



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **178341**

(13) **B**

(51) **Int Cl⁶ C 07 H 15/24**

Styret for det industrielle rettsvern

| | | | |
|---------------------|----------|--------------------------------------|----------------------|
| (21) Søknadsnr | 940675 | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer | |
| (22) Inng. dag | 25.02.94 | (85) Videreføringssdag | |
| (24) Løpedag | 02.08.88 | (30) Prioritet | 04.08.87, US, 81382 |
| (41) Alm. tilgj. | 06.02.89 | | 25.02.88, US, 161068 |
| (44) Utlegningsdato | 27.11.95 | | 29.06.88, US, 211301 |
| (62) Avdelt fra | 883414 | | |

(71) Patentsøker
(72) Oppfinner
(74) Fullmektig

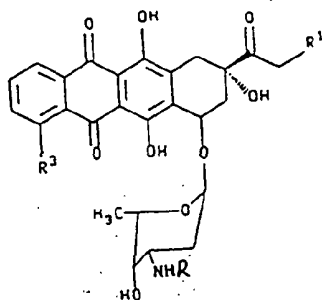
Bristol-Myers Squibb Co, 345 Park Avenue, New York, NY 10154, US
Peter D. Senter, Seattle, WA, US
Mark G. Saulnier, Middletown, CT, US
Joseph P. Brown, Seattle, WA, US
David E. Kerr, Seattle, WA, US
Tandbergs Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** **Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive anthracyclinderivater**

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

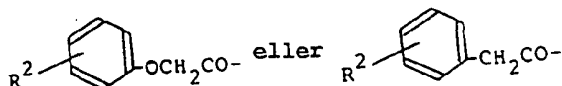
(57) **Sammendrag**

Anthracyclinderivater som har formelen



hvori

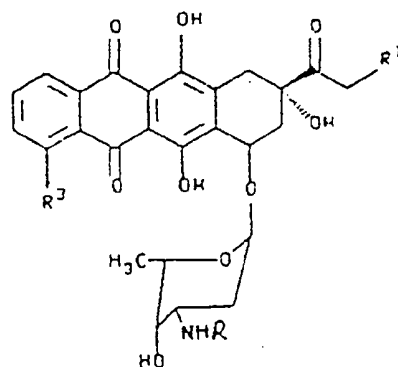
R er gruppen



R¹ er H, og R³ er OH eller OCH₃, eller
R¹ er OH, og R³ er OCH₃, og
R² er H eller OH, er beskrevet. Forbindelsene utviser terapeutisk aktivitet. Fremstilling av forbindelsene er beskrevet.

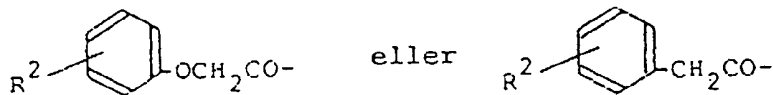
Foreliggende oppfinnelse angår en analogifremgangsmåte for fremstilling av hittil ukjente, terapeutisk aktive anthracyclinforbindelser som er prolegemidler. Et tumorspesifikt antistoff-enzymkonjugat som bindes til tumorcellene administreres, og ytterligere administrering av prolegemidlet omdanner dette i tumorområdet i nærvær av det antistoff-bundne enzym til et aktivt cytotoxisk legemiddel. Antistoff-enzymkonjugatene og prolegemidlene fremstilt ifølge oppfinnelsen løser mange av de ulemper ved de antistoff-formidlende legemiddelfremføringssystemer som for tiden anvendes for behandling av cancer og andre tumorer.

Oppfinnelsen angår således en analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt anthracyclinderivat av formelen



hvor

R er gruppen

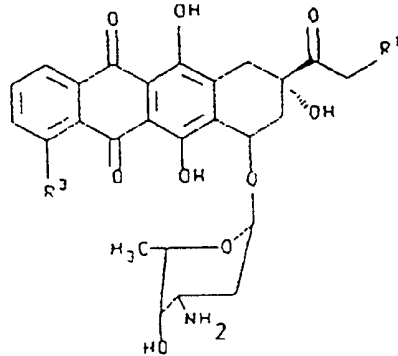


R¹ er H, og R³ er OH eller OCH₃, eller

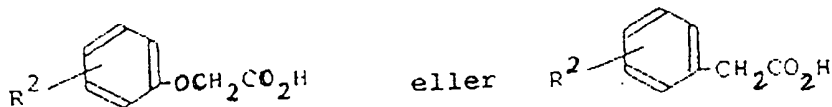
R¹ er OH, og R³ er OCH₃, og

R² er H eller OH,

hvilken fremgangsmåte er kjennetegnet ved at en forbindelse av formelen



5 hvori R^1 og R^3 har den ovenfor angitte betydning, eller et syreaddisjonssalt derav, omsettes med en forbindelse av formelen



15
20 hvori R^2 har den ovenfor angitte betydning, eller en acylerende ekvivalent derav.

Anvendelse av immunokonjugater til selektiv fremføring av cytotoxiske midler til tumorceller ved behandling av cancer er kjent innen teknikken. Fremføring av cytotoxiske midler til tumorområdene er meget ønskelig, da systemisk administrering av disse midler ofte resulterer i tilintetgjørelse av normale celler i legemet, såvel som de tumorceller som søkes tilintetgjort. Ifølge de for tiden anvendte antitumor-legemiddelfremføringssystemer konjugeres et cytotoxisk middel med et tumorspesifikt antistoff under dannelse av et immunokonjugat som bindes til tumorcellene og derved "avleverer" det cytotoxiske middel i tumorområdet. Immunokonjugatene anvendt i disse målrettede systemer, omfatter antistoff-legemiddelkonjugater [se f.eks. R.W. Baldwin et al. "Monoclonal Antibodies For Cancer Treatment", Lancet, s. 603-05 (15. mars 1986)] og antistoff-toksinkonjugater [se f.eks. P.E. Thorpe "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" i Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical

Applications, A. Pinchere et al. (red.), s. 475-506 (1985)].

Både polyklonale antistoffer og monoklonale antistoffer er blitt anvendt i disse immunokonjugater [se f.eks.

- 5 K. Ohkawa et al. "Selective In Vitro And In Vivo Growth Inhibition Against Human Yolk Sac Tumor Cell Lines By Purified Antibody Against Human α -Fetoprotein Conjugated With Mitomycin C Via Human Serum Albumin", *Cancer Immunol. Immunother.*, 23, s. 81-86 (1986) og G.F. Rowland et al.
- 10 "Drug Localisation And Growth Inhibition Studies Of Vindesine-Monoclonal Anti-CEA Conjugates in A Human Tumor Xenograft", *Cancer Immunol. Immunother.*, 21, s. 183-87 (1986)]. De anvendte legemidler i disse immunokonjugater omfatter daunomycin (se f.eks. J. Gallego et al. "Preparation
- 15 Of Four Daunomycin-Monoclonal Antibody 791T/36 Conjugates With Anti-Tumor Activity", *Int. J. Cancer*, 33, s. 737-44 (1984) og R. Arnon et al. "In Vitro And In Vivo Efficacy Of Conjugates Of Daunomycin With Anti-Tumor Antibodies", *Immunological Rev.*, 62, s. 5-27 (1982)], methotrexat
- 20 [N. Endo et al. "In Vitro Cytotoxicity Of A Human Serum Albumin-Mediated Conjugate Of Methotrexate With Anti-MM46 Monoclonal Antibody", *Cancer Research*, 47, s. 1076-80 (1987)], mitomycin C [K. Ohkawa et al., supra], og vindesin [G.F. Rowland et al., supra]. De anvendte toksiner i
- 25 antistoff-toksinkonjugatene omfatter bakterielle toksiner slik som difterintoksin og plantetoksiner slik som ricin [se f.eks. F.L. Moolten et al. "Antibodies Conjugated to Patent Cytotoxins As Specific Antitumor Agents", *Immunol. Rev.*, 62, s. 47-73 (1982)].

- 30 Til tross for omfanget av forskningen rettet mot anvendelse av immunokonjugater til terapeutiske formål, er adskillige begrensinger forbundet med disse fremføringsmetoder, blitt tydelige [se f.eks. M.J. Embleton "Targeting Of Anti-Cancer Therapeutic Agents By Monoclonal Antibodies",
- 35 *Biochemical Society Transactions*, 14, s. 393-395 (615th Meeting, Belfast 1986)]. For det første er den store mengde legemiddel som det er nødvendig å fremføre til tumorcellen for å fremkalle tilintetgjørelse av cellen, ofte uoppnåelig på grunn av begrensninger som skyldes antallet av

tumor-assosierte antigener på overflaten av cellene, og antallet av legemiddelmolekyler som kan bindes til et gitt antistoffmolekyl. Denne begrensning har ført til anvendelse av kraftigere cytotoxiske midler slik som plantetoksiner i disse konjugater, og til utvikling av polymerbundne antistoff-legemiddelkonjugater med meget høye legemiddel-multiplisitetsforhold [se f.eks. P.E. Thorpe, supra, s. 475-506, og R.W. Baldwin et al. "Design And Therapeutic Evaluation of Monoclonal Antibody 791T/36 - Methotrexate Conjugates" i *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, s. 215-31 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]. Selv med store legemiddelmengdeforhold eller ved anvendelse av kraftige toksiner, utviser mange immunokonjugater imidlertid stadig sub-optimal cytotoxisk aktivitet og er ikke i stand til å fremkalle fullstendig tilintetgjørelse ved doser hvor alle tilgjengelige antigene steder er mettet.

