(12) **PATENT**

(19) NO (11) **318980** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] A 61 K 38/10, G 01 N 33/534, 33/566
A 61 K 47/48, 51/08

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19961706	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1994.10.26 PCT/US94/12232
(22)	Inng.dag	1996.04.26	(85)	Videreføringsdag	1996.04.26
(24)	Løpedag	1994.10.26	(30)	Prioritet	1993.10.26, US, 141892 1994.09.13, US, 305056
(41)	Alm.tilgj	1996.06.20			
(45)	Meddelt	2005.05.30			

(73) Innehaver Thomas Jefferson University, 11th and Walnut Streets, Philadelphia, PA 19107, US
(72) Oppfinner Scott A. Waldman, Ardmore, PA, US
(74) Fullmektig Zacco Norway AS, Postboks 765 Sentrum, 0106 OSLO, NO

(54) Benevnelse **Konjugerte forbindelser, anvendelse av konjugerte forbindelser og farmasøytiske sammensetninger omfattende slike, samt in vitro fremgangsmåter og sett for behandling og diagnostikk av kolorektal cancer.**

(56) Anførte publikasjoner
PNAS, vol. 89, 1992, side 947-951 av Currie et al.
The Journal of Biological Chemistry, vol. 266 no. 27, 1991, side 17912-17918 av de Sauvage et al.
US5160723

(57) Sammendrag

Konjugerte forbindelser som omfatter en ST reseptor bindende del og en radiostabil aktiv del er beskrevet. Farmasøytiske sammensetninger som omfatter konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en radiostabil aktiv del eller en ST reseptor bindende del og en radioaktiv del er beskrevet. Fremgangsmåter for behandling av et individ som antas å lide av metastasert kolorektal cancer er beskrevet. Fremgangsmåter for radiobilleddannelse av metastaserte kolorektale cancerceller er også beskrevet. In vitro fremgangsmåter, kit og reagenser er beskrevet for å bestemme om et individ har metastaserte kolorektale cancerceller, for å bestemme om tumorcellene er kolorektal av opprinnelse og for analysering av vevsprøver fra kolonvev for å vurdere grad av metastaser av kolorektale tumorceller.

Foreliggende oppfinnelse vedrører konjugerte forbindelser som omfatter en varmestabil peptid-, antistoff-, Fab- eller $F(Ab)_2$-toksinreseptorbindende del og en aktiv del der nevnte aktive del er et radiostabilt aktivt middel eller et radioaktivt middel.

Foreliggende oppfinnelse vedrører også farmasøytiske sammenstninger og anvendelse av konjugerte forbindelser for fremstilling av slike farmasøytiske sammensetninger. Videre angår oppfinnelser sett og in vitro fremgangsmåter for detektering av metastaserte colorektale tumorceller i prøver, for å bestemme om en tumor en colorektal av opprinnelse, og for vurdering av grad av invasiv aktivitet til colorektale tumorceller i prøver fra tarmen. Foreliggende oppfinnelse er relatert til US serienr. 08/141,892 inngitt oktober 26, 1993 og US serienr. 08/305,056 inngitt september 13, 1994, og beskrivelsene derav er innkorporert heri som referanse.

Colorektal cancer er den tredje mest vanlige neoplasmen i verden. Dødelighetsraten til nylig diagnostiserte tykktarmscancer er der opp til 50% og det har vært små forbedringer over de siste 40 årene. Det meste av denne dødeligheten reflekterer lokale, regionale og fjerne metastaser.

Kirurgi er vanligst behandling for colorektal cancer, men tilbakevendelse skjer stadig. Colorektal cancer har vist seg å være resistent overfor kjemoterapi, men begrenset fremskritt er blitt oppnådd ved anvendelse av en kombinasjon av 5-fluoruracil og levamisol. Kirurgi har størst betydning på overlevelsen og noen pasienter med begrenset sykdom blir helbredet. Kirurgi fjerner derimot hovedtumoren og etterlater mikroskopiske sykdomsrester som igjen resulterer i tilbakevendelse.

Tidlig deteksjon av primær, metastatisk og tilbakevendende sykdom kan ha en stor betydning for prognosen til individer som lider av colorektal cancer. "Large bowel" cancer diagnostisert i tidlig stadium har et betydelig bedre resultat enn det som blir diagnostisert ved senere stadier. Diagnostikk av metastatisk eller tilbakevendende sykdom har en bedre diagnose.

Til tross for at eksisterende radioterapeutiske midler, kjemoterapeutiske midler og biologiske toksiner er potente cytotoksiner så sjelner disse ikke mellom normale og maligne celler og gir derfor negative virkninger og dose-begrensende toksisiteter. Over de senere årene er det blitt anvendt en ny metode for mer spesifikt å målsøke midlene til tumorcellene, som omfatter konjugering av et aktivt middel til molekyler som fortrinnsvis bindes til antigener som eksisterer hovedsakelig på tumorcellene. Disse

konjugatene kan bli administrert systemisk og bindes spesifikt til de målsøkte tumorcellene. Målsøking muliggjør opptak av cellene av cytotoksiske midler i konsentrasjoner som ikke produserer alvorlige toksisiteter i normale vev. Selektiv binding for å målsøke tumorceller letter deteksjon av okkult tumor og er derfor nyttig for konstruksjon av billeddannende midler. Molekylær målsøking har hovedsakelig anvendt monoklonale antistoffer dannet mot antigener selektivt uttrykt på tumorcellene.

Immunscintigrafi ved anvendelse av monoklonale antistoffer rettet mot tumor-spesifikke markører er blitt anvendt for å diagnostisere colorektal cancer. Monoklonale antistoffer mot carcinoembryonisk antigen (CEA) merket med ^{99}Techmetium identifiserte 94% av pasienter med tilbakevendende tumorer. ^{111}Indium-merkede anti-CEA monoklonale antistoffer diagnostiserte 85% av pasienter med tilbakevendende colorektal carcinoma som ikke var diagnostisert ifølge konvensjonelle teknikker. ^{125}Iod-merkede antistoffer har vært effektive for lokalisering av mer enn 80% av patologisk-bekreftet tilbakevendelse av intraoperativ gamma probe scanning.

Monoklonale antistoffer er blitt anvendt for å målsøke spesifikke terapeutiske midler i colorektal cancer. Prekliniske studier demonstrerte at anti-CEA antistoffer merket med ^{99}yttrium inhiberte humane tarmcarcinoma xenografter i nakne mus. Antistoffer dannet mot colorektale cancerceller og koblet til mitomycin C eller neocarzinostatin demonstrerte en anti-tumoreffekt på humane tarmcancer xenografter i nakne mus og 3 pasienter med tarmcancer. Lignende resultater i dyr ble oppnådd med monoklonale antistoffer konjugert til ricin toksin A kjeden.

På grunn av sensitiviteten, spesifisiteten og negativ-effekt profilen til monoklonale antistoffer har resultater oppnådd ved anvendelse av monoklonale antistoff-baserte terapeutiske stoffer vist at de er mindre enn ideelle målsøkende redskaper. Til tross for at monoklonale antistoffer er blitt dannet overfor antigener selektivt uttrykt på tumorer er ingen sanne cancer-spesifikke antistoffer blitt identifisert. De fleste antigenene uttrykt på neoplastiske celler ser ut til å bli kvantitativt økt i disse sammenlignet med normale celler, men antigenene er til tross for dette ofte til stede i normale celler. Antistoffer til slike determinanter kan reagere med ikke-neoplastiske vev og resulterer i betydelige toksisiteter. Antistoffer er relativt store molekyler og vekker følgelig ofte en immunrespons i pasienter. Disse immunresponsene kan resultere i betydelige toksisiteter i pasienter ved reeksponering overfor målsøkende midler og kan forhindre målsøking av det monoklonale på grunn av immunkompleksdannelse med degradering og utskillelse.

Binding av antistoffer til tumorcellene kan være lavt og målsøkende midler kan leveres til cellene i mengder som ikke er tilstrekkelig for å oppnå deteksjon eller cytotoksisitet.

Det er et behov for sammensetninger som spesifikt kan målsøke metastaserte colorektale cancerceller. Det er et behov for billeddannende midler som spesifikt kan bli bundet til metastaserte colorektale cancerceller. Det er et behov for forbedrede fremgangsmåter for billeddannelse av metastaserte colorektale cancerceller. Det er et behov for terapeutiske midler som spesifikt kan bli bundet til metastaserte colorektale cancerceller. Det er et behov for forbedrede fremgangsmåter for behandling av individer som antas å lide av colorektale cancerceller, spesielt individer som antas å lide av metastaser av colorektale cancerceller.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en konjugert forbindelse, kjennetegnet ved at den omfatter en varmestabil peptid-, antistoff-, Fab- eller $F(Ab)_2$-toksinreseptorbindende del og, en aktiv del der nevnte aktive del er et radiostabilt aktivt middel eller et radioaktivt middel.

En foretrukken utførelsesform er en konjugert forbindelse, kjenetegnet ved at den varmestabile toksinreseptorbindende del er utvalgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NOS:5-54 og fragmenter og derivater av disse der nevnte fragmenter og derivater er peptider som er i stand til å bindes til den varmestabile toksinreseptoren, der nevnte fragmenter har en aminosyresekvens identisk med en del av det varmestabile toksinreseptorbindende peptid og der nevnte derivater har en aminosyresekvens som er den samme som aminosyresekvensen til minst en del av det varmestabile toksinpeptid med unntak av at noen rester er fjernet eller substituert med konservative aminosyrer eller at ytterligere aminosyrer er innført.

En annen foretrukken utførelsesform er en konjugert forbindelse, kjennetegnet ved at nevnte aktive del er et terapeutisk middel.

En annen foretrukken utførelsesform er en konjugert forbindelse, kjennetegnet ved at nevnte aktive middel blir valgt fra gruppen bestående av:
metotreksat, doksorubicin, daunorubicin, cytosinarabinose, etopsid, 5-4 fluoruracil, melfalan, klorambucil, cis-platinum, vindesin, mitomycin, bleomycin, purotionin, makromycin, 1,4-benzoquinon derivater, trenimon, ricin, ricin A kjede, Pseudomonas eksotoksin, difteri toksin, Clostridium perfringens fosfolipase C, bovin bukspyttkjertel ribonuklease, kermesbær antiviralt protein, abrin, abrin A kjede, kobra gift faktor,

gelonin, saporin, modeccin, viskumin, volkensin, alkalisk fosfatase, nitroimidazol, metronidazol og misonidazol.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en farmasøytisk sammensetning, kjennetegnet ved at den omfatter:

a) en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel, og
b) en konjugert forbindelse ifølge oppfinnelsen.

En foretrukken utførelsesform er farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen, kjennetegnet ved at nevnte aktive del blir valgt fra gruppen bestående av: ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{132}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P og ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt, ^{197}Hg, ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, $^{81}Rb/^{81M}Kr$, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{203}Pb og ^{206}Bi.

En annen foretrukken utførelsesform er en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen, kjennetegnet ved at den varmestabile toksinreseptorbindende del ver valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 5-54.

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av en konjugert forbindelse ifølge oppfinnelsen for fremstilling av en farmasøytisk sammenseetning for behandling av et individ som mistenkes å lide av metastasert colorektal cancer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre en anvendelse av en konjugert forbindelse omfattende:

a) en varmestabil peptid-, antistoff-, Fab- eller F(Ab)2-toksinreseptorbindende del; og
b) en aktiv del;

der nevnte aktive del er et radiostabilt aktivt middel for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for å diagnostisere og behandle colorektal cancer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en farmasøytisk sammensetning omfattende:

a) en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel, og
b) en sammensetning omfattende:
   i) en varmestabil peptid-, antistoff-, Fab- eller $F(Ab)_2$-toksinreseptorligand; og

ii) et nukleinsyremolekyl.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en in vitro fremgangsmåte for å bestemme om tumorcellen er en colorektal tumorcelle å bestemme om nevnte tumorcelle uttrykker det varmestabile toksin-reseptorprotein.

En foretrukken utførelsesform er en in vitro fremgangsmåte, kjennetegnet ved ekspresjon av nevnte varmestabile toksin-reseptorprotein fra nevnte celler blir bestemt ved analysen valgt fra gruppen bestående av: immunanalyse hvor nevnte prøve blir brakt i kontakt med detekterbare antistoffer som spesifikt blir bundet til den varmestabile toksin-reseptoren; varmestabil toksin-reseptorbindende analyse hvor nevnte prøve blir brakt i kontakt med merket varmestabil toksin-reseptorligand; polymerasekjedereaksjon hvor nevnte prøve blir brakt i kontakt med primere som selektivt amplifiserer mRNA eller cDNA som koder for det varmestabile toksin-reseptorproteinet.

En annen foretrukken utførelsesform er en in vitro fremgangsmåte, kjennetegnet at en prøve av ekstraintestinalt vev eller kroppssekret fra et individ analyseres for tilstedeværelse av metastaserte colorektale cancerceller ved å bestemme om det varmestabile toksin-reseptorproteinet blir uttrykt av cellene i nevnte prøve.

En annen foretrukken utførelsesform er en in vitro fremgangsmåte, kjennetegnet ved at ekspresjonen av nevnte varmestabile toksin-reseptorprotein fra nevnte celler blir bestemt ved analysen valgt fra gruppen bestående av: immunanalyse hvor nevnte tumorcelle blir brakt i kontakt med detekterbare antistoffer som spesifikt blir bundet til den varmestabile toksin-reseptoren; varmestabil toksin-reseptorbindende analyse hvor nevnte tumorceller blir brakt i kontakt med merket varmestabil toksin-reseptorligand; polymerasekjedereaksjon hvor nevnte tumorceller blir brakt i kontakt

med primere som selektivt amplifiserer mRNA eller cDNA som koder for varmestabilt toksinreseptorproteinet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre et sett for å bestemme om en prøve inneholder en colorektarl cancercelle, kjennetegnet ved at det omfatter:

en første beholder som omfatter antistoffer som blir bundet til det varmestabile toksin-reseptorproteinet og en andre beholder som omfatter et isolert varmestabilt toksin-reseptorprotein; eller

en første beholder som omfatter en detekterbar varmestabil toksin-reseptorligand og en andre beholder som omfatter et isolert varmestabilt toksin-reseptorprotein; eller

en første beholder som omfatter et sett av PCR-primere, hvori en PCR-reaksjon ved anvendelse av nevnte sett av primere som amplifiserer et DNA-molekyl fra et substrat av mRNA som koder for det varmestabile toksin-reseptorproteinet eller et sett av primere som amplifiserer et DNA-molekyl fra et substrat av cDNA eller mRNA som koder for det varmestabile toksin-reseptorproteinmolekylet og en andre beholder som omfatter et DNA-molekyl som er lik i størrelse med et DNA-molekyl som blir amplifisert ved PCR ved anvendelse av nevnte første PCR-primer og nevnte andre PCR primer og nevnte mRNA eller nevnte cDNA; eller

en første beholder som omfatter et nukleinsyremolekyl som omfatter en sekvens som er identisk med og/eller komplementær med mRNA eller cDNA som koder for varmestabilt toksin-reseptorprotein og en andre beholder som omfatter et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet i nevnte første beholder.

Oppfinnelsen vedrører US serienr. 08/141,892 inngitt oktober 26, 1993 og US serienr. 08/305.056 inngitt september 13, 1994 og beskrivelsene derav er innkorporert heri som referanse.

I det videre benyttes ofte forkortelsen "ST" for varmestabilt toksin.
Betegnelsen "ST" og "nativ ST" blir anvendt om hverandre og refererer til varme-stabilt toksin (ST) som er et peptid produsert av E. coli, samt fra andre organismer. ST er naturlig forekommende peptider som 1) blir naturlig produsert av organismer, 2) blir bundet til ST reseptoren og 3) aktiverer signalkaskaden som formidler ST-indusert diarrhea.

Som anvendt heri angir betegnelsen "ST reseptor" reseptorer som er til stede på colorektale celler, inkludert lokale og metastaserte colorektale cancerceller, som blir bundet til ST. I normale individer finnes ST reseptorene eksklusivt i tarmceller, spesielt

i celler i tolvfingertarmen, tynntarmen (jejunum og ileum), tykktarmen, tarm (cecum, "ascending" kolon, "transverse" kolon, "descending" kolon og "sigmoid" kolon) og rektum.

Som anvendt heri angir betegnelsen "ST reseptor ligand" forbindelser som spesifikt blir bundet til ST reseptoren. ST er en ST reseptor ligand. En ST reseptor ligand kan være et peptid eller er ikke et peptid.

Som anvendt heri angir betegnelsen "ST reseptor bindende peptid" ST reseptor ligander som er peptider.

Som anvendt heri angir betegnelsen "ST peptider" ST reseptorbindende peptider valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 5-54 og fragmenter og derivater derav.

Som anvendt heri angir betegnelsen "fragment" et peptid a) som har en aminosyresekvens som er identisk med en del av et ST reseptor bindende peptid og b) som har evne til å bli bundet til ST reseptoren.

Som anvendt heri angir betegnelsen "derivat" et peptid a) som har en aminosyresekvens som er vesentlig identisk med i det minste en del av et ST reseptor bindende peptid og b) som har evne til å bli bundet til ST reseptoren.

Som anvendt heri angir betegnelsen "vesentlig identisk" en aminosyresekvens som er lik aminosyresekvensen til et ST peptid med unntagelse av at noen av residiene er deletert eller substituert med konservative aminosyrer eller ytterligere aminosyrer er innskutt.

Som anvendt heri angir betegnelsen "aktivt middel" forbindelser som er terapeutiske midler eller billeddannende midler.

Som anvendt heri angir betegnelsen "radiostabil" forbindelser som ikke gjennomgår radioaktiv nedbrytning; dvs. forbindelsene er ikke radioaktive.

Som anvendt heri angir betegnelsen "terapeutisk middel" kjemoterapeutiske midler, toksiner, radioterapeutiske midler, målsøkende midler eller radiosensibiliserende midler.

Som anvendt heri angir betegnelsen "kjemoterapeutisk middel" forbindelser som, når kontaktet med og/eller innkorporert inn i en celle, produserer en virkning på cellene som innbefatter forårsaking av celledød, inhibering av celledeling eller induserende differensiering.

Som anvendt heri angir betegnelsen "toksin" forbindelser som, når kontaktet med og/eller innkorporert inn i en celle, produserer celledød.

Som anvendt heri angir betegnelsen "radioterapeutisk middel" radionukleotider som når kontaktet med og/eller innkorporert inn i en celle, produserer celledød.

Som anvendt heri angir betegnelsen "målsøkende middel" forbindelser som kan bli bundet av og/eller reagert med andre forbindelser. Målsøkende midler kan bli anvendt for å levere kjemoterapeutiske midler, vaksiner, enzymer, radioterapeutiske midler, antistoffer eller billeddannende midler til celler som har målsøkende midler assosiert med disse og/eller omdanne eller ellers transformere eller forsterke koadministrerte aktive midler. Et målsøkende middel kan innbefatte en del som utgjør et første middel som er lokalisert til cellen som når kontaktet med et annet middel enten blir omdannet til et tredje middel som har en ønsket aktivitet eller forårsaker omdannelse av det andre middelet til et middel som har en ønsket aktivitet. Resultatet er at det lokaliserte middelet letter eksponering av et middel med en ønsket aktivitet til den metastaserte cellen.

Som anvendt heri angir betegnelsen "radiosensibiliserende middel" midler som øker mottageligheten av cellene for skadelige virkninger av ionisert bestrålning. Et radiosensibiliserende middel muliggjør at lavere doser av bestrålning blir administrert og som fortsatt tilveiebringer en terapeutisk effektiv dose. Som anvendt heri angir betegnelsen "billeddannende middel" forbindelser som kan bli detektert.

Som anvendt heri angir betegnelsen "ST reseptor bindende del" den delen av en konjugert forbindelse som utgjør en ST reseptor ligand.

Som anvendt heri angir betegnelsen "aktiv del" den delen av en konjugert forbindelse som utgjør et aktivt middel.

Som anvendt heri blir betegnelsene "konjugert forbindelse" og "konjugert sammensetning" anvendt om hverandre og betyr en forbindelse som omfatter en ST

reseptor bindende del og en aktiv del og som har evne til å bli bundet til ST reseptoren. Konjugerte forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter følgelig en del som utgjør en ST reseptorligand og en del som utgjør et aktivt middel. Konjugerte forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse har følgelig evne til spesifikt å bli bundet til ST reseptoren og innbefatter en del som er et terapeutisk middel eller et billeddannende middel. Konjugerte sammensetninger kan omfatte kryssbindende midler og/eller molekyler som virker som spacere mellom delene.

Som anvendt heri angir betegnelsene "kryssbinder", "kryssbindende middel", "konjugert middel", "koblingsmiddel", "kondenseringsreagens" og "bifunksjonell kryssbinder" om hverandre og refererer til molekylære grupper som blir anvendt for å koble ST reseptorliganden og det aktive middelet for følgelig å danne den konjugerte forbindelsen.

Som anvendt heri angir betegnelsen "colorektal cancer" den aksepterte medisinske definisjonen som definerer colorektal cancer som en medisinsk tilstand karakterisert ved cancer i celler i tarmkanalen under tynntarmen (dvs. tykktarmen (kolon), inkludert cecum, ascending kolon, transverse kolon, descending kolon og sigmoid kolon, og rektum). I tillegg som anvendt heri angir betegnelsen "colorektal cancer" medisinske tilstander som er karakterisert ved cancer i cellene til tolvfingertarmen og tynntarmen (jejunum og ileum). Definisjonen på colorektal cancer anvendt heri er mer omfattende en innenfor vanlig medisinsk definisjon, men er gitt som dette på grunn av at cellene i tolvfingertarmen og tynntarmen også inneholder ST reseptorer og kan følgelig anvendes på fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse ved anvendelse av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse.

Som anvendt heri angir betegnelsen "metastase" fremgangsmåten hvor cancerceller med opprinnelse i et organ eller en del av kroppen flytter seg til en annen del av kroppen og fortsetter å dele seg. Metastaserte celler danner deretter tumorer som kan metastasere seg ytterligere. Metastase refererer følgelig til spredning av cancer fra den delen av kroppen hvor den kommer fra og til andre kroppsdeler. Foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåter for levering av aktive midler til metastaserte colorektale cancerceller.

Som anvendt heri angir betegnelsen "metastaserte colorektale cancerceller" colorektale cancerceller som er blitt metastasert; colorektale cancerceller lokalisert i en del av kroppen forskjellig fra tolvfingertarmen, tynntarmen (jejunum og ileum), tykktarmen

(kolon), inkludert cecum, ascending kolon, transverse kolon, descending kolon og sigmoid kolon, og rektum.

Heri blir betegnelsene "ikke-colorektal prøve" og "ekstra-tarmprøve" anvendt om hverandre og refererer til en prøve av vev eller kroppsfluid fra en kilde forskjellig fra colorektalt vev. I noen foretrukne utførelsesformer er den ikke-colorektale prøven en vevsprøve så som lymfeknuter. I noen foretrukne utførelsesformer er den ikke-colorektale prøven en prøve av ekstra-tarmvev som er et adenocarcinoma med ubekreftet opprinnelse. I noen foretrukne utførelsesformer er den ikke-colorektale prøven en blodprøve.

Som anvendt heri skal "et individ som lider av et adenocarcinoma med ubekreftet opprinnelse" bety et individ som har en tumor hvor opprinnelsen ikke er blitt definitivt identifisert.

Som anvendt heri betyr "et individ som antas å være mottagelig for metastasert colorektal cancer" et individ som har en spesiell risiko for å utvikle metastasert colorektal cancer. Prøver på individer som har en spesiell risiko for å utvikle metastasert colorektal cancer er de fra familier med medisinsk historie som indikerer over gjennomsnittlig forekomst av colorektal cancer blant familiemedlemmer og/eller de som allerede har utviklet colorektal cancer og som er blitt effektivt behandlet og som derfor møter en risiko for tilbakeslag og tilbakevending.

ST, som blir produsert av E. coli, samt av andre organismer, er ansvarlig for endemisk diarè i utviklingsland og diarè blant reisende. ST induserer tarmsekresjon ved å bli bundet til spesifikke reseptorer, ST reseptorer, i apikal brush border membraner til slimhinneceller som kler tarmkanalen. Binding av ST til ST reseptorer er ikke-kovalent og oppstår på en konsentrasjons-avhengig og mettende måte. Når bundet blir ST-ST reseptorkompleksene innesluttet av tarmcellene, dvs. transportert fra overflaten inn i det indre av cellen. Binding av ST til ST reseptorer utløser en kaskade av biokjemiske reaksjoner i apikal membranen til disse cellene og resulterer i produksjon av et signal som induserer tarmcellene til å utskille fluider og elektrolytter, som resulterer i diarè.

ST reseptorene er unike i at de bare er lokalisert i apikal brush border membranene til celler som kler tarmkanalen. De finnes ikke i andre celletyper i placentale pattedyr. I tillegg er ST reseptorene nesten bare lokalisert til apikalmembraner og lite finnes i basolaterale membraner på sidene av tarmcellene.

Slimhinnecellene som kler tarmen er koblet sammen av tette grenser som danner en barriere overfor passering av tarminnholdet inn i blodstrømmen og komponentene av blodstrømmen inn i tarmhulrommet. Apikal beliggenheten til ST reseptorene isolerer følgelig disse reseptorene fra sirkulasjonssystemet slik at de sannsynligvis eksisterer adskilt fra resten av kroppen og vesentlig på "utsiden" av kroppen. Resten av kroppen betraktes som "utsiden" av tarmkanalen. Sammensetninger som blir administrert "utenfor" tarmkanalen blir opprettholdt adskilt og segregert fra de eneste cellene som normalt uttrykker ST reseptorer. Vevsprøver som blir tatt fra vev på utsiden av tarmkanalen inneholder ikke normalt celler som uttrykker ST reseptorer.

I et individ som lider colorektal cancer er cancercellene ofte fra celler som produserer og utviser ST reseptoren og disse cancercellene fortsetter å produsere og utvise ST reseptoren på deres celleoverflater. T84 cellene, som er humane kolon adenocarcinoma celler isolert fra lungemetastaser, uttrykker ST reseptorer på deres celleoverflate. Likeledes uttrykker HT29gly-celler, som er humane kolon adenocarcinoma celler, reseptorer for ST. I individer som lider av colorektal cancer uttrykker noen metastaserte tarmcancer celler ST reseptorer.

Et forsøk er blitt utført for å bestemme andel av colorektale tumorer som har ST reseptoren. Hver av tumorene som er blitt testet ble uavhengig bekreftet å være colorektal cancer ifølge standardteknikker for kirurgisk patologi. Hver av de testede colorektale cancertumorene, inkludert lokale colorektale tumorer og metastaserte colorektale tumorer (lever, lunge, lymfeknute, peritoneum, ovarie) har ST reseptorer. I hvert tilfelle var affiniteten og tettheten til reseptorene mottagelige for målsøking. Normale lever, lymfeknuter, peritoneum, galleblære, ovarie, mave, nyre og lungeceller ble funnet ikke å inneha ST reseptorer.

Når slike cancerceller blir metastasert fortsetter metastaserte cancerceller å produsere og utvise ST reseptoren. Ekspresjon av ST reseptorer på overflaten av metastatiske tumorer tilveiebringer et mål for selektiv binding av konjugerte sammensetninger. ST reseptorer muliggjør absolutt spesifikk målsøking av terapeutiske og diagnostiske midler som blir konjugert til ST reseptorligander for å metastasere colorektale cancerceller.

Ifølge visse utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er sammensetninger og fremgangsmåter gitt for detektering, billeddannelse eller behandling av colorektale tumorer i et individ.

Konjugerte sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttig for målsøking av celler som kler den indre tarmveggen inkludert de cancercellene avledet fra slike celler, spesielt metastaserte cancerceller avledet fra slike celler.

