



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2164866 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/03 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.09.22
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.05.14
(86)	Europeisk søknadsnr	08757166.7
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.05.29
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.03.24
(30)	Prioritet	2007.05.29, US, 807597 2007.05.30, US, 807917 2007.12.20, US, 8880 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Angiochem Inc., 201 President Kennedy Avenue Suite PK-R210, Montréal, QC H2X 3Y7, CA-Canada
(72)	Oppfinner	BELIVEAU, Richard, 8, Cours du Fleuve, Montréal, Québec H3E 1X1, CA-Canada DEMEULE, Michel, 343 Preston, Beaconsfield, Québec H9W 1Z2, CA-Canada CHE, Christian, 7385 Avenue Chateaubriand, Montréal, Québec H2R 2L7, CA-Canada REGINA, Anthony, 10610 Avenue de Lorimier, Montréal, Québec H2B 2J3, CA-Canada
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	APROTININLIKLENDE POLYPEPTIDER FORMULERT FOR Å TILFØRE VEV AGENSER BUNDET TIL SEG
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-2006/086870 WO-A1-2007/009229 WO-A2-2004/060403

Beskrivelse

Bakgrunnen for oppfinnelsen

[0001] Oppfinnelsen dreier seg om forbedringer på feltet legemiddelformulering. Nærmere bestemt dreier oppfinnelsen seg om polypeptider, konjugater og farmasøytiske sammensetninger som inneholder polypeptidene ifølge oppfinnelsen og bruk av disse til å transportere virkestoffer (f.eks. terapeutiske virkestoffer) inn i bestemte celletyper som lever, lunge og nyre.

[0002] Leversykdommer, blant annet hepatitt, (f.eks. virushepatitt) og leverkreft (f.eks. hepatokarsinom) og lungesykdommer som lungekreft (f.eks. småcellet og ikke-småcellet lungekreft) er alvorlige helseproblemer. Mange terapeutiske virkestoffer for slike sykdommer har uønskede bivirkninger (f.eks. kjemoterapeutika) eller er vanskelige å føre fram i tilstrekkelig høy konsentrasjon til målvevet eller i tilstrekkelig lang tid til å oppnå maksimal terapeutisk virkning i målvevet f.eks. på grunn av stabilitet in vivo, transportegenskaper eller andre farmakokinetiske egenskaper.

[0003] Altså er det behov for framgangsmåter og sammensetninger som øker konsentrasjonen av terapeutiske og diagnostiske virkestoffer i målorganer eller målvev.

[0004] WO 2007/009229 A1 bekjentgjør polypeptider som tas opp av bestemte organer og kan brukes til å formulere et virkestoff til organene hvis de bindes til dette virkestoffet.

[0005] WO 2006/086870 A1 bekjentgjør polypeptider som tas opp av hjernen og kan øke transporten av et virkestoff gjennom blod/hjerne-barrieren hvis det bindes til virkestoffet.

[0006] WO 2004/060403 A2 bekjentgjør et polypeptid som øker transporten av et virkestoff gjennom blod/hjerne-barrieren hvis det bindes til virkestoffet.

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

[0007] Vi har oppdaget at polypeptidene som beskrives her (f.eks. Angiopep-7, SEKV.-IDNR.: 112) transporteres effektivt inn i bestemte celletyper (f.eks. lever, lunge, milt, nyrer og muskler), men ikke transporteres effektivt gjennom blod/hjerne-barrieren (BHB). Når det bindes til et virkestoff, fungerer polypeptidene som vektorer og kan øke konsentrasjonen av det bundne virkestoffet i cellen. Vi har også identifisert Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 og Angiopep-6 (SEKV-IDNR: 107–111) som vektorer som kan transporteres effektivt gjennom BHB og dessuten kan transportere inn i bestemte celletyper. Oppfinnelsen dreier seg derfor om polypeptider, konjugater med polypeptidene som vektorer og framgangsmåter for å påvise og behandle sykdommer (f.eks. kreft) med slike polypeptider og konjugater.

[0008] Et første aspekt av oppfinnelsen dreier seg om et polypeptid som innbefatter en aminosyresekvens med følgende formel:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19

der X1–X19 er hvilke som helst aminosyrer eller ikke til stede, minst den ene av X10 og X15 er Arg, og denne aminosyresekvensen er minst 80 % identisk med Angiopep-7, som har aminosyresekvensen SEKV.-IDNR.: 112, idet dette polypeptidet transporteres effektivt til minst én celle eller ett vev valgt fra gruppen som består av lever, lunge og nyre, og idet dette polypeptidet transporteres gjennom blod/hjerne-barrieren i lavere konsentrasjon enn Angiopep-6, som har aminosyresekvensen SEKV.-IDNR.: 111.

[0009] Altså dreier oppfinnelsen seg om et polypeptid som inneholder en aminosyresekvens av formel:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19

der hver av X1–X19 (f.eks. X1–X6, X8, X9, X11–X14 og X16–X19) hver for seg er en hvilken som helst aminosyre (f.eks. en naturlig aminosyre som Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr og Val) eller ikke til stede, og minst én av X1, X10 og X15 er arginin. I noen utførelsesformer er X7 Ser eller Cys, eller X10 og X15 hver for seg er Arg eller Lys. I noen utførelsesformer er restene fra og med X1 til og med X19 stort sett identiske med aminosyresekvensen SEKV.-IDNR.: 112 (dvs. Angiopep-7). I andre eksempler som bekjentgjøres her er restene fra og med X1 til og med X19 stort sett identiske med enhver av aminosyresekvensene til hvilke som helst av SEKV.-IDNR.: 1–105 og 107–111 (f.eks. Angiopep-1, Angiopep-2, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 og Angiopep-6). I noen utførelsesformer er minst en (f.eks. 2, 3, 4 eller 5) av aminosyrene X1–X19 Arg (f.eks. en vilkårlig, to vilkårlige eller alle tre av X1, X10 og X15).

[0010] I andre utførelsesformer dreier oppfinnelsen seg om et polypeptid som inneholder en aminosyresekvens stort sett identisk med SEKV.-IDNR.: 112 (dvs. Angiopep-7). Det bekjentgjøres også et polypeptid som inneholder en aminosyresekvens stort sett identisk med en hvilken som helst av SEKV.-IDNR.: 1–105 og 107–111 (f.eks. Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 og Angiopep-6). I visse utførelsesformer kan polypeptidet inneholde eller være Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6 eller Angiopep-7 (SEKV.-IDNR.: 107–112), kan inneholde en sekvens stort sett identisk med Angiopep-7-sekvensen eller et fragment av denne (f.eks. et funksjonelt fragment). Polypeptidet kan ha en aminosyresekvens med lengde på 10 til 50 aminosyrer, f.eks. 10 til 30 aminosyrer. Oppfinnelsen dreier seg også om funksjonelle derivater (f.eks. kjemiske derivater eller varianter) av disse polypeptidene.

[0011] Eksempler på polypeptider ifølge oppfinnelsen har lysin eller arginin i posisjon 10 (etter aminosyresekvensen i SEKV.-IDNR.: 1) eller et lysin eller arginin i posisjon 15 (etter aminosyresekvensen i SEKV.-IDNR.: 1) eller et lysin eller arginin både i posisjon 10 og posisjon 15. Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan også ha et serin eller cystein i posisjon 7 (ifølge aminosyresekvensen i SEKV.-IDNR.: 1). Hvis man ønsker multimerisering av polypeptidene, kan polypeptidet inneholde et cystein (f.eks. i posisjon 7).

[0012] I visse utførelsesformer er polypeptidene ifølge oppfinnelsen (f.eks. ethvert polypeptid som beskrives her) modifiserte (f.eks. som beskrevet her). Polypeptidet kan amideres, acetyleres eller begge. For eksempel kan et polypeptid som inneholder Angiopep-6 eller Angiopep-7 være amidert, eller SEKV.-IDNR.: 67 kan være amidert (polypeptid nr. 67). I et annet eksempel er aminosyrene til en hvilken som helst av SEKV.-IDNR.: 107–112, eller ethvert annet polypeptid ifølge oppfinnelsen, amidert eller acetylert. Slike modifikasjoner av polypeptider ifølge oppfinnelsen kan befinne seg enten i amino- eller karboksyenden av polypeptidet. Oppfinnelsen dreier seg også om peptidhermere (f.eks. slike som beskrives her) av ethvert av polypeptidene som beskrives her. Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan være i multimerform. For eksempel kan polypeptidene være i dimerform (f.eks. dannet ved disulfidbinding gjennom cysteinrester).

[0013] Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan transporteres effektivt inn i bestemte celler (f.eks. leverceller, nyreceller, lungeceller, muskelceller eller miltceller) eller kan trenge effektivt gjennom BHB (f.eks. Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 og Angiopep-6). I noen utførelsesformer transporteres polypeptidet effektivt inn i bestemte celler (f.eks. leverceller, nyreceller, lungeceller, muskelceller eller miltceller) og transporteres ikke effektivt gjennom BHB (f.eks. Angiopep-7). Polypeptidet kan transporteres effektivt inn i minst én (f.eks. minst to, tre, fire eller fem) av en celle eller vev valgt fra gruppen som består av lever, nyre, lunge, muskel eller milt.

[0014] For ethvert av polypeptidene og konjugatene som beskrives her kan aminosyresekvensen spesifikt inneholde et polypeptid som inneholder eller består av en hvilken som helst av SEKV.-IDNR.: 1–105 og 107–112 (enhver av SEKV.-IDNR.: 1–96, Angiopep-1, Angiopep-2, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6 og Angiopep-7). I noen utførelsesformer ekskluderer polypeptidene og konjugatene ifølge oppfinnelsen polypeptidene til SEKV.-IDNR.: 102, 103, 104 og 105. I andre utførelsesformer inneholder polypeptidene og konjugatene ifølge oppfinnelsen disse polypeptidene.

[0015] I visse utførelsesformer kan et polypeptid ifølge oppfinnelsen ha en aminosyresekvens som beskrives her med minst én aminosyre substituert (f.eks. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 eller 12 substitusjoner). Polypeptidet kan ha et arginin i én, to eller tre av posisjonene som svarer til posisjon 1, 10 og 15 i aminosyresekvensen til en hvilken som helst av SEKV.-IDNR.: 1, Angiopep-1, Angiopep-2, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6 og Angiopep-7. For eksempel kan polypeptidet inneholde 1 til 12 aminosyresubstitusjoner (f.eks. SEKV.-IDNR.: 91). For eksempel kan aminosyresekvensen inneholde 1 til 10 (f.eks. 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) aminosyresubstitusjoner eller 1 til 5 aminosyresubstitusjoner. Ifølge oppfinnelsen kan aminosyresubstitusjonen være en konservativ eller ikke-konservativ aminosyresubstitusjon.

[0016] Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan framstilles kjemisk (f.eks. ved fastfasesyntese) eller ved rekombinant DNA-teknologi, som er kjent. Alle polypeptidene, sammensetningene eller konjugatene som beskrives her kan være i isolert form eller i en stort sett rensert form.

[0017] Det bekjentgjøres også en polynukleotidsekvens som koder for et polypeptid ifølge oppfinnelsen (f.eks. alle polypeptider som beskrives her, som Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6 og Angiopep-7). Nærmere bestemt bekjentgjøres det nukleotidsekvenser (deoksyribonukleotider, ribonukleotider eller derivater av disse) som koder for et polypeptid valgt fra gruppen som består av enhver av SEKV.-IDNR.: 1–97 og SEKV.-IDNR.: 107–112. En ønsket nukleotidsekvens kan framstilles kjemisk ved kjente framgangsmåter.

[0018] Et annet aspekt av oppfinnelsen er et konjugat som inneholder en vektor valgt fra gruppen som består av ethvert av polypeptidene, analogene eller derivatene som beskrives her (f.eks. Angiopep-7) og et virkestoff, der virkestoffet er bundet til vektoren. Det bekjentgjøres også slike konjugater som inneholder en vektor valgt fra gruppen som består av ethvert av polypeptidene, analogene eller derivatene av disse som beskrives her (f.eks. Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 og Angiopep-6), og et virkestoff, der virkestoffet er bundet til vektoren.

[0019] virkestoffet kan velges fra gruppen som består av et terapimiddel (f.eks. et lite legemiddelmolekyl, f.eks. et virkestoff mot kreft, et antibiotikum eller alle som beskrives her), en detekterbar merking, et polypeptid (f.eks. et enzym) og et proteinkompleks. I noen utførelsesformer er 160 000 dalton en høyeste molekylvekt for virkestoffet. Midlet kan være et molekyl som er aktivt i sentralnervesystemet. Virkestoffet kan være ethvert virkestoff som kan brukes til å behandle en nevrologisk sykdom, leversykdom, lungesykdom, nyresykdom eller miltsykdom. Den detekterbare merkingen kan for eksempel være et virkestoff for radioaktiv bildediagnostikk (f.eks. en isotop), en fluorescensmerking (f.eks. rodamin, FITC, cy5.5, alexa), et rapportørmolekyl (f.eks. biotin). Andre eksempler på detekterbare merkinger er grønt fluorescerende protein, histag-proteinet og β -galaktosidase. Konjugatet kan være et fusjonsprotein som hovedsakelig består av vektoren og et protein. Eksempler på proteinbaserte forbindelser som kan bindes til en vektor ifølge oppfinnelsen er et antistoff (f.eks. med tung og/eller lett kjede), et antistofffragment (f.eks. et antistoffbindende fragment, som Fv-fragmentet, F(ab)₂, F(av)₂' og Fab). Et antistoff eller antistofffragment som kan bindes til vektoren er blant annet et monoklonalt eller polyklonalt antistoff, og det kan dessuten ha et hvilket som helst opphav (f.eks. humane, kimære og humaniserte antistoffer). Andre proteiner eller proteinbaserte forbindelser er blant annet celletoksiner (f.eks. monometylauristatin E (MMAE), bakterielle endotoksiner og eksotoksiner, difteritoksiner, botulinumtoksin, tetanustoksiner, kikhostetoksiner, stafylokokkiske enterotoksiner, toksinsjokksyndromtoksinet TSST-1, adenylatsyklasetoksin, shigatoksin og koleraenterotoksin) og antiangiogene forbindelser (endostatin, katekiner, nutrasøytika, kjemokin IP-10, hemmere av matriksmetalloproteinase (MMPI), anastellin, vironektin, antitrombin, tyrosinekinasehemmere, VEGF-hemmer, antistoffer mot reseptorer, herseptin, avastin og panitumumab).

[0020] Leptineksendin-4, GLP-1, PYY eller PYY(3-36) kan brukes f.eks. til å behandle fedme. Andre polypeptider som kan brukes i et konjugat ifølge oppfinnelsen er adrenokortikotrofe hormoner (ACTH, kortikotropin), veksthormonpeptider (f.eks., humant placentalt laktogen (hPL), veksthormoner og prolaktin (Prl)), melanocytstimulerende hormoner (MSH), oksytocin, vasopressin (ADH), kortikotropinfrigjørende faktor (CRF), peptider forbundet med

gonadotropinfrigjørende hormon (GAP), veksthormonfrigjørende faktor (GRF), hormoner som frigjør luteniserende hormon (LH-RH), oreksiner, prolaktinfrigjørende peptider, somatostatin, tyrotropinfrigjørende hormon (THR), kalsitonin (CT), kalsitoninforløperpeptid, kalsitoningenerelatert peptid (CGRP), paratyroideahormoner (PTH), paratyroideahormonrelaterte proteiner (PTHrP), amylin, glukagon, insulin og insulinliknende peptid, neuropeptid Y, bukspyttkjertelpolypeptid (PP), peptid YY, somatostatin,olecystokinin (CCK), gastrinfrigjørende peptid (GRP), gastrin, gastrinhemmende peptid, motilin, sekretin, vasoaktivt tarmpeptid (VIP), natriuretiske peptider (f.eks., atrialt natriuretisk peptid (ANP), B-type natriuretisk peptid (BNP), natriuretisk hjernepeptid og C-type natriuretisk peptid (CNP)), takykinner (f.eks., neurokinin A, neurokinin B og substans P), substans P, angiotensiner (f.eks., angiotensin I og angiotensin II), renin, endotelin (f.eks. endotelin-1, endotelin-2, endotelin-3, sarafotoksin (en slangegift) og skorpiontoksin), sarafotoksinpeptider, opioidpeptider (f.eks. kasomorfinpeptider, demorfiner, endorfiner, enkefaliner, deltorfiner, dynorfiner), brisselpeptider (f.eks. tymopoetin, tymulin, tymopentin, tymosin, brisselhumoral faktor (THF)), adrenomedullinpeptider (AM), allatostatinpeptider, amyloide betaproteinfragmenter (A β -fragmenter), antimikrobielle peptider (f.eks. defensin, kekropin, buforin og magainin), antioksydantpeptider (f.eks. naturlig drepercelleforøkende faktor B (NKEF-B), bombesin, Gla beinproteinpeptider (e.g., osteokalsin (Gla-beinprotein eller BGP), CART-peptider, celleadhesjonspeptider, kortistatinpeptider, fibronektinfragmenter og fibrinrelaterte peptider, FMRF-peptider, galanin, guanylin og uroguanylin, samt inhibinpeptider.

[0021] Legemidler med små molekyler omfatter virkestoffer mot kreft (f.eks. ethvert slikt virkestoff som beskrives her). Eksempler på legemidler mot kreft er blant annet paklitaxel (Taxol), vinblastin, vinkristin, etoposid, doksorubicin, syklofosamid, taxotere, melfalan, klorambucil og ethvert kreftmiddel som beskrives her og enhver kombinasjon av disse. Et legemiddel mot kreft kan ha kjemiske grupper som gjør det mulig å binde det til vektoren ifølge oppfinnelsen.

[0022] I visse utførelsesformer kan konjugatet ifølge oppfinnelsen inneholde formelen $V_x-L_y-A_z$ eller et farmasøytisk aksepterbart salt av dette, der V er et polypeptid eller derivat av dette (f.eks. Angiopep-7, eller enhver av analogene, derivatene eller fragmentene som beskrives her). Det bekjentgjøres også slike konjugater der V f.eks. er Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6 eller noen av analogene, derivatene eller fragmentene som beskrives her. V kan transporteres effektivt til en bestemt celletype (f.eks. lever-, lunge-, nyre-, milt- eller muskelcelle) eller kan transporteres effektivt gjennom BHB (f.eks. etter binding til L_y-A_z). I visse utførelsesformer transporteres ikke vektoren eller konjugatet effektivt gjennom BHB, men transporteres effektivt inn i en bestemt celletype (f.eks. Angiopep-7). L er et bindeledd eller en binding (f.eks. kjemisk eller kovalent binding). A er et virkestoff som f.eks. de som er valgt fra gruppen som består av et terapimiddel (f.eks. et lite legemiddelmolekyl), en detekterbar merking, et protein eller en proteinbasert forbindelse (f.eks. antistoff, antistoffragment), et antibiotikum, et kreftmiddel, en antiangiogen forbindelse og et polypeptid eller ethvert molekyl som er aktivt på sentranervesystemnivået.

[0023] X, Y og Z kan hver for seg være ethvert nummer større enn 0 (f.eks. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10) eller kan stå for et intervall av verdier mellom 1 (f.eks. 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9) og 10 (f.eks. 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2). Altså er ikke formelen $V_x-L_y-A_z$ innskrenket til en bestemt rekkefølge eller en bestemt brøk. For eksempel kan konjugatet omfatte 1 til 5 vektorer (1, 2, 3, 4 eller 5) bundet til virkestoffet. I andre utførelsesformer kan mer enn ett virkestoff bindes til vektoren. Virkestoffet eller konjugatet kan være aktivt når virkestoffet er bundet til vektoren. I noen utførelsesformer kan forbindelsen frigjøres fra vektoren, f.eks. etter transport gjennom BHB eller inn i en bestemt celletype. Forbindelsen kan bli aktiv etter at den er frigjort (f.eks. som en prodrug). I noen utførelsesformer holder virkestoffet seg bundet til vektoren etter transporten. Her kan konjugatet vise lavere efflukstransport (f.eks. med P-glykoprotein) enn det ubundne virkestoffet. I så fall kan det være ønskelig at virkestoffet og vektoren holdes bundet til hverandre. Konjugatet kan tilveiebringes i en farmasøytisk akseptert sammensetning.

[0024] Virkestoffet kan, når det er bundet til en vektor, vise modifisert (f.eks. forbedret) biologisk tilgjengelighet, økt styrke (f.eks. virkning mot kreft), forandret vevsfordeling for virkestoffet, mindre giftighet eller andre farmakokinetiske egenskaper enn virkestoffet når det ikke er bundet til vektoren. En vektor (f.eks. Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 og Angiopep-6) kan fremme opphoping av virkestoffet i hjernen til et individ (f.eks. en hjerne som inneholder en tumorcelle som f.eks. et glioblastom, eller en tumorcelle fra lunge, bryst, tykktarm, lever, bukspyttkjertel eller milt) eller i en bestemt celle eller et bestemt vev (f.eks. fra lever, lunge, nyre, milt og muskel). En vektor som Angiopep-7 kan være i stand til å fremme opphoping i slike celletyper som lever-, lunge-, milt- eller muskelceller, men ikke fremme opphoping i hjernen. Nærmere bestemt kan vektoren øke opphopingen eller styrken til et virkestoff som er et P-gp-substrat eller terapeutiske virkestoffer som skilles ut av P-gp eller et P-gp-beslektet protein (f.eks. et allelisk P-gp-variant fra mennesker eller andre pattedyr, f.eks. mdr1a- eller mdr1b-isoformer fra en gnager), når det tilveiebringes (f.eks. gis) til en pasient. Cellen kan uttrykke eller kan være i stand til å uttrykke P-gp eller et P-gp-beslektet protein. Cellen som konjugatet transporteres inn i kan uttrykke en vektorreseptor eller transportør, for eksempel en lett lipoproteinrelatert reseptor (LRP) (f.eks. en celle som samtidig uttrykker P-gp eller et P-gp-relatert protein.) Cellen kan for eksempel være en normal celle, en tumorcelle eller en metastatisk celle (f.eks. en kreftcelle med multiresistens). Cellen eller svulsten kan være en metastase (f.eks. av noen som helst av kreftformene som beskrives her).

[0025] En vektor eller et konjugat kan transporteres effektivt inn i en bestemt celletype (f.eks. lever-, lunge-, nyre-, milt- eller muskelcelle) og kan transporteres effektivt gjennom BHB. Slike konjugater omfatter Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 og Angiopep-6. I visse utførelsesformer virker ikke transportaktiviteten til vektoren i seg selv inn på integriteten til cellen som den leveres til, eller den påvirker ikke integriteten til BHB. I andre utførelsesformer transporteres vektoren eller konjugatet, som Angiopep-7, effektivt inn i en bestemt celletype, men transporteres ikke effektivt gjennom BHB. Enhver vektor eller konjugat som beskrives her kan transporteres ved reseptorformidlet endocytose eller transcytose eller ved absorptivformidlet endocytose eller transcytose.

[0026] Enhver vektor eller konjugat som beskrives her kan begynne seg i en farmasøytisk akseptert bærer (f.eks. kan være i form av et legemiddel). Oppfinnelsen dreier seg derfor om en farmasøytisk sammensetning som omfatter (a)

et konjugat (f.eks. ethvert konjugat som beskrives her), (b) en farmasøytisk aksepterbar bærer (f.eks. enhver bærer som beskrives her). Konjugatet kan også omfatte (c) en løselighetsformidler. Løselighetsformidleren kan for eksempel være en polyoksyetylenester av en fettsyre (f.eks. Solutol® HS-15). Den farmasøytiske sammensetningen kan brukes til å modifisere farmakokinetikken til en forbindelse, til å redusere veksten av en kreftcelle eller til å detektere en kreftcelle.

[0027] Et annet aspekt av oppfinnelsen er å bruke en vektor eller et konjugat ifølge oppfinnelsen til å påvise eller behandle (f.eks. til å produsere et legemiddel eller bruke det i behandlingen av) en leversykdom, lungesykdom, nyresykdom, miltsykdom eller muskelsykdom. I visse utførelsesformer kan en nevrologisk sykdom eller en sykdom i sentralnervesystemet (f.eks. enhver slik sykdom som beskrives her) behandles med et konjugat ifølge oppfinnelsen som transporteres effektivt gjennom BHB. For eksempel kan vektoren eller konjugatet brukes til å detektere enhver av disse sykdommene in vivo. Behandlingen eller diagnosen kan utføres på et pattedyr (f.eks. et humant eller ikke-humant pattedyr) som trenger det, for eksempel et pattedyr som har eller er disponert for (f.eks. har økt risiko for) sykdommen (f.eks. en kreftform). Legemidlet kan gis på alle kjente måter, for eksempel intraarterielt, intranasalt, intraperitonealt, intravenøst, intramuskulært, subkutant, transdermalt eller oralt. Legemidlet kan gis i en terapeutisk effektiv mengde.

[0028] Ved å binde et virkestoff til en vektor som beskrives her kan giftigheten til virkestoffet reduseres slik at virkestoffet kan gis til en pasient i en dose som er høyere enn den anbefalte dosen for virkestoffet alene. Derfor dreier oppfinnelsen seg om en framgangsmåte for å behandle en pasient som har en sykdom eller lidelse (f.eks. alle sykdommer som beskrives her, for eksempel kreft), som omfatter å gi et konjugat ifølge oppfinnelsen til en pasient, idet dette konjugatet inneholder et virkestoff i en dose som er høyere (f.eks. minst 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 250 %, 500 %, 1000 %, 5000 % eller 10 000 % høyere) enn den terapeutiske dosen av virkestoffet alene.

[0029] Fordi en vektor som beskrives her kan dirigere et virkestoff til en bestemt celletype (f.eks. slike som beskrives her), kan virkestoffet når det er bundet til en vektor i visse utførelsesformer ha høyere effektivitet når det gis til en pasient. Derfor dreier oppfinnelsen seg også om en framgangsmåte for å behandle en pasient som har en sykdom eller lidelse (f.eks. alle sykdommer eller lidelser som beskrives her, for eksempel kreft), ved å gi pasienten et konjugat eller en sammensetning som inneholder et konjugat ifølge oppfinnelsen, idet dette konjugatet inneholder et virkestoff i en dose som er lavere (f.eks. 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, 99,9 % eller med) enn den terapeutiske dosen av virkestoffet alene.

[0030] Behandlingsmetodene ifølge oppfinnelsen kan også innbefatte et trinn der det vurderes om svulsten til individet inneholder en multiresistent svulstcelle (f.eks. en celle som uttrykker P-gp (MDR1) eller bestemme om svulsten kan ha eller har en multiresistent fenotype). Behandlingsmetodene kan omfatte et trinn der det gis kjemoterapi, strålebehandling eller begge. Alternativt kan pasienten som behandles ha mottatt (eller vil motta) slike behandlinger (f.eks. innen 1 år, 6 måneder, 3 måneder, 2 måneder, 1 måned, 2 uker, 1 uke, 3 døgn, 2 døgn eller 1 døgn). Individet

kan være behandlet kirurgisk. Individet kan ha en hjernesvulst (f.eks. en primær hjernesvulst) eller en svulst på et annet sted enn hjernen (f.eks. har ikke en hjernesvulst). Et trengende individ kan ha eller er disponert for å utvikle resistens for minst ett legemiddel (f.eks. en multiresistent (MDR) fenotype). Svulsten kan være en lungesvulst, en ekstrakraniell metastase av en hjernesvulst fra (f.eks. fra et glioblastom) en hjernesvulst av metastatisk opphav (f.eks. fra en lungesvulst, en brystsvulst, et melanom, en kolorektal kreft eller en urinorgansvulst). Svulsten kan innbefatte en celle som uttrykker P-gp, LSP eller begge, eller en celle som kan uttrykke P-gp, LSP eller begge. P-gp og LRP kan være lokalisert til en celleoverflate.

[0031] Et annet aspekt av oppfinnelsen er konjugatet ifølge den foreliggende oppfinnelsen til bruk i en framgangsmåte for å øke konsentrasjonen av et virkestoff i en celle eller å transportere et virkestoff til en celle, der cellen uttrykker et medlem av LRP-reseptorfamilien. Framgangsmåten omfatter å sette cellen i kontakt med et konjugat som innbefatter virkestoffet bundet til en vektor (f.eks. ethvert polypeptid som beskrives her) og dermed øke konsentrasjonen av virkestoffet i cellen, eller transportere virkestoffet til cellen. Oppfinnelsen tilveiebringer også en framgangsmåte for å øke konsentrasjonen av et virkestoff i en celle, der cellen uttrykker P-glykoprotein. Framgangsmåten omfatter å sette cellen i kontakt med et konjugat som innbefatter virkestoffet bundet til en vektor (f.eks. ethvert polypeptid som beskrives her) og dermed øke konsentrasjonen av virkestoffet i cellen sammenliknet med det ubundne virkestoffet.

[0032] Ifølge noen av aspektene av oppfinnelsen omfatter nevrologiske sykdommer en hjernesvulst, en hjernemetastase, schizofreni, epilepsi, Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, Huntingtons sykdom, hjerneslag og BHB-relaterte feilfunksjoner (f.eks. fedme). Leversykdommen kan være en kreftform, som hepatokarsinom. Andre leversykdommer er blant annet de som beskrives her. Lungesykdommen kan være en form for lungekreft (f.eks. slike som beskrives her).

[0033] Konjugatene kan inneholde vektorer i form av multimerer, for eksempel dimerer. Multimerformer av vektorene kan i noen utførelsesformer øke transporten eller opphopingen av virkestoffet. Vektorer kan også foreligge i en proporsjon på minst 1:1 (middel:vektor), 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 eller 1:10. Som antydnet her kan høyere proporsjon mellom vektor og virkestoff gi økt transport. Derfor er det ikke meningen å begrense antall vektorer per virkestoff.

[0034] Den farmasøytiske sammensetningen kan også ifølge oppfinnelsen brukes for eksempel til å formulere et virkestoff for sentralnervesystemet til et individ.

[0035] Et farmasøytisk aksepterbart salt av en vektor (polypeptid) eller av et konjugat omfattes av oppfinnelsen og kan omfatte farmasøytisk aksepterbare syreaddisjonssalter av virkestoffet.

[0036] Vektoren eller konjugatet ifølge oppfinnelsen kan brukes i kombinasjon med eller atskilt fra konvensjonelle behandlingsmetoder. Kombinasjonsterapi sammen med andre virkestoffer kan innebære å gi virkestoffene til et individ etter hverandre eller samtidig. Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan inneholde en kombinasjon av et vektor/virkestoff-konjugat ifølge oppfinnelsen sammen med et

farmasøytisk aksepterbart hjelpestoff slik det beskrives her, og andre kjente behandlings- eller forebyggingsmidler.