For det annet er det åpenbart at den cytotoxiske aktivitet av et immunokonjugat ofte avhenger av den av antistoff-komponenten i konjugatet, formidlet opptagelse derav i tumorcellen [se f.eks. J.M. Lambert et al. "Purified Immunotoxins That Are Reactive With Human Lymphoid Cells", *J. Biol. Chem.*, 260 (nr. 22, s. 12035-12041 (1985))]. Denne internalisering er avgjørende når det anvendes et antistoff-legemiddelkonjugat hvor legemidlet har et intracellulært virkningsområde, eller når antistoff-toksin-konjugater anvendes. Hoveddelen av tumor-assosierte antigener, og således antistoff-legemiddel- eller antistoff-toksinkonjugater bundet til disse antigener, er imidlertid ikke internalisert. De konjugater som er internalisert, transporteres ofte til cellens lysosom hvor legemidlet eller toksinet nedbrytes [se E.S. Vitetta et al., *Science*, 238, s. 1098-1104 (1987)]. Selv om et antistoff-legemiddel- eller antistoff-toksinkonjugat kan utvise fremragende tumorbindingsegenskaper, kan konjugatet ikke desto mindre utvise begrenset cytotoxisk anvendelighet som følge av manglende evne til å nå sitt virkningsområde innen cellen.

Det er dessuten velkjent at tumorcellepopulasjoner ofte er heterogene med hensyn til antigen-ekspressjon [se f.eks. A.P. Albino et al. "Heterogeneity In Surface

Antigen and Glycoprotein Expression of Cell Lines Derived From Different Melanoma Metastases of The Same Patient", J. Exp. Med., 154, s. 1764-78 (1981)]. I tillegg er det blitt vist at antigen-positive tumorceller kan fremkalle antigen-negative avkom [se f.eks. M. Yeh et al. "Clonal Variation for Expression of a Human Melanoma Antigen Defined by a Monoclonal Antibody", J. Immunol., 126 (nr. 4), s. 1312-17 (1981)]. I enhver populasjon av tumorceller vil det således være et visst antall celler som ikke utviser det antigen for hvilket et bestemt immunokonjugat utviser spesifisitet. Immunokonjugatet vil derfor ikke kunne bindes til disse celler og formidle deres tilintetgjørelse.

Som følge av disse ulemper har de for tiden anvendte antitumor-legemiddel- eller toksinfremføringssystemer en begrenset suksess, særlig ved anvendelse til in vivo-behandling.

Foruten de ovenfor beskrevne immunokonjugater er antistoff-enzymkonjugater blitt undersøkt in vitro i kombinasjon med et annet ikke-målrettet enzym til omdannelse av jodid eller arsfenamin til de toksiske former derav, med henblikk på å forsterke antistoff-formidlet cytotoksisitet [se f.eks. C.W. Parker et al. "Enzymatic Activation and Trapping of Luminol-Substituted Peptides and Proteins. A Possible Means of Amplifying the Cytotoxicity of Anti-Tumor Antibodies", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 (nr. 1), s. 338-42 (1975), og G.W. Philpott et al. "Affinity Cytotoxicity of Tumor Cells With Antibody-Glucose Oxidase Conjugates, Peroxidase, and Arspheamine", Cancer Research, 34, s. 2159-64 (1974)].

Ifølge disse in vitro-undersøkelser bindes enzymet gluco-oxydase til et antistoff og anvendes i kombinasjon med et ikke-målrettet peroxydaseenzym for å omdanne jodid eller arsfenamin til hhv. cytotoksisk jod eller arsenikk. Denne metode krever derfor ikke bare at gluco-oxydase målrettes mot tumorceller med antistoff, men også nærvær i tumorområdet av to andre ikke-målrettede midler. Sannsynligheten for at samtlige tre midler in vivo vil finnes i tumorområdet på samme tid, er liten, og det er derfor usann-

synlig at denne metode blir av terapeutisk betydning.

I kanadisk patentskrift 1.216.791 beskrives konjugering til et antistoff av et enzym som kan frigjøre ammoniumioner fra substratet. Ammoniumioner avgis for å styrke den cytotoxiske virkning av immunotoksiner målrettet mot tumorområdet.

Sluttelig omhandler Europapatentsøknad nr. 84302218.7 en fremgangsmåte for behandling av en sykkelig cellepopulasjon slik som en tumor, ved hvilken fremgangsmåte et antistoff anvendes til å rette et ikke-metabolisert antigen mot tumorcellene. Antigenet akkumuleres innen i det minste en prosentdel av tumorcellene som deretter lyseres under frigjørelse av antigenet i en ubikvitær fibronektin-oppfangelsesmatrise dannet i tumorområdet. På dette tidspunkt administreres ved metoden ifølge denne oppfinnelse en jodholdig ligand som er spesifikk for, og som vil bindes til det til matrisen bundne antigen. Det cytotoxiske jod reagerer deretter til tilintetgjørelse av tumorcellene på dette sted. Det er beskrevet mange utførelsesformer i denne søknad, og en av disse foreslår anvendelse av et antistoff-enzymkonjugat til å målrette enzymet mot tumorområdet, og tilsetning av et ikke-letalt substrat som enzymet kan omdanne til et cytotoxiske materiale [se angitte Europapatentsøknad side 34-35]. I søknaden er det imidlertid ikke noe sted beskrevet hvordan denne utførelsesform skal utøves. Tilsvarende foreslår Hellstrom et al. "Antibodies For Drug Delivery" i Controlled Drug Delivery (2. utg.), Robinson og Lee (red.), s. 639 (1987), at "[d]rugs which would be non-toxic until 'activated' by an agent (e.g. an enzyme) localized to tumor may be considered as another approach".

Hittil har imidlertid ingen beskrevet eller angitt hvordan foreliggende metode kan utføres, eller har forsøkt å utøve denne legemiddel-målretningsmetode.

De ovenfor angitte problemer avhjelpest ved fremføring av cytotoxiske midler til tumorceller ved kombinert anvendelse av antistoff-enzymkonjugater og de fremstilte prolegemidler. Et enzym som kan omdanne et i liten grad cytotoxiske

eller et ikke-cytotoksisk prolegemiddel til et aktivt cytotoksisk legemiddel konjugeres med et tumorspesifikt antistoff. Dette antistoff-enzymkonjugat administreres til en tumorbærende pattedyrvert og bindes som følge av antistoff-spesifisiteten til overflaten av disse tumorceller som utviser tumorantigenet mot hvilket antistoffets spesifisitet er rettet. Prolegemidler fremstilt ifølge oppfinnelsen administreres deretter til verten og omdannes i tumorområdet ved innvirkning av det antistoff-bundne enzym til et mer aktivt cytotoksisk legemiddel.

Oppfinnelsen belyses nærmere i det etterfølgende i forbindelse med tegningene hvori

figur 1 avbilder den strategi til aktivering av prolegemidler ved tumorceller som binder antistoff-enzymkonjugater.

Figur 2 avbilder den kjemiske struktur av et adriamycin-prolegemiddel ("APO") og dets fremstilling fra adriamycin.

Figur 3 er en sammenlignende grafisk fremstilling av den prosentvise adriamycin-frigjørelse mot tiden ved omsetning av APO med Δ : fritt penicillin V amidaseenzym eller \circ og \square : L6-PVA-konjugatet ved i alt hhv. 10 og 100 μg protein/ml. Reaksjonens forløp ble registrert med HPLC.

Figur 4 avbilder en sammenligning mellom bindingen av det monoklonale antistoff L6 og L6-PVA- og 1F5-PVA-konjugatene til H2981 tumorceller.

Figur 5 er en sammenlignende grafisk fremstilling av den prosentvise inhibering av ^3H -thymidin-inkorporering i DNA av H2981 tumorceller behandlet med \circ : adriamycin (ADM), \bullet : APO, Δ : L6-PVA+APO eller \blacktriangle : 1F5-PVA+APO. Kurven avbilder den iakttatte økning i cytotoksisk aktivitet når tumorcellene ble penetrert med L6-PVA-konjugatet, etterfulgt av APO-behandling, sammenlignet med aktiviteten som ble iaktatt ved behandling med APO alene.

