



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 319899

C 07 K 16/18, 19/00, 14/47, A 61 K 48/00

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19963283	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.02.06 PCT/US95/01161
(22)	Inng.dag	1996.08.06	(85)	Videreføringsdag	1996.08.06
(24)	Løpedag	1995.02.06	(30)	Prioritet	1994.02.07, US, 192655
(41)	Alm.tilgj	1996.08.06			
(45)	Meddelt	2005.09.26			
(73)	Innehaver	Research Development Foundation, 402 North Division Street, Carson City, NV 89703, US			
(72)	Oppfinner	Nicholas J. Donato, Houston, TX, US			
		Michael G Rosenblum, 3127 Stoney Mist Drive, Sugar Land, TX 77429, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Preformet immunkonjugat koblet gjennom avidin-biotin interaksjonen, invitro fremgangsmåter for innføring av genetisk materiale og en cytotoksisk del av en celle.			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 93/25240			
(57)	Sammendrag				

En ikke-viral vektor omfattende en cellebindende komponent med et biotin-bindende element konjugert til en biotinyleret del er beskrevet. En fremgangsmåte for innføring av genetisk materiale inn i en spesifikk celle omfattende administrering av ikke-viral vektor til et menneske, i det nevnte ikke-virale vektor omfatter en cellebindende komponent som har et biotin-bindende element konjugert til en biotinyleret del samt en fremgangsmåte for levering av en cytotoksisk del til en celle omfattende administrering av den ikke-virale vektoren til et menneske er også beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører området molekylær biologi og terapeutiske midler. Oppfinnelsen vedrører spesielt en ny ikke-viral vektor for levering av genetisk informasjon til celler.

5 Den mest vanlige mekanismen for levering av genetisk materiale med evne til å påvirke molekylære egenskaper til pattedyrceller anvender virale, hovedsakelig retrovirale, vektorer. Denne metoden for genetisk terapi eller levering er derimot innvirket av flere mangler og potensielt farlige betingelser. Til tross for at retrovirale vektorer har vært mer vanlige er adenovirale vektorer nå blitt studert og begge har samme potensiale. En
10 viral vektor har derimot mange ulemper. For det første må målcellene, for eksempel humane celler, ha evne til å reagere med viruset gjennom ekspresjon av et spesifikt celleoverflateelement som ikke nødvendigvis blir uttrykt på cellene eller vev av interesse for levering av genetisk informasjon. For det andre må det genetiske materialet bli integrert og uttrykt i målcellen, for eksempel den humane cellen, som krever at
15 målcellene er aktivt delende og utgjør en tilstand som hindrer effektivitet og homogenitet til dette leveringssystemet. Selv om det blir vellykket integrert kan genet være transkripsjonelt stille ifølge vertscellemekanismer. For det tredje er størrelsen på den genetiske informasjonen som er tillatt i dette systemet begrenset og må bli konstruert med stor nøyaktighet for å forsikre biologisk aktivitet. For det fjerde må
20 replikasjonsdefekte viruset bli anvendt for genterapianvendelser for å redusere risikoen for rekombinasjon med endogene viruset som kan danne nye infeksionse midler. Replikasjonsdefekte viruset kan redusere denne faren, men ikke eliminere den. For det femte er replikasjonsdefekte viruset i seg selv ikke selv-fjernende og det kreves gjentatt infeksjon for å oppnå vellykket levering av gensekvensene til alle cellene.

25 Gitt manglene til virale vektorer har alternative avleveringsvektorer blitt underlagt vitenskapelige undersøkelser (se for eksempel WO 93/21232, Yoshikawa et al., 1992, eller WO 93/25240). Kjent teknikk er imidlertid ikke i stand til å frembringe celle-targeting vektorer som anvendes for avlevering av molekylene av interesse. Den
30 foreliggende oppfinnelsen oppfyller dette behovet og ønsket innen faget.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et nytt ikke-viralt system for levering av genetiske materialer med evne til modifikasjon av skadelige eller uønskede fenotypiske karaktertrekk.

I en utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er det følgelig tilveiebragt en ikke-viral vektor omfattende en cellebindende komponent som har et biotin-bindende element konjugert til en biotinyllert del.

- 5 Foreliggende oppfinnelse muliggjør en fremgangsmåte for innføring av genetisk materiale inn i en spesifikk celle omfattende administrering av den ikke-virale vektoren til et menneske, i det nevnte ikke-virale vektor omfatter en cellebindende komponent som har et biotin-bindende element konjugert til en biotinyllert del.
- 10 Videre muliggjør foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for levering av en cytotoxisk del til en celle som omfatter administrering av den ikke-virale vektoren til et menneske.

Andre og ytterligere aspekter, trekk og fordeler ifølge oppfinnelsen vil fremkomme fra
15 beskrivelsen.

Følgende figurer er gitt for å illustrere forskjellige aspekter av foreliggende oppfinnelse. Noen av figurene er presentert i skjematisk form og er ikke nødvendigvis i riktig skala.

20 Figur 1 viser separering av fri SPDP fra A108/SPDP på G-25 kolonne.

Figur 2 viser separering av fri 2-IT fra avidin/2-IT på G-25 kolonne.

Figur 3 viser separering av fri avidin fra A108-avidin konjugert på S-200 kolonne
25 (FPLC).

Figur 4 viser separering av fritt antistoff fra A108-avidin konjugert på Con-A kolonne.

Figur 5 viser en 7,5% SDS-PAGE mini-gel som viser rensningstrinnene til A108-avidin
30 konjugatet.

Figur 6 viser bindingsaktiviteten for analyse av biotinyllert gelonin.

Figur 7 viser profilen av G-75 (FPLC) for A108-avidin gelonin/biotin konjugat og
35 separering av fri avidin gelonin og noen avidin sub-enheter.

Figur 8 viser ELISA bindingsaktivitetsanalysen for biotinyleret gelonin og for A108-avidin biotinyleret gelonin konjugat.

Figur 9 viser cytotoxissiteten til A108-gelonin konjugat sammenlignet med A108-avidin biotinyleret gelonin konjugat på A431 celler.

Figur 10 viser virkning av inkubasjon av cellene med nukleinsyresekvenser rettet mot EGF reseptorgenpromotersekvensen (merket antisens EGFr).

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en ikke-viral vektor omfattende en cellebindende komponent som har et biotin-bindende element konjugert til en biotinyleret del.

Det biotin-bindende elementet ifølge foreliggende oppfinnelse er et hvilket som helst kjemisk middel som binder biotin og som lett vil bli gjenkjent av en person kjent innenfor dette fagområdet. Biotin-bindende element blir valgt fra gruppen bestående av avidin, streptavidin eller analoger av avidin eller streptavidin.

Det cellebindende elementet ifølge foreliggende oppfinnelse kan være en av flere forskjellige utførelsesformer. For eksempel kan det cellebindende elementet være et monoklonalt antistoff. Monoklonalt antistoff nyttig i sammensetningene og fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse er de som spesifikt binder et antigen. Representative eksempler på antigener hvortil slike antistoffer vil binde er epidermal vekstfaktorreseptor, c-erbB2 antigen, Lewis Y antigen, transferrin reseptor, MDR1, MDR3, insulinreseptor, CD45, CD33, GP240, GD2, GD3, fibroblast vekstfaktorreseptor, blodplateavledet vekstfaktor reseptor.

Alternativt er det cellebindende elementet en ligand som spesifikt binder en celleoverflatereseptor. Representative eksempler på ligandbindende celleoverflatereseptorer innbefatter transformerende vekstfaktor-alfa, heregulin, fibroblastvekstfaktor, blodplate-avledet vekstfaktorreseptor.

Den biotinylerede delen kan være en hvilken som helst forbindelse som kan bli hensiktsmessig biotinyleret og som er et kjemisk middel som man spesifikt ønsker å innføre inn i en celle for å utvise en bestemt biologisk eller farmakologisk effekt. Den biotinylerede delen kan følgelig være et protein eller en nukleinsyre.

Representative eksempler på proteiner nyttige i sammensetninger og fremgangsmåter ifølge foreliggende oppfinnelse er gelonin, ricin, saporin, abrin, difteri toksin, pseudomonas eksotoksin, rayalase, superoksid dismutase, protein tyrosin fosfatase, proteinfosfatase (PP-1 eller PP-2), protein kinase A og protein kinase C.

5

Representative eksempler på nukleinsyrer er trippel heliks oligonukleotider, for eksempel, tripleks EGF reseptor oligonukleotider, antisens oligonukleotider, for eksempel for EGF eller myc, delgensekvenser, for eksempel, sekvenser kodende for en enkelt domene til et protein med flere domener så som c-src eller EGF reseptoren og

10 hele gener, for eksempel tatt fra en integrerende enhet av det retrovirale genomet.

Foreliggende oppfinnelse innbefatter sammensetninger og fremgangsmåter som muliggjør innføring av nukleinsyrer inn i et spesifikt subset av celler uten anvendelse av en viral infeksjon eller transfeksjonskomponent. Monoklonale antistoffer rettet mot en

15

celleoverflate komponent blir modifisert og anvendt for å inneholde, til det intracellulære rommet, nukleinsyrer med evne til å modifisere genekspressjon, spesifikt økende eller reduserende av nivået av protein uttrykt innenfor målcellene. Foreliggende oppfinnelse kan anvendes innen antisens nukleinsyreteknologi i mennesker.

20

Monoklonale antistoffer rettet mot en celleoverflatekomponent blir modifisert med en biotinbindende del og nukleinsyresekvenser som binder genomisk DNA eller mRNA sekvenser slik at genekspressjonen blir endret og koblet gjennom avidin:biotin interaksjonen ved anvendelse av biotinylerede derivater av nukleinsyresekvensene.

Gjennom internalisering av antistoff:antigen kompleksene blir aktive

25

nukleinsyresekvenser samintegret og øker det intracellulære innholdet av disse sekvensene. Anvendelse av foreliggende oppfinnelse: (1) øker det intracellulære innholdet av genekspressjonsmodulerende nukleinsyresekvenser ved mekanismer som er forskjellige fra de som er relatert til virale vektorer eller gjennom enkel eller hjulpet diffusjon gjennom plasmamembran; (2) muliggjør forbigåelse av restriksjonene til små

30

molekylære størrelser, dvs. aktive nukleinsyresekvenser (-20-mer) ved eliminering av behovet for enkel diffusjon gjennom plasmamembranen som mekanismen for innføring av disse sekvensene inn i cellen; og (3) leverer sekvenser av interesse til celler spesifikt eller selektivt gjennom en antistoff:antigen interaksjon i stedet for gjennom global levering eller viral infeksjon for å øke det cellulære innholdet av aktive

35

nukleinsyresekvenser.

