

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 944730 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **944730**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **08.04.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **07.10.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **07.10.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **08.04.1993 PCT/US1993/003284**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

10.04.1992 US 866693 P

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Research Development Foundation, 402 North Division Street, Carson City, NV 89703, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Rosenblum, Michael G., Houston, TX 77071, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

**CD33:lle sukua olevien pinta-antigeenien vastaisia immuunitoksiineja
Immunotoxiner mot CD33-besläktade ytantigener**

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Tämä keksintö koskee uusia immuunitoksiineja ja menetelmiä kasvainsairauksien hoitamiseksi. Nämä immuunitoksiinit koostuvat CD33-proteiiniin spesifisesti sitoutuvan antigeeniin sitoutuvan alueen ja solujen kasvua moduloivan aineen konjugaatista. Tämän keksinnön mukaiset immuunitoksiinit tappavat spesifisesti ja selektiivisesti kasvainsoluja, joille on tunnusmerkillistä CD33-antigeenin esiintyminen. Siten nämä uudet immuunitoksiinit olisivat käyttökelpoisia ihmisen leukemioiden, sekä akuuttien että kroonisten, ja muiden myelodysplasiaoireistojen hoidossa.

Föreliggande uppfinning avser nya immuno-toxiner och förfaranden för behandling av neoplastiska sjukdomar. Dessa immunotoxiner består av ett konjugat av en antigenbindande region, vilken uppvisar bindningsspecificitet för CD33-protein, och en celltillväxtmodulator. Immunotoxinerna i föreliggande uppfinning dödar specifikt och selektivt tumörceller, vilka karakteriseras av expressionen av CD33-antigener. Därigenom kan de nya immunotoxinerna vara användbara vid behandlingen av människans leukemier, både akuta och kroniska, och av andra myelodysplastiska syndrom.

CD33:lle sukua olevien pinta-antigeenien vastaisia immuunitoksiineja

Keksinnön tausta

5 Keksinnön kenttä

Tämä keksintö koskee yleisesti kasvainsairauksien hoitoalaa. Tarkemmin määriteltynä tämä keksintö koskee uusia immuunikonjugaatteja ja niiden käyttöä kasvainsairauksien hoidossa. Vielä tarkemmin määriteltynä tämä keksintö koskee uusia immuunikonjugaatteja, jotka ovat syto-

10 toksisia leukemiasoluille, joille on tunnusmerkillistä CD33-antigeenin esiintyminen.

Aiheeseen liittyvän alan kuvaus

Kasvainsairaudet ovat yksi johtavista kuolevuuden ja sairastavuuden syistä läntisessä maailmassa. Kaikille kasvainsairauksille eli "syöville" on yhteistä ainakin yksi tunnusmerkillinen piirre, ts. solujen kasvunsäätely-

15 prosessin virheiden mukanaolo.

Syöpäsolujen pinnalla sijaitsevat antigeenit ovat olleet käyttökelpoisia lymfoidisten leukemioiden erottamisessa ei-lymfoidisista leukemioista, akuutin myelogeenisen leukemian alatyypin tunnistamisessa, hoitotuloksen ennustamisessa ja *in vivo* -hoidossa tai luuytimen puhdistuksen kautta tehtävässä *ex vivo* -hoidossa. Akuuttien ei-lymfosyyttisten solujen määritysantigeenit ovat tunnusmerkillisiä myös normaaleille hematopoieettisille soluille niiden kehityksen varhaisvaiheissa.

20

25

CD33-antigeeni on 67 kilodaltonin suuruinen glykoproteiini, jota esiintyy normaalin pesäkkeenmuodostusyksikön granulosyytti-monosyytti (CFU-GM) -soluilla, osalla purkauksenmuodostusyksikön erytroidi (BFU-E) -soluista ja CFU-granulosyytti, -erytroidi, -monosyytti ja -megakaryosyytti (CFU-GEMM) -soluilla ja joita ei esiinny normaaleilla pluripotentilla kantasoluilla.

30

Vasta-aineet ovat proteiineja, joita eläimen immuunijärjestelmä tuottaa normaalisti vasteena antigeenideterminantteihin. Vasta-aineet sitoutuvat siihen spesifiseen antigeeniin, jonka vastaisia ne ovat. Spesifisten monoklo-

5 naalisten vasta-aineiden kehittäminen on antanut tutkijoille mahdollisen keinon kohdentaa selektiivisesti kemoterapeuttisia aineita soluihin, joilla ilmenee ylimäärin kasvaimen liittyviä antigeeneja.

Immuunitoksiinit ovat hybridimolekyyliä, jotka

10 koostuvat toksiiniin kovalenttisesti kytketystä monoklo-naalisesta vasta-aineesta. Immuunitoksiineilla on muutamia mahdollisia etuja tavanomaisiin kasvaintenvastaisiin aineisiin nähden, mukaan luettuina kasvainsoluselektiivisyys ja äärimmäisen tehokkaiden toksiinien potentiaalinen vien-

15 ti kohteeseen.

CD33-antigeenin läsnäolo akuutin ei-lymfoidisen leukemian ja akuutin myelogeenisen leukemian yhteydessä esiintyvillä soluilla tarjoaa mahdollisuuden kehittää selektiivisiä immuunitoksiineja. Tällaisia tehokkaita immuunitoksiineja ei ole nykyisin olemassa. Niinpä tällä alalla on edelleen olemassa suuri tarve ja toive saada yhdisteitä ja menetelmiä leukemiasolujen tappamiseksi selektiivisesti.

20

Yhteenveto keksinnöstä

25 Tämä keksintö tarjoaa käyttöön uuden koostumuksen, joka käsittää CD33-proteiiniin spesifisesti sitoutuvan antigeeniin sitoutuvan alueen ja solujen kasvun modulaattorin konjugaattia. Tällainen koostumus toimii immuunitoksiinina sellaisten kasvainsolujen tappamiseksi spesifisesti, joille on tunnusmerkillistä CD33-proteiinin esiintyminen.

30

Niinpä tämän keksinnön yhdessä suoritusmuodossa tarjotaan käyttöön uusi ainekoostumus, joka käsittää CD33-proteiiniin spesifisesti sitoutuvan antigeeniin sitoutuvan alueen ja solujen kasvun modulaattorin konjugaattia. Solu-

35

jen kasvun modulaattori voi olla toksiini, sytosidinen lääkeaine, sytostaattinen lääkeaine tai biologisen vasteen muuntaja. Solujen kasvun modulaattori on edullisesti geloniini.

5 Tämän keksinnön yhdessä toisessa suoritusmuodossa tarjotaan käyttöön menetelmä kasvainsairauksien hoitamiseksi, jossa annetaan sytosidisesti vaikuttava annos tämän keksinnön mukaista immuunitoksiinia mainitunlaisen hoidon tarpeessa olevalle yksilölle.

10 Tämän keksinnön vielä yhdessä toisessa suoritusmuodossa tarjotaan käyttöön menetelmä luuytimessä olevien kasvainsolujen tappamiseksi, jossa poistetaan luuydintä kasvainsairautta potevasta yksilöstä, käsitellään luuydin tämän keksinnön mukaisella koostumuksella ja infusoidaan
15 käsitelty luuydin takaisin yksilöön.

 Tämän keksinnön yhdessä toisessa suoritusmuodossa tarjotaan käyttöön menetelmä sellaisen kasvainsairauden uusiutumisen estämiseksi, jolle on tunnusmerkillistä CD33-proteiinin ilmeneminen. Uusiutuminen estetään antamalla
20 sytosidisesti vaikuttavana hoitokuurina tämän keksinnön mukaisia immuunitoksiineja.

 Tämän keksinnön vielä yhdessä toisessa suoritusmuodossa tarjotaan käyttöön uusi ainekoostumus, joka käsittää fuusioproteiinia, joka on muodostettu liittämällä yhteen
25 CD33-antigeeniin sitoutuva alue ja solujen kasvun modulaattori. Solujen kasvun modulaattori on edullisesti geloniini.

 Keksinnön muissa suoritusmuodoissa tarjotaan käyttöön menetelmiä kasvainsairautta potevan nisäkkään elin-
30 ajan pidentämiseksi antamalla tälle nisäkkäälle tämän keksinnön mukaista immuunitoksiinia. Vielä muissa suoritusmuodoissa tarjotaan käyttöön menetelmä kasvainten kasvunopeuden hidastamiseksi antamalla tämän keksinnön mukaista immuunitoksiinia. Vielä lisäksi tarjotaan käyttöön farma-

seuttinen koostumus, joka käsittää tämän keksinnön mukaisia immuunitoksiinia.

Piirustusten lyhyt kuvaus

5 Kuvio 1 esittää geloniinin ja M195-immuunitoksiinin aikaansaamaa proteiinisynteesin inhibitiota HL60-soluilla.

Kuvio 2 esittää geloniinin ja M195-geloniinin aikaansaamaa proteiinisynteesin inhibitiota SKLY16- ja HL60-solulinjoilla.

10 Kuvio 3 valaisee proteiinisynteesin inhibitiota inkuboidessa M195-immuunitoksiinia kolme vuorokautta yhdessä HL60:n kanssa.

Kuvio 4 esittää proteiinisynteesin inhibitiota inkuboidessa M195-IT:a viisi vuorokautta yhdessä HL60-solujen kanssa.

15 Kuvio 5 valaisee HuG1:n ja HuG1-IT:n sitoutumista HL60-, U937- ja MOLT4-soluihin.

Kuvio 6 valaisee HuG1-IT:n aikaansaamaa DNA-synteesin inhibitiota HL60-soluilla.