[0037] «Vektor» står for en forbindelse eller et molekyl som for eksempel et polypeptid som kan transporteres inn i en bestemt celletype (f.eks. lever, lunge, nyre, milt eller muskel) eller gjennom BHB. Vektoren kan bindes (kovalent eller ikke) til et virkestoff og dermed være i stand til å transportere virkestoffet inn i en bestemt celletype eller gjennom BHB. I visse utførelsesformer kan vektoren bindes til reseptorer som finnes på kreftceller eller hjerneendotelceller og dermed transporteres inn i kreftcellen eller gjennom BHB ved transcytose. Vektoren kan være et molekyl som det kan fås høy transendoteltransport av uten at det påvirker integriteten til cellen eller BHB. Vektoren kan være et polypeptid eller en peptidhermer og kan være av naturlig opphav eller produsert ved kjemisk syntese eller rekombinant genteknologi.

[0038] «Konjugat» står for en vektor bundet til et virkestoff. Bindingen kan være kjemisk, for eksempel gjennom et bindeledd, eller genetisk, for eksempel ved rekombinant genteknologi, eksempelvis i et fusjonsprotein med f.eks. et rapportørmolekyl (f.eks. grønt fluorescerende protein, β -galaktosidase, Histag m.m.)

[0039] Når en vektor «transporteres effektivt gjennom BHB» betyr det at vektoren kan komme igjennom BHB minst like effektivt som Angiopep-6 (dvs. mer enn 38,5 % av effektiviteten til Angiopep-1 (250 nM) i hjerneperfuseringsanalysen in situ som beskrives her). Altså transporteres en vektor eller et konjugat som «ikke transporteres effektivt gjennom BHB» til hjernen i lavere konsentrasjon (f.eks. transporteres mindre effektivt enn Angiopep-6).

[0040] Når en vektor eller et konjugat «transporteres effektivt til en bestemt celletype» betyr det at en vektor eller et konjugat kan hope seg opp (f.eks. enten på grunn av økt transport inn i cellen, redusert effluks fra cellen eller en kombinasjon av disse) i den celletypen minst 10 % (f.eks. 25 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 %, 1000 %, 5000 % eller 10 000 %) mer enn enten et kontrollstoff eller, når det gjelder konjugater, enn et ubundet virkestoff.

[0041] «Stort sett ren» eller «isolert» betyr en forbindelse (f.eks. et polypeptid eller et konjugat) som er separert fra andre kjemiske bestanddeler. Forbindelsen er typisk stort sett ren når den er minst 30 vekt-% fri for andre forbindelser. I visse utførelsesformer er preparatet minst 50 vekt-%, 60 vekt-%, 75 vekt-%, 85 vekt-%, 90 vekt-%, 95 vekt-%, 96 vekt-%, 97 vekt-%, 98 vekt-% eller 99 vekt-% fritt for andre bestanddeler. Et rensset polypeptid kan for eksempel fås ved å uttrykke et rekombinant polynukleotid som koder for et slikt polypeptid eller ved kjemisk syntese av polypeptidet. Renheten kan måles ved enhver passende metode, for eksempel kolonnekromatografi, polyakrylamidgelelektroforese eller HPLC-analyse.

[0042] «Analog» står for et polypeptid som stammer fra en opprinnelig sekvens eller fra en del av en opprinnelig sekvens og som kan inneholde en eller flere modifikasjoner, for eksempel en eller flere modifikasjoner i aminosyresekvensen (f.eks. en aminosyre lagt til, fjernet, satt inn eller byttet ut), en eller flere modifikasjoner i ryggraden eller sidekjeden til en eller flere aminosyrer eller at det er lagt til en gruppe eller et annet molekyl til en eller flere aminosyrer (sidekjede eller

ryggrad). En analog kan ha en eller flere aminosyrer satt inn i en av endene eller begge endene av polypeptidet eller inne i aminosyresekvensen til polypeptidet. En analog kan ha sekvenslikhet og/eller sekvensidentitet (f.eks. kan være stort sett identisk) med den opprinnelige sekvensen eller en del av en opprinnelig sekvens. Analoger kan inneholde en modifikasjon av strukturen, f.eks. slik det beskrives her. Likhetsgraden mellom to sekvenser bygger på prosentandelen av identiteter (identiske aminosyrer) og på konservativ substituering. En analog kan ha minst 35 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % eller 95 % (f.eks. 96 %, 97 %, 98 %, 99 % og 100 %) sekvenslikhet med den opprinnelige sekvensen med en kombinasjon av en eller flere modifikasjoner i ryggraden eller sidekjeden til en aminosyre, eller en gruppe eller et annet molekyl lagt til. Eksempler på aminosyrer som er ment å likne (en konservativ aminosyre) andre er kjente og omfatter for eksempel de som er oppført i tabell 3.

[0043] «Stort sett identisk» betyr et polypeptid eller en nukleinsyre som viser minst 35 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 % eller til og med 99 % likhet med et referanseaminosyresekvens eller en referansenukleinsyresekvens. For polypeptider vil lengden til sammenlikningssekvensene i allmennhet være minst 4 (f.eks. minst 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50 eller 100) aminosyrer. For nukleinsyrer vil lengden til sammenlikningssekvensen i allmennhet være minst 60 nukleotider, fortrinnsvis minst 90 nukleotider, og minst 120 nukleotider eller hele lengden foretrekkes mer. Det må være klart her at det kan være mellomrom mellom aminosyrene til en analog som er identiske med eller likner aminosyrene til det opprinnelige polypeptidet. Mellomrommene kan være uten aminosyrer eller ha en eller flere aminosyrer som ikke er identiske med eller likner det opprinnelige polypeptidet. Biologisk aktive analoger til vektorene (polypeptidene) ifølge oppfinnelsen omfattes av dette. Prosentvis identitet kan bestemmes for eksempel med en algoritme GAP, BESTFIT eller FASTA i Wilkinson Genetics programvarepakke utgave 7.0, med standard mellomromvekting.

[0044] «Funksjonelt derivat» står for et «kjemisk derivat», «fragment» eller en «variant» av en biologisk aktiv sekvens eller del av en vektor eller agent eller et konjugat og et salt av dette ifølge oppfinnelsen. Et funksjonelt vektorderivat kan være i stand til å bindes til et virkestoff og komme inn i en bestemt celletype og dermed transportere virkestoffet til denne cellen.

[0045] «Kjemisk derivat» står for en vektor, et virkestoff eller et konjugat ifølge oppfinnelsen som inneholder andre kjemiske grupper som ikke er en del av vektoren, virkestoffet eller vektor/middel-konjugatet, deriblant kovalente modifikasjoner. Et kjemisk derivat kan framstilles ved direkte kjemisk syntese med kjente framgangsmåter. Slike modifikasjoner kan innføres i et protein eller en peptidvektor, et virkestoff eller et vektor/virkestoff-konjugat ved å bringe målsøkte aminosyrerester til å reagere med et organisk derivatiseringsmiddel som kan reagere med utvalgte sidekjeder eller endeaminosyrer. Et kjemisk vektorderivat kan være i stand til å gå gjennom BHB eller gå inn i eller hope seg opp i en bestemt celletype (f.eks. slike som beskrives her). I et foretrukket utførelsesform fås det svært høye grad av transendotelial transport gjennom BHB uten at det påvirker integriteten til BHB.

[0046] «Fragment» står for et polypeptid som stammer fra en del av en opphavssekvens eller fra en analog til denne opphavssekvensen. Fragmenter omfatter polypeptider der en eller flere aminosyrer er trunkert vekk, der trunkeringen kan begynne i aminoenden (N-enden), karboksyenden (C-enden) eller inne i proteinet. Et fragment kan inneholde samme sekvens som den tilsvarende delen av opphavssekvensen. Funksjonelle fragmenter av vektoren (polypeptidet) som beskrives her omfattes av oppfinnelsen. Fragmenter kan inneholde minst 5 (f.eks. minst 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 100 eller 150) aminosyrer. Fragmenter ifølge oppfinnelsen kan for eksempel omfatte et polypeptid med 7, 8, 9 eller 10 aminosyrer, og opptil 18 aminosyrer. Fragmenter kan inneholde hvilke som helst av modifikasjonene som beskrives her (f.eks. acetylering, amidering, aminosyreutskifting).

[0047] En «ikke-naturlig aminosyre» er en aminosyre som ikke produseres naturlig eller finnes i et pattedyr.

[0048] «Virkestoff» står for enhver forbindelse, for eksempel et antistoff, eller et terapeutisk virkestoff, en merking, et sporingstoff eller en bildedanningsforbindelse.

[0049] «Terapeutisk virkestoff» står for et virkestoff som har biologisk aktivitet. I noen tilfeller brukes det terapeutiske virkestoffet til å behandle symptomene til en sykdom, en fysisk eller mental tilstand, en skade eller en infeksjon, og omfatter virkestoffer mot kreft, antibiotika, antiangiogenika og molekyler som er aktive på sentralnervesystemnivået.

[0050] «Lite legemiddelmolekyl» står for et legemiddel med molekylvekt 1000 g/mol eller mindre (f.eks. mindre enn 800, 600, 500, 400 eller 200 g/mol).

[0051] «Pasient» står for et menneskelig eller ikke-menneskelig dyr (f.eks. et pattedyr).

[0052] «Behandling», «behandle» eller liknende står for å tilveiebringe en ønsket farmakologisk eller fysiologisk virkning, f.eks. å hemme veksten til kreftceller, drepe kreftceller, lindre en sykdom eller lidelse (f.eks. enhver sykdom eller lidelse som beskrives her) eller lindre minst ett symptom som forbindes med en sykdom eller lidelse. Virkningen kan være forebyggende, f.eks. å hindre en sykdom eller lidelse eller et symptom på denne helt eller delvis, eller den kan være behandlende slik at den delvis eller fullstendig kurerer en sykdom og/eller en ugunstig virkning som kan tilskrives sykdommen. Behandling omfatter å: (a) hindre en sykdom eller lidelse (f.eks. forebygge kreft) i å opptre hos et individ (f.eks. et som er disponert for å få sykdommen men ikke har fått den påvist), (b) hemme en sykdom (f.eks. stoppe utviklingen av den) eller (c) lindre en sykdom (f.eks. redusere symptomene som er forbundet med sykdommen). Behandling omfatter alle måter å gi et terapeutisk virkestoff til et individ på for å behandle, kurere, lindre, forbedre, minske eller hemme en lidelse hos individet, inkludert, uten innskrenkninger, å gi individet et vektor/middel-konjugat.

[0053] «Kreft» står for enhver celleprolifisering med den unike egenskapen at de har mistet den normale kontrollen, noe som kan føre til uregulert vekst, ingen

differensiering og en evne til å invadere vev og danne metastaser. Kreft kan utvikle seg i hvilket vev eller organ som helst. Det er meningen at kreft skal omfatte, uten innskrenkninger, kreft i hjernen, leveren, lungene, nyrene eller milten. Det beskrives også andre kreftformer her.

[0054] «Framføre» eller «føre fram» står i forbindelse med en vektor eller et konjugat ifølge oppfinnelsen, for å bringe vektoren eller konjugatet i kontakt med en målcelle eller et målvev enten in vivo eller in vitro. En vektor eller et konjugat kan framføres ved å gi vektoren eller konjugatet til en pasient.

[0055] «Gi» eller «administrere» står i denne sammenhengen for en måte å levere virkestoffet på som uten innskrenkninger omfatter intraarterielt, intranasalt, intraperitonealt, intravenøst, intramuskulært, subkutant, transdermalt eller oralt. En daglig dose kan deles på én, to eller flere doser på en passende måte som skal gis én, to eller flere ganger gjennom en tidsperiode.

[0056] «Terapeutisk effektiv» eller «effektiv mengde» står for en mengde av et terapeutisk virkestoff som er tilstrekkelig til å forbedre, redusere, forebygge, forsinke, undertrykke eller stoppe et hvilket som helst symptom på sykdommen eller lidelsen som behandles. En terapeutisk effektiv mengde av et virkestoff trenger ikke helbrede en sykdom eller lidelse, men vil tilveiebringe en behandling for en sykdom eller lidelse slik at utbruddet av sykdommen eller lidelsen forsinkes, hindres eller forebygges, eller symptomene på sykdommen eller lidelsen lindres eller terminen for sykdommen eller lidelsen forandres eller for eksempel blir mindre alvorlig, eller bedringen akselereres hos et individ.

[0057] «Lidelse» står for enhver situasjon som gir smerter, ubehag, uvelhet, sykdom eller handikap (mentalt eller fysisk) til eller i et individ, blant annet nevrologiske sykdommer, skader, infeksjoner eller kronisk eller akutt smerte. Nevrologiske sykdommer omfatter hjernesvulster, hjernemetastaser, schizofreni, epilepsi, Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, Huntingtons sykdom og hjerneslag.

[0058] «Farmasøytisk sammensetning» står for en terapeutisk effektiv mengde av et virkestoff sammen med et farmasøytisk aksepterbart fortynningsmiddel, konserveringsmiddel, løselighetsformidlende middel, emulgeringsmiddel eller en farmasøytisk aksepterbart adjuvans, for eksempel alle som beskrives her.

[0059] «Terapeutisk dose» står for den dosen av et virkestoff, som f.eks. et legemiddel (uten vektoren) som er akseptabel for klinisk bruk med tanke på giftigheten eller effektiviteten av virkestoffet. Ved å binde et virkestoff til en vektor ifølge oppfinnelsen kan det være mulig å gi virkestoffet i en dose som enten er lavere eller høyere enn den terapeutiske dosen.

[0060] Hvis det nevnes et «utvalg» eller «en gruppe av stoffer» med tanke på en bestemt egenskap (f.eks. temperatur, konsentrasjon, tid eller liknende), dreier oppfinnelsen seg om og inkorporerer her eksplisitt hvert eneste spesifikke medlem med hver sine kombinasjoner av underutvalg og undergrupper. For eksempel når det gjelder en lengde på 9 til 18 aminosyrer, skal det tolkes som at det spesifikt inkorporerer her hver eneste individuelle lengde, f.eks. en lengde på 18, 17, 15, 10, 9 og ethvert tall imellom dem. Derfor skal alle intervaller som omtales her dersom det

ikke spesifikt er sagt noe annet, tolkes som inkluderende. For eksempel skal det når det spesifiseres fra 5 til 19 aminosyrer tolkes som at det inkluderer 5 og 19. Tilsvarende gjelder dette også for andre parametere, som sekvenser, lengder, konsentrasjoner, grunnstoffer eller liknende.

[0061] Sekvensene, regionene, delene som defineres her omfatter hver eneste individuelle sekvens, region og del som beskrives på den måten så vel som hver eneste mulige undersekvens, underregion og underdel uansett om disse undersekvensene, underregionene eller underdelene er definert slik at de klart inkluderer bestemte muligheter, klart utelukker bestemte muligheter, eller en kombinasjon av disse. For eksempel kan en utelukkelsesdefinisjon for en region være som følger: «med mindre det nevnte polypeptidet ikke er kortere enn 4, 5, 6, 7, 8 eller 9 aminosyrer». Et annet eksempel på en negativ innskrenkning er følgende: en sekvens som omfatter SEKV.-IDNR: X unntatt et polypeptid av SEKV.-IDNR: Y, osv. Nok et eksempel på en negativ innskrenkning er følgende: med mindre det nevnte polypeptidet ikke er (ikke omfatter eller består av) SEKV.-IDNR: Z.

Kort beskrivelse av illustrasjonene

[0062]

Fig. 1 illustrerer strukturen av eksempler på polypeptider ifølge oppfinnelsen.

Fig. 2 illustrerer protokollen som brukes til å binde aprotinin til IgG ved hjelp av fornetteren BS³.

Fig. 3 illustrerer protokollen som brukes til å binde aprotinin til IgG ved hjelp av fornetteren sulfo-EMCS.

Fig. 4 illustrerer protokollen som brukes til å binde Angiopep-2 til antistoffer ved hjelp av fornetteren EMCS.

Fig. 5 illustrerer protokollen som brukes til å binde Angiopep-2 til antistoffer ved hjelp av fornetteren SATA.

Fig. 6 illustrerer protokollen som brukes til å binde Angiopep-2 til antistoffer ved hjelp av karbohydratmål via hydrazid.

Fig. 7 illustrerer andre mulige bindeledd som kan brukes til å lage et konjugat.

Fig. 8 illustrerer en framgangsmåte for å binde en vektor ifølge oppfinnelsen til paklitaxel.

Fig. 9 er en skjematisk framstilling av efflukspumpen, P-glykoprotein (P-gp eller MDR1) på celleoverflaten. Efflukspumpen, P-gp eller MDR1, som forbindes med multiresistens for legemidler, uttrykkes i høy grad på overflaten av mange kreftceller og forskjellige vev, blant annet blod/hjerne-barrieren (BHB).

Fig. 10A og 10B er diagrammer som viser vevsfordelingen til Taxol og Tx|An1-konjugatet.

Fig. 11 er et diagram som viser lungefordelingen av Taxol og Tx|An1.

Fig. 12 er et diagram som viser konsentrasjonen av Tx|An1-konjugatet i plasma og lungene.

Fig. 13 er et sett bilder som viser opphoping in vivo av Angiopep-2 og Angiopep-7 i rottehjerner 30 minutter etter IV-injisering. Angiopep-2 hoper seg mer opp i hjernen enn Angiopep-7.

Fig. 14 er et sett av bilder som viser fluorescensmikroskopi av hjernesnitt etter en 10 minutters in situ-perfusering med enten fluorescensmerket Angiopep-2 eller Angiopep-7. Disse bildene viser at Angiopep-2 er lokalisert inne i hjernen, mens Angiopep-7 er lokalisert inne i hårrørsårene.

Fig. 15A er et sett bilder som viser in vivo-avbildning av Angiopep-2 og Angiopep-7 i leveren, lungene og nyrene til ei rotte. Det observeres at Angiopep-7 hoper seg opp i disse vevene.

Fig. 15B er en graf som viser organavbildning ex vivo 24 timer etter injeksjon av enten Angiopep-2 eller Angiopep-7 i ei rotte. Begge polypeptidene hoper seg opp i nyrene, leveren og lungene. Angiopep-2 hoper seg mer opp i hjernen enn Angiopep-7.

Fig. 16 illustrerer fordelingsvolumet i hjerneparenkymet til fritt og Angiopep-konjugert IgG.

Fig. 17 er et diagram av celleprolifisering i nærvær av opphavslegemidlet Taxol. Glioblastomceller (U-87) ble utsatt for forskjellige konsentrasjoner av Taxol i 3 dager. ³H-tymidin inkorporert i celler ble plottet som en funksjon av Taxol-konsentrasjonene.

Fig. 18A og 18B er grafer som viser virkningen av Tx|An2-behandling på subkutan glioblastomsvulstvekst (U-87).

Fig. 19 er et sett fotomikrografier som viser detektering av β -tubulin i NCI-H460-celler ved immunofluorescens eller synlig lys i kreftceller utsatt for Taxol eller Tx|An2-konjugat. Som kontroll ble cellene utsatt for 1 % DMSO.

Fig. 20 er et sett grafer som viser virkningen av Taxol og Tx|An2-konjugatet på NCI-H460-cellesyklusen målt ved FACS. Cellene ble utsatt for bærer (DMSO), Taxol (100 nM) eller Tx|An2-konjugat (30 nM, tilsvarende 100 nM Taxol) i 24 timer.

Fig. 21A er en graf som viser opphoping av forskjellige legemidler i MDCK-celler transfektert med MDR1 i nærvær eller fravær (kontroll) av 10 μ M CsA, en P-gp-hemmer. Forsøket ble utført i nærvær av 1 % DMSO.

Fig. 21B er en graf som viser opphoping av konjugatet i celler som overuttrykker P-gp.

Fig. 22A og 22B er fotografier av western blots som viser immundetektering av LSP i humane hjernesvulstbiopsier.

Fig. 23A og 23B er en skjematisk framstilling av bindingen av et legemiddel til vektoren ifølge oppfinnelsen.

Fig. 24 er et kromatogram som illustrerer framstilling av Tx|An2 (3:1)-konjugatet.

Fig. 25 er en HPLC-analyse av toppen renses på en hydrofob kolonne ved hjelp av AKTA-explorer.

Fig. 26 illustrerer hvordan Angiopep-2 forbinder seg med den lette og tunge kjeden av IgG.

Fig. 27 illustrerer økt hjernefordelingsvolum av IgG/Angiopep-2-konjugater fornett med sulfo-EMCS.

Fig. 28 illustrerer hjernegjennomtrengingen for IgG/Angiopep 2-konjugatet ved hjerneperfusering in situ.

Fig. 29 viser et autoradiogram av radioaktivt merkede [125 I]-IgG/Angiopep-konjugater.

Fig. 30 illustrerer den tilsvarende detekteringen av EGFR på U87-celler med anti-EGFR og anti-EGFR/Angiopep-2-konjugat ved FACS-analyse.

Fig. 31 illustrerer fordelingsvolumet i hjerneparenkymet til fritt og Angiopep-2-konjugert EGFR-antistoff.

Fig. 32 illustrerer fordelingsvolumet i hjerneparenkymet til fritt og Angiopep-2-konjugert VEGF-antistoff.

Fig. 33 illustrerer opptaket av konjugater som inneholder forskjellige proporsjoner mellom vektor og virkestoff (antistoff) i parenkymet.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

[0063] Vi har oppdaget at Angiopep-7, kan transporteres effektivt inn i bestemte celletyper eller organer som lever, lunge, nyre, milt og muskler, men ikke transporteres effektivt gjennom blod/hjerne-barrieren (BHB), sammenliknet med polypeptider som Angiopep-1 eller Angiopep-2. På dette grunnlaget har vi identifisert Angiopep-7 som en vektor egnet for å transportere virkestoffer (f.eks. for å behandle sykdommer forbundet med disse vevene, for eksempel kreft eller en av de andre sykdommene som beskrives her). Vi har også identifisert andre polypeptider, blant annet Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 og Angiopep-6, som også kan brukes som vektorer ifølge oppfinnelsen. Disse polypeptidene kan beholde

evnen til å transporteres effektivt gjennom BHB, eller til å transporteres inn i bestemte vev eller celletyper (f.eks. lever, lunger, nyrer, milt eller muskel). For disse polypeptidene kan virkestoffer som ikke er i stand til å eller ikke effektivt kan trenge gjennom BHB, transporteres gjennom BHB når de er bundet til polypeptidet. Konjugatene kan være i form av en sammensetning, for eksempel en farmasøytisk sammensetning, for behandling eller diagnose av en sykdom eller lidelse.

[0064] Konjugatene ifølge oppfinnelsen (f.eks. noen av de som beskrives her) kan også ha bedre farmakokinetiske egenskaper in vivo enn virkestoffet alene. Disse egenskapene kan omfatte økt halveringstid in vivo eller økt konsentrasjon i, økt opphopingshastighet i eller redusert utskilling fra en ønsket celletype. På dette grunnlaget kan det være mulig å gi konjugater ifølge oppfinnelsen til en pasient enten med lavere dose, mindre hyppig eller mer kortvarig enn for det ubundne virkestoffet. Lavere mengde, mindre hyppighet eller kortere varighet av medisineringsen kan være spesielt ønskelig for terapeutika med kjente bivirkninger. I andre tilfeller kan binding av virkestoffet til et polypeptid som beskrives her gi høyere effektivitet på grunn av økt konsentrasjon i målceller eller målvev. Faktisk kan uønskede bivirkninger reduseres ved å konsentrere virkestoffet i en målcelletype (f.eks. med økt effektivitet). Dette kan gjøre behandlingsbehovet mer kortvarig. I noen tilfeller kan det til og med være mulig å gi konjugatet med høyere dose, hyppighet eller lengre varighet enn dosen av det ubundne virkestoffet, og observere økt effektivitet, færre bivirkninger eller begge deler.

Polypeptider ifølge oppfinnelsen

[0065] Oppfinnelsen tilveiebringer alle polypeptidene som beskrives her, for eksempel alle polypeptidene som beskrives i tabell 1 (f.eks. et polypeptid definert i alle SEKV.-IDNR.: 1–105 og 107–112, f.eks. SEKV.-IDNR.: 1–97, 99, 100, 101 eller 107–112), eller alle fragmenter, analoger, derivater eller varianter av disse. I visse utførelsesformer kan polypeptidet være minst 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % eller 100 % identisk med et polypeptid som beskrives her. Polypeptidet kan ha en eller flere (f.eks. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 eller 15) substitusjoner i forhold til en av sekvensene som beskrives her. Andre modifikasjoner beskrives mer inngående nedenfor.

[0066] Oppfinnelsen tilveiebringer fragmenter av disse polypeptidene (f.eks. et funksjonelt fragment). I visse utførelsesformer kan fragmentene gå inn i eller hope seg opp i en bestemt celletype (f.eks. lever, lunge, nyre, milt eller muskel) eller kan trenge gjennom BHB. Trunkeringer av polypeptidet kan være 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 eller flere aminosyrer enten fra N-enden av polypeptidet eller C-enden av polypeptidet, eller en kombinasjon av disse. Andre fragmenter kan være sekvenser der indre deler av polypeptidet er fjernet.

[0067] Andre polypeptider kan identifiseres ved å bruke en av analysene eller metodene som beskrives i U.S. Patent Application Publication No. 2006/0189515, eller ved enhver annen kjent metode. For eksempel kan en kandidatvektor produseres ved konvensjonell polypeptidsyntese, bindes til Taxol og gis til et forsøksdyr. En biologisk aktiv vektor kan identifiseres for eksempel ut fra hvor effektiv den er til å øke overlevelsessevnen til et dyr som har fått injisert svulstceller

og behandles med konjugatet sammenliknet med en kontroll som ikke er behandlet med et konjugat (f.eks. behandlet med det ubundne virkestoffet).

[0068] I et annet eksempel kan et biologisk aktivt polypeptid identifiseres ved at det lokaliseres i parenkymet ved en hjerneperfuseringssanalyse in situ. BHB-analyser in vitro, for eksempel modellen som er utviklet av CELLIAL™ Technologies, kan brukes til å identifisere slike vektorer.

[0069] Det kan også utføres analyser for å bestemme opphoping i andre vev. Se for eksempel eksempel 1 her. Merkede konjugater av et polypeptid kan gis til et dyr, og opphopingen i forskjellige organer kan måles. For eksempel kan et polypeptid bundet til en detekterbar merking (f.eks. en merking for nær-infrarød fluorescensspektroskopi, som f.eks. Cy5.5), brukes til direkte in vivo-visualisering. Et slikt polypeptid kan gis til et dyr, og nærvær av polypeptidet i et organ kan detekteres slik at hastigheten til og mengden av opphopingen av polypeptidet kan bestemmes i det ønskede organet. I andre utførelsesformer kan polypeptidet være merket med en radioaktiv isotop (f.eks. ^{125}I). Så gis polypeptidet til et dyr. Etter en tid blir dyret drept og organene fjernes. Så kan mengden av radioisotopen i hvert organ måles med ethvert kjent virkemiddel. Ved å sammenlikne mengden av et merket kandidatpolypeptid i et bestemt organ med mengden av merket kontroll, kan hastigheten til og mengden av opphopingen av et kandidatpolypeptid i et bestemt vev bestemmes. Passende negative kontroller er ethvert polypeptid som er kjent for at det ikke transporteres inn i en bestemt celletype.

TABELL 1

SEKV.-IDNR.:

1	T	F	V	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D
2	T	F	Q	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	T	E	K	E
3	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	R	N	N	F	D	T	E	E	Y
4	S	F	Y	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	E	E	E
5	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
6	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
7	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	Y	K	R	A	K	Y
8	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
9	T	F	Q	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
10	T	F	Q	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
11	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
12	T	F	F	Y	G	G	S	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
13	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
14	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	Y	K	R	A	K	Y
15	P	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
16	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	E	K	Y
17	P	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	F	K	R	A	K	E
18	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	D
19	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	A	K	Y
20	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	E	Y
21	P	F	F	Y	G	G	C	G	A	N	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
22	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	T	A	K	Y
23	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
24	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
25	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
26	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	F	K	R	A	K	Y
27	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
28	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
29	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	K	S	A	K	Y
30	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	D	R	E	K	Y
31	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	L	R	E	K	E
32	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	F	D	R	A	K	Y
33	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	G	N	N	F	D	R	A	K	Y

TABELL 1

34	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	K	Y			
35	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	G	N	N	Y	V	T	A	K	Y			
36	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	G	N	N	F	L	T	A	K	Y			
37	S	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	F	L	T	A	K	Y			
38	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	K	N	N	F	V	R	E	K	Y			
39	T	F	F	Y	G	G	C	M	G	N	K	N	N	F	V	R	E	K	Y			
40	T	F	F	Y	G	G	S	M	G	N	K	N	N	F	V	R	E	K	Y			
41	P	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	Y	V	R	E	K	Y			
42	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	V	R	E	K	Y			
43	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	V	R	E	K	Y			
44	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	G	N	N	F	L	T	A	K	Y			
45	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	L	T	A	E	Y			
46	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	K	S	A	E	Y			
47	P	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	F	K	T	A	E	Y			
48	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
49	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	D			
50	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y			
51	S	F	F	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y			
52	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	G	N	N	F	L	R	E	K	Y			
53	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y			
54	S	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	Y	L	R	E	K	Y			
55	T	F	F	Y	G	G	S	L	G	N	G	N	N	F	V	R	E	K	Y			
56	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	V	T	A	E	Y			
57	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	G	N	N	F	V	S	A	E	Y			
58	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	D	R	A	E	Y			
59	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	L	R	E	E	Y			
60	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	E	E	Y			
61	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	R	N	N	Y	L	R	E	E	Y			
62	P	F	F	Y	G	G	S	G	G	N	R	N	N	Y	L	R	E	E	Y			
63	M	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	V	A	R	I			
64	A	R	I	I	R	Y	F	Y	N	A	K	A	G	L	C	Q	T	F	V	Y	G	
65	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	Y	K	S	A	E	D	C	M	R	T	C	G
66	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	V	A	R	I	I	R	Y	F	Y
67	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
68	K	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			

TABELL 1

69	T	F	Y	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	Y	K	T	E	E	Y			
70	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
71	C	T	F	F	Y	G	C	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y		
72	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y	C		
73	C	T	F	F	Y	G	S	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y		
74	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y	C		
75	P	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
76	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	K	E	Y			
77	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
78	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	K	R	Y			
79	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	T	A	E	Y			
80	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	T	A	G	Y			
81	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	R	E	K	Y			
82	T	F	F	Y	G	G	K	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y			
83	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
84	T	F	F	Y	G	C	G	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
85	T	F	F	Y	G	G	R	C	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
86	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	F	D	T	E	E	E			
87	T	F	Q	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
88	Y	N	K	E	F	G	T	F	N	T	K	G	C	E	R	G	Y	R	F			
89	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	M	N	N	F	E	T	L	E	E			
90	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	F	L	R	L	K	Y			
91	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	L	K	Y			
92	K	T	K	R	K	R	K	K	Q	R	V	K	I	A	Y	E	E	I	F	K	N	Y
93	K	T	K	R	K	R	K	K	Q	R	V	K	I	A	Y							
94	R	G	G	R	L	S	Y	S	R	R	F	S	T	S	T	G	R					
95	R	R	L	S	Y	S	R	R	R	F												
96	R	Q	I	K	I	W	F	Q	N	R	R	M	K	W	K	K						
97	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
98	M	R	P	D	F	C	L	E	P	P	Y	T	G	P	C	V	A	R	I			
	I	R	Y	F	Y	N	A	K	A	G	L	C	Q	T	F	V	Y	G	G			
	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D	C	M	R	T	C	G	G	A	
99	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	T	K	E	Y			
100	R	F	K	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	L	K	Y			

TABELL 1

101	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y			
102	N	A	K	A	G	L	C	Q	T	F	V	Y	G	G	C	L	A	K	R	N	N	F
	E	S	A	E	D	C	M	R	T	C	G	G	A									
103	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D	C	M	R	T	C	G
	G	A																				
104	G	L	C	Q	T	F	V	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E
105	L	C	Q	T	F	V	Y	G	G	C	E	A	K	R	N	N	F	K	S	A		
107	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
108	R	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
109	R	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	R	N	N	F	K	T	E	E	Y			
110	R	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	R	N	N	F	R	T	E	E	Y			
111	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	R	N	N	F	R	T	E	E	Y			
112	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	R	R	N	N	F	R	T	E	E	Y			

Peptid nr. 5 omfatter sekvensen til SEKV.-IDNR.: 5 og er amidert i C-enden (se for eksempel fig. 1).

