

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 3093

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **13.02.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **15.02.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/MI000249**

(33) Země priority: **IT**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.02.2003**
(Věstník č. 2/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP01/01543**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/061017**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/62	C 07 K 16/28
C 12 N 15/28	C 07 K 5/08
C 12 N 15/23	C 07 K 7/00
C 07 K 14/525	C 07 K 5/093
C 07 K 14/57	
A 61 K 38/19	
A 61 K 38/21	
A 61 K 31/70	

(71) Přihlašovatel:

FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL
MONTE TABOR, Milano, IT;

(72) Původce:

Corti Angelo, Milano, IT;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Upravené cytokiny vhodné pro použití při léčbě
zhoubného bujení**

(57) Anotace:

Popisují se deriváty cytokinů schopné cílit cévy nádorů a
buňky prezentující antigen a jejich použití jako
protinádorových činidel.

19.11.00

Upravené cytokiny vhodné pro použití při léčbě zhoubného bujení

PV2001-3093

~~84470~~

Oblast techniky

Vynález popisuje upravené cytokiny vhodné pro použití při léčbě zhoubného bujení. Zvláště se popisují deriváty cytokinů, jejichž cílem jsou cévy nádorů a buňky prezentující antigen.

Dosavadní stav techniky

Protinádorová aktivita některých cytokinů je dobře známa a v literatuře popsána. Některé cytokiny se už v minulosti použily při léčbě lidí (popisuje se v publikaci Fiers, W. Biologic therapy with TNF: preclinical studies. In V. De Vita, S. Hellman, and S. Rosenberg Eds.). Biologic therapy of cancer: principles and practice. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1995. P. 295-327). Takové cytokiny, jako je například interleukin-2 (IL-2) a interferon α (IFN α) vykazují pozitivní protinádorovou aktivitu u pacientů s různými typy nádorů, jako jsou metastázující karcinom ledviny, leukémie vlasových buněk, Kaposiho sarkom, melanom, vícenásobný myelom a podobně. Jiné cytokiny jako je IFN β , faktor nekrózy nádoru (TNF) α , TNF β , IL-1, 4, 6, 12, 15 a faktory stimulující kolonie (CFS) vykazují jistou protinádorovou aktivitu u některých typů nádorů a proto jsou předmětem dalších studií.

V obecném případě terapeutické použití cytokinů je silně omezeno jejich systémovou toxicitou. Například TNF se používá v důsledku jeho kapacity vyvolat hemoragickou nekrózu některých nádorů (popisuje se v publikaci Carswell, E. A., et al., An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975. 72: 3666-70.) a *in vitro* cytotoxický účinek u různých nádorových linií (popisuje

se v publikaci Helson, L., et al., Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. Nature 1975. 258: 731-732). Následně se potvrdilo, že vykazuje silnou protizánětlivou aktivitu, což může v případě podmínek nadměrné produkce, nebezpečně ovlivnit lidské tělo (popisuje se v publikaci Tracey, K. J., and A. Cerami. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. Ann. Rev. Cell Biol., 1993. 9: 317-43).

Vzhledem k tomu, že systémová toxicita je základní problém při použití farmakologicky aktivního množství cytokinů u lidí, vyvíjejí se nové deriváty a léčebné strategie, kdy se redukuje toxické účinky uvedené třídy biologických efektorů, zatímco si zachovávají léčebnou účinnost.

Některé nové přístupy jsou následující:

- a) vývoj fúzních proteinů, které mohou zavést TNF do nádoru a tak zvýšit lokální koncentraci. Tak se například produkují fúzní proteiny obsahující TNF a nádorově specifické protilátky (popisuje se v publikaci Hoogenboom, H. R., et al., Construction and expression of antibody tumor necrosis factor. Mol. Immunol. 1995. 32: 873-81.)
- b) vývoj mutantů TNF, které udržují protinádorovou aktivitu a redukuje systémovou toxicitu. Připravily se mutanti, kteří jsou schopni selektivně rozeznat pouze jeden receptor (p55 nebo p75 (popisuje se v publikaci Loetscher, H., et al., Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75 kDa TNF receptors. J. Biol. Chem. 1993. 268: 26 350-7)).
- c) použití protilátek proti TNF schopných redukovat některé toxické účinky TNF, aniž snižují svou protinádorovou aktivitu. Takové protilátky se popisují v publikaci Rathjen, D. A., et al., 1992. Selective enhancement of the tumour necrotic activity TNF alpha with monoclonal antibody. Brit. J. Cancer 65: 852.

d) použití derivátů TNF s vyšším poločasem rozpadu (například TNF konjugovaný s polyetylenglykolem).

Popisuje se příprava derivátů TNF schopných selektivně cílit místa nádorů. Popisuje se například fúzní protein získaný fúzí genu těžkého řetězce monoklonálních protilátek proti receptoru transferinu a genu TNF (popisuje se v publikaci Hoogenboom, H. R., et al., Construction and expression of antibody tumor necrosis factor. Mol. Immunol. 1995. 32: 873-81.) nebo fúzní protein TNF s kloubní oblastí monoklonální protilátky proti antigenu TAG72 spojenému s nádorem (popisuje se v publikaci Zang, J., et al., A genetically engineered single-chain FV/TNF molecule possesses the anti-tumor immunoreactivity of FV as well as the cytotoxic activity of tumor necrosis factor. Mol. Immunol. 1995. 32: 873-81) nebo fúzní protein Fv-TNF (popisuje se v publikaci Zang, J., et al., A genetically engineered single-chain FV/TNF molecule possesses the anti-tumor immunoreactivity of FV as well as the cytotoxic activity of tumor necrosis factor. Mol. Immunol. 1995. 32: 873-81).

Dokument EP 251 494 popisuje systém aplikace diagnostického nebo léčebného činidla, které zahrnuje protilátku konjugovanou s avidinem nebo streptavidinem, činidlo schopné tvořit komplexy konjugovaných protilátek a sloučeniny obsahující diagnostické nebo terapeutické činidlo konjugované s biotinem, které se aplikuje postupně a s odpovídajícím zpožděním tak, aby umožnilo lokalizaci terapeutického nebo diagnostického činidla prostřednictvím interakce biotin-streptavidin na cílové buňce rozeznané protilátkou. Popsaná léčebná nebo diagnostická činidla obsahují cheláty kovů, v určitých chelátech jsou obsaženy radionukleotidy a nízkomolekulová protinádorová činidla, jako je cis-platina, doxorubicin, atd..

Dokument EP 496 074 popisuje způsob, který zahrnuje postupnou aplikaci biotinylovaných protilátek, avidin nebo streptavidin a biotinem značené diagnostické nebo terapeutické činidlo. Ačkoli se zmiňují cytotoxická činidla podobná ricinu, většinou se popisuje aplikace radioaktivně značených sloučenin.

Dokument 95/15979 popisuje způsob lokalizace vysoce toxických činidel na buněčných cílech založených na aplikaci prvního konjugátu, který obsahuje specificky cílenou molekulu konjugovanou s ligandem nebo anti-ligandem, pak následuje aplikace druhého konjugátu, který obsahuje toxické činidlo vázané na anti-ligand nebo ligand.

Dokument WO 99/13 329 popisuje způsob cílení molekuly do nádorových angiogenních cév, založený na konjugování uvedené molekuly s ligandy receptorů NGR. Řada molekul se navrhla jako možný kandidát, ale specificky se popisuje pouze doxorubicin. Nebylo však popsáno žádné použití ligandů receptorů NGR jako cytokinů za účelem vyvolání imunitní odezvy.

Překvapivě se zjistilo, že terapeutický index jistých cytokinů se může znatelně vylepšit a jejich imunoterapeutické vlastnosti se mohou zesílit spojením s ligandem receptoru aminopeptidázy-N (CD13). CD13 je trans-membránový glykoprotein o molekulové hmotnosti 150 000, který je vysoce konzervativní v různých živočišných druzích. Exprimuje se na normálních buňkách stejně jako v liniích myeloidních nádorů v angiogenním endoteliu a v některém epitelu. Receptor CD13 se obvykle identifikoval jako receptor „NGR“, kde jeho peptidové ligandy sdílí aminokyselinový motiv „NGR“.

Vynález popisuje konjugační produkt cytokinů vybraný z TNF a IFN γ a ligandu receptoru CD13. Uvedený ligand může být protilátka nebo její fragment, jako je Fab, Fv, jediný řetězec

FV, peptid nebo molekula napodobující peptid, jmenovitě molekula podobná peptidu schopná vázat se na receptor CD13, která může obsahovat upravené nebo přirozeně se vyskytující aminokyseliny. Ligandem je přednostně přímý nebo cyklický peptid obsahující motiv NGR, jako je CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRC, cycloCVLNGRMEC nebo cycloCNGRC nebo výhodný je peptid CNGRC. Peptid může být spojen s cytokinem přímo nebo nepřímo prostřednictvím mezerníku, kterým může být jediná aminokyselina, aminokyselinová sekvence nebo organický zbytek, jako je 6-aminokapryl-N-hydroxysukcinimid. Postupy spojování jsou dobře známy v oboru a zahrnují metody rekombinace molekul nebo chemickou syntézu.

Peptidový ligand je přednostně spojen s N-koncem cytokinu, tak se minimalizují libovolné interference při navázání upraveného cytokinu na jeho receptor. V jiném případě se může peptid spojit s aminokyselinovými zbytky, které jsou akceptory amidové nebo karboxylové vazby přirozeně se vyskytující na molekule nebo jsou uměle začleněny postupy rekombinace. Upravený cytokin se přednostně připravil použitím cDNA obsahující sekvenci sousedící s 5'-koncem, která obsahuje peptid.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje konjugační produkt mezi TNF a sekvencí CNGRC. Výhodnější je, když je N-konec TNF spojený s peptidem CNGRC prostřednictvím mezerníku G (glycin).

Prokázalo se na zvířecích modelech lymfomu RMA-T, že výsledný produkt (NGR-TNF) je aktivnější než TNF. Dále zvířata ošetřená NGR-TNF jsou schopny potlačit další tumorogenní dávky buněk RMA-T nebo RMA. Růst protinádorové aktivity ve srovnání s normálním TNF je možné pozorovat u imunokompetentních zvířat, ale nikoli u imunodeficientních zvířat. To naznačuje,

že růst protinádorové aktivity TNF konjugované s peptidy „NGR“ je způsoben zesílením imunitní odezvy spíše než přímé cytotoxické aktivity konjugátu.

Ukázalo se, že imunitní účinky *in vivo* vyvolané NGR-TNF jsou přímo vztaženy vůči receptoru CD13. Pozorovalo se například, že protilátky proti receptoru CD13 stejně jako ligand GNGRC soutěží *in vivo* s NGR-TNF, což naznačuje mechanismus cílení receptoru pomocí NGR-TNF.