Konjugerte sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse som blir administrert utenfor tarmkanalen, som de som blir administrert i sirkulasjonssystemet, vil forbli segregert fra celler som kler tarmkanalen og vil bare bli bundet til celler på utsiden av tarmkanalen som er avledet fra tarmkanalen, så som metastaserte colorektale celler. De konjugerte sammensetningene vil ikke bli bundet til ikke-colorektalt avledede celler. De aktive delene av de konjugerte sammensetningene som blir administrert på utsiden av tarmkanalen blir levert til celler som er avledet fra tarmkanalen, så som metastaserte colorektale celle, men vil ikke bli levert til noen andre celler.

Terapeutiske og diagnostiske farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse innbefatter konjugerte forbindelser spesifikt målsøkt til metastatisk sykdom. Disse konjugerte forbindelsene inkluderer ST reseptorbindende deler som ikke blir bundet til celler fra normal vev i kroppen, med unntagelse av celler fra tarmkanalen på grunn av at celler fra andre vev ikke har ST reseptorer. Ulikt normale colorektale celler og lokaliserte colorektale cancerceller, er metastaserte colorektale cancerceller mottagelige for forbindelser administrert utenfor tarmkanalen, for eksempel administrert i sirkulasjonssystemet. De eneste ST reseptorene i normal vev eksisterer i apikalmembranene til tarmmukos celler og disse reseptorene blir effektivt isolert fra målsøkte cancerkjemoterapeutiske midler og billeddannende midler administrert på utsiden av tarmkanalen av tarmslimhinnebarrieren. Metastaserte colorektale celler kan følgelig bli målsøkt av konjugerte forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse ved å innføre slike forbindelser på utsiden av tarmkanalen så som for eksempel ved administrering av farmasøytiske sammensetninger som omfatter konjugerte forbindelser inn i sirkulasjonssystemet.

Fagfolk innenfor dette området kan lett identifisere individer som antas å lide av colorektal cancer og metastaserte colorektale celler. I individer diagnostisert med colorektal cancer utgjør standardterapi overfor antatte metastaser og aggresive forsøk på å fjerne metastaserte celler. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer farmasøytiske sammensetninger og fremgangsmåter for billeddannelse og vil følgelig mer definitivt diagnostisere metastaser. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer farmasøytiske sammensetninger som omfatter terapeutiske midler og fremgangsmåter for spesifikk

målsøking og eliminering av metastaserte colorektale cancerceller. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre farmasøytiske sammensetninger som omfatter terapeutiske midler og fremgangsmåter for spesifikk eliminering av colorektale cancerceller.

Farmasøytiske sammensetninger som omfatter konjugerte sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli anvendt for å diagnostisere eller behandle individer som lider av lokaliserte colorektale tumorer, som er primære eller ikke-metastatiske colorektale tumorer dersom disse har penetrert grunnmembranen som ligger under slimhinnen inn i subslimhinnen hvor det er omfattende blodtilførsel som de har adgang til. Penetrering inn i subslimhinnen omgår slimhinnebarrieren som resulterer i evnen som konjugerte sammensetninger har til å bli ført inn i sirkulasjonssystemet for å reagere med disse tumorene.

Foreliggende oppfinnelse bygger på anvendelse av en ST reseptor bindende del i en konjugert sammensetning. ST reseptor bindende del er vesentlig en del av den konjugerte sammensetningen som virker som en ligand til ST reseptoren og som følgelig spesifikt bindes til disse resptorene. Den konjugerte sammensetningen innbefatter også en aktiv del som er assosiert med den ST reseptor bindende delen og den aktive delen er et aktivt middel som enten er nyttig for billeddannelse, målsøking, nøytralisering eller dreping av cellen.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er den ST reseptor bindende delen ST reseptor ligand delen til en konjugert sammensetning. I noen utførelsesformer kan ST resepor liganden være nativ ST.

Nativ ST er blitt isolert fra forskjellige organismer inkludert E. coli, Yersinia, Enterobacter og andre. I naturen er toksinene generelt kodet på et plasmid som kan "hoppe" mellom forskjellige arter. Flere forskjellige toksiner er blitt rapportert å oppstå i forskjellige arter. Disse toksinene har alle betydelig sekvenshomologi, de kan alle bli bundet til ST reseptorer og de er alle aktive guanilat cyklase, som produserer diarè.

ST er blitt både klonet og syntetisert ved hjelp av kjemiske teknikker. Klonede eller syntetiske molekyler utviser bindingskaraktertrekk som ligner nativ ST. Nativ ST isolert fra E. coli har 18 eller 19 aminosyrer i lengde. Det minste "fragmentet" av ST som har beholdt aktiviteten er 13 aminosyrekjernepeptidet som rager mot karboksyterminalen fra cystein til cystein 18 (av 19 aminosyreformen). Analoger av ST er blitt dannet ved

kloning og ved kjemiske teknikker. Små peptidfragmenter av den native ST strukturen som innbefatter den strukturelle determinanten som utviser bindingsaktivitet kan bli konstruert. Når en struktur er identifisert som blir bundet til ST reseptorer blir ikke-peptidanaloger som etterligner den strukturen i rommet konstruert.

SEQ ID NO: 1 beskriver en nukleotidsekvens som koder for 19 aminosyre ST, betegnet ST Ia, rapportert av So og McCarthy (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4011; som er innkorporert heri som referanse.

Aminosyresekvensen til ST Ia er beskrevet i SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 3 beskriver aminosyresekvensen til et 18 aminosyrepeptid som utviser ST aktivitet, betegnet ST I*, beskrevet av Chan og Gianella (1981) J. Biol. Chem. 256:7744, som er innkorporert heri som referanse.

SEQ ID NO: 4 beskriver en nukleotidsekvens som koder for 19 aminosyre ST, betegnet ST Ib, rapportert av Mosely et al. (1983) Infect. Immun. 39:1167, som er innkorporert heri som referanse.

Aminosyresekvensen til ST Ib er beskrevet i SEQ ID NO: 5.

Et 15 aminosyrepeptid betegnet guanylin som har omtrent 50% sekvenshomologi med ST er blitt identifisert i tarmen til pattedyr (Currie, M.G. et al. (1992) Proc. Natl. Acad.Sci. USA 89:947-951, som er innkorporert heri som referanse). Guanylin blir bundet til ST reseptorer og aktiverer guanylat cyklase i et nivå på omtrent 10- til 100-ganger mindre enn nativ ST. Guanylin kan ikke eksistere som et 15 aminosyrepeptid i tarmen, men i steden som en del av et større protein i dette organet. Aminosyresekvensen til guanylin fra gnager er beskrevet som SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO:17 er et 18 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 8 er et 17 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 9: er et 16 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 10 er et 15 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 11 er et 14 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 12 er et 13 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 13 er et 18 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 14 er et 17 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 15 er et 16 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 16 er et 15

aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO:17 er et 14 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 18 er et 17aminosyrefragment av SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 19 er et 16 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 20 er et 15 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 21 er et 14 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 22 er et 13 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 23 er et 17 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO:24 er et 16 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 25 er et 15 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 3. SEQ ID NO: 26 er et 14 aminosyrefragment av SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 27 er et 18 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 28 er et 17 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 29 er et 16 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 30 er et 15 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 31 er et 14 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 32 er et 13 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 33 er et 18 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 34 er et 17 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 35 er et 16 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 36 er et 15 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5. SEQ ID NO: 37 er et 14 aminosyrefragement av SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 36 og SEQ ID NO: 37 er beskrevet i Yoshimura, S., et al. (1985) FEBS Lett. 181:138, som er innkorporert heri som referanse.

SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 og SEQ ID NO: 40, som er derivater av SEQ ID NO: 3, er beskrevet i Waldman, S.A. og O'Hanley, P. (1989) Infect.Immun. 57:2420, som er innkorporert heri som referanse.

SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 og SEQ ID NO:45, som er derivater av SEQ ID NO: 3, er beskrevet i Yoshimura, S., et al. (1985) FEBS Lett. 181:138, som er innkorporert heri som referanse.

SEQ ID NO: 46 er et 25 aminosyrepeptid avledet fra Y. enterocolitica som bindes til ST reseptoren.

SEQ ID NO: 47 er et 16 aminosyrepeptid avledet fra V. cholerae som blir bundet til ST reseptoren. SEQ ID NO:47 er rapportert i Shimonishi, Y., et al. FEBS Lett. 215:165, som er innkorporert heri som referanse.

SEQ ID NO: 48 er et 18 aminosyrepeptid avledet fra Y. enterocolitica som blir bundet til ST reseptoren. SEQ ID NO: 48 er beskrevet i Okamoto, K., et al. Infec. Immun. 55:2121, som er innkorporert heri som referanse.

SEQ ID NO: 49, er et derivat av SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 og SEQ ID NO: 53 er derivater.

SEQ ID NO: 54 er aminosyresekvensen til guanylin fra mennesket.

I noen foretrukne utførelsesformer omfatter konjugerte forbindelser ST reseptorbindende deler som omfatter aminosyresekvenser valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5-54 og fragmenter og derivater derav.

Fagfolk innenfor dette området kan lett konstruere og produsere derivater som er omtrent identiske aminosyresekvenser som ST peptider med delesjoner og/eller innskudd og/eller konservative substitusjoner av aminosyrer. For eksempel det som blir referert til som Dayhofs regler for aminosyresubstitusjon (Dayhof, M.D. (1978) Nat. Biomed. Res.Found., Washington, D.C. Vol. 5, supp. 3), aminosyre residier i en peptidsekvens kan bli substituert med sammenlignbare aminosyreresidier. Slike substitusjoner er velkjente og er basert på ladning og strukturelle karaktertrekk til hver aminosyre. Derivater innbefatter fragmenter av ST reseptor bindende peptider med delesjoner og/eller innskudd og/eller konservative substitusjoner.

I noen utførelsesformer omfatter ST reseptorbindende peptider D aminosyrer. Som anvendt heri betyr "D aminosyrepeptider" ST reseptorbindende peptider, fragmenter eller derivater som omfatter i det minste en av fortrinnsvis flere D aminosyrer som har evne til å bli bundet til ST reseptoren. Anvendelse av D aminosyrepeptider er ønskelig fordi de er mindre mottagelige for degradering og har derfor en lengre halveringstid. D aminosyrepeptider omfatter nesten alle eller består av D aminosyrer kan omfatte aminosyresekvenser i omvendt rekkefølge av ST reseptorbindende peptider som er dannet av L aminosyrer.

I noen utførelsesformer er ST reseptorbindende peptider, inkludert D aminosyrepeptider, konformasjonsmessig begrenset for å presentere og opprettholde riktig strukurell konformasjon for binding til ST reseptoren. Sammensetningene kan omfatte ytterligere aminosyreresidier nødvendig for å oppnå riktig tredimensjonal konformasjon inkludert residier som letter sirkulasjonen eller ønsket folding.

Det er foretrukket at ST reseptorliganden anvendt som ST reseptor bindende del er så liten som mulig. Det er følgelig foretrukket at ST reseptor liganden er et ikke-peptid lite molekyl eller lite peptid, med fortrinnsvis mindre enn 25 aminosyrer, mer foretrukket mindre enn 20 aminosyrer. I noen utførelsesformer er ST reseptorliganden som utgjør den ST reseptorbindende delen av en konjugert sammensetning mindre enn 50 aminosyrer. ST reseptor bindende peptid omfatter mindre enn 10 aminosyrer og ST reseptor bindende peptid mindre enn 5 aminosyrer kan bli anvendt som ST bindende deler ifølge foreliggende oppfinnelse. Det hører inn under rammen av foreliggende oppfinnelse å innbefatte større molekyler som virker som ST reseptor bindende deler inkludert, men ikke begrenset til molekyler så som antistoffer, FAb og F(Ab)2 som spesifikt blir bundet til ST reseptoren.

En analyse kan bli anvendt for å teste både peptid og ikke-peptid sammensetninger for å bestemme om de er ST reseptorligander eller, for å teste konjugerte sammensetninger for å bestemme om de har ST reseptor bindende aktivitet. Slike sammensetninger som spesifikt blir bundet til ST reseptorene kan bli identifisert ifølge en konkurrerende bindingsanalyse. Den konkurrerende bindingsanalysen er en standardteknikk innen farmakologi som kan lett bli utført av fagfolk innenfor dette området ved anvendelse av lett tilgjengelige utgangsmaterialer. Konkurrende bindingsanalyser, ST reseptorbindingsanalyser, er blitt vist å være effektive for identifisering av sammensetninger som spesifikt blir bundet til ST reseptorene. Analysen består av inkubering av et preparat av ST reseptorer (for eksempel tarmmembraner fra rottetarm, menneksetarm, T84 celler) med en konstant konsentrasjon (1×10^{-10} M til 5×10^{-10} M) av ^{125}I-ST (en hvilken som helst ST reseptorligand så som nativ ST SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 eller SEQ ID NO: 5 kan bli anvendt) og en kjent konsentrasjon av en forsøksforbindelse. Som en kontroll blir et duplikat preparat av ST reseptorer inkubert med en duplikat konsentrasjon av ^{125}I-ST i fravær av forsøksforbindelse. Analysene blir inkubert til likevekt (2 timer) og mengden av ^{125}I-ST bundet til reseptorene blir kvantifisert ved hjelp av standardteknikker. Evnen som testforbindelsen har til å bli bundet til reseptorer blir målt som dets evne til å forhindre (konkurrere med) ^{125}I-ST fra binding. I analyser inneholdende testforbindelsen som blir bundet til reseptoren vil

det være mindre radioaktivitet assosiert med reseptorene. Denne analysen som er hensiktsmessig for å bestemme evnen som et hvilket som helst molekyl har til å bli bundet til ST reseptorer, er en standard konkurrerende bindingsanalyse som lett kan bli anvendt av fagfolk innenfor dette området ved anvendelse av lett tilgjengelige utgangsmaterialer.

ST kan bli isolert fra naturlige kilder ved anvendelse av standardteknikker. I tillegg kan ST reseptorbindende peptider og konjugerte sammensetninger eller deler derav som er peptider bli rutinemessig dannet ifølge hvilke som helst av følgende kjente teknikker.

ST reseptorbindende peptider og konjugerte sammensetninger eller deler derav som er peptider kan bli dannet ved anvendelse av fast fase syntese teknikken opprinnelig beskrevet av Merrifield, i J. Am. Chem. Soc., 15:2149-2154 (1963). Andre peptidsyntese teknikker kan for eksempel bli funnet i M. Bodanszky et al., (1976) Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2d Ed.; Kent og Clark-Lewis i Synthetic Peptides in Biology and Medicine, s. 295-358, eds.Alitalo, K., et al. Science Publishers, (Amsterdam, 1985); samt andre referansearbeider kjent for fagfolk innenfor dette området. En oppsummering av peptidsynteseteknikker finnes i J. Stuart og J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthelia, Pierce Chemical Company, Rockford, IL (1984), som er innkorporert heri som referanse. Fremstilling av peptider ved oppløsningsmetodene kan også bli anvendt, som beskrevet i The Proteins, vol. II, 3d Ed., s. 105-237, Neurath, H. et al., Eds., Academic Press, New York, NY (1976). Hensiktsmessige beskyttelsesgrupper for anvendelse i slike synteser finnes i ovennevnte tekster, samt i J.F.W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, NY (1973), som er innkorporert heri som referanse. Disse syntesemetodene innbefatter generelt sekvensiell tilsetning av en eller flere aminosyreresidier eller egnede beskyttede aminosyreresidier til en voksende peptidkjede. Normalt blir enten amino eller karboksylgruppen til det første aminosyreresidiet beskyttet med en egnet, selektivt fjernbar beskyttelsesgruppe. En annen, selektivt fjernbar beskyttelsesgruppe blir anvendt for aminosyrer inneholdende en reaktiv sidegruppe, så som lysin.

Ved anvendelse av en fast fasesyntese som et eksempel blir den beskyttede eller derivatiserte aminosyren komblet til en inert fast bærer gjennom dets ubeskyttede karboksyl eller aminogruppe. Den beskyttede gruppen av amino eller karboksylgruppen blir deretter selektivt fjernet og den neste aminosyren i sekvensen med komplementær (amino eller karboksyl) gruppe egnet beskyttet blir blandet og omsatt med residiet som allerede er koblet til den faste bæreren. Beskyttelsesgruppen til amino eller

karboksylgruppen blir deretter fjernet fra dette nylig tilsatte aminosyreresidiet, og den aminosyren (på egnet måte beskyttet) blir deretter tilsatt, osv. Etter at alle ønskede aminosyrer er blitt koblet i riktig sekvens blir eventuelt gjenværende terminale og sidegruppe beskyttende grupper (og fast bærer) fjernes sekvensielt eller samtidig, for å tilveiebringe sluttpeptidet. Peptidet ifølge oppfinnelsen mangler fortrinnsvis benzylerte eller metylbenzylerte aminosyrer. Slike beskyttende gruppedeler kan bli anvendt i løpet av syntesen, men de blir fjernet før peptidene blir anvendt. Ytterligere reaksjoner kan være nødvendig, som beskrevet andre steder, for å danne intramolekylære bindinger for å oppnå konformasjonen.

ST reseptor bindende peptider og konjugerte sammensetninger eller deler derav som er peptider kan også bli fremstilt ved hjelp av rekombinante DNA teknikker. Tilveiebringing av en egnet DNA sekvens kodende for det ønskede peptidet muliggjør produksjon av peptidet ved anvendelse av rekombinante teknikker som er kjent innenfor fagområdet. Den kodende sekvensen kan bli oppnådd fra naturlige kilder eller syntetisert eller ellers konstruert ved anvendelse av de tilgjengelige utgangsmaterialer ved hjelp av rutinemessige metoder. Når kodende DNA blir dannet syntetisk kan det dras nytte kjente kodon preferanser fra den antatte verten hvor DNA skal bli uttrykt.

For å produsere et ST reseptorbindende peptid som oppstår i naturen kan fagfolk innenfor dette området ved anvendelse av velkjente teknikker, oppnå et DNA molekyl som koder for ST reseptor bindende peptider fra genomet til organismen som produserer ST reseptorbindende peptid og innskudd av det DNA molekylet inn i en kommersiell tilgjengelig ekspresjonsvektor for anvendelse i velkjente ekspresjonssystemer.

Likeledes kan fagfolk innenfor dette området ved anvendelse av kjente teknikker, kombinere et DNA molekyl som koder for et ST reseptorbindende peptid, så som SEQ ID NO: 1 og SEQ ID NO: 4, som kan bli oppnådd fra genomet til organismen som produserer ST, med DNA som koder for et toksin, et annet aktivt middel som er et peptid eller i tillegg, hvilke som helst andre aminosyresekvenser som er ønskelig å være ved siden av ST reseptor bindende peptid aminosyresekvens i et enkelt peptid og innskudd av det DNA molekylet inn i en kommersiell tilgjengelig ekspresjonsvektor for anvendelse i velkjente ekspresjonssystemer.

For eksempel kan kommersielt tilgjengelig plasmid pSE420 (Invitrogen, San Diego, CA) bli anvendt for rekombinant produksjon i E. coli. Kommersielt tilgjengelig plasmid pYES2 (Invitrogen, San Diego, CA) kan bli anvendt for produksjon i S. serevisiae

stammer av gjær. Kommersielt tilgjengelig MaxBac^{TM} (Invitrogen, San Diego, CA) fullstendig baculovirus ekspresjonssystem kan bli anvendt for produksjon i insektsceller. Kommersielt tilgjengelig plasmid pcDNA I (Invitrogen, San Diego, CA) kan bli anvendt for produksjon i pattedyrceller så som kinesisk hamster ovarieceller.

Fagfolk innenfor dette området kan anvende disse eller andre kommersielt tilgjengelige ekspresjonsvektorer og systemer eller produsere vektorer ved anvendelse av velkjente fremgangsmåter og lett tilgjengelige utgangsmaterialer. Ekspresjonssystemer inneholdende nødvendige kontrollsekvenser, så som promotere og polyadenyleringssignaler, og fortrinnsvis enhancere, er lett tilgjengelige og kjent innenfor fagområdet i forskjellige verter. Se for eksempel Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989). Ønskede proteiner kan bli dannet i både prokaryote og eukaryote systemer, som resulterer i et spekter av prosesserte former av proteinet.

Det mest anvendte prokaryote systemet forblir E. coli, til tross for at andre systemer så som B. subtilis og Pseudomonas også er nyttige. Egnede kontrollsekvenser for prokaryote systemer innbefatter både konstitutive og induserbare promotere inkludert lac promotoren, trp promoteren, hybrid promotere så som tac promotere, lambda fag P1 promoter. Generelt kan fremmede proteiner bli produsert i disse vertene, enten som fusjons- eller modne proteiner. Når ønskede sekvenser blir produsert som modne proteiner kan den produserte sekvensen bli innledet av et metionin som ikke nødvendigvis blir effektivt fjernet. Peptidene og proteinene beskrevet heri kan følgelig bli innledet av en N-terminal Met når produsert i bakterier. Konstruksjoner kan bli dannet hvor den kodende sekvensen for peptidet blir innledet av et operabelt signalpeptid som resulterer i sekresjon av proteinet. Når produsert i prokaryote verter på denne måten blir signalsekvensen fjernet ved sekresjon.

Forskjellige eukaryote verter er også nå tilgjengelige for produksjon av rekombinante fremmede proteiner. Som i bakterier kan aukaryote verter bli transformert med ekspresjonssystemer som produserer det ønskede proteinet direkte, men mer vanlige signalsekvenser er gitt for å oppnå sekresjon av proteinet. Eukaryote systemer har i tillegg den fordelen at de har evne til å prosessere introner som kan oppstå i de genomiske sekvensene kodende for proteinene til høyere organismer. Eukaryote systemer tilveiebringer også forskjellige prosesseringsmekanismer som for eksempel resulterer i glykosylering, karboksy-terminal amidering, oksydering eller derivatisering av visse aminosyreresidier, konformasjonskontroll osv.

Vanlige anvendte eukaryote systemer innbefatter, men er ikke begrenset til, gjær, soppceller, insektsceller, pattedyrceller, apeceller og celler fra høyere planter. Egnede promotere er tilgjengelige og de er kompatible og operable for anvendelse i hver av disse vertstypene samt at de er termineringssekvenser og enhancere, som for eksempel baculovirus polyhedron promoteren. Som ovenfor kan promoterene være enten konstitutive eller induserbare. For eksempel i pattedyrsystemer kan muse metallotionen promoteren bli indusert ved tilførsel av tungmetall ioner.

Former for konstruksjon av ekspresjonssystemer egnede for ønskede verter er kjent for fagfolk innenfor dette området. For rekombinant produksjon av protein blir DNA kodende for dette fortrinnsvis ligert inn i ekspresjonsvektoren som blir valgt og deretter anvendt for å transformere den kompatible verten som deretter blir dyrket og opprettholdt under betingelser hvor ekspresjon av det fremmede genet foregår. Proteinet ifølge foreliggende oppfinnelse som følgelig blir produsert blir isolert fra kulturen, enten ved lysering av cellene eller fra kulturmediet etter behov og kjent for fagfolk innenfor dette området.

Fagfolk innenfor dette området kan, ved anvendelse av velkjente teknikker, isolere proteinet som blir produsert.

Ifølge foreliggende oppfinnelse kan den aktive delen være et terapeutisk middel eller et billeddannende middel i form av et radiostabilt aktivt middel eller et radioaktivt middel. Fagfolk innenfor dette området kan lett innse fordelene ved å kunne spesifikt målsøke metastaserte colorektale celler med en ST reseptorligand og konjugere en slik ligand med mange forskjellige aktive midler.

Kjemoterapeutiske midler nyttige som aktive deler som når konjugert til en ST reseptorbindende del blir spesifikt levert til metastaserte colorektale celler er vanligvis små kjemiske deler som blir produsert ved kjemisk syntese. Kjemoterapeutiske midler innbefatter cytotoksiske og cytostatiske medikamenter. Kjemoterapeutiske midler kan innbefatte slike som har andre effekter på cellene så som reversering av den transformerte tilstanden til en differensiert tilstand eller slike som inhiberer cellereplikasjon. Eksempler på kjemoterapeutiske midler innbefatter vanlige cytotoksiske eller cytostatiske medikamenter så som for eksempel: metotreksat (ametopterin), doksorubicin (adrimycin), daunorubicin, cytosinarabinosid, etopsid, 5-4 fluoruracil, melphalan, klorambucil, og andre nitrogen blandinger (for eksempel

cyklofosfamid), cis-platinum, vindesin (og andre vinca alkaloider), mitomycin og bleomycin. Andre kjemoterapeutiske midler innbefatter: purotionin (byggmel oligopeptid), makromycin, 1,4-benzoquinon derivater og trenimon.

Toksiner er nyttige som aktive deler. Når et toksin blir konjugert til en ST reseptor bindende del blir den konjugerte sammensetningen spesifikt levert til en metastasert colorektal celle ved hjelp av ST reseptorbindende del og toksindeler dreper cellen. Toksiner er generelt komplekse toksiske produkter av forskjellige organismer inkludert bakterier, planter osv. Eksempler på toksiner innbefatter, men er ikke begrenset til: ricin, ricin A kjede (ricin toksin), Pseudomonas eksotoksin (PE), difteria toksin (DT), Clostridium perfringens phospholipase C (PLC), bovin bukspyttkjertel ribonuklease (BPR), kermesbær antiviralt protein (PAP), abrin, abrin A kjede (abrin toksin), cobra venom faktor (CVF), gelonin (GEL), saporin (SAP), modeccin, viscumin og volkensin. Som angitt ovenfor når proteintoksiner blir anvendt med ST reseptor bindende peptider kan konjugerte sammensetninger bli produsert ved anvendelse av rekombinante DNA teknikker. Et rekombinant DNA molekyl kan bli konstruert som koder for ST reseptorliganden og toksin på et chimerisk gen. Når chimeriske genet blir uttrykt blir et fusjonsprotein produsert som innbefatter en ST reseptorbindende del og en aktiv del. Proteintoksiner er også nyttige for å danne konjugerte forbindelser med ST reseptorbindende peptider gjennom ikke-peptidyl bindinger.

I tillegg er det andre metoder for anvendelse av aktive midler for behandling av cancer. For eksempel kan konjugerte sammensetninger bli produsert som innbefatter en ST bindende del og en aktiv del som er et aktivt enzym. Den ST bindende delen spesifikt lokaliserer den konjugerte sammensetningen til tumorcellene. Et inaktivt promedikament som kan bli omdannet av enzymet til et aktivt medikament blir administrert til pasienten. Promedikamentet blir bare omdannet til et aktivt medikament av enzymet som er lokalisert til tumoren. Et eksempel på et enzym/promedikamentpar innbefatter alkalisk fosfatase/etoposiddefosfat. I et slike tilfelle blir alkalisk fosfatase konjugert til en ST reseptorbindende ligand. Konjugert forbindelse blir administrert og lokalisert til den metastaserte cellen. Ved kontakt med etoposiddefosfat (promedikamentet) blir etoposiddefosfatet omdannet til etoposid, et kjemoterapeutisk medikament som blir tatt opp av cancercellen.

Radiosensitiviseringsmidlene er forbindelser som øker sensitiviteten til cellene overfor bestrålning. Eksempler på radiosensitiviserende midler innbefatter nitroimidazoler, metronidazol og misonidazol (se DeVita, V.T. Jr. i Harrison's Principles of Internal

Medicine, s. 68, McGraw-Hill Book Co., N.Y. 1983, som er innkorporert heri som referanse). Den konjugerte forbindelsen som omfatter et radiosensibiliserende middel som aktiv del blir administrert og lokalisert til den metastaserte cellen. Ved individets eksponering overfor bestrålning blir det radiosensibiliserende middelet "aktivert" og forårsaker celledød.

Radionukleider kan bli anvendt i farmasøytiske sammensetninger som er nyttige for radioterapi eller billeddannende prosedyrer.

Eksempler på radionukleider nyttige som toksiner i bestrålningsterapi innbefatter: ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}Pb og ^{212}B. Andre radionukleider som er blitt anvendt av fagfolk innenfor dette området innbefatter: ^{32}P og ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt, ^{197}Hg, alle beta negative og/eller auger emittere. Noen foretrukne radionukleider innbefatter: ^{90}Y, ^{131}I, ^{211}At og $^{312}Pb/^{212}Bi$.