I en utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse syntetiseres antisens DNA mot et onkogent protein som dekker nukleotidene (10) oppstrøms og nedstrøms for mRNA translasjonsstartkodonet. Man syntetiserer deretter DNA komplementær med de første 5 nukleotidene til antisens DNA syntetisert ovenfor. Man innkorporerer deretter inn i den sekvensen en biotin-nukleotid del. De to standardene blir hybridisert. Deretter leveres via tumormålsøking MAb avidin/streptavidin til tumoren.

Foreliggende oppfinnelse omfatter et preformet immunkonjugat koblet gjennom avidin-biotin interaksjonen, kjennetegnet ved at det omfatter en innesluttbar cellebindende komponent som har et biotinbindende element konjugert til en biotinyllert del, i det nevnte biotinyllerte del blir valgt fra gruppen bestående av cytotoxiske proteiner og nukleinsyrer, i det nevnte protein blir valgt fra gruppen bestående av gelonin, ricin, saporin, abrin, difteritoksin, pseudomonas eksotoksin, rayalase, superoksid, dismutase, protein tyrosinfosfatase, proteinfosfatase, (PP-1 eller PP-2), proteinkinase A og proteinkinase C, hvor nevnte nukleinsyre velges fra gruppen bestående av tripleks-dannende oligonukleotider og antisense oligonukleotider.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også en fremgangsmåte for innføring av genetisk materiale inn i en spesifikk celle, kjennetegnet ved å *in vitro* administrere preformet immunkonjugat til en celle, hvor nevnte immunkonjugat internaliseres inn i nevnte celle, og idet nevnte immunkonjugat omfatter en cellebindende komponent som har et biotin-bindende element, nevnte komponent konjugert til en biotinyllert del, og nevnte del omfatter nevnte genetiske materiale.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for levering av en cytotoxiske del til en celle, kjennetegnet ved å *in vitro* administrere et preformet immunkonjugat koblet gjennom avidin-biotin interaksjon til en celle, idet nevnte preformede immunkonjugat omfatter en internaliserbar cellebindende komponent som har et biotin-bindende element konjugert til en biotinyllert del, idet nevnte biotinyllerte del blir valgt fra gruppen bestående av cytotoxiske proteiner, idet nevnte protein blir valgt fra gruppen bestående av gelonin, ricin, saporin, abrin, difteri toksin, pseudomonas eksotoksin, rayalase, superoksid, dismutase, proteintyrosinfosfatase, proteinfosfatase (PP-1 eller PP-2), proteinkinase A og proteinkinase C.

EKSEMPEL 1

Modifikasjon av antistoff A108

A108 gjenkjenner den humane reseptoren for epidermal vekstfaktor. 10 mg A108 i 2,2 ml fosfat-buffret saltvann ble satt til et 12 x 75 mm glassrør. En alikvot av 9,35 µl antistoff og et 2,5 ganger molart overskudd av SPDP (N-succinimidyl 3-(2-pyridyltio)propionat) fra en stokk av 3 mg/ml i dimetylformamid ble sakte tilsatt til røret med vortex behandling. Blandingen ble vortex behandlet hvert 5. minutt i løpet av en 30 minutter lang inkubasjon ved romtemperatur.

10

Ureagert SPDP i overskudd ble fjernet fra prøven ved gelfiltreringskromatografi på en kolonne (1,5 x 37 cm) av Sephadex G-25 pre-ekvilibrert i 100 mM natriumfosfatbuffer (pH 7,0) inneholdende 0,5 mM EDTA. En ml fraksjoner ble samlet på en Gilson fraksjonssamler i løpet av bufferelueringen. Fraksjonene ble analysert for proteininnhold i en 96-brønn mikrotiterskål (Falcon) ved anvendelse av Bradford farvebindingsanalyse. Hver brønn inneholdt 120 µl PBS, 40 µl farvekonsentrat og 40 µl prøve. Absorbansen ble avlest på en BioTek Microplate Autoreader ved 540 nm. Fraksjonene 30-38 ble slått sammen og oppbevart med 4°C.

Figur 1 viser tilsetning av SPDP til anti-EGFr antistoff (A108) gjennom kovalent kobling. A108 ble modifisert gjennom lysin og N-terminal aminosyre modifikasjon ved anvendelse av SPDP. Ureagert materiale ble fjernet fra høymolekylvekt A108 ved gelfiltrering. Elueringsprofilen til SPDP-modifisert A108 er vist i figur 1. Figur 1 demonstrerer at modifisert A108 ble isolert etter SPDP konjugasjon.

25

EKSEMPEL 2

Modifikasjon av avidin - eggehvite

10 mg avidin i 2,5 ml dobbeltdestillert vann (ddH₂O) ble fortynnet for å inneholde 60 mM TEA/HCl (trietanolamin, pH 8,0) og 1 mM EDTA ved tilsetning av 300 µl 0,5 mM TEA/HCl og 28 µl 0,1 mM EDTA stokk oppløsninger. Sluttvolumet var 2,8 ml. 17 µl 2-imino-tiolan (2-IT) TEA/HCl (pH 8,0) ble deretter tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 3 mM. Prøven ble inkubert i 90 minutter ved 4°C under nitrogengassdamp. Overskudd ureagert 2-IT ble fjernet ved gelfiltreringskromatografi ved anvendelse av en G25 Sephadex kolonne (1,5 x 38 cm) (Pharmacia) pre-ekvilibrert med 5 mM bis-tris/acetatbuffer (pH 5,8) inneholdende 50 mM NaCl og 1 mM EDTA. Proteininnholdet

til eluerte fraksjoner ble bestemt ved Bradford farvebindingsanalyse. Absorbansen ble avlest på en BioTek Microplate Autoreader ved 540 nm. Fraksjoner (1 ml hver) 27-38 ble slått sammen. Avidin modifisert med 1-iminotiolan ble isolert ved gelfiltrering som vist i figur 2.

5

Eksempel 3

Konjugasjon av antistoff A108 og avidin

- 10 Modifisert antistoff og modifiserte avidinfraksjoner ble inkubert sammen ved 4°C under en nitrogendampgass i 20 timer (15,5 ml totalvolum). En oppløsning av 0,1 M iodacetamid (0,310 ml) ble tilsatt for å danne en sluttkonsentrasjon på 2 mM for å blokkere eventuelle gjenværende frie sulfhydrylgrupper, og inkubasjonen ble fortsatt i 1 time ved romtemperatur. SPDP-modifisert A108 og 2-iminotiolan-modifisert avidin ble
- 15 inkubert sammen slik at A108 ble kovalentlig bundet til avidin gjennom en sulfhydrylbinding tilført av SPDP: 2-iminotiolan kjemi.

- Immunkonjugatet bestående av A108-avidin (merket som konjugat i figur 3) ble separert fra ureagert avidin ved gelfiltrering. Proteindelen som eluerte inn i fraksjonene 7-9
- 20 representerer umodifisert A108 og A108-avidin som ble isolert og ytterligere rensset.

EKSEMPEL 4

Rensing av konjugat

25

Ikke-konjugert avidin ble fjernet fra reaksjonsblandingen ved gelfiltrering på en Pharmacia FPLC Superdex S-200 kolonne (2,6 x 60 cm) pre-ekvilibrert med 20 mM tris og 150 mM NaCl (pH 7,4). [Figur 3].

- 30 Antistoff-avidinkonjugatet og frie antistofffraksjoner (6-10) ble slått sammen og dialysert (Spectra/Par molecular porous membrane tubing #2 MWCO 12.000-14.000) over natt mot PBS ved 4°C. Fritt antistoff ble fjernet fra blandingen ved anvendelse av concavalin-A (Vector) agarose bundet affinitet. Kolonne (1,5 cm x 7 cm) pre-ekvilibrerte PBS (20 mM Na-K-fosfat, 150 mM NaCl, pH 7,0). Etter prøveapplisering
- 35 ble kolonnen vasket en gang med 40 ml PBS inneholdende 1 M NaCl (pH 7,0) og konjugatet ble eluert med PBS inneholdende 200 mM metyl-D-mannose (pH 7,0)

(fraksjonene 34-38) (2 ml hver). Proteininnholdet til de eluerte fraksjonene ble målt på et Varian spektrofotometer ved 280 nm.

Gjennom binding av karbohyrdrtdelen på avidin ble A108-avidin separert fra A108 ved dets retensjon på en immobilisert bærer av plantelecitin koncanavalin A (Con A) som binder alfa-metylmannosid (som er tilstede på avidin). Fritt antistoff har ikke alfa-metylmannosid og ble vasket gjennom Con A kolonnen (vist som fri Ab på figur 4). A108-avidin (merket som konjugat) ble avgitt fra Con A-Sepharose kolonnen ved anvendelse av eluering med alfa-metylmannosid i oppløsning. Konjugatet ble isolert ifølge denne prosedyren og var fri for umodifisert A108.

Renheten til A108-avidin konjugatet ble registrert ved natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) som separerer proteinene basert på deres molekylære størrelse. En 7,5% akrylamid SDS-PAGE minigel ble kjørt for å undersøke rensningstrinnene til konjugasjonen. Som vist i figur 5 ble proteiner som representerer A108, avidin eller konjugater av A108-avidin oppløst og visualisert når proteinene ble utsatt for farving med coomasie blå farvestoff i polyakrylamidgelen og avfarvet for å eliminere bakgrunnen. Prøver applisert i kolonne 7 (eluert fra Con A kolonnen) representerer rensset immunokonjugat (A108-avidin) som ble anvendt i påfølgende studier.

Evnen som A108-avidin har til å binde biotin og gå inn i eukaryote celler kan bli demonstrert ved anvendelse av et biotinyler protein som har toksisk aktivitet bare når de er innesluttet i celler (for eksempel planteprotein, gelonin). Rensset gelonin protein ble kjemisk modifisert med biotin (ved kovalentlig binding gjennom lysinresidene på gelonin med NHS-biotin) og rensset fra ubundet biotin ved gelfiltrering.