20 Kuvio 7 esittää HuG1-IT:n ja HuG1:n tai FD79:n välistä kilpailua.

Kuvio 8 valaisee pelkän M915:n, reaktioseoksen, pelkän geloniinin ja puhdistetun M195-geloniinin elektroforeesikuviota.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

25 Tässä käytettynä "kimeeriset vasta-aineet" tai "kimeeriset peptidit" tarkoittaa vasta-aineita tai vasta-ainepeptidejä, joissa yhdellä osalla peptidistä on aminohapposekvenssi, joka on peräisin ensimmäisestä geenilähteestä saadussa vasta-aineessa tai peptidissä olevasta
30 vastaavasta sekvenssistä tai homologinen sille, kun taas jäljellä oleva segmentti tai yksi tai useampi ketju on homologinen toisen geenilähteen vastaaville sekvensseille. Kimeerinen raskaan ketjun käsittävä vasta-ainepeptidi voi käsittää esimerkiksi hiiren vaihtelevan alueen ja humaani-
35 vakioalueen. Kyseiset kaksi geenilähdettä ovat tyypillii-

sesti kaksi eri lajia, mutta niiden kohdalla on silloin tällöin kyse yhdestä lajista.

Kimeerisiä vasta-aineita tai peptidejä tuotetaan tyypillisesti käyttämällä yhdistelmäolekyyli- ja/tai -solumenetelmiä. Monissa tapauksissa kimeerisissä vasta-aineissa on sekä kevyiden että raskaiden ketjujen vaihtelevia alueita, jotka jäljittelevät jostakin nisäkäslajista peräisin olevien vasta-aineiden vaihtelevia alueita, samalla kun vakio- ja/tai kehysosat ovat homologisia toisesta, eri nisäkäslajista peräisin olevissa vasta-aineissa esiintyville sekvensseille.

Tässä käytettynä kimeerisen vasta-aineen määritelmä ei kuitenkaan rajoitu tähän esimerkkiin. Kimeerinen vasta-aine on mikä tahansa vasta-aine, jossa joko raskas tai kevyt ketju tai ne molemmat koostuvat eri lähteistä saatavissa vasta-aineissa esiintyviä sekvenssejä jäljittelevistä sekvensseistä riippumatta siitä, ovatko nämä lähteet peräisin eri luokista, erilaisia antigeenivasteita tai peräisin eri lajeista, ja siitä, onko fuusiointikohta vaihtelevan ja vakioalueen rajalla vai ei. Kimeerisiin vasta-aineisiin voi esimerkiksi kuulua vasta-aineita, joissa kehysalueet ja komplementaarisuuden määräävät alueet (CDR:t) ovat peräisin eri lähteistä. Ei-humaani-CDR:iä integroidaan esimerkiksi humaanivakioalueeseen kytkettyihin kehysalueisiin "humanisoitujen vasta-aineiden" valmistamiseksi. Katso esimerkiksi PCT-hakemusjulkaisu WO 87/02671; US-patenttijulkaisu 4 816 567; EP-hakemusjulkaisu 0 173 494; Jones *et al.*, Nature 321 (1986) 522 - 525; Verhoyen *et al.*, Science 239 (1988) 1534 - 1536, jotka kaikki mainitaan tässä viitteinä.

Tässä käytettynä "humaanialueen kaltainen kehysalue" on kunkin vasta-aineketjun yhteydessä oleva kehysalue, ja se käsittää tavallisesti vähintään noin 70 aminohapporyhmää, tyypillisesti vähintään 75 - 85 ryhmää. Humaanialueen kaltaisen kehysalueen aminohapporyhmistä vä-

hintään noin 80 %, edullisesti noin 80 - 85 % ja edullisimmin yli 85 % on homologisia ihmisen immunoglobuliinissa esiintyville ryhmille. Tämä muiden endogeenisten vasta-

5 tettaessa kohdentuva ryhmä, joka aiheuttaa vain vähäisen immuunireaktion, esimerkiksi mekanismin, jolla minimoidaan reagointi "omiin" markkereihin.

Tässä käytettynä "humanisoitu" tai humaani-immunoglobuliinin kaltainen immunoglobuliini" tarkoittaa immuno-

10 globuliinia, joka käsittää humaanialueen kaltaisen kehysalueen ja vakioalueen, joka on olennaisesti homologinen ihmisen immunoglobuliinin vakioalueelle, esimerkiksi homologisuusasteeltaan vähintään noin 80 %, edullisesti vähintään noin 85 - 90 % ja edullisimmin vähintään noin 95 %.

15 Niinpä ihmisen immunoglobuliinin kaltaisen immunoglobuliinin useimmat osat, lukuun ottamatta mahdollisesti CDR:iä, ovat olennaisesti homologisia yhden tai useamman ihmiselle luontaisen immunoglobuliinisekvenssin vastaaville osille.

Tässä käytettynä "hybridivasta-aine" tarkoittaa

20 vasta-ainetta, jossa kukin ketju on erikseen homologinen jonkin nisäkäs vasta-aineketjun suhteen, mutta yhdistelmä edustaa uutta kokoonpanoa, niin että vasta-aine tunnistaa kaksi eri antigeenia. Hybridivasta-aineissa yksi raskaan ja kevyen ketjun muodostama pari on homologinen parille,

25 joka esiintyy yhtä antigeenin tunnistuspiirrettä, esimerkiksi epitooppia, vastaan muodostuneessa vasta-aineessa, kun taas toinen raskaan ja kevyen ketjun muodostama pari on homologinen parille, joka esiintyy jotakin toista epitooppia vastaan muodostuneessa vasta-aineessa. Tämä johtaa

30 multifunktionaalisuusominaisuuteen, ts. kykyyn sitoutua samanaikaisesti vähintään kahteen eri epitooppiin. Tällaisia hybridejä voidaan tietenkin muodostaa myös käyttämällä kimeerisiä ketjuja.

Tässä käytettynä termi "monoklonaalinen vasta-aine"

35 tarkoittaa vasta-ainekoostumusta, joka tunnistaa erillisen

antigeenideterminantin. Sitä ei ole tarkoitettu rajoite-
tuksi vasta-aineen lähteen tai valmistustavan suhteen.

Tämän keksinnön yhteydessä vasta-aine tai muu pep-
tidi on spesifinen CD33:lle, jos vasta-aine tai peptidi
5 sitoutuu tai kykenee sitoutumaan esimerkiksi CD33-proteiiniin mitattuna tai määritettynä tavanomaisin vasta-aine-
antigeeni- tai ligandi-reseptorimäärityksin, esimerkiksi
kilpailumäärityksillä tai tavanomaisilla immuunimäärityk-
sillä, kuten ELISA:lla tai RIA:lla. Tämä spesifisyyismääri-
10 telmä pätee yksittäisiin raskaisiin ja/tai kevyisiin ket-
juihin, CDR:iin, fuusioproteiineihin tai raskaiden ja/tai
kevyiden ketjujen fragmentteihin, jotka ovat myös spesifi-
siä CD33:n suhteen, jos ne sitoutuvat CD33:een yksinään
tai sisällytettyinä asianmukaisesti immunoglobuliinikon-
15 formaatioon, jossa on sopivia komplementaarisia vaihtelevia alueita ja vakioalueita, pystyvät sitoutumaan CD33:een
spesifisesti.

Kilpailumäärityksissä voidaan määrittää vasta-ai-
neen tai peptidifragmentin kyky sitoutua antigeeniin de-
20 tektoimalla peptidin kyky kilpailla sitoutumisesta yhdis-
teen kanssa, jonka tiedetään sitoutuvan kyseiseen antigeeniin.
Tunnetaan lukuisia kilpailumääritystyypppejä ja niitä
käsitellään tässä. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää myös
määrityksiä, joilla mitataan testiyhdisteen sitoutumista
25 inhibiittorin poissa ollessa. Molekyylin tai muun yhdis-
teen kyky sitoutua c-erbB-2-proteiiniin voidaan detektoida
esimerkiksi leimaamalla kiinnostuksen kohteena oleva mole-
kyyli suoraan, tai se voidaan jättää leimaamatta ja detek-
toida epäsuorasti käyttämällä erilaisia kerrosmääritysmal-
30 leja. Tunnetaan lukuisia sitoutumismääritystyypppejä, kuten
kompetitiivisia sitoutumismäärityksiä (katso esimerkiksi
US-patenttijulkaisut 3 376 110 ja 4 016 043 ja Harlow ja
Lane, Antibodies; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
Publications, N.Y. 1988, jotka mainitaan tässä viitteinä).
35 On myös saatavana määrityksiä, jotka on tarkoitettu mit-

taamaan testiyhdisteen sitoutumista yhteen komponenttiin yksinään kilpailumäärityksen käytön sijasta. Esimerkiksi immunoglobuliineja voidaan käyttää CD33:n läsnäolon tunnistamiseen. Tavanomaisia monoklonaalisiin vasta-aineisiin perustuvia määrittämenettelyjä, kuten ELISA-menetelmää, voidaan käyttää (katso Harlow ja Lane, *supra*). Katsaus erilaisiin signaalinmuodostusjärjestelmiin, joita voidaan käyttää, esitetään US-patenttijulkaisussa 4 391 904, joka mainitaan tässä viitteenä.

Sitoutuvien ryhmien spesifisyys CD33:n suhteen voidaan lisäksi määrittää niiden affiniteetin kautta. Mainittuunlainen spesifisyys on olemassa, jos ryhmittymän dissoziaatiovakio ($K_d = 1/k$, jossa K on affiniteettivakio) on < 1 mmol/l, edullisesti < 100 nmol/l ja edullisimmin < 1 nmol/l. Vasta-ainemolekyylien K_d on tyypillisesti matalahkoilla alueilla. $K_d = [R-L]/[R][L]$, jossa $[R]$, $[L]$ ja $[R-L]$ ovat reseptorin eli CD33:n (R), ligandin, vasta-aineen eli peptidin (L) ja vastaavasti reseptori-ligandikompleksin (R-L) tasapainopitoisuudet. Ligandin eli peptidin ja reseptorin eli antigeenin sitoutumisvuorovaikutuksiin kuuluvat tyypillisesti reversiibelit ei-kovalenttiset yhteenliittymiset, kuten sähköstaattiset vetovoimat, Van der Waalsin voimat ja vetysidokset.