Ifølge foreliggende oppfinnelse kan de aktive delene være et billeddannende middel. Billeddannende midler er nyttige diagnostiske prosedyrer samt prosedyrene anvendt for å identifisere lokalisasjonen av metastaserte celler. Billeddanning kan bli utført ved hjelp av mange prosedyrer som er velkjente for fagfolk innenfor dette området og hensiktsmessige billeddannende midler nyttige i slike prosedyrer kan bli konjugert til en ST reseptor ligand ved hjelp av velkjente metoder. Billeddanning kan bli utført, for eksempel, ved radioscintigrafi, nukleær magnetisk resonans billeddannelse (MRI) eller datatomografi (CT scan). De mest vanlige anvendte radionukleotidbilleddannende midlene innbefatter radioaktivt iod og indium. Billeddannelse ved CT scan kan anvende et tungmetall så som jern chelater. MRI scanning kan anvende chelater av gadolinium eller mangan. I tillegg kan positron emisjonstomografi (PET) være mulig ved anvendelse av positron emittere av oksygen, nitrogen, jern, karbon eller gallium. Eksempler på radionukleider nyttige i billeddannende prosedyrer innbefatter: ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, $^{81}Rb/^{81M}Kr$, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb og ^{206}Bi.

Det er foretrukket at de konjugerte sammensetningene er ikke-immungene eller immungene i meget lavt nivå. Det er følgelig foretrukket at ST reseptorbinende del er et lite, både immungent eller ikke-immungent peptid eller et ikke-peptid. Det er likeledes foretrukket at den aktive delen er et lite, dårlig-immungent eller ikke-immungent peptid eller et ikke-peptid. Nativ ST, som er et lite peptid, er dårlig immungent (se Klipstein,

F.A. et al. (1982) Infect. Immun. 37:550-557; Gianella, R.A. et al. (1981) Infect. Immun. 33:186; Burgess, M.N. et al. (1978) Infect. Immun. 21:60; Evans, D.G. et al. (1973) Infect. Immun. 7:873; Gyles, C.L. (1979) Ann. N.Y. Acad. Sci. 16:314; og Sack, R.B. (1975) Ann. Rev. Microbiol. 29:333). Fragmenter og aminosyre erstatningsderivater av nativ ST er dårlig immungene. Konjugerte sammensetninger som innbefatter alle eller en del av nativ ST som en ST reseptor bindende del er generelt dårlig immungen i den grad at det native ST er dårlig immungent.

ST reseptor ligandene blir konjugert til aktive midler ved hjelp av forskjellige velkjente teknikker som lett blir utført uten unødig eksperimentering av fagfolk innenfor dette området. Teknikken anvendt for å konjugere ST reseptorliganden til det aktive middelet er avhengig av den molekylære naturen til ST reseptorliganden og det aktive middelet. Etter ST reseptorliganden og det aktive middelet er konjugert for å danne et enkelt molekyl kan analyser bli utført for å forsikre at det konjugerte molekylet beholder aktivitetene til delene. ST reseptorbindingsanalysen beskrevet ovenfor kan bli utført ved anvendelse av den konjugerte forbindelsen for å teste om det har evne til å bli bundet til ST reseptoren. Aktiviteten til den aktive delen kan bli testet ved anvendelse av forskjellige analyser for hver respektive type av aktivt middel. Radionukleider beholder deres aktivitet, dvs. deres radioaktivitet, uansett konjugering. Med hensyn på aktive midler som er toksiner, medikamenter og målsøkende midler, kan standardanalyser for å demonstrere aktiviteten til ukonjugerte former til disse forbindelsene bli anvendt for å bekrefte at aktiviteten er blitt beholdt.

Konjugering kan bli oppnådd direkte mellom ST reseptor liganden og det aktive middelet eller koblingen, mellomliggende molekylære grupper kan bli tilveiebragt mellom ST reseptorliganden og det aktive middelet. Kryssbindere er spesielt nyttige for å lette konjugasjon ved å tilveiebringe koblingsseter for hver del. Kryssbindere kan innbefatte ytterligere molekylære grupper som virker som spacere for å separere delene fra hverandre for å forhindre disse fra å interferere med aktiviteten til de andre.

I noen foretrukne utførelsesformer er ST reseptorligand peptidet SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5-54 eller fragmenter eller derivater derav. Det er blitt observert at konjugasjon til disse molekylene fortrinnsvis blir utført ved den aminoterminale delen av hvert respektive peptid. I ST reseptorligand peptidene omfattende deaminosyresekvensene i motsatt rekkefølge som SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5-54, oppnås konjugasjon fortrinnsvis ved den karboksyterminale enden.

Fagfolk innenfor dette området kan konjugere et ST reseptorligand peptid til et kjemoterapeutisk medikament ved anvendelse av velkjente teknikker. For eksempel Magerstadt, M. Antibody Conjugates and Malignant Disease. (1991) CRC Press, Boca Raton, USA, s. 110-152) som er inkorporert heri som referanse, beskriver konjugering av forskjellige cytostatiske medikamenter til aminosyrene av antistoffene. Slike reaksjoner kan bli anvendt for å konjugere kjemoterapeutiske medikamenter til ST reseptor ligander, inkludert ST reseptor bindende peptider, med en hensiktsmessig linker. ST reseptor ligandene som kan ha en fri aminogruppe så som ST reseptor bindende peptider kan bli konjugert til aktive midler ved den gruppen. De fleste kjemoterapeutiske midlene som blir anvendt for behandling av cancer har funksjonelle grupper som kan anvendes for direkte kjemisk kryssbinding med proteiner. For eksempel er frie aminogrupper tilgjengelige på metotreksat, doksorubicin, daunorubicin, cytosinarabinosid, cis-platin, vindesin, mitomycin og bleomycin mens frie karboksylsyre grupper er tilgjengelige på metotreksat, melfalan og klorambucil. Disse funksjonelle gruppene, dvs. frie amino og karboksylsyrer, er mål for forskjellige homobifunksjonelle og heterobifunksjonelle kjemiske kryssbindende midler som kan kryssbinde disse medikamentene direkte til den enkelte frie aminogruppen til ST. En fremgangsmåte for å kryssbinde ST reseptorligandene som har en fri aminogruppe så som ST reseptor bindende peptider, som for eksempel SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:5-54 for å aktivere midler som har en fri aminogruppe så som metotreksat, doksorubicin, daunorubicin, cytosinarabinosid, cis-platin, vindesin, mitomycin og bleomycin eller alkalisk fosfatase, eller protein- og peptid-basert toksin anvender homobifunksjonelle suksinimidylestere, fortrinnsvis med karbonkjede spacere så som disuksinimidylsuberat (Pierce Co, Rockford, IL). Dersom en spaltbar konjugert forbindelse er nødvendig kan den samme protokollen bli anvendt ved anvendelse av 3,3'-ditiobis (sulfosuksinimidylpropionat; Pierce Co.).

For å konjugere et ST reseptor ligand peptid til et peptid-basert aktivt middel så som toksin kan ST reseptorliganden og toksinet bli produsert som et enkelt, fusjonsprotein enten ved standardpeptidsyntese eller rekombinant DNA teknologi i det begge rutinemessig kan bli utført av fagfolk innenfor dette området. Alternativt kan to peptider, ST reseptorligand peptidet og peptid-basert toksin bli produsert og/eller isolert som separate peptider og konjugert ved anvendelse av kryssbindere. Som med konjugerte sammensetninger som inneholder kjemoterapeutiske midler kan konjugeres med ST reseptorbindende peptider og toksiner være med på å bestemme evnen til å modifisere den enkelte frie aminogruppen til et ST reseptorbindende peptid, mens den reseptor-bindende funksjonen til dette molekylet blir bevart.

Fagfolk innenfor dette området kan konjugere et ST reseptor ligand peptid til et radionukleid ved anvendelse av velkjente teknikker. For eksempel Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CRC Press, Boca Raton, FLA; og Barchel, S.W. og Rhodes, B.H., (1983) Radioimaging and Radiotherapy, Elsevier, NY, NY, hver er innkorporert heri som referanse, beskriver konjugasjon av forskjellige terapeutiske og diagnostiske radionukleider til aminosyrer av antistoffer. Slike reaksjoner kan bli anvendt for å konjugere radionukleider til ST reseptorligand peptider eller til ST reseptorligander inkludert ST reseptorligand peptider med en hensiktsmessig linker.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer farmasøytiske sammensetninger som omfatter konjugerte forbindelser ifølge oppfinnelsen og farmasøytiske akseptable bærere eller fortynningsmidler. Den farmasøytiske sammensetningen ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli formulert av fagfolk innenfor dette området. Egnede farmasøytiske bærere er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, en standard referanse tekst innenfor dette området, som er innkorporert heri som referanse. Ved å utføre fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse kan konjugerte forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse bli anvendt alene eller i kombinasjon med andre diagnostiske, terapeutiske eller ytterligere midler. Slike ytterligere midler innbefatter eksipienter så som fargestofer, stabiliserende midler, osmotiske midler og antibakterielle midler.

De konjugerte sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan for eksempel bli formulert som en oppløsning, suspensjon eller emulsjon i assosiasjon med en farmasøytisk akseptabel parenteral bærer. Eksempler på slike bærere er vann, saltvann, Ringers oppløsning, dekstrose oppløsning og 5% humant serumalbumin. Liposomer kan også bli anvendt. Bæreren kan inneholde additiver som opprettholder isotonisiteten (for eksempel natriumklorid, mannitol) og kjemisk stabilitet (for eksempel buffere og konserveringsmidler). Formuleringen blir sterilisert ved anvendelse av vanlige anvendte teknikker. For eksempel blir en parenteral sammensetning egnet for administrering ved injeksjon fremstilt ved oppløsning av 1,5 vekt-% aktivt ingrediens i 0,9% natriumkloridoppløsning.

De farmasøytiske sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli administrert som enten en enkelt dose eller i flere doser. De farmasøytiske sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelsen kan bli administrert enten som individuelle terapeutiske midler eller i kombinasjon med andre terapeutiske midler.

Behandlingene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli kombinert med konvensjonelle terapier, som kan bli administrert sekvensielt eller samtidig.

De farmasøytiske sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli administrert ved hjelp av hvilke som helst midler som muliggjør at den konjugerte sammensetningen når målcellene. I noen utførelsesformer omfatter administreringsrutene de som blir valgt for gruppen bestående av intravenøs, intraarteriell, intraperitoneal, lokal administrering inn i blodtilførselen til organet hvor tumoren er tilstede eller direkte inn i selve tumoren. Intravenøs administrering er foretrukket administreringsmåte. Det kan bli oppnådd ved hjelp av en infusjonspumpe.

Administrerte dose varierer avhengig av faktorer så som: naturen til den aktive delen; naturen til den konjugerte sammensetningene; farmakodynamiske karaktertrekk; måte og administrasjonsrute; alder, helse og høyden til mottageren; naturen og graden av symptomene; type av samtidig behandling; og behandlingsfrekvens.

På grunn av at konjugerte forbindelser blir spesifikt målsøkt til celler med ST reseptorer blir konjugerte forbindelser som omfatter kjemoterapeutiske midler eller toksiner administrert i doser som er mindre enn de som blir anvendt når kjemoterapeutiske midler eller toksiner blir administrert som ukonjugerte aktive midler, fortrinnsvis i doser som inneholder opptil 100 ganger mindre aktivt middel. I noen utførelsesformer blir konjugerte forbindelser som omfatter kjemoterapeutiske midler eller toksiner administrert i doser som inneholder 10-100 ganger mindre aktivt middel som en aktiv del enn doseringen til kjemoterapeutiske midler eller toksiner administrert som ukonjugerte aktive midler. For å bestemme hensiktsmessig dose blir mengde av forbindelse fortrinnsvis målt i mol i stedenfor i vekt. På denne måten påvirker ikke den variable vekten til forskjellige ST bindende deler beregningen. Ved å anta et til et forhold av ST bindende del til aktiv del i konjugerte sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan et mindre antall mol av konjugerte forbindelser bli administrert sammenlignet med mol ukonjugerte forbindelser administrert, fortrinnsvis opp til 100 ganger mindre mol.

Kjemoterapeutiske konjugater blir vanligvis administrert intravenøst i flere adskilte doser.

Opp til 20 g IV/dose metotreksat blir vanligvis administrert i en ukonjugert form. Når metotreksat blir administrert som den aktive delen i en konjugert forbindelse ifølge

oppfinnelsen er det en 10- til 100-ganger dosereduksjon. Ved følgelig å anta at hver konjugerte forbindelse innbefatter et molekyl metotreksat konjugert til en ST reseptor bindende del, vil av den totale mengden av konjugert forbindelse administrert opp til omtrent 0,2 - 2,0 g metotreksat være tilstede og derfor administrert. I noen utførelsesformer er av den totale mengden konjugert forbindelse administrert opp til omtrent 200 mg - 2 g metotreksat tilstede og blir derfor administrert.

Metotreksat har en molekylvekt på 455. Et mol ST peptid-metotreksatkonjugat veier mellom omtrent 1755-2955 avhengig av ST peptid som blir anvendt. Den effektive dosen varierer for ST peptid-metotreksat konjugatet mellom omtrent 10 til 1000 mg. I noen utførelsesformer doseringer på 50 til 500 mg ST peptid-metotreksat konjugat blir administrert. I noen utførelsesformer blir doseringer på 80 til 240 mg ST peptid-metotreksat konjugat administrert.

Doksorubicin og daunorubicin veier hver omtrent 535. ST peptid-deoksorubicin konjugatet og ST peptid-daunorubicin konjugater har hver molekylvekter på mellom omtrent 1835-2553.5. Ved å anta at hver konjugerte forbindelse innbefatter et molekyl doksorubicin eller daunorubicin konjugert til en ST reseptor bindende del er det effektive doseringsområdet for ST peptid-doksorubicin konjugatet eller ST peptid-daunorubicin konjugatet mellom omtrent 40 til 4000 mg. I noen utførelsesformer blir doseringer på 100 til 1000 mg ST peptid-doksorubicin konjugat eller ST peptid-daunorubicin konjugat administrert. I noen utførelsesformer blir doseringer på 200-600 mg ST peptid-doksorubicin konjugat eller ST peptid-daunorubicin konjugat administrert.

Toksin-inneholdende konjugerte forbindelser blir formulert for intravenøs administrering. Ved anvendelse av denne metoden blir opp til 6 nanomol/kg kroppsvekt toksin administrert som en enkelt dose med betydelige terapeutiske virkninger i pasienter med melanoma (Spitler L.E., et al. (1987) Cancer Res. 47:1717). I noen utførelsesformer kan opp til omtrent 11 µg ST peptid-toksin konjugert forbindelse/kg kroppsvekt bli administrert for terapi.

Ved å anta at hver konjugerte forbindelse innbefatter et molekyl av ricintoksin A kjede konjugert til en ST reseptorbindende del, blir konjugerte sammensetninger omfattende ricintoksin A kjede administrert i doser hvor andelen i vekt av ricintoksin A kjede er 1-500 µg av totalvekten av konjugatforbindelsen som blir administrert. I noen foretrukne utførelsesformer omfatter konjugerte sammensetninger ricintoksin A kjede administrert

i doser hvor andelen i vekt av ricintoksin A kjede er 10-100 µg av totalvekten til administrert konjugert forbindelse. I noen foretrukne utførelsesformer blir konjugerte sammensetninger omfattende ricintoksin A kjede administrert i doser hvor andelen i vekt av ricintoksin A kjede er 2-50 µg av totalvekten til den konjugerte forbindelsen som blir administrert. Molekylvekten til ricintoksin A kjeden er 32.000. En konjugert forbindelse som inneholder ricin A kjede koblet til et ST peptid har en molekylvekt på omtrent 33.300-34-500. Området av doser til slike konjugerte forbindelser som skal bli administrert utgjør 1 til 500 µg. Ved noen utførelsesformer blir 10 til 100 µg av slike konjugerte forbindelser administrert. I noen utførelsesformer blir 20 til 50 µg av slike konjugerte forbindelser administrert.

Ved å anta at hver konjugerte forbindelse innbefatter et molekyl difteria toksin A kjede konjugert til en ST reseptor bindende del blir konjugerte sammensetninger som omfatter difteria toksin A kjede administrert i doser hvor andelen i vekt av difteria toksin A kjede er 1-500 µg av totalvekten til administrert konjugert forbindelse. I noen foretrukne utførelsesformer omfatter konjugerte sammensetninger difteria toksin A kjede administrert i doser hvor andelen i vekt av difteria toksin A kjede er 10-100 µg av totalvekten til administrert konjugert forbindelse. I noen foretrukne utførelsesformer omfatter konjugerte forbindelser difteria toksin A kjede administrert i doser hvor andelen i vekt av difteria toksin A kjede er 40-80 µg av totalvekten til den konjugerte forbindelsen som blir administrert. Molekylvekten til difteria toksin A kjeden er 66.600. En konjugert forbindelse som inneholder difteria A kjede koblet til et ST peptid har en molekylvekt på omtrent 67.900-69.100. Doseringsområdet til slike konjugerte forbindelser som skal bli administrert utgjør 1 til 500 µg. I noen utførelsesformer blir 10 til 100 µg av slike konjugerte forbindelser administrert. I noen utførelsesformer blir 40 til 80 µg av slike konjugerte forbindelser administrert.

Ved å anta at hver konjugerte forbindelse innbefatter et molekyl Pseudomonas eksotoksin konjugert til ST reseptor bindende del omfatter konjugerte sammensetninger Pseudomonas eksotoksin administrert i doser hvor andelen i vekt av Pseudomonas eksotoksin er .01-100 µg av totalvekten til administrert konjugert forbindelse. I noen foretrukne utførelsesformer omfatter konjugerte sammensetninger Pseudomonas eksotoksin administrert i doser hvor andelen i vekt av Pseudomonas eksotoksin er .1 - 10 µg av totalvekten til den konjugerte forbindelsen som blir administrert. I noen foretrukne utførelsesformer omfatter konjugerte sammensetninger Pseudomonas eksotoksin administrert i doser hvor andelen i vekt av Pseudomonas eksotoksin er .3 - 2,2 µg av totalvekten til konjugert forbindelse som blir administrert. Molekylvekten til

Pseudomonas eksotoksin er 22.000. En konjugert forbindelse som inneholder Pseudomonas eksotoksin koblet til ST peptid har en molekylvekt på omtretn 67.900-69.100. Doseringsområdene til slike konjugerte forbindelser som skal bli administrert er .01 til 100 μg. I noen utførelsesformer blir .1 til 10 μg av slike konjugerte forbindelser administrert. I noen utførelsesformer blir .3 til 2,2 μg av slike konjugerte forbindelser administrert.

Til dosekonjugerte sammensetninger som omfatter ST reseptorbindende deler koblet til aktive deler som er radioisotoper i farmasøytiske sammensetninger nyttige som billeddannende midler antas det at hver ST reseptorbindende del blir koblet til en radioaktiv del. Mengden av radioisotop som skal bli administrert er avhengig av radioisotopen. Fagfolk innenfor dette området kan lett formulere mengden av konjugert forbindelse som skal bli administrert basert på den spesifikke aktiviteten og energien til et gitt radionukleid anvendt som en aktiv del. Vanligvis blir 0.1-100 millucurie pr dose billeddannende middel, fortrinnsvis 1-10 millicurie, som oftest 2-5 millicurie administrert. Farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse nyttige som billeddannende midler omfattende konjugerte sammensetninger omfattende en ST reseptor bindende del og en radioaktiv del omfattende 0.1-100 millicurie, i noen utførelsesformer fortrinnsvis 1-10 millicurie, i noen utførelsesformer fortrinnsvis 2-5 millicurie, i noen utførelsesformer fortrinnsvis 1-5 millicurie. Eksempler på doseringer innbefatter: ^{131}I = mellom omtrent 0.1-100 millicurie pr dose, i noen utførelsesformer fortrinnsvis 1-10 millicurie, i noen utførelsesformer 2-5 millicurie, og i noen utførelsesformer omtrent 4 millicurie; ^{111}In = mellom omtrent 0,1-100 millicurie pr dose, i noen utførelsesformer fortrinnsvis 1-10 millicurie, i noen utførelsesformer 1-5 millicure, og i noen utførelsesformer omtrent 2 millicurie; ^{99m}Tc = mellom omtrent 0,1-100 millicurie pr dose, i noen utførelsesformer fortrinnsvis 5-75 millicurie, i noen utførelsesformer 10-50 millicurie, og i noen utførelsesformer omtrent 27 millicurie. Avhengig av den spesifikke aktiviteten til den radioaktive delen og vekten til ST reseptor bindende del varierer doseringen definert i vekt. ST peptidene har molekylvekter på mellom omtrent 1300-2500. I den farmasøytiske sammensetningen omfattende et ST peptid koblet til et enkelt ^{131}I hvor den spesifikke aktiviteten til ^{131}I-ST peptid er omtrent 2000 Ci/mmol, er administrering av dose på 0,1-100 millicurie tilsvarende 0,1-100 μg ^{131}I-ST peptid, administrering av dosen 1-10 millicurie tilsvarer 1 - 10 μg ^{131}I-ST peptid, administrering av dosen 2-5 millicurie tilsvarer 2-5 μg ^{131}I-ST peptid og administrering av dosen 1-5 millicurie tilsvarer administrering av 1-5 μg ^{131}I-ST peptid. I den farmasøytiske sammensetningen som omfatter et ST peptid koblet til et enkelt ^{111}In hvor den spesifikke aktiviteten til ^{111}In-ST peptid er omtrent 1

Ci/mmol, utgjør administrering av en dose på 0,1 - 100 millicurie omtrent 0,2 - 200 mg ^{111}In-ST peptid, administrering av dosen 1-10 millicurie tilsvarer 2-20 mg ^{111}In-ST peptid, administrering av dosen 2-5 millicurie tilsvarer administrering av 4-10 mg ^{111}In-ST peptid og administrering av dosen 1-5 millicurie tilsvarer 2-10 mg ^{111}In-ST peptid.

For å dosere konjugerte sammensetninger som omfatter ST reseptor bindende deler koblet til aktive deler som er radioisotoper i farmasøytiske sammensetninger nyttige som terapeutiske midler blir det antatt at hver ST reseptor bindende del er koblet til en radioaktiv del. Mengden av radioisotop som ble administrert er avhengig av radioisotopen. Fagfolk innenfor dette området kan lett formulere mengden av konjugert forbindels som skal bli administrert basert på den spesifikke aktiviteten og energien til et gitt radionukleotid anvendt som en aktiv del. For terapeutiske midler som omfatter ^{131}I er mellom 10-1000 nM, fortrinnsvis 50-500, mer foretrukket omtrent 300 nanomol ^{131}I ved tumoren, pr gram tumor ønskelig. Hvis det følgelig er omtrent 1 g tumor, og omtrent 0,1% av den administrerte dosen blir bundet til tumoren blir 0,5-100 mg ^{131}I-ST peptid konjugert forbindelse administrert. I noen utførelsesformer blie 1 til 50 mg ^{131}I-ST peptid konjugert forbindelse administrert. I noen utførelsesformer blir 5 til 10 mg ^{131}I-ST peptid konjugert forbindelse administrert. Wessels B.W. og R.D. Rogus (1984) Med.Phys. 11:638 og Kwok, C.S. et al. (1985) Med. Phys. 12:405, begge er innkorporert heri som referanse, og beskriver detaljerte doseberegninger for diagnostiske og terapeutiske konjugater som kan bli anvendt for fremstilling av farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse som innbefatter radioaktive konjugerte forbindelser.

Individer som antas å lide av metastasert colorektal cancer kan bli behandlet ved administrering til individet en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen som omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radiostabilt terapeutisk middel. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radiostabilt aktivt middel og den ST reseptor bindende delen er et peptid. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptorbindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radiostabilt aktivt

middel og den ST reseptor bindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5-54 og fragmenter og derivater derav. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radiostabilt aktivt middel og den ST reseptor bindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 og SEQ ID NO: 54. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetning en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radiostabilt terapeutisk middel. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radiostabilt aktivt middel valgt gruppen bestående av: metotreksat, doksorubicin, daunorubicin, cytosinarabinosid, etopsis, 5-4 fluoruracil, melfalan, klorambucil, cis-platinum, vindesin, mitomycin, bleomycin, purotionin, makromycin, 1,4-benzoquinon derivater, trenimon, ricin, ricin A kjede, Pseudomonas eksotoksin, diphteria toxin, Clostridium perfringens fosfolipase C, bovin bukspyttkjertel ribonuklease, kermesbær antiviralt protein, abrin, abrin A kjede, kobravenom faktor, gelonin, saporin, modeccin, viskumin, volkensin, alkalisk fosfatase, nitroimidazol, metronidazol og misonidazol. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptorbindende del og en aktiv del hvor den ST reseptorbindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5-54 og fragmenter og derivater derav og den aktive delen er et radiostabilt aktivt middel valgt fra gruppen bestående av: metotreksat, doksorubicin, daunorubicin, cytosinarabonosid, etposid, 5-4- fluoruracil, melfalan, klorambucil, cis-platinum, vindesin, mitomycin, bleomycin, purotionin, makromycin, 1,4-benzoquinon derivater, trenimon, ricin, ricin A kjede, Pseudomonas eksotoksin, difteri toksin, Clostridium perfringens fosfolipase C, bovin bukspyttkjertel ribonuklease, kermesbær antiviralt protein, abrin, abrin A kjede, kobra venom faktor, gelonin, sapronin, modeccin, viskumin, volkensin, alkalisk fosfatase, nitroimidazol, metronidazol og misonidazol. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radiostabilt aktivt middel valgt fra

gruppen bestående av: metotreksat, doksorubicin, daunorubicin, cytosinarabinose, cis-platin, vindesin, mitomycin og bleomycin, alkalisk fosfatase, ricin A kjede, Psedomonas eksotoksin og difteri toksin. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den ST reseptor bindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 og SEQ ID NO: 54 og den aktive delen er et radiostabilt aktivt middel valgt fra gruppen bestående av: metotreksat, doksorubicin, daunorubicin, cytosinarabinose, cis-platin, vindesin, mitomycin og bleomycin, alkalisk fosfatase, ricin A kjede, Psedomonas eksotoksin og difteri toksin. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en radiostabil konjugert forbindelse beskrevet i eksempel 1. Individet som blir behandlet kan bli diagnostisert å ha metastasert colorektal cancer eller kan bli diagnostisert og ha lokalisert colorektal cancer og gjennomgå behandling proaktivt dersom det er noen metastaser som ikke er blitt detektert. Den farmasøytiske sammensetningen inneholder en terapeutisk effektiv mengde av den konjugerte sammensetningen. En terapeutisk effektiv mengde er en mengde som effektivt forårsaker en cytotoksisk eller cytostatisk effekt på metastaserte colorektale cancerceller uten å forårsake letale bivirkninger på individet.

Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan anvendes for behandling av individer som antas å lide av metastasert colorektal cancer. Slike individer kan bli behandlet ved administrering til individet en farmasøytisk sammensetning som omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er radioaktiv. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk askeptabel bærer eller fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktiv og den ST resepor bindende delen er et peptid. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktivt middel og den ST reseptor bindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 5-54 og fragmenter og derivater derav. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk

akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktivt middel og den ST resptor bindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 og SEQ ID NO: 54. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktivt middel valgt fra gruppen bestående av: ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P og ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193}Mpt og ^{197}Hg. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den ST reseptor bindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 5-54 og fragmenter og derivater derav og den aktive delen er et radioaktivt middel valgt fra gruppen bestående av: ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P og ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193}Mpt og ^{197}Hg, ^{32}P og ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193}Mpt, ^{197}Hg, alle beta negative og/eller auger emitterende midler. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktivt middel valgt fra gruppen bestående av: ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P og ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193}Mpt og ^{197}Hg. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den ST reseptor bindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 og SEQ ID NO: 54 og den aktive delen er et radioaktivt middel valgt fra gruppen bestående av: ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P og ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193}Mpt og ^{197}Hg. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller

fortynningsmiddel og en radioaktiv konjugert forbindelse beskrevet i eksempel 1. Individet som blir behandlet kan bli diagnostisert å ha metastasert colorektal cancer eller kan bli diagnostisert å ha lokalisert colorektal cancer og kan gjennomgå behandling proaktivt dersom det er metastaser som ikke er blitt detektert. Den farmasøytiske sammensetningen inneholder en terapeutisk effektiv mengde av den konjugerte sammensetningen. En terapeutisk effektiv mengde er en mengde som effektivt forårsaker en cytotoksisk eller cytostatisk effekt på metastaserte colorektale cancerceller uten å forårsake letale bivirkninger i individet.