Terapeutický index konjugátů ligandů TNF/CD13 se může dále zlepšit použitím mutantní formy TNF schopné se selektivně vázat na jeden ze dvou receptorů TNF, p75TNFR a p55TNFR. Uvedený mutant TNF se může získat místně řízenou mutagenezí (popisuje se v publikaci Loetscher, H., et al., Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75 kDa TNF receptors. J. Biol. Chem. 1993. 268: 26 350-7, Van Ostade, X., et al., Human TNF mutants with selective activity on the receptor p55. Nature 1993. 361: 266-9).

Farmakokinetika upravených cytokinů podle vynálezu se může zlepšit přípravou polyetylglykolových derivátů, které umožňují prodloužit plazmatický poločas rozpadu samotných cytokinů.

Vynález dále popisuje bifunkční deriváty, kde cytokiny upravené ligandem CD13 se konjugují s protilátkami nebo z jejich fragmenty určenými protinádorovým antigenům nebo jiným nádorovým angiogenním markerům, jako jsou α v integriny, metaloproteázy nebo vaskulární růstový faktor nebo protilátky nebo jejich fragmenty řízené proti komponentům extracelulární matrice, jako jsou protilátky proti tenaskinu nebo oblast určená proti fibronektinu EDB. Popisuje se příprava fúzního produktu mezi TNF a kloubní oblastí monoklonálních protilátek

proti antigenu TAG72 spojenému s nádorem, které se exprimují v adenokarcinomu žaludku a vaječníků (Zang, J., et al., A genetically engineered single-chain FV/TNF molecule possess the anti-tumor immunoreactivity of FV as well as the cytotoxic activity of tumor necrosis factor. Mol. Immunol. 1995. 32: 873-81).

Vynález dále popisuje pre-cílení nádoru použitím systému biotin/avidin. Podle tohoto systému se získá v různých stádiích ternární komplex na antigenním místě nádoru, který je tvořen 1) biotinem značenou monoklonální protilátkou, 2) avidinem (nebo streptavidinem) a 3) bivalentním cytokinem upraveným ligandem CD13 a biotinem. Řada článků prokázalo, že předchozí cílení ve srovnání s běžným cílením s imunologickými konjugáty může ihned zvýšit poměr aktivní molekuly směřované k cíli ku volné aktivní molekule, čímž se snižuje toxicita léčby (popisuje se v publikacích Colombo, P., et al., Immunoscintigraphy with anti-chromogranin A antibodies in patients with endocrine/neuroendocrine tumors. J. Endocr. Invest. 1993. 16: 841-3, Modorati, G., et al., Immunoscintigraphy with three step monoclonal pretargeting technique in diagnosis of uveal melanoma: preliminary results. Br. J. Ophthalm. 1994. 78: 19-23, Paganelli, G., et al., Clinical application of the avidin-biotin systém for tumor targeting. In D. Goldenberg (Ed. Cancer Therapy with radiolabeled antibodies. CRC Press, Boca Raton, 1995. P. 239-253, Paganelli, G., et al., Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigenpositive patients. Cancer Res. 1991. 51: 5960-6). Tento přístup dává nejlepší výsledky s TNF značeným biotinem, který byl schopen vyvolat cytotoxicitu *in vitro* a potlačit růst nádorových buněk za podmínek, při kterých normální TNF nebyl aktivní (popisuje se v publikaci Moro, M. et al., Tumor cell targeting with antibody-avidin complexes and biotinylated tumor necrosis factor alpha. cancer Res. 1997. 57: 1922-8, Gasparri, A. et

al., Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: Induction of tumor-specific immunity. J. Immunol. 1987. 138: 4023-32). Přístup pre-cílení se může provést postupem ve dvou fázích použitím bispecifické protilátky, která se ve stejný okamžik váže na nádorový antigen a upravený cytokin. Popisuje se použití bispecifické protilátky určené proti karcinoembryonálnímu antigenu a TNF jako způsoby předchozího cílení TNF do nádoru (popisuje se v publikaci Robert, b., et al., 1996. Cytokine targeting in tumors using a bispecific antibody directed against carcinoembryonic antigen and tumor necrosis factor alpha. cancer Res. 56: 4758).

Vynález dále popisuje molekulu TNF konjugovanou s ligandem CD13 a protilátkou nebo jeho fragmentem (přímo nebo nepřímo prostřednictvím můstku biotin-avidin) na různých podjednotkách TNF, kde protilátka nebo její fragmenty jsou řízeny přímo proti antigenu exprimovanému na nádorových buňkách nebo jiných komponentech nádorového stromatu, například tenaskin a oblast EDB fibronektinu. To vede k dalšímu zlepšení vlastností cílení upraveného cytokinu do nádoru a k pozdějšímu pomalému uvolňování v mikroprostředí nádoru pomocí transice trimer-monomer-trimer. Jak je uvedeno v předcházejících pracích ve skutečnosti upravené podjednotky konjugátů TNF se mohou disociovat z cílových komplexů a znovu spojovat za vzniku neupravených trimerových molekul TNF, které pak difundují v mikroprostředí nádoru. Ukazuje se, že k uvolnění bioaktivního TNF dochází 24 až 48 hodin po cílení (popisuje se v publikaci Corti, A., et al., Tumor targeting with biotinylated tumor necrosis factor alpha: Structure activity relationships and mechanism of action on avidin pretargeted tumor cells. Cancer Res. 1998. 58: 3866-3872).

Při léčbě se upravené cytokiny podle vynálezu vhodně zavedly do farmaceutických přípravků, které jsou vhodné pro orální nebo parenterální aplikaci. Výhodné jsou prostředky pro parenterální aplikaci a obsahují roztoky nebo suspenze, které je možné zavést injekcí, a tekutiny vhodné pro infúzi. Při přípravě parenterálních forem účinné množství aktivní složky se rozpustí nebo suspenduje ve sterilním nosiči, je možné přidat pomocné látky, jako je například rozpouštědla, izotonická činidla, konzervační činidla, stabilizátory, emulzifikační činidla nebo dispergační činidla a následně se rozdělí do zatavených zkumavek nebo ampulí.

Příprava cytokinů ve formě lipozomů může zlepšit jejich biologickou aktivitu. Ve skutečnosti se pozorovalo, že acylace aminoskupin TNF vyvolává růst hydrofobicity aniž dojde ke ztrátě biologické aktivity *in vitro*. Dále se popisuje, že TNF vázané na lipidy vykazuje nedotčenou cytotoxicitu *in vitro*, imunomodulační účinky a sníženou toxicitu *in vivo* (Debs, R. J., et al., Liposome-associated tumor necrosis factor retains bioactivity in the presence of neutralizing anti-tumor necrosis factor antibodies. J. Immunol. 1989. 143: 1192-7, Debs, R. J., et al., Immunomodulatory and toxic effects of free and liposome-encapsulated tumor necrosis factor alpha in rats. Cancer Res. 1990. 50: 375-80).

Maximální tolerovaná dávka TNF u lidí je 218-410 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (popisuje se v publikaci Fraker, D. L., Alexander, H. R. and Pass, H. I., 1995. Biologic therapy with TNF: systemic administration and carcinoembryonic antigen and tumor necrosis factor alpha. Cancer Res. 56: 4758), což je přibližně desetkrát nižší ve srovnání s účinnou dávkou u zvířat. Na základě dat získaných z myších modelů je nutná desetkrát vyšší dávka, aby se dosáhlo protinádorových účinků u lidí (popisuje se v publikaci Schraffordt Koops, et al., Hyperthermic isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and

melphalan as treatment of locally advanced or recurrent soft tissue sarcomas of the extremities. Radiotherapy and Oncology 1998. 48: 1-4). Při první klinické studii se získaly vysoké odezvy při použití jediné dávky 4 mg TNF v kombinaci s melfalanem a interferonem γ (popisuje se v publikaci Lienard, D., et al., In transit metastasis of malignant melanoma treated by high dose rTNF alpha in combination with interferon-gamma and melphalan in isolation perfusion. World Journal of Surgery 1992. 16: 234-40). Jiné práce ukazují, že interferon γ může být vynechán a že dokonce nižší dávky TNF mohou dostatečně vyvolat léčebnou odezvu (popisuje se v publikaci Hill, S. et al., Low-dose tumor necrosis factor alpha and melphalan in hyperthermic isolated limb perfusion. Br. J. Surg. 1993. 80: 995-7, Eggermont, A. M., et al., Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. Ann. Surg. 1996. 224: 756-65). Stejně jako dva cytokiny vykazují synergické účinky na endoteliální buňky, jejich kombinované selektivní cílení podobně vede k silnější proti nádorové aktivitě, což umožňuje překonat problémy spojené se systémovou toxicitou, s kterou je obvykle spojena léčba zhoubného bujení, když se použije kombinace stejných cytokinů. Dále je známo, že TNF může snížit bariérovou funkci endoteliálních cév, čímž se zvýší jejich prostupnost makromolekul. Vzhledem k nižší toxicitě léčby upravenými molekulami TNF podle vynálezu a jejich schopnosti cílit cévy nádoru, je možné je dále použít za účelem zvýšení prostupnosti dalších látek do nádorových cév ať už pro terapeutické tak diagnostické účely. Upravené TNF se mohou použít například při zvýšení pohlcení radioaktivně značených protilátek nebo hormonů nádorem (látky sloužící k zobrazení nádoru) při radioimunoscintigrafii nebo radioimunoterapii nádorů. V jiném případě mohou také zesílit pohlcení

chemoterapeutických léků, imunotoxinů, lipozomů nesoucích léky nebo genů nebo jiných léků proti zhoubnému bujení tak, že se zesílí jejich protinádorový účinek.

Cytokiny podle vynálezu se mohou použít v kombinovaných, oddělených nebo po sobě jdoucích prostředcích a také s jinými diagnostickými nebo léčebnými prostředky při léčbě nebo diagnostice zhoubného bujení.

Vynález dále popisuje cDNA kódující zde popsané konjugované cytokiny, které se mohou připravit z cDNA cytokinů adicí sekvence DNA sousedící s 3'-koncem nebo 5'-koncem, která kóduje ligand CD13, s výhodou pro cílení peptidy popsané shora v textu. Kombinovaná cDNA se může použít jako taková nebo se může začlenit do vektorů a použít při genové terapii. Příprava a terapeutické aplikace vhodných vektorů se popisují v publikaci Mizuguchi, H. et al., Tumor necrosis factor alpha-mediated tumor regression by the in vivo transfer of genes into the artery that leads to tumor. Cancer Res. 1998. 58: 5725-30).

Popis obrázků na výkrese

Obrázek č. 1: Účinek TNF a NGR-TNF na růst lymfomů RMA-T (a a b) a na tělesnou hmotnost zvířete (c a d)

5 zvířat ve skupině se ošetřilo jedinou dávkou TNF nebo NGR-TNF (i.p.) deset dní po implantaci nádoru. Hodnoty oblasti nádoru 14. den jako funkce dávky (b) a ztráty tělesné hmotnosti po léčbě (průměr hodnot získaných 11. a 12. den) (d) se získaly z logaritmických křivek. Protinádorové účinky vyvolané 1 μ g nebo 9 μ g NG-TNF 14. den byly větší než ty vyvolané srovnatelným množstvím TNF ($P=0,024$ a $P=0,032$), zatímco ztráta tělesné hmotnosti po této léčbě byla podobná.