Figur 6 avbilder en sammenligning mellom bindingen av de monoklonale antistoffer L6 og 1F5 og L6-PVA- og 1F5-PVA-konjugatene til Daudi lymfomaceller.

Figur 7 er en sammenlignende grafisk fremstilling av den prosentvise inhibering av ^3H -thymidin-inkorporering i DNA av Daudi lymfomaceller behandlet med ● : ADM, ○ : APO.

■ : L6-PVA+APO eller □ : 1F5-PVA+APO. Kurven avbilder den iakttatte økning i cytotoksisk aktivitet når tumorcellene ble penetrert med 1F5-PVA-konjugatet, etterfulgt av APO-behandling, sammenlignet med den cytotoksiske virkning som ble iaktatt etter behandling av cellene med APO alene.

Antistoff-enzymkonjugat som administreres

til en tumorbærende pattedyrvert, består av et tumorspesifikt antistoff som er bundet til et enzym som kan omdanne et prolegemiddel som er mindre cytotoksisk overfor tumorceller enn stamlegemidlet, til det mer aktive stamlegemiddel. Ved administrering til en vert fører antistoff-komponenten i konjugatet, hvilken komponent er reaktiv overfor et antigen som finnes på tumorcellene, konjugatet til tumorområdet og binder seg til tumorcellene. Antistoffet kan derfor betraktes som et middel til fremføring av enzymet til tumorområdet. Et prolegemiddel som er et substrat for enzymet, administreres deretter til verten og omdannes av enzymet i tumorområdet til et aktivt cytotoksisk legemiddel. Legemidlet aktiveres således ekstracellulært og kan diffundere inn i alle tumorceller i dette område, dvs. de celler som bærer det bestemte tumor-antigen overfor hvilket antistoffet i konjugatet utviser spesifisitet, og til hvilket antistoffet er bundet, såvel som de celler som er negative med hensyn til dette antigen, men ikke desto mindre forefinnes i tumorområdet (se fig. 1). Problemet med tumor-antigen-heterogenitet og kravet om antigen/konjugat-internalisering forbundet med konvensjonelle immunkonjugat-legemiddelfremføringsmetoder er derfor løst.

Da det ikke kreves at legemidlet bindes direkte til antistoffet og derved begrenser mengden av legemiddel som kan fremføres, oppstår ikke det generelle problem med legemiddelstyrke i tumorområdet. I realiteten øker fremføringsmetoden antallet av aktive legemiddelmolekyler som finnes i tumorområdet, da det antistoff-bundne enzym i konjugatet kan utføre tallrike substratomdannelser idet prolegemidlene gjentatte ganger omdannes til aktivt legemiddel. I tillegg er frem-

føringsmetoden i stand til spesifikt å frigjøre det aktive legemiddel i tumorområdet i motsetning til frigivelse i andre vev. Dette er tilfelle fordi enzymkonsentrasjonen i tumorområdet er høyere enn konsentrasjonen i andre vev som følge av
5 belegning av tumorcellene med antistoff-enzymkonjugatet.

Antistoffkomponenten i slike immunokonjugater omfatter ethvert antistoff som spesifikt bindes til et tumor-assosiert antigen. Eksempler på slike antistoffer omfatter, men er ikke begrenset til, slike antistoffer som spesifikt bindes til antigener som finnes på
10 carcinoma, melanoma, lymfoma og sarcoma i knokler og bløtt vev, såvel som andre tumorer. Antistoffer som forblir bundet til celleoverflaten i lengre tidsrom, eller som internaliserer meget langsomt, foretrekkes. Disse antistoffer kan være polyklonale eller fortrinnsvis monoklonale,
15 kan være intakte antistoffmolekyler eller fragmenter inneholdende det aktive bindingsområde av antistoffet, f.eks. Fab eller $F(ab')_2$, og kan fremstilles under anvendelse av kjente metoder innen faget [se f.eks. R.A. DeWeger et al.
20 "Eradication Of Murine Lymphoma And Melanoma Cells By Chlorambucil-Antibody Complexes, Immunological Rev., 62, s. 29-45 (1982) (tumor-spesifikke monoklonale antistoffer fremstilt og anvendt i konjugater), M. Yeh et al. "Cell Surface Antigens Of Human Melanoma Identified By Monoclonal
25 Antibodies", Proc. Natl. Acad. Sci., 76, s. 2927 (1979), J.P. Brown et al. "Structural Characterization Of Human Melanoma-Associated Antigen p97 with Monoclonal Antibodies", J. Immunol., 127 (nr. 2), s. 539-546 (1981) (fremstilling av tumor-spesifikke, monoklonale antistoffer), og J.P. Mach
30 et al. "Improvement Of Colon Carcinoma Imaging: From Polyclonal Anti-CEA Antibodies And Static Photoscanning to Monoclonal Fab Fragments And ECT", i Monoclonal Antibodies for Cancer Detection And Therapy, R.W. Baldwin et al. (red.), s. 53-64 (Academic Press 1985) (fremstilling av
35 antistofffragmenter og anvendelse derav til lokalisering av tumorceller)]. Hvis monoklonale antistoffer anvendes, kan antistoffene dessuten være av museopprinnelse eller human opprinnelse, eller være kimære antistoffer [se f.eks. V.T. Oi "Chimeric Antibodies", BioTechniques, 4, (nr. 3),

s. 214-221 (1986)].

Enzymkomponenten i slike immunokonjugater omfatter ethvert enzym som er i stand til å innvirke på et prolegemiddel på en slik måte at det omdannes til dets mer aktive, cytotoksiske form. Uttrykket "prolegemiddel" betegner her en forløper for, eller en derivatform av et farmasøytisk aktivt stoff, hvilken forløper eller derivatform i sammenligning med stamlegemidlet er mindre cytotoksisk overfor tumorceller og er i stand til enzymatisk å bli aktivert eller omdannet til den mer aktive stamform [se f.eks. D.E.V. Wilman "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions, 14, s. 375-382 (615th Meeting, Belfast 1986) og V.J. Stella et al. "Prodrugs: A Chemical Approach To Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, R. Borchardt et al. (red.), s. 247-267 (Humana Press 1985)].

Enzymer som er anvendbare ved fremføringsmetoden, omfatter penicillin-amidaser slik som penicillin V amidase og penicillin G amidase, som er anvendbare til omdannelse av legemidler som er derivatisert ved deres aminnitrogenatomer med hhv. fenoksyacetyl eller fenylacetyl, til frie legemidler.

I henhold til det ovenfor angitte ble et penicillin-amidase-enzym kovalent bundet til det monoklonale L6 anti-stoff, og det resulterende immunokonjugat ble anvendt til å omdanne et hittil ukjent adriamycin-prolegemiddel fremstilt ifølge oppfinnelsen til det aktive antitumorlegemiddel adriamycin. Den bestemte anvendte amidase var en fra *Fusarium oxysporum* isolert penicillin V amidase ("PVA") som hydrolyserer fenoksyacetylamid-bindinger. Således var det særlig anvendte prolegemiddel N-(p-hydroxyfenoksyacetyl)-adriamycin ("APO"), som ble hydrolysert av amidasen under frigivelse av det kraftige anti-tumormiddel adriamycin. L6-PVA-immunokonjugatet utviste ikke noe tap av enzymatisk aktivitet ved sammenligning med aktiviteten av det ukonjugerte enzym, og det meste av bindingsaktiviteten av L6-anti-stoffet ble bibeholdt i konjugatet.

Ifølge de utførte in vitro-undersøkelser resulterte behandling av humane lungetumorceller med L6-PVA-konjugatet, etterfulgt av at cellene ble utsatt for APO-prolegemidlet,

i en cytotoxissitet som kunne sammenlignes med cytotoxissiteten som ble oppnådd ved behandling av cellene med adriamycin alene. Det er viktig å merke seg at APO-prolegemidlet alene utviste langt lavere cytotoxissitet mot tumorcellene.

5 Tilsvarende in vitro-undersøkelser ble også utført under anvendelse av et 1F5-PVA-konjugat hvori PVA-enzymet var konjugert med 1F5 som er et monoklonalt antistoff som reagerer med et antigen som finnes på lymfocytter. Behandling av Daudi lymfocytter med 1F5-PVA-konjugatet, etterfulgt av at cellene ble utsatt for APO, resulterte i 10 en cytotoxissitet som kunne sammenlignes med cytotoxissiteten oppnådd ved behandling med adriamycin alene, mens behandling av celler med APO alene resulterte i meget liten cytotoxissitet.