Et aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører en in vitro fremgangsmåte for detektering av metastaserte colorektale cancerceller i et individ som antas å lide av metastasert colorektal cancer ved radiobilleddannelse. Slike individer kan bli diagnostisert å lide av metastasert colorektal cancer og metastaserte colorektale cancerceller kan bli detektert ved å administrere til individet, fortrinnsvis ved intravenøs administrering, en farmasøytisk sammensetning som omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptorbindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktivt middel og detektering av tilstedeværelsen av en lokalisert akkumulering eller aggregasjon av radioaktivitet som indikerer tilstedeværelse av celler med ST reseptorer. I noen utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetning en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktivt middel og den ST reseptor bindende delen er et peptid. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktivt middel og den ST reseptor bindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5-54 og fragmenter og derivater derav. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktivt middel og den ST reseptor bindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 og SEQ ID NO: 54. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktivt middel

valgt fra gruppen bestående av: radioaktive tungmetaller så som jernchelater, radioaktive chelater av gadolinium eller mangan, på sitron emitteringsmidler av oksygen, nitrogen, jern, karbon eller gallium, ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, $^{81}Rb/^{81M}Kr$, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb og ^{206}Bi. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den ST reseptor bindende delen blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5-54 og fragmenter og derivater derav og den aktive delen er et radioaktivt middel valgt fra gruppen bestående av: radioaktive tungmetaller så som jernchelater, radioaktive chelater av gadolinium eller mangan, positron emitteringsmiddel av oksygen, nitrogen, jern, karbon eller gallium, ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, $^{81}Rb/^{81M}Kr$, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb og ^{206}Bi. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor den aktive delen er et radioaktivt middel valgt fra gruppen bestående av: ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, $^{81}Rb/^{81M}Kr$, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb og ^{206}Bi. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en konjugert forbindelse som omfatter en ST reseptor bindende del og en aktiv del hvor ST reseptor bindende del blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 og SEQ ID NO: 54 og den aktive delen er et radioaktivt middel valgt fra gruppen bestående av: ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, $^{81}Rb/^{81M}Kr$, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb og ^{206}Bi. I noen utførelsesformer ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter den farmasøytiske sammensetningen en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel og en radioaktiv konjugert forbindelse beskrevet i eksempel 1. Individet som blir behandlet kan bli diagnostisert å ha metastasert colorektal cancer eller kan bli diagnostisert å ha lokalisert colorektal cancer og kan gjennomgå behandling proaktivt dersom det er noen metastaser som ikke er detekterte. Den farmasøytiske sammensetningen inneholder en diagnostisk effektiv mengde av den konjugerte sammensetningen. En diagnostisk effektiv mengde er en mengde som kan bli detektert et sted på kroppen hvor celler med ST reseptorer er lokalisert uten å forårsake letale bivirkninger på individet.

Et annet aspekt vedrører ukonjugerte sammensetninger som omfatter en ST reseptor bindende ligand og et aktivt middel, for eksempel i form av liposomer som er små vesikler bestående av lipider. Medikamentene kan bli introdusert i midten av disse vesiklene. Det ytre skallet til disse vesiklene omfatter en ST resptor bindende ligand. Liposomes Volumes 1, 2 and 3 CRC PressInc. Boca Raton FLA, som er inkorporert heri som referanse, beskriver fremstilling av liposom-innkapslede aktive midler som innbefatter målsøking av midler som tilsvarer ST reseptorliganden i det ytre skjellet. Ukonjugerte sammensetninger som omfatter en ST reseptor ligand i matrisen til en liposom med et aktivt middel inni innbefatter slike sammensetninger hvor ST reseptorliganden blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5-54 og fragmenter og derivater derav og det aktive middelet blir valgt fra gruppen bestående av: metotreksat, doksorubicin, daunorubicin, cytosinarabinosid, etopsid, 5-4 fluoruracil, melfalan, klorambucil, cis-olatinum, vindesin, mitomycin, bleomycin, purotionin, makromycin, 1,4-benzoquinon derivater, trenimon, ricin, ricin A kjede, Pseudomonas ekostoksin, difteri toksin, Clostridium perfringes fosfolipase C, bovin bukspyttkjertel ribonuklease, kermesbær antiviralt protein, abrin, abrin A kjede, kobravenom faktor, gelonin, saporin, modeccin, viskumin, volkensin, alkalisk fosfatase, nitroimidazol, metronidazol og misonidazol.

Et annet aspekt vedrører ukonjugerte og konjugerte sammensetninger som omfatter en ST reseptor ligand anvendt for å levere terapeutiske nukleinsyremolekyler til celler som omfatter en ST reseptor så som normale celler i tarmkanalen samt metastaserte colorektale cancerceller. Det genetiske materialet kan leveres til metastaserte tumorceller for å produsere et antigen som kan bli målsøkt av immunsystemet eller for å produsere et protein som dreper cellen eller inhiberer proliferasjonen derav. ST reseptor liganden kan anvendes for å levere nukleinsyrer som koder for nukleinsyre molekyler som erstatter defekte endogene gener eller som koder for terapeutiske proteiner. ST reseptorliganden kan følgelig anvendes for å levere det aktive middelet spesifikt til cellene som kler tarmkanalen for å behandle sykdommer som er spesifikke for dette organet. Sammensetninger som omfatter nukleinsyremolekyler kan således erstatte defekte gener. Sammensetningene kan anvendes i genterapiprotokoller for å levere til individer, genetisk materiale nødvendig og/eller ønskelig for å kompansere en genetisk mangel.

ST reseptorliganden kan kombineres med eller inkorporeres i en leveringsbærer som derved omdanner leveringsbæreren til en spesifikt målsøkt leveringsbærer. For eksempel kan et ST reseptor bindende peptid bli integrert inn i den ytre delen av en viral

partikkel som gjør et slikt virus til et ST reseptor-bærende cellespesifikt virus. Beleggsproteinet til et virus kan bli omkonstruert slik at det blir produsert som et fusjonsprotein som innbefatter et aktivt ST reseptorbindende peptid som er eksponert eller ellers tilgjengelig på utsiden av viralpartikkelen som danner et slikt virus til et ST reseptor-bærende celle-spesifikt virus. ST reseptorliganden kan integreres eller ellers inkorporert i liposomene hvori ST reseptorliganden blir eksponert eller er ellers mottagelig på utsiden av liposomet som gjør slike liposomer spesifikt målsøkbare til ST reseptor-bærende celler.

Det aktive middelet i de konjugerte eller ukonjugerte sammensetningene kan være et nukleinsyremolekyl. Nukleinsyre kan være RNA eller fortrinnsvis DNA. Nukleinsyremolekylet kan være et antisens molekyl eller kode for en antisenssekvens hvor tilstedeværelsen i cellen inhiberer produksjonen av et uønsket protein. Nukleinsyremolekylet kan kode for et ribozym hvor tilstedeværelsen derav i cellen inhiberer produksjon av et uønsket protein. Nukleinsyremolekylet kan kode for et protein eller et peptid som fortrinnsvis blir produsert i cellen. Nukleinsyremolekylet kan kode for en funksjonell kopi av et gen som er defekt i målcellen. Nukleinsyremolekylet er fortrinnsvis operabelt koblet til regulatoriske elementer nødvendige for å uttrykke den kodende sekvensen i cellen.

Liposomer er små vesikler bestående av lipider. Genetiske konstruksjoner som koder for proteiner som er ønskelig å uttrykke i ST reseptor-bærende celler blir ført inn i midten av disse vesiklene. Det ytre skjellet av disse vesiklene omfatter en ST reseptorligand, i noen utførelsesformer fortrinnsvis et ST peptid. Liposomes Volumes 1, 2 and 3 CRC Press Inc. Boca Raton FLA, som er innkorporert heri som referanse, beskriver fremstilling av liposom-innkapslede aktive midler som innbefatter antistoffer i det ytre skallet. I foreliggende oppfinnelse tilsvarer en ST reseptorligand så som for eksempel et ST peptid antistoffer i det ytre skallet. Ukonjugerte sammensetninger som omfatter en ST reseptorligand i matrisen til et liposom med et aktivt middel inni innbefatter slike sammensetninger hvor ST reseptorliganden blir valgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5-54 og fragmenter og derivater derav.

Cystisk fibrose som er en genetisk sykdom hvor det er en mutasjon i et spesifikt gen kodende for et kloridtransport protein som til slutt produserer unormal funksjon i mange systemer, spesielt i åndedrettskanalen og tarmkanalen, kan behandles ved genterapiteknikker ved anvendelse av ST reseptorligander for å levere det korrigerte genet til cellene. Gjeldende terapi er blitt rettet mot å erstatte det mutante genet i

åndedrettssystemet med det normale genet ved å målsøke disse cellene direkte til celler som kler åndedrettskanalen ved anvendelse av viruser som bare blir bundet til disse cellene. Det normale genet blir pakket i lipsomer målsøkt på deres overflate med ST reseptorligander og levert til mave-tarm kanalen. ST reseptorligandene målsøker spesifikt å lede liposomer inneholdende det normale genet for å korrigere lesjonen for cystisk fibrose til de spesifikke cellene som kler mave-tarm kanalen, fra tolvfingertarmen til rektum. Opptak av det genetiske materialet til de cellene bør resultere i en helbredelse av cystisk fibrose i mave-tarm kanalen.

Avlevering av normale kopier p53 tumorsuppsorgenet til mage-tarm kanalen kan også oppnås ved anvendelse av ST reseptorliganden for å målsøke det genterapeutiske middelet. Mutasjonene til p53 tumorsuppressor genet ser ut til å spille en betydelig rolle for utvikling av colorektal cancer i tarmkanalen. En metode for å bekjempe denne sykdommen er levering av normale kopier av dette genet til tarmkanalen til celler som uttrykker mutante former av dette genet. Genetiske konstruksjoner som omfatter normale p53 tumorsuppressorgener er innkorporert inn i liposomer som omfatter en ST reseptorligand. Sammensetningen blir overført til tarmkanalen. ST reseptorbindende lignander spesifikt målsøker og leder liposomene inneholdende det normale genet for å korrigere lesjonen dannet ved mutasjon av p53 supperssorgenet i tarmcellene.

Preparering av genetiske konstruksjoner hører inn under fagområdet til fagfolkene innenfor dette feltet. Foreliggende oppfinnelse muliggjør at slike konstruksjoner spesifikt blir målsøkt ved anvendelse av ST reseptorligandene ifølge foreliggende oppfinnelse. Sammensetningene ifølge oppfinnelsen innbefatter ST reseptor ligand så som et ST peptid assosiert med en leveringsbærer og en genkonstruksjon som omfatter enten kodende sekvens til et protein hvor produksjonen derav er ønsket i cellene til tarmkanalen koblet til nødvendige regulatoriske sekvenser for ekspresjon i cellene. For opptak fra cellene til tarmkanalen blir sammensetningene administrert oralt eller ved enema hvorved de går inn i tarmkanalen og kontakter cellene som omfatter ST reseptorer. Leveringsbærerene assosiert med ST reseptoren i kraft av ST reseptorliganden og bæreren blir tatt inn i cellen eller det aktive middelet/genetiske konstruksjonen blir ellers tatt opp av cellen. Når innesluttet kan konstruksjonen tilveiebringe en terapeutisk effekt på individet. Fagfolk innenfor dette området kan lett formulere slike sammensetninger for oral eller enema administrering og bestemme den effektive mengen av en slik sammensetning for administrering for å lege sykdommen eller forstyrrelsen.

Sammensetninger, sett og fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen nyttige for in vitro screening, diagnostikk og analysering av pasient og pasientprøver kan bli anvendt for å detektere ST reseptor protein ekspresjonen i celler hvor tilstedeværelse av celler som uttrykker ST reseptoren indikerer metastase av colorektal cancer. Foreliggende oppfinnelse vedrører videre fremgangsmåter, sammensetninger og sett nyttige for in vitro screening, diagnostikk og analysering av pasient og pasientprøver for å detektere ST reseptorprotein ekspresjonen i celler hvori tilstedeværelse av cellene som uttrykker ST reseptoren indikerer og/eller bekrefter at en tumor har en colorektal canceropprinnelse. I et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse er det gitt sammensetninger, sett og fremgangsmåter som er nyttige for å visualisere colorektale celler. Slike sammensetninger, sett og fremgangsmåter for analysering av vevsprøver fra tarmvevet for å vurdere mutastasegraden eller invasjonen av colorektale tumorceller i lamina propria.

In vitro screening og diagnostiske sammensetninger, in vitro fremgangsmåter og sett kan bli anvendt for å registrere individer som er høyrisikogruppene for colorektal cancer så som de som er blitt diagnostisert ved lokalisert sykdom og/eller metastasesykdom og/eller de som er genetisk koblet til sykdommen. In vitro screening og diagnostiske sammensetninger, fremgangsmåter og sett kan bli anvendt for å registrere individer som gjennomgår og/eller er blitt behandlet for lokalisert colorektal cancer for å bestemme om canceren har blitt metastasert. In vitro screening og diagnostiske sammensetninger, fremgangsmåter og sett kan bli anvendt for å registrere individer som gjennomgår og/eller er blitt behandlet for metastasert colorektal cancer for å bestemme om den metastaserte canceren er blitt eliminert. In vitro screening og diagnostiske sammensetninger, fremgangsmåter og sett kan bli anvendt for å registrere individer som ellers er mottagelige, dvs. individer som er blitt identifisert som genetisk predisponert så som ved genetisk screening og/eller familiehistorier. Fremskritt angående forståelse av genetikk og utviklinger i teknologi samt epidemiologi muliggjør bestemmelse for et individs sannsynlighet og risiko for utvikling av colorektal cancer. Ved anvendelse av familie helsehistorier og/eller genetisk screening er det mulig å vurdere sannsynligheten for at et bestemt individ vil utvikle visse typer av cancer inkludert colorektal cancer. Individer som er blitt identifisert å være predisponert for utvikling av en spesiell form for cancer kan bli registrert eller screnet for å detektere tilstedeværelse av mutastasert colorektal cancer. Ved oppdagelse av slike bevis kan det bli foretatt tidlig behandling for å bekjempe sykdommen. Individer som har høy risiko for å utvikle metastasert colorektal cancer kan bli identifisert og prøver kan bli isolert fra slike individer. Oppfinnelsen er spesielt nyttig for registrering av individer som er blitt identifisert å ha

familiære medisinske historier som omfatter slektninger som har lidd av colorektal cancer. Likeledes er foreliggende oppfinnelse spesielt nyttig for å registrere individer som er blitt diagnostisert å ha colorektal cancer og spesielt de som er blitt behandlet og fått fjernet tumorer og/eller har fått tilbakefall inkludert de som er blitt behandlet for metastasert colorektal cancer.

In vitro screening og diagnostiske sammensetninger, in vitro fremgangsmåter og sett kan bli anvendt for analysering av tumorer. Ekspresjon av ST reseptoren er en markør for celletype og muliggjør identifikasjon av opphavet til adenocarcinoma med ubekreftet opprinnelse som colorektal tumorer og muliggjør også å bekrefte en inneldende diagnostikk av colorektal cancer. Tumorer antatt å være colorektale av opprinnelse kan bli bekreftet ved anvendelse av sammensetninger, fremgangsmåter og sett ifølge oppfinnelsen. Oppfinnelsen kan bli anvendt for å bekrefte diagnostikk av colorektal cancer ved å bekrefte at tumorene er av colorektal opprinnelse. Likeledes kan tumorer av ukjent opprinnelse bli analysert og identifisert å være colorektale av opprinnelse ved anvendelse av sammensetningene, fremgangsmåtene og settene ifølge oppfinnelsen. Oppfinnelsen kan bli anvendt for å identifisere colorektale tumorer i tumorprøver fjernet fra individer som lider av adenocarcinoma med uidentifisert opprinnelse.

In vitro screening og diagnostiske sammensetninger, sett og in vitro fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen kan bli anvendt for å analysere vevsprøver fra tarmvev for å vurdere mutastasegraden eller invasjon av colorektale tumorceller inn i lamina propria. Lamina propria representerer barrieren mellom colorektale kanal og resten av kroppen, se Bailey's Textbook of Histology, 16th edition, Coperhaven et al. 1997 Williams and Wilkens, Baltimore MD på side 404 som er innkorporert heri som referanse. Ved identifisering av tilstedeværelse av ST reseptoren eller mRNA som koder for ST reseptorproteinet i cellene til lamina propria, kan grad av invasjon/infiltrering av colorektale tumorceller inn i ikke-colorektalt vev bli vurdert og bekreftet.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det gitt forbindelser som blir bundet til ST reseptor protein eller mRNA kodende for reseptorer. Normalt vev i kroppen har ikke ST reseptorer eller mRNA kodende for ST reseptorer med unntagelse av cellene i tarmkanalen. Metastaserte colorektale celler kan bli identifisert ved detektering i ikke-colorektale prøver av ST reseptorer eller mRNA kodende for ST reseptorer. Ekspresjon av ST reseptoren er en markør for celletypen og muliggjør identifikasjon av colorektale mutastaser i ekstra-intestinale prøver. ST reseptorproteinet eller mRNA som koder for dette kan bli anvendt for å visualisere colorektalt avledede celler fra andre celler i

kroppshulrommet for å vurdere invasjonsnivået til colorektale tumorceller inn i grunnmembranen.

I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen kan ikke-colorektalt vev og fluidprøver eller tumorprøver bli screenet for å identifisere tilstedeværelse eller fravær av ST reseptorprotein. Teknikker som ST reseptor/ligand bindende analyser, ELISA analyser og Western blot kan bli utført for å bestemme om ST reseptoren er tilstede i en prøve.

I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen kan ikke-colorektalt vev og fluidprøver eller tumorprøver bli screenet for å identifisere om ST reseptorproteinet blir uttrykt i cellene utenfor colorektale kanal ved å bestemme tilstedeværelse eller fravær av mRNA som koder for ST reseptorproteinet. Tilstedeværelse av mRNA som koder for ST reseptorproteinet eller cDNA dannet derfra kan bli bestemt ved anvendelse av teknikker så som PCR amplifikasjon, Northern blot (mRNA), Southern blot (cDNA) eller oligonukleotidhybridisering.

I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen kan celler eller ikke-colorektale vevsprøver eller tumorprøver bli undersøkt for å identifisere tilstedeværelse eller fravæe av ST reseptorproteinet. Teknikker så som en ST reseptor/ligand binding eller immunhistokjemi blot kan bli utført på vevssnitt for å bestemme om ST reseptoren er tilstede i en prøve.

I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen kan celler av ikke-colorektale vevsprøver eller tumorprøver bli undersøkt for å bestemme om ST reseptorproteinet blir uttrykt i cellene utenfor colorektalkanalen ved å bestemme tilstedeværelse eller fravær av mRNA som koder for ST reseptorproteinet. Tilstedeværelse av mRNA som koder for ST reseptorproteinet eller cDNA dannet derfra i celler fra vevssnitt kan bli bestemt ved anvendelse av teknikker så som in situ hybridisering.

Tilstedeværelse av ST reseptor i ikke-colorektalt vev og fluidprøver eller på celler fra ikke-colorektale vevsprøver indikerer colorektale tumormetastaser. Tilstedeværelse av ST reseptor i en tumorprøve eller på tumorceller indikerer at tumoren har colorektal opprinnelse. Tilstedeværelse av mRNA som koder for ST reseptoren i ikke-colorektalt vev og fluidprøver eller i celler fra ikke-colorektale vevsprøver indikerer colorektale tumormetastaser. Tilstedeværelse av mRNA som koder for ST reseptor i tumorprøver og tumorceller indikerer at tumoren er av colorektal opprinnelse.

Noen aspekter av foreliggende oppfinnelse vedrører in vitro fremgangsmåter og sett er gitt for å vurdere metastatisk migrering av tumorcellene i lamina propria, som indikerer invasjonsnivået av colorektale tumorceller inn i grunnmembranen. I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen kan vevsprøver som innbefatter snitt av lamina propria bli isolert fra individer som gjennomgår eller som er helbredet ved kirurgi for å fjerne colorektale tumorer. Vevet blir analysert for å bestemme invasjonsgraden inn i grunnmembranen til lamina propria ved neoplastiske colorektale celler. Identifikasjon av tilstedeværelse eller fravær av ST reseptor proteinet bekrefter vurderingen av migreringen til tumorcellene inn i grunnmembranen som indikerer metastaser. Teknikker så som ST reseptor/ligand binding og immunhistokjemianalyser kan bli utført for å bestemme om ST reseptoren er tilstede i cellene i vevsprøven som indikerer metastatisk migrering. Alternativt blir i noen vevsprøver som innbefatter lamina propria analysert for å identifisere om ST reseptorproteinet blir uttrykt i cellene i vevsprøven som indikerer metastatisk migrering ved detektering av tilstedeværelse eller fravær av mRNA som koder for ST reseptor proteinet. Tilstedeværelse av mRNA som koder for ST reseptorproteinet eller cDNA dannet derfra kan bli bestemt ved anvendelse av teknikker så som in situ hybridisering.

Prøver fra tumorer kan bli identifisert som colorektal opprinnelse ved identifisering av ekspresjon til ST reseptorer ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Prøver av tumorer fjernet fra individer som lider av adenocarcinoma med ubekreftet opprinnelse kan bli testet for å bestemme om de har ST reseptorprotein eller mRNA kodende for ST reseptorprotein. Dersom prøven blir fjernet fra tarmkanalen kan en del av frosne celler bli undersøkt for å bestemme om tumorcellene uttrykker ST reseptorproteinet. Dersom prøven blir fjernet fra ekstraintestinalt vev kan en del av frosne celler bli undersøkt for å bestemme om tumorcellene uttrykker ST reseptorprotein eller så kan prøven bli homogenisert og testet på grunn av at ikke-cancer celler ikke vil ha ST reseptor og derfor ikke presentere bakgrunn.

Prøvene kan bli oppnådd fra uttatt vev eller biopsi materialet inkludert nålebiopsi. Vevssnittpreparering for kirurgisk patologi kan bli frosset og preparert ved anvendelse av standardteknikker. I ST bindingsanalyser på vevssnitt blir ST tilsatt før fiksering av cellene. Immunhistokjemi og in situ hybridiseringsbindingsanalyser på vevssnitt blir utført i fikserte celler. Ekstra-intestinale prøver kan bli homogenisert ved hjelp av standardteknikker så som sonikering, mekanisk ødeleggelse eller kjemisk lysering så som detergent lysering. Det er også betraktet at tumorprøvene i kroppen så som blod, urin, lymfevæske, cerebralspinal væske, aniotisk sekret, vaginal sekret, sæd og

avføringsprøver kan også bli screenet for å bestemme om slike tumorer har colorektal opprinnelse.

Ikke-colorektale vevsprøver kan bli oppnådd fra et hvilket som helst vev unntatt fra colorektale kanal, dvs. tarmkanalen under tynntarmen (dvs. tykktarmen (kolon), inkludert cecum, ascending kolon, transvere kolon, descending kolon og sigmoid kolon, og rektum) og ytterligere duodenum og tynntarmen (jejunum og ileum). Cellene fra alle vev unntatt de fra colorektal kanal uttrykker ikke reseptoren. Dersom ST reseptorproteinet eller mRNA kodende for ST reseptorprotein blir detektert i ikke-colorektale prøver vises tilstedeværelse av metastatiske colorektale cancerceller. I noen foretrukne utførelsesformer er vevsprøvene lymfeknuter. Vevsprøver kan bli oppnådd ifølge standardkirurgiske teknikker inkludert anvendelse av biopsinåler. Fagfolk innenfor dette området kan lett finne ut forskjellige testprøver som kan bli undersøkt for ST reseptorprotein og finne metoder for oppnåelse av vevsprøver.

Vevsprøvene kan bli homogenisert eller ellers preparert for screening for tilstedeværelse av ST reseptorprotein ved hjelp av velkjente teknikker så som sonikering, mekanisk ødeleggelse, kjemisk lysering så som detergent lysering eller kombinasjoner derav.

Eksempler på kroppssekretprøver inkluderer blod, urin, lymfevæske, cerebrospinalvæske, amnion væske, vaginalt sekret og sæd. I noen foretrukne utførelsesformer blir blod anvendt som en prøve på kroppsvæske. Celler kan bli isolert fra væskeprøven så som sentrifugering. Fagfolk innenfor dette området vil lett finne ut forskjellige testprøver som kan bli undersøkt for ST reseptorprotein. Testprøvene kan bli oppnådd ifølge slike metoder som å tappe væske med en nål eller med en svamp. Fagfolk innenfor dette området kan lett finne ut andre fremgangsmåter for oppnåelse av testprøvene.

I en analyse ved anvendelse av en blodprøve kan blodplasma bli separert fra blodcellene. Blodplasma kan bli screenet for ST reseptorprotein, inkludert forkorter protein som blir frigjort i blodet når ST reseptorproteinet blir spaltet fra eller separert fra metastaserte colorektale tumorceller. I noen utførelsesformer blir blodcellefraksjoner screenet for tilstedeværelse av metastaserte colorektale tumorceller. I noen utførelsesformer er lymfocyter til stede i blodcelle fraksjonen og screenet ved lysering av cellene og detektering av tilstedeværelse av ST reseptorproteinet eller mRNA kodende for ST reseptorproteinet som kan være tilstede som et resultat av

tilstedeværelse av hvilke som helst metastaserte colorektale tumorceller som kan ha blitt innesluttet av blodcellene.

Når det gjelder aspekter relatert til analysering av hulromsvev er foreliggende oppfinnelse nyttig for å vurdere nivået av metastatisk migrering av colorektale tumorceller ved anvendelse av lumenprøver tatt fra kirurgi pasienter ved og nære ved tumorstedet. Tumoraspektene tilveiebringer fremgangsmåter for analysering av vevsprøver som er fikserte snitt rutinemessig dannet av kirurgiske patologer for å karakterisere og vurdere cellene. I noen utførelsesformer er cellene fra lamina propria og blir analysert for å bestemme og vurdere graden av metastaser til colorektale tumorceller. Lamina propria representerer barrieren mellom colorektal trakt og resten av kroppen. Ved identifisering av tilstedeværelse av ST reseptoren eller mRNA som koder for ST reseptorprotein i celler til lamina propria, kan grad av invasjon, infiltrering av colorektale tumorceller inn i ikke-colorektalt vev bli vurdert. I noen utførelsesformer blir cellene fjernet i en biopsi eller som et adenocarcinoma med ukjent opprinnelse og blir analysert for å bestemme og vurdere om de er colorektale tumorceller. I noen utførelsesformer er cellene fra en tumor antatt å være av colorektal opprinnelse og fremgangsmåten og sammensetningene og settene ifølge oppfinnelsen blir anvendt for å bekrefte identiteten til opprinnelsen av tumorcellene.