Šipky označují extrapolované dávky TNF a NGR-TNF, které vyvolávají srovnatelné účinky.

Obrázek č. 2: Účinek monoklonálních protilátek R3-63 a CNGRC na protinádorovou aktivitu NGR-TNF (a) a TNF(b)

Monoklonální protilátky R3-63 nebo CNGRC se smíchal s NGR-TNF nebo TNF a aplikovaly se zvířeti nesoucí nádor RMA-T 12 dní po implantaci nádoru (n=5 zvířat ve skupině). V dalším experimentu (c) se TNF a NGR-TNF se společně aplikovaly s CNGRC nebo CARAC (kontrolní peptid) zvířatům, které nesou nádory staré 11 dní (n=5). Proti nádorový účinek 1 μ g NGR-TNF byl silnější než účinek 9 μ g TNF ($P=0,009$, t-test v den 20) a podstatně se inhiboval pomocí CNGRC ($P=0,035$) a monoklonálními protilátkami R3-63 ($P=0,011$).

Obrázek 3: Účinek omezeného triptického štěpení NGR-TNF a TNF na jejich hmotnost (a) a proti nádorovou aktivitu (b).

Agaróza obsahující trypsin se připravila přidáním 1 mg trypsinu do 1 ml aktivované sefarozy CH (od firmy Pharmacia-Upjohn) podle instrukcí výrobce. NGR-TNF a TNF (170 μ g každé látky se přidalo do 300 μ l 0,15 M chloridu sodného, 0,05 M fosforečnan sodný, pH7,3) se smíchaly s 15 μ l suspenze pryskyřice (1:4) nebo samotného pufru a nechaly se rotovat při teplotě 37 °C po určenou dobu. Čtyři produkty se filtrovaly pomocí zařízení Spin-X s velikostí pórů 0,22 μ m (od firmy Costar, Cambridge, MA) a uchovávaly se při teplotě -20 °C až do okamžiku použití.

(a) Elektrosprejová hmotnostní spektrometrická analýza. Hodnoty molekulové hmotnosti a odpovídající produkty (N-terminální sekvence) jsou uvedeny na každém píku. Šipky na sekvencích vykazují místo štěpení. (b) Účinek 1 nebo

3 μ g NGR-TNF a TNF inkubovaných bez (horní panel) nebo s (nižší panel) trypsinem na růst nádorů RMA-T a tělesnou hmotnost zvířete (průměr $\pm$ střední odchylka ve skupině ošetřené dávkou 1 a 3 μ g). Zvířata se ošetřila 13 dní po implantaci nádoru (n=5 zvířat ve skupině).

Obrázek č. 4: SDS-PAGE a protinádorová aktivita lidského NGR-TNF před a po denaturaci/opětném sbalení

SDS-PAGE za neredukčních podmínek (A) lidského TNF (a), NGR-TNF před (b) a po (c) denaturaci a opětném sbalení se popisuje v příkladu 5.

Účinek TNF a nesbaleného NGR-TNF na růst lymfomů RMA-T (B) a tělesnou hmotnost (C). Účinek lidského TNF (D) a opětně sbaleného NGR-TNF (obsahující více jak 95 % trimerů s disulfidy uvnitř řetězce) (E) na růst nádoru. Zvířata (15 nebo 5 myši ve skupině, jak se uvádí v každém panelu) se ošetřilo jednou dávkou TNF nebo NGR-TNF aplikovanou i.p. deset dní po implantaci nádoru.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Příprava myšího TNF a NGR-TNF

Myší rekombinant TNF a Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF (NGR-TNF) se produkoval cytoplazmatickou expresí cDNA v mikroorganismu *E. coli*. cDNA kódující myší Met-TNF₁₋₁₅₆ (popisuje se v publikaci Pennica, D., et al., Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. Proc. Natl. Sci. USA 1985, 82: 6060-4) se připravil polymerázovou řetězcovou reakcí za použití reverzní transkriptázy (RT-PCR) mRNA izolované z myších buněk monocyt-makrofág RAW-2647 stimulovaných lipopolysacharidem za použití

5'-CTGGATCCTCACAGAGCAATGACTCCAAAG-3' a

5'-TGCCTCACATATGCTCAGATCATCTTCTC-3' jako 3'a 5'primerů.

Amplifikovaný fragment se štěpil restrikčními enzymy NdeI a BamHI (New England Biolabs, Beverley, MA) a klonoval se do vektoru pET-11b (Novagen, Madison, WI), který se předem štěpil stejnými enzymy (pTNF).

cDNA kódující Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Gly-TNF₁₋₁₅₆ se amplifikoval pomocí PCR na pTNF za použití 5'-GCAGATCATATGTGCAACGGCCGTTGCGGCCTCAGATCATCTTCTC-3' jako primeru 5' a primeru 3', který se popisuje shora v textu. Amplifikovaný fragment se štěpil a klonoval do vektoru pET-11b, jak se popisuje shora v textu a použil se k transformaci buněk E. coli BL21(DE3) (od firmy Novagen). Exprese TNF a NGR-TNF se vyvolala isopropyl- β -D-thiogalaktosidem podle instrukcí výrobce pET11b. Rozpustný TNF a NGR-TNF se získal ze dvou litrů kultury sonikací bakterií v 2 mM kyselině etylendiamintetraoctové, 20 mM Tris-HCl, pH8,0. Pak následovala centrifugace při 15 000xg po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. Oba extrakty se smíchaly síranem amonným (25 % saturace), nechaly se stát po dobu jedné hodiny při teplotě 4 °C a dále se centrifugovaly, jak se popisuje shora v textu. Síran amonný obsažený v supernatantech se pak z 65 % saturoval a nechal se stát při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin a pak proběhla další centrifugace. Každý pelet se rozpustil v 200 ml 1M síranu amonného, 50 mM Tris-HCl, pH8,0 a čistil se chromatografií s hydrofóbními interakcemi na koloně Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (od firmy Pharmacia-Upjohn) (použila se eluce gradientem pufru A: 50 mM fosforečnan sodný, pH8,0 obsahující 1M síran amonný, pufr B: 20% glycerol, 5% metanol, 50 mM fosforečnan sodný, pH8,0). Frakce obsahující imunoreaktivní materiál TNF (westernovým přenosem) se spojily, dialyzovaly se proti 2 mM kyselině etylendiamintetraoctové, 20 mM Tris-HCl, pH8,0 a dále se čistily chromatografií s výměnou

iontů na koloně DEAE-Sepharose Fast Flow (firma Pharmacia-Upjohn) (použila se eluce gradientem pufru A: 20 mM Tris-HCl, pH8,0, pufr B: 1M chlorid sodný, 20 mM Tris-HCl, pH8,0). Frakce vykazující TNF-imunoreaktivitu se spojily a čistily se gelovou filtrační chromatografií na koloně Sephacryl-S-300 HR (od firmy Pharmacia-Upjohn), která se předem uvedla do rovnovážného stavu a eluovala se 150 mM chloridem sodným, 50 mM puforem fosforečnanu sodného s hodnotou pH 7,3 (PBS). Frakce odpovídající produktům o molekulové hmotnosti 40 000 až 50 000 se spojily a rozdělily se do alikvotů a uchovávaly se při teplotě -20 °C. Všechny roztoky používané v chromatografickém kroku se připravily použitím sterilní vody, která neobsahuje toxiny (Salf, Bergamo, Itálie). Konečný výtěžek byl 45 mg TNF a 34,5 mg NGR-TNF.

Molekulová hmotnost čištěného TNF a NGR-TNF se měřila elektrosprejovou hmotnostní spektrometrií. Obsah proteinu se měřil za použití běžně dostupných sad pro testování proteinů (Pierce, Rockford, IL). Obsah endotoxinu NGR-TNF a TNF byl 0,75 jednotek na jeden mikrogram a 1,38 jednotek na jeden mikrogram, jak se stanovilo kvantitativním chromogenním testem lyzátu amoebocytu lymulu (LAL) (firma BioWhittaker).

Polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) a analýza westernovým přenosem se provedly použitím 12,5 nebo 15% polyakrylamidových gelů a standardních postupů.

Malé množství TNF a NGR-TNF se dále čistilo afinitní chromatografií na rozpustném receptoru p55-TNF (sTNF-R1)-Sepharose následujícím způsobem. 5 mg rekombinantu sTNF-R1 se připravilo způsobem popsáným v publikaci Corti, A., et al., Up-regulation of p75 Tumor necrosis factor alpha receptor in Mycobacterium avium-infected mice. Infect. Immun. 1999, 67: 5762-5767) a nanesl se na kolonu Activated-CH-Sepharose o

objemu 2 ml (firma Pharmacia) podle instrukcí výrobce. Dvě oddělené kolony (každá měla objem 1 ml) se extenzivně promyly sterilním roztokem, který neobsahuje toxiny, a nanesly se spolu s čištěným TNF nebo NGR-TNF obsaženým v PBS a vymyly se gradientovou elucí (eluze trvala 1 hodinu a použil se pufr A: PBS, pufr B: 0,5 M chlorid sodný, 0,2 M glycin-HCl). Frakce obsahující TNF-antigen se neutralizovaly a dialyzovaly proti sterilnímu fyziologickému roztoku. Aby se zabránilo adsorbci proteinů na membrány přidal se před dialýzou lidský serový albumin (0,5 mg/ml), který neobsahuje toxin. Obsah TNF v každé frakci se měřil testem ELISA a cytolytickým testem.

Neredukující SDS-PAGE TNF zobrazila jediný pruh odpovídající velikosti 17 000 až 18 000, jak se očekává v případě monomerního TNF (není zobrazeno). Neredukující SDS-PAGE a analýza westernovým přenosem NGR-TNF ukázala, že různé imunoreaktivní formy s molekulovou hmotností 18 000, 36 000 a 50 000 pravděpodobně odpovídají monomerům, dimerům a trimerům. Za redukujících podmínek většina pruhů odpovídající molekulové hmotnosti 50 000 a 36 000 se převedly na formu odpovídající molekulové hmotnosti 18 000, což naznačuje přítomnost molekul NGR-TNF obsahující disulfidové můstky uvnitř řetězce. Pruh s molekulovou hmotností 18 000 odpovídal přibližně 2/3 celkového materiálu, zatímco pruh s molekulovou hmotností 36 000 odpovídal většině ze zbývajících částí. Tyto elektroforetické paterny naznačují, že NGR-TNF je směs trimerů vytvořených ze tří monomerních podjednotek se správnými disulfidy uvnitř řetězce (alespoň 50 %) a zbýající část tvoří většinou trimery obsahující jeden nebo více disulfidů uvnitř řetězce. Při SDS-PAGE za redukčních podmínek je možné stále vidět pruh s molekulovou hmotností 36 000, což naznačuje, že NGR-TNF obsahuje také nevratně denaturovaný dimér (tvoří přibližně 10 % celkového množství).