15 Selv om syntesen og anvendelsen av det hittil ukjente adriamycin-prolegemiddel, N-(p-hydroxyfenoxyacetyl)-adriamycin, er beskrevet her, er det åpenbart at foreliggende oppfinnelse omfatter syntese og anvendelse av andre beslektede adriamycin-prolegemidler som kan derivatiseres på hovedsakelig samme måte. Prolegemidlet 20 N-(fenoxyacetyl)-adriamycin faller eksempelvis også inn under oppfinnelsens ramme, idet prolegemidlet kan syntetiseres under anvendelse av den her beskrevne forskrift ved å erstatte reaktanten p-hydroxyfenoxyeddiksyre (se eksempel 4 25 i det etterfølgende) med fenoxyeddiksyre. Det er dessuten åpenbart at adriamycin-prolegemidlene ifølge oppfinnelsen omfatter andre N-hydroxyfenoxyacetylderivater av adriamycin, f.eks. derivater substituert i forskjellige stillinger av fenylingen, såvel som N-fenoxyacetylderivater.

30 Foreliggende utførelsesform omfatter enn videre anvendelsen av andre amidaser slik som penicillin G amidase som enzymkomponent i immunokonjugatet. Når en penicillin G amidase eksempelvis anvendes som enzym, bør prolegemidlet inneholde en fenylacetylamid-gruppe (i motsetning til fenoxyacetylamid-gruppen i APO), da penicillin G amidase hydrolyserer denne type amidbinding [se f.eks. A.L. Margolin et al., Biochim. Biophys. Acta, 616, s. 283-89 (1980)]. Andre prolegemidler fremstilt ifølge oppfinnelsen omfatter således 35 N-(p-hydroxyfenylacetyl)-adriamycin, N-(fenylacetyl)-

adriamycin og andre eventuelt substituerte N-fenylacetylderivater av adriamycin.

Oppfinnelsen beskrives ytterligere i det etterfølgende eksempel.

5

Eksempel

Foreliggende eksempel illustrerer fremstilling av antistoff-enzymkonjugater og fremstilling av prolegemidler ved analogifremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, samt omdannelse av et relativt ikke-cytotoksisk prolegemiddel til et aktivt anti-tumormiddel som utviser in vitro cytotoxicitet mot tumor-celler. I overensstemmelse med dette eksempel ble det anvendt et L6-penicillin V amidase (i det etterfølgende angitt som "PVA")-immunokonjugat til å omdanne et N-fenoxyacetylderivat av adriamycin til det kjente anti-tumormiddel adriamycin.

15

Fremstilling av antistoff-penicillin V amidasekonjugater

I overensstemmelse med foreliggende eksempel ble et L6-PVA-immunokonjugat og et 1F5-PVA-konjugat fremstilt. L6 er et monoklonalt antistoff av IgG2a-undersklassen, hvilket antistoff er spesifikt for og bindes til et glycoprotein-antigen på humane lungecarcinomaceller [se I. Hellstrom et al. (1986), supra]. 1F5 er et monoklonalt IgG2a antistoff som er spesifikt for CD-20-antigener på normale og neoplastiske B-celler [se E.A. Clark et al., "Role Of The Bp35 Cell Surface Polypeptide In Human B-Cell Activation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, s. 1766-70 (1985)]. L6-hybridomet som danner det monoklonale L6 antistoff, er deponert ved American Type Culture Collection (ATCC) under deponeringsnr. HB8677 i forbindelse med innlevering av Europapatentsøknad nr. 207963. 1F5-hybridomet som danner det monoklonale 1F5-antistoff, er deponert ved ATCC den 12. februar 1988 under deponeringsnr. HB9645. Det anvendte amidaseenzym var en penicillin V amidase isolert fra en soppkultur av *Fusarium oxysporum* i overensstemmelse med fremgangsmåtene beskrevet av D.A. Lowe et al., "Enzymatic Hydrolysis of Penicillin V to 6-aminopenicillanic Acid by *Fusarium oxysporum*", Biotechnology Letters, 8 (3), s. 151-156 (1986). *Fusarium oxysporum*-stammer hvorfra dette enzym kan isoleres, er deponert ved ATCC. PVA er således et letttilgjengelig

30
35

enzym som omdanner penicillin-V til pencillansyre. Nærmere bestemt hydrolyserer PVA fenoksyacetamidbindingen i penicillin-V under dannelse av pencillansyre. Enzymet som reagerer med fenoksyacetamider, kan derfor anvendes til spaltning av prolegemidler av kjente cytotoxiske midler som er derivatisert med fenoksyeddiksyre eller p-hydroxy-fenoksyeddiksyre.

Antistoff-PVA-konjugatene fremstilles ved kovalent å binde prolegemidlet til de monoklonale antistoffer L6, 96,5 eller 1F5 via en thioetherbinding under anvendelse av en fremgangsmåte svarende til metoden som er beskrevet i J.M. Lambert et al., "Purified Immunotoxins That Are Reactive With Human Lymphoid Cells", J. Biol. Chem., 260 (nr. 22), s. 12035-12041 (1985). Antistoffene L6 og 1F5 ble omsatt med iminothiolan som beskrevet, og antallet av innførte sulfhydrylgrupper i hvert av antistoffene ble bestemt til mellom 1 og 2, under anvendelse av Ellmans reagens [se P.W. Riddles et al., "Ellman's Reagent: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoid Acid)-A Reexamination", Analytical Biochemistry, 94, s. 75-81 (1979)].

En 9 mg/ml løsning av PVA-enzymet ble deretter fremstilt i PBS og ble behandlet med SMCC (succimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat, 100 mM i DMF), slik at sluttkonsentrasjonen var 5 mM. Behandling med SMCC innførte maleimidogruupper i enzymet. Etter 30 minutter ved 30°C ble det modifiserte enzym rensset ved gelfiltrering på "G-25 PD-10 Sephadex" og ble eluert med PBS. Det modifiserte PVA ble deretter tilsatt til en løsning av hvert av de thiolerte antistoffer i et molforhold på 3:1. Hver reaksjonsblanding ble mettet med nitrogen og fikk stå ved romtemperatur i 3 timer og ble deretter inkubert ved 4°C i ytterligere 18 timer. På dette tidspunkt ble det tilsatt 2-aminoethanthiol (sluttkonsentrasjon 1 mM) til hver løsning for blokkering av eventuelt ytterligere uomsatte maleimider.

Hver reaksjonsblanding ble deretter ført gjennom en gelfiltreringskolonne ("G-25") under eluering med 20 mM Tris, pH 7,2, med 50 mM NaCl. De resulterende blandinger ble rensset på "DEAE Sephadex"-kolonner (2,5 x 10 cm).

Fraksjonene ble overvåket ved 280 nm. Det uomsatte anti-stoff i hver blanding ble ikke bundet til kolonnen, og konjugatet og uomsatt PVA ble eluert med 20 mM Tris, pH 7,2, med 0,5 M NaCl. Fraksjonene inneholdende PVA og konjugat, ble deretter konsentrert under anvendelse av et "Amicon YM-30"-ultrafiltreringsfilter og ble rensset på en "Sephacryl S-300"-kolonne (2,5 x 95 cm) under eluering med PBS. Fraksjonene ble overvåket ved 280 nm, og de fraksjoner som inneholdt rent konjugat ifølge bestemmelse ved SDS-PAGE (4-12% gradientgel), ble forenet.

Fremstilling av et hittil ukjent adriamycin-prolegemiddel

Hvert av de ovenfor fremstilte antistoff-PVA-konjugater ble omsatt deretter med et hittil ukjent adriamycin-prolegemiddel. Nærmere bestemt var det anvendte prolegemiddel N-(p-hydroxyfenoxyacetyl)-adriamycin (i det etterfølgende angitt som "APO"), hvor aminogruppen i sukkerdelen av adriamycin er acylert med p-hydroxyfenoxyeddiksyre som angitt i figur 2.

Dette adriamycin-prolegemiddel ble fremstilt som følger:

Til 10 ml tetrahydrofuran ble det tilsatt 84 mg (0,5 mmol) p-hydroxyfenoxyeddiksyre, 57 mg (0,5 mmol) N-hydroxysuccinimid og 100 mg (0,49 mmol) dicyclohexylcarbodiimid. Denne blanding ble omrørt i 2 timer, hvorefter løsningen ble filtrert og filtratet ble tilsatt til 200 mg (0,35 mmol) adriamycin-hydroklorid. 0,1 ml triethylamin ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og omrøringen ble fortsatt i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter filtrert gjennom glassull og ble inndampet til et residuum under høyvakuum. Den resulterende blanding ble rensset på en "Silicagel 60"-kolonne (2,5 x 20 ml) under eluering med 95:5 diklormethan:methanol. De forenede fraksjoner ble igjen rensset på samme type kolonne, hvorved det ble erholdt 70 mg (0,1 mmol, 30% utbytte) rent N-(p-hydroxyfenoxyacetyl)-adriamycin.