EKSEMPEL 5

Biotinylering av gelonin

Biotin som ble anvendt var i form av N-hydroksy succinimidester langkjede (NHS-LC) biotin (Pierce Chemical Co.). Et fem-ganger molart overskudd av biotin til gelonin (=0,1 mg biotin til 1 mg gelonin) ble anvendt. Gelonin oppløsningen utgjorde 2 mg gelonin i 2 ml av en 50 mM bikarbonatbuffer (pH 8,5). 5 mg biotin ble løst opp i 500 μ l tørr dimetylformamid (DMF), og øyeblikkelig ble 20 μ l (0,2 mg) av denne biotinoppløsningen tilsatt til gelonin i et rent, tørt 13 x 100 mm glassrør. Prøven ble

vortex behandlet og inkubert i 2 timer på is. Etter 2 timer ble fri biotin separert ved gelfiltreringskromatografi på en 1,5 cm x 37 cm G-25 kolonne ekvilibrert med PBS (pH 7,0). En ml fraksjoner ble samlet i en Gilson fraksjonssamler og analysert for proteininnhold med Bradford farvebindingsanalysen. Fraksjonene 21-27 ble slått
5 sammen.

For å demonstrere at biotin ble innkorporert inn i gelonin ble biotinykert gelonin immobilisert på en polystyrenbærer med et antistoff rettet mot geloninproteinet.

Indikerte mengder av umodifisert gelonin eller biotinykert gelonin ble inkubert i brønner
10 inneholdende anti-gelonin antistoff. Retensjon av biotin med gelonin ble detektert ved skylning av brønnene og tilsetning av streptavidin som ble kjemisk konjugert til enzymet pepperrot peroksidase, som når inkubert med et farveløst peroksidasesubstrat (ABTS) blir grønt og er målbart ved spektrofotometer ved en bølgelengde på 405 nanometer. Mengden av absorbanse ved 405 nm er direkte proporsjonal med mengden av biotin
15 innkorporert i gelonin molekylet. Som vist i figur 6 beholdt gelonin utsatt for biotinylering biotin basert på økning i grønn farge, ved økende mengder av biotinykert gelonin plassert inn i analysen. Resultatene demonstrerer at biotin kan bli innkorporert inn i geloninmolekylet og gjenkjent av proteiner med en affinitet for biotin.

20

Eksempel 6

Aktiviteten til biotinykert gelonin

En stamoppløsning av 0,583 mg/ml murin monoklonalt anti-gelonin antistoff (10 Ci)
25 (10 µl) ble fortynnet i 12 ml beleggbuffer (50 mm NHCO_3) (natriumbikarbonat, pH: 9,6) (1 µg/ml oppløsning). Ved anvendelse av en fler-kanal pipette ble hver brønn av en Falcon 96-brønn mikrotiterskål belagt med 50 µl (50 ng/brønn). Prøvene ble tildekket og frosset over natt. Omtrent 12 timer senere ble prøvene skylt 3 ganger med PBS-0,05% Tween-20 og blokkert i 1,5 timer ved romtemperatur med 5% bovin
30 serumalbumin i PBS. Prøven ble deretter vasket tre ganger med PBS og 0,05% Tween-20.

En oppløsning av gelonin i PBS ble dannet i en konsentrasjon på 2 mg/ml. Deretter ble en oppløsning av biotinykert gelonin i PBS dannet, også ved konsentrasjon på 2 mg/ml.
35 100 µl 1 mg/ml oppløsning av BSA i PBS ble tilsatt til skålen og etterlot den første raden tom. Til første halvpart av denne raden ble 200 µl/brønn av stamgelonin oppløsningen tilsatt, og til den andre halvdel av raden ble 200 µl/brønn av biotinykert

stamopløsning tilsatt. Ved anvendelse av fler-kanal pipetten ble 100 µl tappet fra denne første raden og ble blandet med 100 µl BSA-PBS i den andre raden. Denne prosedyren ble gjentatt fra venstre til høyre over hele platen og resulterte i seriefortynninger av proteinet. Skålen ble dekket og inkubert i 1,5 timer ved romtemperatur. Brønnene i skålen ble vasket tre ganger med PBS-0,05% Tween-20. 100 µl avidin peroksidase (Boehringer-Mannheim) fortynnet 1:6000 i 1 mg/ml BSA-PBS, ble deretter tilsatt. Deretter ble skålen inkubert i 1,5 timer ved romtemperatur etterfulgt av vasking tre ganger med PBS-0,05% Tween-20. Til slutt ble 100 µl ABTS (2, 2'-amino-bis (3-etyl) benz tiazolin - 6-sulfonsyre)) hydrogenperoksid tilsatt. Skålen ble avlest på BioTek Laboratories Microplate Autoreader ved 405 nm. [Figur 6B].

Eksempel 7

Konjugasjon av biotinykert gelonin med A108-avidin

15

Et 5 molart overskudd av biotinykert gelonin til A108-avidin ble anvendt. En ml (250 µg) av A108-avidin ble kombinert med 175 µl (175 µg) biotinykert gelonin. Prøven ble vortex behandlet og inkubert sammen i 1 time ved romtemperatur.

20

For å fjerne ukonjugert gelonin fra blandingen ble blandingen applisert på en Pharmacia FPLC G-75 (1,6 x 60 cm) gelfiltreringskolonne pre-ekvilibrert med 20 mm tris inneholdende 0,5 M NaCl (pH 7,4). En ml fraksjoner ble samlet og avlest på et Varian spektrofotometer ved 280 nm. Topper som representerer A108-avidin biotinykert gelonin merket konjugat er vist i figur 7 og var fri for ubundet gelonin eller fri avidin subenheter.

25

Konjugasjon av A108-avidin med biotinykert gelonin ble undersøkt ved anvendelse av den samme ELISA analysen som beskrevet ovenfor for biotinykert gelonin. Som vist i figur 8 kunne biotin innholdet bli detektert ved dannelse av grønn farve når enten biotinykert gelonin eller biotinykert gelonin:avidin-A108 ble testet i analysen. Konjugatet inneholdt følgelig biotinykert-gelonin.

30

Eksempel 8

Cytotoksitet til A108-avidin/biotinylert gelonin på a431 celler

A431 cellene ble fortynnet 3×10^4 celle/ml i vekstmedium (MEM-minimalt essensielt medium) med ikke-essensiell aminosyre, 100 mM glutamin og 50 μ l gentamicin Tri-Bio Laboratories) med 5% føtalt bovint serum og 5% bovint kalveserum. 100 μ l av denne oppløsningen ble tilsatt til hver brønn av en 96-brønn mikrotiterskål (Falcon) og inkubert over natt ved 37°C i en 5% CO₂ inkubator. Neste dag ble en 2 μ g/ml oppløsning av A108-geloninkonjugat (direkte konjugat av A108-gelonin ved anvendelse av SPDP modifisert A108 og 2-IT modifisert gelonin kovalentlig bundet til hverandre gjennom samme kjemi som anvendt for å danne A108-avidin (i vekstmedium dannet, filtersterilisert ved anvendelse av et 0,22 μ m Acrodisc (Gilman) sprøytefilter og fortynnet i serie i ti 15 ml sentrifugerør (Corning). A108-avidin:biotinylert gelonin ble likeledes dannet og 100 μ l av hver fortynning ble tilsatt i triplikat til skålen. I det allerede var 100 μ l medium tilstede i skålen var sluttkonsentrasjonen 1 μ g/ml for hvert konjugat. For en kontroll ble konjugatene dannet på samme måte, men hvert med en tilsetning av 100-ganger molart overskudd (100 μ g/ml) antistoff A108 til hver. Cellene ble inkubert tre dager og deretter farvet med 0,5% krystallfiolett i 20% metanol og skylt i destillert vann og 150 μ l Sorensens buffer ble tilsatt til ekstraktfarven fra cellene. Skålen ble deretter avleset i Microplate Autoreader ved 540 nm.

Figur 9 viser evnen som konjugatet har til å overføre gelonin til innsiden av cellen hvor den kan indusere cytotoksiteten. Konjugatet ble inkubert med celler som uttrykker EGF reseptoren på deres celleoverflate (A431). Internalisering av konjugatet muliggjør at intracellulære effekter av gelonin, dvs. cytotoksitet oppstår. Som vist i figur 9, når konjugatet ble inkubert med disse cellene drepte nanomolare (nM) konsentrasjoner (1×10^{-6} molar) A431 celler som demonstrerer at A108-avidin kan muliggjøre innførsel av biotinylert-gelonin i A431 cellen (-åpne sirkler). Når cellene ble koinkubert med fritt A108 antistoff i et stort overskudd (sammenlignet med immunokonjugat konsentrasjonen) ble evnen som A108-avidin:biotinylert-gelonin har til å gå inn i A431 cellen øket. Fri A108 binder alle tilgjengelige EGF reseptorer på celleoverflaten og inhiberer dermed immunokonjugatet fra binding av EGF reseptor og innføring av gelonin til innsiden av A431 cellen. Som vist i figur 9, når A108 var tilstede i et 100-ganger overskudd sammenlignet med konsentrasjonen til immunokonjugatet (-lukkede sirkler) var det mulig for A431 cellene å overleve og dette demonstrerer at den eneste måten immunokonjugatet kunne gå inn i og forgifte cellene var gjennom dets evne til å binde og bli innesluttet i EGF reseptoren. Det direkte kovalente konjugatet til A108-

gelonin var også aktivt i dreping av A431 ved introduksjon av gelonin inn i det intracellulære rommet til A431cellene (åpne triangler). Inkludert 100-ganger molart overskudd av fritt A108 beskyttet dette også cellene fra forgiftning av gelonin og dette demonstrerer at A108-gelonin ble ført inn i det intracellulære rommet til cellen på grunn av dets evne til å reagere og bli innesluttet i EGF reseptoren. Anvendelse av avidin:biotin interaksjonen vil muliggjøre introduksjon av et molekyl inn i det intracellulære rommet til cellen om ledet og båret inn i det rommet med et antistoff som har evne til å gjenkjenne et antigen på cellen som blir innesluttet etter forening med antigenet (i dette tilfellet EGF reseptoren).

EKSEMPEL 9

Effekt av trippel heliks dannende nukleinsyresekvenser på ekspresjon av EGF reseptorproteinet.

Evnen som trippel-heliksdannende oligonukleotid eller nukleinsyresekvenser har til å undertrykke ekspresjonen av EGF reseptorproteinet i intakt celle ble demonstrert. A431 cellene ble inkubert i 72 timer med 40 μ m EGF reseptorgen nukleinsyresekvens (nr 5 EGFr) med evne til binding av EGF reseptor genpromoterregionen eller en ikke-sens kontrollsekvens (som inneholder de samme nukleinsyrene, men i en tilfeldig sekvens).

