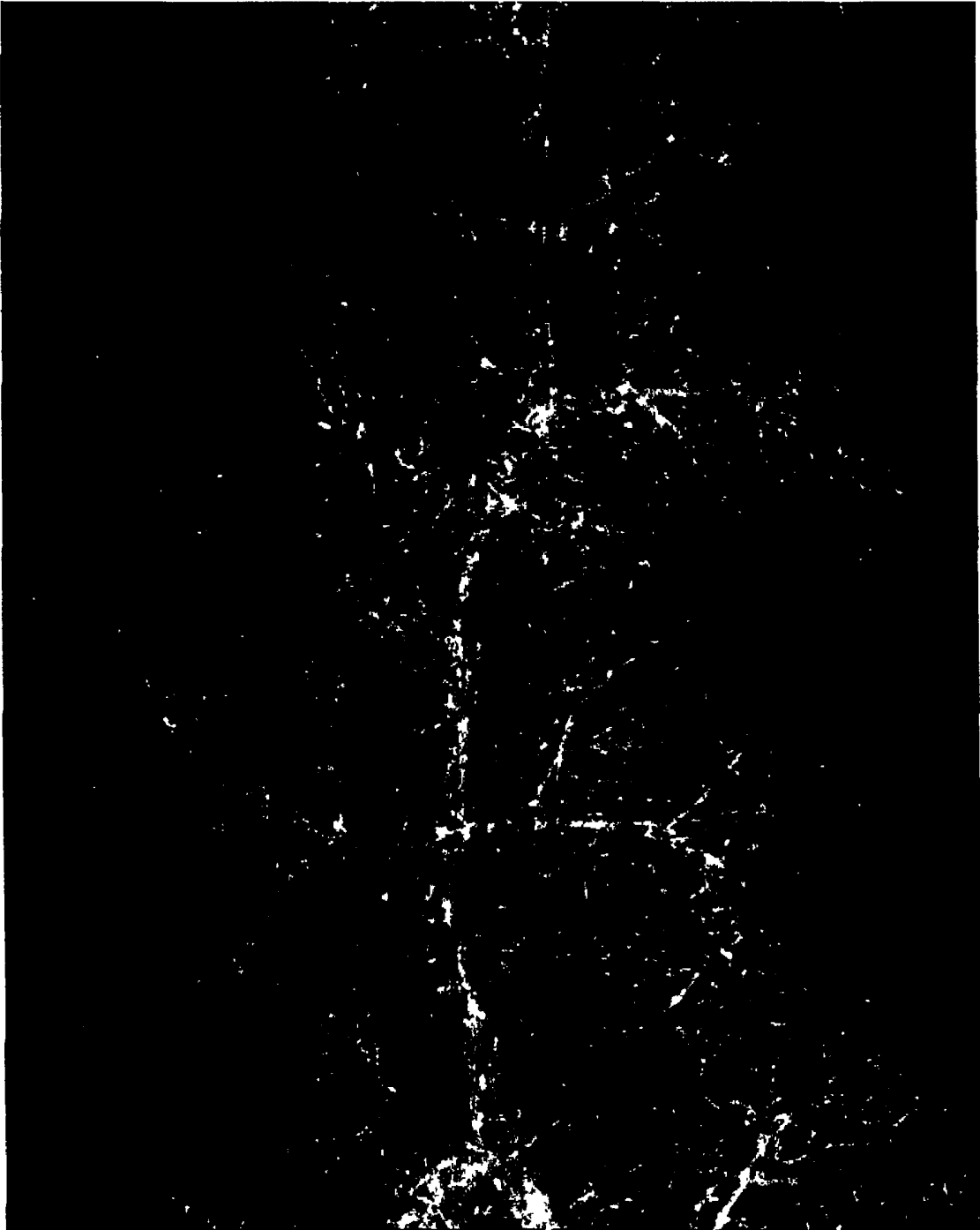
1. Kationisk liposom, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det omfatter:  
minst 5 mol% av minst et kationisk lipid;  
5 eventuelt minst et nøytralt lipid;  
og en toksisk forbindelse som ødelegger angiogene endotelceller til en tumor,  
hvor det kationiske liposomet har et zetapotensial høyere enn 0 mV når tilstede i  
fysiologisk pH.
- 10 2. Liposom ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte kationiske lipid  
omfatter et skjelett og mer enn en fettsyre med 12 til 24 karbonatomer i lengde og  
innhold opptil 6 ikke-metninger knyttet til skjelettet enten med acyl- eller  
eterbindinger.
- 15 3. Liposom ifølge krav 1 eller krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t liposomet  
har minst 5- ganger høyere selektivitet for angiogene endotelceller sammenlignet  
med korresponderende normale endotelceller.
4. Anvendelse av et kationisk liposom for fremstilling av en farmasøytisk  
20 sammensetning for behandling av kreft i et individ, hvor det kationiske liposomet  
omfatter:  
minst 5 mol% av minst et kationisk lipid;  
eventuelt minst et neutralt lipid; og  
en toksisk forbindelse som ødelegger angiogene endotelceller til en tumor, og  
25 hvor det kationiske liposomet har et zetapotensial høyere enn 0 mV når tilstede i  
fysiologisk pH.
5. Anvendelse ifølge krav 4, hvor nevnte kationiske lipid omfatter et skjelett og  
mer enn en fettsyre med 12 til 24 karbonatomer i lengde og inneholder opptil 6 ikke-  
30 metninger knyttet til skjelettet enten med acyl-eller eterbindinger.