FAB MS m/e 694,2125 (M+H)⁺. Beregnet for
C₃₅H₃₆NO₁₄, 694,2136. 360 MHz ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1,06
(d, 3H, sukker CH₃), 1,5-2,2 (m, 6H, sukker H), 3,0 (q, 2H),
4,0 (s, 3H, OCH₃), 4,35 (s, 2H, COCH₂O), 4,8-5,0 (m, 3H),
5,2 og 5,4 (s, 1H), 6,6-6,8 (dd, 4H, fenoxo Arh), 7,4-7,9
(m, 3H, 2,3,4-H), 9,0 (s, 1H, Ar'OH), 11,61 og 12,39 (s,
1H, ArOH).

Det vil være åpenbart at andre fenoxycetylamid-
derivater av adriamycin kan fremstilles ved hovedsakelig
å anvende samme fremgangsmåte som ovenfor beskrevet. Eks-
empelvis kan N-(fenoxycetyl)-adriamycin fremstilles som
ovenfor beskrevet ved å erstatte p-hydroxyfenoxyceddiksyre
med 0,5 mmol (76 mg) fenoxyceddiksyre.

Omsetning av et antistoff-penicillin V amidasekonjugat med
et adriamycin-prolegemiddel

Evnen hos antistoff-PVA-konjugatet, L6-PVA, til å
omdanne det hittil ukjente prolegemiddel APO til adriamycin
ble bestemt som følger: enten ble det tilsatt a) PVA alene
(sluttkonsentrasjon: 50 µg/ml), b) 100 µg/ml L6-PVA-
konjugat (PVA-sluttkonsentrasjon: 25 µg/ml) eller
c) 10 µg/ml L6-PVA (PVA-sluttkonsentrasjon: 2,5 µg/ml) til
en løsning av APO (0,1 mM) i PBS. Hver reaksjon ble over-
våket ved hjelp av HPLC under anvendelse av en "Phenominex
C-18"-kolonne (3 µm, 4,5 x 100 mm) og gradienteluering med
20-60% tetrahydrofuran i vann med 0,1% H₃PO₄ (1,0 ml/minutt,
påvisning ved 495 nm). Under disse betingelser ble
adriamycinet eluert etter 8,9 minutter, og APO ble eluert
etter 12,2 minutter. Resultatene fremgår fra figur 3:

Som det fremgår fra figuren, ble amidgruppen i APO
hydrolysert ved hjelp av PV, hvilket fremgår av dannelsen
av adriamycin. Under de anvendte betingelser var halverings-
tiden for hydrolyse av APO ved hjelp av PVA ca. 20 minutter.
Enn videre viste det seg at innen 40 minutter fra reak-
sjonens start kunne både enzymet alene og antistoff PVA-
konjugatet bevirke hydrolyse av minst 80% av APO til
adriamycin. 10 µg/ml (2,5 µg/ml PVA) kunne bevirke hydrolyse
i denne størrelsesorden i løpet av 120 minutter. Endelig
fremgår det tydelig fra disse undersøkelser at antistoff-

PVA-konjugatet ifølge oppfinnelsen ikke utviste noe tilsynelatende tap av enzymatisk aktivitet som følge av bindingen av enzymet til antistoffet, hvilket fremgår av at konjugatet og det frie enzym utviste like egenskaper med hensyn til hydrolysering av APO til adriamycin.

Serumstabilitet av det hittil ukjente adriamycin-prolegemiddel

Stabiliteten av APO i humant serum ble bestemt under anvendelse av HPLC og måling av hastigheten for APO's forsvinning og hastigheten for dannelse av adriamycin. En løsning av APO (10 mM i dimetylformamid) ble således tilsatt til friskt, humant serum slik at sluttkonsentrasjonen var 0,1 mM. Aliquoter (50 µl) ble fortynnet med methanol (50 µl) for utfelling av serumproteiner. Disse prøver ble deretter sentrifugert og analysert ved hjelp av HPLC som beskrevet ovenfor. I løpet av 2 timer forekom ingen hydrolyse av APO til adriamycin.

Binding av antistoff-PVA-konjugatene til H2981-tumorceller

Evnen hos L6-PVA- og LF5-PVA-konjugatene ifølge oppfinnelsen til å bindes til H2981-tumorceller ble målt som følger: Immunokonjugatene eller de frie antistoffer ble seriefortynnet i modifisert Dulbeccos ufullstendige medium (IMDM), og 100 µl aliquoter ble inkubert ved 4°C med 10⁶ 30 minutter. Cellene ble vasket og inkubert med 50 µl FITC-geite-anti-muse-antistoff (fortynnet 1:12,5) i ytterligere 30 minutter ved 4°C. Cellene ble vasket og analysert på en "Coulter Epics-C"-celle-fluorescensanalysator. Døde celler ble utelukket, og den logaritmiske middelerdi for den grønne fluorescensintensitet hos hver prøve ble beholdt. Dette tall ble omdannet til en lineær skala, og forhold mellom den negative kontroll (celler + FITC-geite-anti-muse-antistoff) og alle testprøver ble beregnet. Resultatene av bindingsprøven er avbildet i figur 4.

FACS-analyse indikerer at både L6- og L6-PVA-konjugatet utviste kraftig binding til tumorcellene, mens LF5-PVA-konjugatet ikke utviste binding av noen signifikant størrelsesorden. Denne bindingsundersøkelse indikerer for det første at konjugeringen til enzymet ikke på noen

vesentlig måte påvirket bindingsevnen hos antistoffkomponenten i immunokonjugatene. For det andre demonstrerer denne prøve igjen spesifisiteten av bindingen av konjugatene, idet L6-PVA-konjugatet bindes til de L6-positive H2981-tumorceller, og
5 1F5-PVA-konjugatet som følge av den manglende spesifisitet hos 1F5-antistoffet for tumorcellene, hovedsakelig ikke utviser noen binding.

In vitro-cytotoksisitet av antistoff-PVA-konjugat/adriamycin-prolegemiddelkombinasjonen på H2981-tumorceller

Den in vitro cytotoksiske virkning av antistoff-PVA/adriamycin-prolegemiddelkombinasjonen mot H2981-tumorceller ble målt under anvendelse av en ³H-thymidin-opptagelsesprøve. I korthet ble H2981-tumorceller anbrakt på mikro-
15 titerplater inneholdende 96 brønner i IMDM (10.000 celler/brønn) og fikk stå for å bli bundet i 18 timer ved 37°C. Antistoff-PVA-konjugatene, L6-PVA eller 1F5-PVA, ble deretter tilsatt i en konsentrasjon på 10 µg/ml antistoff, og platene ble inkubert i 30 minutter ved 4°C.
20 Brønnene ble deretter vasket 4 ganger med IMDM, og APO ble tilsatt i forskjellige konsentrasjoner i IMDM. Etter 2 timer ble brønnene igjen vasket, IMDM ble tilsatt, og cellene fikk stå i 18 timer ved 37°C. På dette tidspunkt ble ³H-thymidin (1 µCi/brønn) tilsatt, og etter 6 timer ble
25 platene nedfrost ved -70°C for å løsne cellene. Etter opp-tining ble cellene høstet på glassfiberfiltre. Inkorporering av ³H-thymidin ble målt under anvendelse av en "Beckman 3801"-scintillasjonsteller og ble sammenlignet med celler behandlet med APO eller adriamycin (ADM) alene.

30 Under anvendelse av denne prøve ble inhiberingen av ³H-thymidin-inkorporeringen i tumorcellenes DNA målt, og den cytotoksiske virkning av prolegemidlet APO på celler med eller uten forbehandling av cellene med L6-PVA- eller 1F5-PVA-konjugatene ble deretter målt. De cytotoksiske
35 virkninger av disse kombinasjoner ble sammenlignet med cytotoksisiteten som ble iaktatt ved behandling av cellene med stamlegemidlet adriamycin alene. Som det fremgår fra figur 5, var adriamycin med IC₅₀-verdi på 38 nM signifikant mer toksisk overfor tumorceller som ikke var be-

handlet med konjugat, enn APO med en IC_{50} -verdi på 2 μM . Dette var forventet under hensyn til tidligere rapporter, hvorav det fremgår at adriamycinamider er mindre toksiske enn adriamycin (se f.eks. Y. Levin og B.A. Sela, FEBS Letters, 98, s. 119 (1979) og R. Baurain et al., J. Med. Chem., 23, s. 1171 (1980)). Forbehandling av cellene med L6-PVA øket cytotoxissiteten av APO 20 ganger, til et nivå som kan sammenlignes med cytotoxissiteten for adriamycin alene. Forbehandling av celler med 1F5-PVA påvirket på ingen måte toksissiteten av APO. Disse resultater indikerer at L6-PVA-konjugatet vil kunne hydrolysere det relativt ikke-cytotoxiske prolegemiddel APO for tilintetgjørelse av tumorceller i en utstrekning som er sammenlignbar med anvendelse av adriamycin alene, og at denne cytotoxissitet er antigenspesifikk, hvilket fremgår av at 1F5-PVA-konjugatet som ikke signifikant bindes til denne bestemte tumorcellelinje, ikke bevirket en slik cytotoxissitet.