Molekulová hmotnost monomerů TNF a NGR-TNF stanovená elektrosprejovou hmotnostní spektrometrií byla 17 386,1 +/- 2,0 a 17 843,7 +/- 2,5. Tyto hodnoty odpovídají velmi dobře hmotnosti očekávané pro Met-TNF₁₋₁₅₆ (17 386,7 Da) a v případě CNGRCG-TNF₁₋₁₅₆ (17 844,2 Da).

Příklad 2: Cytotoxická aktivita *in vitro* myšího TNF a NGR-TNF

Bioaktivita TNF a NGR-TNF se odhadla na základě standardního cytologického testu založeného na L-M myších fibroblastech (ATCC CCL1.2) jak se popisuje v publikaci Corti, A., et al., Tumor necrosis factor (TNF) alpha quantification by ELISA and Bioassay: effects of TNF alpha-soluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubations. J. Immunol. Meth. 1994. 177:191-198). Cytolytická aktivita TNF a NGR-TNF vůči buňkám RMA-T se testovala v přítomnosti 30 ng/ml aktinomycinu D. Každý vzorek se analyzoval ve dvou provedeních ve třech různých ředěních. Výsledky se exprimují jako průměr +/- střední odchylka dvou až tří nezávislých testů.

Cytotoxická aktivita TNF a NGR-TNF *in vitro* byla 1,2 +/- 0,14 x 10⁸ jednotek na jeden miligram a 1,8 +/- 0,7 x 10⁸ jednotek na jeden miligram, což se stanovilo standardním cytolytickým testem s buňkami L-M. Tyto výsledky ukazují, že částí CNGRCG v molekule NGR-TNF nebrání balení, oligomerizaci a navázání na receptor TNF.

V předchozí studii se ukázalo, že buňky RMA-T mohou být usmrceny TNF v přítomnosti 30 ng/ml aktinomycinu D, zatímco v nepřítomnosti inhibitorů transkripce jsou tyto buňky rezistentní vůči TNF, dokonce po několika dnech inkubace. Cytotoxická aktivita NGR-TNF *in vitro* vůči buňkám RMA-T v přítomnosti aktinomycinu D byla 1,4 +/- 0,8 x 10⁸ jednotek na jeden miligram, což se stanovilo použitím TNF jako standardu

(1,2 +/- 0,14 x 10⁸ jednotek na jeden miligram). Pak cytotoxické aktivity NGR-TNF a TNF byly podobné v případě buněk L-M a RMA-T.

Příklad 3: Charakterizace léčebné a toxické aktivity myšího TNF a NGR-TNF

RMA lymfom pocházejí z myši C57BL/6 vyvolaný Rauscherovým virem se udržoval in vitro v kultivačním médiu obsahujícím RPMI 1640, 5% fetální bovinní sérum (FBS), 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 0,25 µg/ml amfotericinu B, 2 mM glutaminu a 50 µM 2-merkaptoetanolu. RMA-T se získal z buněčné linie RMA transfekcí s konstrukcí kodující alelu Thy 1.1 a kultivoval se způsobem popsáným v publikaci Moro, M., et al., Tumor cell targeting with antibody-avidin complexes and biotinylated tumor necrosis factor alpha. Cancer Res. 1997. 57: 1922-8).

Buňky melanomu B16F1 se kultivovaly v kultivačním médiu obsahujícím RPMI 1640, 5% FBS, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu, 0,25 µg/ml amfotericinu B, 2 mM glutaminu, 1% MEM neesenciální aminokyselinu (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgie).

In vivo studie provedené na zvířecích modelech byly schváleny etickou komisí instituce San Raffaele H Scientific Institute a provedly se podle popisu. C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Itálie) (16 až 18 g) se imunizovaly živými buňkami RMA-T nebo B16F1 v počtu 5x10⁴ podkožně do levého boku. Deset až dvanáct dní po implantaci nádoru se myši ošetřily injekcí i.p. 250 µl roztoků TNF nebo NGR-TNF ředěných 0,9% chloridem sodným, který neobsahuje toxiny. Předchozí experimenty ukázaly, že proti nádorová aktivita se přidáním lidského sérového albuminu k TNF a NGR-TNF nezměnila. Lidský

sérový albumin slouží jako nosič. Každý experiment se provedl ve skupině, která obsahuje pět myší. Růst nádoru se monitoroval denně měřením velikosti nádoru posuvným měřidlem. Oblast nádoru se odhadla výpočtem $r_1 \times r_2$, zatímco objem nádoru se odhadl výpočtem $r_1 \times r_2 \times r_3 \times 4/3$, kde r_1 a r_2 jsou délka a šířka a r_3 je tloušťka nádorů vystupující z normální kůže. Zvířata byla usmrcena dříve než nádor dosáhl průměru 1 až 1,3 cm. Velikosti nádoru jsou zobrazeny jako průměr $\pm$ střední odchylka (5 až 10 zvířat v jedné skupině, jak je označeno v popisu obrázku) a porovnaly se pomocí t-testu.

Protinádorová aktivita a toxicita NGR-TNF se porovnávaly s aktivitou a toxicitou lymfomu RMA-T a s modely melanomu B16F1 u myší C57BL6. Protože model RMA-T se už dříve charakterizoval a používal se ke studiu protinádorové aktivity TNF s různými cílovými protokoly (popisuje se v publikaci Gasparri, A., et al., Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor alpha in mouse models. cancer Res. 1999. 59: 2917-23), bylo rozhodnuto použít tento model také v této studii.

Myší TNF aplikované zvířatům nesoucím RMA-T nádory způsobuje o 24 hodin později redukci hmotnosti nádoru a hemoragickou nekrózu v centrální části nádoru, pak následuje podstatné zpomalení růstu trvající několik dní (popisuje se v publikaci Gasparri, A., et al., Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of biotinylated tumor necrosis factor alpha in mouse models. cancer Res. 1999. 59: 2917-23). Léčba s TNF nevyvolává úplnou regresi tohoto nádoru, dokonce ani při dávce blízké LD50, kolem nekrotické oblasti zůstávají živé buňky a několik dní po léčbě začínají opět růst.

Při první sadě experimentů se zkoumal účinek různých dávek (i.p.) TNF nebo NGR-TNF na přežití zvířat. Aby se zabránilo velkému utrpení, zvířata se usmrtila, když průměr nádoru byl větší než 1 až 1,3 cm. Úmrtnost při aplikaci TNF a NGR-TNF 3 dni po léčbě byla podobná (LD50, 60 µg respektive 45 µg), zatímco jejich protinádorová aktivita byla znatelně odlišná (Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Přežití myši s lymfomem RMA-T léčených myším TNF nebo NGR-TNF

léčba	zvířata (n)	dávka (µg)	přeživší (%) ^(a) po léčbě							
			den 3	den 7	den 14	den 21	den 30	den 38 (2. im.) ^b	den 62 (3. im.) ^b	den 92
žádná	18	0	100	0						
TNF	4	1	100	20	0					
	9	3	100	55	0					
	9	9	100	55	22	11	0			
	14	27	100	57	14	7	0			
	9	54	55	55	0					
	9	108	0							
NGR- TNF	10	1	100	70	10	10	0			
	10	3	100	80	20	20	0			
	9	9	100	88	55	22	11	11	11	
	13	27	100	85	30	23	15	15	15	11
	9	54	33	33	0					
	9	108	0							

a) Zvířata s nádorem ošetřená TNF nebo NGR-TNF (i.p.) 10 dní po implantaci nádoru. Zvířata se usmrtila, když průměr nádoru přesáhl 1 až 1,3 cm.

b) Přeživší zvířata se v uvedeném čase opětne imunizovala buňkami RMA-T v množství 50 000 (druhá imunizace) nebo RMA v množství 50 000 (třetí imunizace). Tumorigenicita buněk zavedených injekcí se sledovala v každém určeném čase u 5-ti normálních zvířat. U všech kontrolních zvířat se vyvinul nádor během 10-ti dní (data nejsou uvedena).

Například 1 nebo 3 μg NGR-TNF zpomalí růst nádoru účinněji než 27 μg TNF, což ukazuje, že NGR-TNF je alespoň o jeden řád aktivnější. Je zajímavé, že některá zvířata se léčila dávkami NGR-TNF nižšími než je LD50, zatímco žádná zvířata se neléčila TNF. Léčená zvířata potlačila další imunizaci tumorogenní dávkou buněk RMA-T nebo buněk RMA divokého typu, což naznačuje, že jediná aplikace NGR-TNF byla schopna vyvolat ochrannou imunitu. Za zmínku stojí, že zvýšení dávky TNF nebo NGR-TNF nad 9 až 27 μg znatelně zvyšuje toxicitu a velmi málo nebo vůbec terapeutickou aktivitu.

Ztráta tělesné hmotnosti po aplikaci TNF je dobře známým signálem systémové toxicity (Gasparri, A. et al., Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of botinylated tumor necrosis factor-alpha and the comparison with other cytokines: Induction of tumor-specific immunity. J. Immunol. 1987. 138: 4023-32). Za účelem dalšího porovnání TNF a TGR-TNF se sledoval růst nádoru a tělesná hmotnost zvířat po léčbě. Účinek 1 μg NGR-TNF na růst nádoru byl podobný nebo vyšší ve srovnání s 9 μg TNF (zobrazeno na obrázku č. 1a), zatímco ztráta tělesné hmotnosti jeden až dva dni po léčbě se porovnávala s dávkou 1 μg TNF (zobrazeno na obrázku č. 1c). Když se interpolovaly data s logaritmickou křivkou v grafu závislosti na dávce, zjistilo se, že terapeutický účinek 9 μg TNF po 14 dnech je stejně malý jako se získal s dávkou 0,6 μg NGR-TNF (zobrazeno na obrázku č. 1b). Naopak dávka 8,5 μg byla

nezbytná, aby se vyvolal porovnatelný toxický účinek (zobrazeno na obrázku č. 1d). Tímto způsobem vypočtený poměr účinnost/toxicita NGR-TNF za daných podmínek je 14 krát vyšší než poměr v případě TNF.

Podobné výsledky se získaly v modelu melanomu B16F1. Léčba jedním mikrogramem NGR-TNF v den 11 a 17 vyvolala v den 19 protinádorovou odezvu vyšší než se získala použitím 4 μ g TNF a podobnou odezvě vyvolanou 12 μ g TNF (data nejsou uvedena). Naopak ztráta tělesné hmotnosti způsobená 1 μ g NGR-TNF byla znatelně nižší než ztráta způsobená 4 a 12 μ g TNF. Léčba 12 μ g NGR-TNF způsobila dokonce silnější protinádorový účinek, zatímco toxický účinek byl podobný účinku získanému aplikací 12 μ g TNF.

