



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2235044 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/32 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.02.17
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.10.09
(86)	Europeisk søknadsnr	08864430.7
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.12.22
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.10.06
(30)	Prioritet	2007.12.21, EP, 07150395
(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	Affibody AB, Box 20137, 161 02 Bromma, SE-Sverige
(72)	Oppfinner	ABRAHMSÉN, Lars, Lillängsgatan 28, S-168 58 Bromma, SE-Sverige HERNE, Nina, Nybodaringen 64, S-117 62 Stockholm, SE-Sverige FELDWISCH, Joachim, Korallvägen 16, S-135 42 Tyresö, SE-Sverige LENDEL, Christofer, Glavagatan 3, S-123 71 Farsta, SE-Sverige TOLMACHEV, Vladimir, Stenhagsvägen 255, S-752 66 Uppsala, SE-Sverige
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Nye polypeptider med affinitet for HER2
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2005/003156, WO-A-2007/065635 LINHULT MARTIN ET AL: "Improving the tolerance of a protein a analogue to repeated alkaline exposures using a bypass mutagenesis approach." PROTEINS 1 MAY 2004, vol. 55, no. 2, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 407-416, XP002488610 ISSN: 1097-0134 ORLOVA ANNA ET AL: "Synthetic affibody molecules: a novel class of affinity ligands for molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors." CANCER RESEARCH 1 MAR 2007, vol. 67, no. 5, 1 March 2007 (2007-03-01), pages 2178-2186, XP002488607 ISSN: 0008-5472 cited in the application ORLOVA ANNA ET AL: "Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule." CANCER RESEARCH 15 APR 2006, vol. 66, no. 8, 15 April 2006 (2006-04-15), pages 4339-4348, XP002488605 ISSN: 0008-5472 ORLOVA ANNA ET AL: "Update: affibody molecules for molecular imaging and therapy for cancer." CANCER BIOTHERAPY & RADIOPHARMACEUTICALS OCT 2007, vol. 22, no. 5, October 2007 (2007-10), pages 573-584, XP002488606 ISSN: 1084-9785 TOLMACHEV VLADIMIR ET AL: "Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a ¹⁷⁷ Lu-labeled HER2-specific Affibody molecule." CANCER RESEARCH 15 MAR 2007, vol. 67, no. 6, 15 March 2007 (2007-03-15), pages 2773-2782, XP002488609 ISSN: 0008-5472 TRAN THUY ET AL: "(^{99m} Tc)-maEEE-Z(HER2:342), an Affibody molecule-based tracer for the detection of HER2 expression in malignant tumors." BIOCONJUGATE CHEMISTRY 2007 NOV-DEC, vol. 18, no. 6, November 2007 (2007-11), pages 1956-1964, XP002488608 ISSN: 1043-1802 WIKMAN M ET AL: "Selection and characterization of HER2/neu-binding affibody ligands" PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB, vol. 17, no. 5, 18 June 2004 (2004-06-18), pages 455-462, XP002982293 ISSN: 1741-0126

Område for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår nye polypeptider som binder til Human Epidermal Vekstfaktor-Reseptor 2 (i det følgende referert til som HER2). Foreliggende oppfinnelse angår også anvendelsen av et slikt HER2-bindende polypeptid som et
5 diagnostisk middel og/eller medikament for diagnose og/eller behandling av former for kreft karakterisert ved overekspresjon av HER2.

Bakgrunn

HER2 og dens rolle i kreftsykdommer

HER2 proto-onkogenet koder for fremstillingen av et 185 kDa celleoverflate reseptor-proteinet kjemt som HER2-proteinet eller –reseptoren (Hynes NE et al (1994) Biochim Biophys Acta 1198: 165-184). Dette genet blir også enkelte ganger referert til som *neu*, *HER2/neu* eller *c-erbB-2*. *Neu* ble først oppdaget i rotter som hadde blitt behandlet med etylnitrosurea, og oppviste mutasjon av dette gen (Shih C et al (1981) Nature 290: 261-264). Den muterte versjon av *neu* resulterer i produksjonen av en
10 konstituttivt aktiv form av reseptoren, og utgjør et kraftig onkogen som kan transformere celler ved lavt kopiantall (Hynes NE et al, over).

Normale celler uttrykker en liten mengde av HER2-protein på sine plasmamembraner i et vevsspesifikt mønster. Ingen kjent ligand for HER2 har blitt utledet, men HER2 har blitt vist å danne heterodimerer med HER1 (den epidermale vekstfaktorreseptor, EGFR), HER3 og HER4 i kompleks med ligandene for disse
20 reseptorer. Slik heterodimer-dannelse fører til at den aktiverte HER2-reseptor overfører vekstsignaler fra utsiden av cellen til kjernen for således å kontrollere aspekter av normal cellevekst og deling (Sundaresan S et al (1999) Curr. Oncol. Rep. 1: 16-22).

I tumorceller kan feil i DNA replikasjonssystemet resultere i eksistensen av
25 multiple kopier av et gen på et enkelt kromosom, noe som er et fenomen kjent som genamplifikasjon. Amplifikasjon av HER2-genet fører til en øket transkripsjon av dette genet. Dette øker HER2 mRNA-nivåene og øker den tilhørende syntese av HER2-protein, noe som resulterer i HER2-protein overekspresjon på overflaten av disse tumorceller. Denne overekspresjonen kan resultere i at HER2-nivåer som er 10 til 100
30 ganger større enn dem funnet i de tilstøtende normale celler. Således resulterer dette i sin tur i øket celledeling og en tilhørende høyere cellevekstgrad. Amplifikasjon av HER2-genet er implikert i transformasjon av normale celler til kreftfenotypen (Hynes NE et al, ovenfor; Sundaresan S et al, ovenfor).

Overekspresjon av HER2-protein er antatt å resultere i dannelsen av homodimerer av HER2, noe som i sin tur resulterer i en konstituttivt aktiv reseptor (Siwkowski MX et al (1999) Semin. Oncol. 26 (4 Suppl. 12): 60-70). Under disse forhold kan vekstfremmende signaler bli kontinuerlig overført inn i cellene ved fravær
5 av ligander. Følgelig blir multiple intracellulære signaltransduksjonsveier aktivert, noe som resulterer i uregulert cellevekst og, i visse tilfeller, onkogen transformasjon (Hynes NE et al, ovenfor). Således er signaltransduksjonsmekanismer fremmet av vekstfaktorreseptorer viktige mål for inhibering av cellereplikasjon og tumorvekst.

Brystkreft er den viktigste sykdommen blant kvinner i De Forente Stater med
10 192200 nye tilfeller forutsagt å ha inntruffet i 2001 (Greenlee R. et al (2001) CA Cancer J. Clin. 51: 15-36). I omkring 25% av alle brystkreftpasienter finnes det en overekspresjon av HER2-genet grunnet amplifikasjonen av dette (Slamon DJ et al (1989) Science 244: 707-712). Denne overekspresjonen av HER2-protein korrelerer med flere negative prognostiske variabler innbefattende østrøgen reseptor-negativ
15 status, høy S-fase-fraksjon, positiv nodal status, mutert p53 og høy kjernegrad (Sjögren S et al (1998) J. Clin. Oncol. 16(2): 462-469). Ifølge Slamon et al (ovenfor) ble amplifikasjonen av HER2-genet funnet å korrelere kraftig med forkortet sykdomsfri overlevelse og forkortet total overlevelse av node-positive pasienter.

Av disse grunner har det vært, og er fremdeles, et viktig mål å fortsette videre
20 undersøkelser i rollen av HER2 i patogenesen og behandlingen av brystkreft. Identifikasjonen av molekyler som samvirker med HER2 utgjør en del av dette tiltaket.

Prekliniske in vitro-studier har undersøkt hvorvidt inhiberingen av HER2-aktivitet kunne påvirke tumorcellevekst. Behandling av SK-BR-3 brystkreftceller som overuttrykker HER2-protein, med 4D5 som er et av flere murine anti-HER2
25 monoklonale antistoffer, inhiberte faktisk tumorcelleproliferasjon i forhold til behandling med et monoklonalt kontroll-antistoff. Administrasjon av 4D5 til mus som bærer human bryst- og ovariekreft (xeno-transplantater) som overuttrykker HER2, forlenget deres tumor-frie overlevelsestid. Liknende studier viste vekstinhibering med anti-HER2 monoklonale antistoffer i human magekreft xenotransplantater i mus (Pietras
30 RJ et al (1994) Oncogene 9: 1829-1838).

Blant metodene for å hemme HER2 proteinoverskuddet som er til stede på tumorcelleoverflater, har en behandling blitt kommersielt tilgjengelig under de senere år. Således blir den humaniserte variant av monoklonalt antistoff 4D5, eller

trastuzumab, markedsført for dette formålet av F. Hoffmann-La Roche og Genentech under varemerket Herceptin®.

Overekspresjon av HER2 har således blitt beskrevet for brystkreft. Den har også blitt koblet til bl.a. ovariekreft, magekreft, blærekreft, spyttkjertelkreft, lungekreft
 5 (Holbro et al, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004. 44: 195-217) og kreft i spiserøret (Ekman et al., Oncologist 2007; 12; 1165-1177, s spesielt sidene 1170-1171).

Uansett de innlysende fordelene som blir vist av antistofferterapi mot krefttyper karakterisert ved overekspresjon av HER2-protein, eksisterer det faktum at en mengde faktorer har potensialet å redusere antistoffeffektiviteten (se for eksempel Reilly RM et
 10 al (1995) Clin. Pharmacokinet. 28: 126-142). Disse innbefatter de følgende: (1) begrenset penetrering av antistoffet inn i en stor fast tumor eller inn i vitale områder så som hjernen; (2) redusert ekstravasering av antistoff inn i målområder grunnet minsket vaskulær permeabilitet; (3) kryssreaktivitet og ikke-spesifikk binding av antistoff til normale vev, noe som reduserer den målrettende effekt, (4) heterogent tumor-opptak,
 15 noe som resulterer i ubehandlede soner; (5) øket metabolisme av injiserte antistoff, noe som reduserer terapeutiske effekter, og (6) rask dannelse av HAMA og humane antihumane antistoffer, noe som inaktiverer det terapeutiske antistoff.

I tillegg har de toksiske effekter vært et hovedhinder for utviklingen av terapeutiske antistoffer mot kreft (Carter P (2001) Nat. Rev. Cancer 1: 118-129;
 20 Goldenberg DM (2002) J. Nucl. Med 43: 693-713; Reichert JM (2002) Curr. Opin. Mol. Ther. 4: 110-118). Kryssreaktivitet med friskt vev kan forårsake store bieffekter for ukonjugerte (nakne) antistoffer, hvilke bieffekter kan bli forsterket ved konjugering av antistoffene med toksiner eller radioisotope. Immunomedierte komplikasjoner innbefatter dyspnoea fro pulmonare toksiske effekter, tilfeldige sentrale og perifere
 25 nervesystemkomplikasjoner og minsket lever- og nyrefunksjon. Enkelte ganger kan uventede toksiske komplikasjoner bli observert så som de kardiotoxiske effekter assosiert med det HER2 målrettede antistoff trastuzumab (Schneider JW et al (2002) Semin.Oncol. 29 (3 suppl. 11): 22-28). Radioimmunoterapi med isotop-konjugerte antistoffer kan også forårsake benmargssupresjon.

30 På tross av den nylige klinisk og kommersielle suksess av de for tiden anvendte anti-kreft antistoffer står det således tilbake et stort antall spørsmål angående fremtiden til anvendelsen av antistoffene. Som en følge av dette forblir den fortsatte utvikling av midler med en sammenliknbar affinitet for HER2 en gjenstand for stor interesse innen

fagområdet så vel som fremskaffelse av anvendelse av slike molekyler innen diagnose og behandling av sykdommer.

HER2 som binder Z-variante molekyler

5 Molekyler relatert til protein Z, avledet fra domene B av staphylokkisk protein A (SPA) (Nilsson B et al (1987) Protein Engineering 1, 107-133) har blitt valgt fra et bibliotek av randomiserte slike molekyler som bruker forskjellige interaksjonsmål (se ; for eksempel WO95/19374; Nord K et al. (1997) Nature Biotechnology 15, 772-777; WO2005/000883; WO2005/075507; WO2006/092338; WO2007/065635).

10 I WO2005/003156 er et stort antall av Z-varianter md en egenskap å samvirke md HER2 beskrevet.

Beskrivelse av oppfinnelsen

Det er et mål for foreliggende oppfinnelse å tilfredsstille kravene til fortsatt fremskaffelse av substanser med en affinitet for HER2 via fremskaffelsen av et polypeptid som er særpreget ved spesifikk binding til HER2.

15 Et relatert mål for oppfinnelsen er et HER2-bindende polypeptid som oppviser lite eller ingen ikke-spesifikk binding.

Det er et annet mål for oppfinnelsen å fremskaffe et HER2-bindende polypeptid som lett kan bli brukt som en enhet i et fusjonspolypeptid.

20 Et ant mål er fremskaffelsen av et HER2-bindende polypeptid som løser et eller flere av de kjente problemer som erfares med eksisterende antistoff-reagenser.

Et ytterligere mål for oppfinnelsen er å fremskaffe et HER2-bindnde polypeptid som kan anvendes i terapeutiske applikasjoner.

Et videre mål for oppfinnelsen er å fremskaffe et HER2-bindende polypeptid som kan benyttes for anvendelse i diagnostiske applikasjoner.

25 Et relatert mål er å finne nye former for behandling, inhibering og/eller målretting i et klinisk miljø av lungekreftsykdommer som er særpreget ved en overekspresjon av HER2-protein.

Det er et annet mål for oppfinnelsen å fremskaffe et HER2-bindende polypeptid som lett kan syntetiseres ved kjemisk peptidsyntese.

Et relatert mål er å finne et HER2-bindende polypeptid som oppviser en forbedret stabilitet vis-a-vis kjente HER2-bindende midler.

5 Enda et annet mål for oppfinnelsen er å fremskaffe et HER2-bindende polypeptid som oppviser en lav antigenisitet når benyttet in vivo i et pattedyr.

Det er et annet mål for oppfinnelsen å fremskaffe et HER2-bindende polypeptid med en forbedret biodistribusjon ved administrasjon til et pattedyr.

10 Disse og andre mål blir tilfredsstilt av de forskjellige aspekter av oppfinnelsen som krevet i de medfølgende krav. Således fremskaffer oppfinnelsen i et første aspekt et polypeptid som har en aminosyresekvens som omfatter

EX₁RNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSELLX₂EAKKLNDSQ

hvor X₁ i posisjon 2 er M, I eller L og X₂ i posisjon 39 er S eller C (SEQ ID NO: 1),

eller i enkelte tilfeller mer foretrukket

15 YAKEX₁RNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSEL
LX₂EAKKLNDSQ

vor X₁ i posisjon 5 er M, I eller L og X₂ i posisjon 42 er S eller C (SEQ ID NO: 2),

eller i enkelte tilfeller mer foretrukket

20 AEAKYAKEX₁RNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQ
SSELLX₂EAKKLNDSQ

hvor X₁ i posisjon 9 er M, I eller L og X₂ i posisjon 46 er S eller C (SEQ ID NO: 3),

eller i enkelte tilfeller mer foretrukket

ESEKYAKEX₁RNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQ
SSELLX₂EAKKLNDSQ

hvor X_1 i posisjon 9 er M, I eller L og X_2 i posisjon 46 er S eller C (SEQ ID NO: 4).

I henhold til dette har foreliggende oppfinnere funnet at et polypeptid omfattende enhver av sekvensene SEQ ID NO: 1-4 oppviser overraskende fordeler for eksempel i forhold til de HER2-bindende polypeptider beskrevet i WO2005/003156, mens det opprettholder kapasiteten av de tidligere beskrevne polypeptider til å binde målet HER2. Ikke-begrensede eksempler på slike fordeler som oppvises av en eller flere utførelsesformer av polypeptidet i henhold til oppfinnelsen, er som følger:

- Det oppfinneriske polypeptid omfatter færre aminosyreresiduer som kan forårsake problemer så som lavt utbytte og suksessgrad i kjemisk syntese av polypeptidsekvensen, så som asparagin, arginin, asparaginsyre og metionin.
- Det oppfinneriske polypeptid omfatter færre aminosyreresiduer som gir overflatehydrofobisitet og således en mer hydrofil profil som tidligere beskrevet i forhold til HER2-bindende polypeptider. Dette implikerer færre problemer med lav oppløselighet og aggregering. Uten å ønske å være bunte av teori er det også ansett for tiden at de mer hydrofile karakteristika virker til å forflytte bloddistribusjonen av polypeptidet ved administrasjon til en vertsorganisme fra et hepatobiliært spor (utskilling gjennom leveren) mot et mer ønsket renalt spor (utskilling gjennom nyrene).
- Det oppfinneriske polypeptid omfatter færre aminosyreresiduer som er assosiert med stabilitetsproblemer av polypeptider så som metionin, asparagin og dipeptidet asparagin-prolin. Metionin er mottakelig for oksydering, asparagin er mottakelig for deamidering og asparagin-prolin-bindingen er mottakelig for spaltning, og de medvirker følgelig til ikke-homogeniteten av sluttproduktet.
- Det oppfinneriske polypeptid mangler aminosyreresiduer som i en liknende sekvenssammenheng, har blitt funnet å øke interaksjonen med immunoglobuliner som inneholder et tungkjede variabelt domene fra VH3 (Silverman G.J. Int. Rev. Immunol. 1992; 9(1): 57-78). Uten å ønske å være bundet av teori, er det for tiden antatt at erstatningen av slike aminosyreresiduer i polypeptidene ifølge oppfinnelsen reduserer antigenisiteten av polypeptidet ved administrasjon av dette til en vert.

Det oppfinneriske polypeptid kan anvendes som et alternativ til antistoffer mot HER2 i mange bruksområder. Som ikke-begrensede eksempler er de anvendelige ved behandling av krefttyper karakterisert av HER2 overekspresjon, ved inhibering av cellesignalisering ved binding til HER2 på en celleoverflate, i diagnose av krefttyper

som er særpreget av HER2 overekspresjon både in vivo og in vitro, i innretning av midler mot celler som overuttrykker HER2, i histokjemiske metoder for påvisning av HER2, i separasjonsmetoder og andre anvendelser. Polypeptidet ifølge oppfinnelsen kan vise seg å være anvendelig i enhver metode som baserer seg på affinitet for HER2
 5 av et reagens. Således kan polypeptidet bli brukt som et påvisningsreagens, et innfangningsreagens eller et separasjonsreagens i slike metoder, som et diagnostisk middel for diagnose in vivo eller in vitro eller som et terapeutisk middel i seg selv eller som et hjelpemiddel for å dirigere andre terapeutiske eller diagnostiske midler mot HER2-proteinet. Metoder som benytter polypeptidet ifølge oppfinnelsen in vitro kan bli
 10 utført i forskjellige formater så som i mikrotierplater, i proteinoppstillinger, på biosensoroverflater, i vevssnitt, og så videre.

Forskjellige modifikasjoner av og/eller tillegg til polypeptidet ifølge oppfinnelsen kan bli utført for å skreddersy polypeptidet til det spesielle tiltenkte formål, uten å fravike fra omfanget av foreliggende oppfinnelse. Slike modifikasjoner er
 15 beskrevet i større detalj nedenfor og kan omfatte ytterligere aminosyrer innesluttet i samme polypeptidkjede eller markører og/eller terapeutiske midler som blir kjemisk konjugert eller på annen måte bundet til polypeptidet ifølge oppfinnelsen.

Uttrykk lik ”bindingsaffinitet for HER2”, ”HER2-binding” og liknende refererer til en egenskap hos et polypeptid som kan bli testet for eksempel ved bruk av overflate plasmonresonansteknologi så som et Biacore[®]-instrument (GE Healthcare). HER2
 20 bindingsaffinitet kan bli testet i et forsøk hvor HER2 eller et fragment derav, for eksempel det ekstracellulære domene eller et fusjonsprotein derav, blir immobilisert på en sensorchip av instrumentet, og en prøve inneholdende polypeptidet som skal testes, passerer over chipen. Alternativt blir polypeptidet som skal testes, immobilisert på en
 25 sensorchip av instrumentet og en prøve inneholdende inneholdende HER2 eller et fragment derav, for eksempel det ekstracellulære domene, passert over chipen. Fagpersonen kan så tolke sensogrammene som blir oppnådd, for å danne i det minste et kvalitativt mål for polypeptidets bindingsaffinitet for HER2. Dersom et kvantitativt mål er ønsket, for eksempel med det formål å etablere en viss K_D -verdi for interaksjonen, er
 30 det igjen mulig å bruke overflate plasmonresonansmetoder. Bindingsverdier kan for eksempel bli definert i et Biacore[®] 2000-instrument (GE Healthcare). HER2 eller et fragment derav, for eksempel det ekstracellulære domene, blir immobilisert på en sensorchip av instrumentet, og prøver av polypeptidet hvis affinitet skal bli bestemt, blir laget ved seriefortynning og injisert i tilfeldig rekkefølge. K_D -verdier kan så bli regnet
 35 ut fra resultatene ved å bruke for eksempel 1:1 Langmuir bindingsmodellen av BIA-evaluation 3.2-programmet laget av instrumentforhandleren.

Oppfinnelsen omfatter også polypeptider hvor det HER2-bindende polypeptid beskrevet ovenfor, er til stede som et HER2-bindende domene, til hvilket ytterligere aminosyreresiduer har blitt lagt til ved hver terminal. Disse ytterligere aminosyreresiduer kan spille en rolle i bindingen av HER2 av polypeptidet, men kan like godt har andre formål relatert for eksempel til en eller flere av fremstillingen, opprensningen, stabiliseringen eller påvisningen av polypeptidet. Slike ytterligere aminosyreresiduer kan omfatte et eller flere aminosyreresiduer tillagt for formål av kjemisk kobling. Et eksempel på dette er tilsetningen av et cystein-residuum ved den aller første eller aller siste posisjon av polypeptidkjeden, dvs. ved N- eller C-terminalen. Et cysteinresiduum til å bli brukt for kjemisk kobling, kan også bli lagt til ved å erstatte en annen aminosyre på overflaten av proteindomenet, foretrukket på en del av overflaten som ikke er involvert i målbinding. Slike ytterligere aminosyreresiduer kan også omfatte en "markør" for opprensning eller påvisning av polypeptidet så som en heksahistidylmarkør (His₆) eller en "myc"-markør eller en "FLAG"-markør for intraksjon med antistoffer som er spesifikke for markøren. Fagpersonen kjenner til andre alternativer.

I en spesiell utførelsesform av et polypeptid med ytterligere aminosyreresiduer fremskaffer oppfinnelsen er HER2-bindende polypeptid omfattende aminosyresekvensen

AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSELLSEAKK
LNDSQAPKVDC (SEQ ID NO: 5).

I en annen spesifikk utførelsesform av et polypeptid med ytterligere aminosyreresiduer fremskaffer oppfinnelsen et HER2-bindende polypeptid omfattende aminosyresekvensen

ESEKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSELLSEAKK
LNDSQAPK (SEQ ID NO: 6)

De "ytterligere aminosyreresiduer" som er beskrevet ovenfor, kan også utgjøre et eller flere polypeptiddomene(r) med enhver ønsket funksjon så som den samme bindende funksjon som det første HER2-bindende domene, eller en annen bindende funksjon eller en enzymatisk funksjon eller en fluorescent funksjon eller blandinger derav.

Således omfatter oppfinnelsen multimerer av polypeptidet omfattende enhver av sekvensene SEQ ID NO: 1-6. Det kan være av interesse, for eksempel når det benyttes polypeptidet ifølge oppfinnelsen for diagnose eller behandling av kreft eller i en fremgangsmåte for opprenskning av HER2, å oppnå enda sterkere binding av HER2 enn det som er mulig med et polypeptid ifølge oppfinnelsen. I dette tilfellet kan fremskaffelsen av en multimer så som en dimer, trimer eller tetramer, av polypeptidet gi de nødvendige aviditetseffekter. Multimeren kan bestå av et passende antall polypeptider ifølge oppfinnelsen. De bundne polypeptid-”enheter” i en multimer ifølge oppfinnelsen kan være bundet ved kovalent binding ved å bruke kjente organisk kjemi- metoder eller bli uttrykt som et eller flere fusjonspolypeptider i et system for rekombinant ekspresjon av polypeptider, eller koblet på enhver annen måte enten direkte eller via en linker, for eksempel en aminosyrelinker.