Prøver av lamina propria blir fjernet i løpet av colorektal tumorfjerningskirurgi så som ved reseksjon eller kolonoskopi. Prøver inkludert basalmembranceller blir frosset. Dersom en ST bindingsanalyse skal bli utført blir merket ST kontaktet til den frosne delen og cellene blir deretter fiksert og farget. Dersom immunhistokjemi eller in situ hybridisering skal bli utført blir den frosne delen farget og deretter blir analysen kjørt. Fagfolk innenfor dette området kan lett isolere prøver som innbefatter deler av lamina propria å fiksere og farge disse ved anvendelse av standardteknikker. Ved å tilsette visualiseringen tilveiebragt med en ST reseptordeteksjonsteknikk kan snittet bli mer omfattende analysert og invasjonsnivået til neoplastiske colorektale celler inn i lamina propria kan bli bestemt. Foreliggende oppfinnelse kan bli anvendt for å analysere og vurdere graden av progresjon av lokaliserte colorektale tumorer som er hovedsakelig eller ikke-mutastatiske colorektale tumorer dersom disse har penetrert grunnmembranen som ligger under slimhinnen inn i subslimhinnen.

Immunanalysemetoder kan bli anvendt for å identifisere individer som lider av colorektal cancermutastase ved detektering av tilstedeværelse av ST reseptorprotein i prøven til ikke-colorektalt vev eller kroppsfluid ved anvendelse av antistoffer som ble

produsert i respons til eksponering overfor ST reseptorprotein. Immunanalysefremgangsmåter kan bli anvendt for å identifisere individer som lider colorektal cancer ved å detektere tilstedeværelse av ST reseptorprotein i tumorprøven ved anvendelse av antistoffer som ble produsert i respons til eksponering overfor ST reseptorprotein.

Antistoffene er fortrinnsvis monoklonale antistoffer. Antistoffene blir fortrinnsvis dannet mot ST reseptorprotein dannet i humane celler. Antistoffene bindes fortrinnsvis til en epitope på den ekstracellulære domenen til ST reseptorproteinet. Immunanalyser er velkjente og konstruksjonen kan rutinemessig bli gjennomført av fagfolk innenfor dette området. Fagfolk innenfor dette området kan produsere monoklonale antistoffer som spesifiket blir bundet til ST reseptorproteinet og er nyttige i fremgangsmåter og sett ifølge oppfinnelsen ved anvendelse av standardteknikker og lett tilgjengelige utgangsmaterialer. Teknikker for produsering av monoklonale antistoffer er beskrevet i Harlow, E., og D. Lane, (1988) ANTIBODIES: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, som er innkorporert heri som referanse, tilveiebringer detaljerte retningslinjer for produksjon av hybridomer og monoklonale antistoffer som spesifikt blir bundet til målproteinene. Det hører inn under rammen av foreliggende oppfinnelse å innbefatte FAb og F(Ab)2 som spesifikt blir bundet til ST reseptoren i stedenfor antistoffer.

ST reseptorproteinet blir injisert inn i mus. Milten til musene blir fjernet, miltcellene blir isolert og fusjonert med udødeliggjorte museceller. Hybridcellene, eller hybridomer, blir dyrket og celler som utskiller antistoffer blir selektert. Antistoffer blir analysert og dersom de spesifkt blir bundet til ST reseptorproteinet blir hybridomer som produserer disse dyrket for å produsere en kontinuerlig tilførsel av anti-St reseptor protein spesifikke antistoffer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører forbindelser konjugert med antistoffer som blir produsert i respons til eksponering overfor ST reseptorprotein. Antistoffene er fortrinnsvis monoklonale antistoffer. Antistoffene blir fortrinnsvis dannet overfor ST reseptor protein dannet i humane celler. I noen utførelsesformer blir antistoffene spesifikt bundet til den ekstracellulære domenen av ST reseptorproteinet. I noen utførelsesformer blir antistoffene spesifikt bundet til transmembrandomenet. I noen utførelsesformer bindes antistoffer spesifikt til cytoplasmadomenet.

Midler for å detektere tilstedeværelse av et protein i en testprøve er rutinemessige og fagfolk innenfor dette området kan detektere tilstedeværelse eller fravær av et protein eller et antistoff ved anvendelse av velkjente fremgangsmåter. En velkjent fremgangsmåte for detektering av tilstedeværelse av et protein er en immunanalyse. Fagfolk innenfor dette området kan lett bestemme mange måter for å utføre en immunanalyse på for å detektere tilstedeværelse av ST reseptorprotein i en prøve.

Ifølge noen utførelsesformer omfatter immunanalyser muliggjøring av at proteinene i prøven blir bundet til en fast fase bærer så som plastoverflate. Detekterbare antistoffer blir deretter tilsatt som selektivt blir bundet til ST reseptorproteinet. Deteksjon av detekterbart antistoff indikerer tilstedeværelse av ST reseptorprotein. Detekterbart antistoff kan være et merket eller et umerket antistoff. Umerket antistoff kan bli detektert ved anvendelse av et annet, merket antistoff som spesifikt blir bundet til det første antistoffet eller det andre, umerkede antistoffet som kan bli detektert ved anvendelse av merket protein A, et protein som blir kompleksbundet med antistoffer. Forskjellige immunanalyseprosedyrer er beskrevet i Immunassays for the 80's, A. Voller et al., Eds., University Park, 1981, som er innkorporert heri som referanse.

Enkle immunanalyser kan bli utført hvor en fast fase bærer blir kontaktet med testprøven. Hvilke som helst proteiner som er til stede i testprøven blir bundet til fast fase bæreren og kan bli detektert ved hjelp av et spesifikt, detekterbart antistoffpreparat. En slik teknikk er essensen av dot blot, Western blot og andre lignende analyser.

Andre immunanalyser kan være mer kompliserte, men allikevel gi gode resultater. Typiske og foretrukne immunmetriske analyser innbefatter "forover" analyser for deteksjon av et protein hvor et første anti-protein antistoff bundet til en fast fase bærer blir kontaktet med testprøven. Etter en egnet inkubasjonsperiode blir den faste fase bæreren vasket for å fjerne ubundet protein. Et andre, bestemt anti-protein antistoff blir deretter tilsatt som er spesifikt for en del av det spesifikke proteinet som ikke er gjenkjent av det første antistoffet. Det andre antistoffet er fortrinnsvis detekterbart. Etter en andre inkubasjonsperiode for å muliggjøre at det detekterbare antistoffet blir kompleksbundet med det spesifikke proteinet bundet til fast fase bæreren gjennom det første antistoffet, blir fast fase bæreren vasket for annen gang for å fjerne ubundet detekterbart antistoff. Alternativt kan det være at det andre antistoffet ikke blir detektert. I dette tilfellet blir et tredje detekterbart antistoff, som blir bundet til det andre antistoffet, tilsatt til systemet. Denne typen av "forover sandwich" analyser kan være en enkel ja/nei analyse for å bestemme om bindingen har oppstått eller kan bli gjort

kvantitativ ved å sammenligne mengden av detekterbart antistoff med det som blir oppnådd i en kontroll. Slike "to-sete" eller "sandwich analyser" er beskrevet av Wide, Radioimmune Assay Method, Kirkham, Ed., E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970, s. 199-206, som er innkorporert heri som referanse.

Andre typer immunmetriske analyser er de såkalte "samtidige" og "reverse" analyser. En samtidig analyse innbefatter et enkelt inkubasjonstrinn hvor det første antistoffet bundet til fast fase bæreren, det andre, detekterbare antistoffet og testprøven blir tilsatt på samme tid. Etter at inkubasjonen er fullført blir fast fase bæreren vasket for å fjerne ubunnede proteiner. Tilstedeværelse av detekterbart antistoff assosiert med den faste bæreren blir deretter bestemt som i en konvensjonell "forover sandwich" analyse. Samtidig analyse kan også bli tilpasset på lignende måte for deteksjon av antistoffer i en testprøve.

"Revers" analyse omfatter trinnvis tilsetning av en oppløsning av detekterbart antistoff til testprøven etterfulgt av en inkubasjonsperiode og tilsetning av antistoff bundet til en fast fase bærer etter ytterligere inkubasjonsperide. Fast fase bæreren blir vasket på konvensjonell måte for å fjerne ubunnede protein/antistoff komplekser og ureagert detekterbart antistoff. Bestemmelse av detekterbart antistoff assosiert med fast fase bæreren blir deretter bestemt som i "samtidig" og "forover" analyser. Revers analyse kan også bli tilpasset på en lignende måte for deteksjon av antistoffer i en testprøve.

Den første komponenten av den immunmetriske analysen kan bli tilsatt til nitrocellulose eller en annen fast fase bærer som har evne til å immobilisere proteiner. Den første komponenten for bestemmelse av tilstedeværelse av ST reseptoren i en testprøve er anti-ST reseptor antistoff. Med "fast fase bærer" eller "bærer" menes et hvilket som helst materiale med evne til å binde proteiner. Velkjente fast fase bærere innbefatter glass, polystyren, polypropylen, polyetylen, dekstran, nylon, amylaser, naturlige og modifiserte celluloser, polyakrylamider, agaroser og magnetitt. Naturen til bæreren kan være enten oppløselig i en viss grad eller uoppløselig for formålet ifølge oppfinnelsen. Bærerkonfigurasjonen kan være sfærisk, som i en kule, eller i sylindrisk, som innsiden og flaten til et forsøksrør eller den ytre overflaten til enstang. Alternativt kan overflaten være flat så som et ark, teststrimmel osv. Fagfolk innenfor dette området kjenner til mange andre egnede "fast fase bærere" for binding av proteinene eller vil kunne bestemme dette ved anvendelse av rutinemessig eksperimentering. En foretrukket fast fase bærer er en 96-brønn mikrotiterskål.

For å detektere tilstedeværelse av ST reseptorprotein blir detekterbare anti-ST reseptorantistoffer anvendt. Flere fremgangsmåter er velkjente for deteksjon av antistoffer.

En fremgangsmåte hvor antistoffene kan bli detekterbart merket er ved kobling av antistoffene til et enzym og deretter anvendelse av antistoffene i en enzymimmunanalyse (EEA) eller enzym-bundet immunsorbent analyse (ELISA), så som en oppfangnings ELISA. Enzymet, når deretter eksponert for substratet, reagerer med substratet og danner en kjemisk del som kan bli detektert, for eksempel spektrofotometrisk, flourometrisk eller visuelt. Enzymer som kan bli anvendt for å detektere merkede antistoffer innbefatter, men er ikke begrenset til malat dehydrogenase, staphylococcal nuklease, delta-5-steroid isomerase, gjæralkohol dehydrogenase, alfa-glycerofosfat dehydrogenase, triosefosfatisomerase, pepperrotperoksidase, alkalisk fosfatase, asparaginase, glukoseoksydase, beta-galaktosidase, ribonuklease, urease, katalase, glukose-6-fosfat dehydrogenase, glukoamylase og acetylcholinesterase. Fagfolk innenfor dette området er kjent med andre enzymer som også kan bli anvendt.

En annen fremgangsmåte hvor antistoffer kan bli detekterbart merket er ved radioaktive isotoper og påfølgende anvendelse i en radioimmunanalyse (RIA) (se for eksempel Work, T.S. et al., Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, N.Y., 1978, som er innkorporert heri som referanse). Radioaktivt isotop kan bli detektert ved hjelp av anvendelse av en gammateller eller en scintillasjonsteller eller ved autoradiografi. Isotoper som er spesielt nyttige ifølge foreliggende oppfinnelse er ^{3}H, ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S og ^{14}C. ^{125}I er en foretrukket isotop. Fagfolk innenfor dette området kan lett finne andre radioisotoper som også kan bli anvendt.

Det er også mulig å merke antistoffet med en fluorescensforbindelse. Når det fluorescens-merkede antistoffet blir eksponert for lys med riktig bølgelengde kan tilstedeværelsen derav bli detektert på grunn av dets fluorescens. Blant de mest vanlige anvendte fluroescens merkeforbindeler er fluorescein, isotiocyanat, rhodamin, fykoerytrin, fykocyanin, allofykocyanin, o-ftalaldehydog fluorescamin. Fagfolk innenfor dette området kjenner til andre fluorescensforbindelser som også kan bli anvendt.

Antistoffer kan også bli detekterbart merket ved anvendelse av fluorescens-avgivende metaller så som ^{152}Eu, eller andre fra lanthanoidserien. Disse metallene kan bli koblet til protein-spesifikt antistoff ved anvendelse av slike metallchelateringsgrupper som

dietylentriaminopentaeddiksyre (DTPA) eller etylendiamintetraeddiksyre (EDTA). Fagfolk innenfor dette området kjenner til andre fluorescens-avgivende metaller samt andre metallchelateringsgrupper som også kan bli anvendt.

Antistoffet kan også bli detekterbart merket ved kobling til en kjemiluminescens forbindelse. Tilstedeværelse av kjemiluminescens-merket antistoff blir bestemt ved detektering av tilstedeværelse av luminescens som oppstår i løpet av forløpet til en kjemisk reaksjon. Eksempler på spesielt nyttige kjemoluminescensmerkende forbindelser er luminol, isoluminol, theromatisk akridiniumester, imidazol, akridiniumsalt og oksalatester. Fagfolk innenfor dette området vil kjenne til andre kjemoluminescensforbindelser som også kan bli anvendt.

Likeledes kan en bioluminescensforbindelse bli anvendt for å merke antistoffer. Bioluminescens er en type kjemiluminescens som tynnes i biologiske systemer hvor et katalytisk protein øker effektiviteten til kjemiluminescensreaksjonen. Tilstedeværelse av et bioluminescensprotein blir bestemt ved detektering av tilstedeværelsen avluminescens. Viktige bioluminescensforbindelser for merking er luciferin, luciferase og aequorin. Fagfolk innenfor dette området kjenner også til andre bioluminescensforbindelser som også kan bli anvendt.

Deteksjon av protein-spesifikt antistoff, fragment eller derivat kan bli oppnådd ved en scintillasjonsteller dersom for eksempel den detekterbare markøren er en radioaktiv gammastråler. Alternativt kan deteksjonen bli oppnådd fra et fluorometer dersom for eksempel markøren er et fluorescensmateriale. Når det gjelder en enzymmarkør kan deteksjonen bli oppnådd ved hjelp av kolorometriske metoder som anvender et substrat for enzymet. Deteksjonen kan også bli oppnådd ved visuell sammenligning av graden av enzymatisk reaksjon til et substrat sammenlignet med lignende preparerte standarder. Fagfolk innenfor dette området kjenner til andre hensiktsmessige fremgangsmåter for deteksjon som også kan bli anvendt.

Bindinsaktiviteten til en gitt mengde antistoffer kan bli bestemt ifølge velkjente fremgangsmåter. Fagfolk innenfor dette området vil kunne bestemme operative og optimale analysebetingelser for hver bestemmelse ved anvendelse av rutinemessig eksperimentering.

Positive og negative kontroller kan bli utført hvor kjente mengder av ST reseptorproteinet og ikke noe ST reseptorprotein blir tilsatt til analysene som blir utført

parallelt med testanalysen. Fagfolk innenfor dette området vil ha tilstrekkelig kunnskap for å utføre de hensiktsmessige kontrollene.

ST reseptorproteinet kan bli produsert som et reagens for positive kontroller. Fagfolk innenfor dette området vil dra nytte av de forskjellige metodene hvorved ST reseptorproteinet kan bli produsert og isolert.

En "antistoff sammensetning" refererer til antistoffet eller antistoffene nødvendige for deteksjon av proteinet. For eksempel omfatter antistoffsammensetningen anvendt for deteksjon av ST reseptoren i en testprøve et første antistoff som binder ST reseptorproteinet samt et andre eller tredje detekterbart antistoff som binder det første eller andre antistoffet.

For å undersøke en testprøve for tilstedeværelse av ST reseptorprotein kan en standardimmunmetrisk analyse så som den som er beskrevet nedenfor bli utført. Et første anti-ST reseptorprotein antistoff, som gjenkjenner en spesifikk del av ST reseptoren så som den ekstracellulære eller cytoplasmiske delen, blir tilsatt til en 96-brønn mikrotiterplate i et volum buffer. Platen blir inkubert i en tidsperiode tilstrekkelig for at bindingen skal oppstå og deretter vasket med PBS for å fjerne ubundet antistoff. Platen blir deretter blokkert med en PBS/BSA oppløsning for å forhindre at prøveproteiner uspesifikt blir bundet til mikrotiterplaten. Testprøven blir deretter tilsatt til brønnene og skålen blir inkubert i en tidsperiode som er tilstrekkelig for at binding oppstår. Brønnene blir vasket med PBS for å fjerne ubundet protein. Merkede anti-ST reseptor antistoffer, som gjenkjenner deler av ST reseptoren som ikke blir oppdaget av det første antistoffer, blir tilsatt til brønnene. Skålen blir inkubert i en tidsperiode som er tilstrekkelig for at binding oppstår og deretter vasket med PBS for å fjerne ubundet, merket anti-ST reseptor antistoff. Mengden av merket og bundet anti-ST reseptor antistoff blir deretter bestemt ved hjelp av standardteknikker.

Sett som er nyttige for deteksjon av ST reseptor i en testprøve omfatter en beholder omfattende anti-ST reseptorantistoffer og en beholder eller beholdere som omfatter kontrollene. Kontrollene innbefatter en kontrollprøve som ikke inneholder ST reseptorprotein og/eller en annen kontrollprøve som inneholder ST reseptorprotein. Anti-ST reseptorantistoffer anvendt i settet er detekterbare, i det de er detekterbart merkede. Dersom det detekterbare anti-ST antistoffet ikke er merket kan det bli detektert av de andre antistoffene eller protein A som for eksempel også kan være tilstede i noen sett i separate beholdere. Ytterligere komponenter i noen sett innbefatter

fast bærer, buffer og instruksjoner for å utføre analysen. Anti-ST reseptor antistoffer anvendt i settet blir fortrinnsvis bundet til en epitope på den ekstracellulære domenen til ST reseptorproteinet.

Immunanalysen er nyttig for detektering av ST reseptoren i homogeniserte vevsprøver og kroppssekret prøver inkludert plasmadelen eller cellene i sekretprøven.

Western blot kan bli anvendt i fremgangsmåter for identifisering av individer som lider av colorektale cancer metastaser ved detektering av tilstedeværelse av ST reseptorprotein i prøven til ikke-colorektalt vev eller kroppssekret. Western blot kan også bli anvendt for å detektere tilstedeværelse av ST reseptorprotein i prøven til tumoren fra et individ som lider av cancer for å identifisere og/eller bekrefte at tumoren er av colorektal opprinnelse. Western blot anvender detekterbare anti-ST reseptor antistoffer for å bli bundet til eventuelle ST reseptorer tilstede i en prøve og dermed indikere tilstedeværelse av reseptoren i prøven.

Western blot teknikker, som er beskrevet i Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, som er innkorporert heri som referanse, er lik immunanalysene med den vesentlige forskjellen som omfatter at før eksponering av prøven overfor antistoffene blir proteinene i prøvene separert ved en gelelektroforese og de separerte proteinene blir deretter probet med antistoffer. I noen foretrukne utførelsesformer er matrisen en ST-PAGE gelmatrise og de separerte proteinene i matrisen blir overført til en bærer så som filterpapir før probing med antistoffene. Anti-ST reseptorantistoffer beskrevet ovenfor er nyttige i Western blot metoder.

Prøvene blir homogenisert og cellene blir lysert ved anvendelse av detergent så som Triton-X. Materialet blir deretter separert ved hjelp av standardteknikker i Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sett som er nyttige for deteksjon av ST reseptoren i en testprøve ved Western blot omfatter en beholder omfattende anti-ST reseptorantistoffer og en beholder eller beholdere som omfatter kontroller. Kontrollene innbefatter en kontrollprøve som ikke inneholder ST reseptorprotein og/eller en annen kontrollprøve som inneholder ST reseptorprotein. Anti-ST reseptorantistoffer anvendt i settet er detekterbare i det de blir detekterbart merkede. Dersom det detekterbare anti-ST antistoffet ikke er merket kan

det bli detektert av andre antistoffer eller protein A for eksempel som også kan bli tilveiebragt i noen sett i separate beholdere. Ytterligere komponenter i noen sett innbefatter instruksjoner for å utføre analysen. Antistoffene i settet blir fortrinnsvis bundet til en epitope på den ekstracellulære domenen til ST reseptorproteinet.

For detektering av ST reseptoren i homogeniserte vevsprøver og kroppssekret prøver inkludert plasmadelen eller cellene i sekretprøven.

ST bindingsanalysene kan bli anvendt i fremgangsmåter for identifisering av individer som lider av colorektale cancermetastaser ved detektering av tilstedeværelse av ST reseptorprotein i prøven til ikke-colorektalt vev eller kroppssekret. ST bindende analyser kan også bli anvendt i fremgangsmåter for å detektere tilstedeværelse av ST reseptorprotein i prøven av tumor fra et individ som lider av cancer for å identifisere og/eller bekrefte at tumoren er av colorektal opprinnelse. ST reseptorbindingsanalysen anvender en detekterbar ST reseptorligand for å bli bundet til en hvilke som helst ST reseptor tilstede og som følgelig indikerer tilstedeværelse av reseptoren i en prøve.

I noen utførelsesformer kan ST reseptor liganden være nativ ST. I noen utførelsesformer kan ST reseptorliganden være et ST reseptorbindende peptid. I noen utførelsesformer kan ST reseptorliganden være et ST peptid.

ST reseptorbindingsanalysen beskrevet ovenfor kan lett bli utført av fagfolk innenfor dette området ved anvendelse av lett tilgjengelige utgangsmaterialer. ST reseptorbindings analyser kan bli utført på forskjellige måter, men hver blir identifisert enten et ST reseptorprotein er til stede i en prøve eller ikke ved å bestemme om en detekterbar ST reseptorligand blir bundet til en reseptor i en prøve. Analysen består av inkubering av en prøve med en konstant konsentrasjon av en ST ligand så som 1 x 10^{-10} M til 5 x10^{-10} M ^{125}I-ST. Som en kontroll blir et duplikat preparat av en prøve kjent for å inneholde ST reseptorer inkubert med en duplikat konsentrasjon av ^{125}I-ST. Analysene blir inkubert til likevekt (for eksempel 2 timer) og prøven blir analysert for å bestemme om ^{125}I-ST er bundet til materialet i prøven. ^{125}I-ST/prøven blir sendt gjennom et filter som har evne til å muliggjøre at ^{125}I-ST passerer gjennom, men som ikke har evne til å muliggjøre at ST reseptoren passerer gjennom. Dersom ST reseptoren er til stede i prøven vil den binde ^{125}I-ST som deretter vil bli oppfanget av filtere. Deteksjon av ^{125}I-ST i filteret indikerer tilstedeværelse av ST reseptor i prøven. I noen foretrukne utførelsesformer er filteret Whitman GFB glassfilterpapir. Kontroller innbefatter anvendelse av prøver som er kjent for å inneholde ST reseptorer, for

eksempel tarmmembraner fra rotte tarm, human tarm, T84 celler, isolert ST reseptor protein eller celler som uttrykker klonet nukleotidsekvens kodende for ST reseptorproteiner.

I tillegg til å bli konjugert til ^{125}I kan ST bli detektert ved binding derav til andre radionukleider så som ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, $^{81}Rb/^{81M}Kr$, ^{87M}Sr, ^{99M}Tc, ^{111}In, ^{113M}In, ^{123}I, ^{125}I, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{131}I, ^{132}I, ^{197}Hg, ^{203}Pb og ^{206}Bi, ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P og ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193M}Pt og ^{197}Hg eller ved binding derav til andre markører så som fluorescein eller enzymer. Hver av merkemetodene beskrevet ovenfor for detekterbare merkeantistoffer kan bli tilpasset for å merke ST reseptorligander og antas å bli beskrevet som det heri.

Sett innbefatter beholdere omfattende detekterbar ST reseptorligand sammen med beholdere som har positive og/eller negative kontroll, dvs. prøver som inneholder ST reseptor og prøver som ikke inneholder ST reseptor. Detekterbar ST reseptorligand blir fortrinnsvis merket. Detekterbar ST reseptorligand er fortrinnsvis radiomerket, fortrinnsvis radiomerket med ^{125}I. Detekterbar ST reseptorligand er fortrinnsvis et ST reseptorbindende peptid. Det detekterbare ST reseptorbindende peptidet er fortrinnsvis et ST peptid. I noen foretrukne utførelsesformer blir ST peptidet valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 og SEQ ID NO: 54. Ytterligere komponenter i noen sett innbefatter fast bærer, buffer og instruksjoner for utførelse av analysen.

ST reseptorbindingsanalysen er nyttig for detektering av ST reseptoren i homogeniserte vevsprøver og kroppssekretprøver inkludert plasmadeler av celler i sekretprøven.

I tillegg til deteksjon av ST reseptorproteinet innbefatter aspekter av foreliggende oppfinnelse forskjellige fremgangsmåter for å bestemme om en prøve inneholder celler som uttrykker ST reseptor ved nukleotidsekvens-baserte molekylære analyser. Flere forskjellige fremgangsmåter er tilgjengelige for å utføre dette inkludert de som anvender polymerasekjedereaksjon (PCR) teknologi, ved anvendelse av Northern blot teknologi, oligonukleotidhybridiseringsteknologi og in situ hybridiseringsteknologi.

mRNA sekvens-baserte fremgangsmåter for å bestemme om en prøve mRNA kodende for ST reseptor innbefatter, men er ikke begrenset til ,polymerasekjede-reaksjonsteknologi. Northern og Southern blot teknologi, in situ hybridiseringsteknologi og oligonukleotidhybridiseringsteknologi.

Fremgangsmåtene beskrevet heri eksemplifiserer hvordan foreliggende oppfinnelse kan bli utført. Andre sekvens-baserte metoder for detektering av tilstedeværelse av spesifikk mRNA som koder for ST reseptor i ikke-colorektale prøver kan bli anvendt ifølge oppfinnelsen.

En foretrukket fremgangsmåte for detektering av mRNA som koder for ST reseptor i genetisk materiale avledet fra ikke-colorektale prøver anvender polymerasekjedereaksjons (PCR) teknologi. PCR teknologi blir rutinemessig praktisert av fagfolk innenfor dette området og anvendelser derav i diagnostikk er velkjent og akseptert. Fremgangsmåter for praktisering av PCR teknologi er beskrevet i "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis, M.A., et al., Eds. Academic Press, Inc. San Diego, CA (1990), som er innkorporert heri som referanse. Anvendelser av PCR teknologi er beskrevet i "Polymerase Chain Reaction" Erlich, H.A., et al., Eds. Cold Spring harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) som er innkorporert heri som referanse. US-PS 4.683.202, US-PS 4.683.195, US-PS 4.965.188 og US-PS 5.075.216 som er innkorporert heri som referanse beskriver fremgangsmåter for utføring av PCR. PCR kan rutinemessig bli utført ved anvendelse av Perkin Elmer Cetus GENE AMP RNA PCR kit, Part No. N808-0017.

PCR teknologi muliggjør hurtig dannelse av mange kopier av DNA sekvenser ved å tilveiebringe 5' og 3' primere som hybridiserer til sekvenser tilstede i et RNA eller DNA molekyl, og tilveiebringer videre frie nukleotider og et enzym som fyller i komplementære baser til nukleotidsekvensen mellom primerene med de frie nukleotidene for å produsere en komplementær DNA tråd. Enzymet vil fylle i de komplementære sekvensene ved siden av primerene. Dersom både 5' og 3' primeren hybridiserer til nukleotidsekvensene på de sammen små fragmentene av nukleinsyren vil dette resultere i eksponensiell amplifikasjon av et spesifikt dobbelt-trådet produkt. Dersom bare en enkel primer hybridiserer til nukleinsyrefragmentet produserer lineæt amplifikasjon enkelt-trådede produkter med variabel lengde.

PCR primere kan rutinemessig bli konstruert av fagfolk innenfor dette området ved anvendelse av sekvensinformasjonen. Nukleotidsekvensen kodende for ST reseptor

protein er velkjent, som i US-PS 5.237.051 og F.J. Sauvage et al. 1991 J.Biol. Chem. 266:17912-17918 som er innkorporert heri som referanse. For å utføre denne metoden blir RNA ekstrahert fra cellen i en prøve og testet eller anvendt for å danne cDNA ved anvendelse av velkjente metoder og lett tilgjengelige utgangsmaterialer.