Nr 5 EGFr og kontrollnukleinsyresekvenser ble dannet i medium ved oppvarming til 95° i 2-5 minutter og filtersterilisert. Vekstmedium ble fjernet fra cellekulturskålene inneholdende 2 x 10⁵ A431 celler. Nr 5EGFr fortynnet i 2 ml medium til en sluttkonsentrasjon på 40 μ m ble tilsatt til en skål. Kontrollnukleinsyresekvenser ble fortynnet i 2 ml medium til en sluttkonsentrasjon på 40 μ m og denne oppløsningen ble tilsatt til den andre skålen av A431 cellene. Bare 2 ml medium ble tilsatt til den tredje skålen. Inkubasjonen var i 72 timer. Cellene ble høstet ved vasking av hver skål tre ganger med iskald PBS. For å oppløse cellen og ekstraktproteinet ble 1 ml RIPA buffer tilsatt og cellene ble frigjort med en celleskrape og overført til et sentrifugerør. Hvert rør ble sonikert med en Kontes celleødelegger og sentrifugert i en Sorvall Ultra sentrifuge i 1 time ved 4°C ved 100.000 x g. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet og proteininnholdet bestemt ved BSA proteinanalyse (Pierce).

EGF reseptoren i disse ekstraktene ble immunpresipitert med A108 antistoff og uopløselig antistoff-bindende reagens pansorbin. Supernatanten inneholdende 200 μ g protein ble inkubert i 2 timer ved 4°C med 2,5 μ g antistoff A108. 50 μ l Pansorbin ble

tilsatt til hver prøve, vortex behandlet og inkubert i 30 minutter ved 4°C. EGF reseptoren bundet til A108-pansorbin ble vasket for å fjerne andre proteiner. Etter sentrifugering i 1 minutt (4°C) på en Sorvall mikrosentrifuge ved 12.000 rpm ble supernatanten dekantert. Pelleten ble vasket ved resuspending tre ganger med PBS
5 inneholdende 0,1% triton etterfulgt av sentrifugering og repelletering ved sentrifugering etter hver resuspsjon. Etter endelig vasking og sentrifugering ble supernatanten helt av.

EGF reseptoren tilstede i hvert immunpresipitat ble detektert ved inkubering av denne
10 med radioaktiv (³²P) merket-ATP. Pelleten ble resuspendert i 25 µl 0,4 mM Na vanadate i 20 mM HEPES buffer (pH 7,4). Deretter ble 25 µl 20 mM Hepes buffer inneholdende ³²P-merket ATP (10 µCi) og 12 mM MnCl₂ tilsatt. Prøvene ble inkubert i 5 minutter ved romtemperatur. På grunn av at EGF reseptoren inneholder en enzymaktivitet med evne til å overføre ³²P fra ATP til EGF reseptoren blir mengden av
15 ³²P overført til EGF reseptoren et mål på mengden av EGF reseptor i immunopresipitatet fra hvert av lysatene. Mengden av radioaktivitet på EGF reseptoren kan bli sammenlignet ved separering av EGF reseptoren fra fri ³²P ATP ved SDS-PAGE og måling av radioaktiv EGF reseptor ved autoradiografi av polyakrylamidgelen ved anvendelse av kommersiell røntgenfilm.

20 15 µl 5x-Laemli prøvebuffer ble tilsatt til prøven, prøven ble oppvarmet til 95°C i 5 minutter og deretter amplisert på en 7,5% polyakrylamidgel. Proteinene ble elektroforet over natt ved 14 mA. Gelene ble fjernet fra elektroforeseenheten og fiksert i 40% metanol, 10% eddiksyre, 50% ddH₂O i 1 time. Gelen ble tørket på en BioRad 583
25 geltørker i 2 timer ved 80°C.

Som det fremgår av figur 10 reduserte inkubasjonen av cellene med nukleinsyresekvensene direkte mot EGF reseptorgenpromotersekvensen (merket antisens EGFr) nivået av EGF reseptoren i A431 cellene 5-ganger sammenlignet med
30 tilfeldige nukleinsyresekvenser (merket ikke-sens EGFr) eller bare buffer (merket kontroll). Inkubasjon av cellene med høye konsentrasjoner trippel-heliks dannende nukleinsyresekvenser som reagerer med promoterregionen til EGF reseptor gen et undertrykker følgelig ekspresjonen av EGF reseptoren i intakte A431 celler.

Eksempel 10

A108:nukleinsyresekvenser blir introdusert inn i A431 celler gjennom en avidin:biotin binding. For å demonstrere at nukleinsyresekvenser er rettet mot EGF reseptoren blir
5 genpromotersekvensen innkorporert inn i A431 cellene ved anvendelse av A108 antistoff, A108-avidin kjemisk-bundet konjugat blir dannet og rensset. Nukleinsyresekvenser blir syntetisert, men med substitusjon av et biotinyleret-nukleotid med et normalt nukleotid i en posisjon i sekvensen (fortrinnsvis i enden eller
10 begynnelsen av sekvensen). Disse sekvensene blir inkubert med A108-avidin for å muliggjøre at komplekser inneholdende A108-avidin:biotin-nukleinsyresekvenser blir dannet. Disse hybridmolekylene blir rensset for å fjerne frie nukleinsyresekvenser og mengden av nukleinsyre assosiert med A108-avidin blir bestemt og inkubert med A431 celler. Dersom genekspressjons-undertrykkende nukleinsyresekvenser blir innkorporert i korrekte intracellulære regioner til A431 celler bør dette være biokjemisk målbart.
15 Spesifisiteten til nukleinsyresekvensene for å avbryte EGF reseptorekspressjonen blir bestemt ved testing av immunkonjugatene dannet mellom antisens EGFr, eller ikke-sens EGFr, med A108-avidin og måling av EGF reseptorfosforyleringen som beskrevet ovenfor i eksempel 9. I tillegg blir nukleinsyresekvensenes evne til å komme inn i cellen gjennom dannelse av A108:EGF reseptorkomplekser testet ved å innbefatte et stort
20 molart overskudd fri A108 i inkubasjonsblandingen med A431 cellene. Suppressive effekter av hybridmolekyler bestående av antistoff:nukleinsyresekvenser blir inhibert i nærvær av fri A08 og bekrefter at nukleinsyrene blir innført i cellene ved deres internalisering med antistoffene gjennom innbefatning med et internaliserbart celle-overflate antigen, for eksempel EGF reseptor.

25

Eksempel 11

Store biotinylerete-nukleinsyrer blir anvendt for å bestemme om deres inngang i cellene
30 er formidlet gjennom A108-avidin mekanismen. Konsentrasjonen av nukleinsyresekvensene presentert til cellene gjennom A108-avidin mekanismen som er nødvendig for å endre EGF reseptornivåene vil bli sammenlignet med normale nukleinsyresekvenser som er frie i oppløsning. Evnen som A108-avidin har til å lede aktive nukleinsyresekvenser til spesifikt antigenuttrykkende celler (for eksempel EGF
35 reseptoren) blir undersøkt ved anvendelse av celler som ikke uttrykker dette antigenet. Levering av disse nukleinsyrene til spesifikke celler i dyrene som inneholder cellene som uttrykker dette antigenet blir undersøkt. Suppresjon av EGF reseptoren blir målt.

Både antisens eller ikke-sens nukleinsyresekvenser kompleksbundet med A108-avidin blir anvendt (i tillegg til celler som ikke uttrykker det spesifikke antigenet) som et mål på spesifisiteten til dette leveringssystemet og dets intracellulære biokjemiske spesifisitet.

5

EKSEMPEL 12

Et monoklonalt antistoff mot brystcarcinom uttrykt antigen HER2/Neu (for eksempel, 10 TAb 250) blir kjemisk konjugert til avidin som beskrevet i eksemplene 1-4 for A108 antistoff. Antisens nukleinsyresekvensene overfor antigenet c-myc (5'-AACGTTGAGGGGCAT-3') blir syntetisert med et biotinyllert adeninnukleotid som erstatter adenosin ved terminal 5'-posisjon. Biotinyllerte adeninnukleinsyresekvenser blir inkubert med TAb-250-avidin og antistoff-nukleinsyrekomplekser bestående av TAb- 15 250:antisens c-myc blir renset. Disse kompleksene blir inkubert med brysttumorer som uttrykker HER2/Neu, for eksempel BT-474 celler eller celler negative for dette antigenet, for eksempel BT-20 celler. Suppresjon av c-myc til antisens nukleinsyrene blir målt ved western blotting for c-myc proteinet fra rå cellelysater. C-myc ekspresjonen vil bli endret i HER2/Neu positive celler, men ikke i antigen negative 20 celler. I tillegg blir spesifisiteten oppnådd dersom et stort overskudd (100-ganger) av umodifisert TAb-250 har evne til å inhibere de suppressive effektene av antistoff-nukleinsyrekompleksene på c-myc i den antigen positive cellen. Biotinyllert nukleinsyresekvens blir endret ved å forandre posisjonen til biotinyllert-nukleotid innenfor sekvensen eller ved å øke størrelsen på sekvensen som er komplementær med 25 og som dekker translasjonsstartsetet eller første spleisegrense på c-myc mRNA. Modifikasjoner blir testet for å oppnå den mest spesifikke og sensitive antisens sekvensen som kan leveres til brystcarcinoma celler som uttrykker HER2/Neu antigen som vil undertrykke c-myc ekspresjonen.

30

EKSEMPEL 13

Monoklonalt antistoff A108 blir konjugert kjemisk til avidin som beskrevet i eksemplene 1-4. Antisens oligonukleotider som representerer den komplementære 35 sekvensen til basisk fibroblast vekstfaktor (bFGF) mRNA translasjonsstartsete (5'-GGCTGCCATGGTCCC- 3') blir kjemisk syntetisert med en biotinyllert guanosin i stedet for umodifisert nukleotid i 5'-terminal posisjon. Disse sekvensene blir inkubert

med A108-avidin for å danne antistoff:nukleinsyrekomplekser og blir rensset bort fra ikke kompleksbundet nukleinsyre. Disse kompleksene blir inkubert med humane glioma celler (SNB-19) som uttrykker EGF reseptoren og er kritisk avhengig av cellenes egen syntese av bFGF for å fremme deres egen vekst. Etter inkubasjon med dette konjugatet 5 blir SNB celleveksten målt for å bestemme grad av vekstsuppresjon ved å forhindre ekspresjon av bFGF i disse målcellene. Som angitt ovenfor koinkuberte overskudd A108 med A108:nukleinsyrekompleksene for å vurdere spesifisiteten og bekrefte mekanismen for innførsel av antisens sekvenser gjennom antigen inneslutning.