I tillegg er ”heterogene” fusjonspolypeptider, hvor polypeptidet omfattende enhver av sekvensene SEQ ID NO: 1-6 utgjør et første domene eller første enhet, og det andre og videre enheter har andre funksjoner enn binding av HER2, også påtenkt og faller innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse. Den andre og videre enhet/enheter av fusjonspolypeptidet kan omfatte et bindende domene med affinitet for et annet målmolekyl enn HER2. Resultatet er da et fusjonspolypeptid med minst et HER2-bindende domene og minst et domene med affinitet for nevnte andre målmolekyl. Dette gjør det mulig å danne multispesifikke reagenser som kan bli brukt i flere bioteknologiske applikasjoner så som benyttet som terapeutiske midler eller påvisnings- eller sparasjonsreagenser. Fremstillingen av slike multispesifikke multimerer av polypeptider hvor minst et polypeptiddomene omfatter enhver av sekvensene SEQ ID NO: 1-6, kan bli fremskaffet som beskrevet ovenfor for multimeren av flere HER2-bindende ”enheter”. Den andre eller ytterligere enhet eller enheter kan være en variant av et domene avledet fra protein A av *Staphylococcus aureus*, så som en variant av ”Z-domenet” eller ”protein Z” (Nilsson B et al (1987), supra) eller omfatte et urelatert, naturlig forekommende eller rekombinant protein (eller et fragment derav som opprettholder bindingsegenskapene av det naturlig forekommende eller rekombinante protein) med en bindingsaffinitet for målmaterialet. Et eksempel på et slikt bindende protein som har en affinitet for humant serum albumin og kan bli brukt som fusjonspartner med polypeptidet ifølge oppfinnelsen, er et av de albuminbindende domener fra protein G av *Streptococcus*-stammen G148 (Nygren P-Å t al (1988) Mol. Recogn. 1: 69-74) så som GA1-, GA2- eller GA3-domenet. GA3-domenet av protein G blir også betegnet ABD, dvs. albumin-bindende domene. Et fusjonspolypeptid mellom det HER2-bindende polypeptid omfattende enhver av sekvensene SEQ ID NO: 1-6 og et albumin-bindende domene streptokokkisk protein G, faller således innenfor

omfanget av foreliggende oppfinnelse. Når polypeptidet ifølge oppfinnelsen blir administrert til et menneske som et diagnostisk middel, terapeutisk middel eller som et målfinnende middel, kan fusjonen derav til en enhet som binder serum albumin, vise seg å være gunstig ved at halveringstiden in vivo av et slikt fusjonsprotein er sannsynlig å være utvidet i forhold til halveringstiden av den HER2-bindende enhet alene (dette prinsipp har blitt beskrevet i for eksempel WO91/01743). Likeledes re fusjonspolypeptidet trolig å oppvise en lavere immunogenisitet enn den HER2-bindende enhet alene i henhold til prinsippene utledet i WO2005/097202.

Andre muligheter for dannelsen av fusjonspolypeptider er også påtenkt. Således kan polypeptidet i henhold til det første aspekt av oppfinnelsen bli kovalent bundet til en andre eller videre enhet eller enheter som i tillegg til eller i stedet for målbinding oppviser andre funksjoner. Et eksempel er en fusjon mellom et eller flere polypeptid(er) omfattende enhver av sekvensene med SEQ ID NO: 1-6 samt et enzymatisk aktivt polypeptid som virker som en reporter- eller effektorenhet. Eksempler på reporterenzymen som kan bli koblet til polypeptidet omfattende enhver av sekvensene med SEQ ID NO: 1-6 for danne et fusjonsprotein, kjent for fagpersonen og innbefatter enzymer så som β -galaktosidase, alkalisk fosfatase, pepperrot peroksydase, karboksypeptidase. Andre muligheter for den andre og ytterligere enhet eller enheter av et fusjonspolypeptid ifølge oppfinnelsen innbefatter fluorescente polypeptider så som grønt fluorescent protein, rødt fluorescent protein, luciferase samt varianter derav.

Andre valg for det andre og ytterligere enhet eller enheter av et fusjonspolypeptid ifølge oppfinnelsen innbefatter en enhet eller enheter for terapeutiske applikasjoner. I terapeutiske applikasjoner kan andre molekyler også bli koblet, kovalent eller ikke-kovalent, til det oppfinneriske polypeptid på annen måte. Ikke-begrensede eksempler innbefatter enzymer for ADEPT (antibody-directed enzyme prodrug therapy) –applikasjoner som bruker polypeptidet ifølge oppfinnelsen for dirigering av effektor-enzymet (for eksempel karboksypeptidase); proteiner for innhenting av effektorceller og andre komponenter av immunsystemet, cytokiner så som IL-2, IL-12, TNF- α , IP-10, prokoagulant-faktorer så som vevsfaktor, von Willebrand faktor, toksiner så som ricin A, Pseudomonas eksotoksin, calchamicin, maytansinoid; toksiske små molekyler så som auristatinanaloger, doksorubicin.

Med hensyn til beskrivelsen ovenfor av fusjonsprotiner som innbefatter det HER2-bindende polypeptid ifølge oppfinnelsen, skal det bemerkes at tilsetningen av første, andre og ytterligere enheter er gjort av klarhetshensyn for å skjelne mellom den HER2-bindende enhet eller enheter på den ene side, og enheter som oppviser andre

funksjoner på den annen side. Disse betegnelser er ikke ment å referere til den faktiske rekkefølge av de forskjellige domener i polypeptidkjeden av fusjonsproteinet. Således kan for eksempel nevnte første enhet uten begrensning opptre ved den N-terminale ende, i midten eller ved den C-terminale ende av fusjonsproteinet.

5 Oppfinnelsen omfatter polypeptider hvor det HER2-bindende polypeptid beskrevet ovenfor har blitt utstyrt med en markørgruppe så som minst en fluorofor, biotin eller en reaktiv isotop, f.eks. for påvisningsformål av polypeptidet. Spesielt omfatter oppfinnelsen et radiomerket polypeptid bestående av et radiochelate av et HER2-bindende polypeptid som beskrevet ovenfor, og et radionuklid så som et
10 radioaktivt metall.

En stor del av radionuklider har en metallisk natur og metaller er typisk ute av stand til å danne stabile kovalente bindinger med elementer presentert i proteiner og peptider. Av denne grunn blir merking av målsøkende proteiner med radioaktive metaller utført med anvendelse av chelatorer, multidentate ligander som danner ikke-
15 kovalente forbindelser, kalt chelater, med metallet. I en utførelsesform av polypeptidet ifølge oppfinnelsen blir inkorporeringen av et radionuklid gjort mulig ved fremskaffelsen av et chelaterende miljø via hvilket radionuklidet kan bli koordinert, chelatert eller kompleksbundet til polypeptidet.

I en spesiell utførelsesform av polypeptidet ifølge oppfinnelsen omfatter dette et
20 tetradentat chelaterende miljø karakterisert som en N_3S -chelator. Som uttrykket N_3S indikerer, blir de fire bindende grupper av en slik chelator dannet av tre nitrogentomer og et svovelatom. I en N_3S chelator er N- og S-atomene romlig fordelt for å gi en passende «lomme» for kompleksbinding eller festing av det radioaktive metall.

En N_3S -chelator kan bli dannet via et passende valg av aminosyreresiduer i
25 aminosyresekvensen av polypeptidet.

For eksempel kan et N_3S -chelaterende miljø bli dannet via koblingen av merkaptacetyl til N-terminalen av polypeptidet ifølge oppfinnelsen. I denne utførelsesformen gir merkaptacetyldelen det nødvendige S-atom, mens de første tre N-atomer i peptidstammen utgjør de tre N-atomer av den tetradentate chelator.
30 Foretrukket blir merkaptacetyl koblet til et polypeptid omfattende aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 4 den mest N-terminale aminosyresekvens resulterer i et polypeptid omfattende aminosyresekvensen

MaESEKYAKEX₁RNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQ
SSELLX₂EAKKLND SQ

Hvor ma er merkaptacetyl, X₁ i posisjon 9 er M, I eller L og X₂ i posisjon 46 er S eller C. I en spesielt foretrukket utførelsesform har dette polypeptid sekvensen

5 MaESEKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQ
SSELLSEAKKLND SQAPK

Hvor ma er merkaptacetyl (SEQ ID NO: 7).

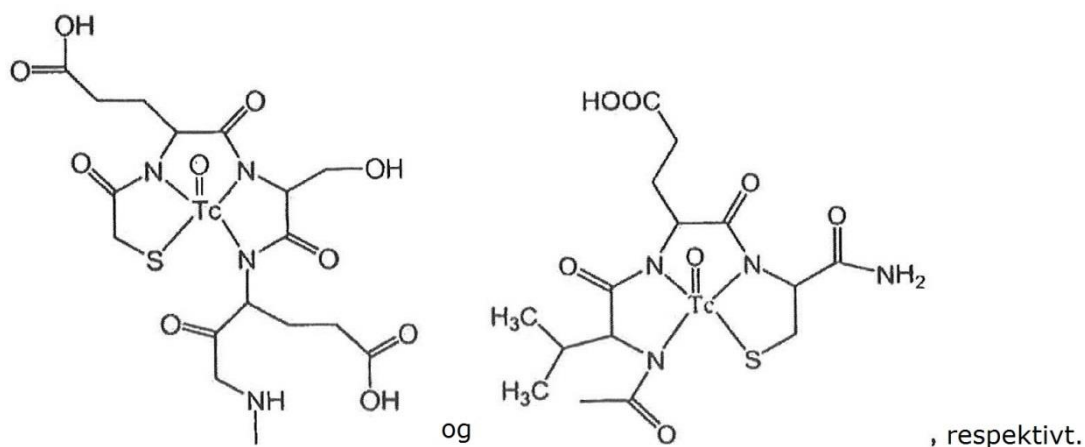
I en alternativ utførelsesform kan de tre N-gruppene bli dannet av N-atomer av de tre påfølgende peptidbindinger i polypeptidkjeden hvorav den siste er et cystein-
10 residuum, som omfatter en SH-gruppe på sin sidekjede. S-atomet av cystein sidekjeden utgjør S-atomet i N₃S-chelatoren. Alternativt betraktet blir N₃S-chelatoren fremskaffet i form av en tripeptidsekvens XXC hvor X er ethvert aminosyreresiduum. En slik tripeptidsekvens kan i polypeptidet ifølge oppfinnelsen bestå av enten initialt eller tillagt som en eller flere ytterligere aminosyrer. Det er foretrukket av cysteinresiduet er et som
15 ligger ved en C-terminale ende av SEQ ID NO: 5 eller at et ytterligere cysteinresiduum er plassert umiddelbart ved C-terminalen av enhver av SEQ ID NO: 1-4 eller 6-7. Cysteinresiduet kan også bli fulgt av en eller flere andre aminosyreresidu(er).

Et polypeptid ifølge oppfinnelsen som omfatter et tetradentat chelaterende miljø karakterisert ved en N₃S-chelator, gitt enten av merkaptacetyl koblet til N-terminalen
20 og nitrogenatomene av tre påfølgende peptidbindinger eller av nitrogenatomene av tre påfølgende peptidbindinger og et cysteinresiduum ved C-terminalen av polypeptidet, kan bli brukt for å danne et radiomerket polypeptid bestående av et radiochelate av det HER2-bindende polypeptid og et radionuklid som er egnet for medisinsk avbildning, hvor nevnte radionuklid er ^{99m}Tc (Engfeldt et al (2007) Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging
25 34(5): 722-22; Engfeldt et al (2007) Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 34(11): 1843-53) eller med et radionuklid som er egnet for terapi, hvor nevnte radionuklid er valgt fra gruppen bestående av ¹⁸⁶Re og ¹⁸⁸Re. I enkelte utførelsesformer er radionuklidet kompleksbundet med det HER2-bindende polypeptid via det chelaterende miljø.

Når polypeptidet ifølge oppfinnelsen omfatter to, tre eller flere XXC
30 tripeptid(er), er det foretrukket det terminale som blir brukt til å kompleksbinde radionuklidet. Når polypeptidet er radiomerket på denne måten, er de(t) andre XXC tripeptid(er) fortrinnsvis beskyttet.

En spesielt foretrukket utførelsesform av et radiomerket polypeptid ifølge oppfinnelsen er et radiochelate av et HER2-bindende polypeptid som har aminosyresekvensen maESEKYAKEMRNAYWEIALLP NLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK hvor ma er merkptoacetyl (SEQ ID NO: 7) og ^{99m}Tc .

De hypotetiske strukturer av ^{99m}Tc ved å bruke maESE- ved N-terminalen eller – VDC ved C-terminalen av polypeptidet er:

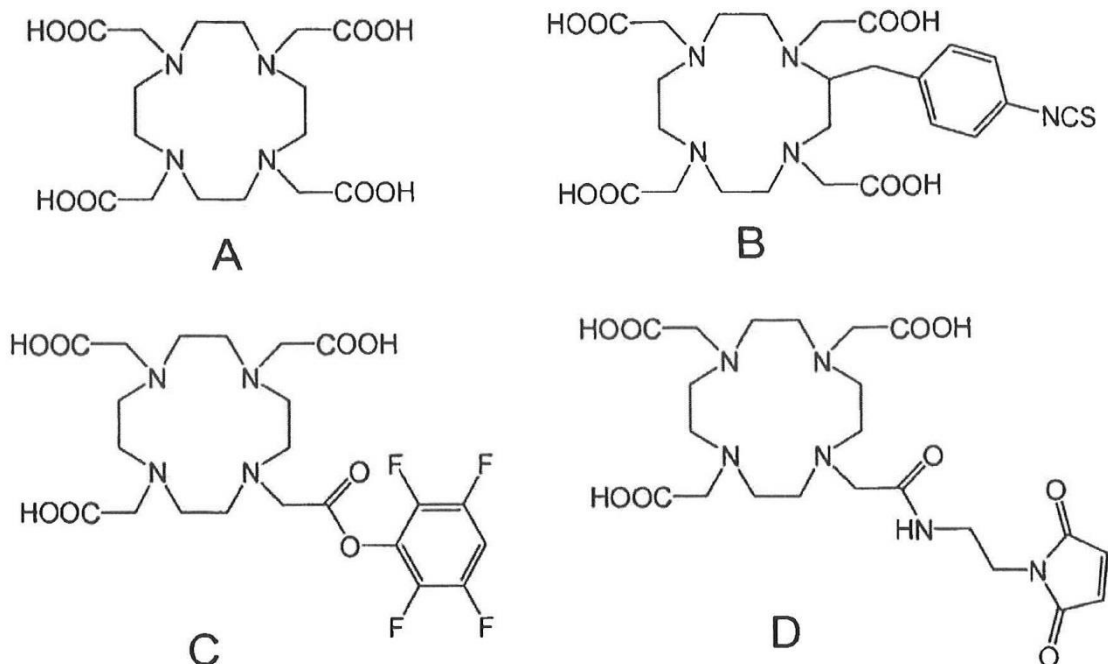


I en alternativ utførelsesform av et polypeptid ifølge oppfinnelsen blir en polyaminopolykarboksylat-chelator brukt for å inkorporere radionuklidet. Foretrukket omfatter polypeptidet da minst et cystein og mest foretrukket omfatter det kun ett cystein. Cystein(ene) kan være til stede i polypeptidet ifølge oppfinnelsen enten initialt eller tilsatt ved et senere stadium som en eller flere ytterligere aminosyrer.

Fagpersonen kunne også forutse et antall av andre chelatorer som er i stand til å chelatere slike kjerner som «nakent» Me, Me=O, O=Me=O, Me≡N, Me(CO)₃ eller HYNIC-Me-ko-ligand(er) kjerne (hvor Me er en radioaktiv isotop av Tc eller Re) som kan bli bundet til et polypeptid setespesifikt under peptidsyntese eller konjugert til et rekombinant fremstilt polypeptid ved å bruke kjent konjugeringskjemi for radiomerkning. Foretrukket har slike chelatorer en hydrofil karakter. En god oversikt over slike chelatorer er gitt i Liu S og Edwards DS (1999) Chem. Rev. 99(9): 2235-68.

Det er mulig å skjelne mellom to klasser polyaminopolykarboksylat-chelatorer: makrocycliske og acykliske.

De vanligst brukte makrocykliske chelatorer for radioisotoper av indium, gallium, yttrium, vismut, radioaktinider og radiolantanider er forskjellige derivater av DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10 tetraeddiksyre) (se nedenfor). Flere forskjellige DOTA-baserte forbindelser som er egnet for anvendelse som chelatorer med polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse, er kommersielt tilgjengelige f.eks. fra Macrocylics Inc. USA og eksempler er vist nedenfor.



I dette skjemaet er A DOTA, B er amino-reaktiv 4-isotiocyanato-benzyl-DOTA, C er DOTA-TFP ester og D er tiol-reaktiv maleimido-monoamid DOTA.

Den høye kinetiske inerteve, dvs. den sene dissosiasjonshastigheten av metall fra DOTA, favoriserer stabil festing av radionuklidet. Imidlertid er økte temperaturer nødvendig for merking grunnet en sen assosiasjonshastighet. Av denne grunn blir DOTA-derivater mye brukt for merking av korte peptider som er relativt ufølsomme overfor oppvarming til 60-90°C.

Et foretrukket derivat for anvendelse som chelator i foreliggende oppfinnelse er 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-tris-eddiksyre-10-maleimidoetylacetamid.

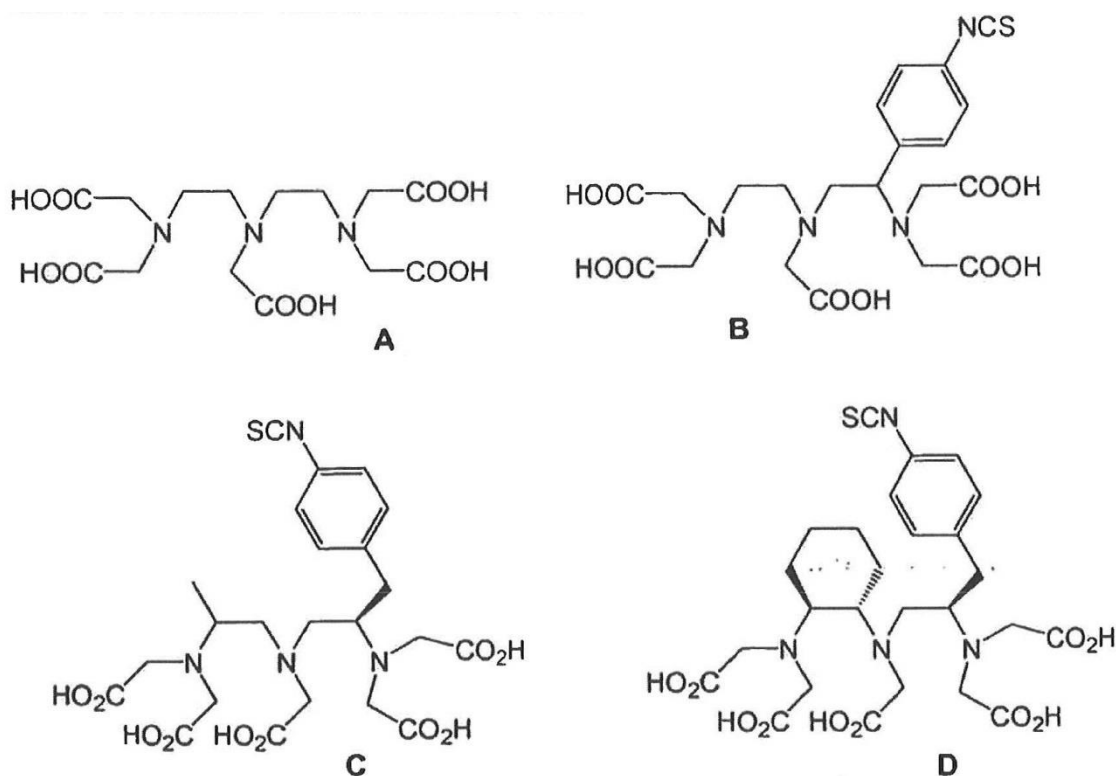
Som beskrevet ovenfor kan polypeptidet ifølge foreliggende oppfinnelse f.eks. omfatte aminosyresekvensen SEQ ID NO: 5. I en mer spesiell utførelsesform omfatter polypeptidet SEQ ID NO: 5 og har en tetraazacyklo-forbindelse koblet til aminosyreresiduum C61. I en spesielt foretrukket utførelsesform er

tetraazacykloforbindelsen 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-tris-eddiksyre-10-maleimidoetylacetamid som har blitt koblet til polypeptidet via reaksjon av SH-gruppen av residuum C61 med maleimido-enheten av tetraazacyklo-forbindelsen.

En spesielt foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er således et HER2-
5 bindende polypeptid omfattende aminosyresekvensen

AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSELLSEAKK
LND SQAPKVDC (SEQ ID NO: 5) koblet til 1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-1,4,7-tris-
eddiksyre-10-maleimidoetylacetamid.

De vanligst brukte acykliske polyaminopolykarboksylat-chelatorer er
10 forskjellige derivater av DTPA (dietylntriamin-pentaeddiksyre), så som dem vist i skjemaet nedenfor, hvor A er DTPA, B er det aminoreaktive derivat isotiocyanatobenzyl-DTPA, C er det aminoreaktive derivat semirigid 2-(para.isotiocyanatobenzyl)-6-metyl-DTPS (IB4M) og D er det aminoreaktive derivat CHX-A''-DTPA.



15 Det har blitt funnet at stammemodifiserte semi-rigide varianter av DTPA gir tilstrekkelig stabilitet for merking med ^{90}Y av f.eks. Zevalin[®]. Selv om acykliske

chelatorer er mindre inerte, og følgelig mindre stabile enn makrocykliske slike, er deres merking rask nok selv ved romtemperatur. Av denne grunn kan de være foretrukket for merking av monoklonale antistoffer som ikke kan tåle oppvarming. Detaljerte metoder for kobling av polyaminopolykarboksylat-chelatorer til målgivende proteiner og peptider har blitt publisert av Cooper og medarbeidere (Nat. Protoc. 1: 314-7. 2006) og Sosabowski og Mather (Nat. Protoc. 1: 972-6, 2006).

Et polypeptid ifølge oppfinnelsen koblet til en polyaminopolykarboksylat-chelator kan bli brukt for å gi et radiomerket polypeptid bestående av et radiochelate av det HER2-bindende polypeptid koblet til chelatoren og et radionuklid som er egnet for medisinsk avbildning hvor nevnte radionuklid er valgt fra gruppen bestående av ^{61}Cu , ^{64}Cu , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{110\text{m}}\text{In}$, ^{111}In , ^{44}Sc og ^{86}Y eller med et radionuklid som er egnet for terapi hvor nevnte radionuklid er valgt fra gruppen bestående av ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{67}Cu , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{212}Pb , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{227}Th og ^{90}Y hvor radionuklidet er kompleksbundet til det HER2-bindende polypeptid via det chelaterende miljø. En spesielt foretrukket utførelsesform av et radiomerket polypeptid ifølge oppfinnelsen er radiochelate av et HER2-bindende polypeptid som har aminosyresekvensen

AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQKRAFIRKLYDDPSQSSELLSEAKK
LNSQAPKVDC (SEQ ID NO: 5) koblet til 1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-1,4,7-tris-
eddikksyre-10-maleimidoetylacetamid og ^{111}In .

En spesielt foretrukket utførelsesform av et radiomerket polypeptid ifølge oppfinnelsen er radiochelate av et HER2-bindende polypeptid som har aminosyresekvensen

AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQKRAFIRKLYDDPSQSSELLSEAKK
LNSQAPKVDC (SEQ ID NO: 5) koblet til 1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-1,4,7-tris-
eddikksyre-10-maleimidoetylacetamid og ^{61}Cu eller ^{64}Cu .

En spesielt foretrukket utførelsesform av et radiomerket polypeptid ifølge oppfinnelsen er radiochelate av et HER2-bindende polypeptid som har aminosyresekvensen

AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQKRAFIRKLYDDPSQSSELLSEAKK
LNSQAPKVDC (SEQ ID NO: 5) koblet til 1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-1,4,7-tris-
eddikksyre-10-maleimidoetylacetamid og ^{66}Ga , ^{67}Ga eller ^{68}Ga .