Peptid nr. 67 omfatter sekvensen til SEKV.-IDNR.: 67 og er amidert i C-enden (se for eksempel fig. 1).

Peptid nr. 76 omfatter sekvensen til SEKV.-IDNR.: 76 og er amidert i C-enden (se for eksempel fig. 1).

Peptid nr. 91 omfatter sekvensen til SEKV.-IDNR.: 91 og er amidert i C-enden (se for eksempel fig. 1).

Peptid nr. 107 omfatter sekvensen til SEKV.-IDNR.: 97 og er acetyliert i N-enden.

Peptid nr. 109 omfatter sekvensen til SEKV.-IDNR.: 109 og er acetyliert i N-enden.

Peptid nr. 110 omfatter sekvensen til SEKV.-IDNR.: 110 og er acetyliert i N-enden.

[0070] Amingruppene i Angiopep-1 (SEKV.-IDNR.: 67) og Angiopep-2 (SEKV.-IDNR.: 97) har vært brukt som posisjoner for å binde agenter. For å studere rollen til amingrupper i bindingen og hvordan de påvirker den totale transportevnen til disse vektorene ble det utformet nye vektorer ut fra Angiopep-1- og Angiopep-2-sekvensene med variabelt reaktive amingrupper og variabel totalladning. Disse polypeptidene er framstilt i tabell 2.

Tabell 2: Vektorer med variable amingruppemål

Polypeptidnavn	Polypeptidsekvenser	Reaktive aminer (posisjoner)	Ladning	SEKV.-IDNR.
Angiopep-3*	Ac ¹ -TFFYGGSRGKRNNFKTEEY	2 (10,15)	+1	107
Angiopep-4b	RFFYGGSRGKRNNFKTEEY	3 (1,10,15)	+3	108
Angiopep-4a	Ac ¹ -RFFYGGSRGKRNNFKTEEY	2 (10,15)	+2	109
Angiopep-5	Ac ¹ -RFFYGGSRGKRNNFRTEEY	1 (10)	+2	110
Angiopep-6	TFFYGGSRGKRNNFRTEEY	2 (1,10)	+2	111
Angiopep-7	TFFYGGSRGRRNNFRTEEY	1 (1)	+2	112

*Angiopep-3 er en acetyliert form av Angiopep-2.

¹Ac representerer acetylering.

Modifiserte polypeptider

[0071] Oppfinnelsen inkluderer også et polypeptid med en modifikasjon av et polypeptid som har en sekvens beskrevet i SEKV.-IDNR.: 112, som Angiopep-7. Det bekjentgjøres også et polypeptid med en modifikasjon av en aminosyresekvens som beskrives her (f.eks. polypeptid som har en sekvens beskrevet i en av SEKV.-IDNR.: 1–105 og 107–111 (f.eks. Angiopep-3, -4a, -4b, -5 eller -6). I visse utførelsesformer ødelegger ikke modifikasjonen en ønsket biologisk aktivitet i vesentlig grad. I noen utførelsesformer kan modifikasjonen redusere den biologiske aktiviteten (f.eks. med minst 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 35 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 % eller 95 %). I andre utførelsesformer har modifikasjonen ingen virkning på den biologiske aktiviteten eller kan øke (f.eks. med minst 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, 200 %, 500 % eller 1000 %) den biologiske aktiviteten til det opprinnelige polypeptidet. Det modifiserte polypeptidet kan ha eller kan optimalisere en eller flere av egenskapene til et polypeptid ifølge oppfinnelsen som i noen tilfeller kan være nødvendige eller ønskelige. Slike egenskaper er blant annet stabilitet in vivo, biologisk tilgjengelighet, giftighet, immunologisk aktivitet eller immunologisk identitet.

[0072] Polypeptider ifølge oppfinnelsen kan omfatte aminosyrer eller sekvenser modifisert enten ved naturlige prosesser, som for eksempel posttranslasjonell bearbeiding eller ved kjente kjemiske modifiseringsmetoder. Modifikasjoner kan opptre hvor som helst i et polypeptid, blant annet i polypeptidryggraden, sidekjedene til aminosyrene og i amino- eller karboksyenden. Den samme typen modifikasjon kan være til stede i samme eller varierende grad i flere posisjoner i et gitt polypeptid, og et polypeptid kan inneholde mer enn én type modifikasjon. Polypeptider kan være forgrenet på grunn av ubikvitinering, og de kan være sykliske, med eller uten forgrening. Sykliske, forgrenede og forgrenede sykliske polypeptider kan stamme fra posttranslasjonelle naturlige prosesser eller kan lages syntetisk. Andre modifiseringer er blant annet pegylering, acetylering, acylering, tilførsel av en acetamidometylgruppe (Acm), ADP-ribosylering, alkylering, amidering, biotinylering, karbamoylering, karboksyetylering, forestring, kovalent binding til flavin, kovalent binding til en hemgruppe, kovalent binding til et nukleotid eller et nukleotidderivat, kovalent binding av et legemiddel, kovalent binding av en merking (f.eks. fluorescerende eller radioaktiv), kovalent binding av et lipid eller lipidderivat, kovalent binding av fosfatidylinositol, fornetting, ringslutning, disulfidbinding, demetylering, kovalent fornetting, cystindanning, pyroglutamatdanning, formylering, gammakarboksylering, glykosylering, danning av GPI-anker, hydroksylering, jodering, metylering, myristoylering, oksydering, proteolytisk bearbeiding, fosforylering, prenylering, rasemisering, selenoylering, sulfatering, t-RNA-formidlet tilførsel av aminosyrer til proteiner, for eksempel arginylering og ubikvitinering.

[0073] Modifiseringen av polypeptidet kan også omfatte å sette inn, fjerne eller substituere en aminosyre, enten konservativt eller ikke-konservativt (f.eks. med D-aminosyrer, desaminosyrer) i polypeptidsekvensen (f.eks. hvis slike forandringer ikke forandrer den biologiske aktiviteten til polypeptidet vesentlig).

[0074] Substitusjonen kan være konservativ (dvs. der en rest byttes ut med en annen av samme allmenne type eller gruppe) eller ikke-konservativ (dvs. der en rest byttes ut med en aminosyre av en annen type). I tillegg kan en naturlig aminosyre

byttes ut med en ikke-naturlig aminosyre (dvs. en ikke-naturlig konservativ aminosyresubstitusjon eller en ikke-naturlig ikke-konservativ aminosyresubstitusjon).

[0075] Polypeptider som lages syntetisk kan omfatte å bytte ut aminosyrer med aminosyrer som DNA ikke naturlig koder for (f.eks. en ikke-naturlig/unaturlig aminosyre). Eksempler på ikke-naturlige aminosyrer er D-aminosyrer, en aminosyre med en acetylaminometylgruppe bundet til et svovelatom i cystein, en pegylert aminosyre, omegaaminosyrene av formel $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ der n er 2–6, nøytrale upolare aminosyrer, som sarkosin, *t*-butylalanin, *t*-butylglycin, *N*-metylisoleucin og norleucin. Fenylglycin kan gå inn i stedet for Trp, Tyr eller Phe; sitrullin- og metioninsulfoksyd er nøytrale upolare, cysteinsyre er sur og ornitin er basisk. Prolin kan byttes ut med hydroksyprolin uten å miste de konformasjongivende egenskapene.

[0076] Analoger kan lages ved substitusjonsmutagenese uten at den biologiske aktiviteten til det opprinnelige peptidet går tapt. Eksempler på substitusjoner som identifiseres som «konservative substitusjoner» er framstilt i tabell 3. Hvis slike substitusjoner fører til en uønsket forandring, innføres andre typer substitusjoner som kalles «substitusjonseksempler» i tabell 3, eller som beskrevet nærmere her i forbindelse med aminosyreklasser, og produktene utsiles.

[0077] Betydelige modifikasjoner i funksjon eller immunologisk identitet fås ved å velge substitusjoner som er vesentlig forskjellige i virkningen på å opprettholde (a) strukturen til polypeptidryggraden i området for substitusjonen, for eksempel som en plate- eller spiralkonformasjon, (b) ladningen eller hydrofobisiteten til molekylet i målposisjonen, eller (c) omfanget til sidekjeden. Naturlige aminosyrerester er fordelt på grupper ut fra de vanlige egenskapene til sidekjedene:

1. (1) hydrofobe: norleucin, metionin (Met), alanin (Ala), valin (Val), leucin (Leu), isoleucin (Ile), histidin (His), tryptofan (Trp), tyrosin (Tyr), fenylalanin (Phe),
2. (2) nøytrale hydrofile: cystein (Cys), serin (Ser), treonin (Thr)
3. (3) sure/negativt ladde: asparaginsyre (Asp), glutaminsyre (Glu)
4. (4) basiske: asparagin (Asn), glutamin (Gln), histidin (His), lysin (Lys), arginin (Arg)
5. (5) aminosyrerester som virker inn på orienteringen av kjeden: glycin (Gly), prolin (Pro)
6. (6) aromatiske: tryptofan (Trp), tyrosin (Tyr), fenylalanin (Phe), histidin (His),
7. (7) polare: Ser, Thr, Asn, Gln
8. (8) basiske, positivt ladde: Arg, Lys, His, og
9. (9) ladde: Asp, Glu, Arg, Lys, His

[0078] Andre konservative aminosyresubstitusjoner går fram av tabell 3.

Tabell 3 Aminosyresubstituering

Opprinnelig aminosyrerest	Substitusjonseksempel	Konservativ substitusjon
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys

Opprinnelig aminosyrerest	Substitusjonseksempel	Konservativ substitusjon
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucin	Leu
Leu (L)	Norleucin, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucin	Leu

Andre analoger

[0079] Polypeptidene og konjugatene ifølge oppfinnelsen kan omfatte kjente polypeptidanaloger av aprotin. For eksempel beskriver U.S. Patent No. 5 807 980 hemmere avledet fra bovin trypsinhemmer fra bukspyttkjertelen (aprotinin) og en framgangsmåte for å framstille dem og bruke dem terapeutisk, inkludert polypeptidet i SEKV.-IDNR.: 102. Disse polypeptidene har vært brukt til å behandle en lidelse som karakteriseres ved abnormt utseende eller mengde av vevsfaktor og/eller faktor VIIIa, for eksempel abnorm trombose. U.S. Patent No. 5 780 265 beskriver serinproteasehemmere som kan hemme kallikrein i plasma, inkludert SEKV.-IDNR.: 103. U.S. Patent No. 5,118,668 beskriver varianter av bovin trypsinhemmer fra bukspyttkjertelen, inkludert SEKV.-IDNR.: 105. Aminosyresekvensen til aprotinin (SEKV.-IDNR.: 98), Angiopep-1 (SEKV.-IDNR.: 67) og SEKV.-IDNR.: 104 og noen sekvenser av biologisk aktive analoger finnes i internasjonalt søknadspubliseringssnr. WO 2004/060403.

[0080] Et eksempel på en nukleotidsekvens som koder for en aprotininanalog er illustrert i SEKV.-IDNR.: 106 (atgagaccag atttctgcct cgagccgccg tacactgggc cctgcaaagc tcgtatcatc cggtacttct acaatgcaaa ggcaggcctg tgtcagacct tcgtatcacg)

cggtgcaga gctaagcgta acaactcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgccg tgggtgcttag; genbanktilvekstnr. X04666). Denne sekvensen koder for et lysin i posisjon 16 i stedet for et valin som i SEKV.-IDNR.: 98. En mutasjon i nukleotidsekvensen til SEKV.-IDNR.: 106 kan innføres ved kjente metoder for å forandre produktpolypeptidet til SEKV.-IDNR.: 98 som har valin i posisjon 16. Andre mutasjoner eller fragmenter kan fås ved hvilke som helst kjente metoder.

[0081] Andre eksempler på aprotininanaloger kan finnes ved å utføre en protein-BLAST (genbank: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) med den syntetiske aprotininsekvensen (eller en del av den) som er framlagt i internasjonalt søknadsnr. PCT/CA2004/000011. Eksempler på aprotininanaloger finnes under tilvekstnr. CAA37967 (GI:58005) og 1405218C (GI:3604747).

Framstilling av polypeptidderivater og peptidhermere

[0082] I tillegg til polypeptider som består bare av naturlige aminosyrer omfattes også peptidhermere eller polypeptidanaloger av den foreliggende oppfinnelsen. Polypeptidanaloger brukes vanlig i den farmasøytiske industrien som ikke-polypeptidiske legemidler med egenskaper som tilsvarer egenskapene til malpolypeptidet. De ikke-polypeptidiske forbindelsene kalles «polypeptidhermere» eller peptidomimetika (Fauchere et al., *Infect. Immun.* 54:283–287, 1986; Evans et al., *J. Med. Chem.* 30:1229–1239, 1987). Polypeptidhermere som er strukturelt beslektet med terapeutisk nyttige polypeptider kan brukes til å oppnå en likeverdig eller bedre terapeutisk eller profylaktisk virkning. I allmennhet likner strukturen til peptidomimetika på strukturen til paradigmpolypeptidet (dvs. et polypeptid som har biologisk eller farmakologisk aktivitet) som for eksempel naturlige reseptorbindende polypeptider, men har eventuelt en eller flere peptidbindinger byttet ut med bindinger som $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis og trans), $\text{CH}_2\text{SO}-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, $-\text{COCH}_2-$ osv., ved kjente framgangsmåter (Spatola, *Peptide Backbone Modifications*, Vega Data, 1(3):267, 1983); Spatola et al. (*Life Sci.* 38:1243–1249, 1986); Hudson et al. (*Int. J. Pept. Res.* 14:177–185, 1979); og Weinstein. B., 1983, *Chemistry and Biochemistry, of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Weinstein red., Marcel Dekker, New-York). Slike polypeptidhermere kan ha vesentlige fordeler framfor naturlige polypeptider, blant annet mer økonomisk produksjon, bedre kjemisk stabilitet, bedre farmakologiske egenskaper (f.eks. halveringstid, opptak, styrke, effektivitet), mindre antigenisitet og annet.

[0083] Selv om polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan være effektive når det gjelder å komme inn i bestemte celletyper (f.eks. slike som beskrives her), kan effektiviteten reduseres i nærvær av proteaser. Serumproteaser har spesifikke substratkrav. Substratet må ha både L-aminosyrer og peptidbindinger der de kan spaltes. Dessuten virker eksopeptidaser, som er den mest framtreddende bestanddelen av proteaseaktiviteten i serum, vanligvis på den første peptidbindingen til polypeptidet og krever en fri N-ende (Powell et al., *Pharm. Res.* 10:1268–1273, 1993). Av hensyn til dette er det ofte en fordel å bruke modifiserte versjoner av polypeptider. De modifiserte polypeptidene beholder strukturegenskapene til de opprinnelige L-aminosyrepeptidene som gir biologisk aktivitet med henblikk på IGF-1, men har den fordel at de ikke har lett for å spaltes av protease og/eller eksopeptidaser.

[0084] Systematisk utskifting av en eller flere aminosyrer i en konsensussekvens

med D-aminosyrer av samme type (f.eks. D-lysin i stedet for L-lysin), kan brukes til å lage mer stabile polypeptider. Altså kan et polypeptidderivat ifølge den foreliggende oppfinnelsen være enten helt L, helt D eller et blandet D-, L-polypeptid. En D-aminosyre i N-enden eller C-enden øker stabiliteten av et polypeptid *in vivo* fordi peptidaser ikke kan bruke en D-aminosyre som substrat (Powell et al., *Pharm. Res.* 10:1268–1273, 1993). Omvendte D-polypeptider er polypeptider som inneholder D-aminosyrer i motsatt rekkefølge av et polypeptid som inneholder L-aminosyrer. Altså blir C-enderesten av et L-aminosyrepolypeptid N-ende for D-aminosyrepolypeptidet, osv. Omvendte D-polypeptider beholder den samme tertiære konformasjonen og derfor den samme aktiviteten som L-aminosyrepeptider, men er mer stabile overfor enzymatisk biologisk nedbryting *in vitro* og *in vivo*, og har derfor høyere terapeutisk effektivitet enn det opprinnelige polypeptidet (Brady og Dodson, *Nature* 368:692–693, 1994; Jameson et al., *Nature* 368:744–746, 1994). I tillegg til omvendte D-polypeptider, kan tvungne polypeptider som innbefatter en konsensussekvens eller en stort sett identisk konsensussekvensvariasjon lages med velkjente framgangsmåter (Rizo og Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387–418, 1992). For eksempel kan tvungne polypeptider lages ved å legge til cysteinrester som kan danne disulfidbruer slik at det blir et syklisk polypeptid. Sykliske polypeptider har ingen frie N- eller C-ender. Derfor er de ikke utsatt for proteolyse gjennom eksopeptidaser, men de er selvsagt utsatt for endopeptidaser, som ikke spalter i endene av peptidet. Aminosyresekvensene til polypeptidene med D-aminosyrer i N- eller C-enden og til de sykliske polypeptidene er vanligvis identiske med sekvensene til polypeptidene som de svarer til, bortsett fra henholdsvis D-aminosyrerestene i N- eller C-enden og den sirkulære strukturen.

[0085] Et syklisk derivat som inneholder en intramolekylær disulfidbinding kan lages ved konvensjonell fastfasesyntese med inkorporering av passende S-beskyttede cystein- eller homocysteinrester i posisjonene som velges for ringslutningen, som for eksempel amino- og karboksyendene (Sah et al., *J Pharm. Pharmacol.* 48:197, 1996). Når kjeden er ferdig sammensatt, kan ringene slutes enten (1) ved å fjerne den S-beskyttende gruppen selektivt og så oksydere de tilsvarende to frie SH-gruppene på underlaget til en S-S-binding og deretter fjerne produktet fra underlaget på konvensjonell vis og en passende renseprosedyre, eller (2) ved å fjerne polypeptidet fra underlaget samtidig som beskyttelsen fjernes fullstendig fra sidekjedene og så oksydere de frie SH-gruppene i svært fortynnet vannløsning.

[0086] Det sykliske derivatet som inneholder en intramolekylær amidbinding kan lages ved konvensjonell fastfasesyntese der man i posisjonen som velges for ringslutning inkorporerer passende aminosyrederivater med beskyttede amino- og karboksylsidekjeder. De sykliske derivatene som inneholder intramolekylære -S-alkylbindinger kan lages ved konvensjonell fastfasekjemi der man tar med en aminosyrerest med passende aminobeskyttet sidekjede og passende S-beskyttet cystein- eller homocysteinrest i posisjonen som velges for ringslutning.

[0087] En annen effektiv tilnærming for å oppnå motstandsdyktighet mot peptidaser som virker på N-enden eller C-enden av et polypeptid er å tilføye kjemiske grupper i endene av polypeptidet slik at det modifiserte polypeptidet ikke er substrat for peptidasen lenger. En slik kjemisk modifisering er glykosylering av polypeptidene i den ene enden eller begge. Det er påvist at visse kjemiske modifiseringer, spesielt N-terminal glykosylering, øker stabiliteten til polypeptider i humant serum (Powell et

al., Pharm. Res. 10:1268–1273, 1993). Andre kjemiske modifikasjoner som øker serumstabiliteten omfatter, men er ikke innskrenket til, å tilføye en alkylgruppe i N-enden som består av fra ett til tjue karboner, for eksempel en acetylgruppe, og/eller å tilføye en amidgruppe eller substituert amidgruppe i C-enden. Spesielt inkluderer den foreliggende oppfinnelsen modifiserte polypeptider som består av polypeptider med en acetylgruppe i N-enden og en amidgruppe i C-enden.

[0088] Inkludert i den foreliggende oppfinnelsen er også andre typer polypeptidderivater som inneholder andre kjemiske grupper som ikke normalt er en del av polypeptidet, så sant derivatet beholder den ønskede funksjonelle aktiviteten til polypeptidet. Eksempler på slike derivater er (1) *N*-acylderivater av aminoenden eller av en annen fri aminogruppe, der acylgruppen kan være en alkanoyolgruppe (f.eks. acetyl, heksanoyl, oktanoyl), en aroylgruppe (f.eks. benzoyl) eller en blokkeringsgruppe som F-moc (fluorenylmetyl-O-CO-), (2) estere av karboksyenden eller av en annen fri karboksyl- eller hydroksylgruppe, (3) amid av karboksyenden eller av en annen fri karboksylgruppe dannet ved reaksjon med ammoniakk eller et passende amin, (4) fosforylerte derivater, (5) derivater bundet til et antistoff eller en annen biologisk ligand, og andre typer derivater.

[0089] Den foreliggende oppfinnelsen omfatter også lengre polypeptidsekvenser som lages ved å tilføye flere aminosyrerester til polypeptidene ifølge oppfinnelsen. Slike lengre polypeptidsekvenser ville forventes å ha samme biologiske aktivitet (f.eks. gå inn i bestemte celletyper) som de ovennevnte polypeptidene. Polypeptider med et betydelig antall ekstra aminosyrer er ikke utelukket. Det er anerkjent at noen store polypeptider kan anta en konfigurasjon som maskerer den effektive sekvensen og dermed hindrer binding til et mål (f.eks. et medlem av LRP-reseptorfamilien som LRP eller LRP2). Disse derivatene kunne fungere som konkurrerende antagonister. Den foreliggende oppfinnelsen omfatter polypeptider eller derivater av polypeptidene som beskrives her og som har en forlengelse, men det er ønskelig at forlengelsen ikke ødelegger cellemåletingsaktiviteten til polypeptidet eller derivatet.

[0090] Andre derivater i den foreliggende oppfinnelsen er doble polypeptider som består av to av de samme eller to forskjellige polypeptider ifølge den foreliggende oppfinnelsen kovalent bundet til hverandre enten direkte eller gjennom et mellomledd, for eksempel en kort sekvens av alaninrester eller et antatt proteolysesete (f.eks. gjennom katepsin, se f.eks. U.S. Patent No. 5,126,249 og europeisk patent nr. 495 049). Multimerer av polypeptidene ifølge den foreliggende oppfinnelsen består av polymerer av molekyler som dannes av samme polypeptid eller forskjellige polypeptider eller derivater av disse.

[0091] Den foreliggende oppfinnelsen omfatter også polypeptidderivater som er kimære proteiner eller fusjonsproteiner som inneholder et polypeptid som beskrevet her, eller et fragment av det, bundet i amino- eller karboksylenden eller begge, til en aminosyresekvens av et annet protein. Et slike kimært protein eller fusjonsprotein kan lages ved rekombinant uttrykking av en nukleinsyre som koder for proteinet. For eksempel kan et kimært protein eller fusjonsprotein inneholde minst 6 aminosyrer av et polypeptid ifølge den foreliggende oppfinnelsen, og det er ønskelig at det har en funksjonell aktivitet som er likeverdig med eller bedre enn et polypeptid ifølge oppfinnelsen.

[0092] Polypeptidderivater ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan lages ved å forandre aminosyresekvensene ved å bytte ut, legge til eller fjerne en aminosyrerest for å danne et funksjonelt likeverdig molekyl eller funksjonelt forbedret eller redusert molekyl hvis man ønsker det. Derivatet ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter, men er ikke begrenset til, slike som inneholder som primær aminosyresekvens hele eller en del av aminosyresekvensen til polypeptidene som beskrives her (f.eks. enhver av SEKV.-IDNR.: 1–105 og 107–112), inkludert endrede sekvenser som inneholder substitusjoner av funksjonelt likeverdige aminosyrerester. For eksempel kan en eller flere aminosyrerester i sekvensen erstattes med en annen aminosyre med liknende polaritet som fungerer som funksjonelt likeverdig og gir en «stille endring». Erstatninger for en aminosyre i en sekvens kan velges blant andre medlemmer av klassen som aminosyren hører til. For eksempel er de positivt ladde (basiske) aminosyrene bl.a. arginin, lysin og histidin. De upolare (hydrofobe) aminosyrene er bl.a. leucin, isoleucin, alanin, fenylalanin, valin, prolin, tryptofan og metionin. De uladde polare aminosyrene er bl.a. serin, treonin, cystein, tyrosin, asparagin og glutamin. De negativt ladde (sure) aminosyrene er bl.a. glutaminsyre og asparaginsyre. Aminosyren glycin kan legges enten i den upolare aminosyrefamilien eller den uladde (nøytrale) aminosyrefamilien. Når man erstatter aminosyrer innenfor samme familie av aminosyrer kalles det vanligvis konservative erstatninger.

Analyser for å identifisere peptidomimetika

[0093] Som beskrevet ovenfor har ikke-peptidylforbindelser som lages for å kopiere ryggradsgeometrien og farmakoforpresentasjonen (peptidomimetika) av polypeptidene som identifiseres ved framgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen, ofte større stoffskiftestabilitet, mer styrke, mer langvarig virkning og bedre biologisk tilgjengelighet.

[0094] De peptidhermende forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan fås ved alle de tallrike kjente tilnærmingene av framgangsmåter med kombinatoriske bibliotek, blant annet: biologiske bibliotek; romadresserbare parallelle fastfasebibliotek eller løsningsfasebibliotek; syntetiske biblioteksmetoder som krever utfolding; «én forbindelse per mikrokule»-biblioteksmetoden; og syntetiske biblioteksmetoder der det brukes affinitetskromatografisk utvalg. Den biologiske bibliotekstilnærmingen er begrenset til polypeptidbibliotek, mens de fire andre tilnærmingene kan brukes på polypeptider, ikke-peptidiske oligomerer eller bibliotek av småmolekylære forbindelser (Lam, *Anticancer Drug Des.* 12:145, 1997). Eksempler på framgangsmåter for å framstille molekylbibliotek kan finnes i litteraturen, for eksempel i: DeWitt et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909, 1993); Erb et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422, 1994); Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37:2678, 1994; Cho et al. (*Science* 261:1303, 1993); Carell et al. (*Angew. Chem, Int. Ed. Engl.* 33:2059, 1994 og 2061 i samme); og i Gallop et al. (*Med. Chem.* 37:1233, 1994). Bibliotek av forbindelser kan presenteres i løsning (f.eks. Houghten, *Biotechniques* 13:412–421, 1992) eller på mikrokuler (Lam, *Nature* 354:82-84, 1991), brikker (Fodor, *Nature* 364:555-556, 1993), bakterier eller sporer (U.S. Patent No. 5,223,409), plasmider (Cull et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865–1869, 1992) eller på bakteriofag (Scott og Smith, *Science* 249:386–390,

1990), eller luciferase, og den enzymatiske merkingen detekteres ved å bestemme omdanningsgraden av et passende substrat til produktet.

[0095] Så snart et polypeptid ifølge den foreliggende oppfinnelsen er identifisert, kan det isoleres og renses ved et vilkårlig antall standardmetoder, inkludert, men ikke innskrenket til, løselighetsforskjeller (f.eks. felling), sentrifugering, kromatografi (f.eks. affinitet, ionebytting, gelfiltrering eller liknende) eller ved enhver annen standardmetode som brukes til å rense polypeptider, peptidhermere eller proteiner. De funksjonelle egenskapene til et identifisert polypeptid av interesse kan undersøkes med enhver kjent funksjonsanalyse. Det er ønskelig å bruke analyser for å undersøke nedstrømsreseptorfunksjonen under intracellulær signalisering (f.eks. celleprolifisering).

[0096] For eksempel kan peptidhermerforbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelsen fås ved den følgende trefaseprosessen: (1) sile ut polypeptidene ifølge den foreliggende oppfinnelsen for å identifisere sekundære strukturregioner som trengs for å målsøke de bestemte celletypene som beskrives her; (2) bruke konformasjonsmessig innskrenkede dipeptidsurrogater til å raffinere ryggradsgeometrien og tilveiebringe organiske plattformer som svarer til disse surrogatene; og (3) bruke de beste organiske plattformene til å presentere organiske farmakoforer i bibliotek av kandidater som er utformet for å imitere den ønskede aktiviteten til det naturlige polypeptidet. I mer detalj er de tre fasene som følger. I fase 1 siles de viktigste kandidatpolypeptidene ut og strukturen sammenfattes for å identifisere forutsetningene for aktiviteten deres. Det framstilles en serie polypeptidanaloger av originalen. I fase 2 undersøkes de beste polypeptidanalogene ved hjelp av de konformasjonsmessig innskrenkede dipeptidanalogene. Indolizidin-2-on-, indolizidin-9-on- og kinolizidinon-aminosyrer (henholdsvis I²aa, I⁹aa og Qaa) brukes som plattformer for å studere ryggradsgeometrien til de beste polypeptidkandidatene. Disse og beslektede plattformer (gjennomgått i Halab et al., *Biopolymers* 55:101–122, 2000; og Hanessian et al. *Tetrahedron* 53:12789-12854, 1997) kan innføres i bestemte regioner av polypeptidet for å orientere farmakoforene i forskjellig retning. Ved biologisk evaluering av disse analogene identifiseres det forbedrede kandidatpolypeptider som imiterer de geometriske forutsetningene for aktiviteten. I fase 3 brukes plattformene fra de mest aktive kandidatpolypeptidene til å presentere organiske surrogater for farmakoforene som er ansvarlige for aktiviteten til det naturlige polypeptidet. Farmakoforene og de grunnleggende syntesebyggesteinene slås sammen i et parallelt synteseformat. Derivatisering av polypeptidene og de ovennevnte fasene kan gjøres med andre virkestoffer ved kjente framgangsmåter.