10

EKSEMPEL 14

Monoklonalt antistoff, BR96, som spesifikt binder Lewis Y antigen på flere humane carcinomer blir kjemisk konjugert til avidin som beskrevet ovenfor. Antisens 15 oligonukleotider som er komplementære med c-Ha-ras 5' flankerende mRNA sekvens blir kjemisk syntetisert 5'-CAGCTGCAACCCAGC-3' med et biotinyllert cytosinnukleotid i stedenfor umodifisert cytosin i 5'-posisjonen. BR96-antisens ras oligonukleotider blir dannet ved inkubasjon med T24 blærecarcinoma celler som uttrykker Lewis Y antigen og som også inneholder c-Ha-ras onkogenet. Etter inkubasjon 20 av immun:nukleinsyrekomplekser med T24 cellene blir produktet av ras onkogenet, p21, registrert ved western blotting. Celleveksten blir også registrert. Nøytralisering av effektene av ras onkogen ved intracellulær levering av antisens molekyler gjennom inneslutning av Lewis Y antigenet blir demonstrert.

25

EKSEMPEL 15

A108-avidin kjemisk konjugat blir syntetisert som beskrevet ovenfor og anvendt for å inneslutte syntetiske dobbelt-trådede RNA molekyler som er cytotoxiske for spesifikke 30 carcinoma celler. En polymer av inosin (PI) blir kjemisk syntetisert (40mer) og hybridisert til en polycytosin (PC) 39mer med et terminal cytosinderivatisert med biotin. Dette dobbelt-trådede RNA molekylet blir inkubert med A108-avidin og A108-avidin:biotin-PC:PI komplekser blir rensset og tilsatt vekstmediet til ME-180 cervical carcinoma celler som uttrykker EGF reseptoren og er cytotoxiske sensitive for PI:PC 35 (dsRNA). Intracellulær levering av dsRNA gjennom inneslutning av EGF reseptoren blir målt ved registrering av cellelevedyktigheten etter inkubasjon med denne

konstruksjonen. Cytotoksisitet induisert ved inkubasjon med dette konjugatet vil vise at nukleinsyrene kan bli levert til et spesifikt sett av celler med en ikke-viral vektor.

5 Alle patenter og publikasjoner nevnt i beskrivelsen indikerer nivåene til fagfolk som oppfinnelsen er rettet mot. Alle patenter og publikasjoner er innkorporert som referanse som om hver publikasjon var spesifikt og individuelt indikert å være innkorporert som referanse.

10 Fagfolk vet at foreliggende oppfinnelse er godt tilpasset for å utføre hensikten og oppnå resultatene og fordelene som er nevnt. Foreliggende eksempler sammen med fremgangsmåter, prosedyrer, behandlinger, molekyler og spesifikke forbindelser beskrevet heri representerer foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen.

P a t e n t k r a v

1.

Preformet immunkonjugat koblet gjennom avidin-biotin interaksjonen,

5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en innesluttbar
cellebindende komponent som har et biotinbindende element konjugert til en biotinyllert
del, i det nevnte biotinyllerte del blir valgt fra gruppen bestående av cytotoksiske
proteiner og nukleinsyrer, i det nevnte protein blir valgt fra gruppen bestående av
gelonin, ricin, saporin, abrin, difteritoksin, pseudomonas eksotoksin, rayalase,
10 superoksid, dismutase, protein tyrosinfosfatase, proteinfosfatase, (PP-1 eller PP-2),
proteinkinase A og proteinkinase C, hvor nevnte nukleinsyre velges fra gruppen
bestående av tripleks-dannende oligonukleotider og antisense oligonukleotider.

2.

15 Immunkonjugat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nevnte biotin-bindende element blir valgt fra gruppen bestående av avidin, streptavidin
eller analoger av avidin eller streptavidin.

3.

20 Immunkonjugat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nevnte cellebindende element er et monoklonalt antistoff.

4.

25 Immunkonjugat ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nevnte monoklonale antistoff spesifikt binder et antigen valgt fra gruppen bestående av
epidermal vekstfaktorreseptor, c-erbB2 antigen, Lewis Y antigen, transferrinreseptor,
MDR1, MDR3, insulinreseptor, CD45, CD33, GP240, GD2, GD3, fibroblast
vekstfaktorreseptor, blodplateavledet vekstfaktorreseptor.

30 5.

Immunkonjugat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nevnte cellebindende komponent er en ligand som spesifikt binder en celleoverflatereseptor
valgt fra gruppen bestående av transformerende vekstfaktor-alfa, heregulin, fibroblast
vekstfaktor, blodplateavledet vekstfaktorreseptor.

35

6.

Fremgangsmåte for innføring av genetisk materiale inn i en spesifikk celle,

k a r a k t e r i s e r t v e d å *in vitro* administrere preformet immunkonjugat til en celle, hvor nevnte immunkonjugat internaliseres inn i nevnte celle, og idet nevnte immunkonjugat omfatter en cellebindende komponent som har et biotin-bindende element, nevnte komponent konjugert til en biotinyleret del, og nevnte del omfatter nevnte genetiske materiale.

5
7.

Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte biotin-bindende element velges fra gruppen bestående av avidin, streptavidin eller analoger av avidin eller streptavidin.

10
8.

Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte cellebindende element er et monoklonalt antistoff.

15
9.

Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte monoklonale antistoff spesifikt binder et antigen valgt fra gruppen bestående av epidermal vekstfaktorreseptor, c-erbB2 antigen, Lewis Y antigen, transferrin reseptor, MDR1, MDR3, insulinreseptor, CD45, CD33, BP240, GD2, GD3, fibroblastvekstfaktorreseptor, blodplateavledet vekstfaktorreseptor.

20
10.

Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte cellebindende element er en ligand som spesifikt binder en celleoverflatereseptor valgt fra gruppen bestående av transformerende vekstfaktor-alfa, heregulin, fibroblast vekstfaktor, blodplateavledet vekstfaktorreseptor.

25
11.

Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte biotinyleret del er en nukleinsyre som velges fra gruppen bestående av tripleksdannende oligonukleotider og antisensnukleotider.

30
12.

Fremgangsmåte for levering av en cytotoxisk del til en celle, k a r a k t e r i s e r t v e d å *in vitro* administrere et preformet immunkonjugat koblet gjennom avidin-biotin interaksjon til en celle, idet nevnte preformede immun-

konjugat omfatter en internaliserbar cellebindende komponent som har et biotin-bindende element konjugert til en biotinyllert del, idet nevnte biotinyllerte del blir valgt fra gruppen bestående av cytotoxiske proteiner, idet nevnte protein blir valgt fra gruppen bestående av gelonin, ricin, saporin, abrin, difteri toksin, pseudomonas eksotoksin, 5 rayalase, superoksiddismutase, proteintyrosinfosfatase, proteinfosfatase (PP-1 eller PP-2), proteinkinase A og proteinkinase C.

13.

Fremgangsmåte ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d a t 10 nevnte biotin-bindende element velges fra gruppen bestående av avidin, streptavidin eller analoger av avidin eller streptavidin.

14.

Fremgangsmåte ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d a t 15 nevnte cellebindende element er et monoklonalt antistoff.

15.

Fremgangsmåte ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d a t 20 nevnte monoklonale antistoff spesifikt binder et antigen valgt fra gruppen bestående av epidermal vekstfaktorreseptor, c-erbB2 antigen, Lewis Y antigen, transferrinreseptor, MDR1, MDR3, insulinreseptor, CD45, CD33, GP240, GD2, GD3, fibroblastvekstfaktorreseptor, blodplateavledet vekstfaktorreseptor.

16.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte cellebindende element er en ligand som spesifikt binder en celleoverflatereseptor valgt fra gruppen bestående av transformerende vekstfaktor-alfa, heregulin, fibroblastvekstfaktor, blodplate-avledet vekstfaktorreseptor.