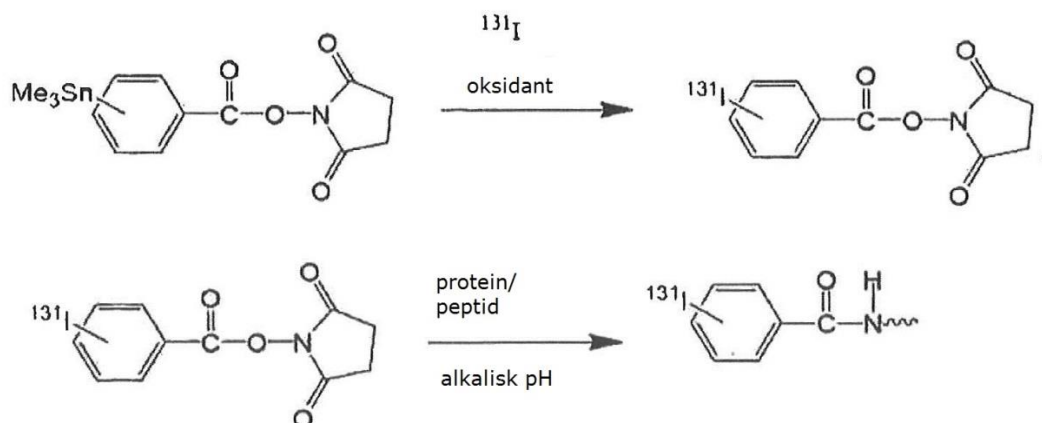
En spesielt foretrukket utførelsesform av et radiomerket polypeptid ifølge oppfinnelsen er radiochelate av et HER2-bindende polypeptid som har aminosyresekvensen

AEAKYAKEMRNAYWEIALLPNLTNQQKRAFIRKLYDDPSQSSELLSEAKK

5 LND SQAPKVDC (SEQ ID NO: 5) koblet til 1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-1,4,7-tris-eddiksyre-10-maleimidoetylacetamid og ^{66}Y .

Det radiomerkede polypeptid ifølge oppfinnelsen kan også bli dannet ved indirekte merking av et HER2-bindende polypeptid som beskrevet ovenfor. Foretrukket omfatter polypeptidet minst et cystein og mest foretrukket omfatter det kun ett cystein. 10 Cysteinene kan være til stede i polypeptidet ifølge oppfinnelsen enten initialt eller bli lagt til ved et senere stadium som en eller flere ytterligere aminosyrer. For indirekte merking med for eksempel ^{18}F , ^{76}Br , forskjellige jodisotoper og ^{211}At blir mellomliggende «linker-molekyler» brukt for merking. En slik linker bør inneholde to funksjonelle enheter, en som gir rask og effektiv radiomerking og en annen som 15 muliggjør rask og effektiv kobling til proteinene, f.eks. til aminer eller foretrukket til tiolgruppen av et enestående cystein. For eksempel reagerer en maleimidgruppe med tiolgrupper for å danne en stabil tioeterbinding. Ideen er først å reagere «linker-molekylet» med radiomerkøren og etterfølgende med tiolgruppen av proteinet.

Flere alternativer er nøye undersøkt for radiojodinerings hvor radiomerking av 20 linkermolekylet har blitt foretatt f.eks. på en aktivert fenolring eller en aromatisk ring med en passende avgangsgruppe. En detaljert metode for fremstilling av ikke-merket linker og indirekte radiojodinerings ved å bruke N-succinimidyl 3-[*I]jodbenzoat har blitt gitt av Vaidyanathan et al. (Vaidyanathan G og Zalutsky MR (2006) Nat. Protoc. 1(2): 707-13). Et eksempel på indirekte radiojodinerings ved å bruke N-succinimidyl 25 trimetylstannylbenzoat er illustrert i skjemaet nedenfor.



I dette skjemaet blir linkermolekylet først radiomerket under sure betingelser og så koblet til fritt amin (N-terminal av ϵ -aminogruppen av lysin) under alkaliske betingelser. Både meta- og para-jodderivater av benzoat har blitt beskrevet i litteraturen.

5 Linkermolekylet kan omfatte en arylgruppe som binder sammen radiomarkøren (f.eks. ved 2-, 3- eller 4-posisjonen) forutsatt at når radiomarkøren er ^{76}Br så inneholder linkermolekylet ikke en fenolisk OH-gruppe. Ikke-begrensede eksempler på linkermolekyler omfatter et heterocyklisk imid som kan bli brukt til å binde sammen polypeptidet ifølge oppfinnelsen og radiomarkør innbefatter N-[2-
10 benzamidoetyl]maleimid, 4-maleimidobenzofenon (BPMal), succinimidyl 4-(p-maleimidofanyl)butyrat (SMBP), 4-(4-N-maleimidofanyl)smørsyrehydrazid hydroklorid (MPBH) og maleimidobenzoyl-N-hydroksysuccinimidester (MBS).

N-[2-benzamidoetyl]maleimid kan bli reagert med ^{18}F for å danne N-[2-(4-(^{18}F -fluorbenzamido)etyl]maleimid. Likeledes kan den bli reagert med ^{76}Br som beskrevet
15 av Cai et al., (J. Nucl. Med. 47: 1172-80, 2006).

Foreliggende oppfinnelse vedrører også forskjellige aspekter ved anvendelse av det ovenfor beskrevne HER2-bindende polypeptid så vel som forskjellige metoder for behandling, diagnose og påvisning hvor polypeptidet er anvendelig grunnet sine bindingskarakteristika. Når det refereres til «HER2-bindende polypeptid» i den
20 følgende beskrivelse av disse anvendelser og metoder, er dette uttrykket ment å omfatte det HER2-bindende polypeptid alene, men også alle de molekyler som er basert på dette molekyl beskrevet ovenfor som f.eks. inkorporerer det HER2-bindende polypeptid som en enhet i et fusjonsprotein og/eller er konjugert til en markør, en chelator, et terapeutisk og/eller diagnostisk middel og/eller er utstyrt med ytterligere aminosyreresiduer som en
25 markør eller for andre formål. Som forklart ovenfor, danner slike fusjonsproteiner, derivater etc. en del av foreliggende oppfinnelse.

Således fremskaffer i et aspekt foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for in vivo avbildning av kroppen til et pattedyr, innbefattende menneske, -individ som har eller er mistenkt for å ha kreft som er særpreget ved overekspresjon av HER2, hvor
30 fremgangsmåten omfatter trinnene:

- administrasjon av et radiomerket polypeptid som beskrevet ovenfor , omfattende et radionuklid som er egnet for medisinsk avbildning, inn i kroppen til et pattedyrindivid; og

- oppnå et bilde av minst en del av individets kropp ved å bruke et medisinsk avbildningsinstrument, hvor nevnte bilde indikerer tilstedeværelsen av radionuklidet inne i kroppen. Foretrukket blir bildet oppnådd innen 1-72 timer, eller i enkelte tilfeller enda mer foretrukket innen 1-24 timer fra administrasjon av det radiomerkede polypeptid til kroppen. Tiden mellom administrasjonen og dannelsen av bildet er avhengig av halveringstiden av det brukte radionuklidet. Det er mulig å gjenta trinnet å oppnå et bilde to, tre eller flere ganger hvorved en serie av bilder blir oppnådd. Dette er nyttig når det søkes å følge biofordelingen over tid av et målsøkende middel, og muliggjør farmakokinetiske studier. Fagpersonen forstår at ethvert antall v bilder kan bli oppnådd for å fremskaffe den nødvendige grad av tidsoppløsning i et slikt studium.

I en annen utførelsesform av avbildningsmetoden ifølge oppfinnelsen omfatter metoden, før administrasjonstrinnet, et preparatorisk trinn for fremstilling av et radiomerket polypeptid i henhold til oppfinnelsen, hvilket trinn omfatter å blande et polypeptid ifølge et første aspekt med et radionuklid som er egnet for medisinsk avbildning.

I en mer spesifikk utførelsesform for avbildningsmetoden ifølge oppfinnelsen, omfatter metoden, før administrasjonstrinnet, et preparatorisk trinn for fremstilling av et radiomerket polypeptid av i) et polypeptid hvis aminosyresekvens består av SEQ ID NO: 7 med ii) ^{99m}Tc , hvilket trinn omfatter å blande polypeptidet med ^{99m}Tc -pereteknetat ved nærvær av et passende reduksjonsmiddel, f.eks. tinnklorid eller fluorid, i en passende buffer. Dette kan bli utført også ved nærvær av et intermediær svak chelator, f.eks. tartrat eller citrat eller glukonat.

I en annen spesifikk utførelsesform av avbildningsmetoden ifølge oppfinnelsen omfatter fremgangsmåten, før administrasjonstrinnet, et preparatorisk trinn for fremstilling av et radiomerket polypeptid av i) et polypeptid hvis aminosyresekvens består av SEQ ID NO: 5 konjugert til 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-tris-eddikksyre-10-maleimidoetylacetamid med ii) ^{111}In , hvilket trinn omfatter å blande konjugatet med ^{111}In i en passende buffer som forhindrer dannelse av ikke-oppløselige kolloider, f.eks. (men ikke begrenset til) acetat- eller citratbuffer.

I en annen spesifikk utførelsesform av avbildningsmetoden ifølge oppfinnelsen omfatter fremgangsmåten, før administrasjonstrinnet, et preparatorisk trinn med fremstilling av et radiomerket polypeptid av i) et polypeptid hvis aminosyresekvens

består av SEQ ID NO: 5 konjuger til 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-tris-eddikksyre-10-maleimidoetylacetamid med ii) ^{61}Cu eller ^{64}Cu hvilket trinn omfatter å blande konjugatet med ^{61}Cu eller ^{64}Cu i en passende buffer som forhindrer dannelse av ikke-oppløselige kolloider f.eks. (men ikke begrenset til) acetat- eller citratbuffer.

5 I en annen spesifikk utførelsesform av avbildningsmetoden ifølge oppfinnelsen omfatter fremgangsmåten, før administrasjonstrinnet, et preparatorisk trinn for fremstilling av et radiomerket polypeptid av i) et polypeptid hvis aminosyresekvens består av SEQ ID NO: 5 konjugert til 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-tris-eddikksyre-10-maleimidoetylacetamid med ii) ^{61}Cu eller ^{64}Cu , hvilket trinn omfatter å
10 blande konjugatet med ^{61}Cu eller ^{64}Cu i en passende buffer som forhindrer dannelse av ikke-oppløselige kolloider, f.eks. (men ikke begrenset til) acetat- eller citratbuffer.

I en annen spesifikk utførelsesform av avbildningsmetoden ifølge oppfinnelsen omfatter fremgangsmåten, før administrasjonstrinnet, et preparatorisk trinn for fremstilling av et radiomerket polypeptid av i) et polypeptid hvis aminosyresekvens
15 består av SEQ ID NO: 5 konjugert til 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-tris-eddikksyre-10-maleimidoetylacetamid med ii) ^{66}Ga , ^{67}Ga eller ^{68}Ga , hvilket trinn omfatter å blande konjugatet med ^{66}Ga , ^{67}Ga eller ^{68}Ga i en passende buffer som forhindrer dannelse av ikke-oppløselige kolloider, f.eks. (men ikke begrenset til) acetat- eller citratbuffer.

20 I enkelte utførelsesformer av dette aspektet av oppfinnelsen er nevnte krefttype valgt fra brystkreft, ovariekreft, magekreft, blærekreft, spyttkjertelkreft, lungekreft og kreft i spiserøret.

I et annet aspekt fremskaffer oppfinnelsen et radiomerket polypeptid som beskrevet ovenfor for anvendelse i diagnose. Uttrykket «diagnose» blir brukt heri for å
25 beskrive handlingen eller prosessen å identifisere eller bestemme naturen og årsaken til en sykdom via evaluering av pasienthistorie, undersøkelse og gjennomgang av laboratoriedata.

Det radiomerkede polypeptid kan bli brukt i diagnose av kreft som tilhører gruppen krefttyper som er karakterisert ved hyppig forekommende overekspresjon av
30 HER2. Uttrykket «hyppig forekommende» blir brukt heri for å betegne at overekspresjon av HER2 er til stede i minst 10% av alle pasienter som har en spesifikk krefttype. Det radiomerkede polypeptid kan således bli brukt i en fremgangsmåte for å bestemme hvorvidt eller ikke en pasient har en slik krefttype eller ikke. Den kan også

bli brukt i en fremgangsmåte for å bestemme for å bestemme angående passende behandling av en pasient. Spesielt kan påvisning av HER2 overekspresjon være nyttig for bestemmelse av pasienter for HER2-måltrettet behandling, f.eks. behandling med trastuzumab (Herceptin®).

5 Det radiomerkede polypeptid kan også bli brukt innen diagnose og/eller molekylær karakterisering av en krefttype valgt fra brystkreft, ovariekreft, magekreft, blærekreft, spyttkjertelkreft, lungekreft og kreft i spiserøret. I denne sammenhengen angår molekylær karakterisering karakteriseringen av HER2-ekspresjon dvs. for eksempel for å bestemme hvorvidt eller ikke det finnes noen ekspresjon av HER2 for å
10 bestemme størrelsen av HER2-ekspresjon, f.eks. før og etter behandling som kan bli utført ved å oppnå bilder før og etter behandling og å bestemme graden eller anatomisk innhold av HER2-ekspresjon f.eks. for kirurgiske formål.

Det er også i et enda et annet aspekt av oppfinnelsen anvendelse av et radiomerket polypeptid som beskrevet ovenfor ved fremstilling av et diagnostisk middel
15 for avbildning in vivo av kroppen til et pattedyrindivider innbefattende menneske.

I et annet applikasjonsaspekt fremskaffer oppfinnelsen en fremgangsmåte for behandling av et pattedyrindivider innbefattende menneske med en krefttype som er karakterisert ved overekspresjon av HER2, omfattende trinnet å administrere et radiomerket polypeptid som beskrevet ovenfor, inn i kroppen av nevnte pattedyrindivider
20 i en terapeutisk effektiv mengde.

I en utførelsesform av dette aspektet omfatter fremgangsmåten, før administrasjonstrinnet, et preparatorisk trinn for fremstilling av et radiomerket polypeptid ifølge oppfinnelsen hvilket trinn kan omfatte:

- å blande et polypeptid ifølge det første aspekt med et metallradionuklid som
25 er egnet for terapi i en passende buffer; eller
- blande et polypeptid ifølge det første aspekt med perrhenat i passende buffer ved tilstedeværelse av passende reduksjonsmiddel; dette kan også bli utført ved nærvær av en intermediat svak chelator, f.eks. tartrat eller citrat eller glukonat; eller
- 30 - blande et polypeptid ifølge første aspekt med et reaktivt intermediat av rhenium så som et trikarbonyl-kompleks; eller

- blande et polypeptid ifølge første aspekt med et reaktivt intermediat med bundet halogenatom i en passende buffer. Denne blandingen kan bli utført ved nærvær av substanser som er utformet til å undertrykke radiolyse av polypeptid så som askorbinsyre eller gentisinsyre.

5 I enkelte utførelsesformer av dette aspekt av oppfinnelsen er nevnte krefttype valgt fra brystkreft, ovariekreft, magekreft, blærekreft, spyttkjertelkreft, lungekreft og kreft i spiserøret.

10 I et annet aspekt fremskaffer oppfinnelsen et radiomerket polypeptid som beskrevet ovenfor for anvendelse i terapi så som for anvendelse i kreftterapi som er karakterisert ved overekspresjon av HER2, f.eks. for bruk i behandling av en krefttype valgt fra brystkreft, ovariekreft, magekreft, blærekreft, spyttkjertelkreft, lungekreft og kreft i spiserøret.

15 Det er også fremskaffet i enda et annet aspekt av oppfinnelsen anvendelse av et radiomerket polypeptid som beskrevet ovenfor ved fremstilling av et medikament for en krefttype som er karakterisert ved overekspresjon av HER2 så som en krefttype valgt fra brystkreft, ovariekreft, magekreft, blærekreft, spyttkjertelkreft, lungekreft og kreft i spiserøret.

20 Et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse vedrører et nukleinsyremolekyl omfattende en sekvens som koder for et polypeptid som beskrevet ovenfor.

Et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse angår en ekspresjonsvektor omfattende nukleinsyremolekylet av det foregående aspekt og andre nukleinsyreelementer som tillater produksjon av polypeptidet ifølge oppfinnelsen via ekspresjon av nukleinsyremolekylet.

25 Enda et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse angår en vertscelle omfattende ekspresjonsvektoren av foregående aspekt.

30 De tre sistnevnte aspekter av oppfinnelsen er verktøy for fremstilling av et polypeptid ifølge oppfinnelsen, og fagpersonen vil være i stand til å oppnå dem og ta dem i praktisk bruk uten urimelig belastning gitt informasjonen heri angående polypeptidet som skal bli uttrykt og gitt det eksisterende dyktighetsnivå innen faget rekombinante ekspresjonsproteiner.

Imidlertid kan plypeptidet ifølge oppfinnelsen også bli fremstilt på enhver annen kjent måte innbefattende kjemisk syntese eller ekspresjon i forskjellige prokaryote eller eukaryote vertsorganismer innbefattende planter og transgene dyr.

5 Oppfinnelsen vil nå bli illustrert i detalj via beskrivelsen av forsøk utført i samsvar med denne. Eksempelene som følger skal ikke tolkes som begrensende. I eksempelene blir det referert til medfølgende figurer.

Kort forklaring av figurene

Sekvensene av Affibody[®]-molekylene er gitt i Tabell 1 nedenfor.

10 Figur 1 viser Biacore sensogrammer oppnådd etter injeksjon av A: 7,8 nM; B: 1,9 nM og C: 0,49 nM av Affibody[®]-molekyl II over en sensorchip med HER2/Fc chimerisk fusjonsprotein immobilisert til denne. SH-gruppen av det C-terminale cystein var blokkert med N-etylmaleimid (NEM).

15 Figur 2 viser Biacore sensogrammer oppnådd etter injeksjon av A: 6 nM; B: 1,5 nM og C: 0,38 nM av Affibody[®]-molekyl II ISEQ ID NO: 5) med DOTA koblet til det C-terminale cystein over en sensorchip med HER2/Fc chimerisk fusjonsprotein immobilisert til denne.

20 Figur 3 viser Biacore sensogrammer oppnådd etter injeksjon av A: 6 nM; B: 1,5 nM og C: 0,38 nM av Affibody[®]-molekyl X (SEQ ID NO: 7) over en sensorchip med HER2/Fc fusjonsprotein immobilisert på denne.

25 Figur 4 viser biofordelingen av ¹¹¹In-merket Affibody[®]-molekyl II med DOTA i BALB/c nu/nu-mus SKOV-3 tumor xenotransplantater. Alle mus ble injisert med 1 µg (100 kBq) av ¹¹¹In-merket Affibody[®]-molekyl II. 0,5, 1, 4 og 24 timer etter injeksjon ble organene dissekert, veiet og deres radioaktivitetsinnhold målt i en gammateller. Radioaktivitetsopptak ble regnet ut som prosentdel av injisert aktivitet per gram vev (% IA/g).

Figur 5 viser tumor-til-organ-forholdene av radioaktivitetsopptaket målt i biofordelingsstudiet beskrevet i Figur 4.

30 Figur 6 viser spesifisiteten av tumormålretting med ¹¹¹In-metket Affibody[®]-molekyl II med DOTA i SKOV-3 tumor xenotransplantater. Alle

mus ble injisert med 1 µg (1000 kBq) av ^{111}In -merket Affibody[®]-molekyl II med DOTA. En gruppe av dyr med forbehandling med overskudd av umerket Affibody[®]-molekyl (blokkerende gruppe) 50 minutter før injeksjon av det ^{111}In -merkede Affibody[®]-molekyl. Organene ble dissekert 4 timer etter injeksjon, veiet og deres radioaktivitetsinnhold ble målt i en gammateller. Radioaktivitetsopptak ble regnet ut som prosentandel av injisert aktivitet per gram vev (% IA/g).

Figur 7 viser gamma kamerabilder av HER2-uttrykkende SKOV-3 xenotransplantattumorer i BALB/c nu/nu-mus (venstre del, 30 minutter og 4 timer etter injeksjon) og HER2-negative A431 xenotransplantater (høyre del, 4 timer etter injeksjon). Alle mus ble injisert med 3 µg (4,5 MBq) av ^{111}In -merket Affibody[®]-molekyl II med DOTA. K=nyre, T=tumor.

Figur 8 viser biofordelingen av $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -merket Affibody[®]-molekyl X i BALB/c nu/nu-mus SKOV-3 xenotransplantater 4 timer etter injeksjon. Alle mus ble injisert med 1 µg (65 kBq) av $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -merket Affibody[®]-molekyl X. En gruppe av dyr ble forbehandling med overskudd av umerket Affibody[®]-molekyl (blokkerende gruppe) 50 minutter for injeksjon av det $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -merkede Affibody[®]-molekyl. Organene ble dissekert 4 timer etter injeksjon, veiet og deres radioaktivitetsinnhold ble målt i gammatelleren. Radioaktivitetsopptak ble regnet ut som prosentdel av injisert aktivitet per gram vev (% IA/g).

Figur 9 viser tumor-til-organ-forholdene av radioaktivitetsopptaket målt i biofordelingsassayet beskrevet i Figur 8.

Figur 10 viser gammakamerabilder av HER2-uttrykkende SKOV-3 xenotransplantat-tumorer i BALB/c nu/nu-mus (venstre del 1 time og 4 timer etter injeksjon) og HER2-negative A431 xenotransplantater (høyre del, 4 timer etter injeksjon). Alle mus ble injisert med 3 µg (15 MBq) av $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -merket Affibody[®]-molekyl X. K = nyre, T = tumor.

Figur 11 viser de analytiske HPLC elueringsprofiler for Affibody[®]-molekyl X ved syntesetrimmet av aminosyre 18 til 58. Affibody[®]-molekylene ble separert på en Vydac TP218 Affibody[®]-molekylTP54-kolonne. Strømningshastighet: 1 ml/min; Temperatur: 35°C; Påvisning: 220 nm; Elueringsmiddel A: 0,1 % TFA, 1 % acetonitril i H₂O; Elueringsmiddel B. 0,1 % TFA i acetonitril.

A) Syntese utført på polystyren-resin ved å bruke pseudoproliner i polsijoner

22-23, 41-42, 45,46 og 53-54.

B) Standard peptidsyntese på polystyren-resin uten pseudoproliner.

Figur 12 viser de analytiske HPLC elueringsprofiler for Affibody[®]-molekyl X ved syntesetrinnet av aminosyre 1 til 58 (**A**) og 10 til 58 (**B**).

Affibody[®]-molekylene ble separert på en Vydac TP218TP54-kolonne.

Strømningshastighet: 1 ml/min; Temperatur: 35°C; Påvisning: 220 nm;

Oppløsningsmiddel A: 0,1 % TFA, 1 % acetonitril i H₂O; Oppløsningsmiddel B: 0,1 % TFA i acetonitril.

A) Syntese utført på polystyren-resin ved å bruke pseudoproliner i posisjoner 22-23, 41-42, 45-46 og 53-54.

B) Standard peptidsyntese på polystyren-resin uten pseudoproliner.

Figur 13 viser hydrofobisitet /hydrofilisitetsskurver for enkelte av Affibody[®]-molekylene opplistet i Tabell 1. **A)** kurve for Affibody[®]-molekyl II (SEQ ID NO: 5), **B)** kurve for Affibody[®]-molekyl med SEQ ID NO: X (SEQ ID NO: 7) og **C)** kurve for Affibody[®]-molekyl Z00342, det opprinnelige Affibody[®]-molekyl uten mutasjoner som kontroll. Den øvre del av figurene viser kurven som bruker Kyte-Doolittle-skalan og den nedre del hydrofobisitetstallene ved pH 3,4 bestemt med HPLC. Hydrofobiske aminosyrer har positive verdier og hydrofile aminosyrer har negative verdier. Et bevegelig vindu på syv aminosyrer ble brukt for begge kurver. I **B)** ble kun aminosyreskvensen av Affibody[®]-molekyl X (SEQ ID NO: 7), dvs. Affibody[®]-molekyl X utn ma bl brukt for å lage kurvene.

Figur 14 viser HPLC elueringsprofiler for Affibody[®]-molekyl II ifølge oppfinnelsen (sort linje) og Affibody[®]-molekyl Z00342 (grå stiplet linje).

Affibody[®]-molekylene ble separert på en Zobax 300SB C8 150 x 2,1 mm, 3,5 µm kolonne ved å bruke en strømningshastighet på 0,5 ml/min og et TFA, vann, acetonitril oppløsningsmiddelsystem.