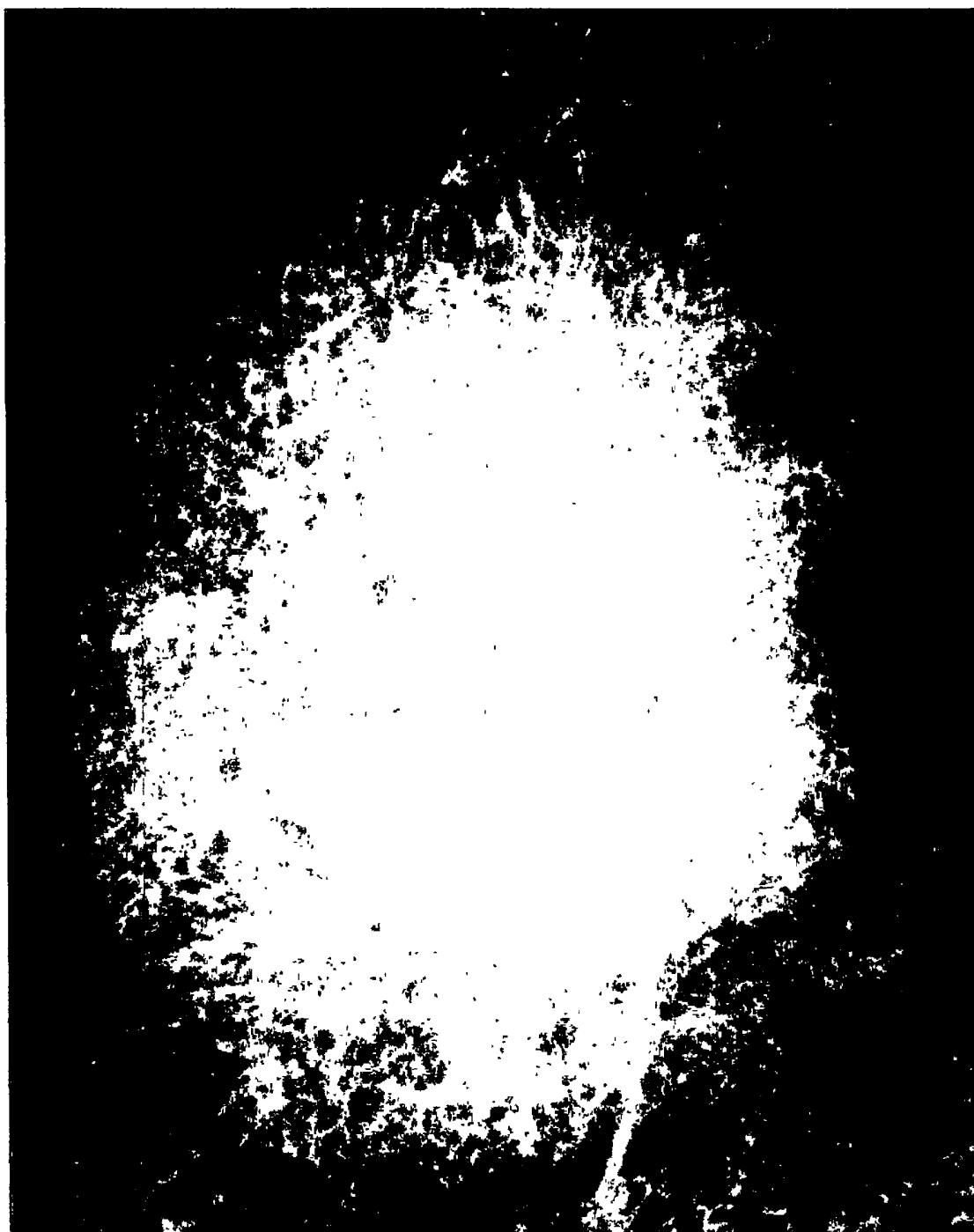
Figur 1



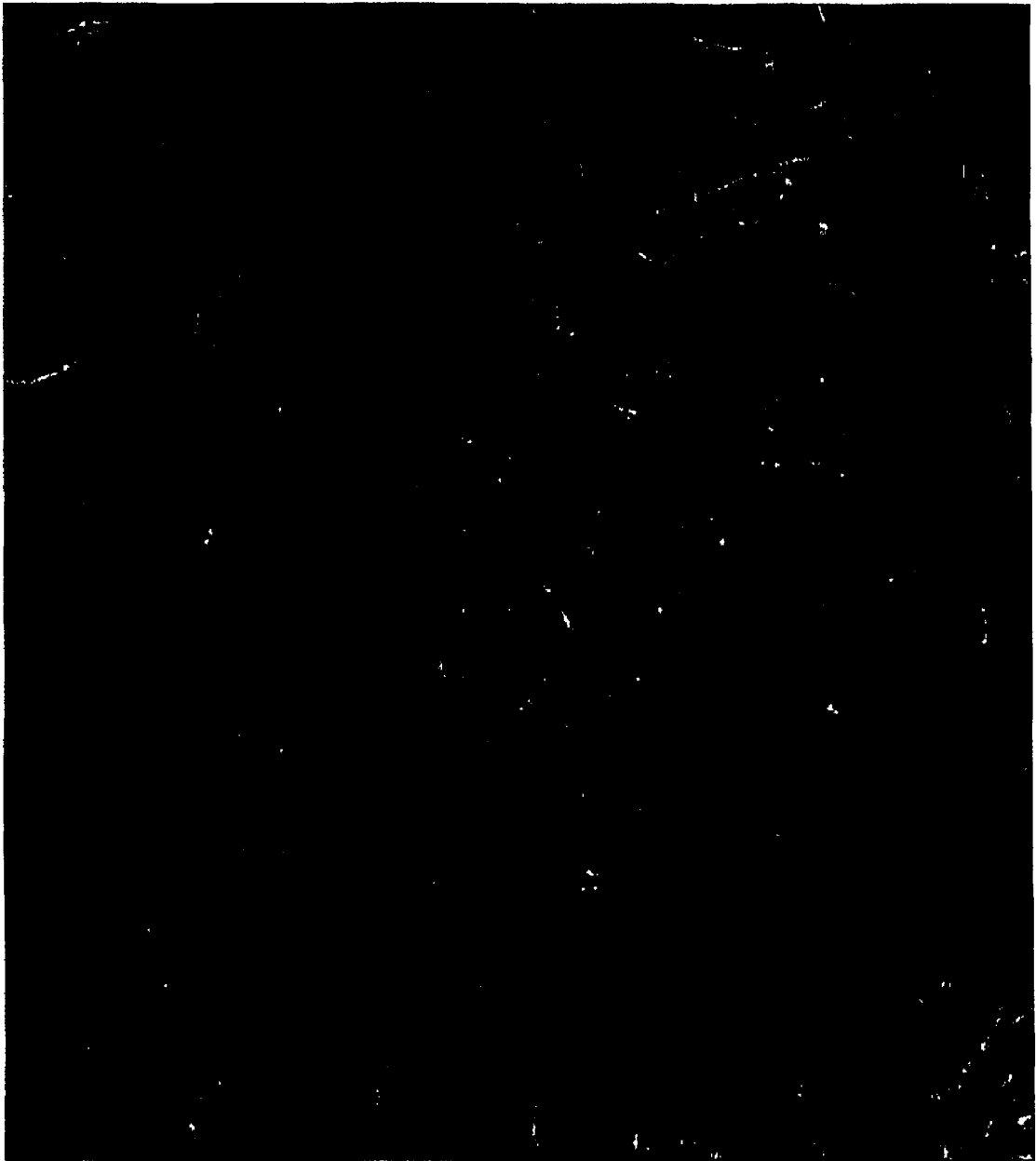