Muissa määrittäsmalleissa voidaan detektoida vuorovaikutuksen seurauksena tapahtuvien erilaisten fysiologisten tai kemiallisten muutosten, kuten alaspäin tapahtuvan modulaation, internalisaation tai fosforylaation lisääntymisen läsnä- tai poissaolo, kuten kuvataan US-patenttihakemuksessa nro 07/644 361, joka on jätetty 18.1.1991 ja mainitaan tässä viitteenä. Katso myös Receptor-Effector Coupling - A Practical Approach, toim. Hulme, IRL Press, Oxford 1990.

Geloniini on *Gelonium multoiflorum* siemenistä puhdistettu glykoproteiini (M noin 29 000 - 30 000 kD). Geloniini kuuluu voimakkaiden ribosomeja inaktivoivien kasvi-

toksiinien ryhmään. Muita tämän ribosomeja inaktivoivien kasvitoksiinien ryhmän jäseniä ovat abriinin, risiinin ja modeksiinin ketjut. Geloniini, samoin kuin abriini ja risiini, inhiboi proteiinisynteesiä vahingoittamalla nisäkäiden ribosomien alayksikköä, jonka sedimentaatiovakio (S) on 60. Geloniini näyttää olevan stabiili kemiallisessa ja fysikaalisessa käsittelyssä. Lisäksi itse geloniini ei sitoudu soluihin ja on siksi myrkytöntä (paitsi suurina pitoisuuksina) ja turvallista käsitellä laboratoriossa.

10 Ribosomien inaktivaatio on irreversiibeli, siihen ei näytä liittyvän kofaktoreita, ja se tapahtuu teholla, joka viittaa siihen, että geloniini toimii entsyymaattisesti.

Geloniini ja risiini kuuluvat aktiivisimpiin proteiinisynteesiä inhiboiviin toksineihin proteiinin painon mukaan laskettuna. Geloniini on on 10 - 1000 kertaa aktiivisempaa kuin risiinin A-ketju proteiinisynteesin inhiboinnissa. Sellaiset peptidit kuin risiini ja abriini koostuvat kahdesta ketjusta, A-ketjusta, joka on toksinen yksikkö, ja B-ketjusta, joka toimii sitoutumalla soluihin,

20 Toisin kuin risiini ja abriini, geloniini koostuu yhdestä ketjusta, ja koska siitä puuttuu soluihin sitoutuva B-ketju, se on itsessään suhteellisen myrkytöntä intakteille soluille.

Nisäkässoluilta puuttuu ilmeisesti kyky sitoa ja/tai ottaa sisäänsä luonnon geloniinimolekyyli. Geloniinin konjugaatit monoklonaalisen vasta-aineen, kuten tietyillä kasvainsoluilla esiintyvän kasvaimeen liittyvän antigeenin vastaisen M195:n, kanssa tarjoavat sekä spesifisen menetelmän geloniinin sitomiseksi soluun että reitin

30 geloniini-vasta-ainekompleksin viemiseksi solun sisään.

Immuunitoksiinin sytotoksinen ryhmittymä voi olla sytotoksinen lääkeaine, bakteeri- tai kasviperäinen entsyymaattisesti aktiivinen toksiini tai tällaisen toksiinin entsyymaattisesti aktiivinen fragmentti ("A-ketju"). Entsyymaattisesti aktiiviset toksiinit ja niiden fragmentit ovat

35

edullisia, ja niistä ovat esimerkkejä geloniini, difterian A-ketju, difteriatoksiinin sitoutumattomat aktiiviset fragmentit, oksotoksiinin A-ketju (*Pseudomonas aeruginosa*), risiinin A-ketju, abriinin A-ketju, modeksiinin A-ketju, alfa-sarsiini, *Aleurites fordii* -proteiinit, diantiiniproteiinit, *Phytoiaccia americana* -proteiinit (PAPI, PAPII ja PAP-S), *Momordica charantia* -inhibiittori, kurssiini, krotiini, *Saponaria officinalis* -inhibiittori, mitogelliini, restriktosiini, fenomysiini ja enomysiini. Edullisinta on konjugointi geloniinin kanssa.

Aktiivisiin fragmentteihin ja johdannaisiin kuuluvat mitkä tahansa yhdisteet, joilla on sama ydinrakenne kuin täyspitkällä geloniinirakenteella mutta joista puuttuu koko primaarisekvenssi. Näillä fragmenteilla tai johdannaisilla on sama tai parempi biologinen tai sytotoksinen aktiivisuus kuin geloniinilla. Geloniinifragmenttien tai -johdannaisten sytotoksisuuden voivat ammattimiehet määrittää rutiininomaisesti käyttämällä kaniinin retikulo-syyttilysaatti -määrittystä.

Biologista vastetta muuntaviin aineisiin, joita voidaan kytkeä M195-vasta-aineeseen ja käyttää tämän keksinnön yhteydessä, kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, lymfokiinit ja sytokiinit, kuten IL-1, IL-2, interferonit (α , β tai γ), TNF, LT, TGF- β ja IL-6. Näillä biologista vastetta muuntavilla aineilla on joukko erilaisia vaikutuksia kasvainsoluihin. Näihin vaikutuksiin kuuluvat lisääntynyt kasvainsolujen tappaminen suoran vaikutuksen kautta samoin kuin lisääntynyt kasvainsolujen tappaminen lisääntyneiden isännän puolustusmekanismien välittämien prosessien kautta. M195-vasta-aineen liittäminen näihin biologista vastetta muuntaviin aineisiin mahdollistaa myös selektiivisen kohdentamisen kasvainten sisällä ja siten parannetut antiproliferatiiviset vaikutukset vähentäen samalla epäspesifisiä vaikutuksia, jotka johtavat toksisuuteen muiden kuin kohdesolujen suhteen.

Sytotoksisiin lääkeaineisiin (ja niiden johdannaisiin), jotka ovat käyttökelpoisia tämän keksinnön yhteydessä, kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, adriamysiini, cis-platinakompleksi, bleomysiini ja metotreksaatti. Nämä sytotoksiset lääkeaineet ovat käyttökelpoisia uusiutuvien kasvainten kliinisessä hoidossa, mutta niiden käyttöä hankaloittavat vakavat sivuvaikutukset ja muiden kuin kohdesolujen vahingoittuminen. M195-vasta-aine voi toimia käyttökelpoisena kantajana tällaisille lääkeaineilla ja tarjota tehokkaan keinon lääkeaineen toimittamiseksi kasvaimeen ja viemiseksi tehokkaammin itse kasvainsoluihin. Lisäksi sytotoksisten lääkeaineiden toimittaminen kasvaimiin spesifisen vasta-aineen avulla suojaa herkkiä kohtia, kuten maksaa, joissa ei esiinny CD33:a, ja luuytimen kantasoluja kemoterapeuttisten aineiden haittavaikutuksilta. M195-vasta-aineeseen kytkettyjen lääkeaineiden käyttö antojärjestelmänä mahdollistaa itse lääkeaineen pienemmän annostuksen, sillä kaikki lääkeaineryhmittymät kytketään vasta-aineisiin, jotka keskittyvät kasvaimen tai leukemiasoluihin.

Monoklonaalisen vasta-aineen konjugaatteja voidaan valmistaa käyttämällä erilaisia bifunktionaalisia proteiinin-kytkentäaineita. Esimerkkejä tällaisista reagensseista ovat SPDP, iminotiolaani (IT), imidoesteriden bifunktionaaliset johdannaiset, kuten dimetyyliadipimidaatti, HCl, aktiiviset esterit, kuten disuksiini-imidyyli-suberaatti, aldehydit, kuten glutaarialdehydi, bis-atsodihydriidit, kuten bis(p-atsidobentsoyyli)heksaanidiamiini, bis-diatsoniumjohdannaiset, kuten bis-(p-diatsoniumbentsoyyli)etyleenidiamiini, di-isosyanaatit, kuten tolyleeni-2,6-diisoyanaatti, ja bis-aktiiviset fluoriyhdisteet, kuten 1,5-difluori-2,4-dinitrobentseeni.

Tämän keksinnön mukaisten immuunitoksiinien anto yksilölle, jolla on diagnosoitu olevan leukemia, jolle on tunnusmerkillistä CD33-proteiinin esiintyminen, mahdollis-

taa sytotoksisen aineen kohdentamisen ja keskittämisen kohtaan, jossa on tarpeen tapaa kasvainsoluja. Kohdentamalla sytotoksiset aineet tällä tavalla eliminoidaan epäspesifinen toksisuus muille elimille, kudoksille ja soluille tai vähennetään sitä.

Käytettäessä immuunitoksiineja hoitoon *in vivo*, niitä annetaan ihmis- tai eläinpotilaalle terapeutisesti vaikuttavia määriä, ts. määriä, jotka eliminoivat kasvainrasituksen tai vähentävät sitä, tai määriä, jotka eliminoivat jäljellä olevan sairauden aiemman kemoterapian tai sädehoidon jälkeen. Niitä annetaan normaalisti parenteraalisesti, edullisesti laskimonsisäisesti. Annos ja annostusohjelma riippuvat leukemian luonteesta ja sen solupopulaatiosta, kyseisen immuunitoksiinn ominaispiirteistä, esim. sen terapeuttisesta indeksistä, potilaasta ja potilaan historiasta. Annettava immuunitoksiinimäärä on tyyppillisesti suunnilleen alueella 0,01 - 1,0 mg/kg potilaan painoa.