Eksempler

Eksempel 1 – Fremstilling av et polypeptid ifølge oppfinnelsen

Oppsummering

I dette eksempelet blir utvalgte HER2-spesifikke Affibody[®]-molekyler subklonet i en pET System ekspresjonsvektor uttrykt i en større skala i passende bakterieceller og renses i henhold til metodene nedenfor. Aminosyresekvensene

av de tilvarende HER2-spesifikke Affibody[®]-molekyler av full lengde er opplistet i Tabell 1 som Affibody[®]-molekyler I-XI.

Kloning av Affibody[®]-molekyler

Genene som koder for Affibody[®]-molekyler I-VIII ble PCR-amplifisert ved å bruke to oligonukleotider (som sammen omfatter Affibody[®]-sekvensene) som templat. For hvert konstrukt ble en spesifikk del av templat-oligonukleotider (hver 102 b langt) med en komplementaritetsoverlapping på 28 bp brukt. Affibody[®]-genet ble amplifisert med en fremadrettet primer (sense) innbefattende et NdeI-sete og et ATG startkodon (for Affibody[®]-molekyl I en His₆-markørkodende sekvens bl også inkludert i primeren) og en revers primer (anti-sense) med kodoner for de C-terminale aminosyrer, stopp-kodon og et NotI-sete.

Affibody[®]-Albumin-bindende domene (ABD) genfusjon i Affibody[®]-molekyl IX ble fremstilt ved overlap-forlengelse PCR. Det Affibody[®]-molekylkodende fragment ble generert som beskrevet ovenfor for Affibody[®]-molekyler I-VIII med unntaket at den reverse primer innbefattet en linkersekvens (med et Cys-kodon) og den 5' ende av ABD-genet. ABD-genet ble amplifisert med en fremadrettet primer innbefattende den 3' ende av Affibody[®]-genet og linkersekvens og en revers primer med stopp-kodon og et NotI-sete. Deretter ble de to PCR-produkter med 25 bp overlapping brukt som templat i den sluttlige PCR-amplifisering ved å bruke Affibody[®]-gen fremadrettet primer og ABD revers primer for å danne Affibody[®]-ABD genfusjonen.

PCR-produktene ble spaltet med restriksjonsnzymer NdeI og NotI og ligert i en T7 ekspresjonsvektor på forhånd spaltet med de samme enzymer.

Tabell 1. Aminosyresekvens av fremstilte Affibody[®]-molekyler.

Affibody[®]-molekyl	Aminosyreskvens av det mature protein
I	GSSHHHHHHL QVDAKYAKEM RNAYWEIALL PNLTNQQKRA FIRKLYDDPS QSSELLSEAK KLNDSQAPK
II	AEAKYAKMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDSPQ

(SEQ ID NO: 5)	SSELLSEAKK LND SQAPKVD C
III	AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LND SQAPKC
IV	AEAKYAKEIR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LND SQAPKC
V	AEAKYAKELR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LND SQAPKC
VI	AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLCEAKK LND SQAPK
VII	AEAKYAKEIR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLCEAKK LND SQAPK
VIII	AEAKYAKELR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLCEAKK LND SQAPK
IX	AEAKYAKMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LND SQAPG-CGS-"ABD"
X (SEQ ID NO: 7)	MaESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LND SQAPK
XI	YAKELRNAYW EIALLPNLTN QKRAFIRKL YDDPSQSSEL LCEAKKLND S QA

Ekspresjon og innhøsting av Affibody[®]-molekyler

De resulterende ekspressionsplasmider ble transformert til *Escherichia coli* BL21(DE3)-celler ved å bruke elektroporering. Bakterier

inneholdende ekspresjonsplasmider ble plukket fra selektiv agar inneholdende kanamycin og dyrket ved 37°C i 800 ml av TSB+YE-medium (30 g/l Tryptisk Soya-medium + 5 g/l gjærekstrakt) supplementert med 50 mg/l kanamycin ved å bruke et multifermentor-system (System Greta, Belach Biotekink AB, Sverige). Ved en optisk tetthet (OD600nm) på ~1 ble ekspresjonen av Affibody®-molekyler automatisk induisert gjennom tilsetningen av 0,5 mM IPTG. Fem timer etter tilsetningen av induksjonsmiddel ble kulturene automatisk kjølt ned til <12°C. Kulturene ble så innhøstet via sentrifugering (20 min ved 15.900 x g) og 5-10 g av bakteriell cellepellet ble høstet inn og lagret i en fryser (-20°C).

Opprensning av Affibody®-molekyl I

Cellepelleten (3g) ble resuspendert i 30 ml av en pH 8-buffer inneholdende 7 M urea og 1000 enheter Benzonase (Merck). Etter 30 minutters inkubering ble lysatet klargjort med sentrifugering og supernatanten inneholdende det His₆-merkede Affibody®-molekyl ble påsatt på en 1,5 ml Superflow Ni-NTA-kolonne (Qiagen). Kolonnen ble vasket med 20 ml av en pH 6,3-buffer inneholdende 7 M urea og eluert med en pH 4,5-buffer inneholdende 8 M urea. Til slutt ble bufferen byttet til 1 x PBS (2,68 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) ved å bruke en PD-10-kolonne (GE Healthcare).

Opprensning av Affibody®-molekyler II-VIII

Cellepelleten (10 g) ble resuspendert i 100 ml 20 mM Tris-HCl pH 7,5 supplementert med 2000 enheter Benzonase (Merck), sprenget med ultralydbehandling og oppvarmet til 75°C i 10 minutter. Det varmebehandlede lysat ble klargjort med sentrifugering og satt på en XK26-kolonne pakket med 25 ml Q-Sepharose FF (GE Healthcare) på forhånd ekvilibrert med 20 mM Tris-HCl pH 7,5. Gjennomstrømningsfraksjonen fra kolonnen ble samlet opp og Affibody®-molekyler med et C-terminalt cystein ble inkubert med 20 mM DTT i 1 time ved romtemperatur. ACN ble tilsatt til 5 % og påsatt på en 3 ml Resource 15RPC-kolonne (GE Healthcare) på forhånd ekvilibrert med 5 % ACN, 0,1 % TFA i vann. Etter vasking av kolonnen med 5 kolonnevolumer (CV) 5 % ACN, 0,1 % TFA i vann, ble bundne proteiner eluert med en lineær gradient 5-32 % ACN, 0,1 % TFA i vann i løpet av 20 CV. Fraksjoner inneholdende Affibody®-molekyler ble identifisert med SDS-PAGE-analyse og slått sammen. Til slutt ble bufferen byttet ut til 1 x PBS ved å bruke en HiPrep 26/10 avsaltningskolonne (GE Healthcare).

Opprensning av Affibody[®]-molekyl IX

Cellepelletten (5 g) ble resuspendert i 50 ml TST-buffer (25 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % Tween 20, pH 8,0) og sprengt med ultralydbehandling. Etter klargjøring med sentrifugering ble supernatanten satt på en XK26-kolonne (GE Healthcare) pakket med 20 ml HSA-Sepharose (human serum albumin immobilisert på CNBr-aktivert Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare). Kolonnen ble vasket med 10 CV TST-buffer fulgt av 5 CV 5 mM NH₄Ac pH 5,6. Bundet ABD-merket Affibody[®]-molekyl ble eluert med 0,5 M HAc pH 2,8. Til slutt ble bufferen byttet til 1 x PBS ved å bruke en HiPrep 26/10 avsaltningskolonne (GE Healthcare).

Eksempel 2 – HER2-bindende egenskaper av et polypeptid ifølge oppfinnelsen in vitro

Oppsummering

I forsøkene som utgjør dette eksempelet, ble bindingen av polypeptider ifølge oppfinnelsen analysert ved å bruke Overflateplasmonresonans (SPR) i et Biacore[®] 2000-system. HER2 målbindingsaktiviteten er vist for Affibody[®]-molekyler II (SEQ ID NO: 5), II med DOTA koblet til det C-terminale cystein og X (SEQ ID NO: 7).

Biosensoranalyse

Det rekombinante humane HER2/Fc (ErbB2/Fc) chimerisk protein, bestående av det ekstracellulære domene av ErbB2 (HER2, Met¹-Thr⁶⁵²) kondensert til Fc-regionen av human IgG₁ (Pro¹⁰⁰-Lys³³⁰) med en C-terminal His₆-markør (R&D Systems #1129-ER) ble immobilisert (1800 resonansenheter (RU)) på en overflate av en CM5 sensorchip ved å bruke amin-koblingskjemi. En overflate av chipen ble aktivert og deaktivert for bruk som referansecelle. Affibody[®]-molekyler fortynnet i HBS-EP-buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Affibody[®]-molekyl surfaktant P-20, pH 7,4) ble brukt som analytter.

For analyse av bindingskinetikken ble tre analyttkonsentrasjoner injisert i duplikater over chipen ved å bruke en konstant strømningshastighet på 50 µl/minutt. Assosiasjonsfasen var 5 minutter fulgt av en lang dissosiasjonsfase (30 min) som gir grunnen til den sene av-hastighet av Affibody[®]-molekylene. Dissosiasjonslikevektskonstanten (K_D), assosiasjonshastighetskonstanten (k_a) og dissosiasjons hastighetskonstanten (k_d) ble regnet ut ved å bruke 1:1 Langmuir

bindingsmodellen med masseoverføringskorreksjon av av BIAevaluation 4.1-programmet (GE Healthcare).

Blokkering av SH-gruppen av cystein

Affibody[®]-molekyler med et enkelt C-terminalt cystein ble behandlet med N-etylmaleimid (NEM, Pierce Nr. 23030) for å blokkere SH-gruppen av cystein og derved forhindre dimerisering av molekylene. Affibody[®]-molekyl II (SEQ ID NO: 5) ble redusert ved å behandle 1 ml (2,1 mg) av peptidet med 10 µl Tris-HCl pH 8,5 og 40 µl 0,5 M ditioneitol (DTT) i to timer ved romtemperatur. Overskudd av DTT ble fjernet med gelfiltrering på NAP5-kolonner (GE Healthcare) ekvibrert med koblingsbuffer (100 mM natriumfosfat, 150 mM NaCl, pH 7,0): Sett på kolonnen 0,5 ml redusert protein, eluer protein med 1 ml koblingsbuffer.

Blokkering av de frie SH-grupper ble foretatt ved å bruke et 20 gangers molart overskudd av NEM til protein: tilsett 15 µl NEM-oppløsning i vann (200 mM) til 0,5 ml av redusert proteinoppløsning (1 mg/ml) og inkuber i en time ved romtemperatur på en vendeblander. Overskytende NEM ble fjernet med gelfiltrering på NAP5-kolonner som beskrevet ovenfor, men med PBS som ekvibreringsbuffer.

Kobling av maleimid-DOTA til det C-terminale cystein

3 mg av Affibody[®]-molekyl II (SEQ ID NO: 5) ble redusert med 20 mM DTT ved 40°C i 30 minutter. Overskudd av DTT ble fjernet med bufferbytte på en PD-10-kolonne til 0,2 M NH₄acetat pH 5,5. Koblingen ble utført med tre gangers molart overskudd av chelator, malimido-mono-amid-DOTA (Mal-DOTA, Macrocyclics Nr. B-272) –oppløsning i vann (1 mg/ml). Blandingen ble inkubert i 1 time ved 40°C med kontinuerlig risting. Opprenskning fra ikke-konjugerte chelatorer ble foretatt på en semi-preparativ RPC-kolonne, Zorbax 300SB C18, 9,4 x 250 mm, 5 µm. Koblingsgraden av det rensede materialet ble analysert med HPLC-MS på en Zorbax 300SB C8 150 x 2,1 mm 3,5 µm analytisk kolonne. Kun maleimid-DOTA-konjugerte Affibody[®]-molekyler ble påvist med metoden.

Den HER2-bindende interaksjon av Affibody[®]-molekyl II er vist i sensografene i Figur 1, Affibody[®]-molekyl II med DOTA koblet til det C-terminale cystein i Figur 2 og av Affibody[®]-molekyl X (SEQ ID NO: 7) i Figur 3.

Et kinetisk studium ble utført for å bestemme bindingsparameterne for interaksjonen av Affibody[®]-molekylene med HER2 målmaterialet. Biacore chip-overflater med immobilisert HER2/Fc fusjonsprotein. Dissosiasjons-ekvilibrumskonstanter ($K_D = k_d/k_a$), assosiasjons hastighetskonstanter (k_a) og dissosiasjons hastighetskonstanter (k_d) er oppsummert i Tabell 2. DOTA-kobling til det C-terminale cystein endret ikke i vesentlig grad K_D i forhold til dt NEM-blokkerte Affibody[®]-molekyl II.

Tabell 2

	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (pM)
Affibody [®] -molekyl II (SEQ ID NO: 5) med NEM	1,23E + 07	7,41E - 04	60
Affibody [®] -molekyl II (SEQ ID NO: 5) med DOTA	1,27E + 07*	8,10E - 04*	65* [†]
Affibody [®] -molekyl X (SEQ ID NO: 7)	6,72E + 07	5,57E - 04	83

* gjennomsnitt av 18 bestemmelser

[†] $\pm 8,66$ (stanardavvik)

Eksempel 3a – In vivo HER2-bindingsegenskaper av polypeptider ifølge oppfinnelsen med en polyaminopolykarboksylat-chelator

Oppsummering

I forsøkene som utgjør dette eksempelet, ble bindingen av radiomerkede polypeptider ifølge oppfinnelsen analysert in vivo i en muse xenotransplantat-modell. Affibody[®]-molekyl II med DOTA koblet til det C-terminale cystein ble radiomerket med ¹¹¹In og injisert i mus som har HER2 overuttrykkende SKOV-3

tumor-xenotransplantater og i HER2-negative A431 tumor-xenotransplantater som kontroll. Biofordeling og gamma-kamera bildestudier ble utført for å analysere fordelingen av det radiomerkede Affibody[®]-molekyl hos forskjellige organer og lokaliseringen i hele dyret.

5 ¹¹¹In-merking

Affibody[®]-molekyl II ble modifisert med kobling av mon-amid DOTA (Mal-DOTA) til det C-terminale cystein som beskrevet i eksempel nr. 2. Det resulterende molekyl er gitt navn ” Affibody[®]-molekyl II med DOTA”.

10 For ¹¹¹In-merking ble 30 µg av Affibody[®]-molekyl II med DOTA (i 30 µl ammoniumacetatbuffer pH 5,5) blandet med 40,5 µl stamopløsning av ¹¹¹InCl₃ (15 MBq på tiden for merking). pH av reaksjonsblandingen var ~5,0. Reaksjonsblandingen ble inkubert ved 60°C i 60 min.

15 Merkingseffektiviteten ble analysert med umiddelbar tynnsjiktskromatografi (ITLC) på silikagelimpregnerte flassfiberplater (ITLC SG-plater, Gelman Sciences Inc.) ved å bruke 0,02 M sitronsyre som elueringsmiddel. Fordelingen av radioaktiviteten langs TLC-strimmelen ble visualisert og mengdebestemt ved å bruke Phosphorimager (Cyclone[™] Storage Phosphor System, Packard). Radiomerkete Affibody[®]-molekyler forble ved tartpunktet hos ITLC-platen, mens fri ¹¹¹In migrerte med
20 oppløsningsmiddelfronten

Den radiokjemiske renhet var 99,8 – 99,9% dvs. radiomerkingen var nesten kvantitativ. Ingen ytterligere rensing av det radiomerkede Affibody[®]-molekyl var nødvendig. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med PBS til 1,4 ml og holdt frossen før forsøket (1-2 dager).

25 *Tumor-modell*

Utformerte BALB/c nu/nu hunnmus ble transplantert med 1 x 10⁷ SKOV-3 (humant ovarie-bukvæske adenokarsinom) –celler eller 1 x 10⁷ A431 (humant epidermoid karsinom) –celler i høyre bakben. SKOV-3-celler overuttrykker HER2 og A431-celler er negative for HER2.

30 *Biofordeling i tumor-bærende mus*

For biofordelingsstudier ble mus som bærer xenotransplantat-tumorer (30-40 dager etter implantasjon av 1 x 10⁷ SKOV-3-celler) ble randomisert i

grupper på fire. Mus ble injisert i halevenen med 1 µg (100 kBq) av ^{111}In -merket Affibody[®]-molekyl i 10 µl PBS. Alle injeksjoner med godt tolerert. En gruppe av dyr ble s.c. injisert med 1,5 ml (0,9 mg) av umerket Affibody[®]-molekyl II hvor det C-terminale Cys hadde blitt blokkert med NEM som beskrevet i Eksempel 2, fulgt av i.v.-injeksjon med 1 µg (100 kBq) av ^{111}In -merket Affibody[®]-molekyl 50 min senere (blokkeringsforsøk).

Etter injeksjon av en dødelig dose av en oppløsning av Ketalar og Rompun-oppløsning ble mus avlivet ved årelating via hjertepunktur ved 0,5, 1, 4 og 24 timer etter injeksjon (h p.i.). Dyr fra blokkeringsgruppen ble avlivet 4 timer p.i. Organene ble dissekert, veiet og deres radioaktivitetsinnhold ble målt i gammatelleren. Radioaktivitetsopptak ble regnet ut som prosentdel av injisert aktivitet per gram vev (% IA/g).

Avbildning

For gammakamera-avbildning ble mus som bærer xenotransplantat-tumorer (30-40 dager etter implantasjon av 1×10^7 SKOV-3-celler eller 10-15 dager etter implantasjon av 1×10^7 A431-celler), brukt.

Mus ble injisert i halevenen med 3 µg (4,5 MBq) av ^{111}In -merket Affibody[®]-molekyl II i 100 µl PBS. 0,5 eller 4 timer p.i. ble dyrene bedøvet med en dødelig dose av en oppløsning av Ketalar og Rompun. Avbildning ble utført ved å bruke et Millenium GE gamma-kamera utstyrt med en MEGP-kollimator. De scintigrafiske resultater ble vurdert visuelt ved å bruke Hermes-programmet (Nuclear Diagnostics, Stockholm, Sverige).

Resultater

Resultatene fra biofordelingsstudiet under anvendelse av ^{111}In -merket Affibody[®]-molekyl II med DOTA er vist i Figur 4. Opptak av radioaktivitet ved alle tidspunkter var høyere i tumoren enn i alle andre organer bortsett fra nyrene. Tumor-opptak var $13 \pm 2\%$ IA/g allerede ved 0,5 timer p.i, økte til $17 \pm 2\%$ IA/g ved 1 time p.i. og minsket sakte fra $15 \pm 3\%$ IA/g ved 4 timer p.i. til $11 \pm 4\%$ IA/g ved 24 timer p.i. Et høyt opptak av radioaktivitet ble også funnet i nyrene, noe som er ventet siden nyrene er hovedekskresjonsveien for små proteiner som Affibody[®]-molekylene. Det høyeste nyre-opptaket med $186 \pm 24\%$ IA/g målt ved 1 time p.i. minsket til $144 \pm 13\%$ IA/g ved 24 timer p.i. Således var nyreopptaket vesentlig lavere enn nyreopptaket målt for Affibody[®]-molekylet Z00342 (beskrevet i WO 2005/003456 som Z_{HER2;107} og enkelte anger også kalt

Z_{HER2:342}) med DOTA koblet til N-terminalen, dvs. 243±22% IA/g målt ved 1 time p.i. og 232±34% IA/g ved 24 timer p.i. (Orlova, A et al. (2006), Cancer Research 67: 2178-2186). I tillegg hadde det ¹¹¹In-merkede Affibody[®]-molekyl II med DOTA lavere opptak i alle organer ved alle målte tidspunkter i forhold til det HER2-spesifikke Affibody[®]-molekyl beskrevet av Orlova et al. (2006). Det høye tumoropptak sammen med redusert opptak i andre organer førte til tumor-til-organ-forhold som overstiger forholdene publisert for Affibody[®]-molekylet beskrevet tidligere (Figur 5). For eksempel var tumor-til-blod-forholdet 16 ved 1 time p.i., 88 ved 4 timer p.i. og 275 ved 24 timer p.i. i forhold til 8 (1 time p.i.), 12 (4 timer p.i.) og 47 (24 timer p.i.) for Affibody[®]-molekylet beskrevet av Orlova, A. et al. (2006).

Spesifisiteten av tumor-målfinning ved å bruke Affibody[®]-molekylene ifølge oppfinnelsen ble vist med et blokkeringsforsøk hvor pre-injeksjon av tumor-bærende mus med overskudd av umerket Affibody[®]-molekyl reduserte tumoropptak av ¹¹¹In-merket Affibody[®]-molekyl II med DOTA med 66%, men ikke opptaket i andre organer (Figur 6). Gamma-kamera-bilder tatt 30 minutter og 4 timer p.i. bekreftet høy spesifikk tumor-målfinning av det ¹¹¹In-merkede Affibody[®]-molekyl II med DOTA (Figur 7). SKOV-3-tumorene ble visualisert allerede 0,5 timer p.i. og 4 timer p.i. var bakgrunns-radioaktiviteten vasket ut. Bortsett fra tumoren er et klart opptak også synlig i nyrene. Musen som bærer den HER2-negativbe A431 xenotransplantat-tumor hadde neglisjerbart opptak av radioaktiviteten i tumoren ved 4 timer p.i.

Eksempel 3b – In vivo HER2-bindende egenskaper av polypeptider ifølge oppfinnelsen som har en N₃S-chelator

Oppsummering

I forsøkene som utgjør dette eksempelet, ble bindingen av radiomerkede polypeptider ifølge oppfinnelsen analysert in vivo i en muse-xenotransplantat-modell. Affibody[®]-molekyl X ISEQ ID NO: 7) inneholdende en N-terminal merkaptacetil-glutamyl-seryl-glutamyl (ma-ESE) –sekvens ble radiomerket med ^{99m}Tc og injisert i musen som bærer HER2-overuttrykkende SKOV-3 tumortransplantat. Biofordeling og gamma-kamera avbildningsstudier ble utført for å analysere fordelingen av det radiomerkede Affibody[®]-molekyl til forskjellige organer og lokalisering i hele dyret.

^{99m}Tc-merking

Affibody[®]-molekyl X ble merket med ^{99m}Tc ved å bruke den indirekte metoden.

For merking med ^{99m}Tc ble et sett inneholdende de følgende ingredienser laget: 50 mg glukonat-dihydrat, 1 mg dinatriumsalt av EDTA og 0,5 mg tinn (II) kloridhydrat per 1 ml. Oppløsningen ble fordelt i alikvoter inneholdende 1 ml og alikvoter ble frysetørket. Frysetørkede merkingssett ble lagret ved -20°C før bruk.

50 µl OBS (2,68 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) ble satt til 50 µg ABY-024-oppløsning (2 mg/ml i deionisert avgasset vann). Etter virvling ble blandingen blandet med et teknetium-merkingssett og 200 µl av ^{99m}TcO₄⁻ inneholdende eluat fra en ^{99m}Tc-generator (UltratechneKow FM generator, Tycho Healthcare Nordic AB, Mallinckrodt Sweden AB) ble tilsatt. Blandingen ble inkubert ved 90°C i 60 minutter.

To små (0,8 µl) alikvoter av hver blanding på påført to ITLC SG-strimler og en ble eluert emd PBS (for å bestemme utbytte) og en annen med en blanding av pyridin:eddiksyre:vann (5:3:1,5) (for å bestemme tilstedeværelsen av redusert hydrolysert teknetium (RHT)). I dette eluatet forble teknetium-kolloidene ved startpunktet mens de radiomerkede Affibody[®]-molekyler, perteknat og andre komplekser av ^{99m}Tc migrerte med oppløsningsmiddelfronten. Fordelingen av radioaktiviteten langs ITLC-strimmelen ble visualisert og mengdebestemt ved å bruke et Phosphorimager (Cyclone[™] Storage Phosphor System, Packard). Merking av nesten kvantitativ, noe som gjorde enhver ytterligere opprensning unødvendig.

De radiomerkede Affibody[®]-molekyler ble fortynnet med PBS for å sikre art radioaktivitetskonsentrasjonen er 65 kBq per 100 µl. Konsentrasjonen av Affibody[®]-molekyler ble justert til 1 µg per 100 µl.

Biofordeling i tumor-bærende mus

Utformerte BALB/c nu/nu hunnmus ble transplantert med 1 x 10⁷ SKOV-3 (human ovarie-bukvæske adenokarsinom) –celler i høyre bakben.