Figur 2



Figur 3

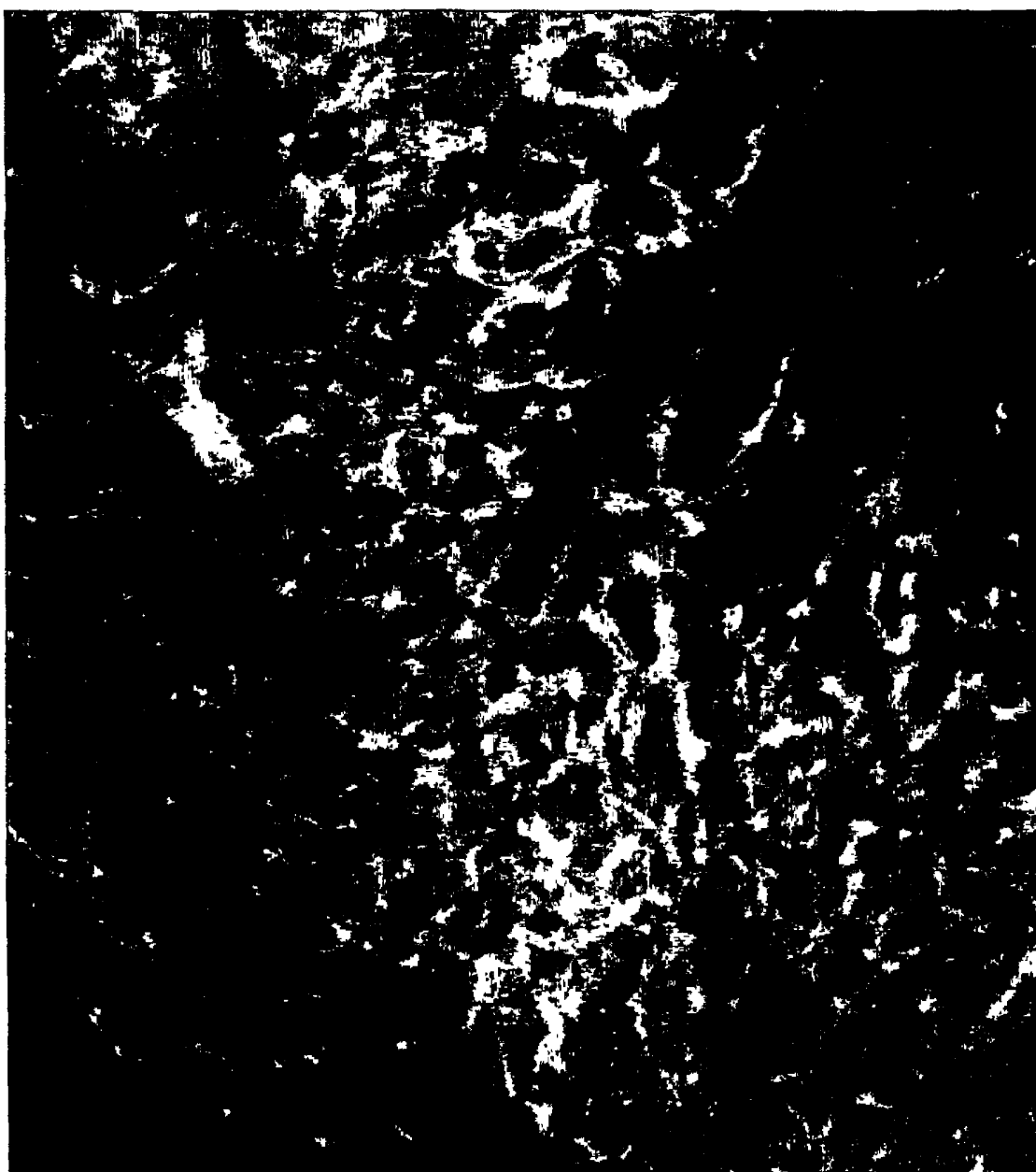


Figur 4