[0097] Strukturelle funksjonsforhold som er bestemt ut fra polypeptidene, polypeptidderivatene, peptidomimetika eller andre små molekyler ifølge den foreliggende oppfinnelsen, kan brukes til å raffinere og framstille analoge molekyllstrukturer som har liknende eller bedre egenskaper. Derfor omfatter forbindelser ifølge den foreliggende oppfinnelsen også molekyler som har strukturen, polariteten, ladningsegenskapene og sidekjedeegenskapene til felles med polypeptidene som beskrives her.

[0098] For å oppsummere kan fagfolk ut fra det som bekjentgjøres her utvikle utsilingsanalyser for polypeptider og peptidomimetika som kan brukes til å

identifisere forbindelser for å gjøre et virkestoff målsøkende for bestemte celletyper (f.eks. slike som beskrives her). Analysene ifølge denne oppfinnelsen kan utvikles for utslingsformater med lav gjennomstrømming, høy gjennomstrømming eller ultrahøy gjennomstrømming. Analyser ifølge den foreliggende oppfinnelsen er blant annet analyser som kan automatiseres.

Konjugater ifølge oppfinnelsen

[0099] Polypeptidene som beskrives her eller derivater av disse kan bindes til et virkestoff. For eksempel kan polypeptidet (f.eks. Angiopep-7) bindes til et terapeutisk virkestoff, et diagnostisk virkestoff eller til en merking. I visse utførelsesformer er polypeptidet bundet til eller merket med en detekterbar merking, for eksempel et radioaktivt bildediagnostisk virkestoff, for å påvise en sykdom eller lidelse. Eksempler på slike virkestoffer er et konjugat mellom et radioaktivt bildediagnostisk virkestoff, et antistoff og en vektor, der antistoffet bindes til et antigen som er spesifikt for en sykdom eller lidelse (f.eks. for diagnostikk eller behandling). Andre bindingsmolekyler overveies også ifølge oppfinnelsen. I andre tilfeller er polypeptidet eller derivatet bundet til et terapeutisk virkestoff for å behandle en sykdom eller lidelse, eller kan være bundet til eller merket med blandinger av slike virkestoffer. Sykdommen eller lidelsen kan behandles ved å gi et vektor/virkestoff-konjugat til et individ under forhold som gjør det mulig å transportere virkestoffet gjennom BHB eller inn i en bestemt celletype. Hvert polypeptid kan ha minst 1, 2, 3, 4, 5, 6 eller 7 virkestoffer. I andre utførelsesformer er det bundet minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 eller flere polypeptider til hvert virkestoff. Konjugatene ifølge oppfinnelsen kan være i stand til å fremme opphoping (f.eks. på grunn av høyere opptak eller lavere utskilling) av virkestoffet i en bestemt celletype eller et bestemt vev som lever, lunge, nyre, milt eller muskel hos en pasient.

[0100] Det kan være mulig å frigjøre virkestoffet fra vektoren etter at det er transportert inn i en bestemt celletype eller gjennom BHB. Virkestoffet kan frigjøres for eksempel ved å spaltes fra med enzymer eller på annen måte bryte en kjemisk binding mellom vektoren og virkestoffet. Det frigjorte virkestoffet kan da fungere slik det er tiltenkt i fravær av vektoren.

Terapeutiske virkestoffer

[0101] Et terapeutisk virkestoff kan være et hvilket som helst biologisk aktivt virkestoff. For eksempel kan et terapeutisk virkestoff være et legemiddel, et virkestoff som avgir stråling, en cellegift (for eksempel et kjemoterapeutikum), et biologisk aktivt fragment av disse eller en blanding av disse for å behandle en sykdom (f.eks. drepe kreftceller) eller det kan være et virkestoff for å behandle en sykdom eller lidelse hos et individ. Et terapeutisk virkestoff kan være et synteseprodukt eller et produkt fra sopp, bakterier eller andre mikroorganismer (f.eks. mykoplasma eller virus), fra dyr, for eksempel krypdyr eller planter. Et terapeutisk virkestoff og/eller biologisk aktivt fragment av dette kan være et enzymatisk aktivt virkestoff og/eller et fragment av dette, eller kan fungere ved å hemme eller blokkere en viktig og/eller essensiell cellereaksjonsgang eller ved å konkurrere med en viktig og/eller essensiell naturlig celled bestanddel. Andre terapeutiske virkestoffer er blant annet antistoffer og antistofffragmenter.

[0102] *Legemidler mot kreft.* Ethvert kjent legemiddel mot kreft kan være en del av et konjugat ifølge oppfinnelsen. Kreft i hjernen kan behandles med et konjugat som inneholder en vektor som transporteres effektivt gjennom BHB (f.eks. Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 eller Angiopep-6). Kreft i lever, lunger, nyrer eller milt kan behandles med et legemiddel mot kreft bundet til en vektor som transporteres effektivt inn i den aktuelle celletypen (f.eks. Angiopep-7). Eksempler på virkestoffer er abarelix, aldesleukin, alemtuzumab, alitretinoin, allopurinol, altretamin, amifostin, anakinra, anastrozol, arsentioksyd, asparaginase, azacitidin, levende BCG, bevacizumab, beksaroten, bleomycin, bortezomib, busulfan, kalusteron, kapecitabin, karboplatin, karmustin, celekoksib, cetuximab, klorambucil, cisplatin, cladribin, klofarabin, syklofosamid, cytarabin, dacarbazin, daktinomycin, aktinomycin D, dalteparin (f.eks. natrium), darbepoetin alfa, dasatinib, daunorubicin, daunomycin, decitabin, denileukin, denileukin diftitoks, deksrazoksan, docetaxel, doxorubicin, dromostanolonpropionat, ekulizumab, epirubicin (f.eks. HCl), epoetin alfa, erlotinib, estramustin, etoposid (f.eks. fosfat), eksemestan, fentanyl (f.eks. sitrat), filgrastim, floksuridin, fludarabin, fluoruracil, 5-FU, fulvestrant, gefitinib, gemcitabin (f.eks. HCl), gemtuzumab ozogamicin, goserelin (f.eks. acetat), histrelin (f.eks. acetat), hydroksyurea, ibritumomab tiuxetan, idarubicin, ifosfamid, imatinib (f.eks. mesylat), interferon alfa-2b, irinotekan, lapatinibditosylat, lenalidomid, letrozol, leukovorin, leuprolid (f.eks. acetat), levamisol, lomustin, CCNU, mekloretamin (nitrogensennepe), megestrol, melfalan (L-PAM), merkaptopurin (6-MP), mesna, metotreksat, metoksalen, mitomycin C, mitotan, mitoksantron, nandrolonfenpropionat, nelarabin, nofetumomab, oprelvekin, oksaliplatin, paklitaxel, palifermin, pamidronat, panitumumab, pegademase, pegaspargase, pegfilgrastim, peginterferon alfa-2b, pemetreksed (f.eks. dinatrium), pentostatin, pipobroman, plikamycin (mitramycin), porfimer (f.eks. natrium), prokarbazin, kinakrin, rasburikase, rituximab, sargramostim, sorafenib, streptozocin, sunitinib (f.eks. maleat), talk, tamoksifen, temozolomid, teniposid (VM-26), testolakton, talidomid, tioguanin (6-TG), tiotepa, topotekan (f.eks. HCl), toremifen, tositumomab/I-131 (tositumomab), trastuzumab, tretinoin (ATRA), uracilsennepe, valrubicin, vinblastin, vinkristin, vinorelbin, vorinostat, zoledronat og zoledronsyre. Eksempler på derivater av paklitaxel er beskrevet i U.S. Patent No. 6,911,549.

Detekterbare merkinger

[0103] Konjugatet ifølge oppfinnelsen kan merkes for detektering eller diagnostikk. Detekterbare merkinger kan være en radioaktiv merking, en fluorescensmerking, en aktiv kjernemagnetresonansmerking, en luminescensmerking, en kromoformerking, en positronutstrålende isotop for PET-skanning, en kjemiluminescensmerking eller en enzymatisk merking. Eksempler på merkinger for radioaktiv bildediagnostikk som avgir stråling (detekterbare radioaktive merkinger) er indium 111, technetium 99 eller lave doser av jod 131. Gamma- og betastrålende radionuklider er ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{90}Y , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ og ^{201}Tl . Positronutstrålende radionuklider er ^{18}F , ^{55}Co , ^{60}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{82}Rb og ^{86}Y . Fluorescensmerkinger er Cy5.5, grønt fluorescensprotein (GFP), fluorescein og rodamin. Kjemiluminescensmerkinger er blant annet luciferase og β -galaktosidase. Enzymatiske merkinger er blant annet peroksydase og fosfatase. En histag kan også være en detekterbar merking. For eksempel kan konjugatene ha en vektorgruppe og en antistoffgruppe (antistoff eller antistofffragment) som også kan ha en merking. I dette tilfellet kan merkingen bindes enten til vektoren eller til antistoffet.

Antistoffer

[0104] Antistoffer kan også bindes til polypeptidene ifølge oppfinnelsen ved alle kjente virkemidler (f.eks. ved å bruke bindingsstrategiene som beskrives her). Alle diagnostiske eller terapeutiske antistoffer kan bindes til en eller flere (f.eks. 2, 3, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 eller flere) vektorer ifølge oppfinnelsen. Dessuten kan antistoffragmenter (som f.eks. kan binde et antigen) også bindes til vektorene ifølge oppfinnelsen. Antistoffragmenter er blant annet Fab- og Fc-regionene, og den lette kjeden av et antistoff (f.eks. av alle antistoffer som beskrives her). Eksempler på antistoffer til bruk i diagnostikk og terapi av kreft er ABX-EGF (panitimumab), OvaRex (oregovemab), Theragyn (pemtumomab-yttrium 90), Therex, Bivatuzumab, Panorex (edrekolomab), ReoPro (abciximab), Bexxar (tositumomab), MAb, idiotypisk 105AD7, Anti-EpCAM (katumaxomab), MAb lungekreft (fra Cytoclonal), Herceptin (trastuzumab), Rituxan (rituximab), Avastin (bevacizumab), AMD Fab (ranibizumab), E-26 (2. gen. IgE) (omalizumab), Zevalin (rituxan + yttrium 90) (ibritumomab tiuxetan), Cetuximab, BEC2 (mitumomab), IMC-1C11, nuC242-DM1, LymphoCide (epratuzumab), LymphoCide Y-90, CEA-Cide (labetuzumab), CEA-Cide Y-90, CEA-Scan (Tc 99m-merket arcitumomab), LeukoScan (Tc 99m-merket sulesomab), LymphoScan (Tc 99m-merket bectumomab), AFP-Scan (Tc 99m-merket), HumaRAD-HN (+ yttrium-90), HumaSPECT (votumumab), MDX-101 (CTLA-4), MDX-210 (overuttrykking av her-2), MDX-210/MAK, Vitaxin, MAb 425, IS-IL-2, Campath (alemtuzumab), CD20 streptavidin, Avidicin, (albumin + NRLU13), Oncolym (+ jod 131) Cotara (+ jod 131), C215 (+ stafylokokkenterotoksin), MAb lunge-/nyrekreft (fra Pharmacia Corp.), nakolomab tafenatox (C242 stafylokokkenterotoksin), Nuvion (visilizumab), SMART M195, SMART 1D10, CEAVac, TriGem, TriAb, NovoMAb-G2 radioaktivt merket, Monopharm C, GlioMAb-H (+ gelonintoksin), Rituxan (rituximab) og ING-1. Andre terapeutiske antistoffer er 5G1.1 (ekluizumab), 5G1.1-SC (pekselizumab), ABX-CBL (gavilimomab), ABX-IL8, Antegren (natalizumab), Anti-CD11a (efalizumab), Anti-CD18 (fra Genetech), Anti-LFA1, Antova, BTI-322, CDP571, CDP850, Corsevin M, D2E7 (adalimumab), Humira (adalimumab), Hu23F2G (rovelizumab), IC14, IDEC-114, IDEC-131, IDEC-151, IDEC-152, Infliximab (remicade), LDP-01, LDP-02, MAK-195F (afelimomab), MDX-33, MDX-CD4, MEDI-507 (siplizumab), OKT4A, OKT3 (muromonab-CD3) og ReoPro (abciximab).

Konjugeringsbindeledd

[0105] Konjugatet (f.eks. et protein/protein-konjugat) kan lages med enhver kjent fornettingsreagens (konjugeringsreagens) eller protokoll, og mange av dem fås i handelen. Slike protokoller og reagenser er blant annet fornettingsmidler som reagerer med aminogrupeer, karboksylgrupper, sulfhydrylgrupper, karbonylgrupper, karbohydratgrupper og/eller fenolgrupper. Mengdene, tidene og forholdene for slike protokoller kan varieres for optimal binding. Fornettingsreagenser inneholder minst to reaktive grupper, og det skilles gjerne mellom homofunksjonelle fornettingsmidler (som inneholder identiske reaktive grupper) og heterofunksjonelle fornettingsmidler (som inneholder ikke-identiske reaktive grupper). Fornettingsmidlene ifølge oppfinnelsen kan være enten/både homobifunksjonelle og/eller heterobifunksjonelle. Dessuten kan fornettingsmidlet inneholde et 'mellomstykke' mellom de reaktive gruppene, eller de to reaktive gruppene i fornettingsmidlet kan være direkte forbundet med hverandre. Bindingene kan være esterbindinger.

[0106] Eksempler på bindeledd er BS³ [Bis(sulfosuksinimidyl)suberat], NHS/EDC (*N*-hydroksysuksinimid og *N*-etyl-(dimetylaminopropyl)karbodiimid, Sulfo-EMCS ([*N*-maleimidokaprønsyre]hydrazid), SATA (*N*-sukksinimidyl-*S*-acetyltioacetat) og hydrazid. BS³ er en homobifunksjonell *N*-hydroksysuksinimidester som retter seg mot tilgjengelige primære aminer. Fig. 2 viser et eksempel på en bindingsplan. NHS/EDC gjør det mulig å binde primære amingrupper til karboksylgrupper. Sulfo-EMCS er heterobifunksjonelle reaktive grupper (maleimid og NHS-ester) som er reaktive overfor sulfhydryl- og aminogrupper. Aminbinding ved sulfo-NHS/EDC-aktivering kan brukes til å fornette terapeutiske antistoffer med polypeptidene ifølge oppfinnelsen, som fig. 3 og 4 viser eksempler på. Dette er en rask, enkel og reproducerbar bindingsmetode. Det resulterende konjugatet er stabilt og beholder den biologiske aktiviteten til antistoffet. Dessuten har det høy bindingskapasitet som kan kontrolleres pålitelig, og lav ikke-spesifikk interaksjon under bindingsprosedyrene. SATA er reaktiv overfor aminer og brukes til å tilføye beskyttede sulfhydrylgrupper. NHS-esteren reagerer med primære aminer ved å danne stabile amidbindinger. Beskyttelsen på sulfhydrylgruppene kan fjernes med hydroksylamin. Fig. 5 viser et eksempel på denne bindingsmetoden. Hydrazid kan brukes til å binde karboksylgrupper til primære aminer, som vist på fig. 6, og kan derfor være nyttige for å binde glykoproteiner. Andre eksempler på bindeledd er illustrert på fig. 7.

[0107] Små molekyler, som terapeutiske virkestoffer, kan bindes til polypeptidene ifølge oppfinnelsen. Eksempelet på et lite molekyl, paklitaxel, har to strategiske posisjoner (posisjon C2' og C7) som kan brukes til binding. Bindingen av en vektor eller en vektor ifølge oppfinnelsen til paklitaxel kan gjøres som følger (fig. 8). Kort fortalt bringes paklitaxel til å reagere med vannfri ravsyrepipridin i tre timer ved romtemperatur for å binde en suksinylgruppe i posisjon 2'. 2'-suksinylpaklitaxel har en spaltbar esterbinding i posisjon 2' som ganske enkelt kan frigjøre ravsyre. Denne spaltbare esterbindingen kan så brukes til forskjellig modifisering med bindeledd hvis ønskelig. Det resulterende 2'-*O*-suksinylpaklitaxel bringes så til å reagere med EDC/NHS i DMSO i ni timer ved romtemperatur, og så blir det tilsatt vektor alene eller i Ringer/DMSO og reagert i fire timer ved romtemperatur. Reaksjonen med bindingen som er avbildet på fig. 8 overvåkes med HPLC. Hvert mellomprodukt, som paklitaxel, 2'-*O*-suksinylpaklitaxel og 2'-*O*-NHS-suksinylpaklitaxel, renses og godkjennes med forskjellige tilnærmingsmåter, som HPLC, tynnsjikt-kromatografi, NMR (¹³C- eller ¹H-utveksling), smeltepunkt eller massespektrometri. Det ferdige konjugatet analyseres ved massespektrometri og SDS-polyakrylamidgelelektroforese. Dette gjør det mulig å bestemme hvor mange paklitaxelmolekyler som er bundet på hver vektor.

Konjugataktiviteter

[0108] Ved å binde virkestoffet til en vektor som beskrives her, kan det oppnås ønskelige egenskaper, som forandret farmakokinetikk, forandret vevsfordeling (f.eks. økt formulering til bestemte vevstyper, som lever, hjerne, lunge, milt eller nyre). Kort sagt har vi identifisert vektorer som transporterer virkestoff effektivt gjennom BHB (f.eks. Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 og Angiopep-6). Som Angiopep-2 kan disse vektorene også være i stand til å målrette virkestoff mot andre celletyper eller vev (f.eks. lever, lunge, nyre, milt eller muskel). Vi har også identifisert en vektor, Angiopep-7, som ikke transporteres effektivt gjennom BHB,

men transporteres til bestemte vev (f.eks. lever, lunge, nyre, milt eller muskel). Derfor kan vektorer med denne aktiviteten være nyttig hvis transport gjennom BHB ikke er ønskelig.

[0109] Fordi konjugatene ifølge oppfinnelsen transporterer virkestoffer til bestemte vev, kan konjugerte virkestoff gi lavere giftighet (dvs. færre bivirkninger), høyere effektivitet (f.eks. fordi virkestoffet er konsentrert i et målvev på grunn av økt opptak eller redusert utskilling fra vevet eller cellene, eller fordi virkestoffet er mer stabilt når det er bundet), eller en kombinasjon av disse. Slike aktiviteter beskrives nedenfor og i internasjonal publikasjonsnr. WO 2007/009229.

[0110] I noen tilfeller gjør binding av et virkestoff til en vektor det mulig å unnsnippe virkningen av P-glykoprotein (P-gp), en effluxpumpe som kan pumpe ut visse virkestoffer fra en celle. Styrken til dette virkestoffet kan økes ved å redusere P-gp sin evne til å fjerne virkestoffet fra en celle. Disse konjugatene kan altså aktivt hemme kreftcellevekst. Dessuten tyder resultatene for svulstvekst in vivo på at vektorene ifølge oppfinnelsen kan dirigeres mot reseptoren LRP. Konjugeringen kan også modifisere farmakokinetikken eller den biologiske fordelingen til det ubundne virkestoffet.

[0111] Sammenfatningsvis kan konjugater brukes mot primære svulster, inkludert bryst-, lunge- og hudkreft samt til metastaser som stammer fra primære tumorer.

Omgåelse av P-glykoprotein

[0112] Fordi resistensen mot forskjellige kjemoterapeutika som vinkristin, etoposid og doksorubicin formidles gjennom overuttrykking av P-gp (MDR1) (fig. 9), kan det styrke virkningen av disse legemidlene mot forskjellige krefttyper hvis man går utenom denne effluxpumpen. Ved å binde en vektor til et slikt virkestoff er det nå mulig å redusere P-gp-formidlet effluks av virkestoffet. Disse konjugatene kan være nyttige til å øke styrken til legemidler som er forbundet med resistens formidlet av P-gp. Som det går fram av eksemplene nedenfor ble vektorene som beskrives her testet med hensyn til evnen til å unngå å bli drevet ut av P-gp.

LRP-formidlet opptak

[0113] Ifølge det tidligere arbeidet vårt (se internasjonal patentsøknad nr. PCT/CA2004/00011), hemmet reseptorforbundet protein (RAP) transcytose av aprotinin i en in vitro-modell av blod/hjerne-barrieren. LRP uttrykkes på flere forskjellige kreftceller (se f.eks. internasjonal patentsøknad nr. WO 2007/009229). Derfor foreslo vi at den lett lipoprotein-relaterte reseptoren (LRP) er involvert når aprotinin trenger gjennom til hjernen. Det ble også oppnådd tilsvarende hemming av transporten av Angiopep-1 og Angiopep-2 gjennom en in vitro-modell av blod/hjerne-barrieren (data ikke framstilt), noe som tyder på at transcytosen av disse polypeptidene gjennom hjerneendotelceller også involverte LRP. På dette grunnlaget antar vi at LRP kan være involvert, generelt, i opptaket av de aprotininbeslektede polypeptidene som beskrives her.

[0114] LRP er en heterodimer membranreseptor på 600 kDa som består av to underenheter: α -enheten (515 kDa) og β -enheten (85 kDa). Fordi LRP kan være

innblandet i transporten av en vektor som beskrevet her, kan konjugatene ifølge oppfinnelsen rettes mot celler og svulster som uttrykker denne reseptoren. For eksempel uttrykker visse kreftceller et medlem av LRP (f.eks. LRP eller LRP2).

Behandling

[0115] Oppfinnelsen tilveiebringer også polypeptidkonjugatene som beskrives her til bruk i en behandlingsmetode. Konjugater som transporteres effektivt gjennom BHB (f.eks. Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 og Angiopep-6) kan brukes i en framgangsmåte for å behandle enhver sykdom i hjernen eller sentralnervesystemet. Disse konjugatene transporteres også effektivt til leveren, lungene, nyrene, milten eller musklene og kan derfor også brukes, sammen med et passende terapeutisk virkestoff, til å behandle en sykdom som er forbundet med disse vevene (f.eks. en kreftform), Fordi Angiopep-7 ikke transporteres effektivt til hjernen men transporteres effektivt til vev og celler som for eksempel lever, lunge, nyre, milt og muskel, kan Angiopep-7 være spesielt velegnet som vektorbehandling av sykdommer forbundet med disse vevene når det ikke ønskes å dirigere virkestoffet mot hjernen.

[0116] Leversykdommer er blant annet amøbeleverabscess, cirrhose, disseminert koksidioidomykose; legemiddelkolestase, hemokromatose, hepatitt A, hepatitt B, hepatitt C, hepatitt D, hepatocellulært karsinom, leverkreft, leversykdommer som skyldes alkohol, primær biliær cirrhose, pyrogen leverabscess, Reyes syndrom, skleroserende kolangitt og Wilsons sykdom. Amøbeleverabscess kan behandles ved å gi en vektor bundet til metronidazol. Hepatitt B kan for eksempel behandles ved å gi en vektor bundet til interferon alfa, lamivudin, adefovir dipivoksil, entekavir eller andre antivirale legemidler. Hepatitt C kan for eksempel behandles ved å gi en vektor bundet til pegylert interferon eller ribavirin eller en kombinasjon av disse.

[0117] Lungesykdommer er lungekreft, for eksempel småcellet karsinom (f.eks. småcellet bronkogen karsinom), blandet små-/storcellet karsinom, kombinert småcellet karsinom og metastatiske svulster. Metastatiske svulster kan stamme fra kreft i hvilket som helst vev, blant annet brystkreft, tykktarmskreft, prostatakreft, sarkom, blærekreft, nevroblastom og Wilms tumor. Miltsykdommer er blant annet kreft, som for eksempel lymfom, ikke-hodgkinlymfom og visse T-cellelymfomer.

[0118] Andre eksempler på kreftformer som kan behandles med et konjugat eller en sammensetning ifølge oppfinnelsen er hepatocellulært karsinom, brystkreft, kreft i hodet og halsen inkludert forskjellige lymfomer som mantelcellelymfom, ikke-hodgkinlymfom, adenom, plateepitelkreft, strupekreft, kreft i netthinnen, kreft i spiserøret, multippelt myelom, eggstokkreft, livmorkreft, melanom, kolorektal kreft, blærekreft, prostatakreft, lungekreft (blant annet ikke småcellet karsinom), bukspyttkjertelkreft, livmorhalskreft, hudkreft, nasofaryngealt karsinom, liposarkom, epitelkarsinom, nyrecellekarsinom, adenokarsinom i galleblæren, parotidadenokarsinom, endometriumsarkom, multiresistent kreft; og prolifererende sykdommer og lidelser som neovaskularisering forbundet med svulstangiogenese, makuladegenerasjon (f.eks. våt/tørr AMD), neovaskularisering i hornhinnen, diabetisk retinopati, neovaskulært glaukom, myop degenerering og andre prolifererende sykdommer og lidelser som restenose og cystenyrrer. Hjernekreftformer som kan behandles med en vektor som transporteres effektivt

gjennom BHB er astrocytom, pilocytisk astrocytom, dysembryoplastisk nerveepitelsvulst, oligodendrogliomer, ependymom, glioblastoma multiforme, blandede gliomer, oligoastrocytomer, medulloblastom, retinoblastom, nevroblastom, germinom og teratom.

[0119] Et konjugat eller en sammensetning ifølge oppfinnelsen kan gis til pasienten på alle kjente måter, for eksempel oralt, intraarterielt, intranasalt, intraperitonealt, intravenøst, intramuskulært, subkutant, transdermalt. Virkestoffet kan for eksempel være et antiangiogenikum.

Farmasøytiske sammensetninger

[0120] Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan inneholde et polypeptid eller konjugat som beskrevet her sammen med en farmasøytisk aksepterbare bærer. Slike sammensetninger er væsker eller frysetørkede eller på andre måter tørkede formuleringer og inneholder fortynningsmidler med forskjellig bufferinnhold (f.eks. Tris-HCl, acetat, fosfat), pH og ionestyrke, tilsetninger som albumin eller gelatin for å hindre adsorpsjon på flater, overflateaktive midler (f.eks. Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, gallesyresalter). Løselighetsformidlere (f.eks. glyserol, polyetylenglykol), antioksydanter (f.eks. askorbinsyre, natriummetabisulfitt), konserveringsmidler (f.eks. timerosal, benzylalkohol, parabener), fyllstoffer eller tonisierungsmodifiserende midler (f.eks. laktose, mannitol), kovalent binding av polymerer som polyetylenglykol til proteinet, kompleksing med metallioner eller inkorporering av stoffet i eller på partikkelpreparater av polymerforbindelser som polymelkesyre, polyglykolsyre, hydrogeler osv. eller på liposomer, mikroemulsjoner, miceller, enkeltlags eller flerlags vesikler, tomme erytrocytter eller sferoplaster. Slike sammensetninger vil virke inn på den fysiske tilstanden, løseligheten, stabiliteten, hastigheten til frigjøringen in vivo og hastigheten til utskillingen in vivo. Sammensetninger for kontrollert eller langvarig frigjøring er blant annet formuleringer i lipofile depoter (f.eks. fettsyrer, voks, oljer). Oppfinnelsen innbefatter også partikkelsammensetninger belagt med polymerer (f.eks. poloksamerer eller poloksaminer). I andre utførelsesformer for sammensetningene ifølge oppfinnelsen inkorporeres det partikkelformer med beskyttende belegg, proteasehemmere eller gjennomtrengingsfremmere for forskjellige administreringsveier, blant annet parenteralt, pulmonært, nasalt, oralt, vaginalt og rektalt. I én utførelsesform gis den farmasøytiske sammensetningen parenteralt, parakanseralt, transmukosalt, transdermalt, intramuskulært, intravenøst, intradermalt, subkutant, intraperitonealt, intraventrikulært, intrakranielt eller intratumoralt.

[0121] Farmasøytisk aksepterbare bærere omfatter også 0,01–0,1 M eller 0,05 M fosfatbuffer eller 0,8 % saltløsning. Slike farmasøytisk aksepterbare bærere kan også være vandige eller ikke-vandige løsninger, suspensjoner og emulsjoner. Eksempler på ikke-vandige løsningsmidler er propylenglykol, polyetylenglykol, vegetabiliske oljer som olivenolje, og injiserbare organiske estere som etyloleat. Vandige bærere er blant annet vann, alkohol/vann-løsninger, emulsjoner eller suspensjoner, blant annet saltvann og bufret medium. Parentale bærere er natriumkloridløsning, Ringers dekstrose, dekstrose med natriumklorid, laktatert Ringers eller fikserte oljer. Intravenøse bærere er væske- og næringstilførselsløsninger, elektrolytttilførselsløsninger som de som er basert på Ringers dekstrose eller liknende. Konserveringsmidler og andre tilsetninger kan også

være til stede, for eksempel antimikrobielle midler, antioksydanter, kelatdannere, inerte gasser eller liknende.

[0122] Andre formuleringer inneholder polyoksyetylenestere av en fettsyre (f.eks. 12-hydroksystearinsyre) som for eksempel Solutol® HS 15. Altså kan en farmasøytisk sammensetning i noen utførelsesformer innbefatte a) et konjugat som beskrevet her, b) Solutol® HS15 og c) en vannløsning eller buffer (f.eks. Ringer/Hepes-løsning med pH 5 til 7). Konsentrasjonen av Solutol® HS15 i formuleringen kan være minst 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % eller 60 % (f.eks. 30 %) eller innenfor ethvert intervall mellom ethvert par av disse tallene. Konsentrasjonen av konjugat kan bestemmes ut fra dosen som er nødvendig for å behandle en pasient effektivt, eller mengden av ester som er nødvendig for løseligheten av konjugatet som gis. Bruk av Solutol i en formulering for å gi et Taxol-konjugat beskrives for eksempel i internasjonalt publikasjonsnr. WO 2007/009229.

Faste doseringsformer til oral bruk

[0123] Formuleringer til oralt bruk omfatter tabletter som inneholder virkestoffet/virkestoffene i en blanding med ikke-giftige farmasøytisk aksepterbare hjelpestoffer, og slike formuleringer er kjent for fagfolk (f.eks. U.S.P.N.: 5,817,307, 5,824,300, 5,830,456, 5,846,526, 5,882,640, 5,910,304, 6,036,949, 6,036,949, 6,372,218). Disse hjelpestoffene kan for eksempel være inerte fortynningsmidler eller fyllstoffer (f.eks. sukrose, sorbitol, sukker, mannitol, mikrokrySTALLIN cellulose, stivelse, blant annet potetstivelse, kalsiumkarbonat, natriumklorid, laktose, kalsiumfosfat, kalsiumsulfat eller natriumfosfat); granulerings- og nedbrytingsmidler (f.eks. cellulosederivater som mikrokrySTALLIN cellulose, stivelse, blant annet potetstivelse, kroskarmellose-natrium, alginater eller alginsyre); bindemidler (f.eks. sukrose, glukose, sorbitol, akasiegummi, alginsyre, natriumalginat, gelatin, stivelse, pregelatinisert stivelse, mikrokrySTALLINSK cellulose, magnesiumaluminiumsilikat, karboksymetylcellulose-natrium, metylcellulose, hydroksypropylcellulosemetylcellulose, etylcellulose, polyvinylpyrrolidon eller polyetylnglykol); og smøremidler, glidemidler og antiklebemidler (f.eks. magnesiumstearat, sinkstearat, stearinsyre, silisiumdioksyd, hydrogenerte vegetabiliske oljer eller talk). Andre farmasøytisk aksepterbare hjelpestoffer kan være fargestoffer, smaksstoffer, myknere, fuktighetsbevarende midler, bufringsmidler eller liknende.