Immuunitoksiinit formuloidaan parenteraalista antoa varten injektoitavissa olevaan yksikköannosmuotoon (liuokseksi, suspensioksi, emulsioksi) yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän vehikkelin kanssa. Mainitunlaiset vehikkelit ovat itsessään myrkyttömiä ja ei-terapeuttisia. Esimerkkejä mainitunlaisista vehikkeleistä ovat vesi, suolaliuos, Ringerin liuos, dekstroosiliuos ja 5-%:inen ihmisen seerumialbumiiniliuos. Vedettäviä vehikkelejä, kuten rasvaöljyjä ja etyylioleaattia, voidaan myös käyttää. Liposomeja voidaan käyttää kantajina. Vehikkeli voi sisältää pieniä määriä lisäaineita, kuten aineita, jotka parantavat isotonisuutta ja kemiallista stabiiliutta, esimerkiksi pusku-reita ja säilytteitä. Immuunitoksiinia formuloidaan mainitunlaisiin vehikkeleihin tyyppillisesti suunnilleen pitoisuuksiksi 0,1 - 10 mg/ml.

Tämän keksinnön mukaisia immuunitoksiineja voidaan käyttää myös menetelmässä luuytimessä olevien kasvainsolu-

jen tappamiseksi. Tässä menetelmässä luuydin poistetaan ensin yksilöstä, jolla on kasvainsairaus, kuten leukemia. Sitten luuydin käsitellään sytosidisesti vaikuttavalla annoksella tämän keksinnön mukaista immuunitoksiinia.

5 Seuraavissa esimerkeissä kuvataan yksityiskohtaisesti tämän keksinnön mukaisten immuunitoksiinien valmistusta, karakterisointia ja käyttöä. Näitä esimerkkejä ei ole tarkoitettu keksintöä millään tavoin rajoittaviksi.

Esimerkki 1

10 Geloniinin puhdistus

Gelonium multoflorum siemenet kuorittiin ja pähkinät jauhettiin homogenaattorissa kahdeksankertaisessa tilavuudessa NaCl-liuosta (0,14 mol/l), joka sisälsi 1 mmol/l natriumfosfaattia (pH 7,4). Homogenaattia sekoi-

15 tettiin yön yli lämpötilassa 4 °C, jäähdytettiin jäällä ja sentrifugoitiin 20 min kiihtyvyydellä 35 000 G lämpötilassa 0 °C. Supernatantti poistettiin, dialysoitiin natriumfosfaattiliuosta (5 mmol/l, pH 6,5) vastaan ja konsentroitiin käyttämällä pm10-suodatinta. Näyte laitettiin kerrok-

20 seksi Cm-52-ioninvaihtokolonnille (120 x 1,5 cm), joka oli tasapainotettu natriumfosfaattiliuoksella (5 mmol/l, pH 6,5). Ioninvaihtohartsin sitoutunut materiaali eluoitiin 400 ml:lla lineaarista NaCl-gradienttia 0 → 0,3 mol/l nopeudella 25 ml/h lämpötilassa 4 °C. Kerättiin 5 ml:n fraktioita.

25 Fraktioita seurattiin aallonpituudella 280 nm spektrofotometrissä. Geloniini eluoitui suunnilleen fraktioissa 55 - 70 ja se oli viimeinen suuri eluointihuippu. Fraktiot 55 - 70 yhdistettiin, dialysoitiin kahdesti tislattua vettä vastaan ja konsentroitiin kylmäkuivaamalla.

30 Kunkin valmisteen puhtaus ja moolimassa tarkistettiin suurpainenestekromatografialla käyttämällä TSK 3000 -geelipermaatiokolonnia ja natriumfosfaattipuskuria (50 mmol/l, pH 7,4) ja elektroforeettisesti 15-%:isella natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelillä (SDS-

page). Geloniini liikkui yhtenä vyöhykkeenä suunnilleen moolimassan 20 000 - 30 000 daltonia kohdalla.

Esimerkki 2

Geloniiniaktiivisuuden määrittäminen

5 Geloniiniaktiivisuutta seurattiin soluttomalla proteiinisynteesin estomäärityksellä. Soluton proteiinisynteesin estomääritys toteutettiin lisäämällä 50 µl:aan kaniinin retikulosyyttilysaattia seuraavat komponentit sekoittaen joka lisäyksen jälkeen: 0,5 ml Tris-HCl-liuosta
10 (0,2 mol/l, pH 7,8), 8,9 ml etyleeniglykolia ja 0,25 ml HCl-liuosta (1 mol/l).

 20 µl suola-aminohappo-energiaseosta (SAEM), jonka koostumus oli 0,375 mol/l KCl:a, 10 mmol/l $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$:a, 15 mmol/l glukosia, 0,25 - 10 mmol/l aminohappoja (leusiini pois luettuna), 5 mmol/l ATP:a, 1 mmol/l GTP:a ja
15 50 mmol/l Tris-HCl:a (pH 7,6), 10 µl kreatiiniinifosfaattikreatiiniinifosfokinaasia, 3 µl [^{14}C]-leusiinia (Amersham, 348 mCi/mmol) ja lisäksi 1,5 µl liuoksia, jotka sisälsivät vaihtelevina pitoisuuksina geloniiniseosta. Seosta inkuboitiin 60 min lämpötilassa 30 °C. [^{14}C]-leusiinin sisällytystä seurattiin seosnäytteestä saostamalla syntetisoitunut proteiini lasikuitusuodattimille, pesemällä 10-%:isella TCA-liuoksella ja asetonilla ja seuraamalla radioaktiivisuutta beeta-laskurissa käyttämällä Aquasol-tuikelaskentatestettä. Geloniini, jonka ominaisaktiivisuus oli vähintään $4 \cdot 10^9$ yksikköä/mg, käytettiin konjugaatioon vasta-aineiden kanssa. Yksi geloniiniaktiivisuusyksikkö on se määrä geloniiniproteiinia, joka saa aikaan 50-%:isen inhibition [^{14}C]-leusiinin sisällytyksessä proteiiniin soluttomassa määrittäyksessä.
20
25
30

Esimerkki 3

Geloniinin muuntaminen iminotiolaanilla

2-IT-muunnetun geloniinin valmistus

 Geloniinin liuos fosfaattipuskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa konsentroitiin suunnilleen pitoisuu-
35

teen 10 mg/ml Centriprep 10 -konsentrintilaitteessa. Lisättiin trietanoliamiinihydrokloridia (TEA/HCl), pH 8,0, ja EDTAa loppupitoisuuksiksi 60 mmol/l TEA/HCl:a ja 1 mmol/l EDTAa, pH 8,0. Lisättiin 2-iminotiolaanivarastoliuosta [500 mmol/l TEA/HCl-puskurissa (60 mmol/l), joka sisältää 1 mmol/l EDTAa, pH 8,0] loppupitoisuudeksi 1 mmol/l ja näytettä inkuboitui 90 min lämpötilassa 4 °C typpikaasuvirran alla ja sekoittaen. Ylimääräinen iminotiolaani poistettiin geelisuodatuksella Sephadex G25 -kolonnilla (1 x 24 cm), joka oli tasapainotettu ennalta fosfaatti-EDTA-puskurilla, pH 7,5, joka sisälsi 0,01 mol/l Na₂HPO₄:a, 0,0018 mol/l KH₂PO₄:a, 0,0034 mol/l KCl:a, 0,001 mol/l EDTA:a ja 0,17 mol/l NaCl:a. Fraktioista analysoitiin proteiinisäilytys mikromaljoilla käyttämällä Bio-Rad-määritystä. Geloniini eluotui huokostilavuudessa (suunnilleen fraktiot 21 - 33). Nämä fraktiot yhdistettiin ja säilytettiin lämpötilassa 4 °C.

4-suksiini-imidylioksikarbonyyli- α -metyyli- α -(2-pyridyyliditio)tolueeniin (SMPT) kytketty M195 valmistetaan kytkemällä 2-IT-muunnettu geloniini SMPT-muunnettuun MAB-M195:een. Lyhyesti esitettynä M195:n muuntamiseksi SMPT:llä laimennetaan seos, joka sisältää 10 mg vasta-ainetta 1,0 ml:ssa PBS:ää, suhteessa 1:1 2X-boraattipuskurilla (0,05 mol/l natriumboraattia, 1,7 % natriumkloridia, pH 9,0) ja lisätään vasta-aineliuokseen hitaasti 52 μ l liuosta, joka sisältää 4 mmol/l SMPT:tä kuivassa DMF:ssä. Reaktioseosta inkuboidaan huoneenlämpötilassa 2 tuntia sekoittaen typen alla. Ylimääräinen SMPT poistetaan joltamalla reaktioses Sephadex G-25 -kolonnin läpi, joka sisältää fosfaatti-EDTA-puskuria, pH 7,5, ja vasta-ainepositiiviset fraktiot tutkitaan Bio-Rad-määrityksellä. Fraktiot yhdistetään ja säilytetään lämpötilassa 4 °C N₂:n alla. Silloitus 2-IT:llä tehdään lämpötilassa 27 °C N₂:n alla sekoittaen 96 tuntia. Lopputuote puhdistetaan edellä SPDP:n yhteydessä kuvatulla tavalla.

Esimerkki 4

Hiiren monoklonaalisen vasta-aineen M195 valmistus

Hiiren monoklonaalista vasta-ainetta M195 tuotettiin hybridomista, joita saatiin fuusioimalla NS-1-hiiren myeloomasoluja ja pernasoluja, joita saatiin viiden viikon ikäisestä BALB/c-hiirestä, joka oli immunisoitu akuuttia ei-lymfosyyttistä leukemiaa (FAB-M2) sairastavasta potilaasta peräisin olevilla leukemiasoluilla. Kloonatuista hybridomaviljelmistä saadut supernatanttinesteet tutkittiin leukemisolulinjajoukkoa ja alkuperäisiä ANLL-leukemiasoluja vastaan käyttämällä *Staphylococcus aureus* -proteiini A (PA) -erytrosyytti -rosettimenetelmää. Useaan kertaan alikloonattua M195-hybridomaa lisättiin pristaanilla kahdesti esikäsitellyissä (C57 BL/6 kertaa BALB/c) Fl-hiirissä.