Když se v den 19 aplikovala třetí imunizace ve všech skupinách se zaznamenalo o 1 až 2 dni později úmrtí některých zvířat (2 zvířata mimo skupinu 5-ti zvířat ošetřené fyziologickým roztokem a 12 μ g NGR-TNF a 1 zvíře mimo 5 zvířat ve zbývajících skupinách). Jedno zvíře ošetřené 12 μ g NGR-TNF zcela potlačilo vznik nádoru. Když se toto zvíře imunizovalo druhou tumorogenní dávkou buněk B16F1 po 18-ti dnech se vyvinul hmatatelný nádor, zatímco u kontrolních zvířat se nádor vyvinul během 6 až 7 dní.

Tyto výsledky dohromady naznačují, že účinnost NGR-TNF při inhibici růstu nádoru je 10 až 15 vyšší než v případě TNF, zatímco toxicita je podobná. NGR-TNF mohou vyvolat účinnější ochranou imunitní odezvu ve srovnání s TNF.

Příklad 4: Mechanismus působení NGR-TNF

Monoklonální protilátky proti myšimu CD13 R3-63 se izolovaly z ascitických tekutin chromatografií za použití

sefarozy s proteinem G (firma Pharmacia-Upjohn, Uppsala, Švédsko) a dialyzovaly se proti 0,9 % chloridu sodnému.

Králičí polyklonální antisérum se získalo z Primm srl (Milan, Itálie) a čistilo se afinitní chromatografií na sefaroze s proteinem A (firma Pharmacia-Upjohn, Uppsala, Švédsko). Peptidy CNGRC a CARAC se připravily způsobem popsáným dříve v textu (popisuje se v publikaci Arap, W., et al., Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. Science 1998. 279: 377-80).

Aby se získaly důkazy, že lepší aktivita NGR-TNF je závislá na cílení nádoru prostřednictvím části NGR, zkoumalo se zda in vivo aktivita NGR-TNF může částečně konkurovat s CNGRC. Myším nesoucím nádor RMAT-T se aplikovalo NGR-TNF (1 µg) s molárním nadbytkem CNGRC nebo bez molárního nadbytku. Paralelně se jiná zvířata ošetřila pomocí TNF (3 nebo 9 µg) opět, kde CNGRC může nebo nemusí být v nadbytku. Jak se očekávalo CNGRC podstatně snižuje proti nádorovou aktivitu NGR-TNF (zobrazeno na obrázku č. 2a), ale nikoli aktivitu TNF (zobrazeno na obrázku č. 2b). Kontrolní peptid (CARAC) nebyl schopen způsobit podstatné snížení aktivity NGR-TNF (zobrazeno na obrázku č. 2c). Tyto výsledky naznačují, že CNGRC soutěží o navázání NGR-TNF na receptor CNGRC a podporuje hypotézu, že mechanismus cílení zlepšuje aktivitu. Je nutné poznamenat, že CNGRC není schopen snížit cytotoxickou aktivitu NGR-TNF in vitro (data nejsou uvedena).

Protože se publikovalo, že aminopeptidáza N (CD13) je receptor peptidů CNGRC, zkoumala se úloha tohoto receptoru v mechanismu cílení NGR-TNF. Studoval se účinek monoklonálních protilátek proti CD-13 (R3-63) na proti nádorovou aktivitu NGR-TNF a TNF. Monoklonální protilátky R3-63 podstatně inhibovaly protinádorovou aktivitu NGR-TNF (zobrazeno na obrázku č. 2a), ale nikoli aktivitu TNF (zobrazeno na obrázku

ukazuje, že CD13 se kritickým způsobem podílí na protinádorové aktivitě NGR-TNF. Za použití analýzy FACS se nepozorovala žádná exprese CD13 na povrchu buněk RMA-T, které se kultivovaly s monoklonálními protilátkami R3-63 (není zobrazeno), což naznačuje, že protilátky rozeznávají jiné buňky in vivo.

Ačkoli tyto data ukazují, že CD13 je důležitý receptor v případě NGR-TNF, nemůžeme zcela vyloučit, že na mechanismu cílení se také podílí navázání na jiné ještě neidentifikované receptory, i když v menší míře.

Předchozí experimenty částečné proteolýzy ukázaly, že Arg-Ser vázaný na N-terminální segment TNF (zbytky 2-3) je velmi citlivý na trypsin, zatímco zbytek molekuly je daleko více rezistentní. Aby se získal další důkaz, že zlepšená aktivita NGR-TNF je spojena s jeho částí NGR, z N-terminální oblasti muteinu se odštěpila doména NGR částečným štěpením s imobilizovaným trypsinem. Tato léčba převedla NGR-TNF a TNF na molekulu odpovídající fragmentu TNF3-156 (očekávaná hmotnost je 16 986,2, na obrázku č. 3a je zobrazená hmotnost a očekávané sekvence).

Zatímco štěpení nesnížilo cytolytickou aktivitu NGR-TNF in vitro u buněk L-M ((2,3 +/- 1,4) x 10⁸ u/mg)), jeho protinádorová aktivita in vivo se snížila na hodnotu dosaženou TNF (zobrazeno na obrázku č. 3b). Je nutné zmínit, že toxicita NGR-TNF a TNF byly podobné před a po štěpení, jak se usuzovalo ze ztráty tělesné hmotnosti zvířat jeden den po aplikaci (zobrazeno na obrázku č. 3b, na pravém panelu), což naznačuje, že mechanismus cílení závislý na NGR nemění toxicitu.

Příklad 5: Příprava a charakterizace lidského TNF a NGR-TNF

Lidský rekombinantní TNF a NGR-TNF (obsahující lidský TNF1-157 fúzoval s C-koncem CNGRCG) se připravily technologií rekombinace DNA a podstatně se čistily, jak se popisuje v případě myšího TNF a NGR-TNF. cDNA kódující lidský NGR-TNF se připravila PCR použitím plazmidu pET11b/hTNF, který obsahuje kódující sekvenci hTNF (popisuje se v publikaci Pennica, D. et al., 1984. Human tumor necrosis factor: precursor, structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature, 321, 724-729) použitím následujících primerů:

- NGR-hTNF/1 (sense): 5'A TAT CAT ATG TGC AAC GGC CGT TGC

GGC GTC AGA TCA TCdT TCT CG 3'.

- NGR-hTNF/2 (antisense): 5' TCA GGA TCC TCA CAG GGC AAT GAT

CCC AAA GTA GAC 3'.

Amplifikovaný fragment se štěpil a klonoval do pET-11b (NdeI/BamHI) a použil se k transformaci buněk mikroorganismu E. coli BL21 (firma Novagen). Expres NGR-hTNF se vyvolala isopropyl- β -D-thiogalaktosidem podle instrukcí výrobce pET11b. Rozpustný NGR-TNF se získal z kultur o objemu 2 l sonikací bakterií v 2 mM kyselině ethylendiamintetraoctové, 20 mM Tris-HCl, pH8,0, pak následovala centrifugace (15 000 x g, doba 20 minut, teplota 4 °C).

Extrakt se smíchal se síranem amonným (35 % saturece), nechal se stát po dobu 1 hodiny při teplotě 4 °C a dále se centrifugoval, jak se uvádí shora v textu. Síran amonný v supernatantech se pak saturoval ze 65 % a nechal se stát při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin a dále se centrifugoval. Každý pelet se rozpustil v 1 M síranu amonném, 50 mM Tris-HCl, pH8,0 a čistil se hydrofóbní interakční chromatografií na koloně „Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow“ (od firmy Pharmacia-Upjohn) eluce proběhla gradientem, Pufr A: 100 mM fosforečnan sodný, pH8,0 obsahující 1 M síran amonný, pufr B: 70 % ethylenglykol, 5 % metanol, 100 mM fosforečnan sodný, pH 8,0). Frakce obsahující hTNF imunoreaktivní materiál (stanoveno testem

ELISA) se spojil, dialyzoval se proti 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 a dále se čistil chromatografií s výměnou iontů na koloně „DEAE-Sepharose Fast Flow (firma Pharmacia-Upjohn) (eluze proběhla gradientem, pufr A: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, pufr B: 1 M chlorid sodný, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0). Všechny roztoky používané v kroku chromatografie se připravily se sterilní vodou, která neobsahuje endotoxin (Salf, Bergamo, Itálie).

V tomto případě se z kultur o objemu 2 litry získalo přibližně 30 mg TNF a 32 mg NGR-TNF. Neredukující SDS-PAGE zobrazily pruhy odpovídající monomerům, dimérům a trimérům, které naznačují, že také lidské NGR-TNF je směs trimerů se správnými disulfidy uvnitř řetězce a trimery s jedním nebo více disulfidovými můstky uvnitř řetězce (zobrazeno a oobrázku č. 4A, dráha b), jak se pozorovalo u myšího NGR-TNF.

Triméry se správnými disulfidovými můstky uvnitř řetězce se izolovaly z této směsi čtyřstupňovým denaturačním balícím postupem, jehož popis následuje. Čištěný lidský NGR-TNF se denaturoval 7 M močovinou a filtroval se přes kolonu HR Sephacryl S-300 (o objemu 1 025 ml) (firma Pharmacia), která se předem uvedla do rovnováhy 7 M močovinou, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0. Frakce odpovídající monomerickému TNF se spojily, proběhla ultrafiltrace přes membránu YM MWCO 10 kDa (Amicon) a opětně se sbalily dialýzou proti 33 objemům 2,33 M močoviny, 100 mM Tris-HCl, pH 8 při teplotě 4 °C (po dobu 140 minut), pak následuje 1,55 M močovina, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 (po dobu 140 minut) a 1 M močovina, 100 mM Tris-HCl, pH 8,00 (po dobu 140 minut). Nakonec se produkt dialyzoval proti 80-ti objemům 100 mM Tris-HCl (po dobu 16 hodin) a pak proběhla centrifugace při 13 000 x g (po dobu 30 minut) a filtrace přes membránu SFCA s velikostí pórů 0,45 µm (firma Nalgene) a dále filtrace na koloně HR Sephacryl S-300 (o objemu 1 020 ml), která se uvedla do rovnováhy 0,15 M chloridem sodným, 0,05 M

fosforečnanem sodným (PBS). Získalo se přibližně 23 mg opětne sbaleného proteinu.