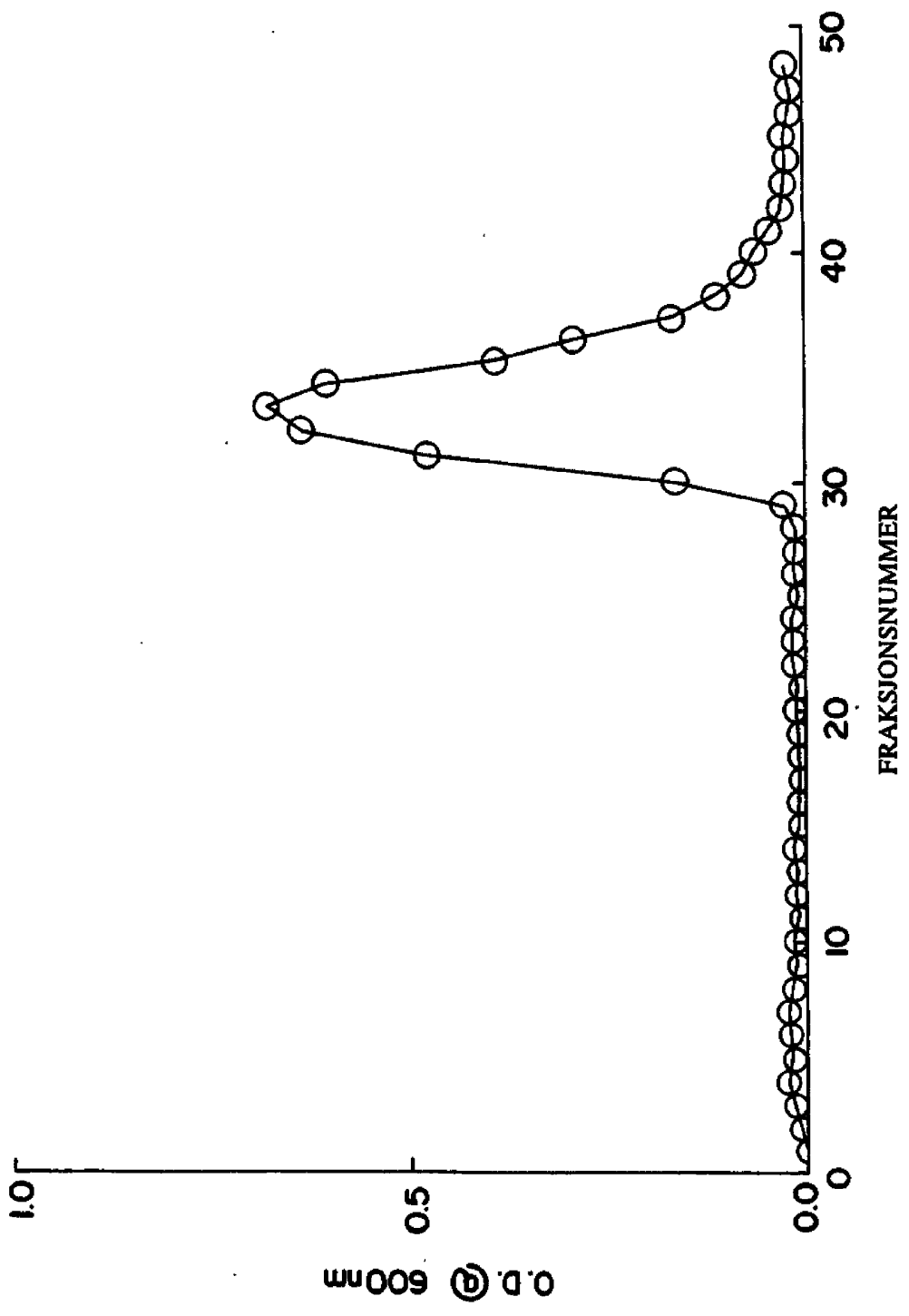


FIG.1

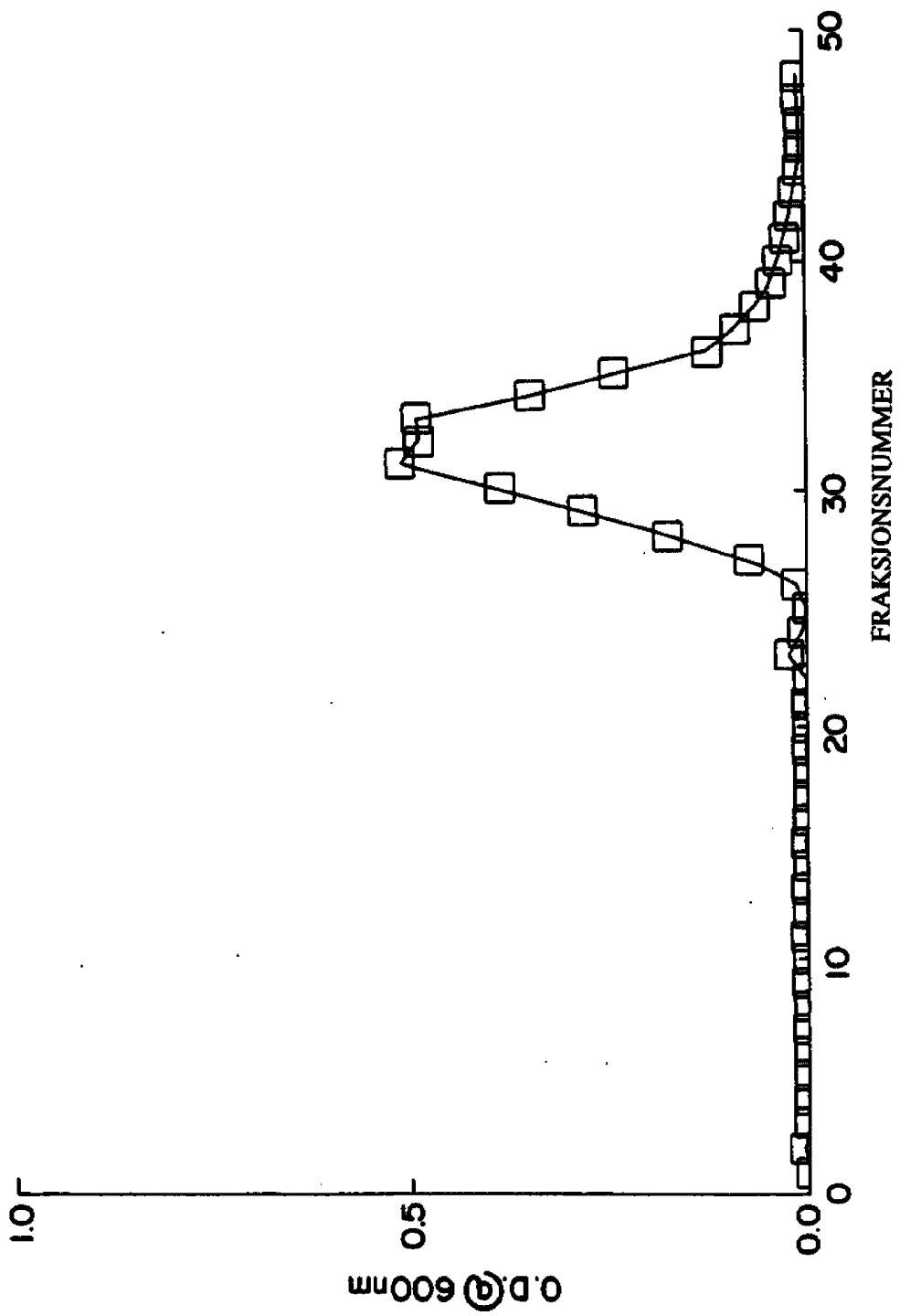


FIG. 2

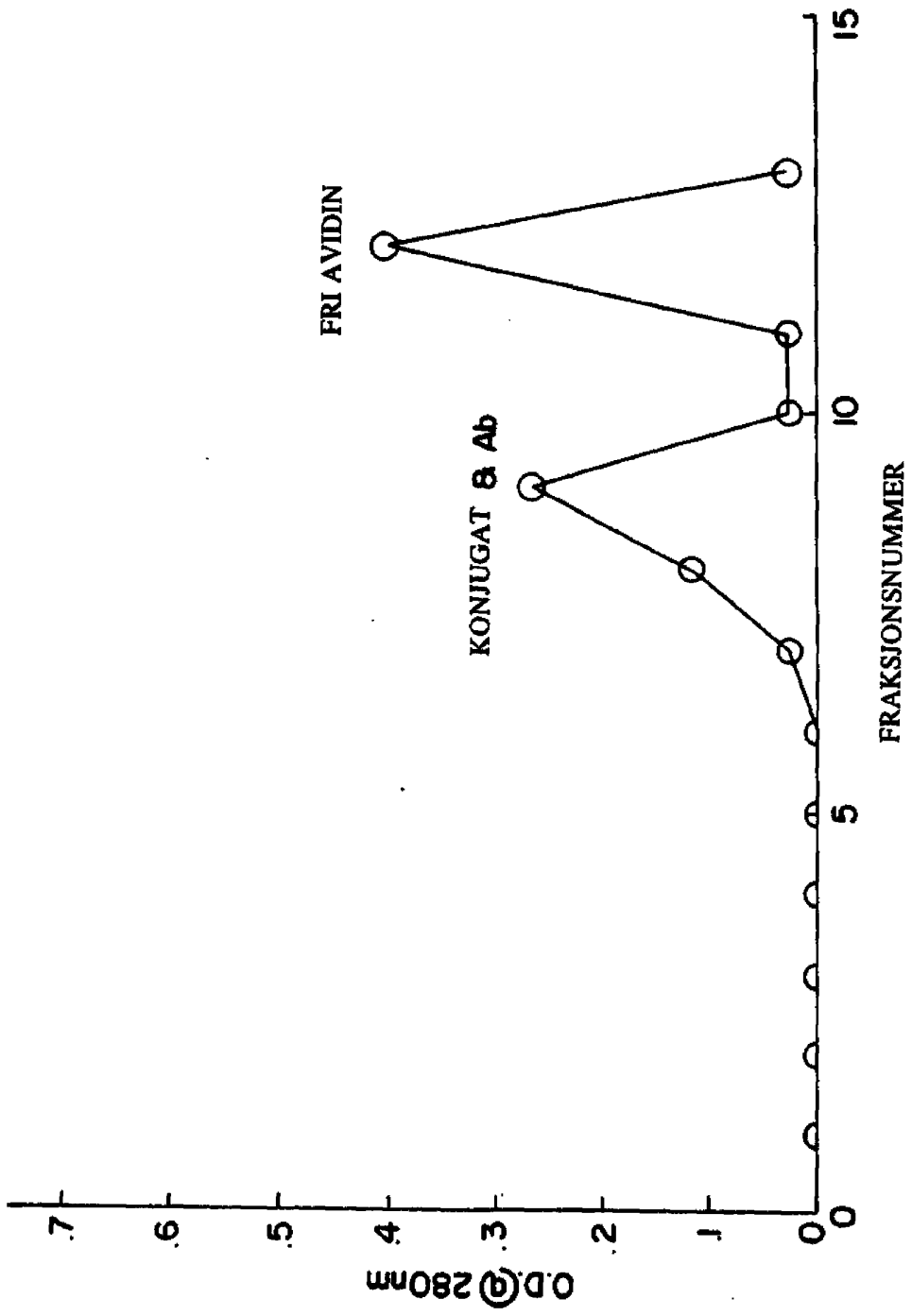


FIG. 3

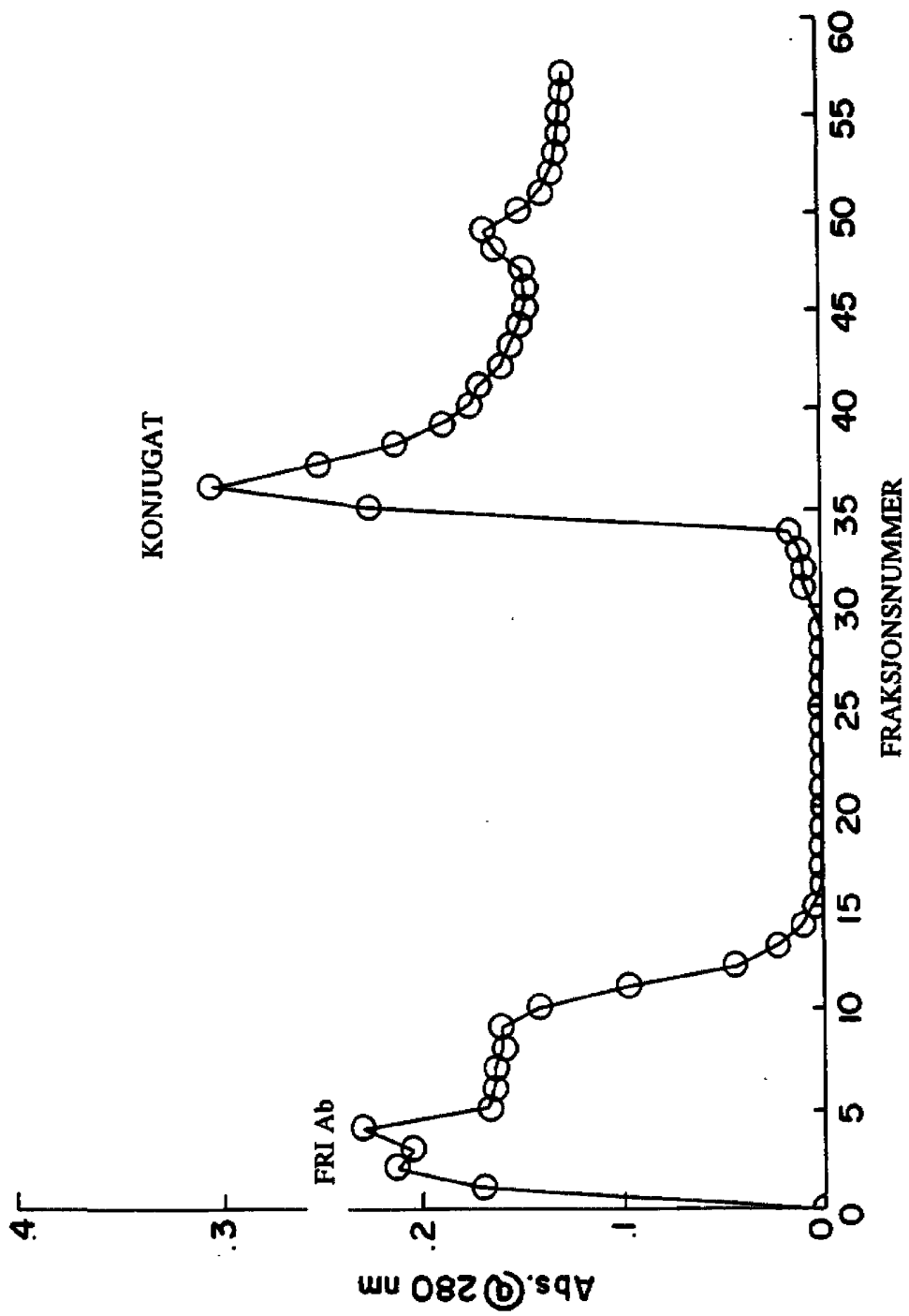