M195 puhdistettiin PA-Sepharosella affiniteettikromatografisesti käyttämällä peräkkäin laimennoksia, joissa pH muuttui portaittain. Puhtaus määritettiin natriumdodekyyli sulfaatti (SDS) -polyakryyliamidigeeleillä, jotka värjättiin Coomassie Brilliant -sinisellä. Humanisoitu monoklonaalinen vasta-aine M195 valmistettiin Con et al. kuvaamalla tavalla [Chmieri and Humanized Antibodies with Specificity for the CD33 Antigen, J. Immunol. 148 (1992) 1149 - 1154] ja se tuotettiin hybridomista ja puhdistettiin edellä kuvatulla tavalla.

Lyhyesti esitettynä kloonattiin voimakkaasti muuttuva alue (V-alue) hiiren M195:n H- ja L-ketjuja varten immobilisoidulla PCR-menetelmällä. Ensin hajotettiin M195-hybridomasolut ja uutettiin RNA käyttämällä kuuma fenoli -menetelmää. cDNA syntetisoitiin RNA:sta inkuboidulla viruskäänteistranskriptiaasin kanssa. Sitten suunniteltiin PCR-alukkeet ja sisällytettiin edellä ja jäljessä oleviin alukkeisiin sekä EcoRI- että HindIII-kohtia alikloonauksen tekemiseksi käteväksi. PCR-reaktiot toteutettiin ohjelmoitavassa kuumennusyksikössä käyttämällä 30

lämpötilasykliä (1 min 92 °C, 2 min 50 °C ja 3 min 72 °C). PCR-tuotteet erotettiin elektroforeettisesti matalassa lämpötilassa sulavalla agarosigeelillä. Vyöhykkeet leikattiin irti, pilkottiin restriktioentsyymeillä ja kloonattiin vektoriin PUC 18 sekvenssin määrittämistä varten. Hiiren H- ja L-ketjujen vaihtelevat alueet silmukoitiin sitten plasmideihin, jotka sisälsivät komplementaarisia humaani-H- ja -L-ketjuja käyttämällä eri vektoreita. Ki-meerisillä hiiri/humaani-L- ja -H-ketjuja koodittavilla vektoreilla transfektoitiin sitten SP 2/0 -soluja elektroporaatiomenetelmällä. Elossa olevat pesäkkeet siirrostettiin maljoille ja niistä testattiin kyky tuottaa humani-soitua α CD₃₃-vasta-ainetta.

Esimerkki 5

SPDP-muunnetun monoklonaalisen vasta-aineen M195 konjugointi iminotiolaanimuunnettuun geloniiniin

1 mg esimerkissä 1 kuvatulla tavalla valmistettua puhdistettua geloniinia (2 mg/ml PBS:ssä) muunnettiin iminotiolaanilla esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Esimerkissä 4 kuvatulla tavalla muunnettu monoklonaalinen vasta-aine M195 sekoitettiin yhtä suuren painomäärän kanssa muunnettua geloniinia. Tämä suhde vastasi 5-kertaista mooliylimäärää geloniinia vasta-aineeseen nähden. Seoksen pH säädettiin arvoon 7,0 lisäämällä TEA/HCl-puskuria (0,05 mol/l, pH 8,0) ja seosta inkuboitiin 20 tuntia lämpötilassa 4 °C typen alla. Lisättiin jodiasetamidia (0,1 mol/l) loppupitoisuudeksi 2 mmol/l mahdollisesti jäljellä olevien vapaiden sulfhydryyliryhmien suojaamiseksi ja jatkettiin inkubointia vielä 1 tunti suunnilleen lämpötilassa 25 °C. Reaktioseos säilytettiin lämpötilassa 4 °C geelisuodatuspuhdistukseen asti.

Esimerkki 6

Geloniini - monoklonaalinen vasta-aine M195 -kompleksien puhdistus

Konjugoitumaton geloniini ja moolimassaltaan pienet tuotteet poistettiin esimerkin 6 reaktioseoksista tekemällä geelisuodatus Sephadex S-300 -kolonnilla (1,6 x 31 cm), joka oli ennalta tasapainotettu PBS:llä.

Esimerkissä 5 saadut reaktioseokset konsentroitiin noin 1 ml:ksi Centricon 30 -mikrokonsentroidintilaitteella ennen syöttämistään Sephadex-kolonnille. Kolonni huuhdottiin PBS:llä. Kerättiin 1 ml:n fraktioita ja analysoitiin 50 µl:n näytteistä proteiini Bradford-määrityksellä.

Konjugoitumattoman M195:n poistamiseksi laitettiin S-300-kolonnista eluoitunut moolimassaltaan suuri piikki (fraktiot 28 - 40) Blue Sepharose CL-6B -affiniteettikromatografiakolonnille (1 x 24 cm), joka oli tasapainotettu fosfaattipuskurilla (10 mmol/l, pH 7,2), joka sisälsi 0,1 mol/l NaCl:a. Kun S-300-eluaattinäyte oli lisätty, kolonni huuhdottiin 30 ml:lla samaa puskuria konjugoitumattoman vasta-aineen eluoimiseksi täydellisesti.

Geloniiniin konjugoitunut vasta-aine sitoutui kolonniin ja eluoitiin lineaarisella suolagradientilla 0,2 → 2 mol/l NaCl:a fosfaattipuskurissa (10 mmol/l, pH 7,2). Vasta-aine-geloniinikompleksi eluoitui suunnilleen NaCl-pitoisuuden 0,7 mol/l kohdalla. Eluoitujen fraktioiden proteiinisältö määritettiin Bradford-määrityksellä. Proteiinia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja eluoitumismalli varmistettiin elektroforeettisesti pelkistämättömällä polyakryyliamidigradienttigelillä 5 → 20 %.

Kuvio 8 valaisee pelkän M195:n, puhdistamattoman M195:ä, geloniinia ja M195-geloniinia sisältävän reaktioseoksen, pelkän geloniinin ja puhdistetun M195-geloniinin elektroforeesikuviota. Läpivirtauspiikki (fraktiot 14 - 20) sisältää vain vapaata vasta-ainetta, kun taas fraktiot 50 - 80, jotka eluoituivat suurella suolapitoi-

suudella, sisältävät M-195-geloniinikonjugaattia, joka on vapaata geloniinista tai vasta-aineesta. Lopputuote sisälsi M195-vasta-ainetta kytkettynä 1, 2 tai 3 geloniinimolekyyliin. Keskimääräinen geloniinisisältö oli 1,5 molekyyliä yhtä vasta-ainemolekyyliä kohden. Olennaisesti puhtaan geloniini-M195-vasta-ainekompleksin geloniiniaktiivisuus arvioitiin käyttämällä *in vitro* -translaatiojärjestelmää, jossa käytettiin kaniinin retikulosyyttejä. Yksi aktiivisuusyksikkö määriteltiin tämän määrityksen yhteydessä proteiinimääräksi, joka tarvitaan saamaan aikaan proteiinisynteesin 50-%:inen inhibitio verrattuna käsittelemättömiin vertailunäytteisiin. Käyttämällä tätä määritystä saatiin luonnon geloniinin ja M195-geloniinikonjugaatin ominaisaktiivisuudeksi $2 \cdot 10^8$ yksikköä/mg ja vastaavasti $8,2 \cdot 10^5$ yksikköä/mg. Olennaisesti puhdas geloniini-M195-vasta-aine on aktiivista retikulosyyttilysaattimäärityksessä. Alkuperäinen näyte laimennettuna suhteessa 1:1000 sai aikaan noin 50-%:isen proteiinisynteesin inhibition, ts. 50 %:n vähenemisen [^{14}C]-leusiinin sisällytyksessä proteiiniin. Niinpä alkuperäisen valmisteen aktiivisuus oli 1000 yksikköä/ml.

Esimerkki 7

Tämän keksinnön mukaisiin koostumuksiin saattaa kuulua monoklonaalisen M195-vasta-aineen ja sytoksisen ryhmittymän fuusiorakenteita. Tällaisia tämän keksinnön mukaisen immuunitoksiinin fuusiorakenteita voidaan valmistaa Con et al. menetelmällä, joka mainitaan tässä viitteenä.

Ennen käyttöään näissä tutkimuksissa Sp2/0-Ag14-soluja kasvatetaan aluksi luonnon geloniinin ollessa läsnä pitoisuutena 0,1 µg/ml. Geloniinipitoisuutta nostetaan muutaman kuukauden aikana asteittain, kunnes soluja pystytään pitämään yllä jopa pitoisuudessa 10 mg/ml. Sitten solut kloonataan rajalaimennusmenetelmällä geloniinin ollessa läsnä pitoisuutena 10 mg/ml ja tuloksena olevia ge-

loniinille resistenttejä pesäkkeitä lisätään. Geloniini poistetaan sitten kasvualustoista kahden sukupolven ajaksi ja solut altistetaan uudelleen geloniinille stabiilisti resistenttien pesäkkeiden kehittymisen varmistamiseksi.

5 Kun on tehty testit humanisoidun M195:n tuotannon ja aktiivisuuden varmistamiseksi, kasvatetaan geloniiniresistenttejä, vasta-ainetta tuottavia SP2/0-soluja ja M195-vasta-ainetta vastaava cDNA poistetaan kokonais-DNA:sta inkuboimalla yhdessä restriktioendonukleaasin kanssa. Rinnalla poistetaan cDNA optimoitua geloniinia tuottavasta *E. coli* JM105:stä, puhdistetaan se ja vapautetaan geloniinia koodittava DNA HindIII- ja EcoRI-pilkonnan jälkeen. Geloniinigeeni ligatoidaan raskaan ketjun käsittävään fragmenttiin ja tämä insertti sijoitetaan geloniiniresistentteihin SP2/0-soluihin. Solut alikloonataan sitten rajalaimennusmenetelmällä ja klooneista tutkitaan sekä humanisoidun vasta-aineen tuotanto että geloniinisisältö. Lopuksi positiivisia klooneja lisätään ja rekombinanttifuusioproteiini puhdistetaan ja testataan sekä *in vitro* sytotoksisuusmäärityksillä että *in vivo* kudusjakautumis-, farmakokinetiikka-, hoito- ja toksisuuskokein. M195-geloniinifuusioproteiinin ominaisuuksia verrataan edellä kuvattujen M195-geloniinirakenteiden ominaisuuksiin kummankin etujen ja haittapuolien määrittämiseksi. Näiden tutkimusten perusteella voidaan tehdä 1. vaiheen kliininen tutkimus kimeerisellä M195-geloniinifuusioproteiinilla pitkälle edennyt rintasyöpää sairastavissa potilaissa.