Konečný produkt byl ve většině případů po neredukující SDS-PAGE monomer (zobrazeno na obrázku č. 4A, dráha c), který měl hydrodynamický objem podobný objemu trimerového lidského TNF, což se stanovilo analytickou gelovou filtrací na HPLC na koloně Superdex 75 HR (data nejsou zobrazena), a jeho molekulová hmotnost byla $17\,937,8 + 1,8$ (očekávaná molekulová hmotnost v případě CNGRCG-TNF1-157 je $17\,939,4$), což se stanovilo elektrosprejovou hmotnostní spektroskopií. Cytolytické aktivity in vitro nesbaleného a sbaleného NGR-TNF v myších buňkách L-M byly $(6,11 \times 10^7) + 4,9$ respektive $(5,09 \times 10^7) + 0,3$ jednotky na miligram, zatímco cytolytická aktivita in vitro lidského TNF byla $5,45 \times 10^7 + 3,1$ jednotky na miligram. Tyto výsledky naznačují, že proces denaturace-opětne sbalení neovlivňuje interakci lidského NGR-TNF s myším receptorem p55.

Protinádorová aktivita in vivo lidského NGR-TNF v množství 1 μg (nesbalený) byla větší než TNF v množství 10 μg (zobrazeno na obrázku č. 4B), zatímco toxicita, jak se odhaduje na základě ztráty hmotnosti zvířat, byla podstatně nižší (zobrazeno na obrázku č. 4C). Po opětne sbalení 0,3 μg NGR-TNF bylo podstatné vyvolat protinádorový účinek, který bude silnější než se dosáhne použitím 10 μg TNF (zobrazeno na obrázku č. 4D, 4E).

Tyto výsledky ukazují, že protinádorová aktivita lidského NGR-TNF je větší než se dosáhlo použitím TNF.

Dále se pozorovalo, že opětne sbalený lidský a myší NGR-TNF může vyvolat podstatné protinádorové účinky v případě myší nesoucích RMA-T dokonce ve velmi nízkých dávkách (1 až 10 ng/myš), aniž se prokáží toxické účinky, zatímco TNF nebyl

schopen vyvolat podstatné účinky při těchto dávkách (není zobrazeno).

Příklad 6: Příprava a charakterizace myšího NGR-IFN γ

Rekombinantní myší interferon (IFN) γ fúzovaný s CNGRC (NGR-IFN γ) se připravil technologií rekombinace DNA v podstatě stejným způsobem, jak se popisuje v případě NGR-TNF. Oblast CNGRC se fúzovala s C-koncem IFN γ . Cystein v poloze 134 se nahradil serinem. Methionin se zavedl do polohy -1 za účelem exprese v buňkách E. coli. Primery PCR používané při produkci cDNA NGR-IFN γ byly 5'-A TAT CTA CAT ATG CAC GGC ACA GTC ATT GAA AGC C (sense) a 5'-TC GGA TCC TCA GCA ACG GCC GTT GCA GCC GGA GCG ACT CCT TTT CCG CTT CCT GAG GC. cDNA se klonovala do pET-11b (Nde I/BamH I) a používala se k transformování buněk E. coli BL21(DE3) (Novagen). Exprese proteinu se vyvolala isopropyl- β -D-thiogalaktosidem podle instrukcí výrobce plazmidu pET11b. Produkt se izoloval z extraktů mikroorganismu E. coli imunoafinitní chromatografií za použití monoklonálních protilátek proti myším IFN γ (AN18) imobilizovaných na agaróze za použití standardních metod. Redukční a neredukční SDS-PAGE finálního produktu ukázala jediný pruh o molekulové hmotnosti 16 000. Elektrosprejová hmotnostní spektrometrie ukázala molekulovou hmotnost 16 223 + 3,6 (očekávaná molekulová hmotnost je 16 255), což odpovídá myšimu Met-IFN γ -134(C134S)CNGRC (NGR-IFN γ).

Schopnost NGR-IFN γ a NGR-TNF soutěžit o navázání protilátek proti CD13 na cévy spojené s nádorem se zkoumaly použitím imunohistochemického přístupu.

Čerstvé chirurgické preparáty karcinomu buněk lidské ledviny se získaly z katedry histopatologie vědeckého ústavu

„San Raffaele H Scientific Institute“. Sekce (5 až 6 μm silné) fixované podle postupem podle Bouin (po dobu 4 až 6 hodin) zalité parafinem se připravily a adsorbovaly na sklíčkách potažených polylyzinem. Antigeny CD13 se detekovaly za použití komplexu avidin-biotin následujícím způsobem: sekce tkání se opětne hydratovaly za použití xylenů a série zesilujících alkoholů za použití standardních postupů. Sekce tkání se umístily do nádoby obsahující 1 mM EDTA a vařily se po dobu 7 minut v mikrovlnné troubě (1 000 W). Nádoba se znovu naplnila 1 mM EDTA a opět se vařila po dobu 5 minut. Sekce tkání se nechaly ležet až se ochladily a inkubovaly se v PBS, který obsahuje 0,3 % peroxidu vodíku po dobu 15 minut. Reakce se zastavila endogenní peroxidázou. Vzorky se pak promyly PBS a inkubovaly se s 100 až 200 μl PBS-BSA (po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti) a pak se nanasly monoklonální protilátky WM15 (anti-hCD13) samotné nebo smíšené s různými kompetenčními činidly (uvedeno v tabulce č. 2) obsaženými v PBS-BSA (nechalo se stát přes noc při teplotě 4 °C). Sklíčka se pak promyla 3 krát (promytí každého sklíčka trvalo 3 minuty) s PBS a inkubovala se s PBS-BSA obsahujícím 2% normální horské sérum (PBS-BSA.NHS) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) po dobu 5 minut. Roztok se pak nahradil 3 $\mu\text{g/ml}$ biotinem značeného koňského anti-myšího IgG (H+L) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) v PBS-BSA-NHS a dále se inkuboval po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti. Sklíčka se opět promyla a inkubovala se po dobu 30 minut s činidlem „Vectastain Elite Reagent“ (Vector Laboratories, Burlingame, CA) ředěném 1:100 v PBS. Tableta 3,3'-diamino-benzidintetrahydrochloridu (Merck, Darmstadt, Německo) se pak rozpustila v 10 ml deionizované vody, která obsahuje 0,03 % peroxidu vodíku. Roztok se filtroval přes membránu s velikostí pórů 0,2 μm a přelila se přes sekce tkáně po dobu 5 až 10 minut. Sklíčka se promyla postupem popsaným shora v textu a k obarvení za účelem počítání se použil Harrisův hematoxylin. Cévy spojené s

nádorem se identifikovaly obarvením sériových sekci tkáně s monoklonálními protilátkami proti CD31 /monoklonální protilátky JC/70A, proti lidskému CD31, IgG1, od firmy DAKO, Kodaň, Dánsko).

Výsledky se sumarizovaly do tabulky 2. Jak je zobrazeno, navázání WM15 na cévy spojené s nádorem se inhibovalo nadbytkem NGR-TNF, NGR-IFN γ a CNGRC, ale nikoli dalšími kontrolními činidly, které neobsahují motiv NGR. To naznačuje, že vazebné místo NGR na CD13 prostorově přesahuje epitop WM15. Naopak NGR-TNF nebyl schopen soutěžit v navázání 13C03 na epiteliální buňky.

Ukazuje se, že část NGR NGR-IFN γ a NGR-TNF může reagovat s formou CD13 rozeznávanou monoklonálními protilátkami WM15 na cévách spojených s nádorem. Tyto výsledky ukazují, že motiv CNGRC je funkční ať už je spojen s N-koncem nebo C-koncem cytokinu.

Tabulka č. 2: Navázání WM15 buněčné sekce karcinomu ledviny v přítomnosti různých kompetitorů

kompetitor	navázání WM15 na cévy spojené s nádorem
žádný	+
NGR-TNF (25 μ g/ml)	-
NGR-IFN γ (50 μ g/ml)	-
CNGRC (100 μ g/ml)	-
TNF (25 μ g/ml)	+
lidský sérový albumin (25 μ g/ml)	+
syntetický CgA(60-68) (100 μ g/ml)	+

^a do kroku blokace se přidal kompetitor v PBS obsahující 2% BSA a smíchal se s primární protilátkou.

^b monoklonální protilátka WM15 (určená proti lidskému CD13, IgG1) se získala u firmy Pharmingen (San Diego, CA), syntetický peptid CgA(60-68) odpovídá fragmentu 60-68 chromograninu A

Příklad 7: Cílené zavedení biotinem značeného NGR-TNF do nádorů za použití protinádorových protilátek a avidinu (pre-cílení)

Následující příklad zobrazuje možnost „dvojího“ cílení TNF založeného na kombinaci protilátek určených protinádoru a peptidu CNGRC.

Konjugát biotin-NGR-TNF se připravil smícháním NGR-TNF s N-hydroxysukcinimidesterem D-biotinyl-6-aminokapronové kyseliny (Società Prodotti Antibiotici S.p.A, Milán, Itálie) v 1M pufru uhličitanu sodném s hodnotou pH 6,8 (po dobu 3 hodiny, při teplotě místnosti) (popisuje se v publikaci Corti, A., et al., Tumor targeting with biotinylated tumor necrosis factor alpha: Structure activity relationships and mechanism of action on avidin pretargeted tumor cells. Cancer Res. 1998. 58: 3866-3872). Reakce se blokovala 1M Tris-HCl s hodnotou pH 7,5.

Konjugát se charakterizoval hmotnostní spektrometrií a zjistilo se, že obsahuje jednu molekulu biotinu na jeden trimer (v průměru). Myši C57BL/6 (Charles River Laboratories, Calco, Itálie se imunizovaly pomocí živých buněk RMA-T v množství 5×10^4 , které se aplikovaly podkožně do levého boku. Když oblast nádoru dosáhla velikosti 40 mm², myši se ošetřily postupně aplikovanými injekcemi biotinem značených protilátek, avidiny a komplexem biotin-TNF podle tří denního protokolu, jak se popisuje shora v textu v publikaci Gasparri, A. et al., Tumor pretargeting with avidin improves the therapeutic index of botinylated tumor necrosis factor-alpha

and the comparison with other cytokines: Induction of tumor-specific immunity. J. Immunol. 1987. 138: 4023-32). Injekcí se zavedlo 40 μ g monoklonální protilátky 19E12 značené biotinem (i.p., krok I), 60 μ g avidinu a 60 μ g streptavidinu po 18 respektive 19 hodinách (i.p., krok II) a o 24 hodin později 3 μ g NGR-TNF značeného biotinem. Každá sloučenina se ředila sterilním roztokem 0,9% chloridu sodného. V kontrolním experimentu se vynechal avidin a streptavidin. Každý experiment se provedl na skupinách myší, kdy každá skupina obsahovala 5 myší. Růst nádoru se zaznamenával denně měřením velikosti nádoru měřítkem. Oblast nádoru ve skupině, které se aplikovalo 19E12-biotin/avidin/streptavidin/biotin-NGR-TNF, před léčbou a deset dní po léčbě byla $39 \pm 4 \text{ mm}^2$ respektive $8 \pm 5 \text{ mm}^2$ (5 zvířat, průměr $\pm$ standardní odchylka). V kontrolní skupině (ošetřené samotnými monoklonálními protilátkami 19E12-biotin/biotin-NGR-TNF) oblasti nádoru před ošetřením a 10 dní po ošetření byly $40 \pm 4 \text{ mm}^2$ respektive $20 \pm 6 \text{ mm}^2$, což ukazuje, že pre-cílení s protilátkami mířícími k nádoru spolu s avidinem zvýšilo aktivitu NGR-TNF.