Binding av antistoff-PVA-konjugatene til Daudi-lymfoceller

Evnen hos L6-PVA- og 1F5-PVA-konjugatene til å bindes til den kjente Daudi-cellelinje ble også målt. Denne cellelinje er en Burkitt-lymfocellelinje som er deponert ved ATCC (ATCC nr. CCL 213) og som uttrykker CD-20-antigenet hvortil 1F5-antistoffet bindes. Resultatene er avbildet i figur 6.

I dette tilfelle ble både det monoklonale 1F5-antistoff og 1F5-PVA-konjugat bundet sterkt til lymfocellene. Denne undersøkelse indikerte igjen at bindings- evnen hos konjugatene ikke signifikant ble påvirket av konjugeringsmetoden.

Som det fremgår fra figuren, utviste L6-antistoffet og L6-PVA-konjugatet i tillegg ikke noen tydelig binding til Daudi-cellene. Dette kunne også forventes da Daudi-tumorceller ikke utviser antigenet hvormed L6-antistoffet reagerer. Denne undersøkelse kombinert med de ovenfor beskrevne bindingsundersøkelser, demonstrerer klart bindings- spesifisiteten hos konjugatene, dvs. at L6-holdige konjugater bindes spesifikt til L-positive tumorceller, og 1F5-holdige konjugater bindes spesifikt til CD-20-positive tumorceller.

In vitro-cytotoksisitet hos antistoff-PVA-konjugat/adriamycin-prolegemiddelkombinasjonen på Daudi-celler

Den in vitro cytotoksiske virkning av L6-PVA- eller LF5-PVA-konjugatet i kombinasjon med APO-prolegemidlet ble deretter prøvet på Daudi-celler.

³H-thymidinprøven ble utført hovedsakelig som beskrevet ovenfor, med lette modifikasjoner som følge av at Daudi-cellene er ikke-adhererende. Således ble ca. 250.000 Daudi-celler i IMDM anbrakt i hver brønn i en mikrotiterplate med 96 brønner, og antistoffenzymkonjugatet ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble inkubert ved 4°C i 30 minutter. Ubundet antistoffenzymkonjugat ble fjernet ved sentrifugering ved 500 x g i 5 minutter, og supernatanten ble fjernet. Cellene ble resuspendert i IMDM, og vaskeprosedyren ble gjentatt 3 ganger for fjerning av alt ubundet konjugat. Deretter ble APO i IMDM tilsatt, og etter henstand i 2 timer ble cellene vasket én gang som ovenfor beskrevet. Den resulterende del av prøven ble utført som beskrevet tidligere.

Under anvendelse av denne prøve ble inhiberingen av ³H-thymidin-inkorporering i Daudi-cellenes DNA målt, og således den cytotoksiske virkning av APO-prolegemidlet på cellene med eller uten forbehandling av cellene med L6-PVA- eller LF5-PVA-konjugatet. De cytotoksiske virkninger av disse kombinasjoner ble sammenlignet med den iakttatte cytotoksisitet etter behandling av cellene med adriamycin alene. Som det fremgår fra figur 7, var adriamycin signifikant mere toksisk enn APO overfor Daudi-celler som ikke var behandlet med noe konjugat. Forbehandling av cellene med LF5-PVA-konjugatet øket signifikant cytotoksisiteten av APO-prolegemidlet til et nivå som kunne sammenlignes med cytotoksisiteten av adriamycin alene, mens forbehandling med L6-PVA-konjugatet ikke resulterte i en slik økning.

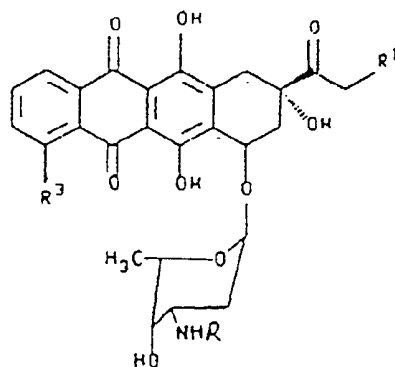
Det skal bemerkes at de oppnådde resultater ved disse bindings- og cytotoksisitetsundersøkelser er de motsatte av resultatene som ble oppnådd med disse konjugater ved de tidligere beskrevne undersøkelser under anvendelse av H2981-tumorceller hvor L6-PVA pluss APO-kombinasjonen utviste

øket cytotoxisk virkning og 1F5-PVA pluss APO-kombinasjonen ikke utviste en slik virkning. Dette kunne forventes under hensyn til de forskjellige spesifisiteter hos L6- og 1F5-antistoffene i konjugatene og demonstrerer tydelig spesifisiteten av de cytotoxiske virkninger oppnådd med konjugat/prolegemiddelkombinasjonene.

Denne undersøkelse antyder enn videre nytten av 1F5-PVA-konjugatet i kombinasjon med APO til frembringelse av cytotoxiske virkninger på tumorceller in vitro. Således påviser in vitro-cytotoksisitetsundersøkelsene i dette eksempel at ethvert av de ifølge oppfinnelsen oppnådde konjugater som inneholder et antistoff som reagerer med et tumorassosiert antigen, kan anvendes til behandling av tumorer, hvormed dette antistoff reagerer.

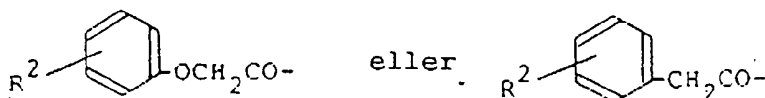
P a t e n t k r a v

1. Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt anthracyclinderivat av formelen



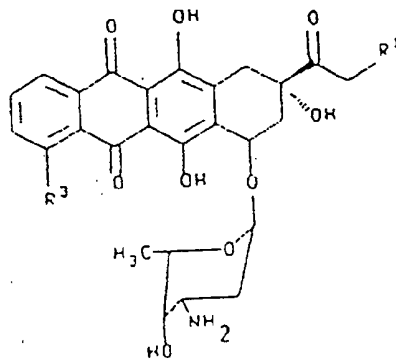
hvor

R er gruppen

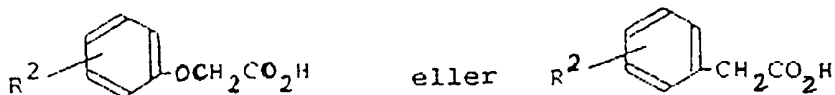


R^1 er H, og R^3 er OH eller OCH_3 , eller
 R^1 er OH, og R^3 er OCH_3 , og
 R^2 er H eller OH.

karakteriseret ved at en forbindelse av
 5 formelen



hvor R^1 og R^3 har den ovenfor angitte betydning, eller et
 syreaddisjons salt derav, omsettes med en forbindelse av
 formelen



hvor R^2 har den ovenfor angitte betydning, eller en acylerende
 ekvivalent derav.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av N-(p-
 hydroxyfenoxyacetyl)-adriamycin,

karakteriseret ved at tilsvarende utgangs-
 materialer anvendes.

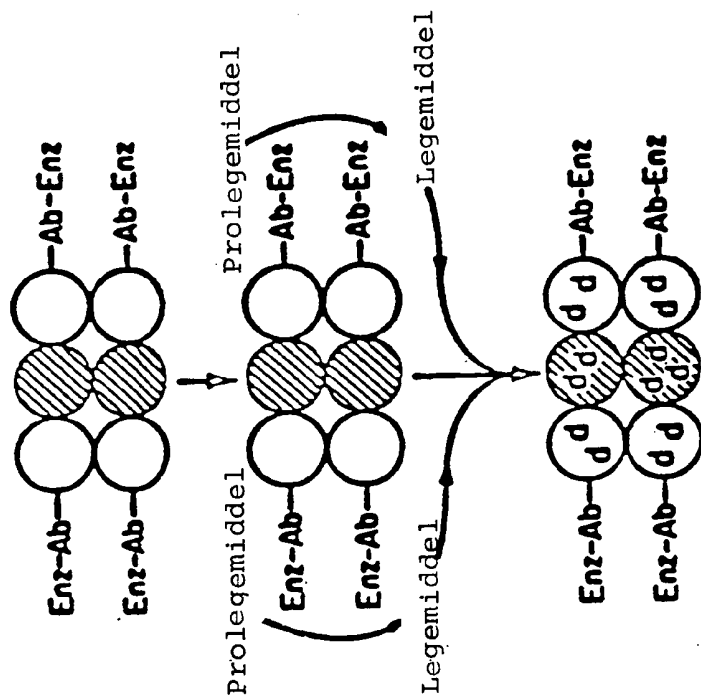
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av N-
 (fenoxyacetyl)-adriamycin,

karakteriseret ved at tilsvarende utgangs-
 materialer anvendes.