[0124] Tablettene kan være udrasjerte eller kan drasjeres med kjente metoder, eventuelt for å forsinke nedbrytingen og opptaket i mage-tarmkanalen og dermed gi langvarig virkning. Drasjeringen kan tilpasses slik at den frigjør virkestoffet etter et forhåndsbestemt mønster (f.eks. for å lage en formulering for kontrollert frigjøring), eller den kan tilpasses slik at den ikke frigjør virkestoffet/virkestoffene før det har passert magesekken (enterodrasjering). Drasjeringen kan være en sukkerdrasjering, en filmdrasjering (f.eks. basert på hydroksypropylmetylcellulose, metylcellulose, metylhydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose, karboksymetylcellulose, akrylatkopolymerer, polyetylnglykoler og/eller polyvinylpyrrolidon) eller en enterodrasjering (f.eks. basert på metakrylsyrekopolymer, celluloseacetatftalat, hydroksypropylmetylcelluloseftalat, hydroksypropylmetylcelluloseacetatsuksinat, polyvinylacetatftalat, skjellakk og/eller etylcellulose). Dessuten kan det brukes et tidsforsinkende stoff som for eksempel glycerylmonostearat eller glyceryldistearat.

[0125] De faste tablett sammensetningene kan ha en drasjering som er tilpasset for å beskytte sammensetningen mot uønskede kjemiske forandringer (f.eks. hvis virkestoffene brytes ned kjemisk før de frigjøres). Drasjeringen kan påføres den faste doseformen på en måte som likner beskrivelsen i *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* ovenfor.

[0126] Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan blandes sammen i tablett eller fradeles. I ett eksempel befinner et første virkestoff seg inne i tablett og et annet virkestoff på utsiden, slik at en betydelig andel av det andre virkestoffet frigjøres før det første virkestoffet.

[0127] Formuleringer til oral bruk kan også gis som tyggetabletter eller som harde gelatinkapsler der virkestoffet blandes med et inert fast fortynningsmiddel (f.eks. potetstivelse, laktose, mikrokrySTALLinsk cellulose, kalsiumkarbonat, kalsiumfosfat eller kaolin), eller som myke gelatinkapsler der virkestoffet er blandet med vann eller et oljemedium, for eksempel peanøttolje, flytende parafin eller olivenolje. Pulvere og granulater kan lages ved å bruke bestanddelene som er nevnt ovenfor under tabletter og kapsler på konvensjonelt vis, blant annet ved å bruke en blander, et virvelsjiktapparat eller sprøytetørkingsutstyr.

Dosering

[0128] Doseringen av ethvert konjugat eller enhver sammensetning som beskrives her eller identifiseres med framgangsmåtene som beskrives her er avhengig av flere faktorer, blant annet: administreringsmåten, sykdommen (f.eks. kreft) som skal behandles, alvorligheten til sykdommen, om kreften skal behandles eller forebygges, og alderen, vekten og helsen til pasienten som skal behandles.

[0129] Når det gjelder behandlingsmetodene ifølge oppfinnelsen er det ikke meningen at administreringen av en vektor, et konjugat eller en sammensetning til en pasient skal innskrenkes til en bestemt administreringsmåte, dosering eller doseringshyppighet; ifølge oppfinnelsen overveies alle administreringsmåter. Konjugatet eller sammensetningen kan gis til pasienten i en enkelt dose eller i flere doser. For eksempel kan en forbindelse som beskrives her eller identifiseres ved utslingsmetoder ifølge oppfinnelsen gis en gang i uka i f.eks. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 eller flere uker. Det må være klart at for enhver individuell pasient skal spesifikke doseringsregimer justeres over tid i samsvar med pasientens individuelle behov og den faglige vurderingen til personen som administrerer eller har tilsyn med administreringen av vektoren, konjugatet eller sammensetningen. For eksempel kan dosen av et konjugat økes hvis den lavere dosen ikke gir tilstrekkelig aktivitet under behandling av en sykdom eller lidelse som beskrives her (f.eks. kreft). Tilsvarende kan dosen av forbindelsen senkes hvis sykdommen (f.eks. kreft) går tilbake eller er eliminert.

[0130] Det er den tilsynshavende legen som i siste ledd vil bestemme den passende mengden og doseregimet, men en terapeutisk effektiv mengde av en vektor, et konjugat eller en sammensetning som beskrives her kan for eksempel ligge i området 0,0035 µg til 20 µg/kg kroppsvekt/dag eller 0,010 µg til 140 µg/kg kroppsvekt/uke. Det er ønskelig at en terapeutisk effektiv mengde ligger i området 0,025 µg til 10 µg/kg, for eksempel minst 0,025, 0,035, 0,05, 0,075, 0,1, 0,25, 0,5,

1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 eller 9,0 µg/kg kroppsvekt gitt daglig, annenhver dag eller to ganger i uka. Videre kan en terapeutisk effektiv mengde ligge i området 0,05 µg til 20 µg/kg, for eksempel minst 0,05, 0,7, 0,15, 0,2, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 10,0, 12,0, 14,0, 16,0 eller 18,0 µg/kg kroppsvekt gitt ukentlig, annenhver uke eller en gang i måneden. Dessuten kan en terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse for eksempel ligge i området 100 µg/m² til 100,000 µg/m², gitt annenhver dag, en gang i uka eller annenhver uke. I en ønskelig utførelsesform ligger den terapeutisk effektive mengden i området 1000 µg/m² til 20 000 µg/m², for eksempel minst 1000, 1500, 4000 eller 14 000 µg/m² gitt av forbindelsen gitt daglig, annenhver dag, to ganger i uka, ukentlig eller annenhver uke.

[0131] De følgende eksemplene skal bare illustrere og ikke innskrenke oppfinnelsen.

Eksempel 1

Fordelingen og farmakokinetikken til konjugatene

[0132] Virkningen på fordelingen av et virkestoff når det er bundet til en vektor kan studeres ved å gi et merket polypeptid eller konjugat til et dyr og måle fordelingen av polypeptidet eller konjugatet mellom organene. I ett eksempel ble enten ³H-Taxol (5 mg/kg) eller ¹²⁵I-Taxol-Angiopep-1 (Tx|An-1) (10 mg/kg, tilsvarende 5 mg Taxol/kg) gitt til mus. Tilsvarende eksempler kan utføres med hvilke som helst av Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6, og Angiopep-7. Her blir det ubundne legemidlet mot kreft og konjugatet injisert intravenøst i mus som en bolus. Vevsprøver tas til forskjellige tidspunkter (0,25, 0,5, 1 og 4 timer) og homogeniseres. For å måle mengden av ³H-Taxol digereres vevshomogenisatene med vevsløsende reagens og prøvene tilsettes 10 ml flytende scintillator. Mengden av det ¹²⁵I-merkede konjugatet i de forskjellige vevene måles etter felling med TCA. Radioaktiviteten forbundet med vevene måles. Arealet under kurven (AUC 0–4) estimeres med Prism-programmet og plottes for de forskjellige vevene. Med et Angiopep-1-konjugat er AUC 0–4-verdiene for konjugatet høyere enn for Taxol i forskjellige vev, blant annet hjerne, nyre, lever og øyne (fig. 10A), noe som tyder på at konjugatet hoper seg mer opp i disse vevene enn det ubundne virkestoffet. Opphopingen av konjugatet er mye høyere enn for ubundet virkestoff i lungene (fig. 10B).

[0133] Resultatene fra et liknende forsøk utført med Taxol/Angiopep-2-konjugatet er oppsummert i tabell 4 nedenfor. Konjugatet i tabell 4 hoper seg også mer effektivt opp i lungene, hjernen og leveren enn ubundet Taxol selv om resultatene ikke er de samme som for Tx|An-1-konjugatet.

Tabell 4

	AUC 0–4 (µg/g vev)		
Vev	Tx An-2	Taxol	Forholdstall (Tx An-2/Taxol)
Plasma	170	2,2	77,3
Hjerne	0,32	0,07	4,6
Lunge	3,4	1,1	3,0

Vev	AUC 0–4 (µg/g vev)		
	TxlAn-2	Taxol	Forholdstall (TxlAn-2/Taxol)
Nyre	11,2	8,0	1,4
Hjerte	5,0	2,5	2,0
Lever	513	22	23
Øye	0,99	0,57	1,7
Urin	35,7	88	0,4
Behandlinger som er likeverdige med 5 mg/kg Taxol			

[0134] Kinetikken for opphoping av Taxol og Taxol-Angiopep-1 i lungene ble studert (fig. 11). Mengden av konjugatet som ble målt i lungene er mye høyere enn for det ubundne virkestoffet. Opphopingen av konjugatet i lungene er også mye høyere enn konsentrasjonen av det i serum (plasma) ved forskjellige tidspunkter (fig. 12). Disse resultatene tyder på at den biologiske fordelingen eller farmakokinetikken til et legemiddel mot kreft, som Taxol, kan forandres ved å binde det til en vektor ifølge oppfinnelsen (f.eks. Angiopep-1 eller -2).

Eksempel 2

Angiopep-7 transporteres ikke effektivt til hjernen

[0135] Angiopep-7 transporteres ikke effektivt gjennom blod/hjerne-barrieren. Ved måling av opphoping av Angiopep-2 og Angiopep-7 i rottehjerner 30 minutter etter intravenøs injisering, viste det seg at Angiopep-7 hadde lavere konsentrasjon i hjernen enn både Angiopep-1 og Angiopep-2 (fig. 13).

[0136] Vi har også undersøkt opphoping av Angiopep-2 og Angiopep-7 i hjernen med fluorescensmikroskopi etter en 10 minutters hjerneperfusering in situ. Her ble 2 mM Angiopep-2 eller Angiopep-7, begge bundet til fluorescensmerkingen Cy5.5, sprøytet inn i halspulsåren. Deretter ble hjernen til dyrene undersøkt med fluorescensmikroskopi. I hvert tilfelle ble kapillærårene farget med Vessel Green (FITC-lektin), kjernene til hjernecellene ble farget med DAPI (blått) og Angiopep-ene ble visualisert med Cy5.5-merkingen (fig. 14). Disse snittene viser at Angiopep-2 er lokalisert inne i hjernen, mens Angiopep-7 er lokalisert inne i kapillærårene. Også in vivo observeres det lavere opphoping av Angiopep-7 i hjernen enn Angiopep-2. Både Angiopep-2 og Angiopep-7 ble bundet til Cy5.5 og gitt til rotter. Etter 30 minutter ble opphopingen i hjernen målt ved hjelp av fluorescensen til Cy5.5-indikatoren. På dette grunnlaget konkluderer vi at Angiopep-7 ikke transporteres effektivt gjennom BHB, mens Angiopep-2 transporteres effektivt gjennom BHB.

Eksempel 3

Angiopep-7 transporteres effektivt til lever, nyrer, lunger, milt og muskler

[0137] Med rotter som fikk Angiopep-2 eller Angiopep-7 bundet til Cy5.5 som beskrevet i eksempel 2, ble konsentrasjonen av Angiopep-7 og Angiopep-2 målt i organer som lever, nyre og lunge. I disse organene ble det sett konsentrasjoner av polypeptid med Angiopep-7 som liknet konsentrasjonene med Angiopep-2. På grunn av disse resultatene tror vi at Angiopep-7 kan være spesielt nyttig for å formulere virkestoff til lever, nyre og lunger til formål der det ikke ønskes å formulere det til hjernen.

[0138] Det er utført avbildingsstudier av Angiopep-7 bundet til Cy5.5 for å måle Angiopep-7-konsentrasjonen i dyr. Ut fra to avbildingsstudier in vivo 30 minutter etter injeksjonen ble det observert opphoping av Cy5.5-signalet i nyrene, leveren og lungene (fig. 15A). Det ble utført organanalyse ex vivo 24 timer etter injeksjonen av Angiopep-7, og sammenliknet med injeksjon med Angiopep-2. Disse studiene viste også vesentlig opphoping både av Angiopep-2 og Angiopep-7 i leveren, lungene og nyrene. Men Angiopep-7 viste vesentlig lavere opphoping i hjernen enn Angiopep-2 (fig. 15B). Ut fra disse resultatene tror vi at Angiopep-7 er nyttig som en vektor for virkestoffer inn i perifere organer som leveren, nyrene, lungene, milten eller musklene til formål der det ikke er ønskelig å formulere til hjernen.

Eksempel 4

Transport av IgG-konjugater

[0139] Hjerneopptaket av disse vektorene ble målt ved den eksperimentelle hjerneperfuseringsmetoden in situ. Resultatene (framstilt i tabell 5 nedenfor) viste at lysinene i posisjon 10 og 15 er viktige for disse vektorenes evne til å trenge gjennom BHB.

Tabell 5: Hjerneopptak av Angiopep målt ved hjerneperfusering in situ

Vektor	Parenkym (ml/100 g)	Transport i forhold til Angiopep-1 (250 nM), uttrykt i prosent
Angiopep-1 (50 nM)	34,9	155,46
Angiopep-1 (250 nM)	22,45	100,00
Angiopep-1 (dimer) (250 nM)	27,03	120,40
Angiopep-2 (250 nM)	19,62	87,39
Angiopep-3 (250 nM)	17,08	76,08
Angiopep-4a (250 nM)	17,57	78,26
Angiopep-4b (250 nM)	12,05	53,67
Angiopep-5 (250 nM)	11,82	52,65
Angiopep-6 (250 nM)	8,64	38,49
Angiopep-7 (250 nM)	2,99	13,32

[0140] Angiopep-polypeptidene ble bundet til IgG med SATA-fornetteren og transportkapasiteten deres ble studert ved hjerneperfusering in situ. Som vist på fig. 16 er Angiopep-2 det mest fordelte konjugatet i hjerneparenkymet. Dessuten later det til at polypeptiddimerene transporteres effektivt. Angiopep-7 ble ikke transportert effektivt inn hjernen

Eksempel 5

Virkningen av konjugater på cellevekst in vitro

[0141] Det kan utføres en test in vitro for å undersøke evnen til konjugater med en vektor og et legemiddel mot kreft til å drepe kreftceller. I ett eksempel er det påvist at Taxol (ubundet) blokkerer prolifereringen av glioblastomceller (U-87) med IC50-verdier på rundt 10 nM (fig. 17). Virkningen av Taxol når den er bundet til en vektor som beskrives her, studeres og sammenliknes med ubundet Taxol. Som vist i tabell 6A var IC50-verdiene for Taxol/Angiopep-2-konjugatet (Tx|An2) svært lik verdiene for ubundet Taxol for mange kreftceller. Endotelceller fra rottehjerner (RBE4) var mindre følsomme enn de testede kreftcellestammene. For sammenlikningens skyld ble resultatene uttrykt som Taxol-konsentrasjoner.

[0142] De fleste av disse cellene (U-87, U-118, NC1-H460, A549) uttrykker LRP. Data om dette er imidlertid ikke tilgjengelig for RBE4-celler. Den prolifereringshemmende aktiviteten til konjugatet mot kreftceller in vitro analyseres. I denne analysen utsettes kreftceller (U87 og U118) for et legemiddel mot kreft (f.eks. Taxol) og et konjugat (f.eks. Tx|An2 (3:1)) i 48 timer. Innlemmingen av [³H]-tymidin i U87- og U118-cellene synker som funksjon av konsentrasjonen av virkestoffet. Det uttrykkes verdier som kreves for å hemme celleprolifereringen med 50 % (IC50). Resultatene fra prolifereringsanalysene tyder på at IC50-verdiene som kreves for å hemme proliferering av kreftceller uttrykkes i nM og viser at Tx|An2 (3:1)-konjugatet er tre ganger så sterkt som paklitaxel og ligger i det samme området når det rapporteres for paklitaxel-ekvivalenter (tabell 6B). Det kan utføres tilsvarende forsøk med alle vektorene eller konjugatene som beskrives her.

[0143] Også evnen hos et konjugat (f.eks. Tx|An2 (3:1)) til å blokkere prolifereringen av andre kreftcelletyper estimeres. Slike analyser kan utføres på lungekreftceller (NC1-H460) og brystkreftcellestammen (MDA-MB2321, MDA-MB-468, HCC-1954, BT-474) og på hepatokarsinomer (SK-Hep1) og glioblastomer (U-87MG). Vi har påvist at slike celler også er svært følsomme for Tx|An2 (3:1)-konjugatet (tabell 6B).

Tabell 6A. Virkningen av konjugater på celleproliferering

Cellestammer	IC50 (nM)	
	Taxol	Taxol/Angiopep-2 (3:1)
Glioblastomer		
5 U-87	9,5	9,7
U-118	7,2	8,1
Lungekarsinom		
NCI*-H460	9,3	12,5

Cellestammer	IC50 (nM)	
	Taxol	Taxol/Angiopep-2 (3:1)
Glioblastomer		
A549	3,6	6,0
10 Calu-3	17,2	25,0
Endotelceller		
RBE4	137	139

Tabell 6B: Cytotoksisiteten til Taxol og TxIA2 (3:1)-konjugatet in vitro

Cellestamme	IC50 (nM)	Paklitaxel				TxIA2 (3:1)-konjugatet			
		Overlevende rest %		IC50 (nM)		Overlevende rest %			
	Gj.sn	SD	Gj.sn	SD	Gj.sn	SD	Gj.sn	SD	
BT-474	62,86	-	52,24	3,87	40,22	-	51,83	1,70	
HCC1954	6,12	-	48,82	11,17	8,26	3,37	44,08	8,63	
MDA-MB-231	17,61	-	45,62	13,89	28,16	-	46,95	7,50	
MDA-MB-468	13,52	-	54,26	10,34	1,41	-	55,34	5,55	
NCI-H460	6,61	3,35	24,98	10,80	12,68	10,08	30,44	9,36	
SK-HEP-1	8,84	-	55,18	13,17	7,83	-	54,09	11,03	
U-87 MG	12,94	2,49	40,35	2,40	17,75	10,82	44,13	1,85	

Eksempel 6

Hemming av svulstvekst in vivo (U-87)

[0144] Evnen hos et konjugat til å hemme veksten av en svulst kan evalueres i en in vivo-modell (se f.eks. fig. 18A). U-87-celler implanteres subkutan på høyre flanke av mus og på dag 3 etter implanteringen får musene injeksjoner med bærer (DMSO/Ringer:80/20;kontroll), et ubundet virkestoff (f.eks. Taxol (5 mg/kg)) eller virkestoffet som del av et konjugat (f.eks. Taxol/Angiopep-2 (10 mg/kg) tilsvarende 5 mg Taxol/kg). Hemmingen av svulstveksten er mer markert for mus behandlet med konjugatet enn for mus behandlet med det ubundne legemidlet mot kreft.

[0145] I ett eksempel var hemmingen av veksten til svulsten på dag 17 etter implanteringen mer enn 75 % med TxIA2, mens svulstveksten bare var 34% hemmet med ubundet virkestoff (tabell 7). Altså er konjugatene mer effektive enn ubundet virkestoff til å hemme veksten av svulster in vivo. Totalt sett ble det målt 2,2 ganger så sterk hemming av svulstveksten for konjugatet som for det ubundne virkestoffet.

Tabell 7. Hemming av svulstvekst med konjugater.

Grupper	Svulstvolum (mm ³)	Svulstvekst		Hemming (%)	T/C
		(gjennomsnitt $\pm$ sem) dager etter injeksjonen		Δ (mm ³)	(%)
		Dag 0*	Dag 14**		
Kontroll		79 $\pm$ 7	289 $\pm$ 50	203 $\pm$ 47	100
Taxol (5 mg/kg)		74 $\pm$ 5	219 $\pm$ 52	134 $\pm$ 55	34 66
TxlAn2 (3:1) (10 mg/kg)		88 $\pm$ 9	144 $\pm$ 27	56 $\pm$ 32	73 27
Behandlinger som er likeverdige med 5 mg/kg Taxol *svarer til 3 dager etter implanteringen (første behandling) **svarer til 17 dager etter implanteringen (etter 4 behandlinger)					

Eksempel 7**Hemming av svulstvekst in vivo (hepatokarsinom)**

[0146] Det utføres in vivo-studier for å bestemme om et konjugat kan hemme veksten til hepatokarsinomceller (SK-Hep 1) implantert subkutant. Det settes en subkutan injeksjon med $2,5 \times 10^6$ humane SK-Hep 1-celler i høyre flanke på nakenmus. Behandlingene starter når størrelsen til den implanterte svulsten kommer opp i rundt 200 mm³. Dyrene behandles med et konjugat eller bærer ved intraperitoneale injeksjoner.

[0147] Resultatene fra et forsøk utført med et TxlAn2 (3:1) gitt med 80 mg/kg ved intraperitoneal injeksjon går fram av fig. 18B; behandlingene er angitt med svarte piler. I dette forsøket ble behandlingene gitt to ganger i uka og høyst fem behandlinger med den angitte dosen på 80 mg/kg. TxlAn2 (3:1)-konjugatet som gis intraperitonealt viser høy effektivitet når det gjelder å hemme veksten av hepatokarsinom, en type kreft som vanligvis ikke er følsom for Taxol® (fig. 18B).

Eksempel 8**Framgangsmåter for å evaluere aktiviteten til konjugater**

[0148] Følgende framgangsmåter ble brukt i eksemplene som beskrives her.

Celleprolifereringsanalyse

[0149] For celleprolifereringsanalysen in vitro blir mellom $2,5$ og 5×10^4 U87- eller A549-celler sådd i en 24-brønners vevskulturmikroplate til et endelig volum på 1 ml medium med 10 % serum, og inkubert i 24 timer ved 37 °C og 5% CO₂. Så erstattes mediet med et serumfritt medium og det inkuberes over natten. Neste morgen løses virkestoffet ferskt i dimetylsulfoksyd (DMSO) og mediet erstattes med fullmedium som inneholder virkestoffet i forskjellig konsentrasjon i triplikat. Den endelige

konsentrasjonen av DMSO er 0,1 %. Kontrollen som brukes er en brønnmikroplate med celler og uten reagens. Cellene inkuberes i 48 til 72 timer ved 37 °C og 5 % CO₂. Etter inkuberingen byttes mediet og erstattes med 1 ml fullmedium med [³H]-tymidin (1 pCi/analyse). Platen inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ i 4 timer. Mediet fjernes og cellene vaskes med PBS ved 37 °C. Cellene fikseres med en blanding av etanol:eddiksyre (3:1), vaskes med vann og felles 3 ganger med 10 % iskald TCA (trikloreddiksyre). Endelig tilsettes brønnene 500 µl PCA (perklorsyre) og mikroplatene varmes ved 65 °C i 30 minutter og 75 °C i 30 minutter. Innholdet av hver brønn overføres så til et scintillasjonsglass med 10 ml scintillasjonscocktail og aktiviteten måles i TPM (telling per minutt) på en flytende scintillasjonsteller Tri-Carb fra Packard.

Jodering av polypeptider

[0150] Polypeptider joderes med standardprosedyrer ved hjelp av jodkuler fra Sigma. Kort fortalt fortynnes polypeptider i 0,1 M fosfatbuffer, pH 6,5 (PB). To jodkuler brukes til hvert protein. Disse kulene vaskes to ganger med 3 ml PB på et Whatman-filter og resuspenderes i 60 µl PB. Kulesuspensjonen ble tilsatt ¹²⁵I (1 mCi) fra Amersham-Pharmacia biotech i 5 minutter ved romtemperatur. Hver jodering ble startet ved tilsetting av polypeptid (100 µg). Etter en inkubering på 10 minutter ved romtemperatur ble fritt jod fjernet ved HPLC.

Subkutan implantering

[0151] For å estimere effektiviteten til konjugatene og formuleringene på svulstveksen utviklet vi en subkutan modell av glioblastomer. I denne modellen injiseres $2,5 \times 10^6$ i 100 µl cellemedium uten serum men med 1 % metylcellulose subkutan i museflanken. Svulsten er lett synlig og kan måles med en vernierpasser. Det estimerte svulstvolumet ble så plottet som funksjon av tiden.

Musehjerneperfusjon in situ

[0152] Opptaket av [¹²⁵I]-polypeptider til innsiden av hårrørsårer i musehjernen måles ved å bruke in situ-hjerneperfuseringsmetoden tilpasset til laboratoriet vårt for å studere opptaket av virkestoff i musehjernen. Kort fortalt blottlegges den høyre felles halspulsåren til mus bedøvet med ketamin/xylazin (140/8 mg/kg intraperitonealt) og underbindes på delingsstedet til den felles halspulsåren, foran bakhodepulsåren. Så settes det inn et polyetylenkateter fylt med heparin (25 U/ml) på framdelen av den felles halspulsåren, montert på en 26 G nål. Sprøyten som inneholdt perfuseringsvæsken ([¹²⁵I]-polypeptider eller [¹⁴C]-inulin i Krebs/bikarbonatbuffer ved pH 7.4 gjennomboblet med 95 % O₂ og 5 % CO₂) settes i en infusjonspumpe (Harvard pump PHD 2000; Harvard Apparatus) og kobles til kateteret. Før perfuseringen elimineres blodstrømbidraget fra motsatt side ved å skjære over hjerteventriklene. Hjernen perfuseres med 1,15 ml/min i de angitte tidene. Etter 14,5 minutters perfusering perfuseres hjernen i ytterligere 60 sekunder med Krebs-buffer for å vaske ut overskuddet av [¹²⁵I]-proteiner. Så halshogges musene for å avbryte perfuseringen, høyre hjernehalvdel isoleres på is og hårrørsårene utarmes. Det tas porsjoner av homogenater, supernatanter, tabletter og perfusater for å måle innholdet av [¹²⁵I]-konjugater ved TCA-felling og evaluere det tilsynelatende fordelingsvolumet.

Eksempel 9

Virkningsmekanismen til konjugatene

[0153] Det kan også gjennomføres studier over virkningsmekanismen til konjugerte terapeutiske virkestoffer. I ett eksempel inkuberes lungekreftceller (NCI-H460) i 24 timer enten med fri Taxol (30 nM) eller et Taxol-konjugat (f.eks. Tx|An2 10 nM, tilsvarende 30 nM Taxol, fig. 19)). Etter at cellene er merket for β -tubulin ved hjelp av et sekundært antistoff bundet til FITC, tas det bilder med synlig lys og med fluorescens. I dette eksempelet har Taxol og Taxol-konjugatet en liknende virkning på β -tubulin, som fører til at det polymeriserer. Som fig. 20 viser et eksempel på, blokkeres NCI-H460-cellen i G2/M-fase når Taxol og Taxol-konjugatet tilsettes. Disse resultatene tyder på at virkningsmekanismen til Tx|An-konjugatet mot kreftceller likner mekanismen til Taxol.

Eksempel 10

Framstilling av konjugater

[0154] Eksempler på binding av et virkestoff til en vektor som beskrevet her er framstilt på fig. 23A–23B. I dette eksempelet aktiveres først Taxol i et *N*-suksinimidderivat (2'-NHS-Txl). Aminene som for eksempel finnes i en vektor (f.eks. aminet i aminenden eller i lysinrester) bringes til å reagere med den aktiverte Taxolen slik at det dannes en peptidbinding (amidbinding). Hvis det er mange aminer tilgjengelig, gir denne reaksjonen mange kombinasjoner av konjugater, f.eks. med tilføyelser på 1, 2 eller 3 Taxoler til polypeptidet, ut fra hvilket molforhold som brukes. Konjugeringsproduktene analyseres ved HPLC og bindingen bekreftes ved massespektroskopi (Maldi-Tof). Det er påvist at Taxol kan frigjøres fra vektoren ved å spalte esterbindingen med en esterase.

[0155] Alle vektorer som beskrives her kan bindes til et virkestoff med denne framgangsmåten. Tx|An2 (3:1)-konjugatet ble framstilt ved å tilsette 1 molekvivalent av Angiopep-2 direkte til en løsning av 2,5 molekvivalenter av 2'-NHS-Taxol. Reaksjonen ble utført i 68 % DMSO i Ringers løsning (pH 7,3) i 1 time ved 12 °C. Kuldebadet ble fjernet og man lot reaksjonen fortsette i rundt 22 timer ved romtemperatur (fig. 24). Angiopep-2, 2'-NHS-Taxol og Tx|An2 (3:1)-konjugat vises med piler på kromatogrammet. Det ble tatt ut porsjoner av reaksjonsblandingen og analysert ved HPLC etter 25 minutter, 2 timer og 15 minutter, 5 timer og 23 timer som vist på fig. 24. Toppene for Angiopep-2, 2'-NHS-Taxol og Tx|An2 (3:1)-konjugat vises med piler på kromatogrammet. Resultatene på fig. 24 illustrerer hvordan Angiopep-2 og 2'-NHS-Taxol forsvinner i løpet av reaksjonen, hovedsakelig til fordel for Tx|An2 (3:1)-konjugatet.

[0156] Denne blandingen av produkter ble separert ved hydrofob kromatografi på en RPC 300 m-kolonne med mobilfasestrøm 4 ml/min og AKTA-explorer (fig. 25). For toppen som svarer til Tx|An2 (3:1)-konjugatet ble fraksjonene slått sammen og analysert ved HPLC og MS. På fig. 25 svarer det øverste kromatogrammet til den løpende reaksjonen ved tid = 23 timer, mens den andre svarer til Tx|An2 (3:1)-konjugatet som har blitt bekreftet ved massespektrometri (MW 5107) etter AKTA-rensingen.

Eksempel 11

Binding og opptak av antistoffer

[0157] Antistoffer kan bindes til aprotinin som beskrevet i U.S. Patent Application Publication No. 2006/0189515. Liknende resultater kan fås med alle vektorene som beskrives her.

[0158] Derfor konjugerte vi Angiopep-2 til IgG med SATA. Etter bindingen er omtrent 3 til 5 molekyler Angiopep-2 forbundet med både den lette og den tunge kjeden av IgG (fig. 26). Med denne tilnærmingsmåten ventes det derfor at 2 til 6 molekyler av vektor (f.eks. Angiopep-1, Angiopep-2) bindes for hvert molekyl antistoff (tung og lett kjede).