For biofordelingsstudier ble mus med xenotransplantat-tumorer (40-45 dager etter implantasjon av 1 x 10⁷ celler) randomisert i grupper på fire.

Mus ble injisert i halevenen med 1 µg (65 kBq) av ^{99m}Tc -merket Affibody[®]-molekyl X i 100 µl PBS. Alle injeksjoner ble godt tolerert. En gruppe dyr ble s.c.-injisert med 100 µl (0,5 mg) av umerket His₆-Z003342 med i.v.-injeksjon med 1 µg (65 kBq) av ^{99m}Tc -merket Affibody[®]-molekyl X 50 minutter senere (blokkeringsforsøk).

Etter injeksjon av en dødelig dose av en oppløsning av Ketalar og Rompun ble mus avlivet ved årelating via hjertepunktur ved 4 timer etter injeksjon (h p.i.). Dyr fra blokkeringsgruppen ble avlivet 4 timer p.i.. Organene ble dissekert, veiet og deres radioaktivitetsinnhold ble målt i gammatelleren. Radioaktivitetsopptak ble regnet ut som prosentdel av injisert aktivitet per gram vev (% IA/g).

Avbildning

For gammakamera-avbildning ble mus som bærer xenotransplantat-tumorer (40 dager etter implantasjon av 1×10^7 SKOV-3-celler eller 10-15 dager etter implantasjon av 1×10^7 A431-celler), brukt.

Mus ble injisert i halevenen med 3 µg (15 MBq) av ^{99m}Tc -merket Affibody[®]-molekyl X i 100 µl PBS. 1 til 4 timer p.i. ble dyrene bedøvet med en dødelig dose av en oppløsning av Ketalar og Rompun. Avbildning ble utført ved å bruke et e. Cam Siemens gamma-kamera utstyrt med en LEHR-kollimator. De scintigrafiske resultater ble vurdert visuelt ved å bruke Hermes-programmet (Nuclear Diagnostics, Stockholm, Sverige).

Resultater

Resultatene fra biofordelingsstudien ved bruk av ^{99m}Tc -merket Affibody[®]-molekyl X er vist i Figur 8. Opptak av radioaktivitet ved 4 timer p.i. var høyere i tumoren enn i alle andre organer, bortsett fra nyrene. Tumor-opptak var $17 \pm 4\%$ IA/g ved 4 timer p.i. Et høyt opptak av radioaktivitet ble også funnet i nyrene, noe som er forventet siden nyrene er hovedekskresjonsveien for små proteiner som Affibody[®]-molekylene. Nyreopptaket var med $58\% \pm 10\%$ IA/g målt ved 4 timer p.i.. Således var nyreopptaket vesentlig lavere enn nyreopptaket målt for ^{111}In -merket Affibody[®]-molekyl beskrevet i Eksempel 2a ovenfor og Z00342 med DOTA koblet til N-terminalen (Orlova, A. et al., (2006), Cancer Research 67: 2178-2186). I tillegg viser lavt opptak i tarmen (3,52% IA/g) og leveren (1,06% IA/g) sammen med høyere opptak i nyrene at det ^{99m}Tc -merkede Affibody[®]-molekyl X blir i hovedsak fjernet av nyreveien og

ikke av den hepato-biliære veien. EP 6 123 095 beskriver av den foretrukne ma-Xaa1-Xaa2-Xaa3 chelaterende enhet omfattende en eller to Ser og de gjenværende to eller en aminosyreresiduer er Glu, resulterer i et skift fra hepato-biliær tiki nyrefjerningsvei. Affibody[®]-molekyl X inneholder både en av de foretrukne chelator-enheter beskrevet i EP 6 123 095, dvs. ma-Glu-Ser-Glu og alle aminosyreutskiftningene beskrevet i Eksempel 1 (tabell 1) ifølge foreliggende oppfinnelse som resulterer i en øket hydrofilisitet av disse polypeptidene. Således representerer det ^{99m}Tc-merkede Affibody[®]-molekyl X beskrevet her et ytterligere eksempel på et polypeptid inneholdende en ma-Xaa1-Xaa2-Xaa3 chelaterende enhet som balanserer lav hepatobiliær-fjerning med høy renal fjerning, men minimal re-absorpsjon i nyrene.

Opptaket av ^{99m}Tc-merket Affibody[®]-molekyl X i alle organer var lik opptaket av ¹¹¹In-merket Affibody[®]-molekyl beskrevet i Eksempel 3a.

Tumor-til-organ-forholdene av biofordelingsforsøket beskrevet ovenfor er vist i Figur 9. Igjen ble høye tumor-til-organ-forhold oppnådd. Spesielt var tumor-til-lever-forholdet av det ^{99m}Tc-merkede Affibody[®]-molekyl X 17 i forhold til det ¹¹¹In-merkede Affibody[®]-molekyl II med DOTA beskrevet i Eksempel 3a med et forhold på 10 ved 4 timer p.i. Tumor-til-blod-forholdet var 42 ved 4 timer p.i.

Spesifisiteten av tumor-målingen ved å bruke Affibody[®]-molekyl X ble vist med et blokkeringsforsøk hvor pre-injeksjon av tumor-bærende mus med overskudd av umerket Affibody[®]-molekyl reduserte tumor-opptak av ^{99m}Tc-merket Affibody[®]-molekyl X med 90%, men ikke opptaket i andre organer (Figur 8).

Gammakamera-bilder tatt 1 time og 4 timer p.i. bekreftet høy spesifikk tumor-måling av det ^{99m}Tc-merkede Affibody[®]-molekyl ifølge oppfinnelsen (Figur 10). SKOV-3-tumorene ble visualisert allerede 1 time p.i og ved 4 timer p.i. var bakgrunnsradioaktiviteten vasket ut. Bortsett fra tumoren er et klart opptak også synlig i nyrene, men dette opptaket var vesentlig lavere i forhold til nyreopptaket av ¹¹¹In-merket Affibody[®]-molekyl II med DOTA beskrevet i eksempel 3a. Musen som bærer den HER2-negative A431 xentotarnsplantat-tumor hadde neglisjerbart opptak av radioaktivitet i tumoren ved 4 timer p.i.

Eksempel 4 – Sammenligningsforsøk av kjemisk syntese av et polypeptid ifølge oppfinnelsen og av Z00342

Oppsummering

I forsøkene som utgjør dette eksempelet, er fastfase peptidsyntese av polypeptider ifølge oppfinnelsen beskrevet. Mutasjonene introdusert ved fire posisjoner, dvs. [N23T], [A42S], [A46S] og [A54S] muliggjorde en alternativ syntestrategi med pseudoprolin-prekursorer med den forenklete forkortelse Fmoc.Xxx-Yyy-OH. Det å bruke pseudoproliner i de fire posisjonene som er beskrevet ovenfor, gjorde det mulig å syntetisere hele Affibody[®]-molekyl X (SEQ ID NO: 7) (dvs. aminosyrer 1-58) mens standardsyntese ikke klarte å danne dette peptidet.

Innføring av nye serin- og treonin-residuer muliggjør også anvendelsen av isoacyl-dipeptider, noe som er et alternativ til pseudoproliner for å øke synteseeffektiviteten ved å redusere aggregering under peptidsyntesen (Sohma et al., Tetrahedron Lett. 47: 3013, 2006). Flere slike byggeblokker er tilgjengelige fra Novabiochem of MerckBiosciences AG.

Teori

Peptidsyntese av Affibody[®]-molekyl Z00342 (beskrevet i WO 2005/003156 som Z_{HER2:107} og enkelte ganger også kalt Z_{HER2:342}) så vel som kobling av DOTA til N-terminalen av dette Affibody[®]-molekyl, er mulig og beskrevet i litteraturen (Orlova, A. et al., (2006), Cancer Research 67: 2178-2186). Imidlertid ble en stor variasjon i peptidutbytte observert. Vanskelighetene med reproducerbart å syntetisere peptidet kan bli relatert til både lengden av peptidet så vel som den primære aminosyresekvens. I tillegg kan lange peptider med de reaktive grupper av aminosyre sidekjedene fremdeles beskyttet, generere ugunstige sekundære strukturer, f.eks. beta-plater som kan forstyrre fastfase peptidsyntese (Quibell, M. & Johnson, T., i Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis-A Practical Approach, W. C. Chan, P.D. White Eds. Oxford University Press 2000, 115-135). En måte å forhindre sekundær strukturdannelse på i løpet av peptidsyntese er anvendelsen av pseudoproliner. Pseudoproliner med en forenklete forkortelsen Fmoc-Xxx-Yyy-OH kan bli brukt dersom aminosyren Yyy er serin, treonin eller cystein. Disse pseudoproliner oppviser en lukket prolin-liknende struktur med sidekjeden bundet til stammen og som kan bli konvertert til den normale aminosyrestruktur ved syrebehandling (Haak, T. & Mutter, M. Tetrahedron Letters (1992), 33(12),

1589-92). Pseudoproliner er kommersielt tilgjengelige for 14 aminosyrer i posisjon Xxx (bortsett fra Arg, Cys, His, Met, Pro, Thr) sammen med serin og treonin i posisjon Yyy.

5 Det opprinnelige Affibody[®]-molekyl Z00342 har intet treonin og cystein i primærsekvensen. Serin blir kun funnet i posisjon 33, 39 og 41. En pseudoprolin-prekursor er kun tilgjengelig for serin 41 (Q⁴⁰-S⁴¹). For de to andre seriner forhindrer aminosyren i posisjon Xxx anvendelsen av pseudoproliner siden det ikke er noen prekursorer tilgjengelige (R³²-S³³ og P³⁸-S³⁹).

10 Mutasjonene introdusert i polypeptidene ifølge oppfinnelsen er rettet mot, men er ikke begrenset til, å lette peptidsyntese. Spesielt kan mutasjonene i posisjon 23, 42, 46 og 4, dvs. [N23T], [A42S], [A46S] og [A54S] ha kapasiteten å løse to av problemene i SPPS som er identifisert: de tillater anvendelsen av pseudoproliner og den kritiske region omkring aminosyre 21 til 26 blir endret i posisjon 23 ved å erstatte asparagin med treonin.

Fastfase peptidsyntese (SPPS)

Aminosyresekvensen av Affibody[®]-molekyl X (SEQ ID NO: 7) ble satt sammen på et Fmoc-Lys(Boc)-Wang polystyrenresin i en fullstendig automatisk peptidsyntetisator. Dette resinet er svært godt egnet for dannelsen av peptider med Fmoc-strategien. 57 aminosyrer (med passende sidekjedebeholdelse) ble koblet til resinet. Det siste trinns kobling av S-trityl-beskyttet merkaptodiddiksyre ble utført manuelt.

Trinn 1: Fastfase peptidsyntese

25 Fmoc-Lys(Boc)-Wang polystyrenresinet ble overført til en SPPS-reaktor med et røreverk. Syntese ble så startet med Fmoc-Pro-OH i henhold til den generelle beskrivelse gitt nedenfor. Dette trinnet ble igjen fulgt av en Fmoc deblokkering og etterfølgende kobling av aminosyrederivatene i henhold til sekvensen. Etter sluttvasker av resinet med isopropyleter (IPE) ble peptidresinet tørket i en desikkator under redusert trykk.

30 Både en standard Fmoc peptidsyntese og en syntese som bruker pseudoproliner i fire posisjoner ble utført. For standard peptidsyntese ble kun Fmoc-aminosyrer brukt. For den alternative peptidsyntese bortsett fra Fmoc-aminosyrer, ble de følgende pseudoproliner brukt: Fmoc-Leu-Thr-OH i posisjon

22-23, Fmoc-Ser-Ser-OH i posisjon 41-42, Fmoc-Leu-Ser-OH i posisjon 45-46 og Fmoc-Asp-Ser-OH i posisjon 53-54.

Fmoc deblokkeringsprosedyre

5 Resinet ble også behandlet med 20% piperidin i NMP for å oppnå spaltning av den N- α -Fmoc-beskyttende gruppe. Vaskingen av resinet ble så utført med NMP.

Koblingsprosedyre

10 Automatisk kobling av aminosyrederivatene Pro57 til Glu1. Opp til 3 eq av Fmoc-AA-derivatet ble oppløst i NMP. For koblingen ble 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluronium-tetrafluorborat (TBTU) i dimetylformamid (DMF) og sym.-kollidin (2,4,6-trimetylpyridin) i NMP tilsatt. Den resulterende oppløsningen ble blandet ved romtemperatur før den ble helt over resinet. NMP ble brukt som oppløsningsmiddel. Etter en koblingstid på minst 15 minutter ved 60°C ble resinet vasket med NMP.

15 Etter hver koblingsprosedyre finner en repetisjon av koblingen med 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluronium-tetrafluorborat (TATU) i DMF som koblingsreagens og med diklorethan som oppløsningsmiddel, sted automatisk fulgt av eddiksyreanhydrid-avslutning.

Trinn 2 Kobling av merkaptoseddiksyre

20 Acylinger ble utført med 5 molar-ekvivalenter aminosyre, 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluronium-heksafluorofosfat (HBTU) og 1-hydroksybenzotriazol (HOBt) og 10 ekvivalenter N-etyldiisopropylamin (DIEA, fra Lancaster Synthesis, Morecambe, England). S-trityl-merkaptoseddiksyre var fra AnaSpec Inc. (San Jose, CA, USA).

Trinn 3: Spaltning fra resinet innbefattende spaltning av de gjenværende beskyttelsesgrupper

25 Peptidresinet ble behandlet med trifluorediksyre (TFA) ved nærvær av rensset vann, etanditiol (EDT) og triisopropylsilan (TIS). Etter omkring 2 timers spaltningstid ved romtemperatur ble reaksjonsblandingen avkjølt til omkring 0°C og ammoniumjodid og dimetylsulfid ble tilsatt for å redusere oksydert metionin. 30 Etter en ytterligere 60 min spaltningstid ved omkring 0°C ble det dannede jod redusert med askorbinsyre. Etter frafiltrering av produktet ble det felt ut i IPE i kulde, filtrert fra igjen, vasket med IPE og tørket under redusert trykk.

Renhetsanalyse med HPLC

Renheten av de 58 aminosyrer lange peptider og enkelte intermediater ble bestemt med revers fase HPLC ved å bruke en Vydac 218 TP54 (5 µm, 250 X 4,6 mm) kolonne og 0,1% TFA, 1% acetonitril i H₂O og 0,1% TFA i acetonitril som henholdsvis oppløsningsmiddel A og B. Kolonne

5 ovnstemperaturen ble satt til 35°C. Kolonnen ble eluert enten med en gradient av 15 til 45% oppløsningsmiddel B i 30 minutter eller med en gradient fra 20 til 50 % B i 30 minutter. UV-påvisning var ved 220 nm. Renheten ble regnet ut med arealenormalisering.

Resultater

Utbyttet og renheten av Affibody[®]-molekyl X (SQ ID NO: 7), syntetisert med eller uten anvendelse av pseudoproliner ble analysert med analytisk revers fase kromatografi. For å følge progresjonen av syntesen ble en liten del av synteseresinet tatt etter flere koblingstrinn og analysert for tilstedeværelse,

15 renhet og utbytte av det ønskede peptidintermediat. Figur 11 viser analysen av det 41 aminosyrer lange peptidintermediat (aminosyre 18-58). På dette stadium av peptidsyntesen ble en klar og dominerende peptid-topp med den rette sekvensen (RT = 15,33 min, utbytte 49%) identifisert dersom syntesen ble utført ved å bruke pseudoproliner (figur 11 A). Standard Fmoc-syntese resulterte

20 imidlertid i et stort antall små peptidtopper og to hovedtopper med lik størrelse, men lavt utbytte. En av disse to topper (RT = 20,82 min) ble identifisert som peptidintermediatet med den riktige sekvens (aa18-58) (Figur 11 B). Peptidet av full lengde (aminosyrer 1-58) ble oppnådd kun dersom syntesen ble utført ved å bruke pseudoproliner. Figur 12A viser en enkelt produkttopp med et utbytte av

25 sluttpeptidet på 26%. Standard Fmoc-syntese klarte imidlertid ikke å danne sluttpeptidproduktet. Analyse av det 49 aminosyrers lange intermediat (aminosyre 10-58) fra standardsyntesen viste at det ønskede intermediat ikke kunne bli påvist og syntesen ble avsluttet (Figur 12 B).

Eksempel 5 – Komparativt studium av hydrofilisitet av polypeptid ifølge oppfinnelsen og av Z00342

Oppsummering

I forsøkene som utgjør dette eksempelet, blir den økede hydrofilisitet av polypeptidene ifølge oppfinnelsen beskrevet ved å bruke to metoder: 1) proteinhydrofobisitet/hydrofilisitetskurver og 2) revers fase HPLC

35 elueringsprofiler.

1) Proteinhydrofobisitet/hydrofilisitetsskurver

Hydrofobisitet/hydrofilisitetsskurver ble dannet for å oppvise fordelingen av polare og apolare residuer langs proteinsekvensen. Disse kurver blir vanligvis brukt til å forutsi sterkt hydrofobe områder, for eksempel membrangjennomløpende deler eller hydrofile sekvenser, dvs. områder som trolig er eksponert på overflaten av proteiner.

Kurvene blir laget ved å skanne proteinsekvensen med et bevegelig vindu som kan bli tilpasset for formålet med analysen. For eksempel blir et bevegelig vindu på syv aminosyrer antydning å være en god verdi for å finne forsøksvis overflate-eksponerte områder. Ved hver posisjon blir den gjennomsnittlige hydrofobiske indeks av aminosyrene innenfor vinduet regnet ut. Denne verdien blir nedtegnet som midtpunktet av vinduet. For hydrofobisitet/hydrofilisitetsskurvene som utgjør dette eksempelet, ble to hydrofobisitetsskalaer brukt: 1) Kyte-Doolittle-skala hvor hydrofobiske områder oppnår en positiv verdi (Kyte J., Doolittle R.F. (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132) og 2) Hydrofobisitetsverdier ved pH 3,4 bestemt med HPLC (Cowan R., Whittaker R.G. (1990) Peptid Research 3: 75-80). Kurvene ble laget ved å bruke programmet BioAnnotator som er en komponent av Vector NTI Suite 9.0.0. (Invitrogen)

Ti til tolv aminosyrer av Affibody[®]-molekylet (dvs. aminosyrer ikke involvert i målbindingsaktivitet av molekylet (bortsett fra en, Met⁹) ble endret når mulig til mer hydrofobe aminosyrer og/eller til aminosyrer som reduserer den totale antignisitet for å optimalisere sekvensen for ekspresjon i E- coli og for merking med radionuklider.

To eksempler på hydrofobisitet/hydrofilisitetsskurver for polypeptider ifølge oppfinnelsen er vist i Figur 13 A og B. For sammenligning er kurven for det opprinnelige Affibody[®]-molekyl Z00342 gitt i Figur 13 C.

I sekvensen av Affibody[®]-molekyl II (SEQ ID NO: 5) ble de følgende aminosyreendringer foretatt:

- Fire av disse mutasjoner skiftet ut ikke-polare hydrofobe aminosyrer til polare aminosyrer [F5Y], [A42S], [A46S] og [A54S]
- To som endret polar aminosyre til ikke-polar hydrofob aminosyre [N3A] og [N6A]

- En som endret en uladet polar aminosyre til positivt ladet polar aminosyre [S33K]
- En som endret en polar aminosyre til en negativt ladet aminosyre [N43E]
- 5 • En som endret en polar aminosyre til en mindre polar aminosyre [N23T]
- En som endret en ikke-polar hydrofob aminosyre til en mindre hydrofob aminosyre [V1A]
- 10 • En som endret en negativt ladet aminosyre til en annen negativt ladet aminosyre [D2E]

Kurvene for Affibody[®]-molekyl II i Figur 13 A viser øket

- hydrofilisitet i området av Affibody[®]-molekylene som danner alfa heliks 2 og 3 og C-terminalen (mellom aminosyrer 24-58) sammenlignet med det opprinnelige Affibody[®]-molekyl Z00342 (Figur 13 C)

15 I sekvensen av Affibody[®]-molekyl X (SEQ ID NO: 7) ble de samme aminosyreendringer foretatt for Affibody[®]-molekyl II, men de første 3 aminosyrer ble endret til mer hydrofile aminosyrer:

- en av disse mutasjoner byttet en ikke-polar hydrofob aminosyre til en negativt ladet aminosyre [V1E]
- 20 • en som endret en negativt ladet aminosyre til en polar aminosyre [D2S]
- en som endret en uladet polar aminosyre til en negativt ladet polar aminosyre [N3E]

25 Kurvene for Affibody[®]-molekyl X (SEQ ID NO: 7) i Figur 13 B viser den samme økede hydrofilisitet i området av alfa heliks 2 og 3 (mellom aminosyrer 24-58) og en enda mer hydrofil N-terminal i forhold til det opprinnelige Affibody[®]-molekyl Z0342 (Figur 13 C).

2) Revers fase HPLC elueringsprofiler

Proteiner kan bli effektivt separert med revers fase (RP) kromatografi. Forskjeller i hydrofilisitet/hydrofobisitet av et protein kan bli analysert på RP-kolonner
 30 f.eks. C8- eller C18-kolonner hvor mer hydrofile proteiner eluerer tidligere, dvs. ved lavere konsentrasjoner av acetonitril elueringsmiddelet enn mer hydrofobe proteiner. De følgende betingelser ble brukt for å sammenligne elueringen av Affibody[®]-molekyl

II (SEQ ID NO: 5) og det opprinnelige Affibody[®]-molekyl Z00342: HPLC-instrument: Agilent 1100 (Agilent); kolonne: Zorbax 300SB C8 150 x 2,1 mm, 3,5 µm (Agilent), temperatur: 30°C; pålasting: 20 µl av proteinoppløsning med 2,2 mg/ml; strømningshastighet: 0,5 ml/min; Oppløsningsmiddel A: 0,5% trifluoreddiksyre (TFA) i vann; oppløsningsmiddel B: 90% aceton itril, 0,5% tfa I VANN; GRADIENT: 0-2 MIN 10% B, 2-17 min 10-70% B, 17-18 min 70-100% B, 18-21 min 100% B, 21-22 min 100-10% B, 22-25 min 10% B. Disse resultater av analysen er vist i Figur 14. Skiftet i retensjonstid illustrerer den økede hydrofilisitet av Affibody[®]-molekyl II i forhold til de opprinnelige Affibody[®]-molekyl Z00342. Dette Affibody[®]-molekyl med alle mutasjonene beskrevet ovenfor eluerer med en retensjonstid på 9,614 min i forhold til 9,860 for det opprinnelige Affibody[®]-molekyl Z00342.

Eksempel 6 – Sammenligningsstudium av antigenisitet (IgG-bindign) av polypeptid ifølge oppfinnelsen og Z00342

Oppsummering

En ønsket egenskap av de HEDR2-spesifikke polypeptider beskrevet i foreliggende oppfinnelse er å ha en lav antigenisitetsprofil som har til hensikt å vise et lavt interaksjonspotensiale med immunoglobuliner (Ig). I dette eksempelet er en metode for å måle antigenisitet (IgG-bindign) in vitro beskrevet og Affibody[®]-molekyler I, II, II med DOTA konjugert til de C-terminale cystein og XI med DOTA konjuger til et innvendig cystein (posisjon 42) blir sammenlignet med standard HER2-spesifikt Affibody[®]-molekyl Z00342 for å evaluere påvirkningen av de foretatte aminosyreendringer. Assayet som ble benyttet, er referert til som et in vitro antigenisitets (IVA) ELISA.

In vitro antigenisitets (IVA) ELISA

I IVA ELISA ble en 96 brønners plate belagt med 2 µg/ml av det HER2-spesifikke Affibody[®]-molekyl Z00342 som ble valgt som standard beleggingsreagens. I tilelgg ble platen belagt med 2 µg/ml av de HER2-spesifikke Affibody[®]-molekyler I, II, II med DOTA og XI med DOTA. 50 µl av belegningsoppløsning ble til satt til hver brønn og halve arealet av platen ble inkubert ved 4°C over natten. EKLISA-platen ble vasket to ganger med springvann og 100 µl blokkeringsoppløsning (fosfatbufret saline (PBS) pH 7,4 med om5 % kasein) ble tilsatt til hver brønn. Platen ble derpå inkubert i 1 time ved romtemperatur (RT), tømt, fulgt av tilsetning av 50 µl/brønn av en sammenslåing av primatserum i to gangers fortyningsserie ved å starte fra 1 i 100 fortykning. Platen ble inkubert i 1 timer ved RT og så vasket fem ganger med PBS + 0,05% Tween (PBS-T). For påvisning ble et geit anti-human Ig-HRP antistoff brukt

fortynnet 1/5000 (Southern Biotechnology). Platen ble inkubert i 50 min ved RT fulgt av et fem gangers vasketrinn med PBS-T. For fargeutvikling ble 50 µl av ImmunoPure TMB-substrat (Pierce) tilsatt og platen ble inkubert i mørke ved RT i 12 min.