Figur 1

Målrattede enzymer til prolegemiddelaktivering

Antistoff-enzym-konjugat bindes til cellepopulasjon

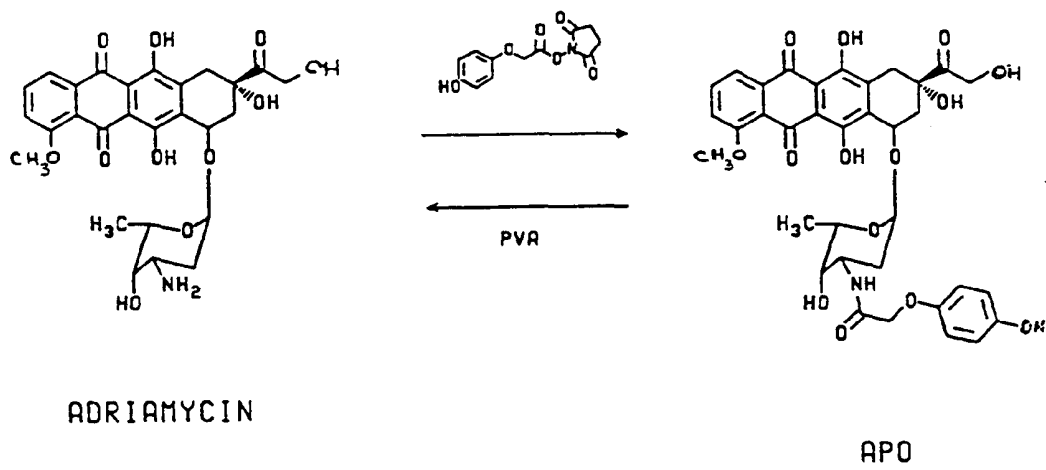


Enzym omdanner prolegemiddel til aktivt legemiddel

Legemiddel (d) trenger inn i celler og fremkaller tilintetgjørelse herav