Seznam sekvencí

(2) Informace o SEQ ID NO: 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bází
- (B) TYP: nukleotidová sekvence
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="umělá sekvence"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

ctggatcctc acagagcaat gactccaaag

30

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- A) DÉLKA: 29 párů bází
- B) TYP: nukleotidová sekvence
- C) DRUH ŘETĚZCE:
- D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="umělá sekvence: primer PCR"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

tgcttcacat atgctcagat catcttctc

29

(2) Informace o SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 46 párů bází
- (B) TYP: nukleotidová sekvence
- (C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="umělá sekvence"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

gcagatcata tgtgcaacgg ccgttgccggc ctcagatcat cttctc

46

(2) Informace o SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 45 párů bazí

(B) TYP: nukleotidová sekvence

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="umělá sekvence: primer PCR"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

ataatcatatg tgcaacggcc gttgcggcgt cagatcatct tctcg

45

(2) Informace o SEQ ID NO: 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 36 párů bazí

(B) TYP: nukleotidová sekvence

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="umělá sekvence: primer PCR"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

tcaggatcct cacagggcaa tgatcccaaa gtagac

36

(2) Informace o SEQ ID NO: 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 35 párů bazí
- (B) TYP: nukleotidová sekvence
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="umělá sekvence: primer PCR"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

atatctacat atgcacggca cagtcattga aagcc

35

(2) Informace o SEQ ID NO: 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 58 párů bazí
- (B) TYP: nukleotidová sekvence
- (C) DRUH ŘETĚZCE:
- (D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: DNA

(ix) ZNAKY:

(D) Jiné informace:

/poznámka="umělá sekvence: primer PCR"/

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

tcggatcctc agcaacggcc gttgcagccg gagcgactcc tttccgctt
cttgaggc

58

19.11.02

DV 2002-2093

84740

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Konjugační produkt v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e vznikl mezi cytokinem vybraným z TNF nebo IFN γ a ligandem receptoru CD13.
2. Konjugační produkt podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený cytokin je TNF α nebo TNF β .
3. Konjugační produkt podle nároků 1 až 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e ligand receptoru CD13 se vybral ze skupiny obsahující protilátky nebo jejich aktivní fragmenty, peptidy nebo napodobeniny peptidů.
4. Konjugační produkt podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený ligand je peptid obsahující motiv NGR.
5. Konjugační produkt podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený peptid se vybral ze skupiny zahrnující CNGRCVSGCAGRC, NGRAHA, GNGRG, cycloCVLNGRMEC, lineární nebo cyklický CNGRC.
6. Konjugační produkt podle libovolného z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e cytokin se derivatizoval polyetylenglykolem nebo acylovým zbytkem.
7. Konjugační produkt podle libovolného z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e cytokin se dále spojuje s protilátkou řízenou na nádorový antigen nebo s jejím fragmentem, s nádorovým angiogenním markerem nebo komponentem extrabuněčné matrice nebo s biotinem.
8. Konjugační produkt podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e cytokin je TNF a je konjugovaný s ligandem

CD13 a v jiném případě s protilátkou, jejím fragmentem nebo biotinem na různých podjednotkách.

9. cDNA kódující cytokin vybraný z TNF a IFN nesoucí sekvenci přilehlou k 5' a 3' konci a kódující ligand CD13.
10. cDNA podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený ligand CD13 je peptid podle nároku 5.
11. Vektor vhodný pro genovou terapii obsahující cDNA podle nároků 9 až 10.
12. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje efektivní množství konjugačního produktu podle nároků 1 až 8 spolu s farmaceuticky přijatelnými nosiči a pomocnými látkami.
13. Prostředek podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je ve formě roztoku nebo suspenze, které je možné aplikovat injekcí, nebo tekutiny, která je vhodná pro infúze.
14. Prostředek podle nároku 12 až 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je ve formě lipozomů.
15. Použití konjugačního produktu podle nároků 1 až 8 nebo cDNA podle nároků 9 až 10 při přípravě léčebných nebo diagnostických prostředků vhodných pro terapii zhoubného bujení.
16. Použití konjugačního produktu podle nároku 15 v kombinaci s jinými protinádorovými činidly nebo diagnostickými látkami, které umožňují zobrazení nádoru.