Fargereaksjon ble stoppet ved å tilsette stop-oppløsning (2 M H₂SO₄) og absorbansen ble målt ved 450 nm.

Utrekning av IVA-verdier

IVA-ELISA-forsøket ble deretter utført som beskrevet ovenfor. De resulterende titeringskurver ble nedtegnet i en kurve ved å bruke en XY-ikke-lineær regresjonsformel for å oppnå en fortynningsverdi ved OD 0,3. Standard fortynningsverdien ved OD 0,3 ble satt til 100 og IVA-verdien for hver prøve ble regnet ut ved å relatere den til standarden. Ut fra dette reflekterer en IVA-verdi lavere enn 100 en lavere grad av av primat Ig-binding av dette spesielle HER2-spesifikke polypeptid i forhold til standard Z00342. Fire forskjellige HER2-spesifikke polypeptider ble vurdert for in vitro antigenisitet, dvs. Affibody[®]-molekyler I, II, III med DOTA og XI med DOTA. Disse polypeptider ble vist å ha en lav in vitro antigenisitetsprofil i forhold til standardproteinene. Konkklusjonen er at aminosyreendringene som ble foretatt, resulterte i et minsket potensiale til å samvirke med immunoglobuliner.

Tabell 3. IVA-verdier av forskjellige HEER2-spesifikke polypeptider i forhold til standard Z00342.

Affibody [®] -molekyl	IVA-verdi
Standard Z00342	100
I	13
II	4
II med DOTA	6
XI med DOTA	1

Sekvenslister

```

<110>  AFFIBODY AB
<120>  NEW POLYPEPTIDES
<130>  21039125
<150>  EP07150395
<151>  2007-12-21
<160>  7
<170>  PatentIn version 3.5

<210>  1
<211>  48
<212>  PRT
<213>  artificial

<220>
<223>  new HER-2 binding polypeptide

<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (2)..(2)
<223>  X in position 2 is M, I or L

<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (39)..(39)
<223>  X in position 39 is S or C

<400>  1

Glu Xaa Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr
1          5          10          15

Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser
          20          25          30

Gln Ser Ser Glu Leu Leu Xaa Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln
          35          40          45

<210>  2
<211>  51
<212>  PRT
<213>  artificial

<220>
<223>  new HER-2 binding polypeptide

<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (5)..(5)
<223>  X in position 5 is M, I or L

```

47

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (42)..(42)
 <223> X in position 42 is S or C

<400> 2

Tyr Ala Lys Glu Xaa Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile Ala Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg Lys Leu Tyr Asp
 20 25 30

Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Xaa Glu Ala Lys Lys Leu Asn
 35 40 45

Asp Ser Gln
 50

<210> 3
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> new HER-2 binding polypeptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X in positin 9 is M, I or L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(46)
 <223> X in positin 46 is S or C

<400> 3

Ala Glu Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Xaa Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
 20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Xaa Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln
 50 55

48

<210> 4
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> new HER-2 binding polypeptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> X in position 9 is M, I or L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(46)
 <223> X in position 46 is S or C

<400> 4

Glu Ser Glu Lys Tyr Ala Lys Glu Xaa Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
 20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Xaa Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln
 50 55

<210> 5
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> new HER-2 binding polypeptide

<400> 5

Ala Glu Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
 20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys
 50 55 60

49

<210> 6
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> new HER-2 binding polypeptide

<400> 6

Glu Ser Glu Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
 20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
 50 55

<210> 7
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> new HER-2 binding polypeptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> The sequence comprises a mercaptoacetyl group (ma) coupled to the
 N-terminal

<400> 7

Glu Ser Glu Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg
 20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys
 50 55

P a t e n t k r a v

1. HER2-bindende polypeptid omfattende aminosyresekvensen
EX₁RNAYWEIA LLPNLTNQQK RAFIRKLYDD PSQSSELLX₂E AKKLNDSQ
hvor X₁ i posisjon 2 er M, I eller L og X₂ i posisjon 39 er S eller C (SEQ ID NO: 1).
- 5 2. HER2-bindende polypeptid ifølge krav 1, omfattende den følgende aminosyresekvens
YAKEX₁RNAYW EIALLPNLTN QQKRAFIRKL YDDPSQSSEL
LX₂EAKKLNDS Q
hvor X₁ i posisjon 5 er M, I eller L og X₂ i posisjon 42 er S eller C (SEQ ID NO: 2)
- 10 3. HER2-bindende polypeptid ifølge krav 1 eller 2, omfattende en aminosyresekvens valgt fra
AEAKYAKEX₁R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELX₂EAK
K LNDSQ (SEQ ID NO: 3) og
ESEKYAKEX₁R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLX₂EAK
15 K LNDSQ (SEQ ID NO: 4)
hvor X₁ i posisjon 9 er M, I eller L og X₂ i posisjon 46 er S eller C.
4. HER2-bindende polypeptid ifølge krav 3, omfattende en aminosyresekvens valgt fra
AEAKYAKEMR NAYWEISLLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK
20 LNDSQAPKVD C (SEQ IS NO: 5) og
ESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK
LNDSQAPK (SEQ ID NO: 6).
5. HER2-bindende polypeptid ifølge ethvert av kravene 1-4, ytterligere omfattende et merkptoacetyl koblet til N-terminalen derav, hvor et chelaterende miljø bestående av
25 et N₃S-chelatormotiv er gitt av nitrogenatomene av de første tre påfølgende peptidbindinger fra N-terminalen sammen med SH-gruppen av merkptoacetyl.
6. HER2-bindende polypeptid ifølge ethvert av kravene 1-4 omfattende et cysteinresiduum enten allerede til stede i sekvensen eller som et ytterligere aminosyreresiduum eller ved å erstatte et overflateeksponert aminosyreresiduum som
30 ikke er involvert i HER2-binding.

7. HER2-bindende polypeptid ifølge krav 6, hvor cysteinresiduet er det som ligger ved den C-terminale ende v SEQ ID NO: 5 eller det ytterligere cystein er beliggende ved C-terminalen av enhver av SEQ ID NO: 1-4 eller 6-7, hvor cysteinet eventuelt er fulgt av en eller flere andre aminosyreresidu(er), og hvor et chelaterende miljø bestående av et N₃S chelatormotiv er gitt av nitrogenatomene av tre påfølgende peptidbindinger i strekningen av aminosyreresiduer bestående av cysteinet og de to forutgående aminosyreresiduer sammen med SH-gruppen av cysteinresiduet.
8. HER2-bindende polypeptid ifølge krav 6, omfattende et chelaterende miljø gitt av enn polyaminopolykarboksylat-chelator koblet til polypeptidet via en tiolgruppe.
9. HER2-bindende polypeptid ifølge krav 8, hvor polyaminopolykarboksylat-chelatoren er valgt fra 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraeddikksyre eller derivater derav og dietylentriaminpentaeddikksyre eller derivater derav.
- 10 HEDR2-bindende polypeptid ifølge krav 9, hvor aminosyresekvensen er som angitt i SEQ ID NO: 5.
11. Radiomerket polypeptid bestående av et radiochelate av et HER2-bindende polypeptid og et radionuklid, hvor nevnte radiochelate er valgt fra et HER2-bindende polypeptid ifølge ethvert av kravene 5 og 7 med et radionuklid som er egnet for medisinsk avbildning, og som er ^{99m}Tc eller med et radionuklid som er egnet for terapi og som er valgt fra gruppen bestående av ¹⁸⁶Re og ¹⁸⁸Re;
- et HER2-bindende polypeptid ifølge ethvert av kravene 8-10 med et radionuklid som er egnet for medisinsk avbildning og som er valgt fra gruppen bestående av ⁶¹Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁶Ga, ⁶⁸Ga, ^{110m}In, ¹¹¹In og ⁸⁶Y eller med et radionuklid som er egnet for terapi og som er valgt fra gruppen bestående av ²²⁵Ac, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ²¹²Pb, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ²²⁷Th og ⁹⁰Y,
- hvor radionuklidet er kompleksbundet med det HER2-bindende polypeptid via det chelaterende miljø, og
- et HER2-bunden polypeptid ifølge krav 6 bundet via et linkermolekyl til et radionuklid som er egnet for medisinsk avbildning og/eller terapi valgt fra gruppen bestående av ²¹¹At, ⁷⁶Br, ¹⁸F og jodisotoper.
12. Radiomerket polypeptid ifølge krav 11, omfattende aminosyresekvensen angitt i SE ID NO: 5 bundet via et linkermolekyl til ¹⁸F.

13. Radiomerket polypeptid ifølge ethvert av kravene 1 – 12, hvor radionuklidet er egnet for avbildning for anvendelse i diagnose.

14. Radiomerket polypeptid ifr anvendelse ifølge krav 13, hvor nevnte diagnose omfatter trinnene å:

- 5 - administrere et radiomerket polypeptid ifølge ethvert av kravene 11-12, hvor radionuklidet er egnet for avbildning, i kroppen til et pattedyrindivid; og
- oppnå et eller flere bilder innen 1-72 timer fra administrasjon av det radiomerkede polypeptid, av minst en del av individets kropp ved å bruke et medisinsk avbildningsinstrument, hvor nevnte bilde(r) indikerer tilstedeværelse av radionuklidet
- 10 inne i kroppen.

15. Radiomerket polypeptid ifølge krav 11, hvor radionuklidet er egnet for terapi for anvendelse i terapi.

16. Fusjonspolypeptid omfattende minst en første enhet bestående av et HEDR2-bindende polypeptid ifølge ethvert av kravene 1-4 samt minst en ytterligere enhet

15 bestående av et albumin-bindende domene av streptokokkisk protein G.

17. Fusjonspolypeptid omfattende minst en første enhet bestående av et HER2-bindende polypeptid ifølge ethvert av kravene 1 – 4 samt minst en enhet for terapeutiske applikasjoner.