FIG. 4



KOLONNER

1 2 3 4 5 6 7 8

FIG.5

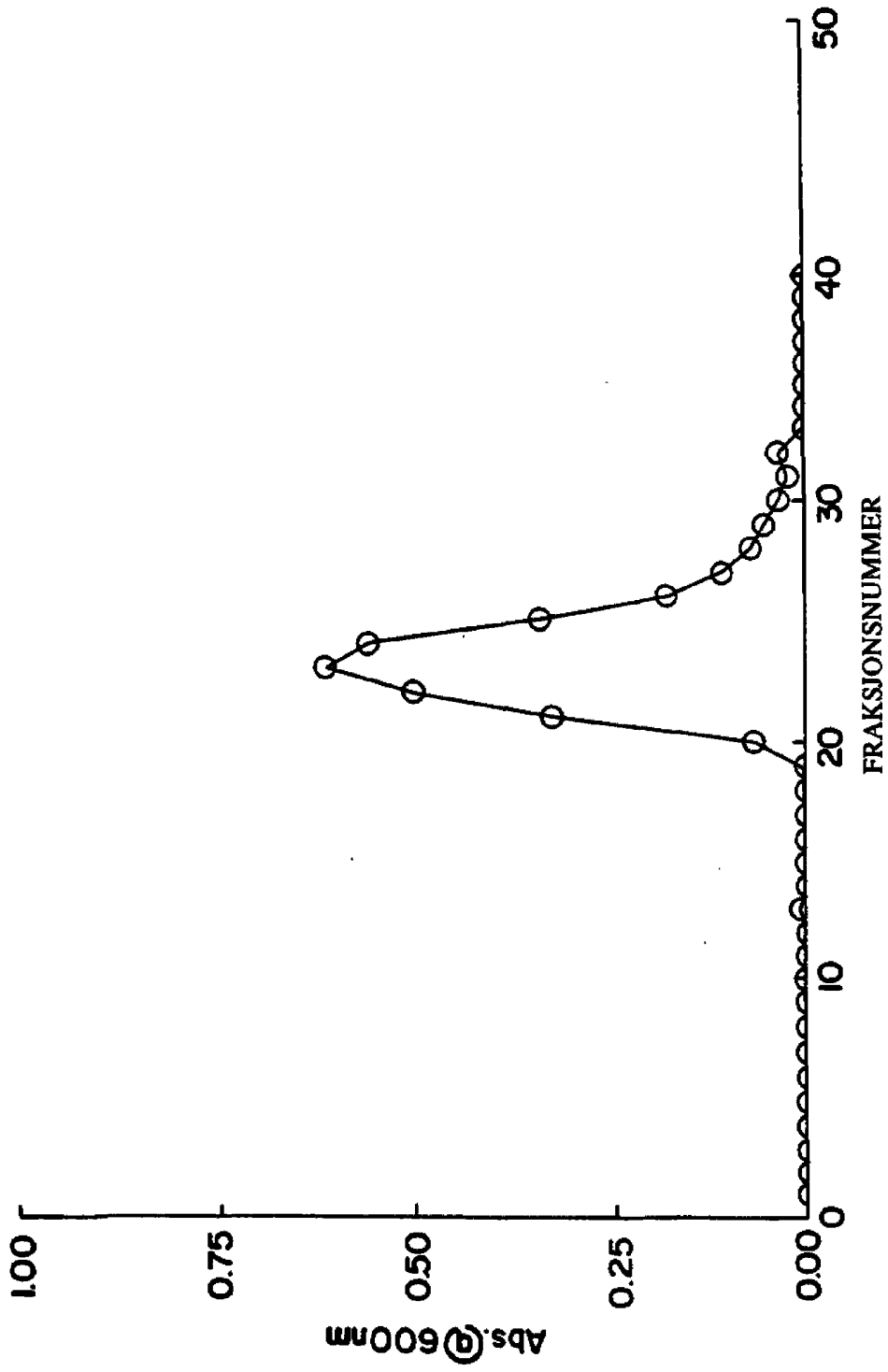


FIG. 6A

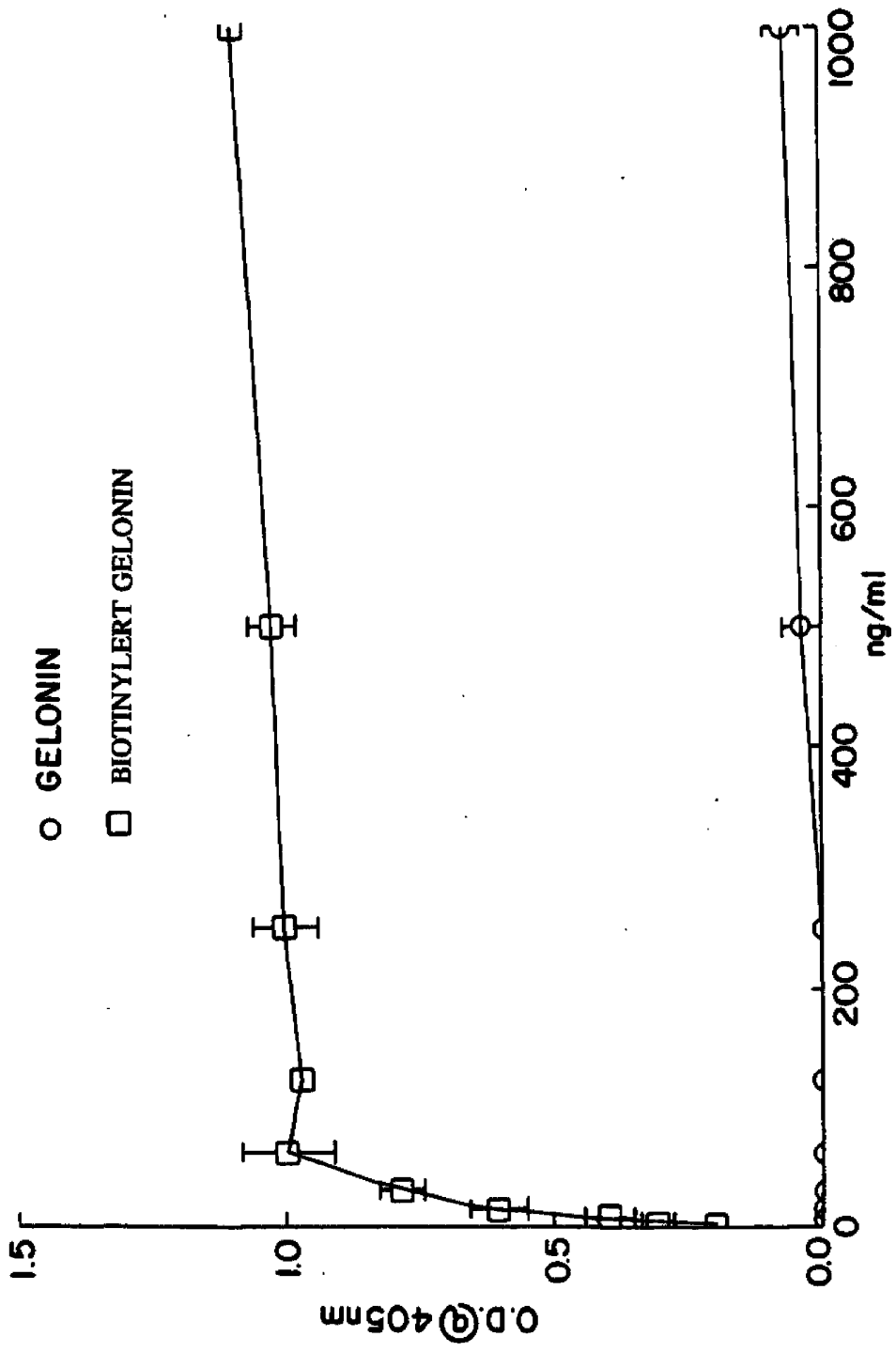
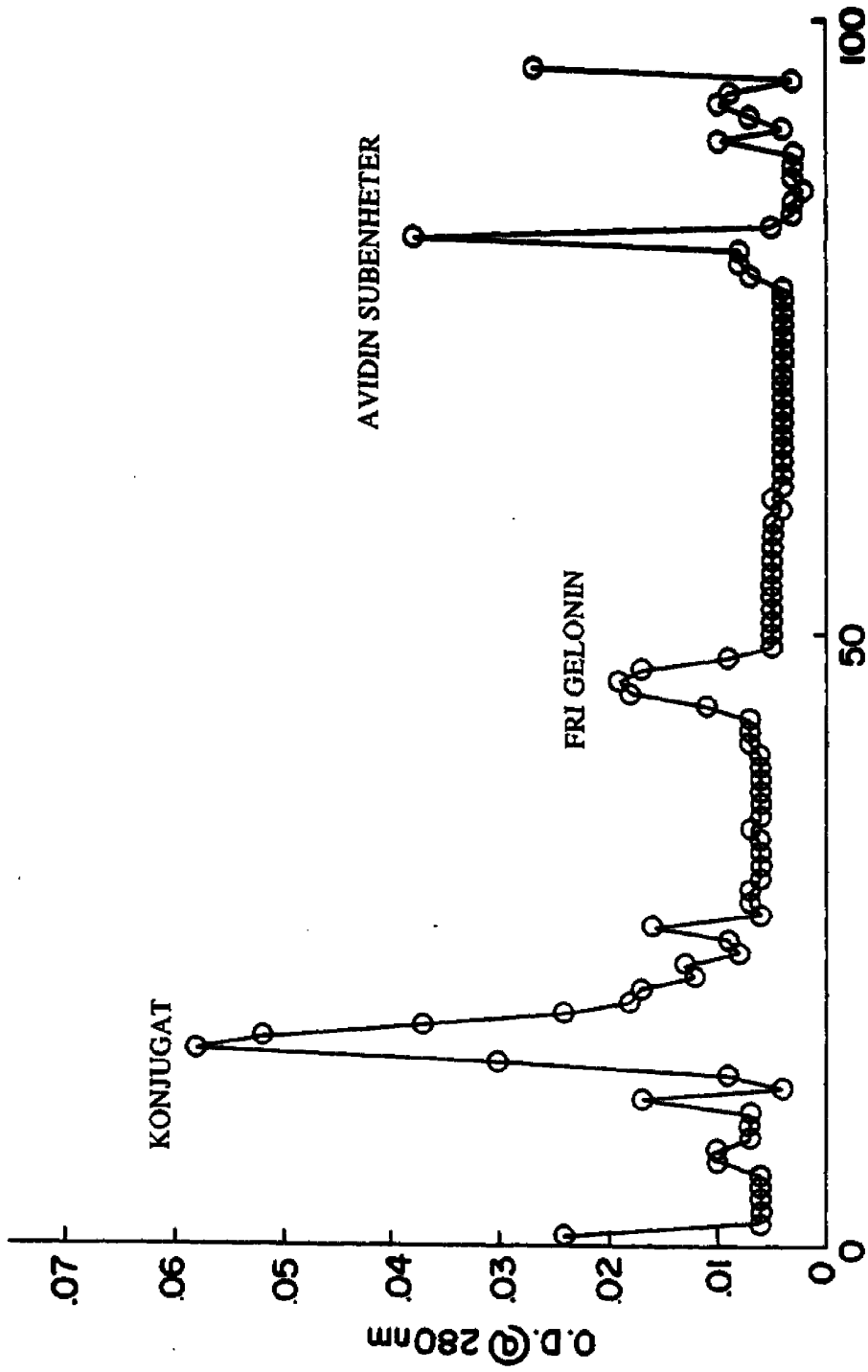