[0159] Det ble også utført binding av Angiopep-2 med sulfo-EMCS, som illustrert på fig. 4. Hjernefordelingen av IgG/Angiopep-2-konjugater bundet gjennom sulfhydrylgrupper ved hjelp av EMCS-Angiopep-2 ble testet i forskjellige hjernevev (total hjerne, kapillærårer, parenkym). Det er høyere (omtrent tredobbelt) opptak i hjernen av [¹²⁵I]-IgG/Angiopep-2-konjugatet enn av ubundet [¹²⁵I]-IgG (se fig. 27). Derfor øker bindingen av IgG til Angiopep-2 opphopingen av IgG i hjernen in vivo.

[0160] Transport av Angiopep-2/IgG-konjugater bundet med SATA-metoden ble også testet med hjerneperfuseringsforsøk in situ. IgG/An2-konjugater transporteres inn i hjernevev (fig. 28). IgG/Angiopep-2-konjugatene hopet seg opp i parenkymet mer enn 50 ganger så mye som IgG.

[0161] Etter binding av IgG til vektorer ble det utført SDS-polyakrylamidgelelektroforese, immundetektering og autoradiografi for å sikre tilbørlig binding, se f.eks. fig. 29, som viser at bare [¹²⁵I]-IgG/Angiopep-konjugater ble registrert. Det var ingen tegn til fritt Angiopep-2-konjugat, noe som viser at konjugeringstilnærmingen er effektiv.

Eksempel 12

Binding av et antistoff mot EGFR til en vektor

[0162] Signalisering gjennom reseptoren for epidermisvekstfaktoren gir opphav til celleprolifereringssignaler og har tilknytning til overgangen fra normale til ondartede celler. Det kan registreres flere mutasjoner av EGFR i svulstceller. En av de vanligste mutasjonene av EGFR er EGFRvIII-mutasjonen der aminosyrene 6–273 er borte.

[0163] For å vise at binding av vektorer ifølge oppfinnelsen til andre antistoffer enn IgG var mulig og at bindingen opprettholdt antistofffunksjonen, ble et EGFR-antistoff (monoklonalt 528 som fås fra ATCC) fornettet til vektoren ved hjelp av fornetteren SATA som et eksempel på et terapeutisk polypeptid. Den biologiske aktiviteten til det bundne EGFR-antistoffet ble testet ved å farge EGFR-positive U87-celler. Det ble demonstrert liknende detektering av EGFR i U87 med både ubundne og bundne EGFR-antistoffer ved FACS-analyse (fig. 30), og det viste seg at bindingen av antistoffene til vektorene ifølge oppfinnelsen ikke forandret aktiviteten deres.

[0164] I tabell 8 viser vi at antistoffene ikke inaktiveres ved bindingen og har samme bindingsaffinitet i en in vitro-analyse.

Tabell 8: Kinetikkanalyse av konjugatbinding til EGFR-reseptoren ved FACS

	Anti-EGFR	Anti-EGFR-Angiopep-2
Bmax (RFU)	23,6	22,0
Halv metning (nM)	1,7	1,8

[0165] Deretter ble transport av EGFR-antistoffkonjugater (f.eks. anti-EGFR/Angiopep-2) gjennom BHB målt med et merket konjugat. Opptaket av [¹²⁵I]-EGFR/Angiopep-2 til innsiden av hårrørsårer i musehjernen ble målt ved å bruke in situ-hjernepperfuseringsmetoden som vist på fig. 31. Det var høyere hjerneopptak for [¹²⁵I]-EGFR/Angiopep-2-konjugatet enn for ubundet [¹²⁵I]-EGFR-antistoff i alle testede vev. Altså hoper EGFR-antistoff seg mer opp i hjerneparenkymet in vivo når det er bundet til Angiopep-2. Disse konjugatene representerer en interessant mulighet siden det ble påvist at flere forskjellige svulsttyper uttrykte EGFR i forskjellig grad (se tabell 9).

Tabell 9

Svulsttype	Svulster som uttrykker EGFR (%)
Hode og hals	90–95
Bryst	82–90
Nyrekarsinom	76–89
Livmorhals/livmor	90
Spiserør	43–89
Bukspyttkjertel	30–89
Ikke-småcellet lunge	40–80
Prostata	40–80
Tykkttarm	25–77
Eggstokk	35–70
Gliom	40–63
Blære	31–48
Mage	4–33

Eksempel 13

Binding og transport av et antistoff mot VEGF til en vektor

[0166] For å demonstrere fleksibiliteten og anvendeligheten ved binding av antistoffer til vektorer ifølge oppfinnelsen ytterligere, ble det brukt et annet eksempel på terapeutisk antistoff, Avastin. Avastin er et rekombinant humanisert monoklonalt IgG1-antistoff mot VEGF med isotype kappa som fås fra Roche Biochemical og bindes til og hemmer biologisk aktive former av vaskulær endotelvekstfaktor (VEGF).

[0167] Etter bindingen ble transporten av Avastin-konjugater gjennom BHB målt med in situ-hjerneperfuseringsmetoden. Det er høyere hjerneopptak for [¹²⁵I]-Avastin/Angiopep-2-konjugatet enn for ubundet [¹²⁵I]-Avastin (fig. 32).

[0168] Det er derfor en nyttig strategi å binde terapeutiske antistoffer (som Avastin eller MAb 528 fra ATCC) til vektorer (f.eks. Angiopep-1, -2, -3, -4a, -4b, 5 og 6) og transportere dem til hjernen.

Eksempel 14

Dimertransport

[0169] Dimerer av vektorer kan også transporteres. I ett eksempel ble Angiopep-1 inkubert ved 4 °C i minst 12 timer slik at polypeptidet ble multimerisert/dimerisert. Transcytosekapasiteten til Angiopep-1-dimeren ble evaluert in vitro. Angiopep-1-dimer transcytoseres bedre enn IgG. Som vist i tabell 5 viser også dimerformen av Angiopep-1 høyere fordelingsvolum enn Angiopep-1. Altså kan dimerer av vektorer også transporteres gjennom BHB.

Eksempel 15

Binding av et antistoff til mer enn én vektor

[0170] Fornettingsreaksjoner gir gjerne mellom 1 og 6 molekyler av vektor for hvert molekyl antistoff, tung og lett kjede.

[0171] Konjugasjonsgraden mellom Angiopep-2 og IgG ble estimert med en analyse der mengden av sulfhydrylgrupper kunne titreres etter at beskyttelsen var fjernet fra SATA på aminet i IgG før og etter reaksjon med maleimidgruppen i N-enden av Angiopep-2. Ved å forandre den relative konsentrasjonen av de forskjellige reaktantene som ble brukt i bindingsprotokollen kunne mengden av Angiopep-2 som ble bundet til IgG optimaliseres.

[0172] Ved hjerneperfuseringsforsøk in vivo økte parenkymopptaket av konjugater med konjugasjonsgraden (fig. 33). Derfor kan det være ønskelig å ha et høyere antall vektorer per molekyl. Altså kan mer enn 6 vektorer brukes til å transportere en forbindelse (virkestoff) gjennom BHB.

Patentkrav

1. Polypeptid som innbefatter en aminosyresekvens med følgende formel:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19

der X1–X19 er hvilke som helst aminosyrer eller ikke til stede;
minst den ene av X10 og X15 er Arg, og
denne aminosyresekvensen er minst 80 % identisk med Angiopep-7, som har aminosyresekvensen SEKV.-IDNR.: 112, idet dette polypeptidet transporteres effektivt til minst én celle eller ett vev valgt fra gruppen som består av lever, lunge og nyre, og idet dette polypeptidet transporteres gjennom blod/hjerne-barrieren i lavere konsentrasjon enn Angiopep-6, som har aminosyresekvensen SEKV.-IDNR.: 111.

2. Polypeptidet ifølge krav 1, der polypeptidet når det bindes til et virkestoff kan øke opphopingen av dette virkestoffet med minst 50 % i denne ene cellen eller dette ene vevet i forhold til det ubundne virkestoffet.

3. Polypeptidet ifølge krav 2, der det nevnte virkestoffet er paklitaxel.

4. Farmasøytisk sammensetning som innbefatter polypeptidet fra noen av kravene 1 til 3 og en farmasøytisk akseptierbar bærer.

5. Konjugat som innbefatter:

(a) en vektor som innbefatter polypeptidet ifølge noen av kravene 1 til 3, og

(b) et terapeutisk virkestoff, diagnostisk virkestoff eller en detekterbar merking, idet virkestoffet eller merkingen er bundet til vektoren.

6. Polypeptidet ifølge noen av kravene 1 til 3 eller konjugatet ifølge krav 5, som er minst 90 % identisk.

7. Polypeptidet ifølge noen av kravene 1 til 3 eller konjugatet ifølge krav 5, der

a.) X10 er Lys eller Arg, X15 er Lys eller Arg, eller begge,

b.) der X1 er Arg,

c.) der X10 er Arg,

d.) der X15 er Arg,

e.) der X10 og X15 er Arg,

f.) der X7 er Ser eller Cys, eller

g.) der X7 er Ser.

8. Polypeptidet ifølge noen av kravene 1 til 3 eller konjugatet ifølge krav 5, der polypeptidet eller vektoren innbefatter aminosyresekvensen SEKV.-IDNR.: 112.

9. Polypeptidet ifølge noen av kravene 1 til 3 eller konjugatet ifølge krav 5, der polypeptidet eller vektoren består av aminosyresekvensen SEKV.-IDNR.: 112.

10. Konjugatet ifølge krav 5, der vektoren er bundet til et terapeutisk virkestoff.

11. Konjugatet ifølge krav 5, der det terapeutiske virkestoffet er et legemiddel mot kreft.

12. Konjugatet ifølge krav 11, der legemidlet mot kreft er valgt fra gruppen som består av abarelix, aldesleukin, alemtuzumab, alitretinoin, allopurinol, altretamin, amifostin, anakinra, anastrozole, arsentrisksyd, asparaginase, azacitidin, levende BCG, bevacizumab, beksaroten, bleomycin, bortezomib, busulfan, kalusteron, kapecitabin, karboplatin, karmustin, celekoksib, cetuximab, klorambucil, cisplatin, cladribin, klofarabin, syklofosfamid, cytarabin, dacarbazin, daktinomycin, aktinomycin D, dalteparin, darbepoetin alfa, dasatinib, daunorubicin, daunomycin, decitabin, denileukin, denileukin diftitoks, deksrazoksan, docetaxel, doxorubicin, dromostanolonpropionat, ekulizumab, epirubicin, epoetin alfa, erlotinib, estramustin, etoposid, eksemestan, fentanyl, filgrastim, floksuridin, fludarabin, fluoruracil, 5-FU, fulvestrant, gefitinib, gemcitabin, gemtuzumab ozogamicin, goserelin, histrelin, hydroksyurea, ibritumomab tiuxetan, idarubicin, ifosfamid, imatinib, interferon alfa-2b, irinotekan, lapatinibditosylat, lenalidomid, letrozol, leukovorin, leuprolid, levamisol, lomustin, CCNU, mekloreteamin, megestrol, melfalan, merkaptopurin, mesna, metotreksat, metoksalen, mitomycin C, mitotan, mitoksantron, nandrolonfenpropionat, nelarabin, nofetumomab, oprelvekin, oksaliplatin, paklitaxel, palifermin, pamidronat, panitumumab, pegademase, pegaspargase, pegfilgrastim, peginterferon alfa-2b, pemetreksed, pentostatin, pipobroman, plikamycin, porfimer, prokarbazin, kinakrin, rasburikase, rituximab, sargramostim, sorafenib, streptozocin, sunitinib, talk, tamoksifen, temozolomid, teniposid, testolakton, talidomid, tioguanin, tiotepa, topotekan, toremifen, tositumomab/I-131, trastuzumab, tretinoin, uracilsennep, valrubicin, vinblastin, vinkristin, vinorelbin, vorinostat, zoledronat og zoledronsyre.

13. Konjugatet ifølge krav 12, der virkestoffet er paklitaxel.

14. Konjugatet ifølge krav 11, der virkestoffet er et antistoff.

15. Konjugatet ifølge krav 14, der antistoffet er valgt fra gruppen som består av ABX-EGF, OvaRex, Theragyn, Therex, Bivatuzumab, Panorex, ReoPro, Bexxar, MAb, idiotypisk 105AD7, Anti-EpCAM, MAb lungekreft, Herceptin, Rituxan, Avastin, AMD Fab, E-26, Zevalin, Cetuximab, BEC2, IMC-1C11, nuC242-DM1, LymphoCide, LymphoCide Y-90, CEA-Cide, CEA-Cide Y-90, HumaRAD-HN, MDX-101, MDX-210, MDX-210/MAK, Vitaxin, MAb 425, IS-IL-2, Campath, CD20 streptavidin, Avidicin, Oncolym, Cotara, C215, nacolomab tafenateox, Nuvion, SMART M195, SMART 1D10, CEA Vac, TriGem, TriAb, NovoMAb-G2 radiomerket, Monopharm C, GlioMAb-H, Rituxan og ING-1.

16. Konjugatet ifølge krav 5, der konjugatet hoper seg raskere opp, hoper seg opp til høyere konsentrasjon eller viser lavere P-gp-formidlet effluks i en levercelle, lungecelle, nyrecelle eller miltcelle enn virkestoffet eller merkingen når de ikke er bundet til vektoren.

17. Sammensetning som innbefatter konjugatet ifølge krav 5 og en farmasøytisk akseptert bærer.

18. Konjugat ifølge noen av kravene 11 til 15 til bruk i en framgangsmåte for å behandle en pasient som har kreft, idet framgangsmåten innbefatter å gi pasienten dette konjugatet i en mengde som er tilstrekkelig til å behandle pasienten.

19. Konjugatet til bruk ifølge krav 18, der kreften er en lungekreft, leverkreft, nyrekreft eller miltkreft.

20. Konjugatet til bruk ifølge krav 19, der kreften er valgt fra gruppen som består av hepatocellulært karsinom, brystkreft, kreft i hodet og halsen, lymfom, mantelcellelymfom, ikke-hodgkinlymfom, adenom, plateepitelkreft, strupekreft, kreft i netthinnen, kreft i spiserøret, multippelt myelom, eggstokkreft, livmorkreft, melanom, kolorektal kreft, blærekreft, prostatakreft, lungekreft, ikke småcellet lungekarsinom, bukspyttkjertelkreft, livmorhalskreft, hudkreft, nasofaryngealt karsinom, liposarkom, epitelkarsinom, nyrecellekarsinom, adenokarsinom i galleblæren, parotidadenokarsinom, endometriumsarkom og multiresistent kreft.

21. Konjugatet til bruk ifølge krav 18, der legemidlet mot kreft har høyere effektivitet eller mindre bivirkninger når det er bundet til polypeptidet enn legemidlet når det ikke er bundet til polypeptidet.

22. Konjugatet til bruk ifølge krav 18, der pasienten er et menneske.

Peptid	Aminosyresekvens	Ladning
Angiopep	TFFYGGCRGKRNNFKTEEY	+2
67	TFFTGGCRGKRNNFKTEEY-amid	+2
76	TFFYGGCRGKRNNFKTKEY-amid	+3
91	RFKYGGCLGNKNNYLRLKY-amid	+5
5	TFFYGGCRAKRNNFKRAKY-amid	+6

Ladning +: lysin (K), arginin (R)

Ladning -: glutaminsyre (E), asparaginsyre (D)

Fig. 1

Fornetter: BS³

Forholdstall 40:1

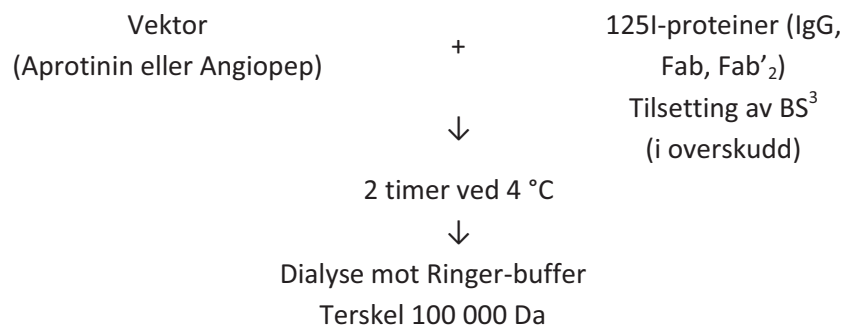


Fig. 2

Fornetter: sulfo-EMCS

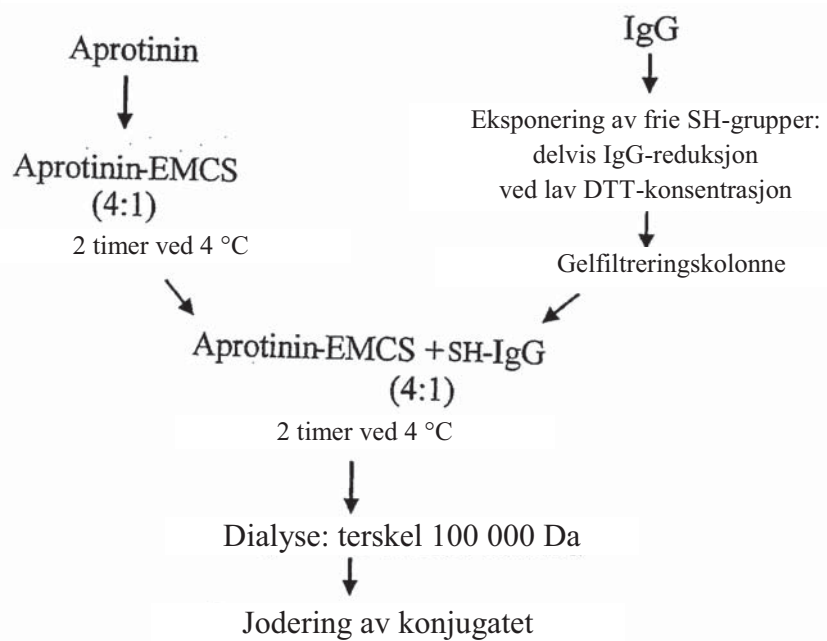
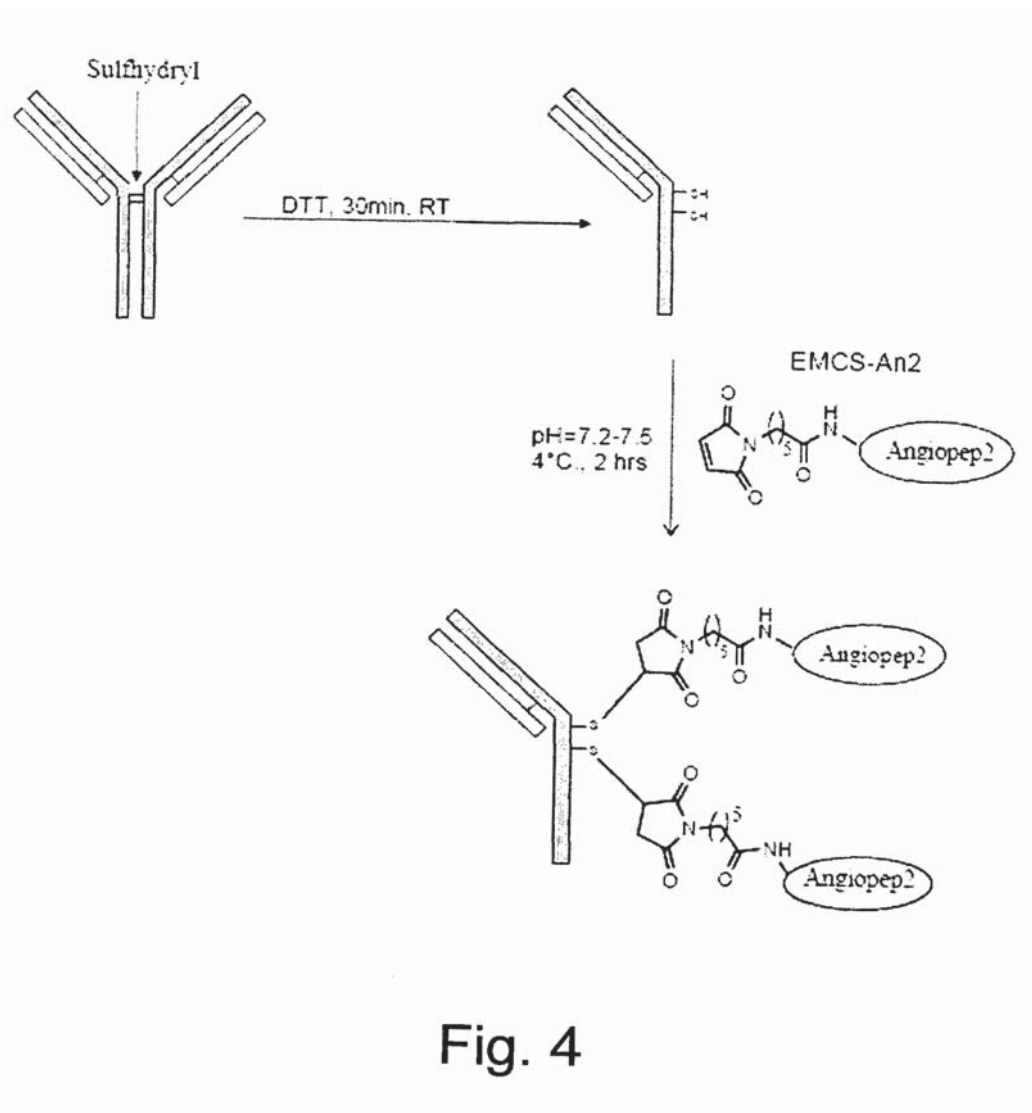


Fig. 3



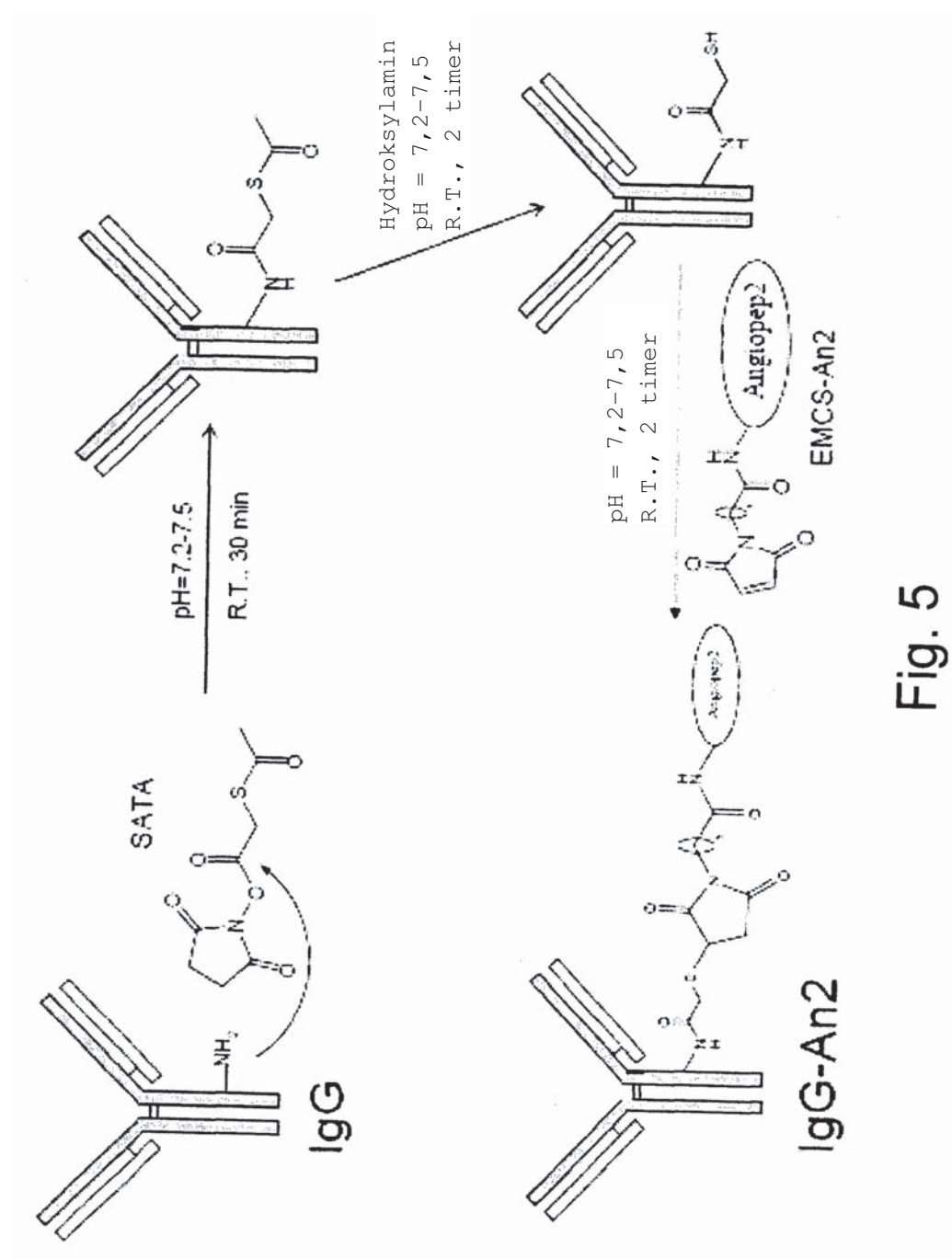


Fig. 5

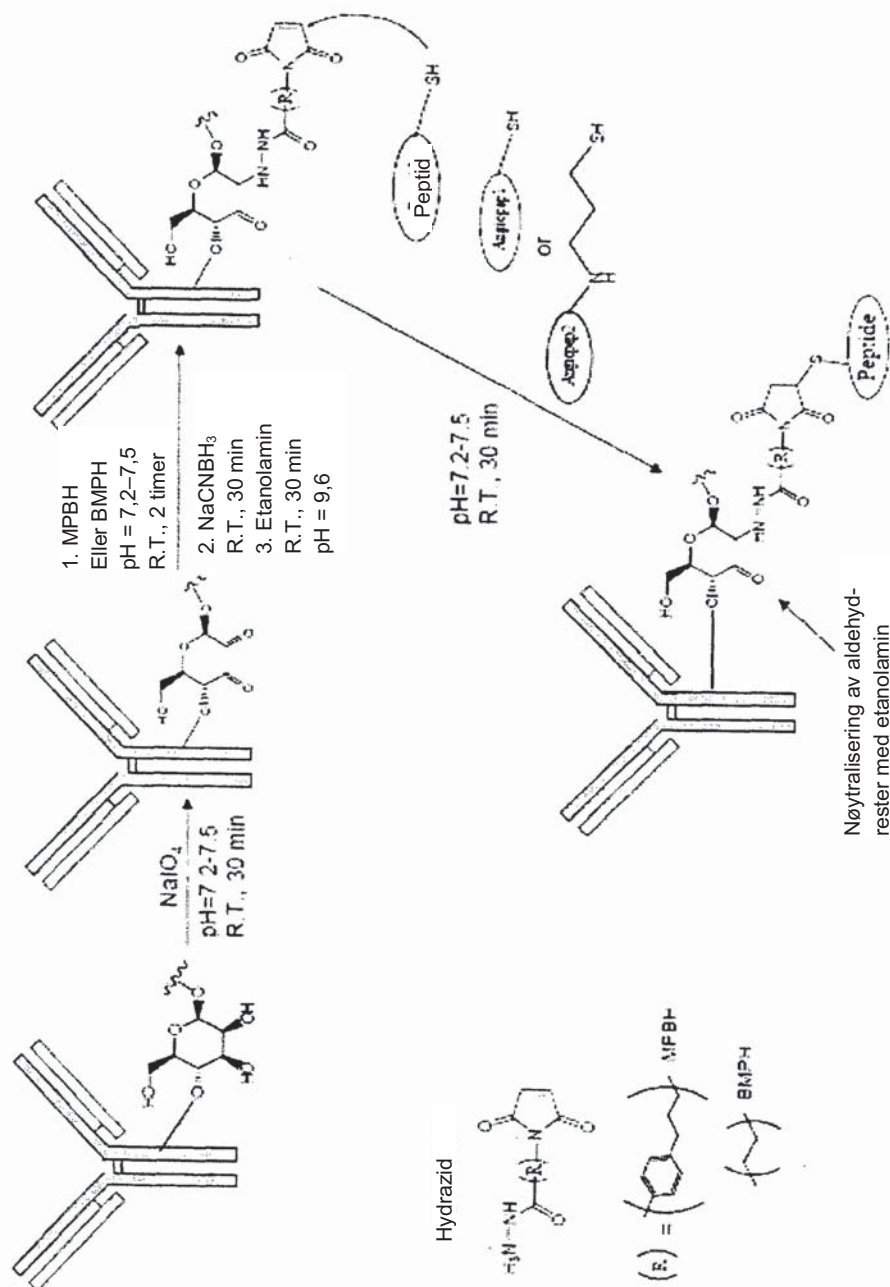


Fig. 6

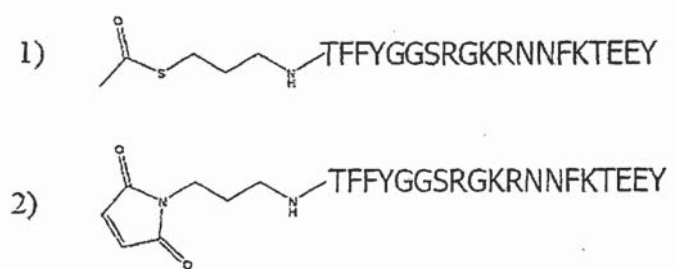
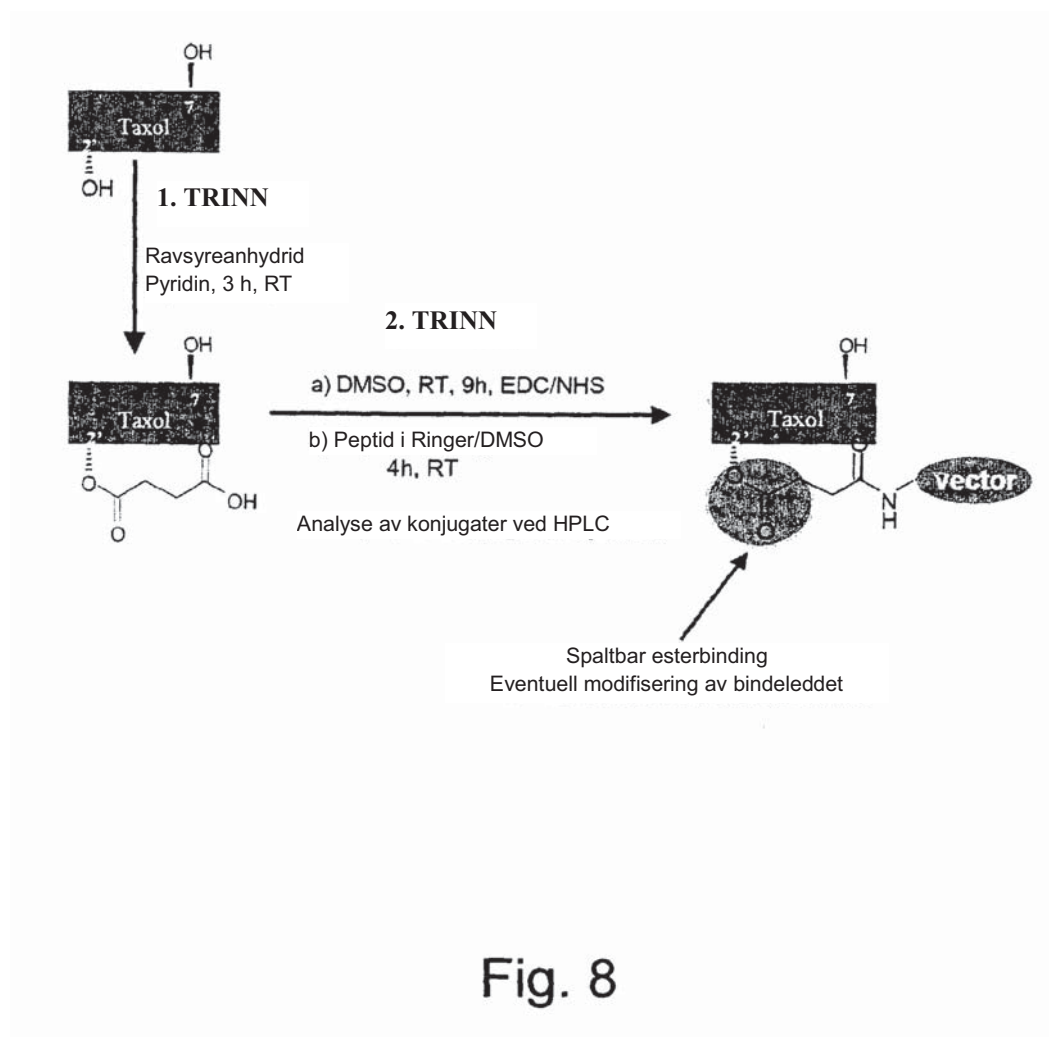
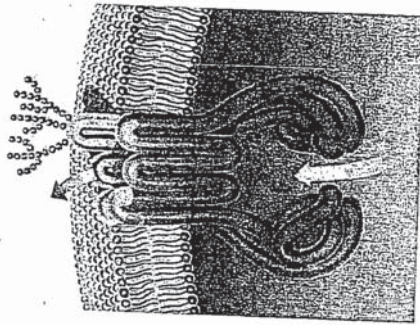