19.11.02

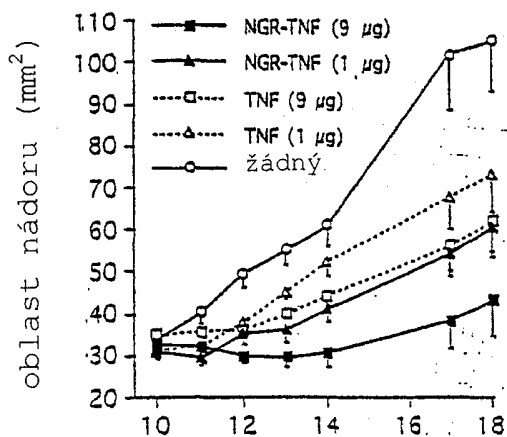
FU 202-8093

84440

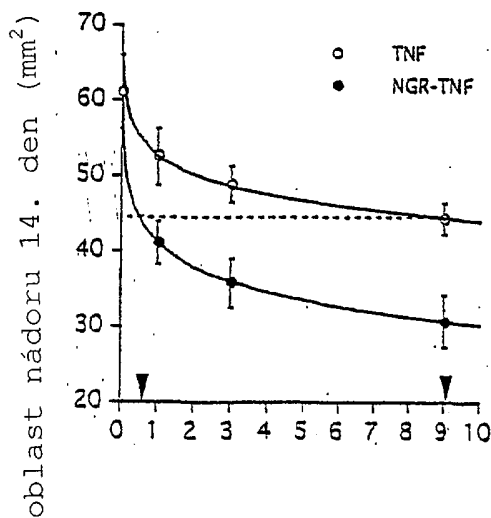
1/9

Obrázek č. 1

a



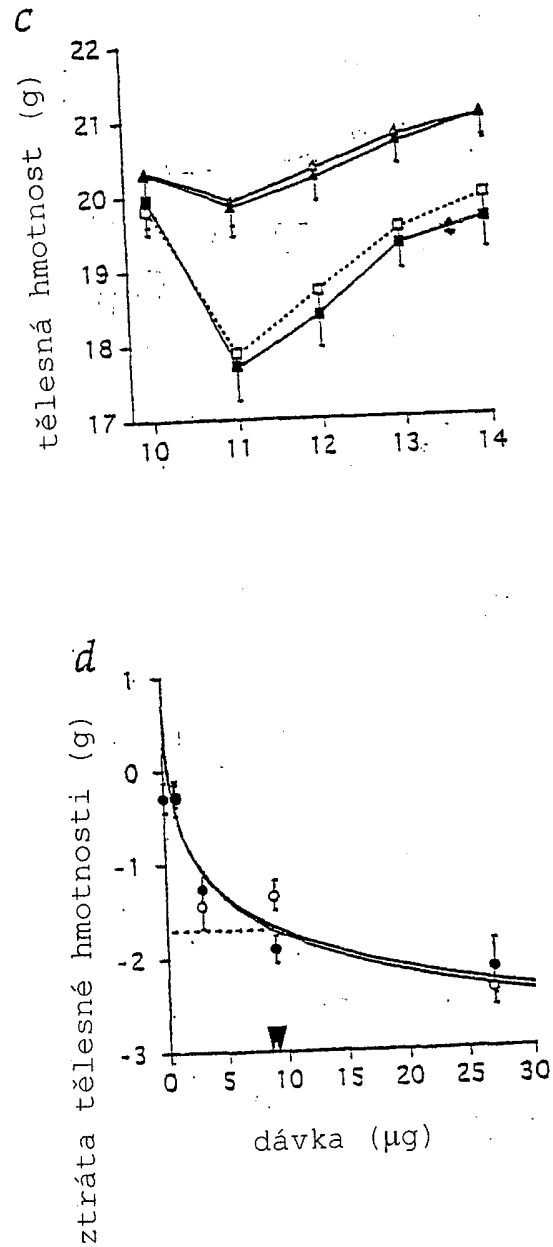
b



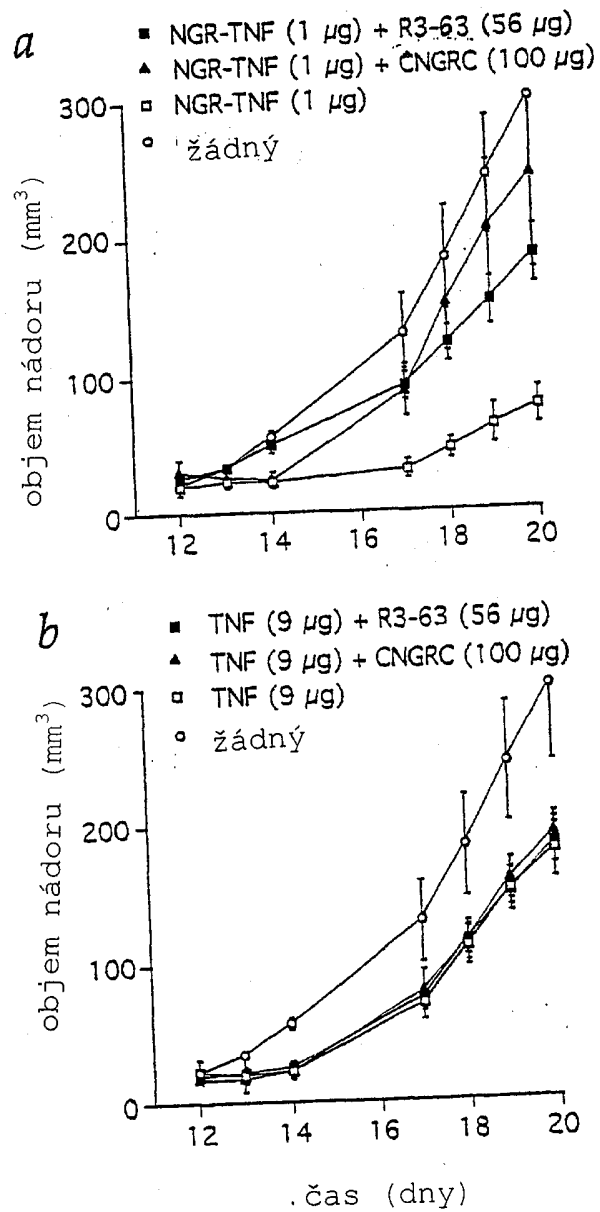
19.11.02

2/9

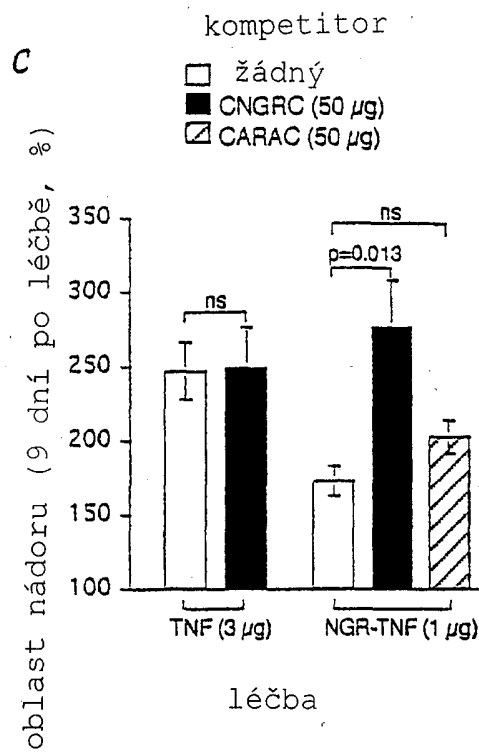
Obrázek č. 1



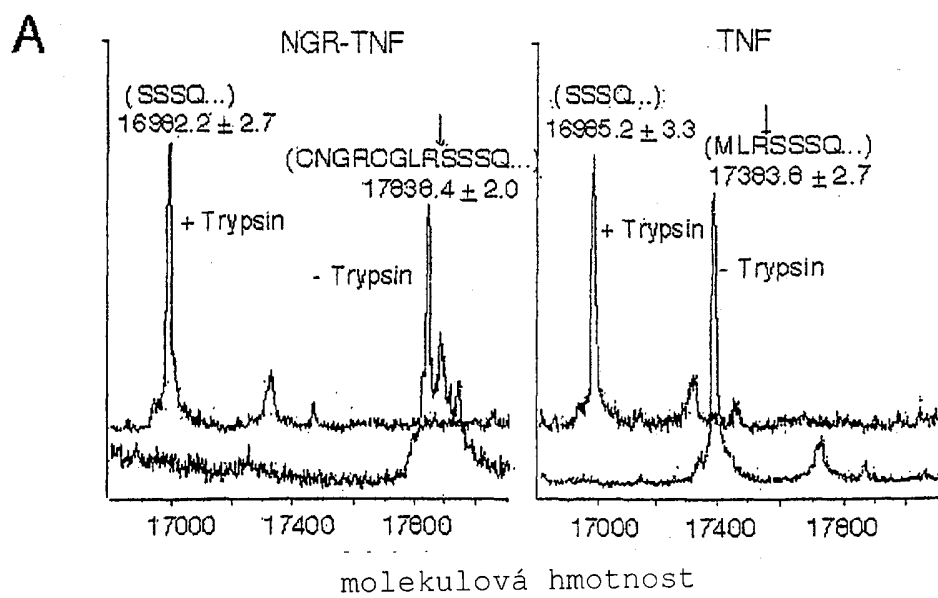
Obrázek č. 2



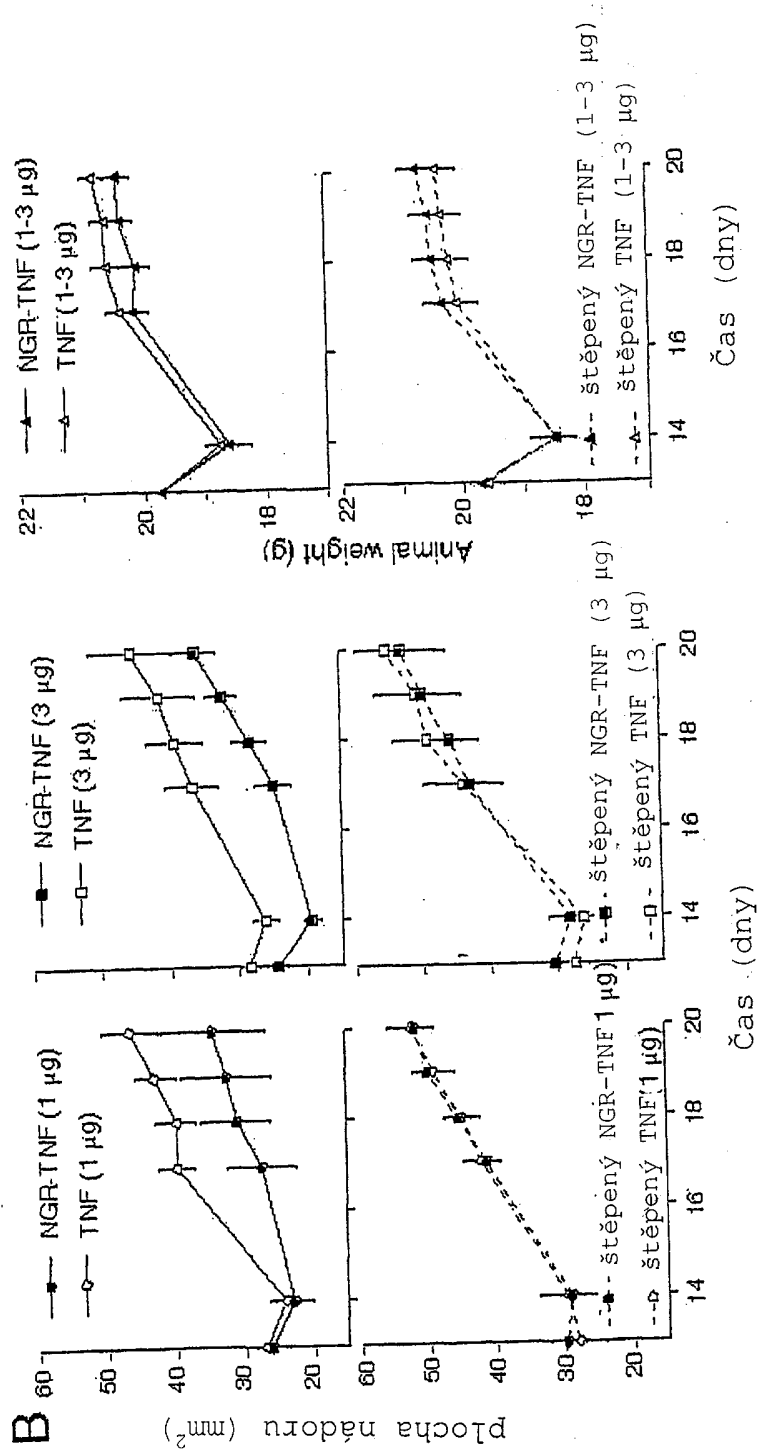
Obrázek č. 2



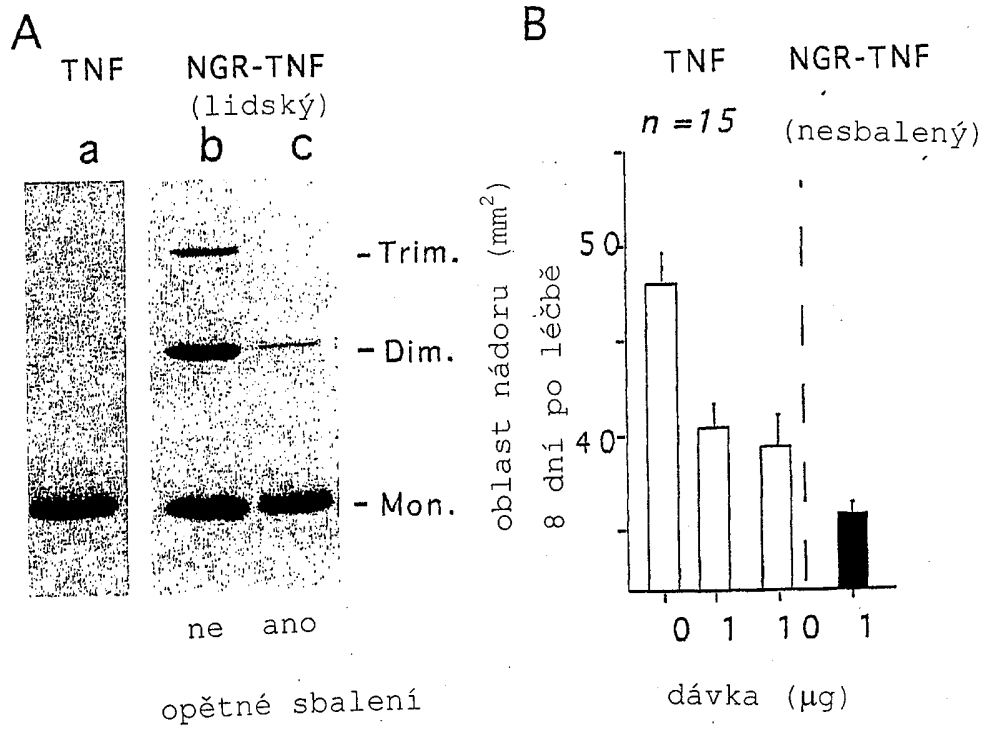
Obrázek č. 3



Obrázek č. 3

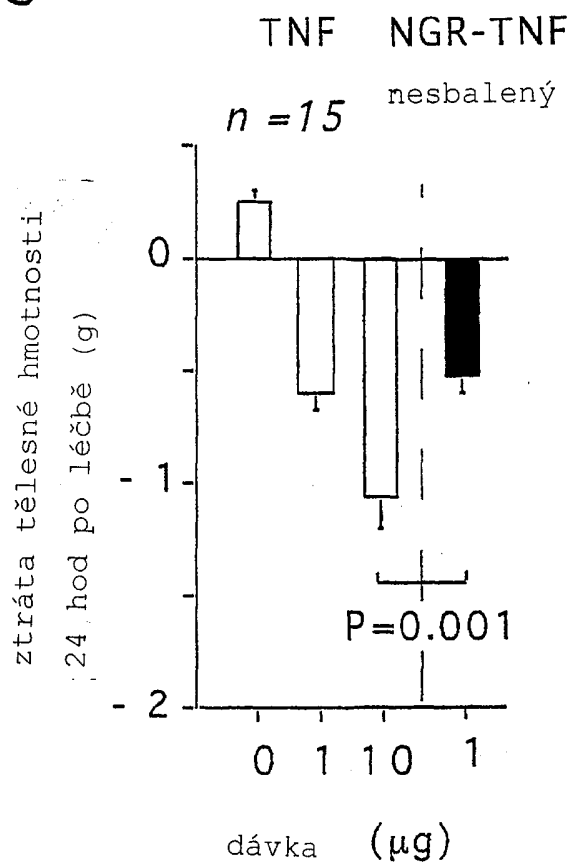


Obrázek č. 4



Obrázek č. 4

C



Obrázek č. 4