18. Nukleinsyre som koder for polypeptidet ifølge ethvert av kravene 1-4 eller 6.

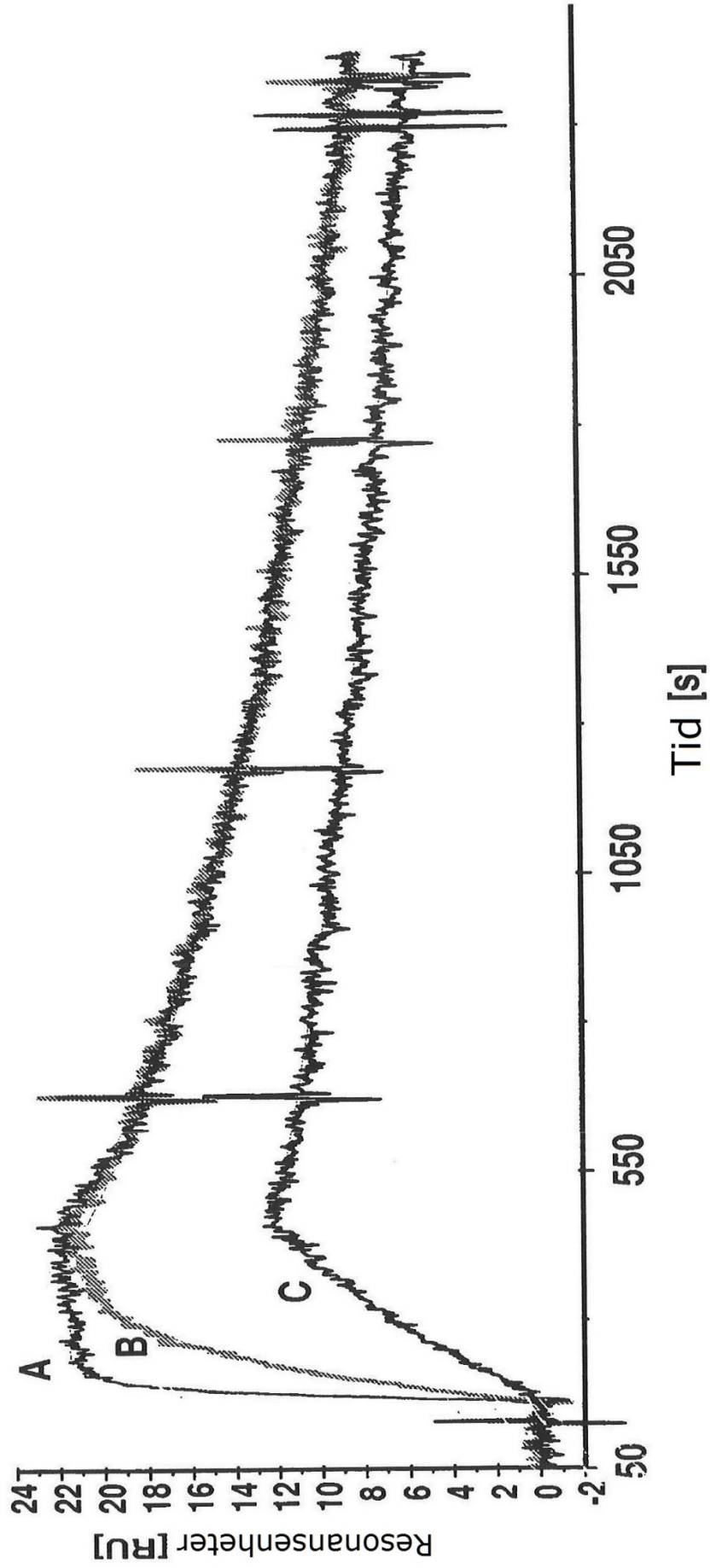


Fig. 1

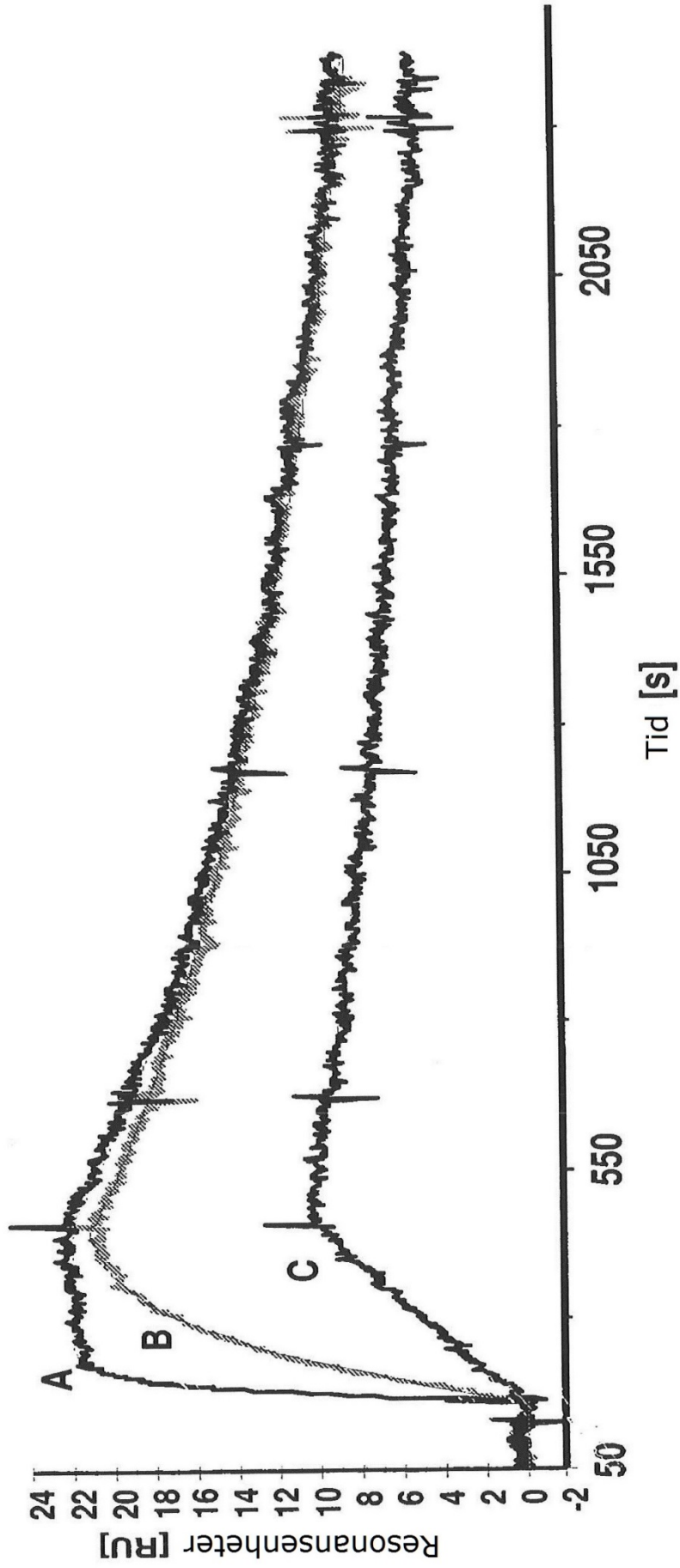


Fig. 2

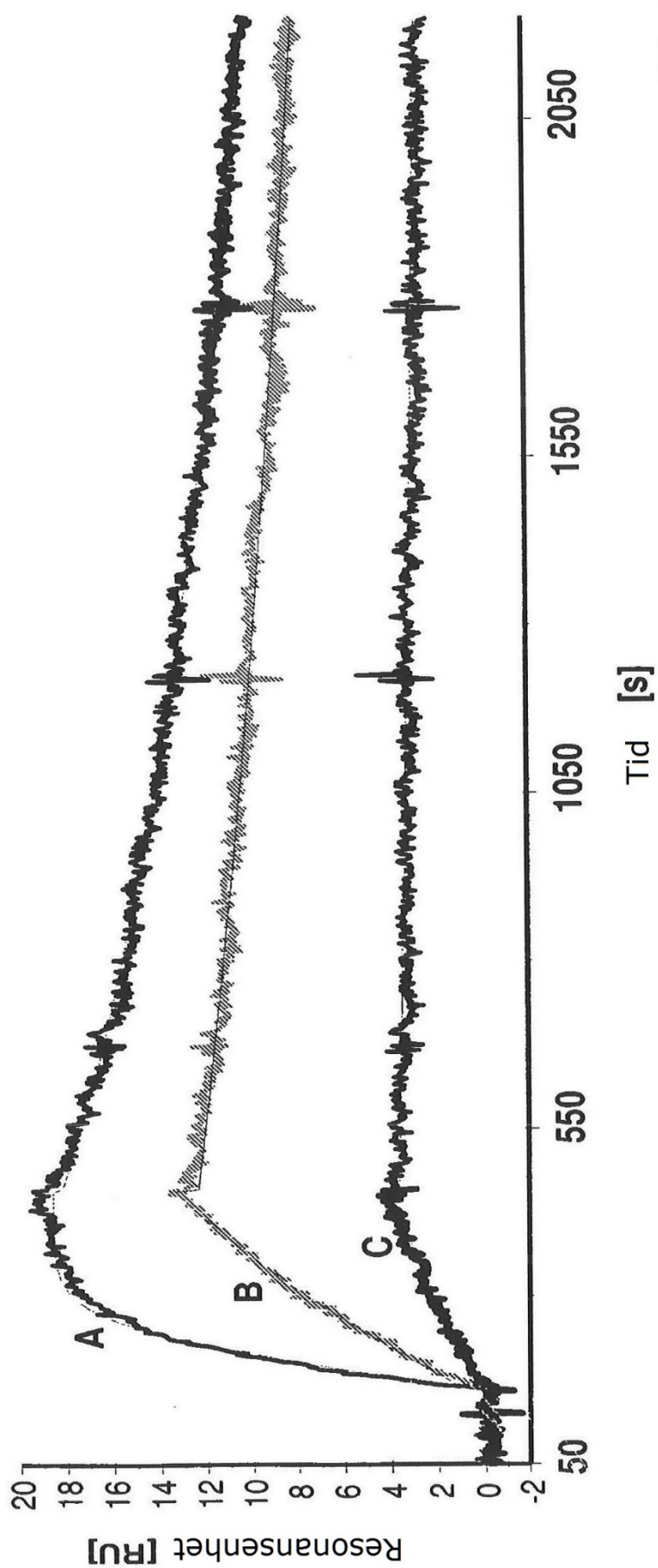


Fig. 3

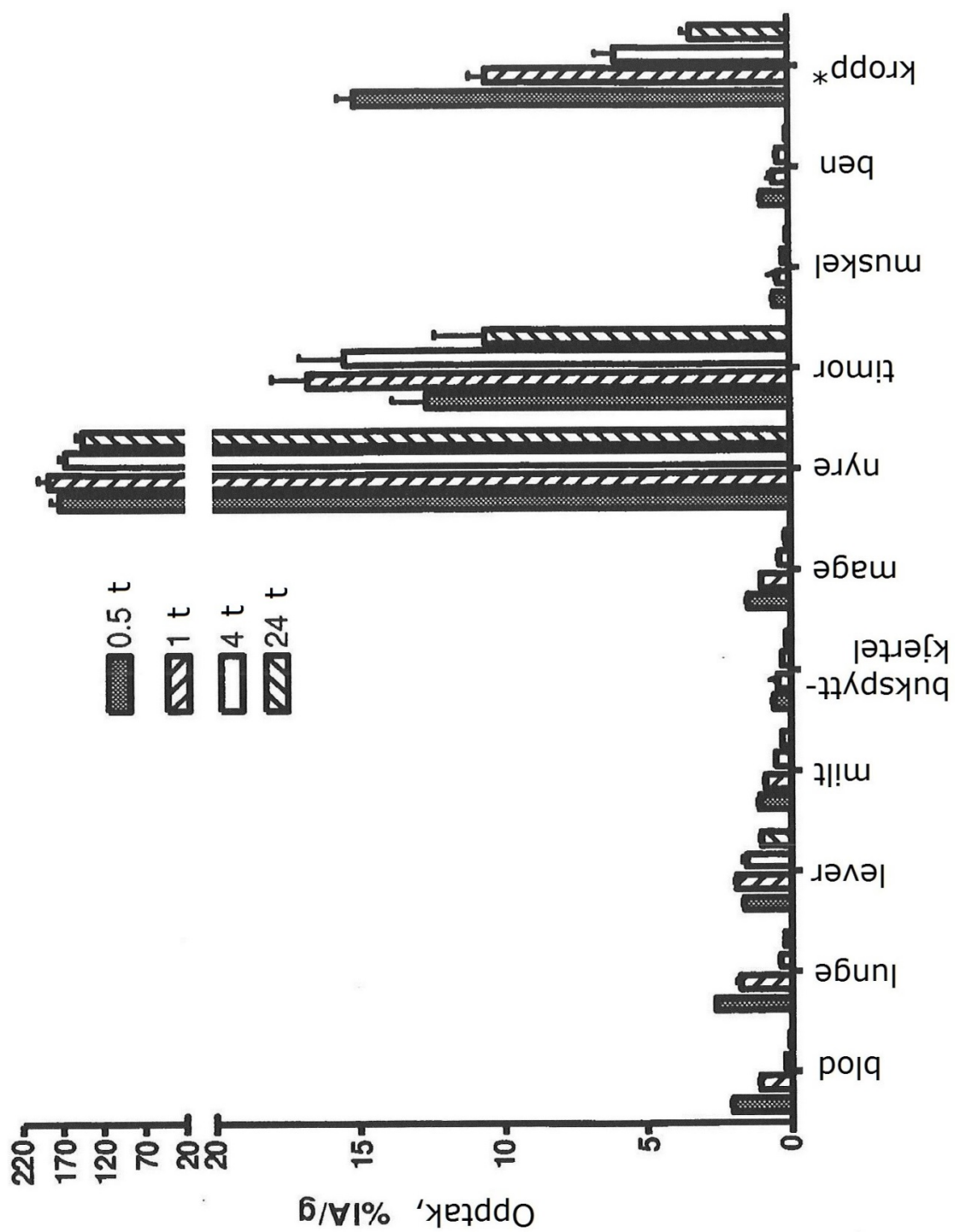


Fig. 4

Fig. 5

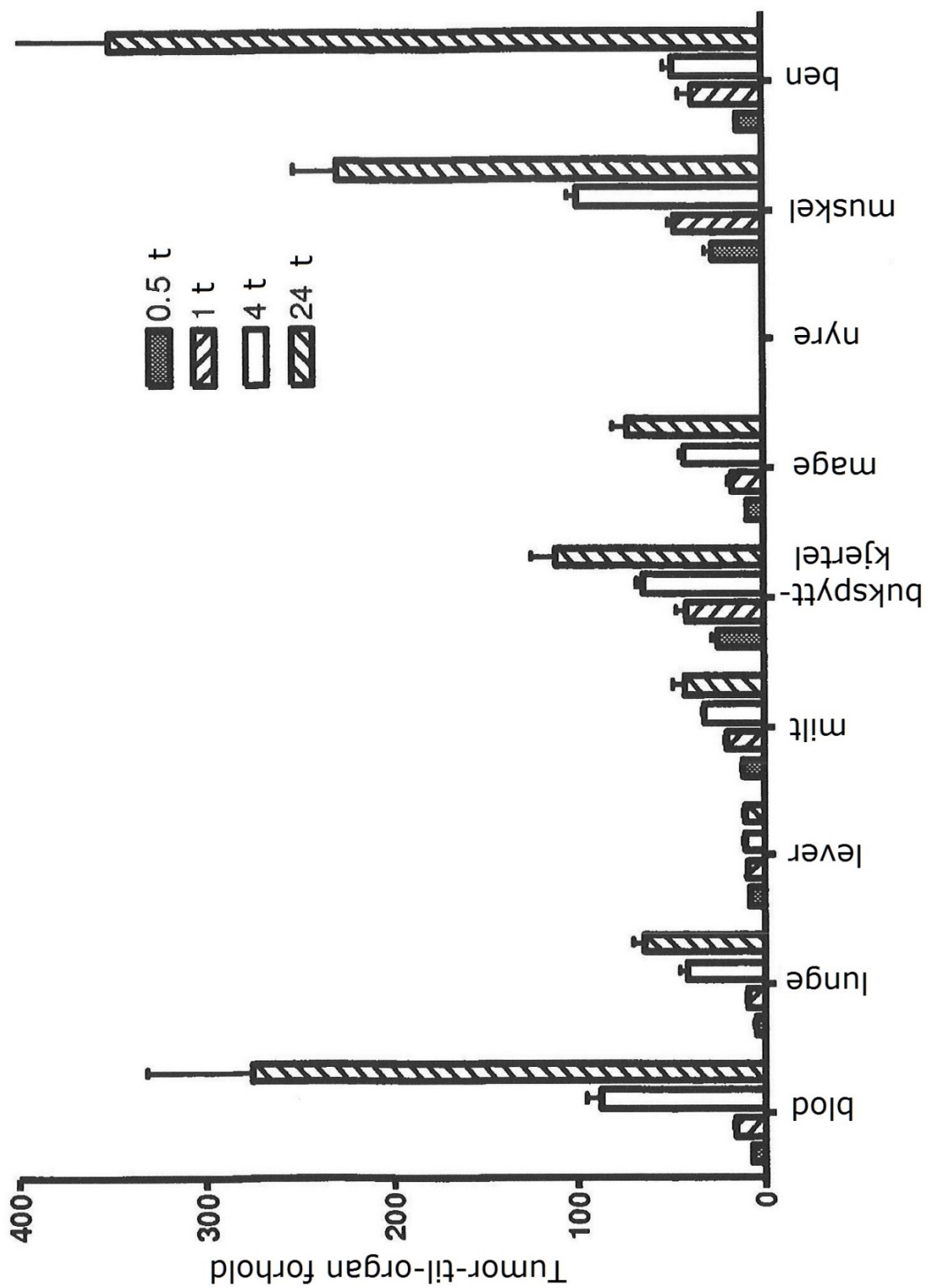


Fig. 6

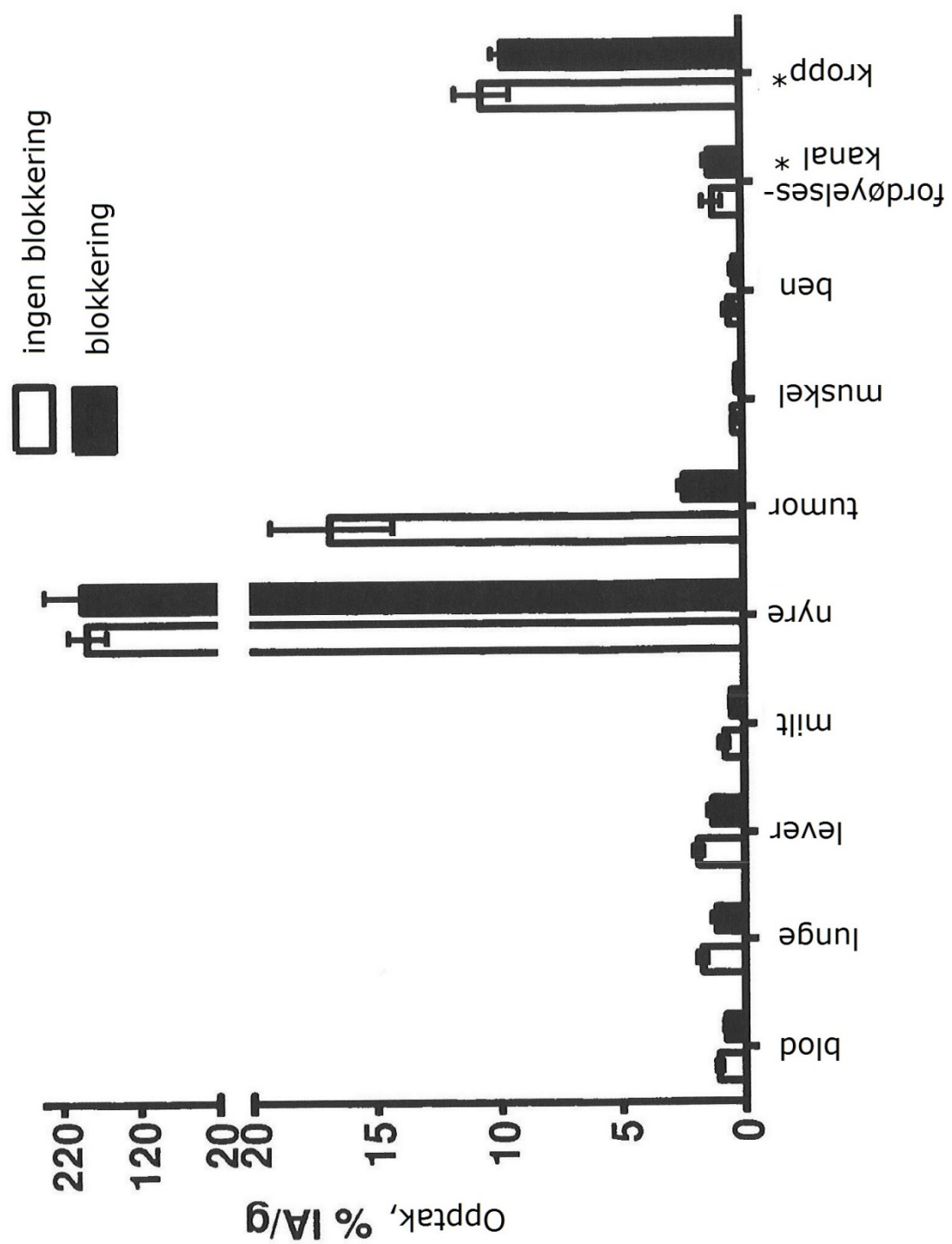




Fig. 7

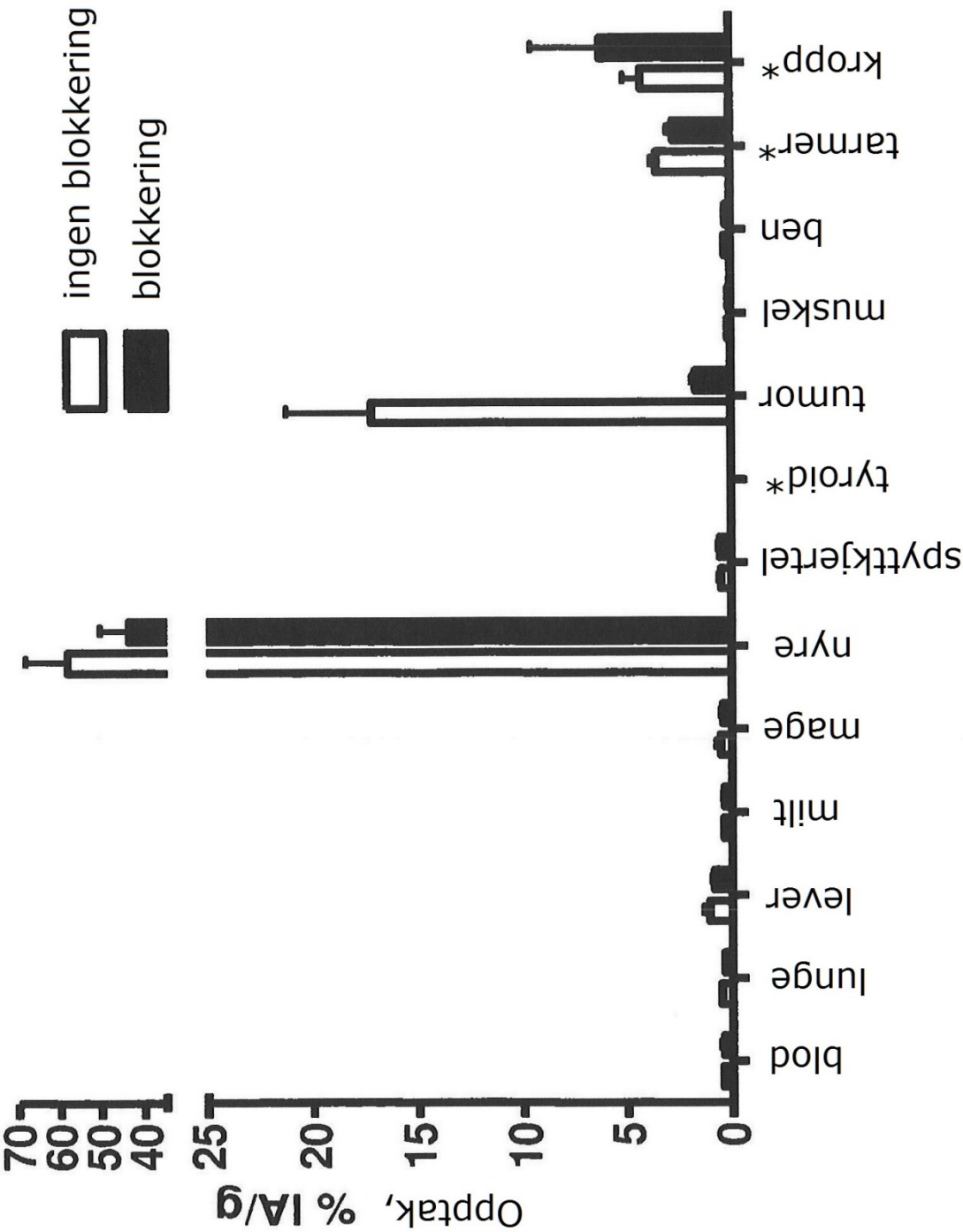
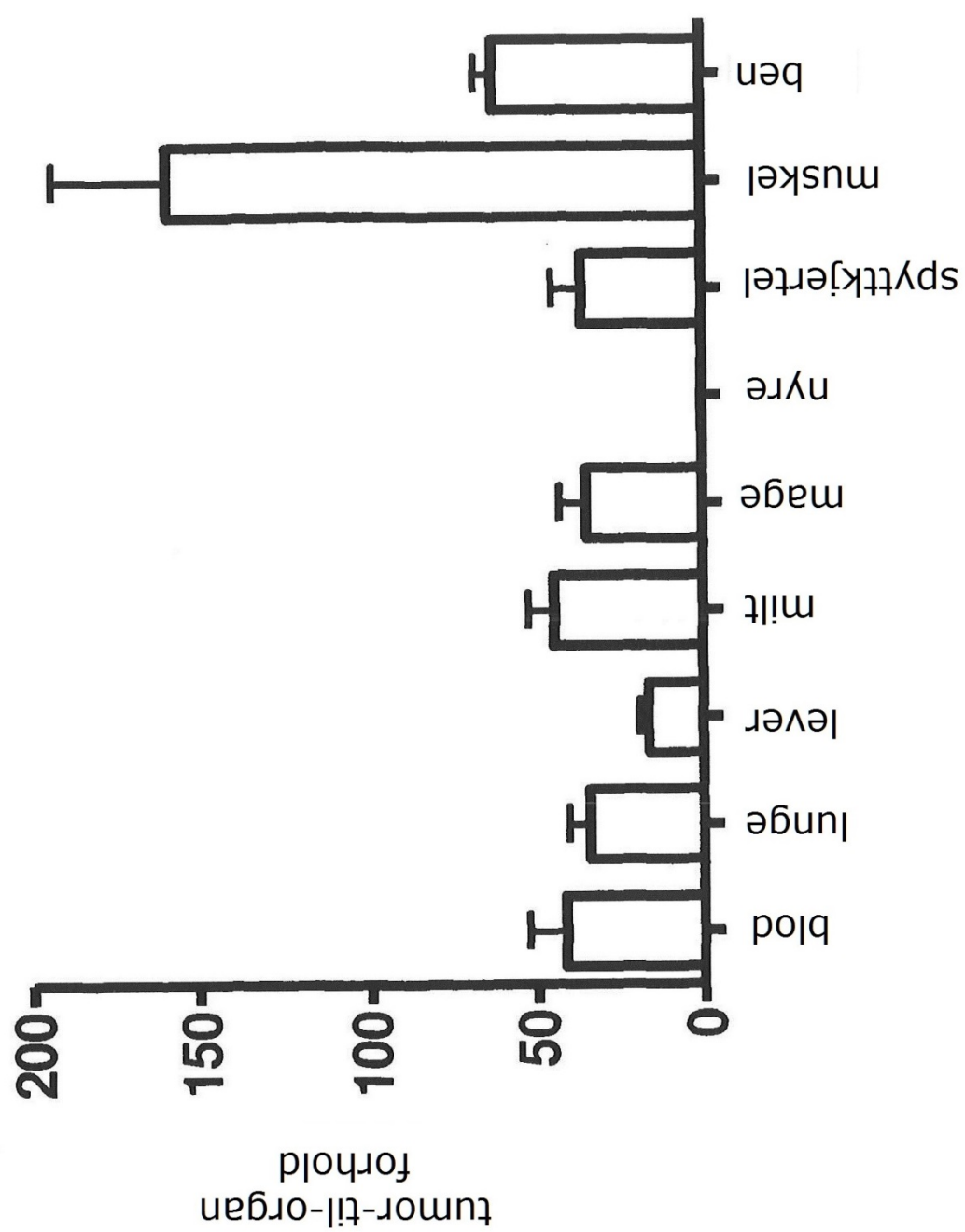
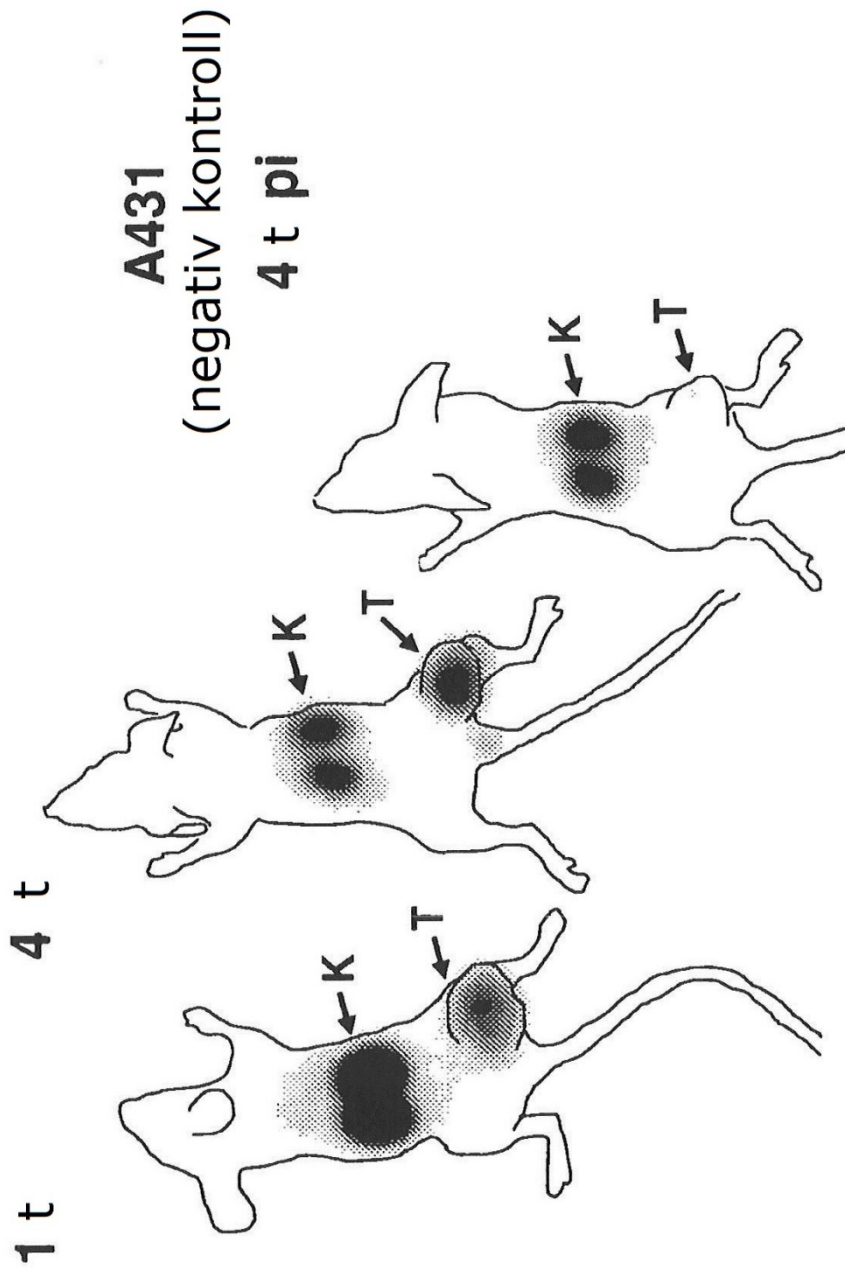