Fagfolk innenfor dette området kan lett danne PCR primere. Et sett av primere inneholder generelt to primere. Ved utførelse av PCR på ekstrahert mRNA eller cDNA dannet derfra, dersom mRNA eller cDNA kodende for ST reseptorproteinet er tilstede, vil mange kopier av mRNA eller cDNA bli dannet. Dersom de ikke er tilstede vil PCR ikke danne et diskret detekterbart produkt. Primere har generelt 8-50 nukleotider, fortrinnsvis omtrent 15-35 nukleotider, mer foretrukket 18-28 nukleotider, som er identiske eller komplementære med og derfor hybridiserer til mRNA eller cDNA dannet derfra som koder for ST reseptorproteinet. I foretrukne utførelsesformer er primerene hver 15-35 nukleotider i lengde, mer foretrukket er 18-28 nukleotidfragmenter av nukleinsyremolekylet som omfatter nukleotidsekvensen kodende for ST reseptorproteinet som beskrevet i US-PS 5.237.015 og F.J. Sauvage et al. 1991 J.Biol. Chem. 266:17912-17918. Primeren må hybridisere til sekvensen som skal bli amplifisert. Typiske primere har 18-28 nukleotider i lengde og har generelt 50% til 60% G+C sammensetning. Hele primeren er fortrinnsvis komplementær med sekvensen som den må bli hybridisert til. Primere danner PCR produkter med 100 basepar til 2000 basepar. Det er derimot mulig å danne produkter med 50 til opptil 10 kb og mere. Dersom mRNA blir anvendt som en templat må primerene hybridisere til mRNA sekvensene. Dersom cDNA blir anvendt som en templat må primerene hybridisere til cDNA sekvensene. Den ekstracellulære domenen er den mest unike delen av ST reseptorproteinet. Minst en primer hybridiserer til en nukleotidsekvens som tilsvarer den ekstracellulære domenen av ST reseptorproteinet.

5' PCR primeren kan konstrueres basert på nukleotidene 15-41 til ST reseptorkodende sekvens som beskrevet i US-PS 5.237.051, basert på nukleotidene 20-40 til ST reseptorkodende sekvens som beskrevet i US-PS 5.237.051, basert på nukleotidene 25-43 til ST reseptorkodende sekvens som beskrevet i US-PS 5.237.051, eller basert på nukleotidene 40-62 til ST reseptorkodende sekvens som beskrevet i US-PS 5.237.051, 3' PCR primeren kan konstrueres basert på nukleotidene 350-375 til ST reseptorkodende sekvens som beskrevet i US-PS 5.237.051, basert på nukleotidene 290-308 til ST reseptorkodende sekvens som beskrevet i US-PS 5.237.051, basert på nukleotidene 121-141 til ST reseptorkodende sekvens som beskrevet i US-PS 5.237.051, eller basert

på nukleotidene 171-196 til ST reseptorkodende sekvens som beskrevet i US-PS 5.237.051.

mRNA eller cDNA blir kombinert med primere, frie nukleotider og enzym ifølge standard PCR protokoller. Blandingen gjennomgår en serie temperaturforandringer. Dersom mRNA eller cDNA kodende for ST reseptoren er tilstede, dvs. dersom begge primere hybridiserer til sekvenser på samme molekylet, vil molekylet som omfatter primerene og mellomliggende komplementære sekvenser bli amplifisert eksponensielt. Amplifisert DNA kan lett bli detektert ved forskjellige velkjente metoder. Dersom ikke mRNA eller cDNA som koder for ST reseptoren er tilstede vil PCR produkt ikke bli amplifisert eksponensielt. PCR teknologien tilveiebringer følgelig en meget enkel, og pålitelig metode for å detektere mRNA kodende ST reseptorprotein i en prøve.

PCR produktet kan bli detektert ved hjelp av flere kjente metoder. Den foretrukne metoden for detektering av tilstedeværelse av amplifisert DNA er å separere PCR rekasjonsmaterialet ved gelelektroforese og farge gelen med etidiumbromid for å visualisere om amplifisert DNA er tilstede. En størrelsesstandard med kjent størrelse av amplifisert DNA blir fortrinnsvis kjørt på gelen som en kontroll.

I noen tilfeller så som når uvanlige små mengder av RNA blir isolert og bare små mengder av cDNA blir dannet derfra er det ønskelig eller nødvendig å utføre en PCR reaksjon på det første PCR reaksjonsproduktet. Dersom det er vanskelig å detektere blir mengder av amplifisert DNA produsert i den første reaksjonen og andre PCR kan bli utført for å danne flere kopier av DNA sekvensene til det første amplifiserte DNA. Et sammensatt sett av primere blir anvendt i den andre PCR reaksjonen. Det sammensatte sett av primere hybridiserer til sekvenser nedstrøms for 5' primeren og oppstrøms for 3' primeren anvendt i den første reaksjonen.

Ifølge foreliggende oppfinnelse kan diagnostiske sett bli satt sammen slik at de er nyttige for å utføre fremgangsmåter for detektering av tilstedeværelse av mRNA eller cDNA som koder for ST reseptoren i ikke-colorektale prøver. Slike diagnostiske sett omfatter oligonukleotid som er nyttige som primere for utførelse av PCR metoder. Det er foretrukket at diagnostiske sett ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en beholder omfattende en størrelsesmarkør kjørt som en standard på en gel anvendt for å detektere tilstedeværelse av amplifisert DNA. Størrelsesmarkøren har sammen størrelse som DNA dannet av primere i nærvær av mRNA eller cDNA kodende for ST reseptoren.

PCR analysene er nyttige for detektering av mRNA kodende for ST reseptoren i homogeniserte vevsprøver og celler i kroppssekretprøver. PCR på plasmadelen av en sekretprøve kan bli anvendt for å detektere mRNA kodende for ST reseptorprotein.

En annen metode for å bestemme om en prøve inneholder celler som uttrykker ST reseptoren er ifølge Northern blot analyser av mRNA ekstrahert fra en ikke-colorektal prøve. Teknikker for å utføre Northern blot analyser er velkjente for fagfolk innenfor dette området er beskrevet i Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. mRNA ekstrahering, elektroforetisk separasjon av mRNA, blotting, probepreparering og hybridisering er velkjente teknikker som rutinemessig kan bli utført ved anvendelse av lett tilgjengelig utgangsmateriale.

mRNA blir ekstrahert ved anvendelse av poly dT kolonner og materialet blir separert ved gelelektroforese og for eksempel overført til nitrocellulosepapir. Merkede prober dannet fra et isolert spesifikt fragment eller fragmenter kan bli anvendt for å visualisere tilstedeværelse av et komplementært fragment fiksert til papiret. Prober nyttige for å identifisere mRNA i et Northern blot har en nukleotidsekvens som er komplementær med mRNA transkribert fra genet som koder for ST reseptorproteinet. Fagfolk innenfor dette området kan anvende sekvensinformasjonen i US-PS 5.237-051 og F.J.Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266:17912-17918 for å konstruere slike prober eller for å isolere og klone ST reseptorgen eller cDNA som kan bli anvendt som en probe. Prober hybridiserer fortrinnsvis til den delen av mRNA som tilsvarer den ekstracellulære domenen av ST reseptorproteinet. I foretrukne utførelsesformer er probene full-lengde kloner eller fragmenter av nukleinsyremolekyler som omfatter nukleotidsekvensen kodende for ST reseptorproteinet som beskrevet i US-PS 5.237.051 og F.J.Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. Slike prober er på minst 15 nukleotider, fortrinnsvis 30-200. mer foretrukket er 40-100 nukleotidfragmenter og kan være hele den kodende sekvensen til ST reseptorer, fortrinnsvis 18-28 nukleotidfragmenter av nukleinsyremolekylet som omfatter nukleotidsekvensen kodende for ST reseptor proteinet som beskrevet i US-PS 5.237.051 og F.J. Sauvage et al. 1991 J. Biol. Chem. 266:17912-17918. En foretrukket probe hybridiserer til mRNA som koder for ST reseptorproteinet fra nukleotid 50 til nukleotid 90.

Ifølge oppfinnelsen kan diagnostiske sett bli satt sammen slik at de er nyttige for å utføre fremgangsmåter for detektering av tilstedeværelse av mRNA som koder for ST reseptoren i ikke-colorektale prøver ved Northern blot analyser. Slike diagnostiske sett

omfatter oligonukleotid som er nyttig som prober for hybridisering til mRNA. Probene kan bli radioaktivt merket. Det er foretrukket at diagnostiske sett ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en beholder omfattende en størrelsesmarkør som blir kjørt som en standard på en gel. Det er foretrukket at diagnostiske sett ifølge oppfinnelsen omfatter en beholder omfattende en positiv kontroll som vil hybridisere til proben.

Northern blot analyser er nyttige for detektering av mRNA kodende for ST reseptoren i homogeniserte vevsprøver og celler i kroppssekretprøver. Det er betraktet at PCR på plasmadelen av en sekretprøve kan bli anvendt for å detekere mRNA kodende for ST reseptorproteinet.

En annen fremgangsmåte for detektering av tilstedeværelse av mRNA kodende ST reseptorprotein er ved oligonukleotidhybridiseringsteknologi. Oligonukleotid-hybridiseringsteknologi er velkjent for fagfolk innenfor dette området. Detekterbare prober som inneholder en spesifikk nukleotidsekvens som vil hybridisere til nukleotidsekvensen til mRNA kodende for ST reseptorprotein. RNA eller cDNA dannet fra RNA fra en prøve blir fiksert, vanligvis til filterpapir eller lignende. Probene blir tilsatt og opprettholdt under betingelser som muliggjør hybridisering bare dersom probene er fullstendig komplementære med det fikserte genetiske materialet. Betingelsene er tilstrekkelig stringente for avvasking av prober hvor bare en del av proben hybridiserer til det fikserte materialet. Deteksjon av proben på det vaskede filteret indikerer komplementære sekvenser.

Prober nyttige i oligonukleotidanalyser er minst 18 nukleotider av komplementært DNA og kan være så store som en fullstendig komplementær sekvens til ST reseptor cDNA. I noen foretrukne utførelsesformer har probene ifølge oppfinnelsen 30-200 nukleitider, fortrinnsvis 40-100 nukleotider. Probene inneholder fortrinnsvis en sekvens som er komplementær med den delen som koder for ekstracellulære domenen av ST reseptoren.

Fagfolk innenfor dette området kan ved anvendelse av sekvensinformasjonen beskrevet i US-PS 5.237.051 og F. J. Sauvage et al. 1991 J.Biol. Chem. 266:17912-17918 konstruerer prober som er fullstendig komplementære med mRNA sekvenser, men ikke genomiske DNA sekvenser. Hybridiseringsbetingelsene kan bli rutinemessig optimalisert for å minimalisere bakgrunnssignalet ved ufullstendig komplementær hybridisering. Prober hybridiserer fortrinnsvis til den delen av mRNA som innbefatter en nukleotidsekvens som tilsvarer den ekstracellulære domenen til ST reseptorproteinet. Prober hybridiserer fortrinnsvis til den delen av mRNA som tilsvarer den

ekstracellulære domenen av ST resptorproteinet. Probene kan være full-lengde kloner eller fragmenter av nukleinsyremolekyler som omfatter nukleotidsekvensen kodende for ST reseptorproteinet som beskrevet i US-PS 5.237.051 og F. J. Sauvage et al. 1991 J.Biol. Chem. 266:17912-17918. Slike prober har minst 15 nukleotider, fortrinnsvis 30-200, mer foretrukket er 40-100 nukleotidfragmenter og kan utgjøre hele kodende sekvens til ST reseptorene, fortrinnsvis 18-28 nukleotidfragmenter av nukleinsyremolekylet som omfatter nukleotidsekvensen kodende for ST reseptorproteinet som beskrevet i US-PS 5.237.051 og F.J. Sauvage et al. 1991 J.Biol. Chem. 266:17912-17918. En foretrukket probe hybridiserer til mRNA som koder for ST reseptorproteinet fra nukleotid 50 til nukleotid 90.

Merket oligonukleotid kan anvendes som prober for å utføre oligonukleotidhybridisering. De er fullstendig komplementære med mRNA sekvenser, men ikke genomiske sekvenser. mRNA sekvensene innbefatter for eksempel deler kodet av forskjellige eksoner. De merkede probene blir merket med radiomerkede nukleotider eller er ellers detekterbare ved hjelp av lett tilgjengelige ikke-radioaktive deteksjonssystemer.

Diagnostiske sett kan bli sammenstilt for å utføre oligonukleotid-hybridiseringsmetoden ifølge oppfinnelsen. Slike diagnostiske sett omfatter et merket oligonukleotid som koder for deler av ST reseptoren som blir kodet av forskjellige eksoner. Det er foretrukket at merkede prober til de oligonukleotid diagnostiske settene ifølge foreliggende oppfinnelse er merket med et radionukleotid. Oligonukleotid-hybridiserings-baserte diagnostiske sett ifølge oppfinnelsen omfatter fortrinnsvis DNA prøver som representerer positive og negative kontroller. En positiv kontroll DNA prøve omfatter et nukleinsyremolekyl som har en nukleotidsekvens som er fullstendig komplementær med probene til settet slik at probene vil hybridisere til molekylet under analysebetingelsene. En negativ kontroll DNA prøver omfatter minst et nukleinsyremolekyl, i det nukleotidsekvensen er delvis komplementær med sekvensene til proben i settet. Under analysebetingelsene vil proben ikke hybridisere til den negative kontroll DNA prøven. Fagfolk innenfor dette området vil kunne anvende sekvensinformasjonen i US-PS 5.237.051 og F.J. Sauvage et al. 1991 J.Biol. Chem. 266:17912-17918 for å konstruere slike prober eller for å isolere og klone ST reseptorgenet eller cDNA som kan bli anvendt som en probe. Enten kan den kodende tråden eller den komplementære tråden bli anvendt som en probe.

Oligonukleotidhybridiseringsteknikker er nyttige for deteksjon av mRNA kodende for ST reseptoren i homogeniserte vevsprøver og celler i kroppssekretprøver. Det er betraktet at PCR på plasmadelen av en sekretprøve kan bli anvendt for å detektere mRNA kodende for ST reseptorprotein.

Foreliggende oppfinnelse vedrører in vitro sett for vurdering av vevsprøver for å bestemme nivået av metastaser og reagenser og sammensetninger nyttige for utførelse av denne.

I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen kan vevsprøver som innbefatter deler av lamina propria bli isolert fra individer som gjennomgår eller som er helbredet etter kirurgi for å fjerne colorektale tumorer inkludert reseksjon eller kolonoskopi. Vevet blir analysert for å identifisere tilstedeværelse eller fravær av ST reseptorproteinet. Teknikker så som ST reseptor/ligand bindingsanalyser og immunhistokjemianalyser kan bli utført for å bestemme om ST reseptoren er tilstede i cellene i vevsprøven som indikerer metastatisk migrering. I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen blir vevsprøvene analysert for å identifisere om ST reseptorproteinet blir uttrykt i cellene i vevsprøven som indikerer metastatisk migrering ved detektering av tilstedeværelse eller fravær av mRNA som koder for ST reseptorproteinet. Tilstedeværelse av mRNA som koder for ST reseptorproteinet eller cDNA dannet derfra kan bli bestemt ved anvendelse av teknikker så som in situ hybridisering, immunhistokjemi og in situ ST bindingsanalyser.

Foreliggende oppfinnelse vedrører in vitro sett for vurdering av tumorprøver for å bestemme om de er av colorektal opprinnelse og reagenser og sammensetninger nyttige for å utføre denne. I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen kan tumorprøver bli isolert fra individer som gjennomgår eller som er helbredet etter kirurgi for å fjerne tumorer i tarm, tumorer i andre organer eller biopsimaterialet. Tumorprøven blir analysert for å identifisere tilstedeværelse eller fravær av ST reseptorproteinet. Teknikker så som ST reseptor/ligand bindingsanalyser og immunhistokjemi analyser kan bli utført for å bestemme om ST reseptoren er tilstede i cellene i tumorprøven som indikerer colorektal opprinnelse. Alternativt blir i noen utførelsesformer av oppfinnelsen kroppshulromvevsprøver analysert for å identifisere om ST reseptorproteinet blir uttrykt i cellene i tumorprøven som indikerer colorektal opprinnelse ved detektering av tilstedeværelse eller fravær av mRNA som koder for ST reseptorproteinet. Tilstedeværelse av mRNA som koder for ST reseptorproteinet eller cDNA dannet derfra

kan bli bestemt ved anvendelse av teknikker så som in situ hybridisering, immunhistokjemi og in situ ST bindende analyse.

In situ hybridiseringsteknologi er velkjent for fagfolk innenfor dette området. Cellene blir fiksert og detekterbare prober som inneholder en spesifikk nukleotidsekvens blir tilsatt til de fikserte cellene. Dersom cellene inneholder komplementære nukleotidsekvenser vil probene som kan bli detekert hybridisere til disse.

Prober nyttige i oligonukleotidanalyser inneholder minst 18 nukleotider av komplementært DNA og kan være så stort som en fullstendig komplementær sekvens til ST reseptor mRNA. Probene kan utgjøre 30-200 nukleotider, fortrinnsvis 40-100 nukleotider. Probene inneholder fortrinnsvis en sekvens som er komplementær med den delen som koder for den ekstracellulære domenen av ST reseptoren.

Fagfolk innenfor dette området kan ved anvendelse av sekvensinformasjonen beskrevet i US-PS 5.237.051 og F.J. Sauvage et al. 1991 J.Biol. Chem. 266:17912-17918 konstruere prober nyttige for in situ hybridiseringsteknologi for å identifisere celler som uttrykker ST reseptoren. Prober hybridiserer fortrinnsvis til en nukleotidsekvens som tilsvarer den ekstracellulære domenen av ST reseptorproteinet. Hybridiseringsbetingelser kan rutinemessig bli optimalisert for å minimalisere bakgrunnssignalet ved ufullstendig komplementær hybridisering. Prober hybridiserer fortrinnsvis til den delen av mRNA som innbefatter en nukleotidsekvens som tilsvarer den ekstracellulære domenen av ST reseptorproteinet. Prober hybridiserer fortrinnsvis til den delen av mRNA som tilsvarer den ekstracellulære domenen av ST reseptorproteinet. Probene kan være full-lengde kloner eller fragmenter av nukleinsyremolekylet som omfatter nukleotidsekvensen kodende for ST reseptorproteinet som beskrevet i US-PS 5.237.051 og F.J. Sauvage et al. 1991 J.Biol. Chem. Slike prober inneholder minst 15 nukleotider, fortrinnsvis 30-200, mer foretrukket er 40-100 nukleotidfragmenter og kan utgjøre hele den kodende sekvensen til ST reseptorene, fortrinnsvis 18-28 nukleotidfragmenter av nukleinsyremolekylet som omfatter nukleotidsekvensen kodende for ST reseptor proteinet som beskrevet i US-PS 5.237.051 og F.J. Sauvage et al. 1991 J.Biol. Chem. 266:17912-17918. En foretrukket probe hybridiserer til mRNA som koder for ST reseptorproteinet fra nukleotid 50 til nukleotid 90.

Probene er fullstendig komplementære og hybridiserer ikke godt til delkomplementære sekvenser. For in situ hybridisering er det foretrukket at probene er detekterbare ved fluorescens. En vanlig prosedyre er å merke proben med biotin-modifisert nukleotid og

deretter detektering derav med fluorescens koblet avidin. Proben behøver ikke selv å bli merket med fluorescens, men kan bli detektert med fluorescensmarkør.

Merket oligonukleotid kan anvendes som prober for å utføre oligonukleotidhybridisering. De er fullstendig komplementære med mRNA sekvenser, men ikke genomiske sekvenser. mRNA sekvensen innbefatter deler som blir kodet av forskjellige eksoner. De merkede probene blir merket med radiomerkede nukleotider eller kan ellers detekteres ved lett tilgjengelige ikke-radioaktive detekteringssystemer.

Prober nyttige for in situ hybridisering for å identifisere celler som uttrykker ST reseptorprotein kan anvendes.

Cellene blir fiksert og probene tilsatt til det genetiske materialet. Prober vil hybridisere til komplementære nukleinsyresekvenser tilstede i prøven. Ved anvendelse av et fluorescens mikroskop kan probene bli visualisert ved hjelp av deres fluorescens markører.

Diagnostiske sett kan bli sammenstilt for å utføre in situ hybridiseringsmetoder ifølge oppfinnelsen som er fullstendig komplementære med mRNA sekvenser, men ikke genomiske sekvenser. For eksempel innbefatter mRNA sekvensen deler som blir kodet av forskjellige eksoner. Det er foretrukket at de merkede probene til in situ diagnostiske sett ifølge foreliggende oppfinnelse blir merket med en fluorescensmarkør.

Fagfolk innenfor dette området kan analysere de fikserte cellene for å karakterisere nivået av metastatisk migrering av tarmcancercellene. Merking av tarm-avledede celler muliggjør forbedret analysering.

Immunhistokjemiske teknikker kan bli anvendt for å identifisere og vesentlig farge celler med ST reseptor. Slik "farging" muliggjør analysering av metastatisk migrering. Anti-ST reseptorantistoffer som de som er beskrevet ovenfor blir kontaktet med fikserte celler og ST reseptoren tilstede i cellene i reagerer med antistoffene. Antistoffene blir detekterbart merket eller detektert ved anvendelse av merket andre antistoff eller protein A for å farge cellene.

ST bindingsanalysene kan bli utført i stedenfor immunhistokjemi med unntagelse av at celledelen først blir frosset og deretter blir ST bindingsanalyse utført og cellene blir fikserte.

Teknikkene beskrevet heri for vurdering av tumordelene kan også bli anvendt for å analysere vevsdelene for prøver av lymfeknuter samt andre vev for å identifisere tilstedeværelse av colorektale tumorceller. Prøvene kan bli preparert og "farget" for å detektere ekspresjon av ST reseptoren.

Følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen.

Eksempler

Eksempel 1

Følgende utgjør representative forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse. Når de som angitt nedenfor er referanse til en serie forbindelser gitt for å gjøre dette mer hensiktsmessig og skal angi hver forbindelse i serien inkludert alle forbindelser i nummerisk rekkefølge, så som for eksempel "3-D1 til 3-D16" refererer til forbindelsene 3-D1, 3-D2, 3-D3, 3-D4, 3-D5, 3-D6,3-D7, 3-D8, 3-D9, 3-D10, 3-D11, 3-D12, 3-D13, 3-D14, 3-D15 og 3-D16. Likeledes, når angitt nedenfor, er referanser til en serie av SEQ ID NO gitt for effektivitet og skal angi hver SEQ ID NO: i serien inkludert alle SEQ ID NO: i nummerisk rekkefølge, så som for eksempel SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID: 54 skal referere til SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29,SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54. Likeledes er referanse til en serie forbindelser gitt for effektivitet og skal angi hver forbindelse i serien inkludert alle forbindelser i nummerisk rekkefølge, så som for eksempel "5-AP til 54-AP" refererer til forbindelsene 5-AP, 6-AP, 7-AP, 8-AP, 9-AP, 10-AP, 11-AP, 12-AP, 13-AP, 14-AP, 15-AP, 16-AP, 17-AP, 18-AP, 19-AP, 20-AP, 21-AP, 22-AP, 23-AP, 24-AP, 25-AP, 26-AP, 27-AP, 28-AP, 29-AP, 30-AP, 31-AP, 32-AP, 33-AP, 34-AP, 35-AP, 36-AP, 37-AP, 38-AP, 39-AP, 40-AP, 41-AP, 42-AP,

43-AP, 44-AP, 45-AP, 46-AP, 47-AP, 48-AP, 49-AP, 50-AP, 51-AP, 52-AP, 53-AP og 54-AP.

Forbindelse 2-D1 omfatter metotreksat (ametopterin) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D2 omfatter deksorubicin (adrimycin) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D3 omfatter daunorubicin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D4 omfatter cytosinarabinosid konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D5 omfatter etoposid konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D6 omfatter 5-4 fluoruracil konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D7 omfatter melfalan konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D8 omfatter klorambucil konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D9 omfatter cyklofosfamid konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D10 omfatter cis-platinum konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D11 omfatter vindesin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D12 omfatter mitomycin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D13 omfatter bleomycin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D14 omfatter purotionin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D15 omfatter makromyocin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-D16 omfatter trenimon konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelsene 3-D1 til 3-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 3-D1 til 3-D16 SEQ ID NO: 3 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 5-D1 til 5-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 5-D1 til 5-D16 SEQ ID NO: 5 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 6-D1 til 6-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 6-D1 til 6-D16 SEQ ID NO: 6 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 7-D1 til 7-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 7-D1 til 7-D16 SEQ ID NO: 7 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 8-D1 til 8-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 8-D1 til 8-D16 SEQ ID NO: 8 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 9-D1 til 9-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 9-D1 til 9-D16 SEQ ID NO: 9 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 10-D1 til 10-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 10-D1 til 10-D16 SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 12-D1 til 12-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 12-D1 til 12-D16 SEQ ID NO: 11 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 12-D1 til 12-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 12-D1 til 12-D16 SEQ ID NO: 12 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 13-D1 til 13-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 13-D1 til 13-D16 SEQ ID NO: 13 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 14-D1 til 14-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 14-D1 til 14-D16 SEQ ID NO: 14 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 15-D1 til 15-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 15-D1 til 15-D16 SEQ ID NO: 15 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 16-D1 til 16-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 16-D1 til 16-D16 SEQ ID NO: 16 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 17-D1 til 17-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 17-D1 til 17-D16 SEQ ID NO: 17 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 18-D1 til 18-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 18-D1 til 18-D16 SEQ ID NO: 18 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 19-D1 til 19-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 19-D1 til 19-D16 SEQ ID NO: 19 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 20-D1 til 20-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 20-D1 til 20-D16 SEQ ID NO: 20 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 22-D1 til 22-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 22-D1 til 22-D16 SEQ ID NO: 21 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 22-D1 til 22-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 22-D1 til 22-D16 SEQ ID NO: 22 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 23-D1 til 23-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 23-D1 til 23-D16 SEQ ID NO: 23 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 24-D1 til 24-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 24-D1 til 24-D16 SEQ ID NO: 24 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 25-D1 til 25-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 25-D1 til 25-D16 SEQ ID NO: 25 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 26-D1 til 26-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 26-D1 til 26-D16 SEQ ID NO: 26 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 27-D1 til 27-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 27-D1 til 27-D16 SEQ ID NO: 27 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 28-D1 til 28-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 28-D1 til 28-D16 SEQ ID NO: 28 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 29-D1 til 29-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 29-D1 til 29-D16 SEQ ID NO: 29 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 30-D1 til 30-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 30-D1 til 30-D16 SEQ ID NO: 30 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 32-D1 til 32-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 32-D1 til 32-D16 SEQ ID NO: 31 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 32-D1 til 32-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 32-D1 til 32-D16 SEQ ID NO: 32 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 33-D1 til 33-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 33-D1 til 33-D16 SEQ ID NO: 33 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 34-D1 til 34-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 34-D1 til 34-D16 SEQ ID NO: 34 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 35-D1 til 35-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 35-D1 til 35-D16 SEQ ID NO: 35 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 36-D1 til 36-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 36-D1 til 36-D16 SEQ ID NO: 36 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 37-D1 til 37-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 37-D1 til 37-D16 SEQ ID NO: 37 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 38-D1 til 38-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 38-D1 til 38-D16 SEQ ID NO: 38 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 39-D1 til 39-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 39-D1 til 39-D16 SEQ ID NO: 39 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 40-D1 til 40-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 40-D1 til 40-D16 SEQ ID NO: 40 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 42-D1 til 42-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 42-D1 til 42-D16 SEQ ID NO: 41 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 42-D1 til 42-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 42-D1 til 42-D16 SEQ ID NO: 42 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 43-D1 til 43-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 43-D1 til 43-D16 SEQ ID NO: 43 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 44-D1 til 44-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 44-D1 til 44-D16 SEQ ID NO: 44 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 45-D1 til 45-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 45-D1 til 45-D16 SEQ ID NO: 45 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 46-D1 til 46-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 46-D1 til 46-D16 SEQ ID NO: 46 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 47-D1 til 47-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 47-D1 til 47-D16 SEQ ID NO: 47 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 48-D1 til 48-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 48-D1 til 48-D16 SEQ ID NO: 48 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 49-D1 til 49-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 49-D1 til 49-D16 SEQ ID NO: 49 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 50-D1 til 50-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 50-D1 til 50-D16 SEQ ID NO: 50 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 51-D1 til 51-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 51-D1 til 51-D16 SEQ ID NO: 51 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 52-D1 til 52-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 52-D1 til 52-D16 SEQ ID NO: 52 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 53-D1 til 53-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 53-D1 til 53-D16 SEQ ID NO: 53 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 54-D1 til 54-D16 er lik forbindelsene 2-D1 til 2-D16, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 54-D1 til 54-D16 SEQ ID NO: 54 som ST reseptorbindende del.