Esimerkki 8

Viitaten kuvioon 1, M195-immuunitoksiinin kyky tappaa HL60-soluja testattiin verrattuna vapaaseen geloniiniin. Proteiinisynteesin inhibitiota [määritettiin käyttämällä testiä, jolla mitataan tritoidun aminohapposeoksen (0,5 µCi/ml; New England Nuclear Corp.) sisällytystä trikloorietikkahapolla (TCA) saostettavissa olevaan proteiiniin] käytettiin käytetyn aineen aktiivisuuden mittana.

M195-geloniini-immuunitoksiinin loppupitoisuudet olivat alueella 5 µg/ml - 5 ng/ml. Geloniinin loppupitoisuudet olivat alueella 44 - 0,6 µg/ml.

5 M195-geloniini-immuunitoksiini oli noin 600 kertaa tehokkaampaa kuin pelkkä vapaa geloniini. M195-geloniini-immuunitoksiinin ID₅₀ oli noin 0,4 nmol/l. Proteiinisynteesin inhibointi M195-geloniini-immuunitoksiinilla johtaa sitten joko solujen jakautumattomuuteen tai solujen kuolemaan. Solukuolema varmistettiin kokeilla, joissa käytettiin trypaanisinieksluusiota elävien solujen kokonaislukumäärän ja elävien solujen prosentuaalisen osuuden määrittämiseksi. Viitaten kuvioon 1, HL60-soluja, joiden loppupitoisuus oli $1 \cdot 10^6$ solua/cm³, inkuboitiin kolme vuorokautta lämpötilassa 37 °C M195-geloniini-immuunitoksiinin tai
10 pelkän geloniinin läsnä ollessa.
15

Viitaten kuvioon 2, HL60 SKLY16 -soluja, joiden loppupitoisuus oli $5 \cdot 10^6$ solua/cm³, inkuboitiin kolme vuorokautta lämpötilassa 37 °C joko pelkän geloniinin tai M195-geloniini-immuunitoksiinin läsnä ollessa. M195-geloniini-immuunitoksiinin loppupitoisuudet olivat alueella
20 4 µg/ml - 15,2 pg/ml. Geloniinin loppupitoisuudet olivat alueella 10 - 0,1 µg/ml. Proteiinisynteesitasot määritettiin sisällyttämällä tritioituja aminohappoja 5 tunnin ajan trikloorietikkahapolla saostettavissa olevaan proteiiniin.
25

Kuten kuviosta 2 on nähtävissä, M195-geloniini-immuunitoksiinipitoisuudet inhiboivat yli 80 % HL60:n proteiinisynteesistä; vertailukelpoisilla immuunitoksiinipitoisuuksilla ei ollu vaikutusta SKLY16-soluihin. M195-geloniini-immuunitoksiinin selektiivisyys on siten selvä.
30

Viitaten kuvioihin 3 ja 4, HL60-soluja inkuboitiin loppupitoisuutena $1 \cdot 10^6$ kolme vuorokautta (kuvio 3) tai viisi vuorokautta (kuvio 4) lämpötilassa 37 °C M195-geloniini-immuunitoksiinin läsnä ollessa. Immuunitoksiinin
35 loppupitoisuus oli alueella 4 µg/ml - 0,9 ng/ml. Proteiini-

nisynteesitasot määritettiin sisällyttämällä tritioituja aminohappoja 5 tunnin ajan trikloorietikkahapolla saostettavissa olevaan proteiiniin.

5 Kuten on nähtävissä vertaamalla kuvioita 3 ja 4, altistusaika immuunitoksiinille vaikuttaa tämän aktiivisuuteen. Itse asiassa havaitaan noin M195-geloniini-immunitoksiinin tehon noin kymmenkertainen kasvu HL60-solujen kanssa tehdyn viisi vuorokautta kestäneen inkuboinnin jälkeen verrattuna kolmen vuorokauden inkubointiin.

10 Viitaten kuvioon 5, tutkittiin humanisoidun M195 (HuG1) -immuunitoksiinin sitoutumista HL60-, U937- ja MOLT4-soluihin. HuG1:ä ja HuG1-immuunitoksiinia lisättiin HL60-soluihin (kuvio 5, kuva A) tai U937- ja MOLT4-solulinjoihin (kuvio 5, kuva B) pitoisuuksiksi 5 µg/ml -
15 5 ng/ml. Soluja inkuboitiin jäissä 1 tunti ennen ylimääräisen vasta-aineen pesemistä pois. Sitten soluihin lisättiin vuohen anti-humaani-FITC:tä ja soluja inkuboitiin uudelleen 1 tunti jäissä. Kun ylimääräinen vasta-aine oli pesty pois, solut kiinnitettiin paraformaldehydillä
20 (0,5 %) ja tehtiin luenta EPICS Profile -virtaussytometrillä.

Kuvio 5 valaisee sitä, että humanisoidulla M195-geloniini-immuunitoksiinilla on kyky sitoutua spesifisesti kohdesoluihin. Käytettäessä epäsuoraa virtaussytometriaa
25 humanisoitu M195-geloniini-immuunitoksiini sitoutui kuviossa 5 spesifisemmin CD33-positiivisiin solulinjoihin (HL60) ja U937:ään vastaavalla tavalla kuin pelkkä humanisoitu M195-vasta-aine. Se ei sitoutunut CD33-negatiivisiin solulinjoihin (MOLT4; kuvio 5, kuva B).

30 Viitaten kuvioon 6, HL60-soluja inkuboitiin loppupitoisuuksina $3 \cdot 10^6$ ja $5 \cdot 10^5$ viisi vuorokautta lämpötilassa 37 °C humanisoidun M195-geloniini-immuunitoksiinin ollessa läsnä loppupitoisuuksina 4 µg/ml - 0,2 ng/ml. Geloniinin loppipitoisuudet olivat alueella 50 - 0,5 µg/ml. DNA-synteesi määritettiin tekemällä viisi tuntia kestävä inku-
35

bointi yhdessä tritiodun tymidiinin kanssa. Kuten kuvios-
ta 6 on nähtävissä, humanisoitu M195-geloniini-immuunitok-
siini inhiboi proteiinisynteesiä noin 4500-kertaisesti
pelkkään geloniinin nähden.

5 Kuvio 7 valaisee humanisoidun M195-geloniini-immuu-
nitoksiinin kykyä tappaa HL60-soluja. Kuten kuviosta 7 on
nähtävissä, humanisoidun M195-geloniini-immuunitoksiinin
ID₅₀ oli alle 10 pmol. Tämä immuunitoksiinin ID₅₀ on yli 400
kertaa alhaisempi kuin pelkän geloniinin ID₅₀.

10 Viitaten kuvioon 8, HL60-soluja inkuboitiin yksi
tunti jäillä humanisoidun M195-vasta-aineen tai F79:n,
isotyypiltään samanlaisen GUG1-vertailuvasta-aineen, kans-
sa. Humanisoitua M195-geloniini-immuunitoksiinia lisättiin
pitoisuudeksi 0,15 µg/ml. Soluja inkuboitiin 96 tuntia
15 lämpötilassa 37 °C. Elävien solujen lukumäärä määritettiin
trypaanisinieksluusiomenetelmällä. Prosentuaalinen inhibi-
tio edustaa tapettujen solujen vähenemistä kilpailevan
vasta-aineen läsnä ollessa verrattuna pelkän immuunitok-
siinin tappamiin soluihin.

20 Kuten kuviosta 8 on nähtävissä, humanisoitu M195-
vasta-aine pystyi estämään humanisoidun M195-geloniini-
immuunitoksiinin sytotoksisuutta annoksesta riippuvalla
tavalla. Sen sijaan Fd79:llä, epäspesifisellä humanisoi-
dulla IgG1:llä, ei ollut vaikutusta samoina pitoisuuksina.

25 Johtopäätöksenä on siten nähtävissä, että tämä kek-
sintö ja tässä esitetyt suoritusmuodot soveltuvat hyvin
alussa esitettyjen tavoitteiden toteuttamiseen ja saavut-
tamiseen. Menetelmään ja laitteistoon voidaan tehdä tiet-
tyjä muutoksia joutumatta tämän keksinnön hengen ja suoja-
30 alan ulkopuolelle. Ymmärrettäneen, että muutokset ovat
mahdollisia, ja lisäksi on tarkoituksena, että missä ta-
hansa seuraavista patenttivaatimuksista esitettävä kukin
elementti tai vaihe on ymmärrettävä viittaavaksi kaikkiin
vastaaviin elementteihin tai vaiheisiin olennaisesti samo-
35 jen tulosten toteuttamiseksi olennaisesti samalla tai vas-

taavalla tavalla. Tämä keksintö soveltuu siten hyvin mainittujen samoin kuin siihen luontaisesti liittyvien tavoitteiden ja etujen toteuttamiseen.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä fuusioproteiinin valmistamiseksi, joka käsittää CD33-proteiinin antigeenialueeseen spesifisesti sitoutuvan proteiinin ja kasviperäisen toksinin, joka kasviperäinen toksini valitaan geloniinin, täyspitkän rekombinanttigeloniinin ja geloniinifragmenttien joukosta, t u n n e t t u siitä, että mainittu spesifisesti sitoutuva proteiini ja mainittu toksini fuusioidaan.
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että spesifinen sitoutuminen tapahtuu CD33:n solunulkoiseen epitooppiin.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että toksini valitaan luonnon toksiinien ja rekombinanttitoksiinien joukosta.
- 15 4. Menetelmä farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi, joka sisältää fuusioproteiinin, joka käsittää CD33-proteiinin antigeenialueeseen spesifisesti sitoutuvan proteiinin ja kasviperäisen toksinin, joka kasviperäinen toksini valitaan geloniinin, täyspitkän rekombinanttigeloniinin ja geloniinifragmenttien joukosta, sekä farmaseuttisesti hyväksyttävän vehikkelin, t u n n e t t u siitä, että mainittu spesifisesti sitoutuva proteiini ja toksini fuusioidaan ja formuloidaan farmaseuttisesti hyväksyttävän
- 20
- 25 vehikkelin kanssa.