Fig. 8

Fig. 9



SKOV-3**Fig. 10**

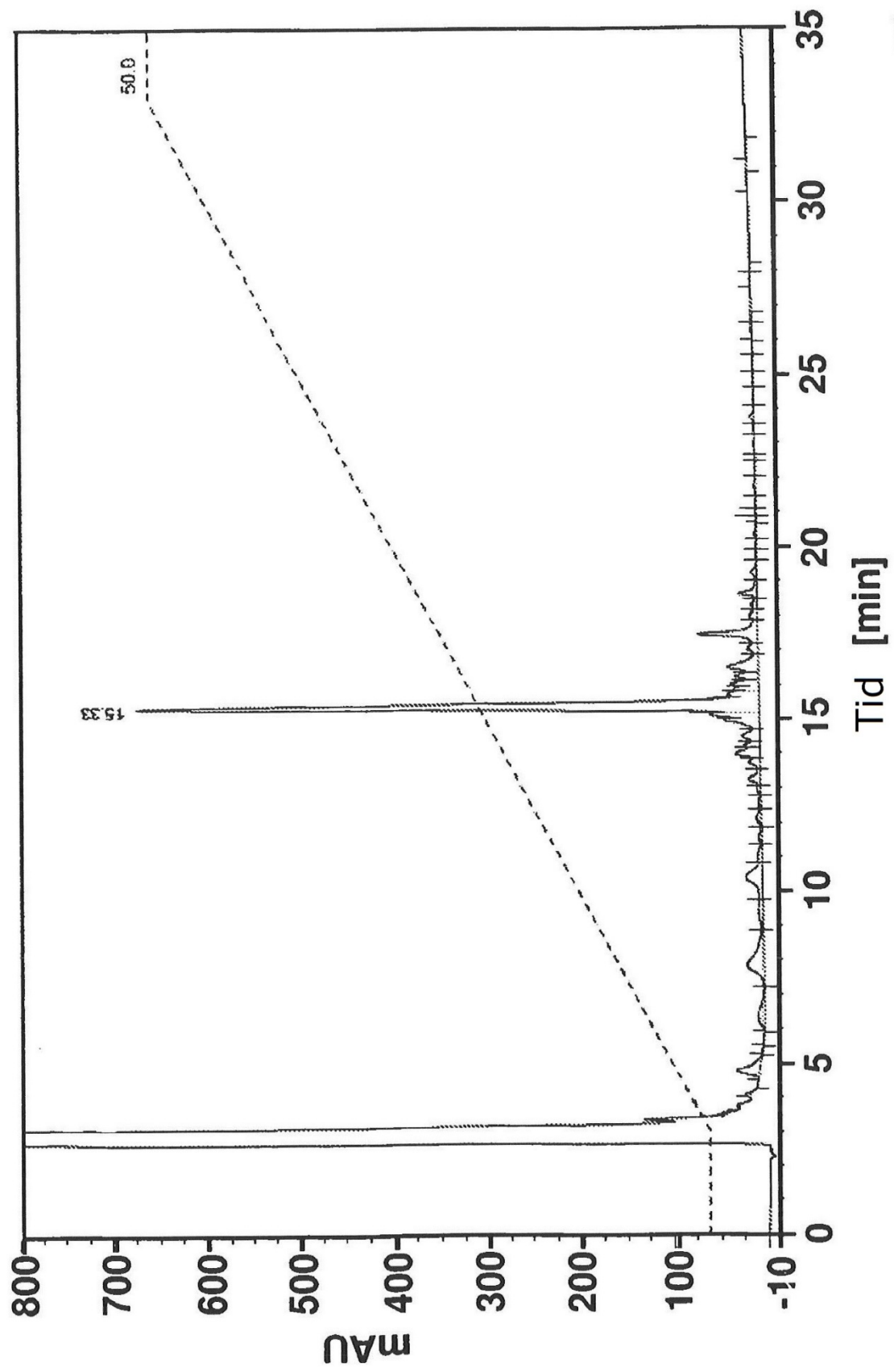


Fig. 11 A

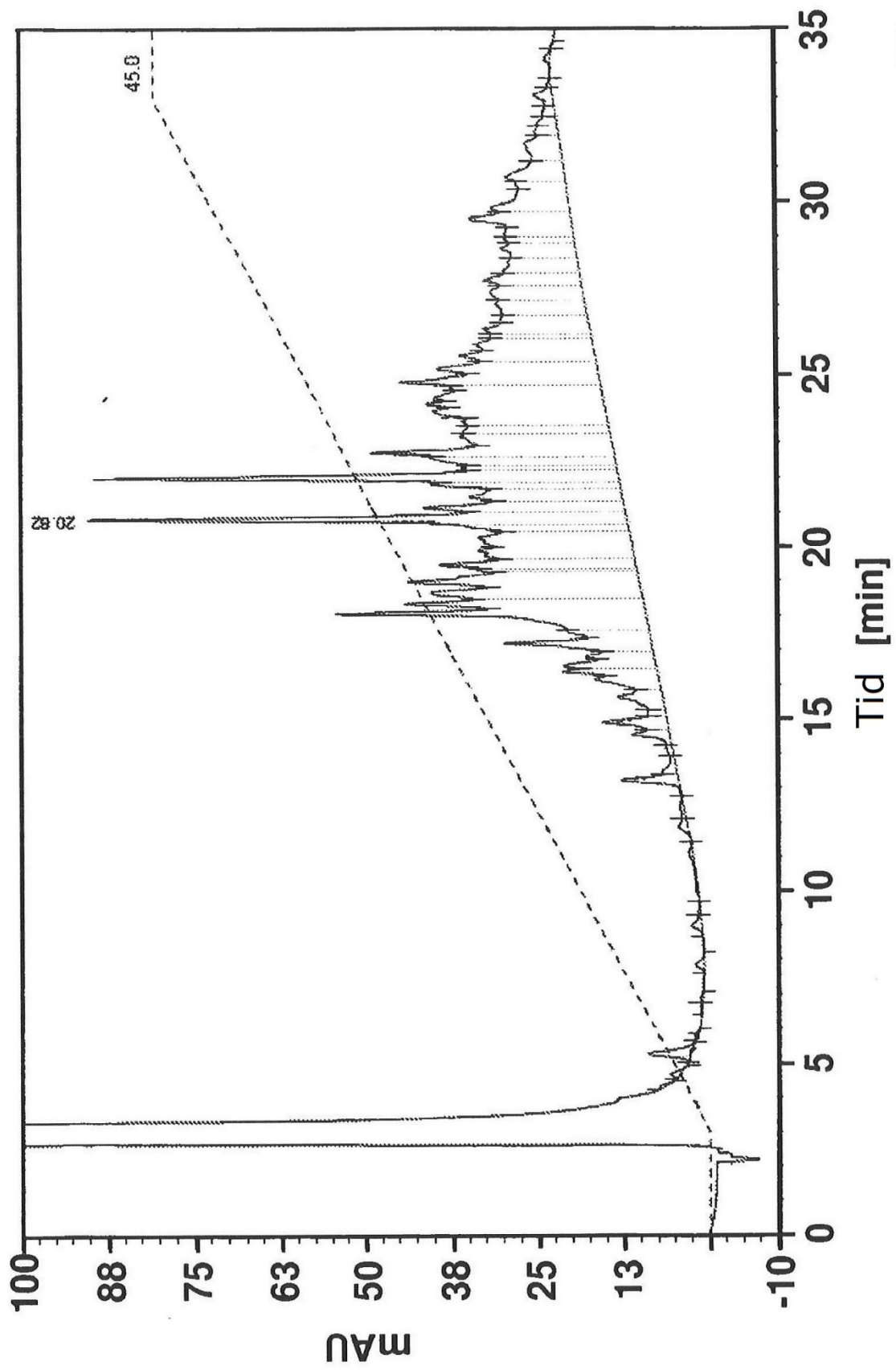


Fig. 11 B

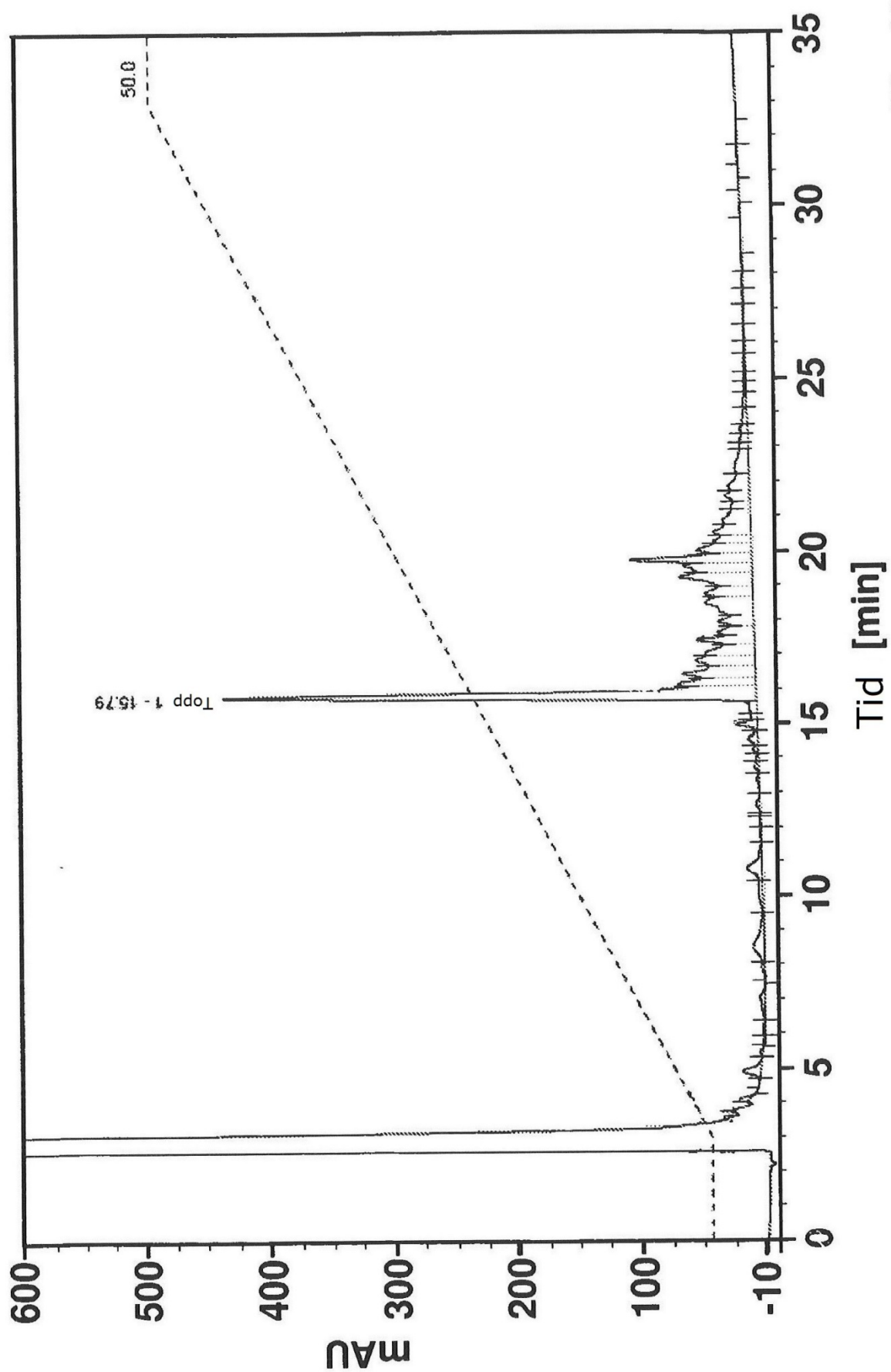


Fig. 12 A

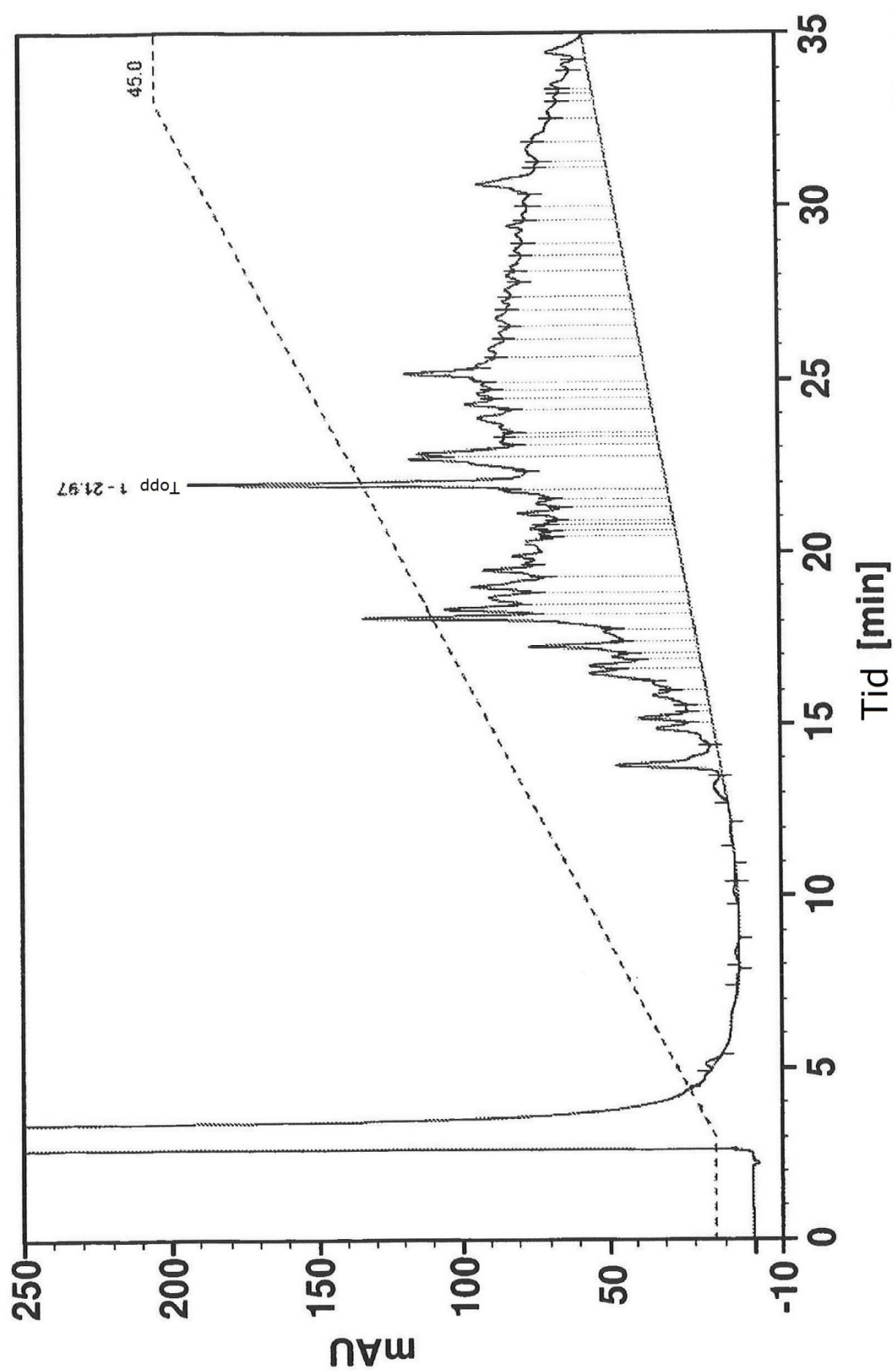
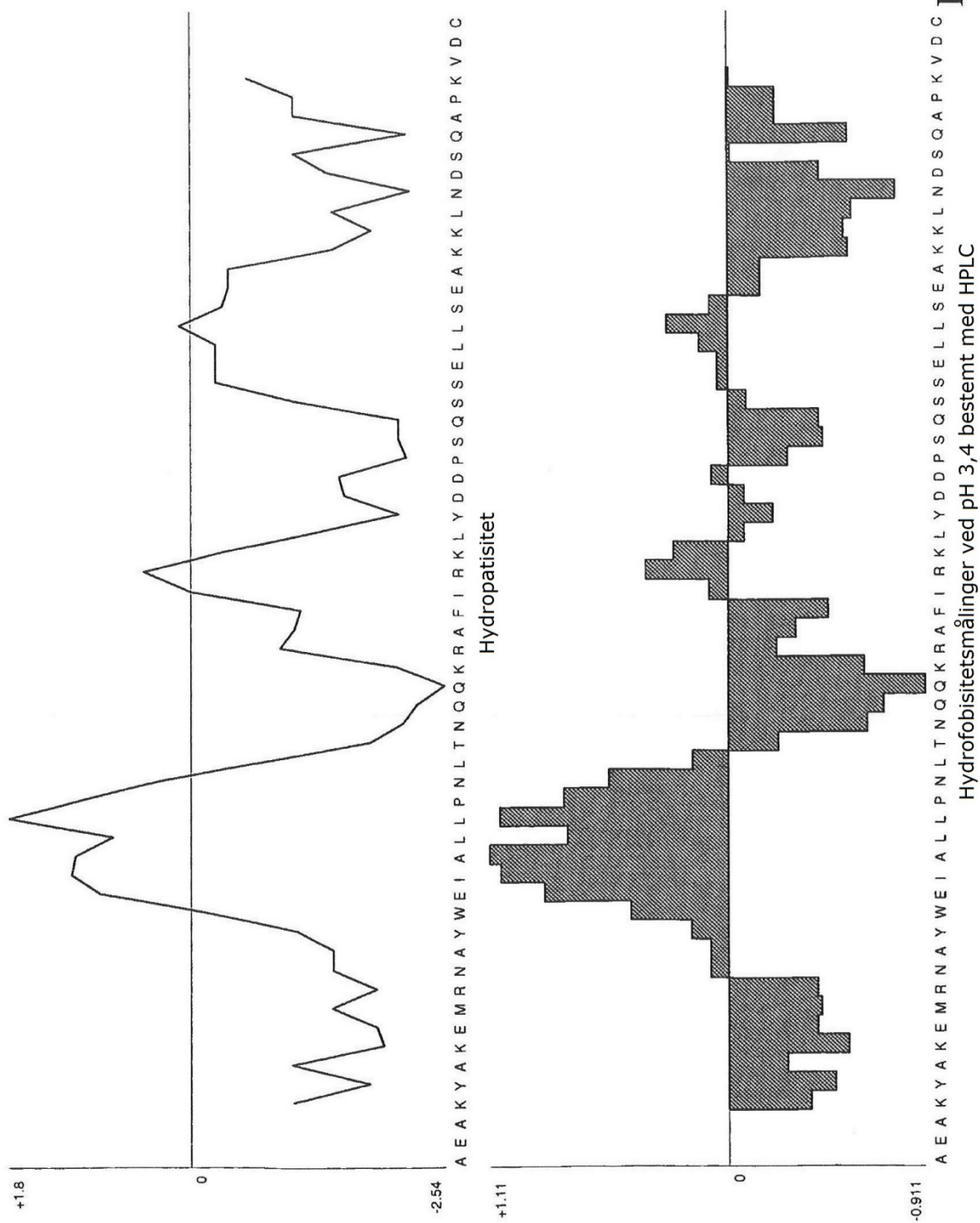


Fig. 12 B

**Fig. 13A**

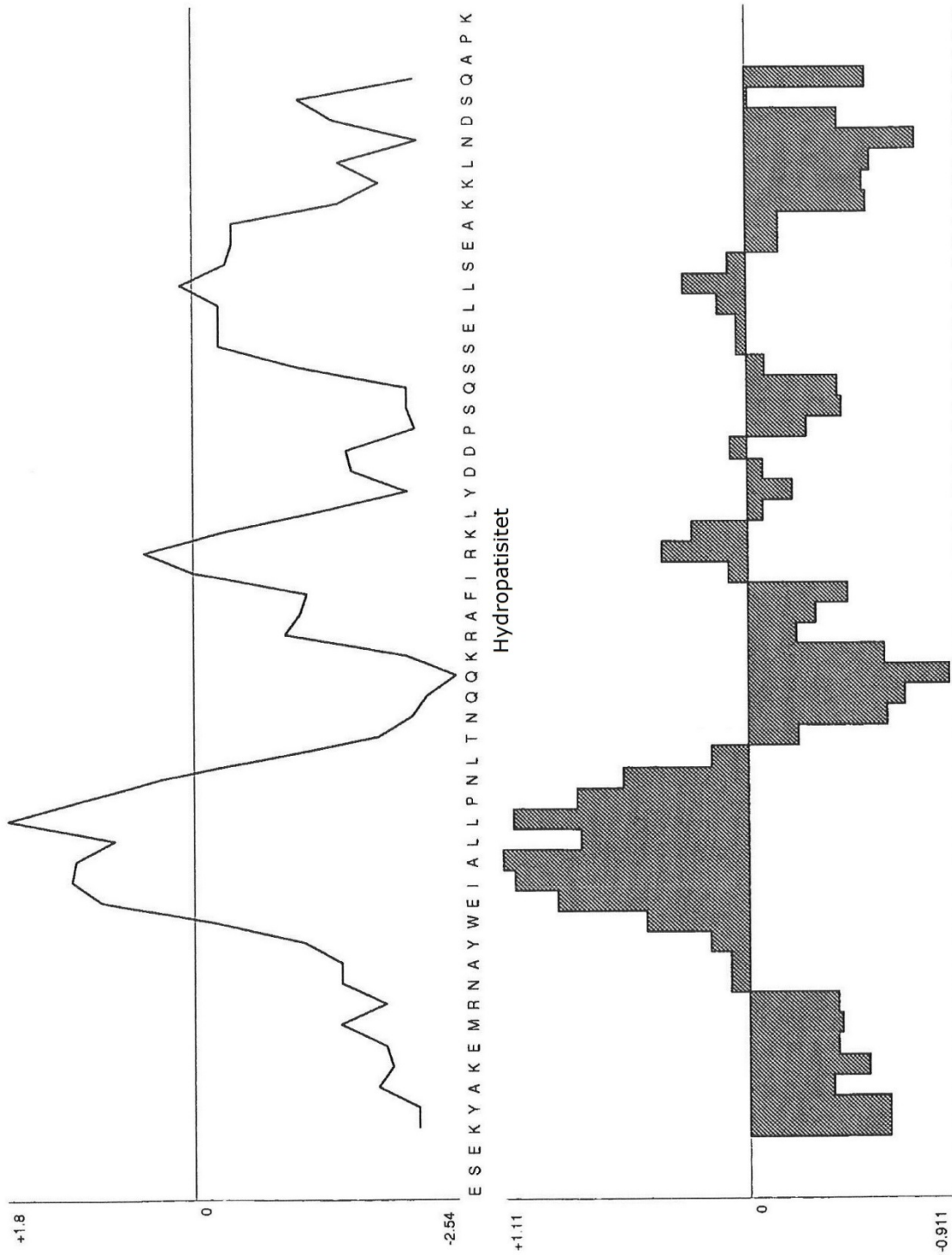
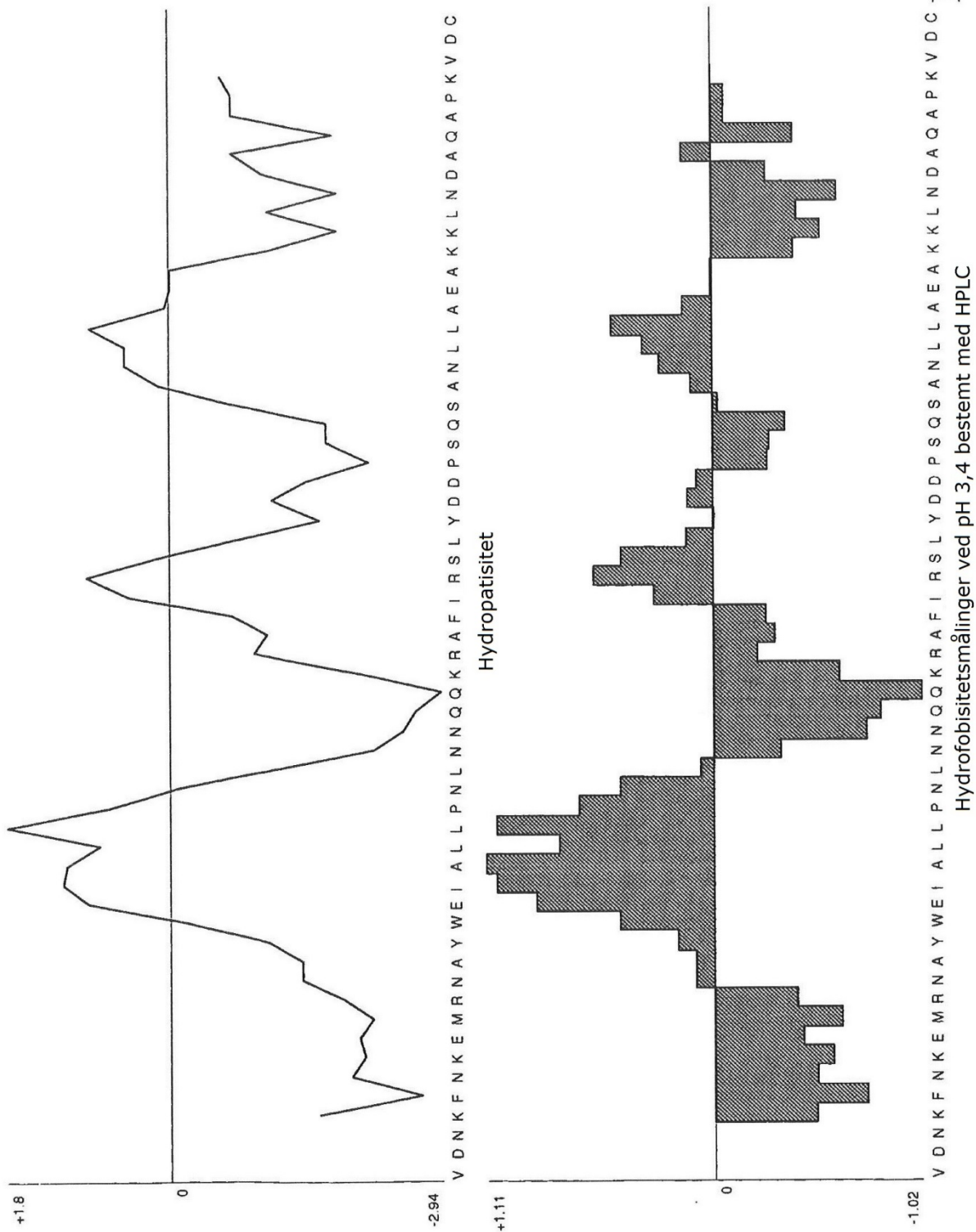


Fig. 13B
Hydrofobisitetmålinger ved pH 3,4 bestemt med HPLC

**Fig. 13C**

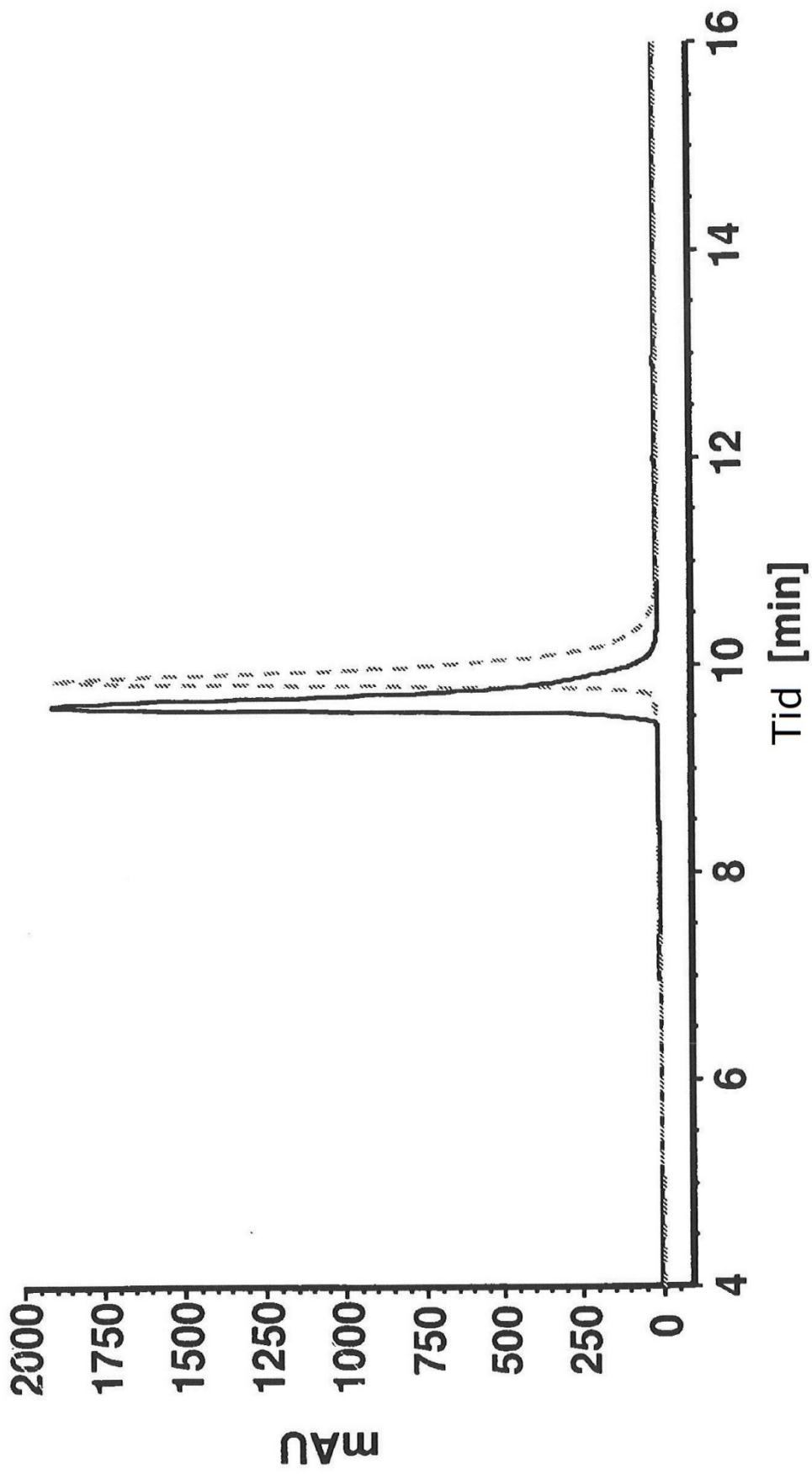


Fig. 14