Fig. 7





- Legemiddelefflukspumpe

- Uttrykkes i høy grad på blod/hjerne-barrieren

- Begrenser tilførselen av mange legemidler til hjernen

Fig. 9

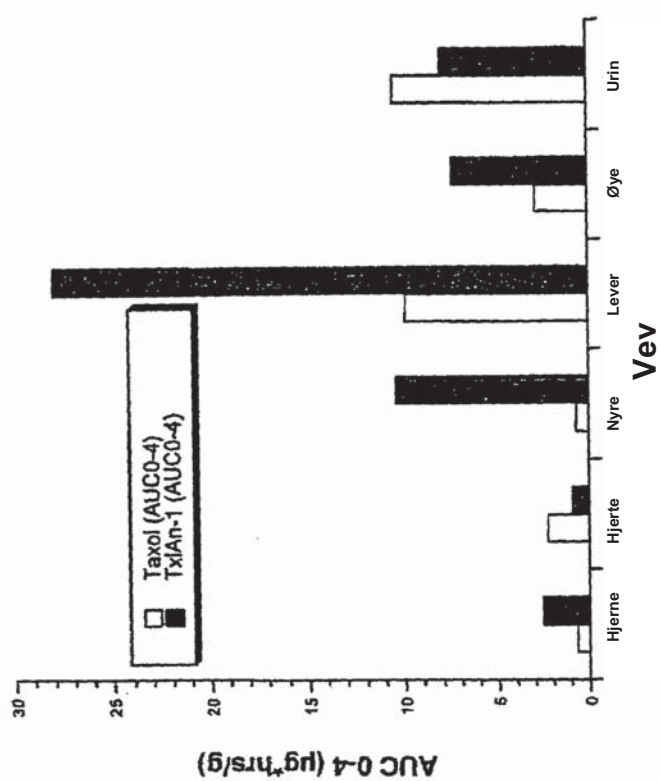


Fig. 10A

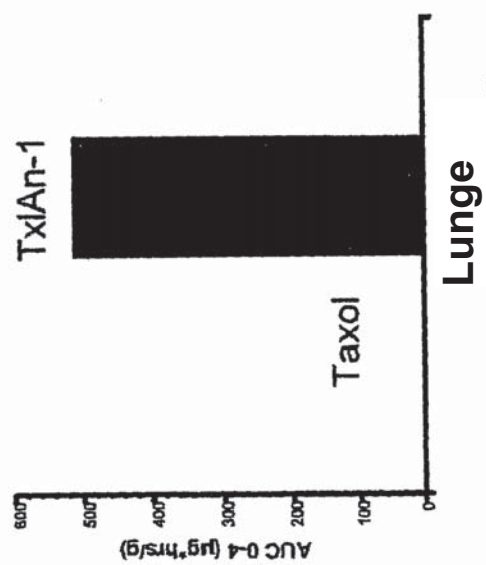


Fig. 10B

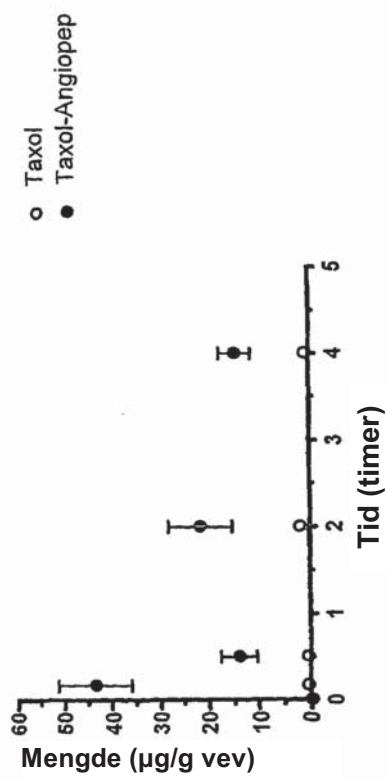


Fig. 11

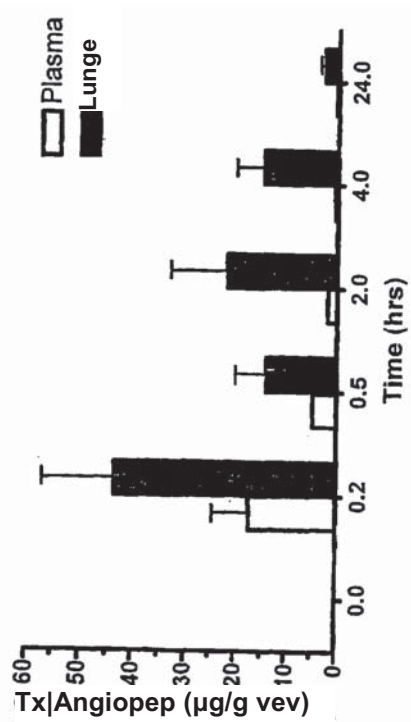


Fig. 12

AngioPep-2



Fig. 13A

AngioPep-7

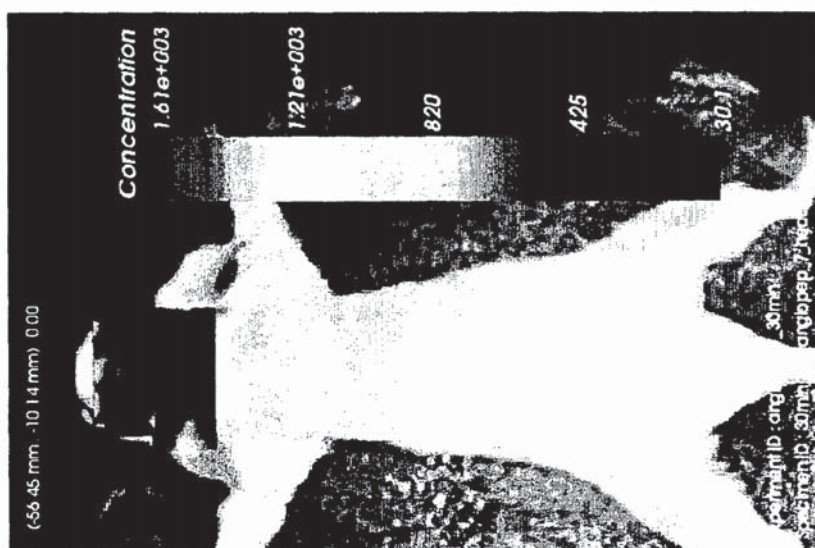


Fig. 13B

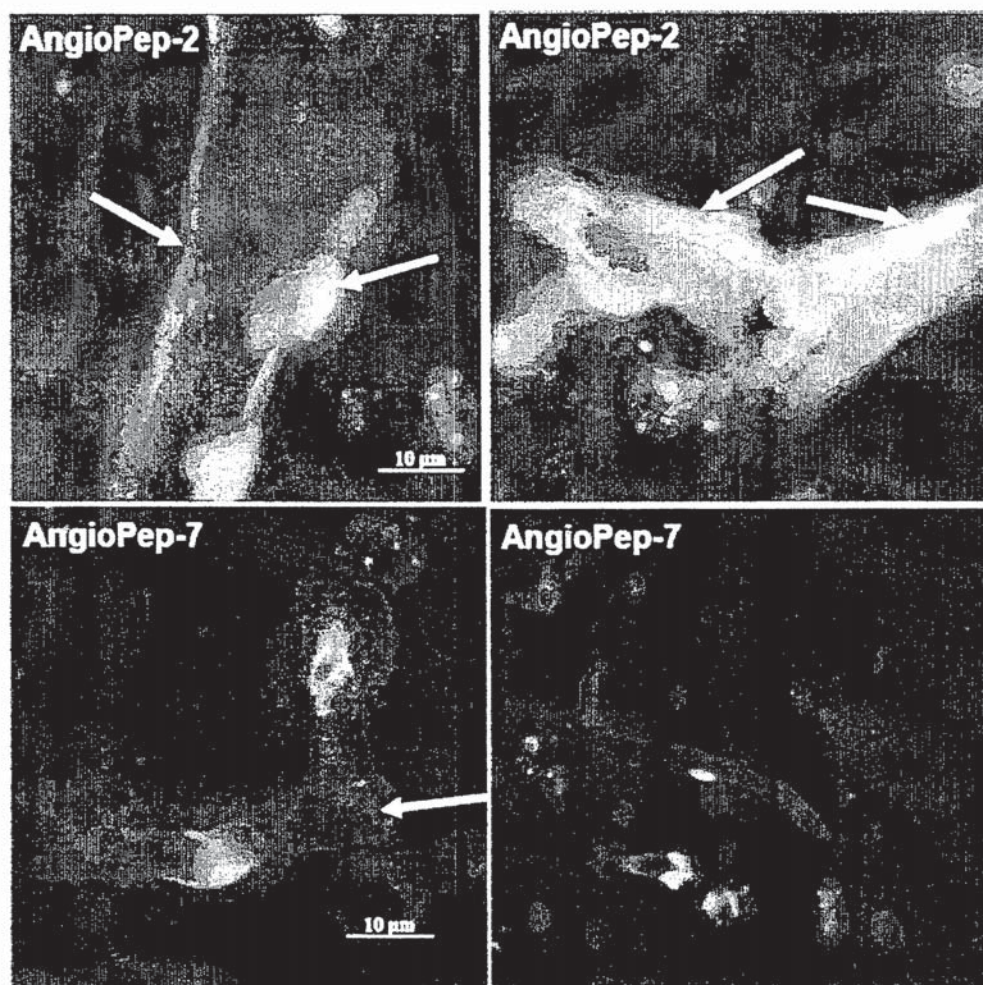


Fig. 14

Lifetime

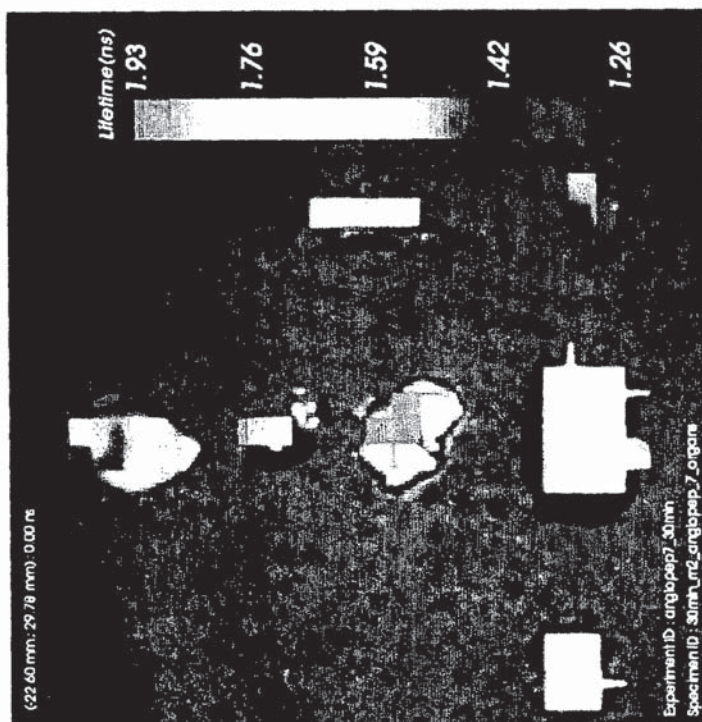


Fig. 15B

Intensity

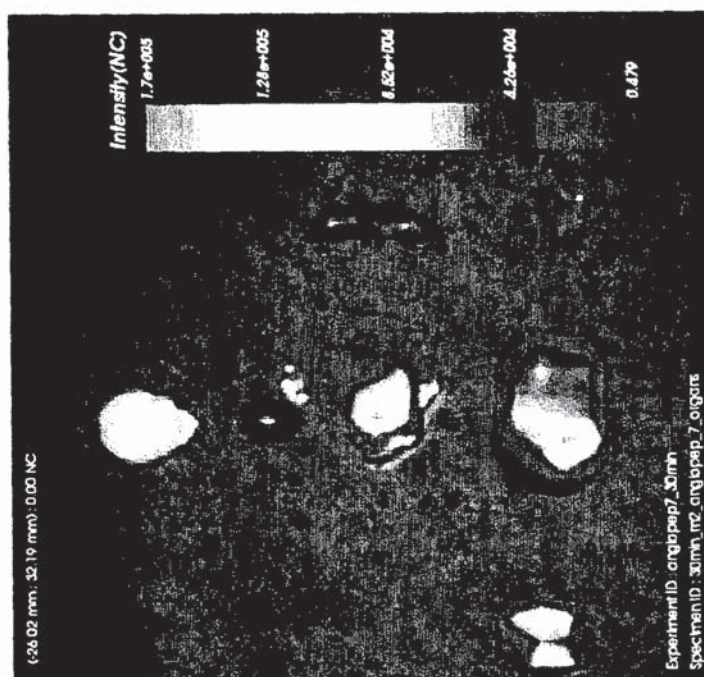


Fig. 15A

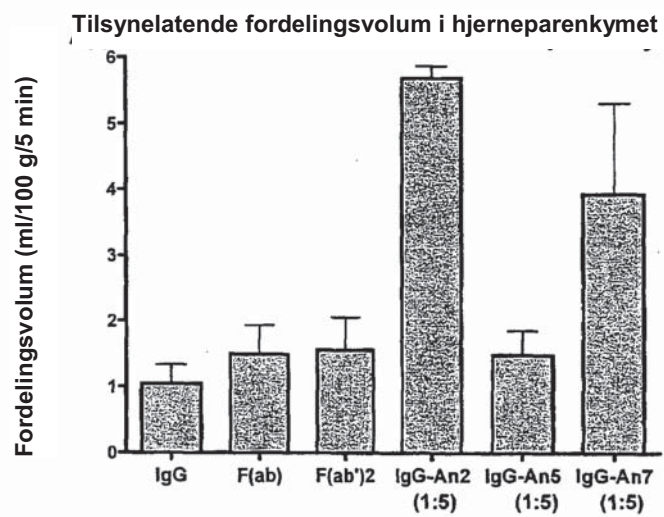


Fig. 16

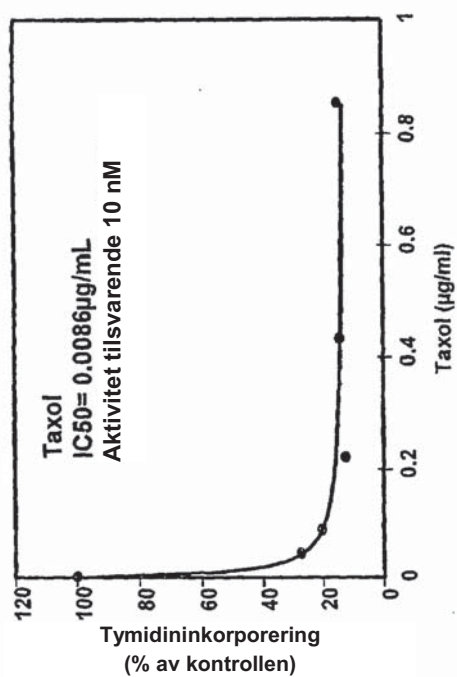


Fig. 17

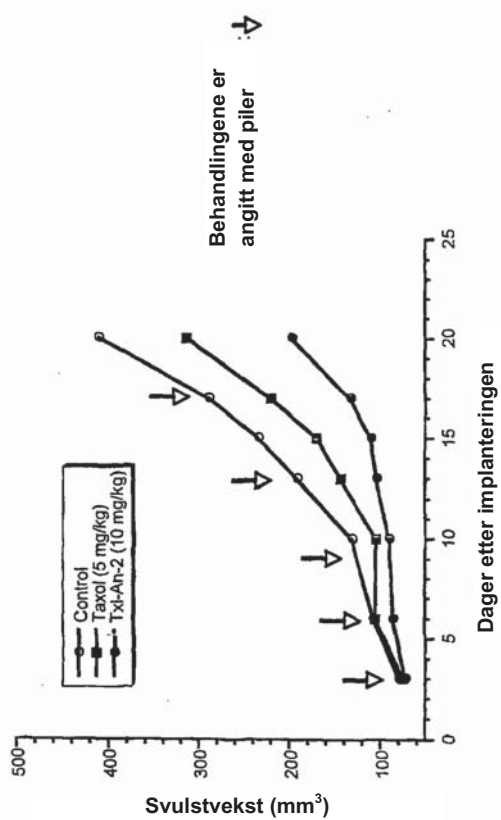


Fig. 18A

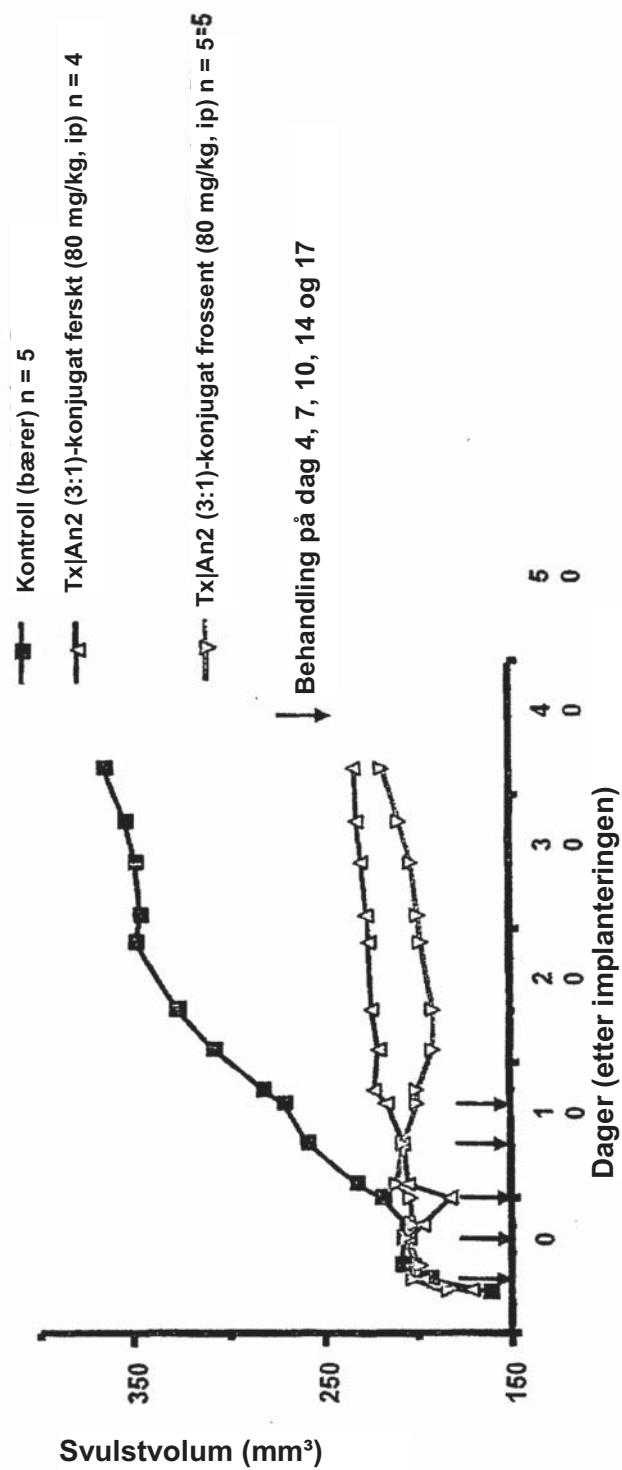
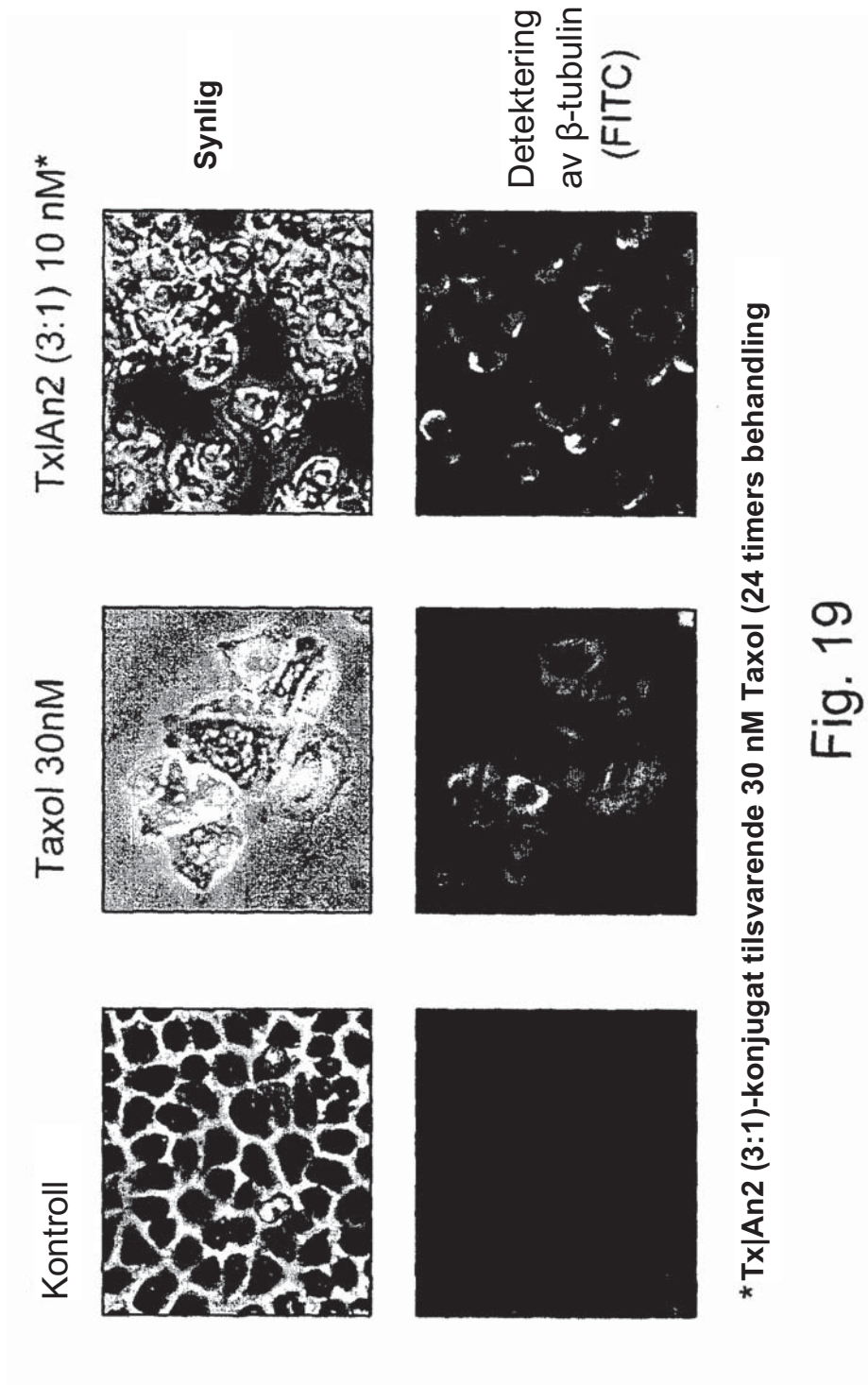


Fig. 18B



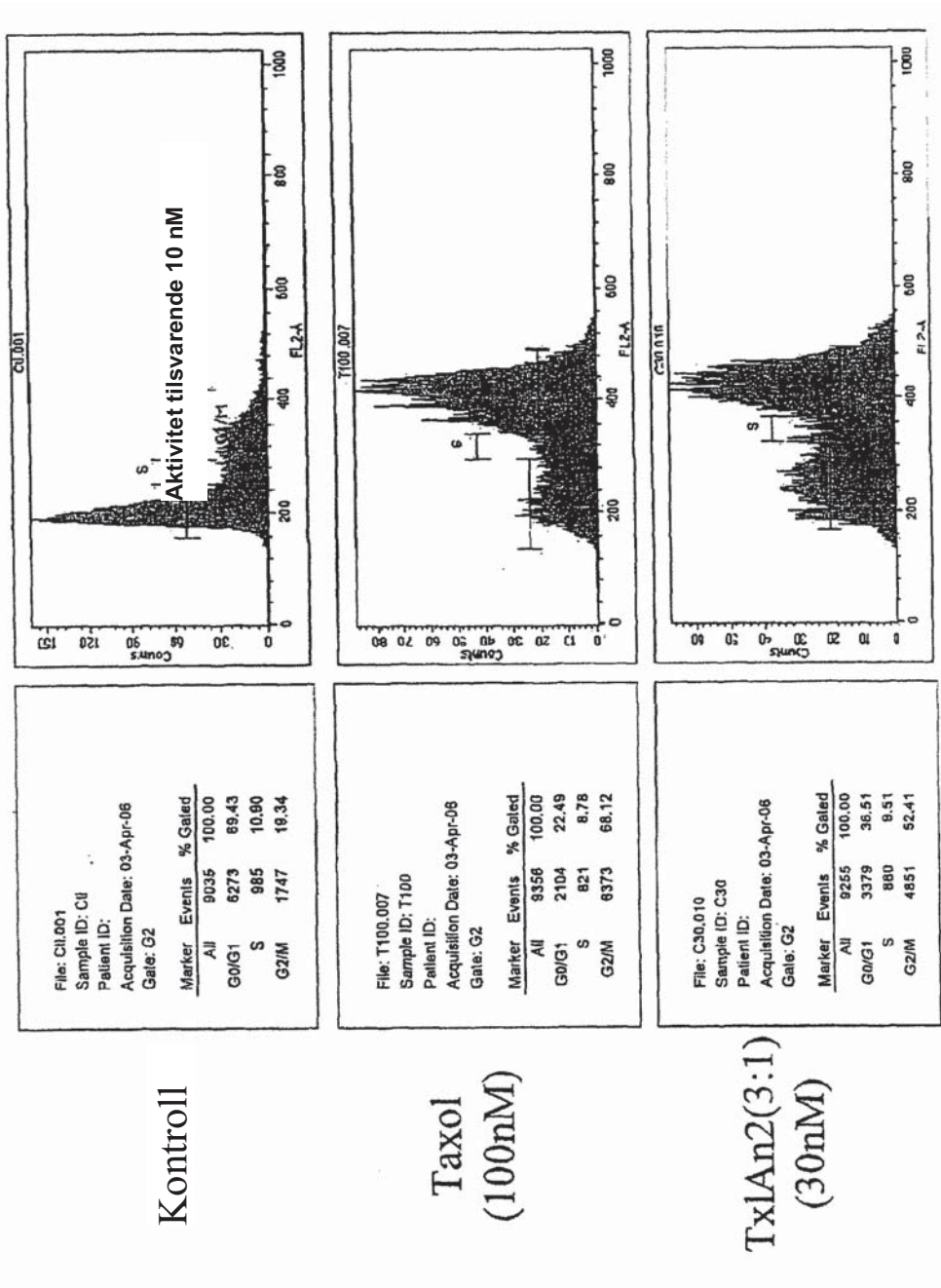


Fig. 20

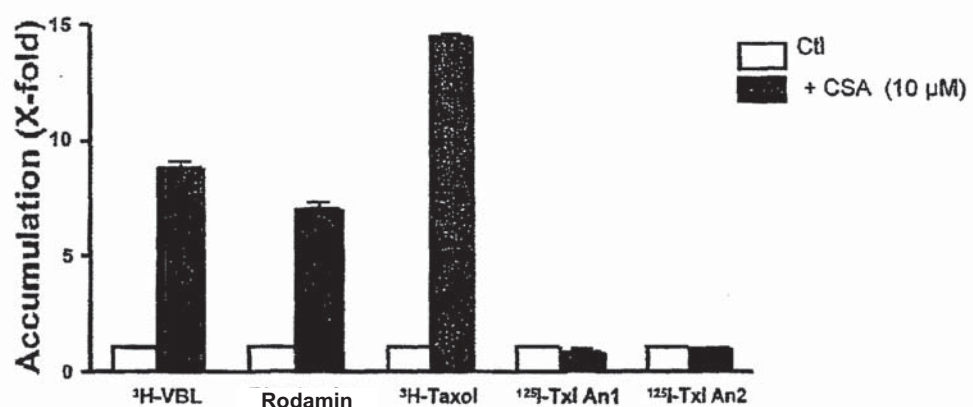


Fig. 21A

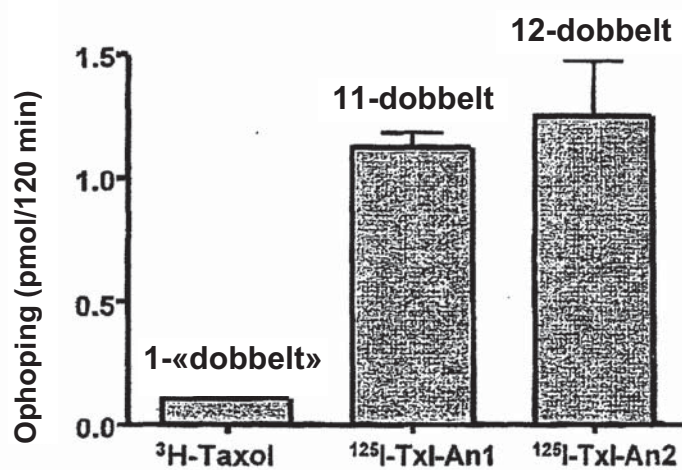
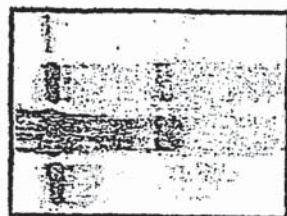