Forbindelse 2-T1 omfatter ricin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T2 omfatter ricin A kjede (ricin toksin) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T3 omfatter Pseudomonas eksotoksin (PE) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T4 omfatter difteri toksin (DT), konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T5 omfatter Clostridium perfringens fosfolipase C (PLC) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T6 omfatter bovin bukspyttkjertel ribonuklease (BPR) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T7 omfatter kermesbær antiviralt protein (PAP) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T8 omfatter abrin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T9 omfatter abrin A kjede (abrin toksin) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T10 omfatter cobra venom faktor (CVF) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T11 omfatter gelonin (GEL) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T12 omfatter saporin (SAP) konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T13 omfatter modeccin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T14 omfatter viscumin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelse 2-T15 omfatter volkensin konjugert til SEQ ID NO: 2.

Forbindelsene 3-T1 til 3-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 3-T1 til 3-T15 SEQ ID NO: 3 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 5-T1 til 5-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 5-T1 til 5-T15 SEQ ID NO: 5 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene -T1 til -T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene -T1 til -T15 SEQ ID NO: som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 6-T1 til 6-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 6-T1 til 6-T15 SEQ ID NO: 6 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 7-T1 til 7-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 7-T1 til 7-T15 SEQ ID NO: 7 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 8-T1 til 8-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 8-T1 til 8-T15 SEQ ID NO: 8 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 9-T1 til 9-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 9-T1 til 9-T15 SEQ ID NO: 9 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 10-T1 til 10-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 10-T1 til 10-T15 SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 11-T1 til 11-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 11-T1 til 11-T15 SEQ ID NO: 11 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 12-T1 til 12-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 12-T1 til 12-T15 SEQ ID NO: 12 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 13-T1 til 13-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 13-T1 til 13-T15 SEQ ID NO: 13 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 14-T1 til -T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 14-T1 til 14-T15 SEQ ID NO: 14 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 15-T1 til 15-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 15-T1 til 15-T15 SEQ ID NO: 15 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 15-T1 til 15-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 15-T1 til 15-T15 SEQ ID NO: 15 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 17-T1 til 17-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 17-T1 til 17-T15 SEQ ID NO: 17 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 18-T1 til 18-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 18-T1 til 18-T15 SEQ ID NO: 18 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 19-T1 til 19-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 19-T1 til 19-T15 SEQ ID NO: 19 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 20-T1 til 20-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 20-T1 til 20-T15 SEQ ID NO: 20 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 21-T1 til 21-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 21-T1 til 21-T15 SEQ ID NO: 21 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 22-T1 til 22-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 22-T1 til 22-T15 SEQ ID NO: 22 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 23-T1 til 23-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 23-T1 til 23-T15 SEQ ID NO: 23 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 24-T1 til 24-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 24-T1 til 24-T15 SEQ ID NO: 24 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 25-T1 til 25-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 25-T1 til 25-T15 SEQ ID NO: 25 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 26-T1 til 26-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 26T1 til 26-T15 SEQ ID NO: 26 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 27-T1 til 27-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 27-T1 til 27-T15 SEQ ID NO: 27 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 28-T1 til 28-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 28-T1 til 28-T15 SEQ ID NO: 28 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 29-T1 til 29-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 29-T1 til 29-T15 SEQ ID NO: 29 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 30-T1 til 30-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 30-T1 til 30-T15 SEQ ID NO: 30 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 31-T1 til 31-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 31-T1 til 31-T15 SEQ ID NO: 31 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 32-T1 til 32-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 32-T1 til 32-T15 SEQ ID NO: 32 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 33-T1 til 33-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 33-T1 til 33-T15 SEQ ID NO: 33 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 34-T1 til 34-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 34-T1 til 34-T15 SEQ ID NO: 34 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 35-T1 til 35-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 35-T1 til 35-T15 SEQ ID NO: 35 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 36-T1 til 36-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 36-T1 til 36-T15 SEQ ID NO: 36 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 37-T1 til -T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 37-T1 til 37-T15 SEQ ID NO: 37 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 38-T1 til 38-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 38-T1 til 38-T15 SEQ ID NO: 38 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 39-T1 til 39-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 39-T1 til 39-T15 SEQ ID NO: 39 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 40-T1 til 40-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 40-T1 til 40-T15 SEQ ID NO: 40 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 41-T1 til 41-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 41-T1 til 41-T15 SEQ ID NO: 41 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 42-T1 til 42-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 42-T1 til 42-T15 SEQ ID NO: 42 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 43-T1 til 43-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 43-T1 til 43-T15 SEQ ID NO: 43 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 44-T1 til 44-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 44-T1 til 44-T15 SEQ ID NO: 44 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 45-T1 til 45-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 45-T1 til 45-T15 SEQ ID NO: 45 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 46-T1 til 46-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 46-T1 til 46-T15 SEQ ID NO: 46 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 47-T1 til 47-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 47-T1 til 47-T15 SEQ ID NO: 47 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 48-T1 til 48-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 48-T1 til 48-T15 SEQ ID NO: 48 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 49-T1 til 49-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 49-T1 til 49-T15 SEQ ID NO: 49 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 50-T1 til 50-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 50-T1 til 50-T15 SEQ ID NO: 50 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 51-T1 til 51-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 51-T1 til 51-T15 SEQ ID NO: 51 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 52-T1 til 52-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 52-T1 til 52-T15 SEQ ID NO: 52 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 53-T1 til 53-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 53-T1 til 53-T15 SEQ ID NO: 53 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 54-T1 til 54-T15 er de samme som forbindelsene 2-T1 til 2-T15, med unntagelse av at istedenfor å omfatte SEQ ID NO: 2 som ST reseptorbindende del omfatter forbindelsene 54-T1 til 54-T15 SEQ ID NO: 54 som ST reseptorbindende del.

Forbindelsene 2-AP, 3-AP og 5-AP til 54-AP refererer til konjugerte forbindelser som omfatter alkalisk fosfatase konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-NIZ, 3-NIZ og 5-NIZ til 54-NIZ refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter nitroimidazol konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-MEZ, 3-MEZ og 5-MEZ til 54-MEZ refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter metroimidazol konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-MIS, 3-MIS og 5-MIS til 54-MIS refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter misonidazol konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-47Sc, 3-47Sc og 5-47Sc til 54-47Sc refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{47}Sc konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-67Cu, 3-67Cu og 5-67Cu til 54-67Cu refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{67}Cu konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-90Y, 3-90Y og 5-90Y til 54-90Y refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{90}Y konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-109Pd, 3-109Pd og 5-109Pd til 54-109Pd refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{109}Pd konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-123I, 3-123I og 5-123I til 54-123I refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{123}I konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-125I, 3-125I og 5-125I til 54-125I refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{125}I konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-131I, 3-131I og 5-131I til 54-131I refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{131}I konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-132I, 3-132I og 5-132I til 54-132I refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{132}I konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-186Re, 3-186Re og 5-186Re til 54-186Re refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{186}Re konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-188Re, 3-188Re og 5-188Re til 54-188Re refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{188}Re konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-199Au, 3-199Au og 5-199Au til 54-199Au refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{199}Au konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-211At, 3-211At og 5-211At til 54-211At refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{211}At konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-212Pb, 3-212Pb og 5-212Pb til 54-212Pb refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{212}Pb konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-212Bi, 3- og 5-212Bi til 54-212Bi refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{212}Bi konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-203Pb, 3-203Pb og 5-203Pb til 54-203Pb refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{203}Pb konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-206Bi, 3-206Bi og 5-206Bi til 54-206Bi refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{206}Bi konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-32P, 3-32P og 5-32P til 54-32P refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{32}P konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-33P, 3-33P og 5-33P til 54-33P refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{33}P konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-71Ge, 3-71Ge og 5-71Ge til 54-71Ge refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{71}Ge konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-77As, 3-77As og 5-77As til 54-77As refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{77}As konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-103Pd, 3- og 5-103Pd til 54-103Pd refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{103}Pd konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-105Rh, 3-105Rh og 5-105Rh til 54-105Rh refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{105}Rh konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-111Ag, 3-211Ag og 5-211Ag til 54-111Ag refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{111}Ag konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-119Sb, 3-119Sb og 5-119Sb til 54-119Sb refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{119}Sb konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-121Sn, 3-121Sn og 5-121Sn til 54-121Sn refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{121}Sn konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-131Cs, 3-131Cs og 5-131Cs til 54-131Cs refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{131}Cs konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-127Cs, 3-127Cs og 5-127Cs til 54-127Sc refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{127}Cs konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-129Cs, 3-129Cs og 5-129Cs til 54-129Cs refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{129}Cs konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-143Pr, 3-143Pr og 5-143Pr til 54-143Pr refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{143}Pr konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-161Tb, 3-161Tb og 5-161Tb til 54-161Tb refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{161}Tb konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-177Lu, 3-177Lu og 5-177Lu til 54-177Lu refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{177}Lu konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-191Os, 3-191Os og 5-191Os til 54-191Os refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{191}Os konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-193mPt, 3-193mPt og 5-193mPt til 54-193mPt refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{193}mPt konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-197Hg, 3-197Hg og 5-197Hg til 54-197Hg refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{197}Hg konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-43K, 3-43K og 5-43K til 54-43K refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{43}K konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-52Fe, 3-52Fe og 5-52Fe og 54-52Fe refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{52}Fe konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-57Co, 3-57Co og 5-57Co til 54-57Co refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{57}Co konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-67Ga, 3-67Ga og 5-67Ga til 54-67Ga refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{67}Ga konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-68Ga, 3-68Ga og 5-68Ga til 54-68Ga refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{68}Ga konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-77Br, 3-77Br og 5-77Br til 54-77Br refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{77}Br konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-81Rb, 3-81Rb og 5-81Rb til 54-81Rb refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{81}Rb konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-87mSr, 3-87mSr og 5-87mSr til 54-87mSr refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{87M}Sr konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-99mTc, 3-99mTc og 5-99mTc til 54-99mTc refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{99M}Tc konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-111In, 3-111In og 5-111In til 54-111In refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{111}In konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene 2-113mIn, 3-113mIn og 5-113mIn til 54-113mIn refererer til 51 konjugerte forbindelser som omfatter ^{113M}In konjugert til SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5 til og med SEQ ID NO: 54.

Forbindelsene beskrevet i dette eksemplet blir kombinert med en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel for å produsere farmasøytiske sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse. Radiostabile forbindelser beskrevet heri er nyttige i farmasøytiske sammensetninger som terapeutiske midler for behandling av individer som antas å lide av metastasert colorektal cancer inkludert behandling av individer diagnostisert med lokalisert colorektal cancer som et profylaktisk/terapeutisk middel før metastaser kan bli detekert. Når tilstede i terapeutiske effektive mengder er radioaktive forbindelser beskrevet heri nyttige i farmasøytiske sammensetninger som terapeutiske midler for behandling av individer antatt å lide av metastasert colorektal

cancer inkludert behandling av individer diagnostisert med lokalisert colorektal cancer som et profylaktisk/terapeutisk middel før metastasene lett kan bli detektert. Når tilstede i diagnostiske effektive mengder er de radioaktive forbindelsene beskrevet heri nyttige i farmasøytiske sammensetninger som billeddannende midler i diagnostikk og identifikasjon av metastasert colorektal cancer i individer.

Eksempel 2

En fremgangsmåte for kryssbinding av ST reseptorligander som har en fri aminogruppe så som ST reseptorbindende peptider, som for eksempel SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 og SEQ ID NO: 5-54 til det aktive middelet som har en fri aminogruppe så som metotreksat, doksorubicin, daunorubicin, cytosinarabinosid, cis-platin, vindesin. mitomycin og blemycin eller alkalisk fosfatase, eller protein- eller peptid-basert toksin anvender homobifunksjonelle succinimidylestere, fortrinnsvis med kjedekarbonspacere så som disuccinimidyl suberat (Pierce Co. Rockford IL). Denne metoden for aminogruppe derivatisering er blitt anvendt for å kryssbinde nativ ST til biotin og til store agarosekuler med mikron-skala størrelse, med opprettholdelse av funksjonen til nativ ST (Hughes, M., et al. (1991) Biochem. 30: 10738; Hakki, S., et al. (1993) Int. J.Biochem. 25:557; Almenoff, J.S., et al. (1992) Mol. Micro. 8:865; som hver er innkorporert heri som referanse).

En ST bindende ligand med fri aminogruppe så som et ST reseptorbindende peptid blir inkubert i nærvær av det kjemiske kryssbindende middelet og et aktivt middel som har en fri aminogruppe i ekvimolare mengder ved romtemperatur i 15-30 min. Inkubasjonen blir avsluttet ved separering av reaktantene ved gelpermeasjonskromatografi ifølge HPLC. Denne teknikken separerer de konjugerte forbindelsene fra de frie aktive midlene og frie ST bindende ligandene, aktivt middel-aktivt middel konjugater og ST bindende ligand-ST bindende ligandkonjugater. Homogene preparater av konjugatet gjennom deres frie aminogrupper og med et foretrukket molart forhold på 1:1 blir oppnådd. Som angitt ovenfor opprettholder kompleksbinding av den frie aminogruppen til et ST peptid reseptorbindingsfunksjonen.

Eksempel 3

Dersom det er nødvendig med en spaltbar konjugert forbindelse kan samme protokollen som angitt ovenfor bli anvendt ved anvendelse av 3,3'-ditiobis (sulfosuccinimidylpropionat (SPDP); Pierce, IL). SPDP danner en sulfhydrylgruppe fra en fri aminogruppe som kan bli anvendt for å konjugere en forbindelse til en annen fri aminogruppe. For eksempel kan ST peptider så som SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5-54 bli derivatisert ved anvendelse av etablerte prosedyrer som anvender N-succinimidyl-3 (2-pyridiltio)-propionat (SPDP, Pharmacia-LKB, NJ). ST peptidet blir inkubert med et 5-ganger molart overskudd av SPDP i 30 minutter ved romtemperatur.

ST-pyridyltiopropionatkonjugatet blir separert fra ureagerte reagenser ved gelpermeasjonskromatografi ved HPLC. Et aktivt middel med en fri aminogruppe, så som et protein-basert toksin, blir preparert for konjugasjon ved reduksjon ved ditiotreitol i 4 timer ved romtemperatur. Redusert aktivt middel blir inkubert med et 2-ganger molart overskudd ST reseptorligand-PDP konjugat ved pH 8,0 i 36 timer ved 4°C. Konjugatforbindelsen blir renset fra ureagerte midler ved gelpermeasjonskromatografi ved HPLC.

Denne protokollen for konjugasjon er spesielt nyttig for å konjugere ST peptider til difteri toksin A kjeder og Pseudomonas eksotoksin samt ricin toksin A kjeder (Magerstadt, M. Antibody Conjugates and Malignant Disease. (1991) CRC Press, Boca Raton, USA, s. 110-152; Cawley, D.B. et al. (1980) Cell 22:563; Cumber, A.J., et al. (1985) Meth. Enz. 112:207; Gros, O. (1985) J.Immunl. Meth. 81:283; Worrell, N.R., et al. (1986) Anti-Cancer Drug Design 1:179; Thorpe, P.E. et al. (1987) Cancer Res. 47:5924, som hver er innkorporert heri som referanse.

Eksempel 4

Aktive midler med en fri aminogruppe kan bli derivatisert med SPDP som beskrevet ovenfor og konjugert med en ST ligand som har en fri aminogruppe og som er blitt modifisert med succinimidylester av iodeddiksyre (Pierce Co., Rockford, IL) (Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CEC Press Boca Raton; Cumber, A.J. et al. (1985) Meth. Enz. 112:20, som er innkorporert heri som referanse). Konjugasjonen bygger på den selektive reaksjonen av iodacetylgrupper ført inn i den aminoterminale delen av ST liganden med tiolgrupper ført inn i det aktive middelet. Som med ovennevnte protokoll fører dette til unngåelse av homopolymerdannelse. Produktet blir derimot konjugert gjennom en sentral tioeterbinding som ikke kan bli redusert.

Eksempel 5

En ST reseptorligand med en fri aminogruppe og aktive midler med frie aminogrupper kan bli konjugert gjennom en disulfidbinding ved anvendelse av iminotiolan (Pierce, Rockford, IL) (Fitzgerald, D.J.P. et al. (1983) Cell 32:607; Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CRC Press, Boca Ratom; Bjorn, M.J., et

al. (1985) Cancer Res. 45:1214; Bjorn, M.J., et al. (1986) Cancer Res. 46:3262, som er innkorporert heri som referanse). ST reseptorliganden med en fri aminogruppe blir derivatisert med aminoterminalen med iminotiolan og det aktive middelet blir derivatisert med SPDP som beskrevet ovenfor. Reaksjon av iminotiolan-derivatisert ST reseptorligand med SPDP-derivatisert aktivt middel resulterer i konjugasjon med en reduserbar disulfidbinding. Iminotiolan gir mangfoldigheten for å konjugere disse proteinene gjennom bindinger forskjellige fra disulfider. Derivatisering av aktive midler med heterobifunksjonelt middel sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidometyl) cykloheksan (Pierce, Rockford, IL) og omsetning med iminotiolanderivatisert ST reseptorligand vil konjugere disse peptidene uten dannelse av disulfider.

Eksempel 6

Konjugerte forbindelser ifølge oppfinnelsen som omfatter en aktiv del som er et terapeutisk middel inhiberer spesifikt T84 celler in vitro. Følgende protokoller kan bli anvendt for å demonstrere at de konjugerte forbindelsene ifølge oppfinnelsen vil omfatte en aktiv del som er kjemoterapeutisk eller toksin spesifikt inhiberer T84 cellene in vitro. Inhibisjon av T84 cellene blir vurdert ved å bestemme virkningene av konjugerte forbindelser på evnen som T84 cellene har til å innkorporere ^{35}S-leucin til protein, ^{3}H-tymidin til DNA og å danne kolonier. Vurdering av protein og DNA syntesen er klassiske teknikker for å bestemme cytotoksisiteten til konjugerte forbindelser in vitro. Inhibisjon av proteinsyntesen blir målt på grunn av at toksiner anvendt som aktive deler er spesifikke inhibitorer av denne prosessen. Disse analysene er følgelig det mest følsomme målet på om konjugerte forbindelser blir bundet til og innesluttet i T84 cellene. Inhibisjon av DNA syntesen blir målt på grunn av at noen kjemoterapeutiske midler inhiberer DNA syntesen og det er videre en cytotoksisitetsanalyse som korrelerer med den reproduktive overlevelsen av cellene i kultur. Cytotoksisiteten, eller svikt i normale cellulære metabolske prosesser, trenger ikke alltid direkte å korrelere med celleoverlevelsen. Vurdering av kolonidannelse vil derfor direkte måle evnen som de eksperimentelle midlene har til å redusere overlevelsen av tumorcellene, som er i nært samsvar med virkningen av de terapeutiske midlene på tumorlevedyktigheten in vivo. Kontroller innbefatter utførelse av den samme analysen ved anvendelse av den ukonjugerte formen av det aktive middelet og den ukonjugerte formen av ST reseptorliganden hvor den konjugerte forbindelsen er omfattet i stedenfor den konjugerte forbindelsen. Resultatene oppnådd i testanalysene og kontrollanalysene blir sammenlignet.

Konjugerte forbindelser blir vurdert for deres evne til å inhibere protein og DNA syntese in vitro og å inhibere overlevelsen og proliferasjonen ved måling av kolonidannelsen i monolagskulturen til etablerte protokoller (Wilson, A.P. (1987) "Cytotoxicity and viability assays", Animal Cell Culture: A Practical Approach. Frshney, R.I., ed. s. 183-216, IRL Press, Oxford, som er innkorporert heri som referanse).

For å vurdere evnen som en konjugert forbindelse har til å inhibere proteinsyntesen in vitro blir cellene sådd ut i 200 µl medium ved en subkonfluenstetthet på 1-2 x 10^5 og latt bli tilkoblet for å danne et delende cellemonolag over 12 timer ved 37°C. Deretter blir mediet erstattet med 200 µl friskt medium inneholdende hensiktsmessig konsentrasjon av konjugerte forbindelser og cellene blir inkubert ved 37°C i forskjellige tidspunkter. Etter endt indikert inkubasjonsperiode blir cellene vasket to ganger med medium og inkubert ved 37°C i 0,5 ml metionin-fritt medium supplementert med 0,5 µCi L^{35}S-metionin (800 Ci/mmol). Etter inkubasjon i ytterligere 2 timer ved 37°C blir mediet sugd av, cellene vasket to ganger med medium inneholdende 1 mg/ml metionin og deretter presipitert i 12% iskald TCA. Radioaktiviteten isolert i TCA presipitatene ved sentrifugering blir kvantifisert ved væskescintillasjonsspektroskopi. I disse studiene blir cellene opprettholdt i log vekst og analysene blir utført ved anvendelse av triplikate brønner. Data blir uttrykt som en prosentandel av proteinsyntesen observert i nærvær av eksperimentelle midler sammenlignet med ubehandlede celler.

For å vurdere evnen som en konjugert forbindelse har til å inhibere DNA syntesen blir in vitro celler sådd ut som et subkonfluent monolag og inkubert med eksperimentelle midler som beskrevet ovenfor. Etter endt inkubasjonsperiode blir cellene vasket to ganger og inkubert ved 37°C i medium inneholdende 2,5 µCi ^{3}H-tymidin (5 Ci/mmol). Etter inkubasjon i en ytterligere time blir cellene bearbeidet med TCA, presipitater isolert og radioaktiviteten kvantifisert som beskrevet ovenfor. Som ovenfor blir cellene opprettholdt i log vekst og analysene blir utført i triplikat. Data blir uttrykt som en prosentandel DNA syntese observert i nærvær av eksperimentelle midler sammenlignet med ubehandlede celler.

For å vurdere evnen som en konjugert forbindelse har til å inhibere overlevelsen og proliferasjonen ved måling av kolonidannelse i monolagskultur blir cellene sådd ut som et subkonfluent monolag på 25 cm^2 flasker og latt bli koblet som beskrevet ovenfor. Mediet blir erstattet med det som inneholder forskjellige konsentrasjoner av eksperimentelle midler og inkubert med celler i forskjellige tidsperioder. Etter endt

inkubasjon blir cellene isolert som en enkelt cellesuspensjon ved trypsinering og på ny sådd ut i en tetthet som vil gi 100-200 kolonier pr 6 cm skål. Cellene blir dyrket i 7 dager, deretter fiksert i metanol, farget med 1% krystallviolett og antall kolonier kvantifisert. Analysene blir utført i duplikat og data blir uttrykt som en prosentandel av kolonidannelse observert i nærvær av eksperimentelle midler sammenlignet med ubehandlede celler. Resultatene i laboratoriet har demonstrert at T84 cellene kan bli plassert i enkeltcelle suspensjoner ved anvendelse av trypsin (10 μg/ml) med en utsåingseffektivitet på 40% og en doblingstid på 18 timer.

Eksempel 7

Radioaktivt iod så som ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I og ^{132}I kan bli tilsatt til et ST reseptorbindende peptid så som et ST peptid ved anvendelse av en standardprotokoll som er velkjent for fagfolk innenfor dette området (Thompson, M. et al. (1985) Analytical Biochemistry 148:26, som er innkorporert heri som referanse). Radioaktivt iod blir konjugert direkte til et ST peptid så som SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 eller SEQ ID NO: 5 med henholdsvis tyrosin-5, tyrosin-4 eller tyrosin-5.

ST peptidet blir produsert i bakterier. For eksempel blir E. coli stamme 431 dyrket i kultur og utskiller ST inn i denne kulturen. Kulturmediet blir deretter renset ved anvendelse av rutinemessige teknikker. ST kan også bli dannet ved fast-fase syntese som utført tidligere ved anvendelse av standardteknikker. (Dreyfus, L., et al. (1983) Infec. Immun. 42:539, som er innkorporert heri som referanse.

10 μg ST peptid blir omsatt med 2 millicurie radioaktiv INa (Amersham Corporation, Massachusetts) i nærvær av Iodobeads (Bio Rad Laboratories, CA) og beta-D-glukose. Disse blir omsatt i 30 minutter hvoretter produktene blir utsatt for kromatografi på en Sepak revers-fase cartridge (Millipore Corp., MA) etterfulgt av separering på en C18 revers-fase kolonne ved HPLC ved anvendelse av en 20-25% acetonitrilgradient. Konjugerte forbindelser som omfatter SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 eller SEQ ID NO:5 med radioiod koblet til tyrosin-4 eluerer ved 45 min. Disse molekylene har opprettholdt fullstendig biokjemisk og farmakologisk aktivitet.

Eksempel 8

^{125}I blir konjugert direkte til et ST peptid så som SEQ ID NO:13 med tyrosin-4.

SEQ ID NO: 13 blir produsert ved fast-fase syntese som beskrevet ovenfor. 10 µg SEQ ID NO: 13 blir omsatt med 2 millicurie ^{125}INa (Amersham Corporation, Massachusetts) i nærvær av Iodobeads (Bio Rad Laboratories, CA) og beta-D-glukose. Disse blir omsatt i 30 minutter hvoretter produktene blir utsatt for kromatografi på en Sepak revers-fase cartridge (Millipore Corp., MA) etterfulgt av separering på en C18 revers-fase kolonne ved HPLC ved anvendelse av en 20-25% acetonitrilgradient. ^{125}I-SEQ ID NO: 13 konjugert med radioiod koblet til tyrosin-4 eluerer ved 45 min. Dette molekylet har beholdt full biokjemisk og farmakologisk aktivitet.

Dosering av radioiod for diagnostisk billeddannelse krever vanligvis omtrent 4 millicurie/pasient (Steinstraber, A., et al. (1988) J.Nucl. Med. 29:875; Wessels, B.W. og Rogus, R.D. (1984) Med. Phys. 11:638; Kwok, C.S., et al. (1985) Med. Phys. 12:405). For proteiner merket med en spesifikk aktivitet på 2.000 curie/mmol, så som ST peptidet, vil dette kreve omtrent 10 µg merket peptid injisert intravenøs pr pasient for diagnostisk billeddannelse.

Eksempel 9

^{131}I blir konjugert direkte til et ST peptid så som SEQ ID NO: 13 ved tyrosin-4.

SEQ ID NO: 13 blir produsert ved fast-fase syntese som beskrevet ovenfor. 10 µg SEQ ID NO:13 blir omsatt med 10 millicure ^{131}INa (Amersham Corporation, Massachusetts) i nærvær av Iodobeads (Bio Rad Laboratories, CA) og beta-D-glukose. Disse blir omsatt i 30 min. hvoretter produktene blir utsatt for kromatografi på en Sepak revers-fase cartridge (Millipore Corp., MA) etterfulgt av separering på en C18 revers-fase kolonne ved HPLC ved anvendelse av en 20-25% acetonitrilgradient. ^{131}I-SEQ ID NO: 13 konjugat med radioiod koblet til tyrosin-4 eluerer ved 45 min. Dette molekylet har beholdt fullstendig biokjemisk og farmakologisk aktivitet.