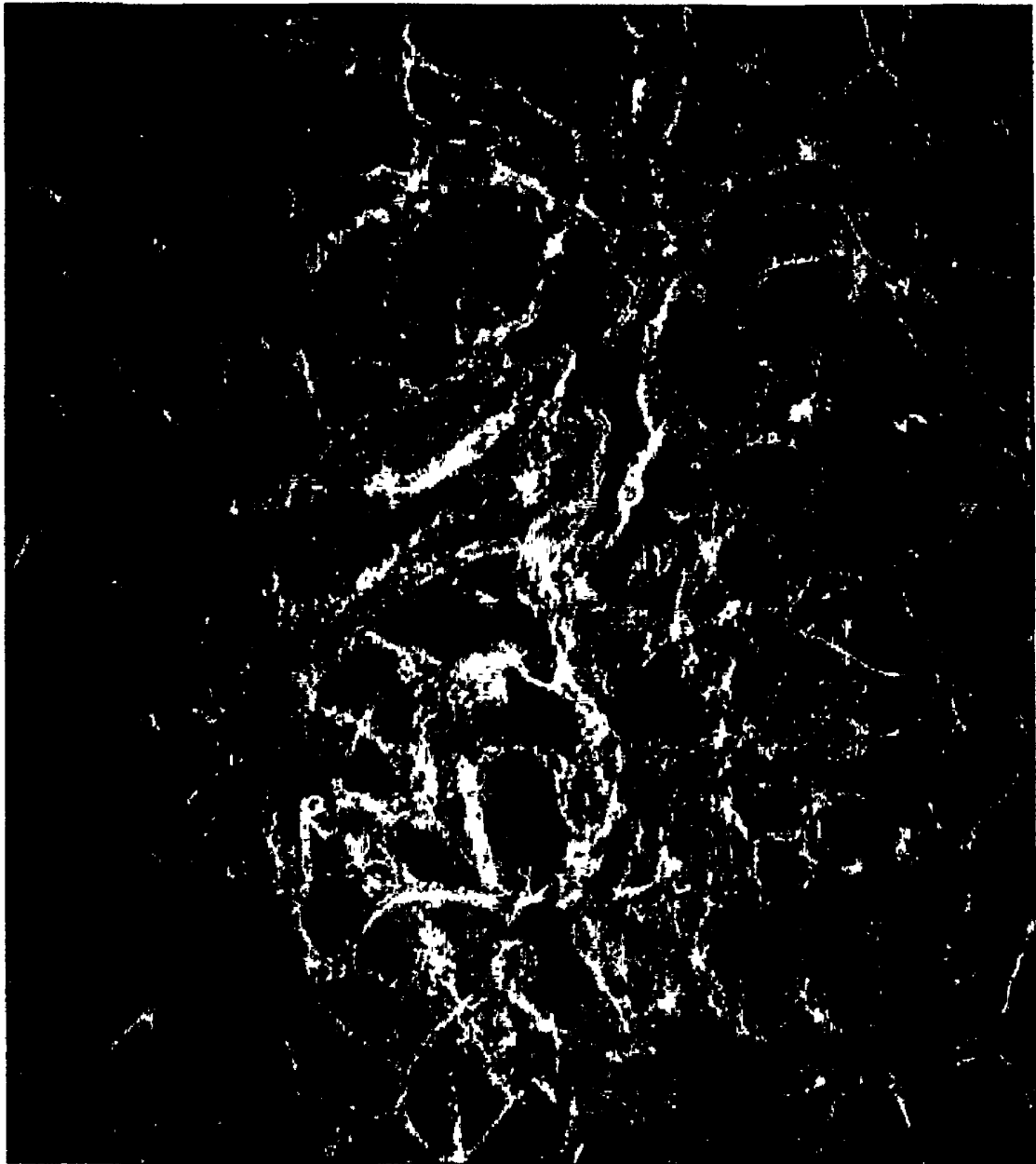


Figur 5

—



Figur 6



Figur 7



Figur 8