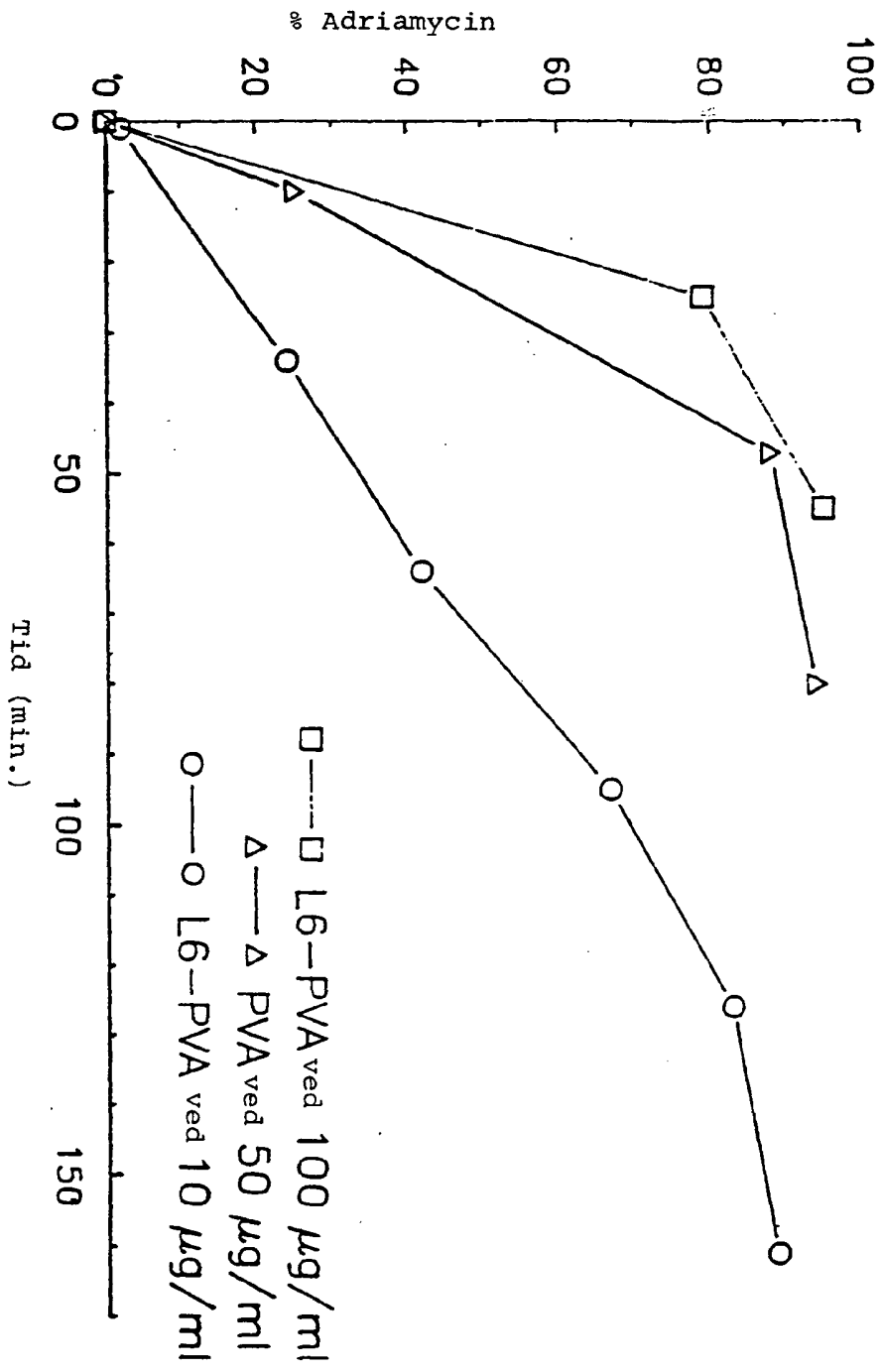
178341

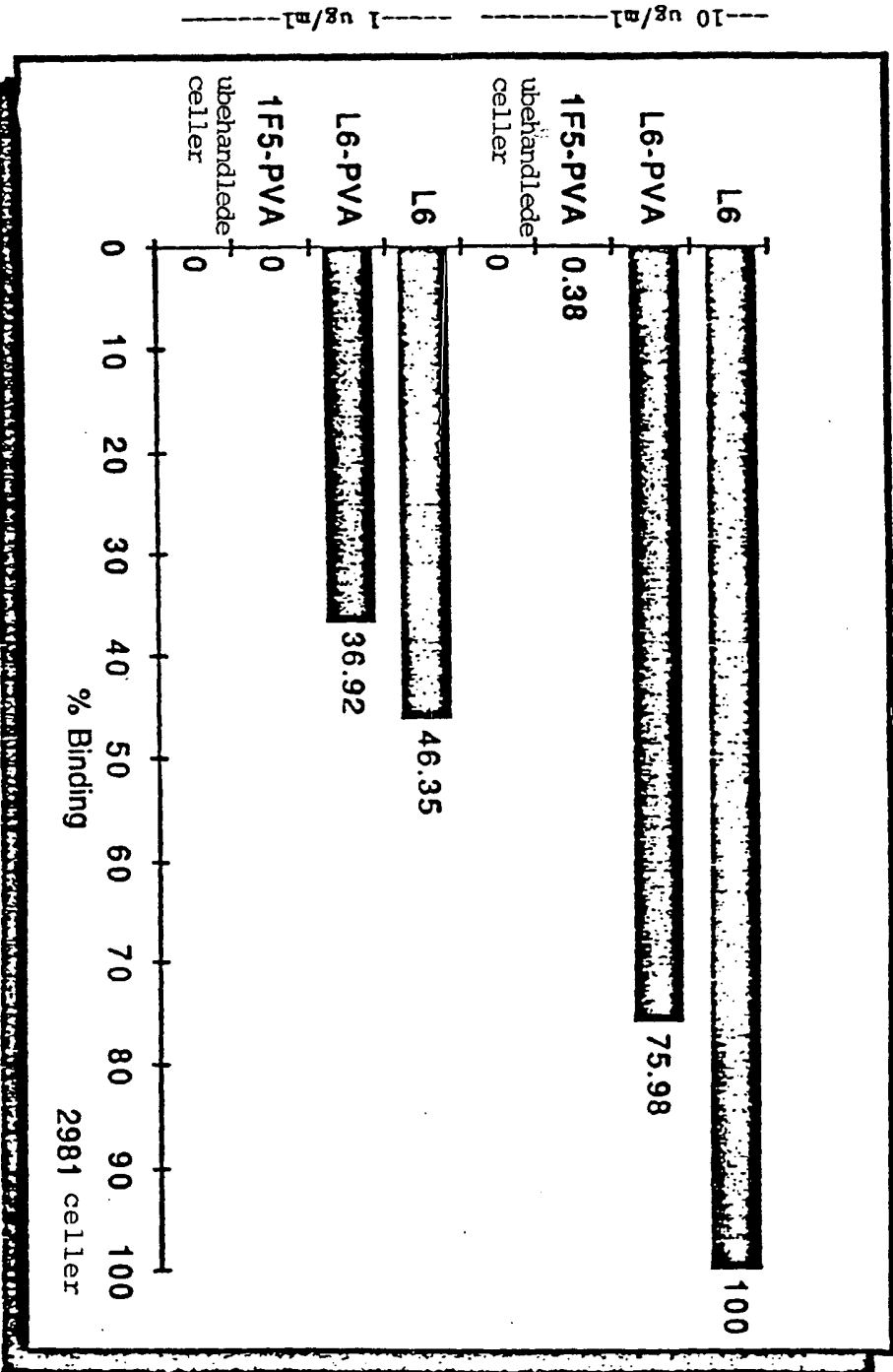
Figur 2



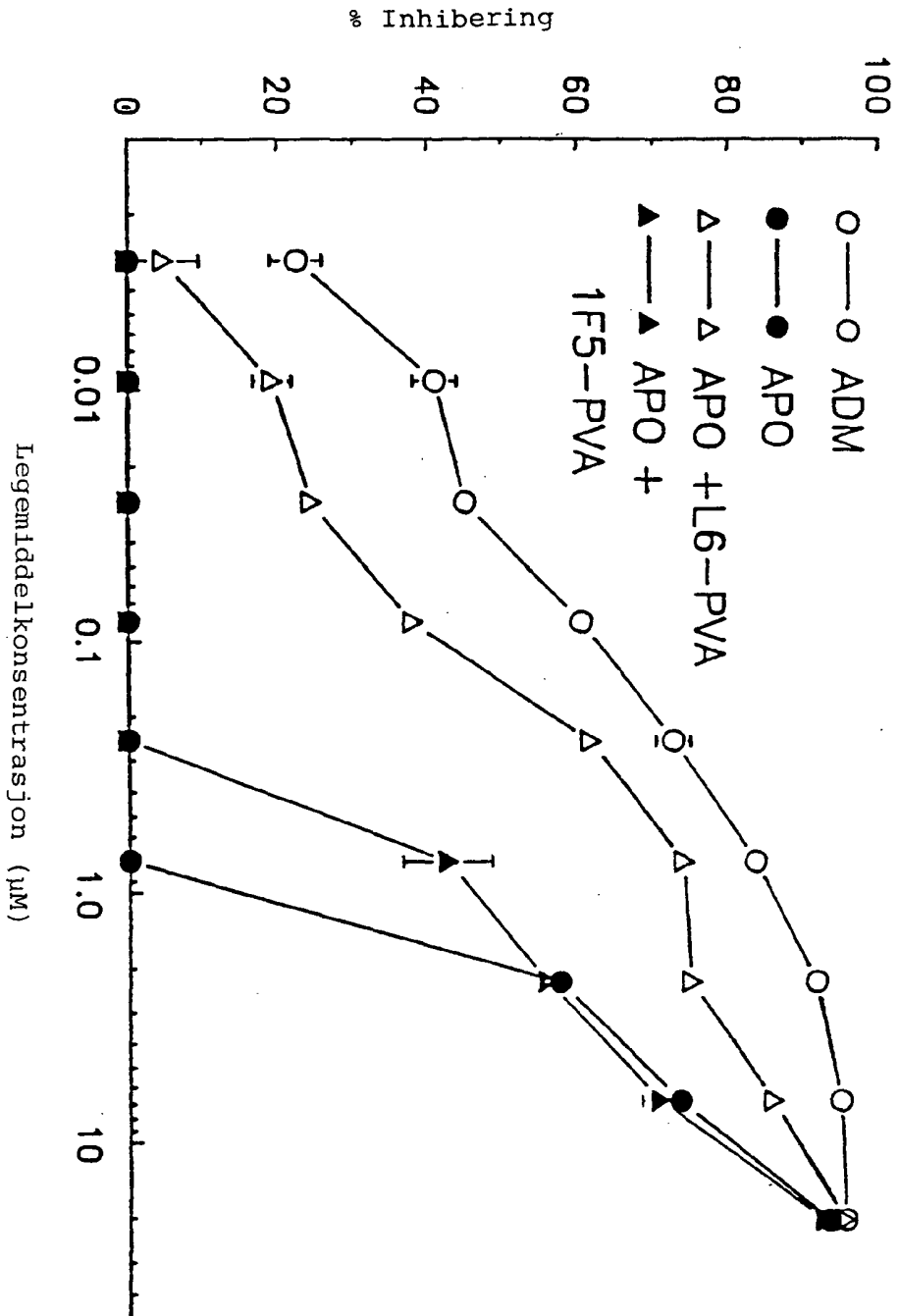
Figur 3

Spaltning av APO med L6-PVA-konjugat og PVA alene





Figur 4



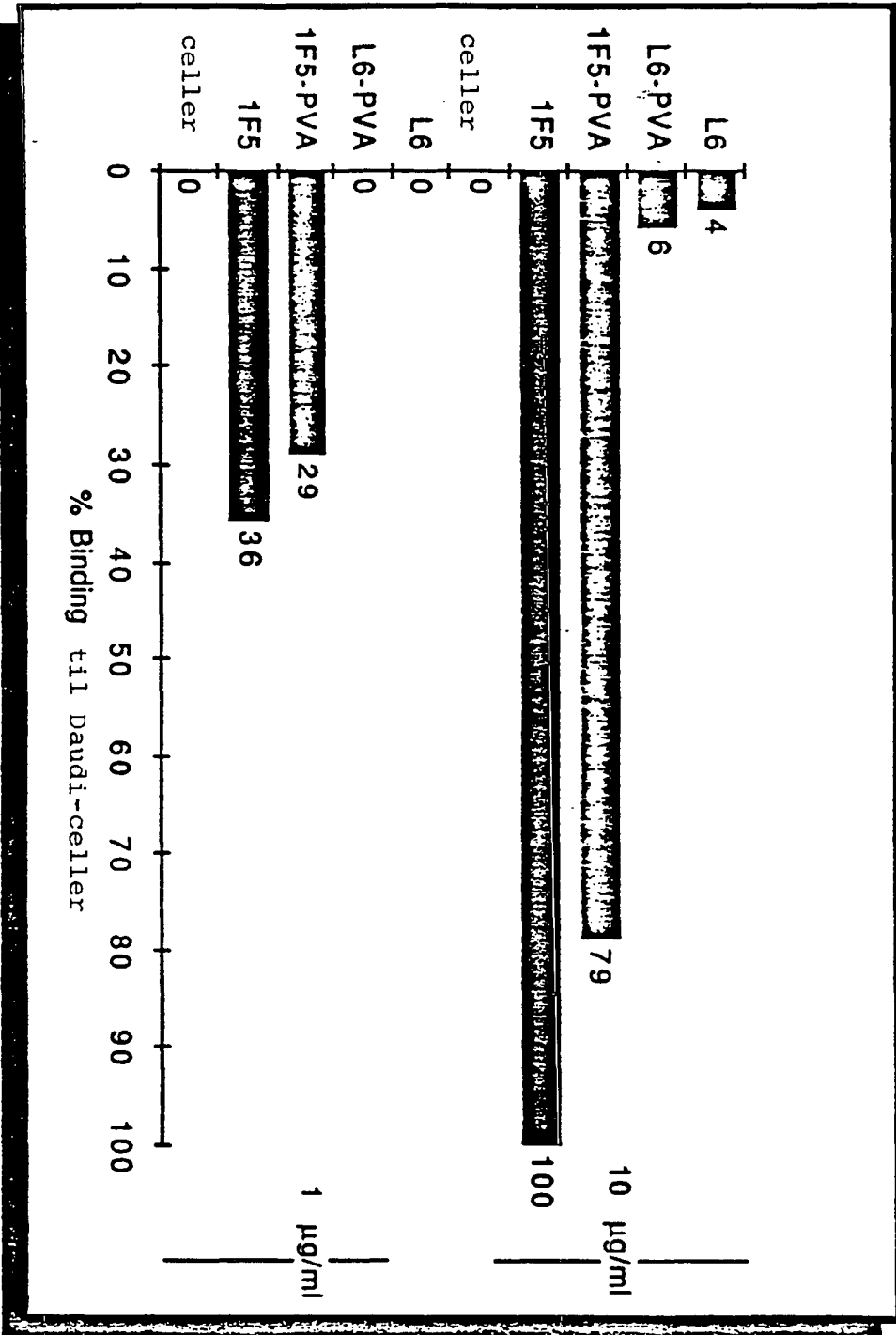


Figure 6

178341

Figur 7