Fig. 21B

LRP-uttrykking i hjernesvulster

A. Primære hjernesvulster

U-87-glioblastomer



LRP →

Fig. 22A

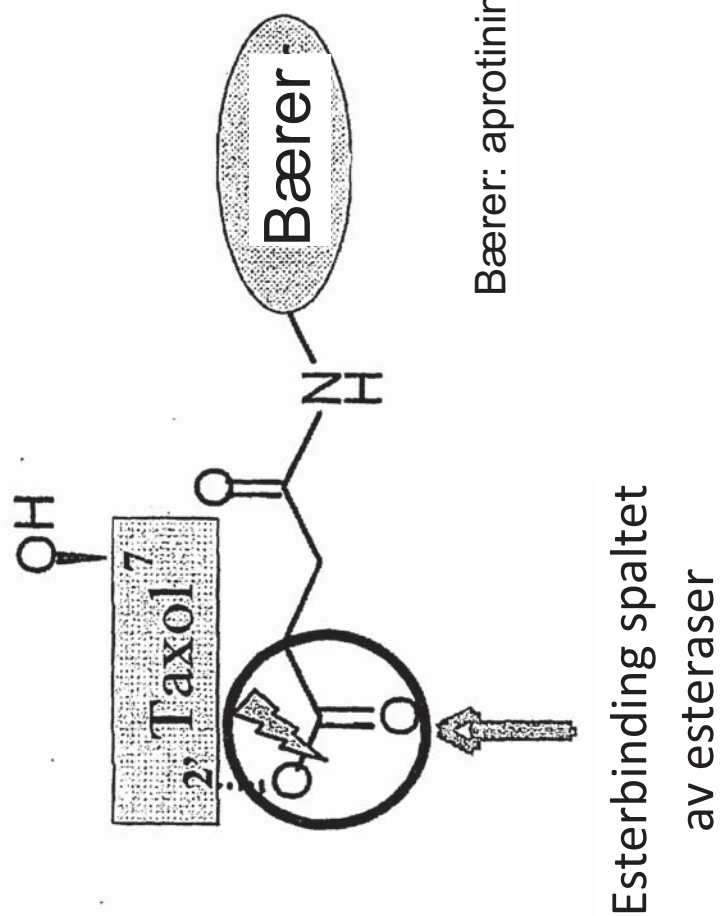
A. Hjernemetastaser fra

U-87 Lunge Bryst Melanomer



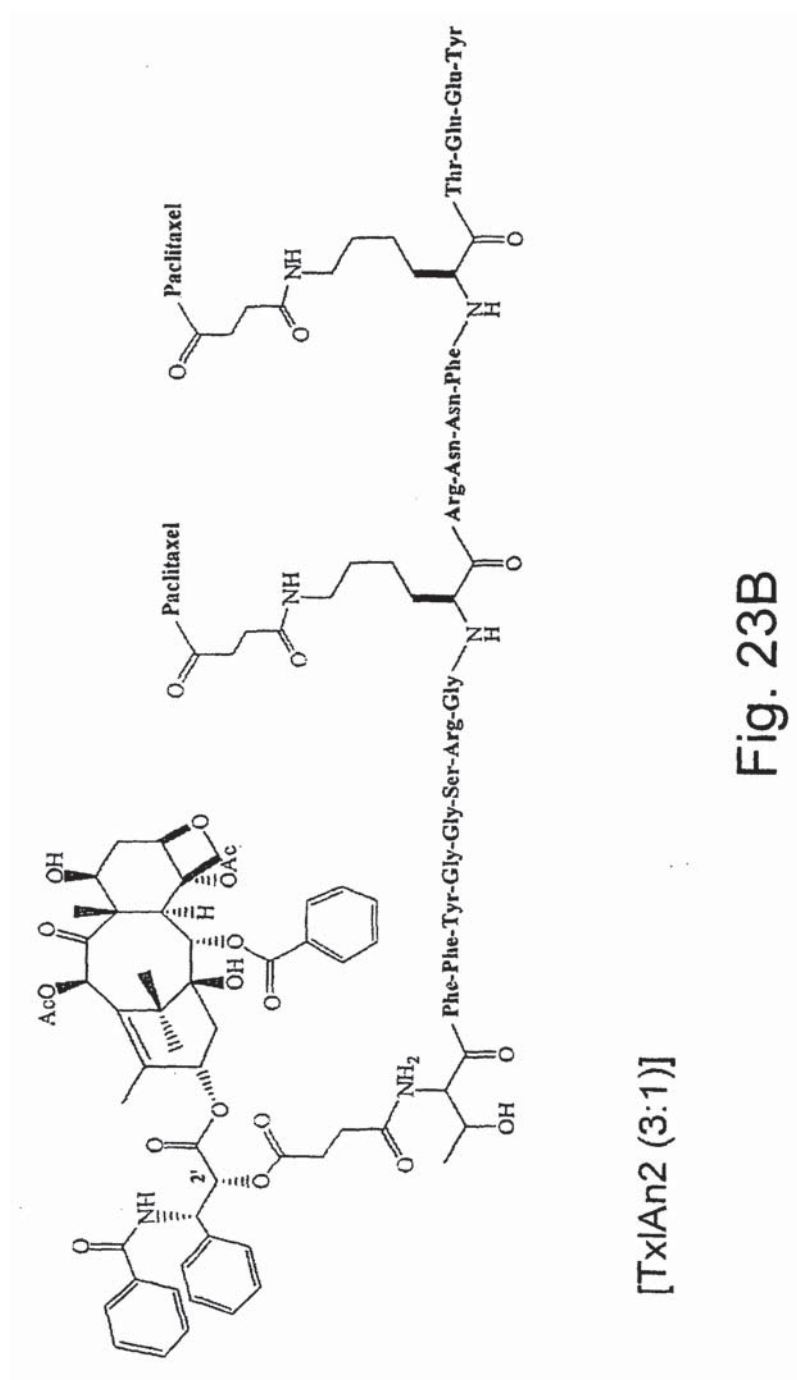
LRP →

Fig. 22B



Bærer: aprotinin eller Angiopep-1 eller

Fig. 23A



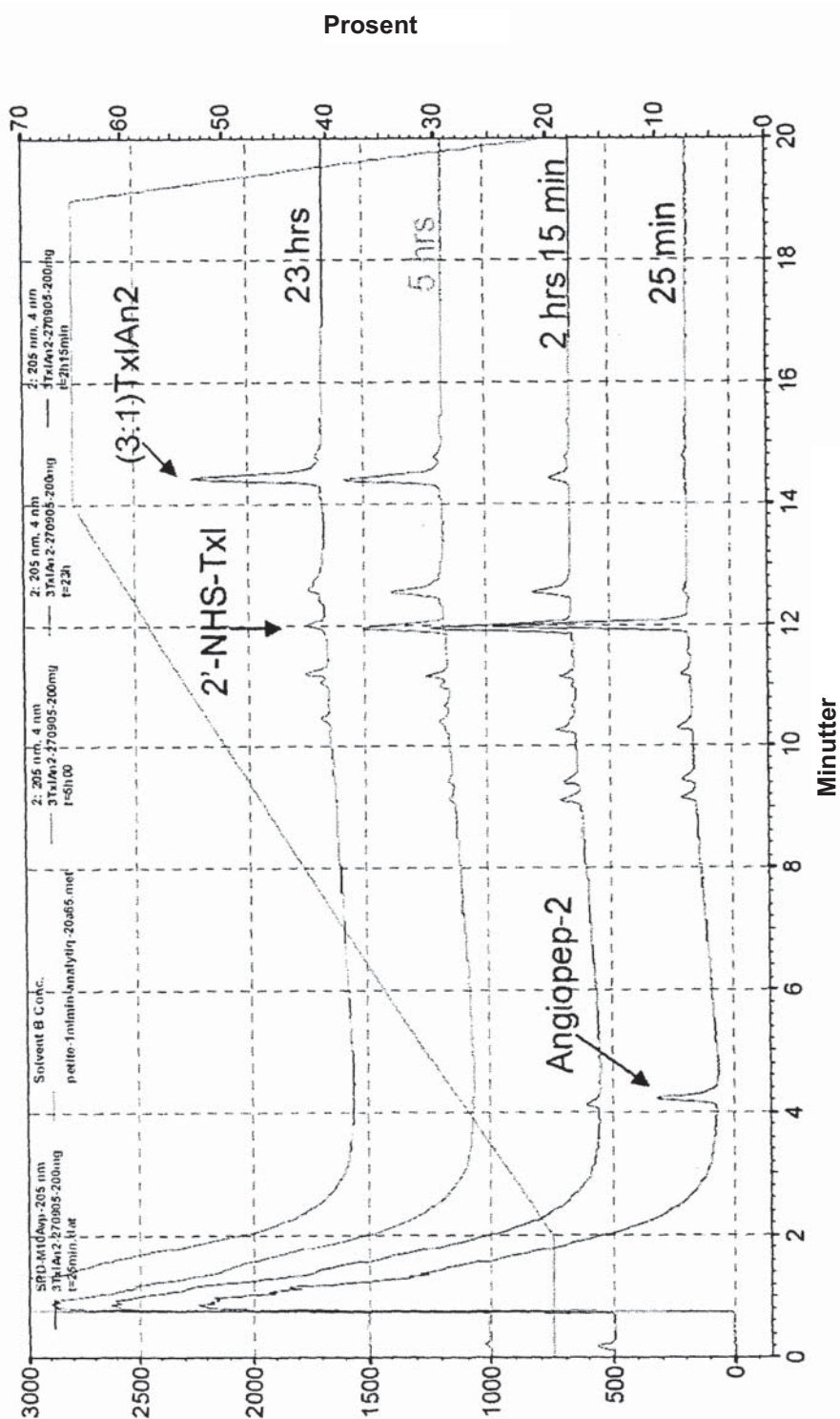


Fig. 24

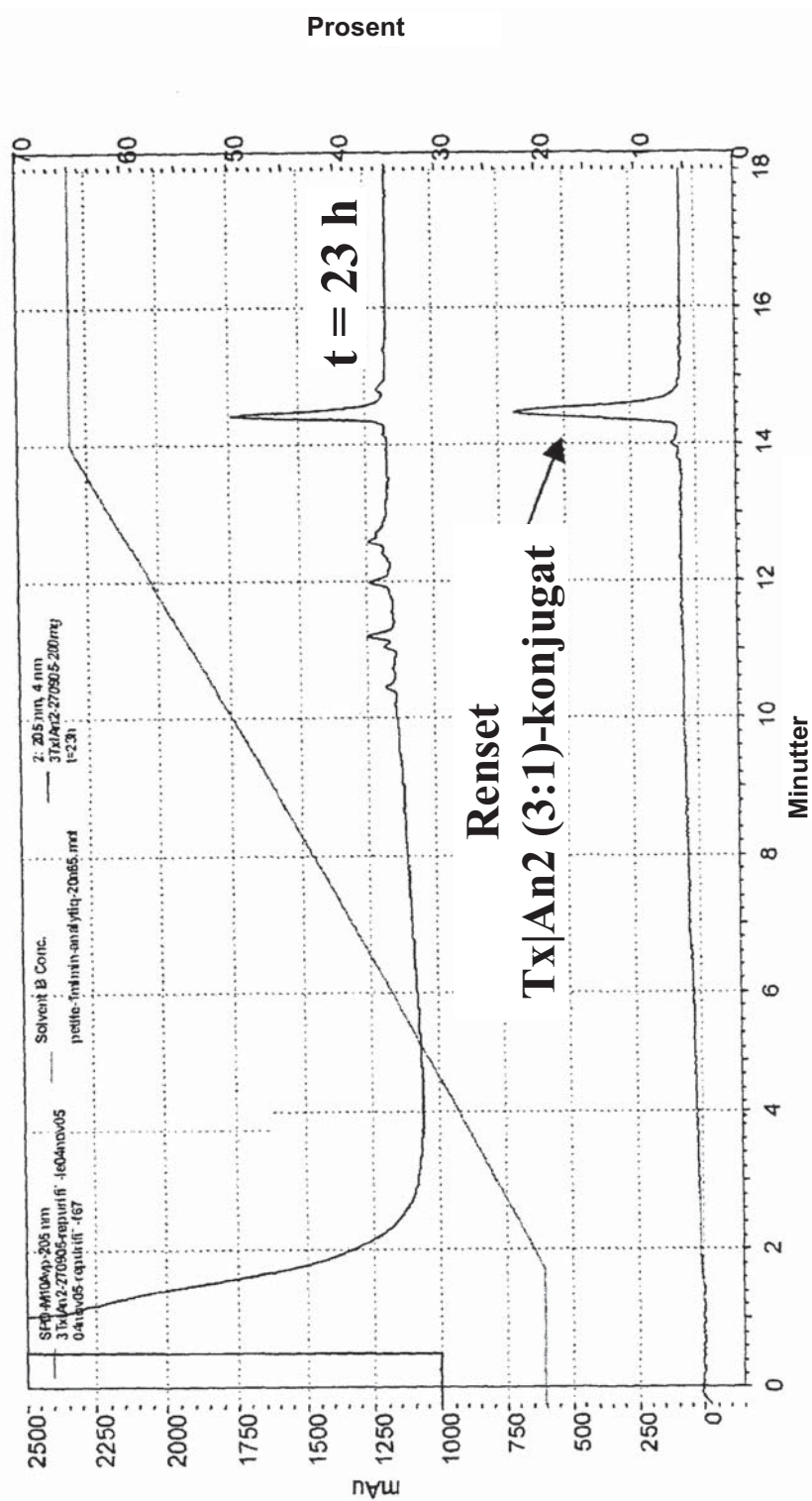


Fig. 25

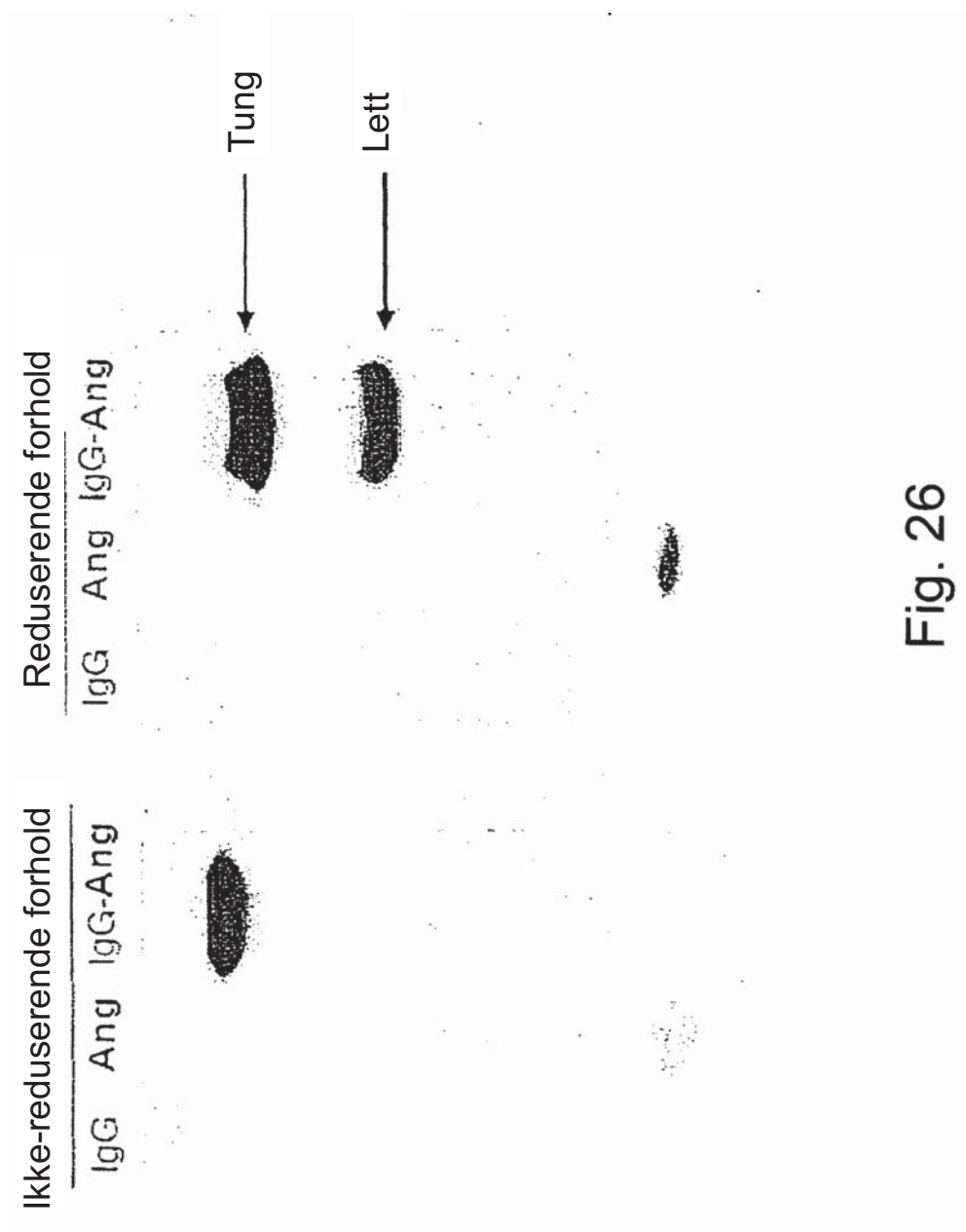
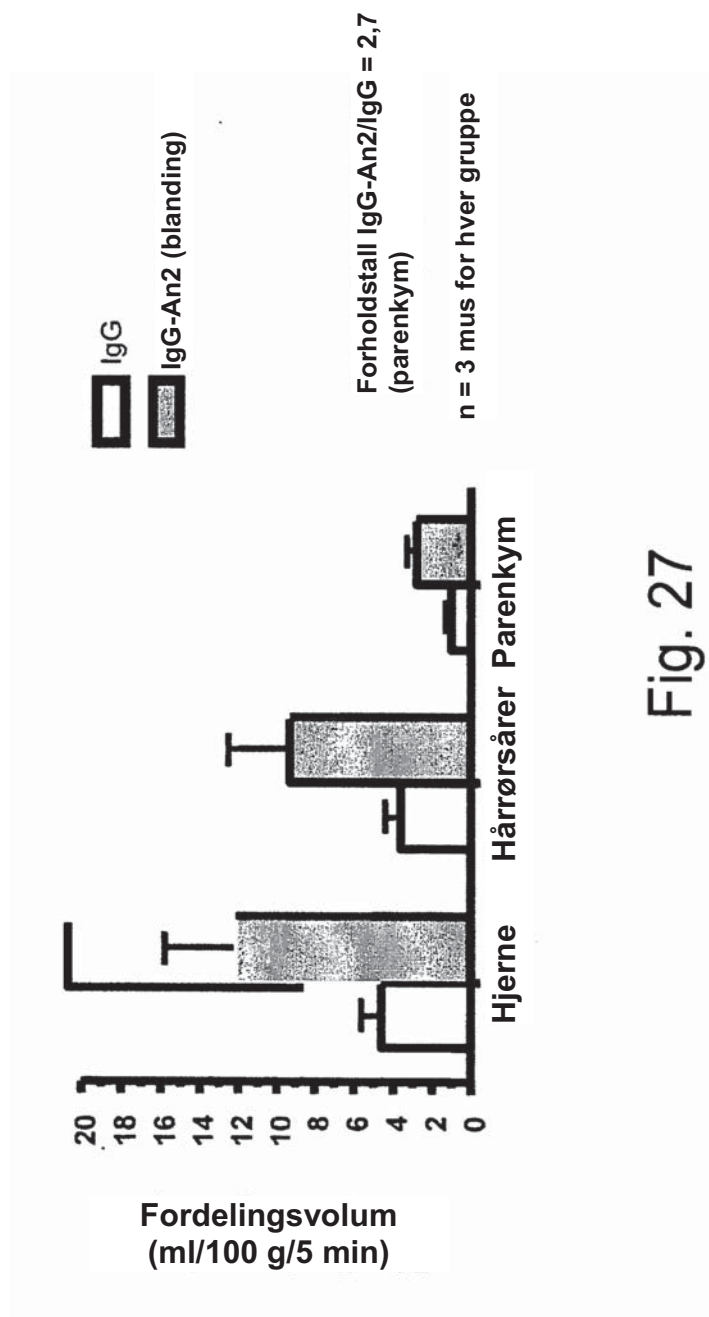


Fig. 26



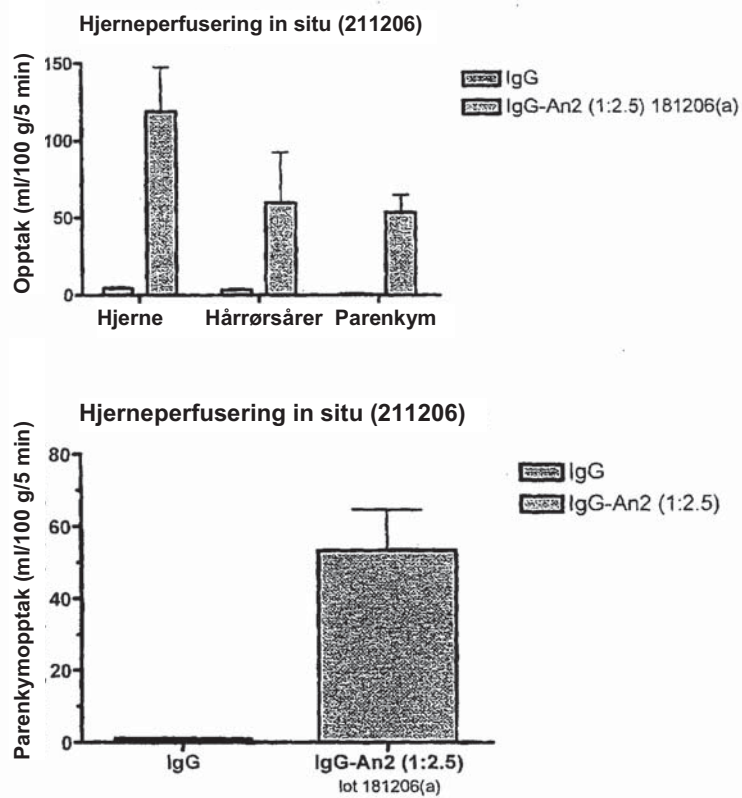


Fig.28

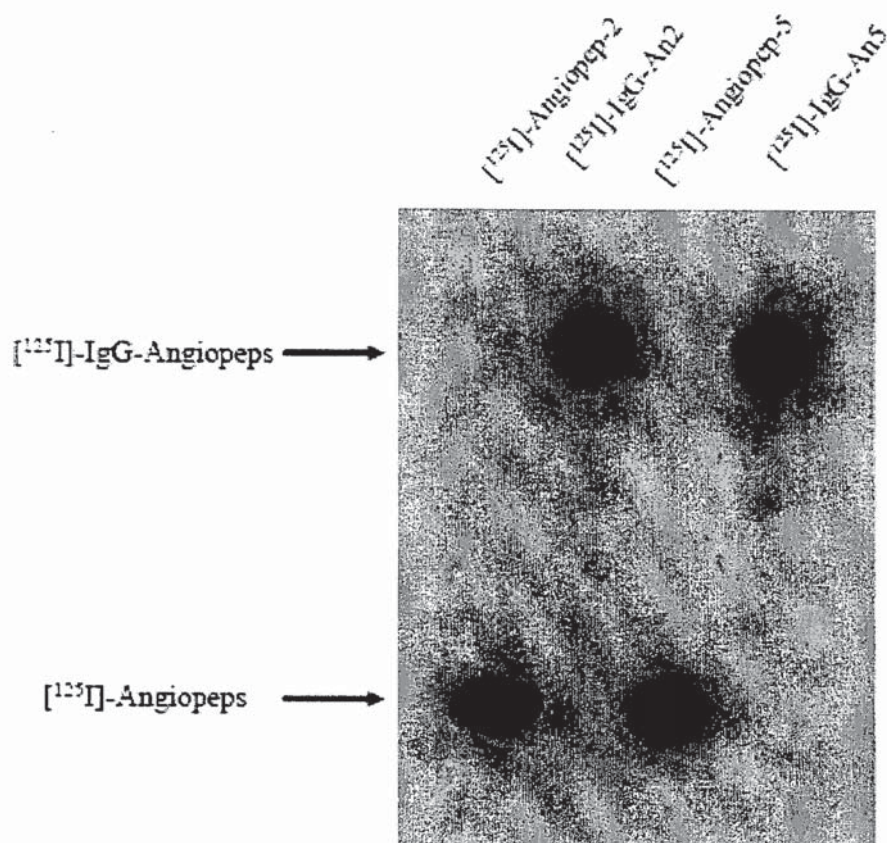


Fig. 29

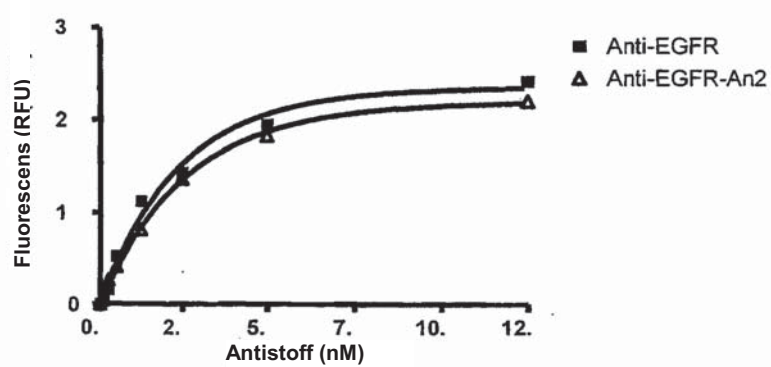


Fig.30

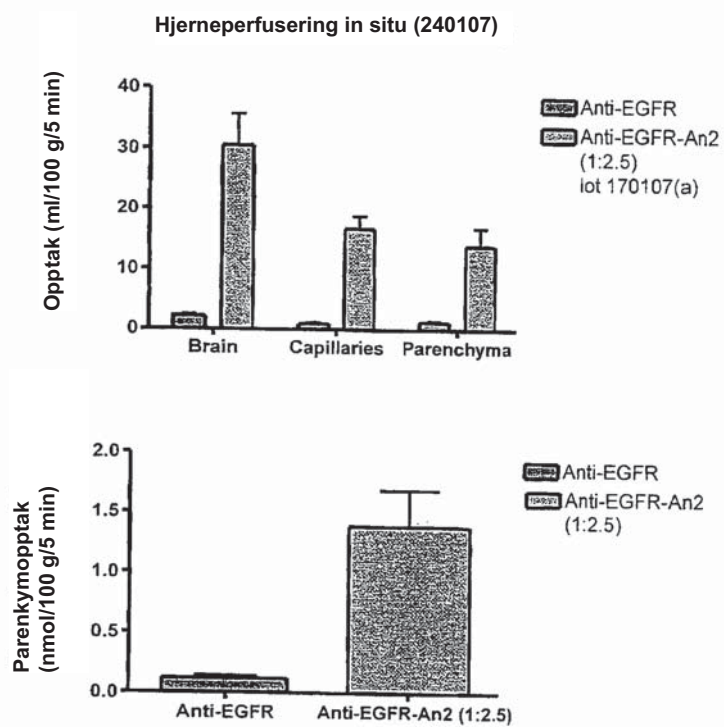


Fig.31

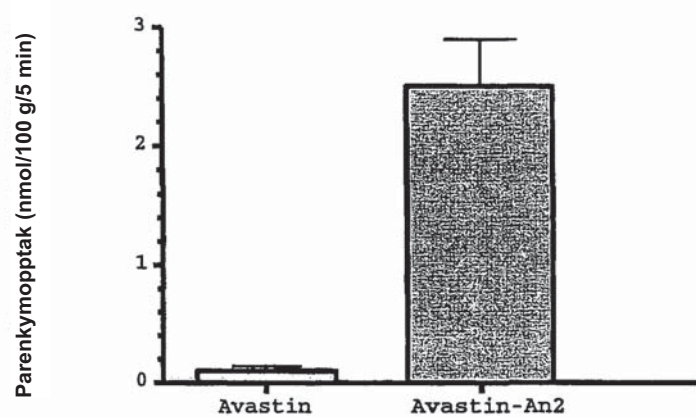


Fig.32

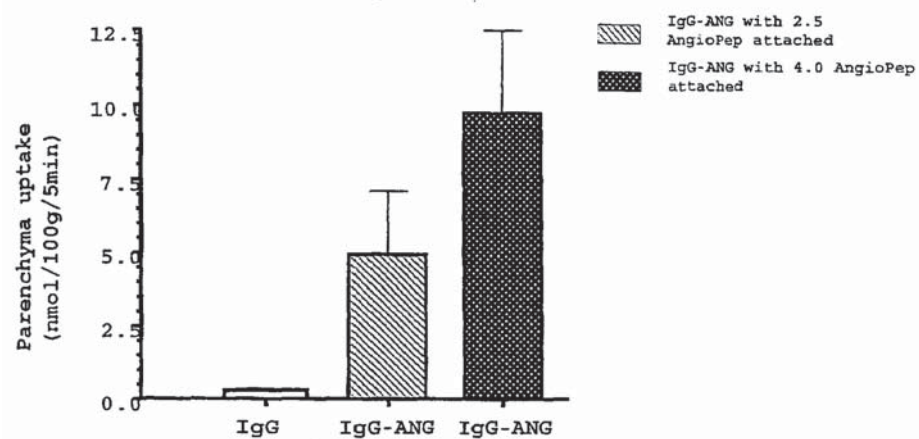


Fig.33