For radioioderte antistoffer (MW=160.000 Da), omtrent 150 nanomol protein (24 milligram) merket med en spesifikk aktivitet på 10.000 curie/mmol er nødvendig pr gram tumor pr pasient (Humm, J. L. (1986) J.Nucl. Med. 27:1490). For proteiner merket

med en spesifikk aktivitet på 2.000 curie/mmol, med en molekylvekt på 2.000 Da, så som ST peptid, er omtrent 3 milligram nødvendig pr gram tumor pr pasient for intravenøs infusjon.

Eksempel 10

I visse utførelsesformer blir kobling av ST reseptorligandene som har en fri aminogruppe, spesielt ST reseptorbindende peptider så som ST peptider, og aktive midler med en fri aminogruppe så som protien-baserte toksiner utført ved innføring av en disulfidbro mellom 2 molekyler. Denne strategien er spesielt nyttig for å konjugere ST peptidene på grunn av at den frie aminoterminalen er blitt vist å være nyttig som et punkt for konjugasjon uten å påvirke ST bindende aktivitet. Denne strategien er spesielt nyttig for å konjugere protein-baserte toksiner på grunn av at den frie aminoterminale enden er tilgjengelig på slike molekyler og for noen konjugerte forbindelser, spesielt RTA konjugater, kan en disulfidbro bli redusert for å tilveiebringe separate proteiner som er blitt demonstrert å være viktige for konstruksjon av funksjonelle chimerer målsøkt av monoklonale antistoffer (Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CRC Press, Boca Raton; Bjorn, M.J., et al. (1985) Cancer Res. 45:1214; Bjorn, M.J., et al. (1986) Cancer Res. 46:3262; Masuho, Y., et al. (1982) J. Biochem. 91:1583, som er innkorporert heri som referanse). I det noen toksiner kan bli koblet til ST peptider ved anvendelse av kryssbindende midler som ikke resulterer i en reduserbar disulfidbro mellom individuelle komponenter, men som har beholdt funksjonell cytotoksisitet, krever i sin A kjede toksin et reduserbart disulfid for cytotoksisitet, mens for eksempel Pseudomonas eksotoksin ikke trenger dette.

Disulfidkoblingen blir oppnådd ved anvendelse av etablerte prosedyrer ved anvendelse av det heterobiofunksjonelle middelet N-succinimidyl-3 (2-pyridyltio)-propionat (SPDP, Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ) (Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease, CRC Press, Boca Raton; Cawley, D.E.et al (1980) Cell 22:563; Cumber, A.J., et al. (1985) Meth.Enz. 112:20; Gros, O., et al. (1985) J.Immunl. Meth. 81:283; Worrell, N.R., (1986) Anti-Cancer Drug Design 1:19; Thorpe, P.E., et al (1987) Cancer Res. 4:5924, som er innkorporert heri som referanse).

I noen utførelsesformer blir toksiner som inkluderer A kjedene til deglykosylert ricintoksin (RTA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), difteri toksin A (DTA; Calbiochem, La Jolla, CA) og Pseudomonas ekotoksin (PEA) konjugert til ST peptider

for å produsere konjugerte sammensetninger ifølge foreliggende oppfinnelse ved anvendelse av denne prosedyren. Deglykosylert RTA blir anvendt på grunn av at den glykosylerte formen av dette toksinet utviser uspesifikk binding til levercellene. DTA blir dannet fra difteri toksin ifølge en etablert prosedyre (Michel A. og Drykx, J. (1975) Bichem. Biophys. Acta 365:15; Cumber, A.J., et al. (1985) Meth.Enz. 112:207, som begge er innkorporert heri som referanse). PEA

I noen utførelsesformer blir ST peptider konjugert til toksiner ifølge denne prosedyren. For eksempel ST peptidet SEQ ID NO: 3 som blir produsert som beskrevet ovenfor (se Dreyfus, L., et al. (1983) Infec. Immun. 42:539, som er innkorporert heri som referanse.

Toksiner blir dannet for kobling ved reduksjon med 0,1 M ditiotreitol (DTT) i 4 timer ved romtemperatur i 0,4 M tris-HCl, pH 8,0 og 1 mM EDTA. Reduserte toksiner blir avsaltet på en Sephadex G-25 kolonne ekvilibrert i TES buffer og blandet med et 2-ganger molart overskudd ST-PDP. Reaksjonene blir justert til pH 8,0 med TES og inkubert ved 4°C i 36 timer. ST peptid-toksin konjugater blir renset fra ureagerte produkter og homopolymerene av ST peptidene og toksinene ved gelfiltrering på Sephadex G-75 i 20 mM TES, pH 8,0 inneholdende 0,1 M NaCl. Kromatografiske fraksjoner blir registrert ved SDS-PAGE på 10% polyakrylamidgeler under ikke-reduserende betingelser i nærvær av 1:1 konjugater av ST peptider og toksiner. Disse konjugatene blir også analysert ved 10% SDS-PAGE under reduserende betingelser for å forsikre at ST og cytotoksiner blir koblet med en reduserbar disulfidbinding. Molare konsentrasjoner av konjugatet blir beregnet ved å kvantifisere radioaktiviteten i disse prøvene.

ST spor merket med ^{125}I på tyrosin 4 (10 Ci/mmol) blir anvendt for å følge konjugatet gjennom forskjellige separasjons- og kromatografitrinn og for å muliggjøre beregning av det molare forholdet mellom ST og cytotoksin i det rensede konjugatet. ST spor merket med ^{125}I blir derivatisert ved inkubering av 1 mg/ml med et 5-ganger molart overskudd SPDP i 30 minutter ved romtemperatur i Na fosfatbuffer, pH 7,4. ST-pyridyltiopropionat (ST-PDP) konjugatet blir renset fra ureagert kryssbindende middel ved kromatografi på Sephadex G-25 ekvilibrert med 20 mM N-tris (hydroksymetyl)-metyl-2-aminoetan sulfonsyre (TES) buffer, pH 7,4. Preservering av reseptorbinding av konjugerte ST peptider i humane tarmmembraner blir bestemt i konkurrerende analyser med økende konsentrasjoner av ST-PDP og ^{125}I-ST ($5 \times 10^{10}M$), for å forsikre at denne prosessen ikke ødelegger funksjonen til ST reseptorliganden.

Ovennevnte koblingsprotokoll har flere fordeler for konjugering av forskjellige toksiner. For det første introduserer den en reduserbar disulfidbro inn i den konjugerte sammensetningen som er viktig for RTA cytotoksisitet. Denne teknikken unngår videre eksponering av ST peptidet for kvantitativ reduksjon med DTT som kan avbryte dets 3 intrakjede disulfidbindinger som er viktige for reseptorbindende aktivitet. Det er i tillegg en enkeltgruppe tilgjengelig ved aminoterminalen til ST peptidet for derivatisering med SPDP og tidligere eksperimenter har demonstrert at derivatisering av gruppen konserverer bindingsegenskapene til liganden. Andre konfigurasjoner for konjugasjon som kunne resultere i inaktivering av ST er ikke mulig. PEA krever videre preaktivering med DTT for å oppnå optimal cytotoksisitet som vil bli oppnådd ved anvendelse av ovennevnte protokoll.

For å produsere en funksjonell konjugert forbindelse som omfatter et toksin er det vesentlig at reseptorbindende og enzymaktivitetene til delene blir konservert i løpet av konjugasjonsprosessen. Når slike konjugatforbindelser blir oppnådd blir de testet for konservering av disse funksjonene. ST reseptorbindende aktivitet til konjugerte forbindelser blir undersøkt i konkurrende bindingsanalyser, som beskrevet ovenfor. I disse studiene blir økende konsentrasjoner av konjugerte forbindelser inkubert med en konstant konsentrasjon (5 X 10^{10}M) ^{125}I-ST og tarmmembranene (50-100 µg protein) for å oppnå likevekt. Parallelle inkubasjoner inneholder overskudd (5 X 10^{7}M) umerket ST for å vurdere uspesifikk binding. Konsentrasjons-avhengig konkurrerende erstatning av radiomerket ST ved konjugerte forbindelser blir sammenlignet med den konkurrerende forflytning oppnådd ved nativt ST. Forflytningskurvene blir anvendt for å vurdere affiniteten til hver konjugerte forbindelse (K_D) for å sammenligne den med affiniteten til nativt ST målt ifølge denne teknikken. Kontrollstudier innbefatter vurdering av evnen som ukonjugerte toksiner har til å konkurrere med nativt ST for reseptorbinding. Disse studiene konkluderer med at den bindende funksjonen til ST i den konjugerte konstruksjonen blir bevart.

Bevaring av toksinaktiviteten i konjugerte forbindelser blir også vurdert. PEA og DTA induserer toksisitet ved katalysering av NAD-avhengig ADP-ribosylering av elongeringsfaktor 2 (EF2), med inhibering av proteinsyntesen. ADP-ribosyl transferase aktiviteten blir vurdert ved anvendelse av en etablert analyse (Chung, D.W. og Collier, R.J. Infect. Immun. 16:832; Fitzgerald, D.J.P. (1987) Meth. Enz. 151:139, som begge er innkorporert heri som referanse). Reaksjoner blir inkubert i 30 mM tris-HCl, pH 8,2 inneholdende 40 mM DTT, 50 mCi ^{14}C-NAD, og 20 µl kaninretikulocytlysat inneholdende elongeringsfaktor 2 (EF-2); Promgea, Madison, WI) i et totalvolum på

500 µl. Raksjonene blir initiert ved tilsetning av lysat, inkubert i 30 minutter ved 37°C og terminert ved tilsetning av is-kald 12% TCA. Radioaktiviteten i proteinpresipitatene samlet ved sentrifugering blir kvantifisert ved væskescintillasjonsspektroskopi. Evnen som de konjugerte forbindelsene som omfatter DTA eller PEA har til å katalysere overføringen av merket ADP-ribose til E-2 blir sammenlignet med den katalysert av lignende mengder ukonjugerte toksiner. Kontrolleksperimenter innbefatter undersøkelse av evnen til ukonjugerte toksiner eller ST når det gjelder å katalysere ADP-ribose overføringen og virkningene av ST på den enzymatiske aktiviteten til ukonjugerte cytotoksiner.

RTA inhiberer proteinsyntesen ved katalytisk inaktivering av 60S ribosomal subenhet. Den katalytiske aktiviteten til konjugerte forbindelser som omfatter RTA blir vurdert ved dets evne til å inhibere proteinsyntesen i celle-frie analyser ved hjelp av etablerte prosedyrer (Leonard, J.E. et al. (1985) Cancer Res. 45:5263 som er innkorporert heri som referanse). Analyser inneholder 35 µl nuklease-behandlet kaninretikulocytlysater, 1 µl 1 mM blandede aminosyrer som mangler metionin, 2 µl brom mosaikk RNA (Promega, Madison, WI) ved 0,5 µg/µl, 7 µl sterilt vann eller konjugatoppløsning, og 5 µCi ^{35}S-metionin i et totalvolum på 50 µl. Reaksjonene vil bli initiert ved tilsetning av lysat, inkubert ved 30°C i 30 minutter og avsluttet ved anvendelse av tilsetning av 12% TCA. Radioaktiviteten i proteinpresipitater samlet ved sentrifugering blir kvantifisert ved væskescintillasjonsspektroskopi. Kontrolleksperimentene innbefatter undersøkelse av evnen som ukonjugert RTA eller ST peptid har til å inhibere celle-fri proteinsyntese og virkningene av ST peptidet på den inhibitoriske aktiviteten til ukonjugert cytotoksin.

Eksempel 11

Metotreksat blir koblet til SEQ ID NO: 12 ved homobifunksjonell kryssbinder succinimidylestere med langkjedede karbonspacere så som disuccinimidylsuberat (Pierce, IL). SEQ ID NO: 12 blir inkubert i nærvær av kjemisk kryssbindende middel og metotreksat i ekvimolare mengder ved romtemperatur i 15-30 min. Inkubasjonen blir terminert ved separering av reaktantene ved gelpermeasjonskromatografi ved HPLC. Denne teknikken separerer metotreksat/SEQ ID NO: 12 konjugater fra fritt medikament, fritt ST peptid, medikament-medikament konjugater og ST peptid-ST peptid konjugater. Homogene preparater av SEQ ID NO: 12 metotreksatkonjugater koblet gjennom deres frie aminogrupper og med et foretrukket molart forhold på 1:1 blir oppnådd.

Kompleksbinding av den frie aminogruppen til ST konserverer reseptorbindende funksjon.

Eksempel 12

^{111}In blir koblet til SEQ ID NO: 37 med funksjonelle aminogrupper ved anvendelse av en chelator. ST peptidet har en fri aminofunksjon ved den aminoterminale enden som kan bli modifisert uten å endre ST reseptorbindende aktivitet til ST peptidet. ^{111}In blir hurtig og potensielt chelatert med enten EDTA (etylendiamintetraeddiksyre) eller DTPA (dietylentriaminpetaeddiksyre). DTPA er foretrukket i forhold til EDTA på grunn av at sistnevnte kan være mer ustabil in vivo. ^{111}In-DTPA blir omdannet til en blandet N-hydroksysuccinimidester som er reaktiv med frie aminogrupper, blandet med ST og reaksjonsprodukter, inkludert ^{111}In-SEQ ID NO: 37 separert ved HPLC (Bremer, K.H. og Sckwartz, A. (1987) i Safety And Efficacy Of Radiopharmaceuticals. Kristensen, K., og Norbygaard, E. Eds. Martinius Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, s 43; Krejcarek, G.E., ig Tucker, K.L. (1977) Biochem. Biophys.Res. Commun. 77:581; Paxton, R.J., et al. (1985) Cancer Res. 45:5694; Richardson, A.P., et al. (1986) Nucl. Med.Biol. 14:569, som er innkorporert heri som referanse).

Eksempel 13

^{99m}Tc kan bli konjugert til SEQ ID NO:46 ved anvendelse av en metode som ligner den til indium. Technetium kan bli chelatert av DTPA som blir omdannet til et anhydrid, så som N.hydroksysuccinimidanhydrid, og omsatt med SEQ ID NO:46. ST-technetium konjugatet kan deretter bli separert ved anvendelse av HPLC (Magerstadt, M. (1991) Antibody Conjugates And Malignant Disease CRC Press, Boca Raton; Eckelman, W.C. og Paik, C.H. (1986) Nucl. Med. Biol. 14:569).

Eksempel 14

Difteri toksin A kjede (DTA) blir preparert fra nativ difteritoksin ved hjelp av standardteknikker. SEQ ID NO: 22 blir koblet til N-succinimidyl-3(2-pyridyltio)-propionat (SPDP, Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ) og SEQ ID NO: 22-PDP konjugatet blir renset ved HPLC ved hjelp av etablerte prosedyrer. DTA blir redusert med

ditiotreitol og inkubert med SEQ ID NO: 22-PDP. DTA-SEQ ID NO: 22 blir renset etter konjugasjon ved anvendelse av HPLC.

Eksempel 15

Pseudomonas eksotoksin blir dannet fra native kilder ved hjelp av standardteknikker. SEQ ID NO: 54 blir koblet til N-succinimidyl-3(2-pyridyltio)-propionat (SPDP, Pharmacia, LKB, Piscataway, NJ) og SEQ ID NO:54-PDP konjugatet blir renset ved HPLC ifølge etablerte prosedyrer. Pseudomonas eksotoksin blir redusert med ditiotreitol og inkubert med SEQ ID NO: 54-PDP. Pseudomonas eksotoksin-SEQ ID NO: 54 blir renset etter konjugasjon ved anvendelse av HPLC.

Eksempel 16

Doksorubicin blir koblet til SEQ ID NO: 54 ifølge homobifunksjonell kryssbindende succinimidylestere med langkjedede karbonspacere så som disuccinimidylsuberat (Pierce, IL). SEQ ID NO:54 blir inkubert i nærvær av det kjemiske kryssbindende middelet og doksorubicin i ekvimolare mengder ved romtemperatur i 15-30 minutter. Inkubasjonen blir terminert ved separering av reaktantene ved gelpermeasjonskromatografi ved HPLC. Denne teknikken separerer doksorubicin/SEQ ID NO: 54 konjugatet fra fri doksorubicin, fritt ST peptid, medikament-medikament konjugater og ST peptid-ST peptid konjugater. Homogene preparater av SEQ ID NO:54-doksorubicin konjugater blir koblet gjennom deres frie aminogrupper og med et foretrukket molart forhold på 1:1 blir oppnådd. Kompleksbinding av den frie aminogruppen til ST konserverer reseptorbindingsfunksjonen.

Eksempel 17

Daunorubicin blir koblet til SEQ ID NO: 32 ved homobifunksjonell kryssbindende succinimidylestere med langkjedede karbonspacere så som disuccinimidylsuberat (Pierce, IL) SEQ ID NO: 32 blir inkubert i nærvær av kjemisk kryssbindende middel og daunorubicin i ekvimolare mengder ved romtemperatur i 15-30 minutter. Inkubasjonen blir terminert ved separering av reaktantene ved gelpermeasjonskromatografi med HPLC. Denne teknikken separerer daunorubicin/SEQ ID NO: 54 konjugatene fra fri

daunorubicin, fri ST peptid, medikament-medikament konjugater og ST peptid-ST peptid konjugater. Homogene preparater av SEQ ID NO:54-daunorubicin konjugater koblet gjennom deres frie aminogrupper og med et foretrukket molart forhold på 1:1 blir oppnådd. Kompleksbinding av den frie aminogruppen til ST bevarer reseptorbindende funksjon.

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1:

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 19 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 2:

Asn Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala
1 5 10 15

Gly Cys Tyr

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 18 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 3:

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15

Cys Asn

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 57 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: dobbel

(D) TOPOLOGI: begge

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(ix) TREKK:

(A) NAVN/NØKKEL: CDS

(B) BELIGGENHET: 1..57

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 4:

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 19 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: protein

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 5:

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Asn
1 5 10 15

Gly Cys Thr

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 15 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 6:

Pro Asn Thr Cys Glu Ile Cys Ala Tyr Ala Ala Cys Thr Gly Cys
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 18 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 7:

Asn Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala
1 5 10 15
Gly Cys

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 8:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 17 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 8:

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15
Cys

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 9:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 16 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 9:

Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 10:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 15 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 10:

Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 11:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 14 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 11:

Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 12:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 13 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 12:

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 13:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 18 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 13:

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15
Cys Tyr

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 14:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 17 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 14:

Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10 15
Tyr

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 15:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 16 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 15:

Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys Tyr
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 16:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 15 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 16:

Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys Tyr
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 17:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 14 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 17:

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys Tyr
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 18:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 17 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 18:

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15
Cys

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 19:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 16 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 19:

Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 20:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 15 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 20:

Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 21:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 14 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 21:

Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 22:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 13 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 22:

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 23:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 17 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 23:

Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10 15
Asn

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 24:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 16 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 24:

Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly Cys Asn
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 25:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 15 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 25:

Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly Cys Asn
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 26:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 14 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 26:

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Ala Gly Cys Asn
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 27:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 18 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 27:

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
1 5 10 15
Gly Cys

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 28:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 17 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 28:

Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly
1 5 10 15
Cys

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 29:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 16 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 29:

Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys
1 5 10 13

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 30:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 15 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 30:

Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 31:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 14 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 31:

Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 32:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 13 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 32:

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 33:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 18 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 33:

Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly
1 5 10 15
Cys Tyr

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 34:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 17 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 34:

Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys
1 5 10 15
Tyr

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 35:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 16 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 35:

Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 36:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 15 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 36:

Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 37:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 14 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 37:

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 38:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 18 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 38:

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15
Cys Tyr

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 39:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 18 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 39:

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Ala Pro Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15
Cys Tyr

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 40:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 18 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 40:

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Ala Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15
Cys Tyr

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 41:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 17 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 41:

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15
Cys

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 42:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 15 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 42:

Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys Tyr
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 43:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 14 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 43:

Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 44:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 14 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 44:

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys Tyr
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 45:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 13 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 45:

Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 46:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 25 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 46:

Gln Ala Cys Asp Pro Pro Ser Pro Pro Ala Glu Val Cys Cys Asp Val
1 5 10 15
Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys
20 25

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 47:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 16 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 47:

Ile Asp Cys Cys Ile Cys Cys Asn Pro Ala Cys Phe Gly Cys Leu Asn
1 5 10 15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 48:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 18 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 48:

Ser Ser Asp Trp Asp Cys Cys Asp Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala
1 5 10 15
Gly Cys

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 49:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 19 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 49:

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Thr
1 5 10 15
Gly Cys Tyr

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 50:
(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:
(A) LENGDE: 13 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær
(ii) MOLEKYLTYPE: peptid
(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 50:

Cys Cys Asp Val Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 51:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 14 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 51:

Cys Cys Asp Val Cys Cys Tyr Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 52:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 14 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 52:

Cys Cys Asp Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys Tyr
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 53:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 14 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 53:

Cys Cys Gln Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 54:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 15 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 54:

Pro	Gly	Thr	Cys	Glu	Ile	Cys	Ala	Tyr	Ala	Ala	Cys	Thr	Gly	Cys
1				5					10					

Patentkrav

1.

Konjugert forbindelse, karakterisert ved at den omfatter:

a) en varmestabil peptid-, antistoff-, Fab- eller $F(Ab)_2$-toksinreseptorbindende del; og,

b) en aktiv del; der nevnte aktive del er et radiostabilt aktivt middel eller et radioaktivt middel.

2.

Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at den varmestabile toksinreseptorbindende del er utvalgt fra gruppen bestående av: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NOS:5-54 og fragmenter og derivater av disse der nevnte fragmenter og derivater er peptider som er i stand til å bindes til den varmestabile toksinreseptoren, der nevnte fragmenter har en aminosyresekvens identisk med en del av det varmestabile toksinreseptorbindende peptid og der nevnte derivater har en aminosyresekvens som er den samme som aminosyresekvensen til minst en del av det varmestabile toksinpeptid med unntak av at noen rester er fjernet eller substituert med konservative aminosyrer eller at ytterligere aminosyrer er innført.

3.

Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at nevnte aktive del er et terapeutisk middel.

4.

Forbindelse ifølge krav 1, karakterisert ved at nevnte aktive middel blir valgt fra gruppen bestående av:
metotreksat, doksorubicin, daunorubicin, cytosinarabinose, etopsid, 5-4 fluoruracil, melfalan, klorambucil, cis-platinum, vindesin, mitomycin, bleomycin, purotionin, makromycin, 1,4-benzoquinon derivater, trenimon, ricin, ricin A kjede, Pseudomonas eksotoksin, difteri toksin, Clostridium perfringens fosfolipase C, bovin bukspyttkjertel ribonuklease, kermesbær antiviralt protein, abrin, abrin A kjede, kobra gift faktor, gelonin, saporin, modeccin, viskumin, volkensin, alkalisk fosfatase, nitroimidazol, metronidazol og misonidazol.

5.

Farmasøytisk sammensetning k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

a) en farmasøytisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel, og

b) en konjugert forbindelse ifølge krav 1.

6.

Anvendelse av en konjugert forbindelse ifølge krav 1 for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av et individ som mistenkes å lide av metastasert colorektal cancer.

7.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte aktive del blir valgt fra gruppen bestående av: ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{90}Y, ^{109}Pd, ^{123}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{132}I, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}B, ^{32}P og ^{33}P, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{103}Pb, ^{105}Rh, ^{111}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}Os, ^{193m}Pt, ^{197}Hg, ^{43}K, ^{52}Fe, ^{57}Co, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{77}Br, $^{81}Rb/^{81m}Kr$, ^{87m}Sr, ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{113m}In, ^{127}Cs, ^{129}Cs, ^{203}Pb og ^{206}Bi.

8.

Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at den varmestabile toksinreseptorbindende del er valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NOS:5-54.

9.

Anvendelse av en konjugert forbindelse omfattende:

a) en varmestabil peptid-, antistoff-, Fab- eller $F(Ab)_2$-toksinreseptorbindende del; og

b) en aktiv del;

der nevnte aktive del er et radiostabilt aktivt middel for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for å diagnostisere colorektal cancer.

10.

Anvendelse av en konjugert forbindelse omfattende:

a) en varmestabil peptid-, antistoff-, Fab- eller $F(Ab)_2$ -toksinreseptorbindende del; og,

b) en aktiv del;

der den aktive del er et radiostabilt aktivt middel for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av kolorektal cancer.

11.

Farmasøytisk sammensetning omfattende:

c) en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel, og

d) en sammensetning omfattende:

i) en varmestabil peptid-, antistoff-, Fab- eller $F(Ab)_2$-toksinreseptorligand; og

ii) et nukleinsyremolekyl.

12.

In vitro fremgangsmåte for å bestemme om tumorcellen er en colorektal tumorcelle, k a r a k t e r i s e r t v e d å bestemme om nevnte tumorcelle uttrykker det varmestabile toksin-reseptorprotein.

13.

Fremgangsmåte ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at ekspresjon av nevnte varmestabile toksin-reseptorprotein fra nevnte celler blir bestemt ved analysen valgt fra gruppen bestående av: immunanalyse hvor nevnte prøve blir brakt i kontakt med detekterbare antistoffer som spesifikt blir bundet til den varmestabile toksin-reseptoren; varmestabil toksin-reseptorbindende analyse hvor nevnte prøve blir brakt i kontakt med merket varmestabil toksin-reseptorligand; polymerasekjedereaksjon hvor nevnte prøve blir brakt i kontakt med primere som selektivt amplifiserer mRNA eller cDNA som koder for det varmestabile toksin-reseptorproteinet.

14.

In vitro fremgangsmåte ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at en prøve av ekstraintestinalt vev eller kroppssekret fra et individ analyseres for tilstedeværelse av metastaserte colorektale cancerceller ved å bestemme om det varmestabile toksin-reseptorproteinet blir uttrykt av cellene i nevnte prøve.

15.

Fremgangsmåte ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at ekspresjonen av nevnte varmestabile toksin-reseptorprotein fra nevnte celler blir bestemt ved analysen valgt fra gruppen bestående av: immunanalyse hvor nevnte tumorcelle blir brakt i kontakt med detekterbare antistoffer som spesifikt blir bundet til

den varmestabile toksin-reseptoren; varmestabil toksin-reseptorbindende analyse hvor nevnte tumorceller blir brakt i kontakt med merket varmestabil toksin-reseptorligand; polymerasekjedereaksjon hvor nevnte tumorceller blir brakt i kontakt med primere som selektivt amplifiserer mRNA eller cDNA som koder for varmestabilt toksin-reseptorproteinet.

16.

Sett for å bestemme om en prøve inneholder en colorektal cancercelle,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter:

en første beholder som omfatter antistoffer som blir bundet til det varmestabile toksin-reseptorproteinet og en andre beholder som omfatter et isolert varmestabilt toksin-reseptorprotein; eller

en første beholder som omfatter en detekterbar varmestabil toksin-reseptorligand og en andre beholder som omfatter et isolert varmestabilt toksin-reseptorprotein; eller

en første beholder som omfatter et sett av PCR-primere, hvori en PCR-reaksjon ved anvendelse av nevnte sett av primere som amplifiserer et DNA-molekyl fra et substrat av mRNA som koder for det varmestabile toksin-reseptorproteinet eller et sett av primere som amplifiserer et DNA-molekyl fra et substrat av cDNA eller mRNA som koder for det varmestabile toksin-reseptorproteinmolekylet og en andre beholder som omfatter et DNA-molekyl som er lik i størrelse med et DNA-molekyl som blir amplifisert ved PCR ved anvendelse av nevnte første PCR-primer og nevnte andre PCR primer og nevnte mRNA eller nevnte cDNA; eller

en første beholder som omfatter et nukleinsyremolekyl som omfatter en sekvens som er identisk med og/eller komplementær med mRNA eller cDNA som koder for varmestabilt toksin-reseptorprotein og en andre beholder som omfatter et nukleinsyremolekyl som hybridiserer til nukleinsyremolekylet i nevnte første beholder.