FIG.6B



FRAKSJONSNUMMER
FIG.7

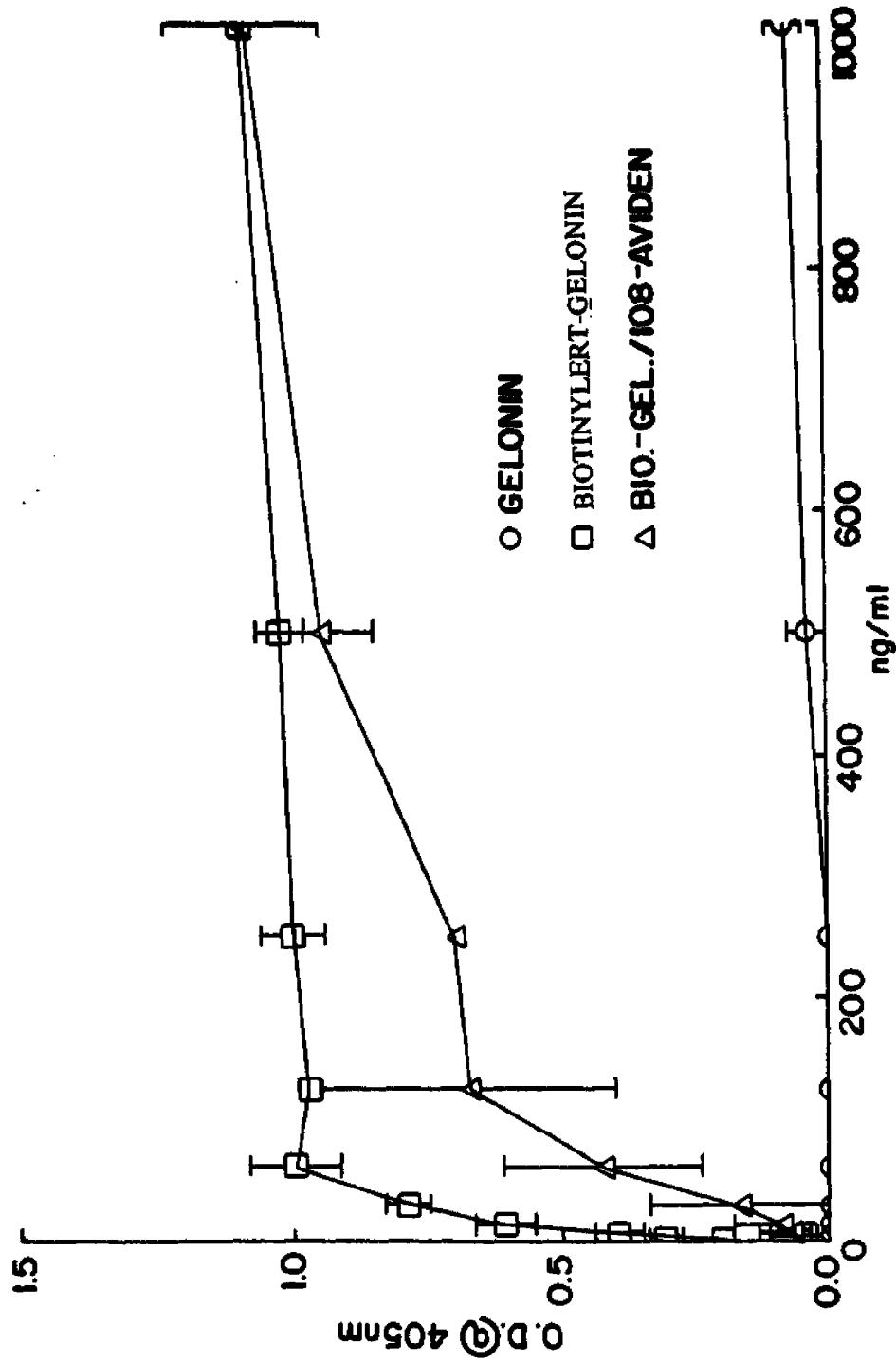


FIG. 8

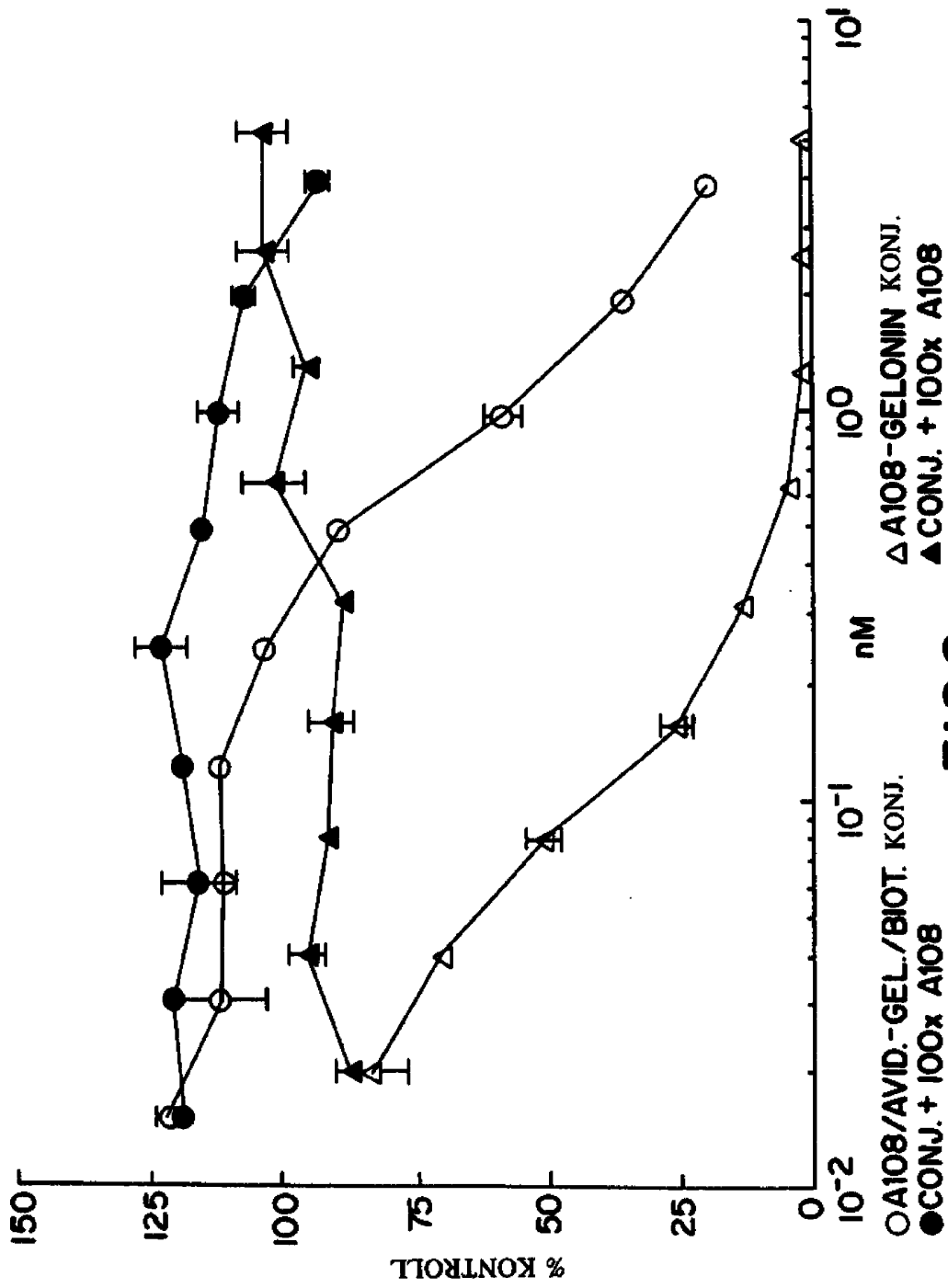


FIG.9



Kontroll AS Sens
(anti-sens)

FIG. 10