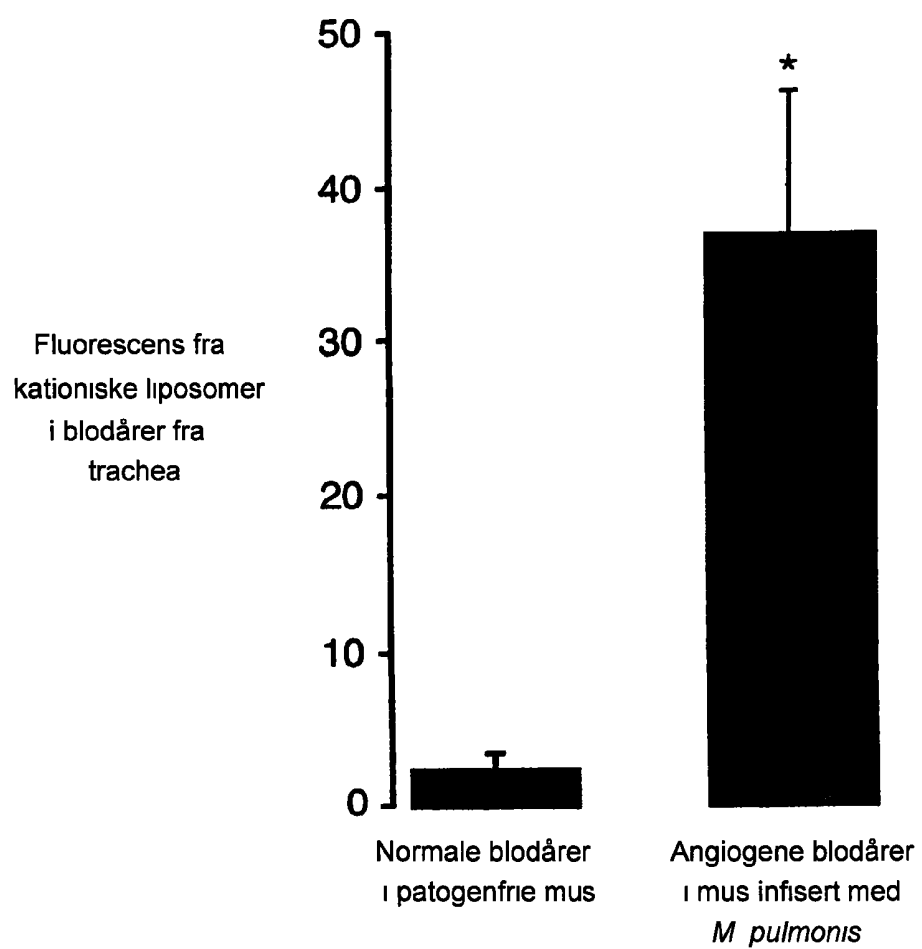


Figur 9

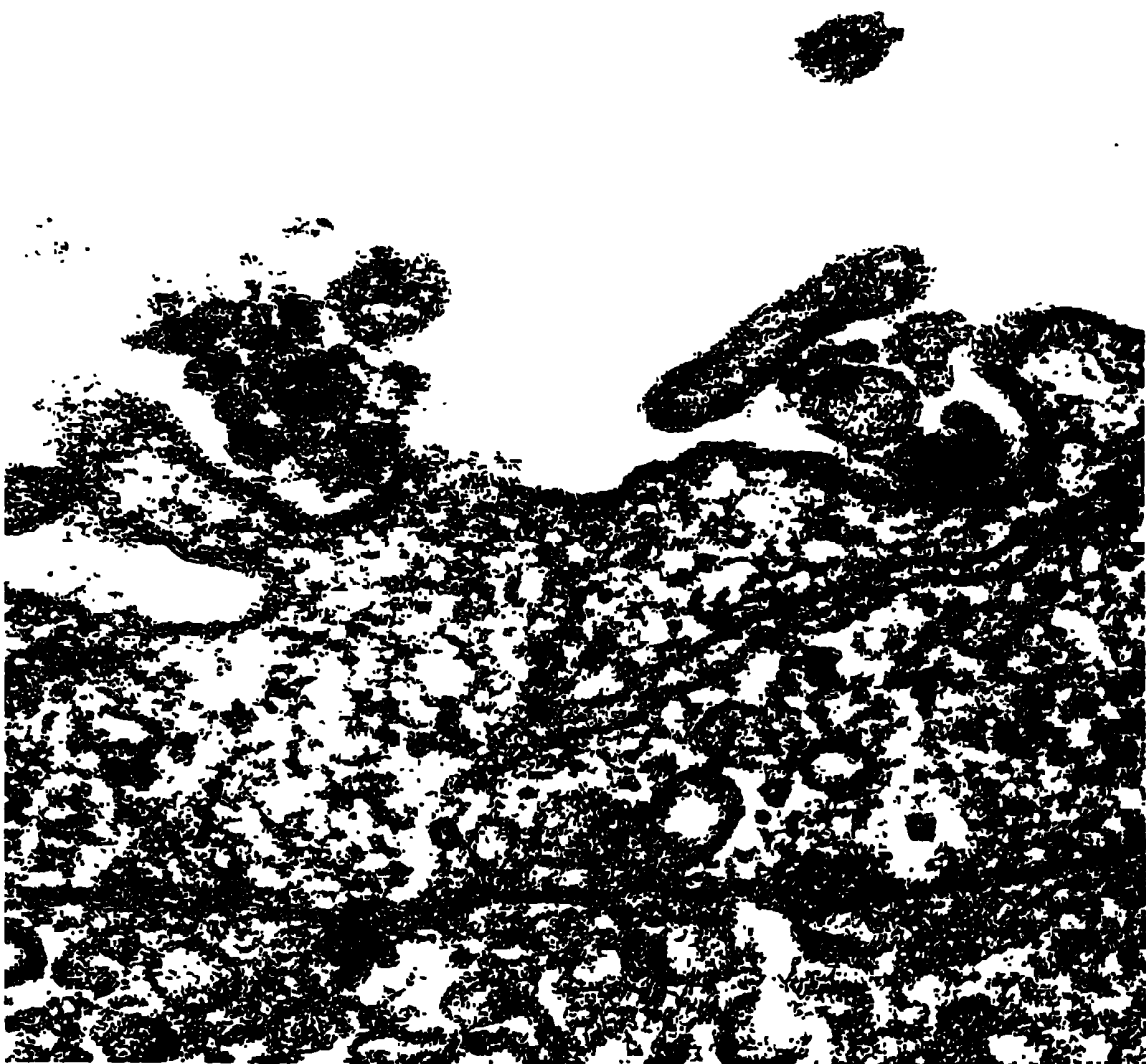


Figur 10

Opptak av DOTAP<sup>+</sup> kolesterol liposomer av  
endotelceller i blodårer fra trachea i C3H/HeNCr mus



Figur 11



Figur 12



Figur 13