Patentkrav:

1. Komposition, k ä n n e t e c k n a d av, att
den omfattar ett protein som specifikt binder sig vid
5 CD33-proteinets-antigenområde och ett ur växtriket derive-
rat toxinkonjugat, varvid det ur växtriket deriverade tox-
inet valts bland gelonin, rekombinant gelonin med full
längd och geloninfragment.

2. Komposition enligt patentkrav 1, k ä n n e -
10 t e c k n a d av, att det specifika bindandet sker vid en
extracellulär CD33-epitop.

3. Komposition enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d av, att toxinet väljs bland naturliga
toxiner och rekombinanta toxiner.

15 4. Komposition enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a d av, att konjugatet är ett fusionsprotein
mellan det nämnda antigenbindande området och det ur växt-
riket deriverade toxinet.

20 5. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1.

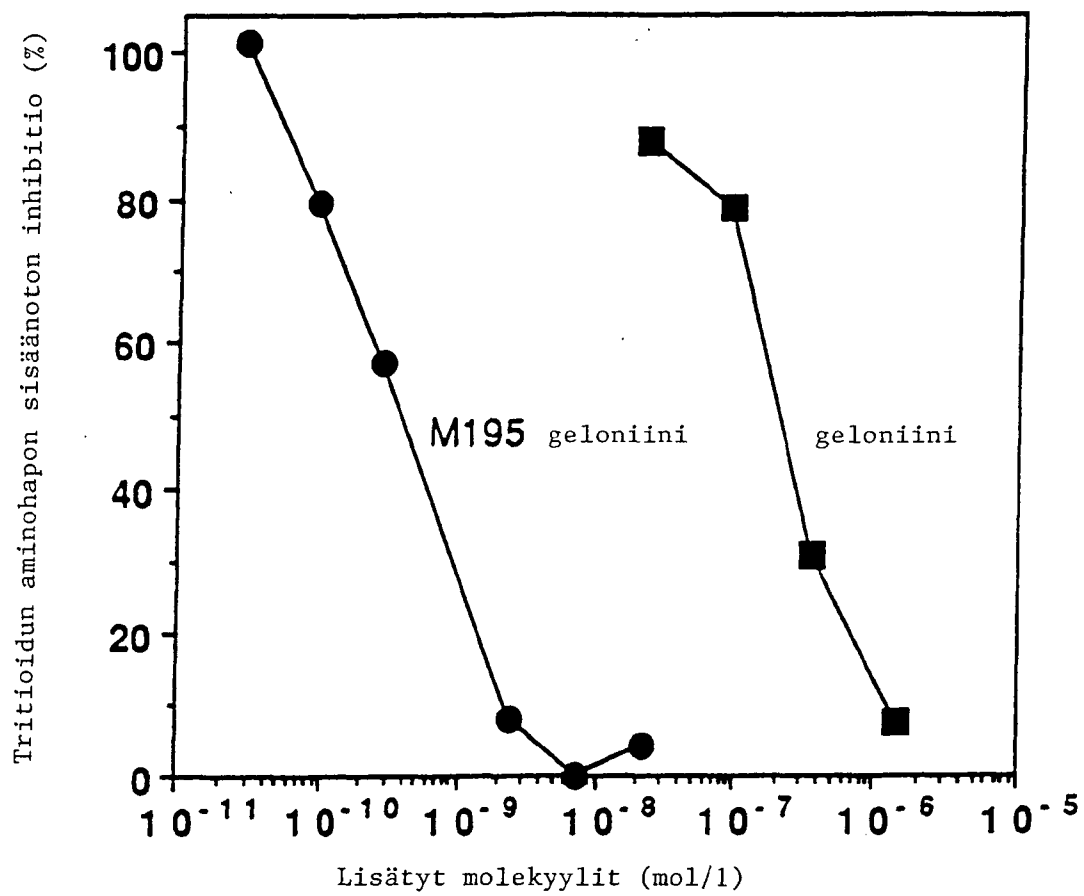


FIG. 1

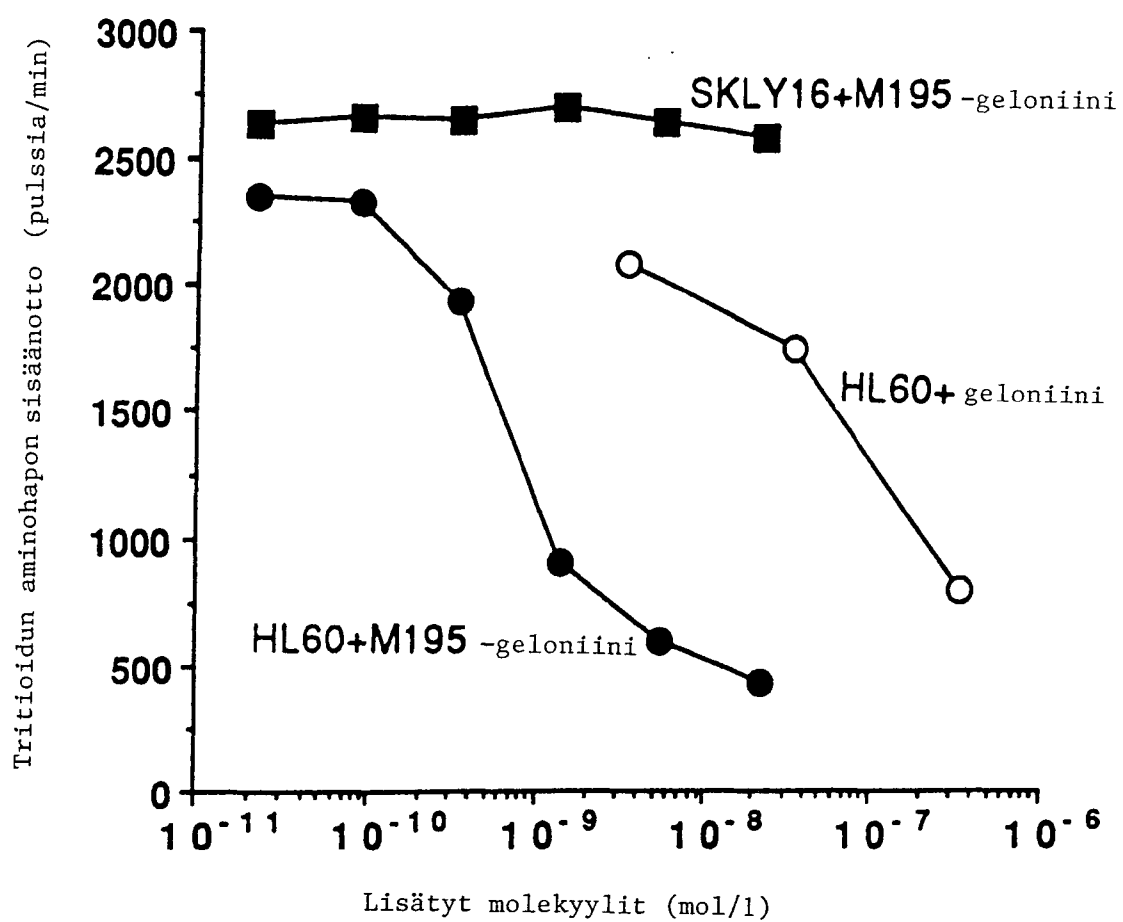


FIG. 2

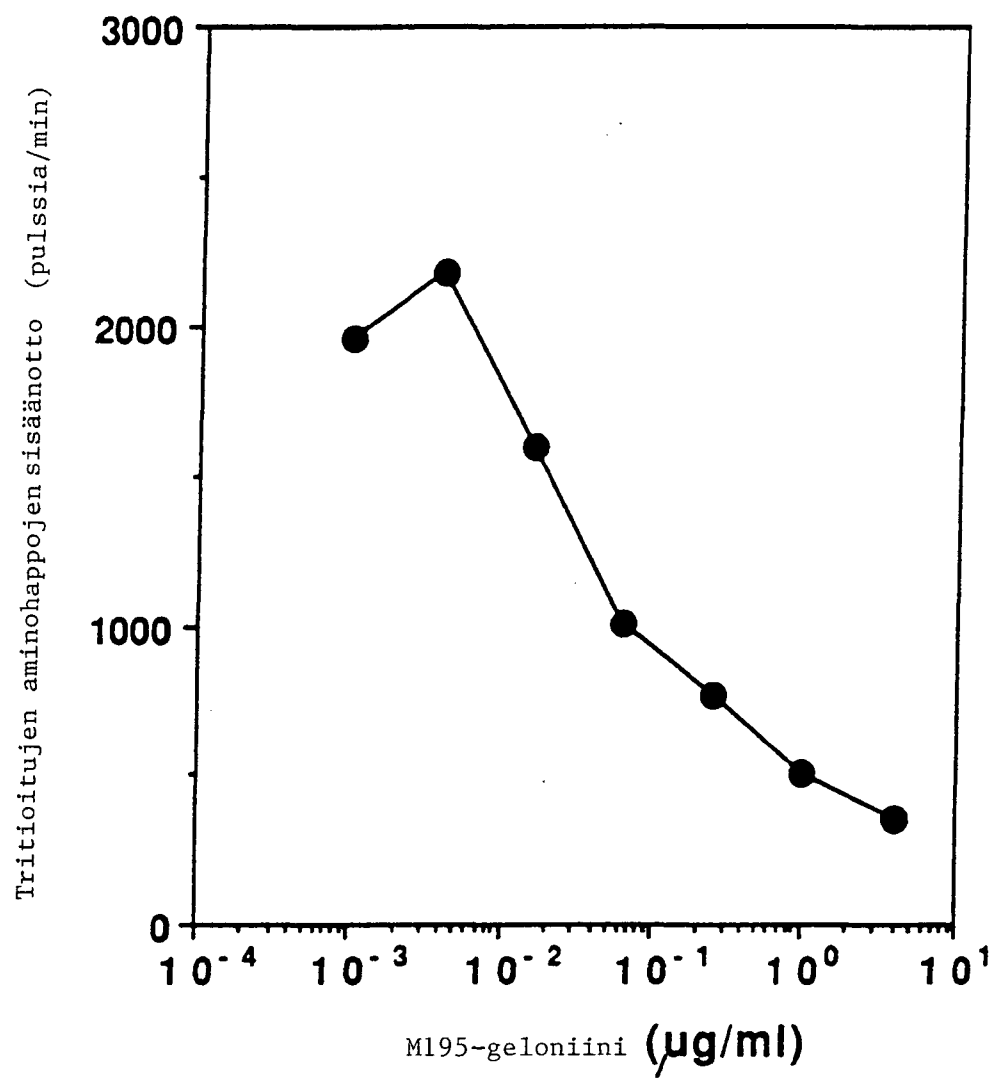


FIG. 3

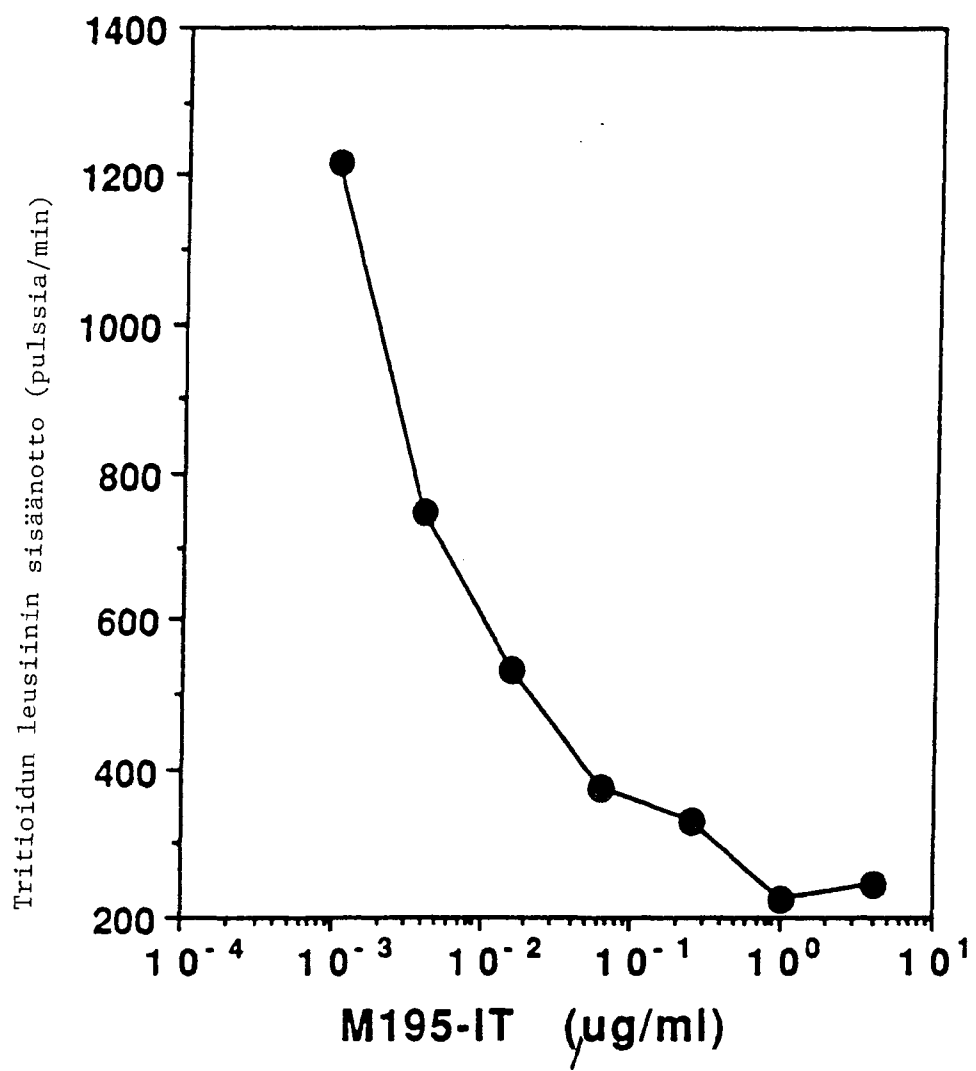


FIG. 4

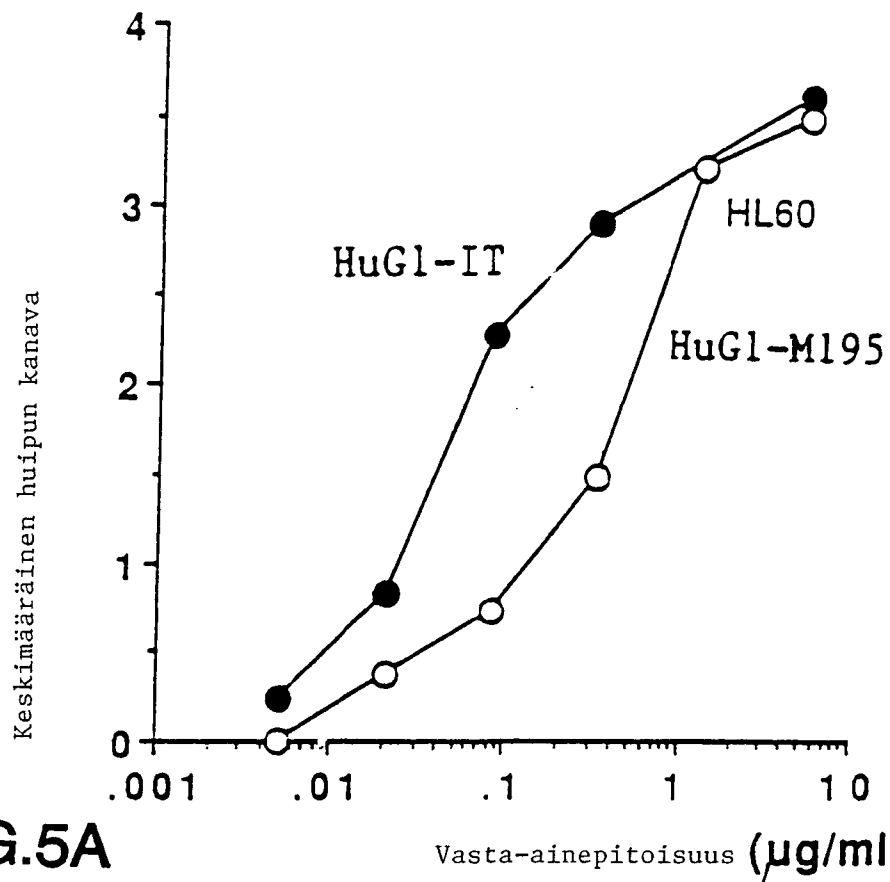


FIG.5A

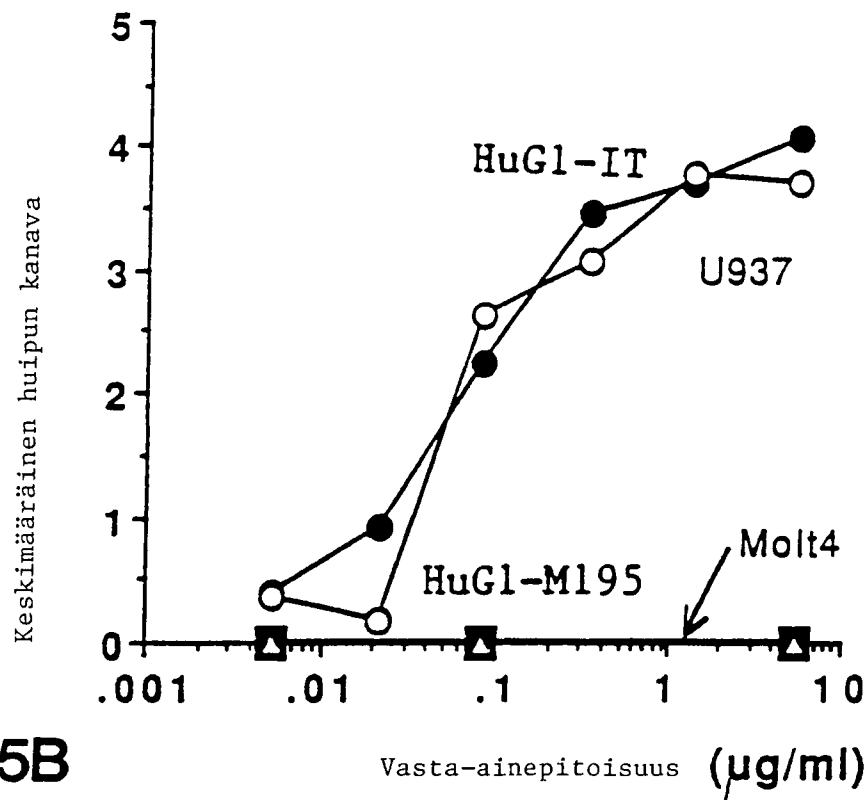


FIG.5B

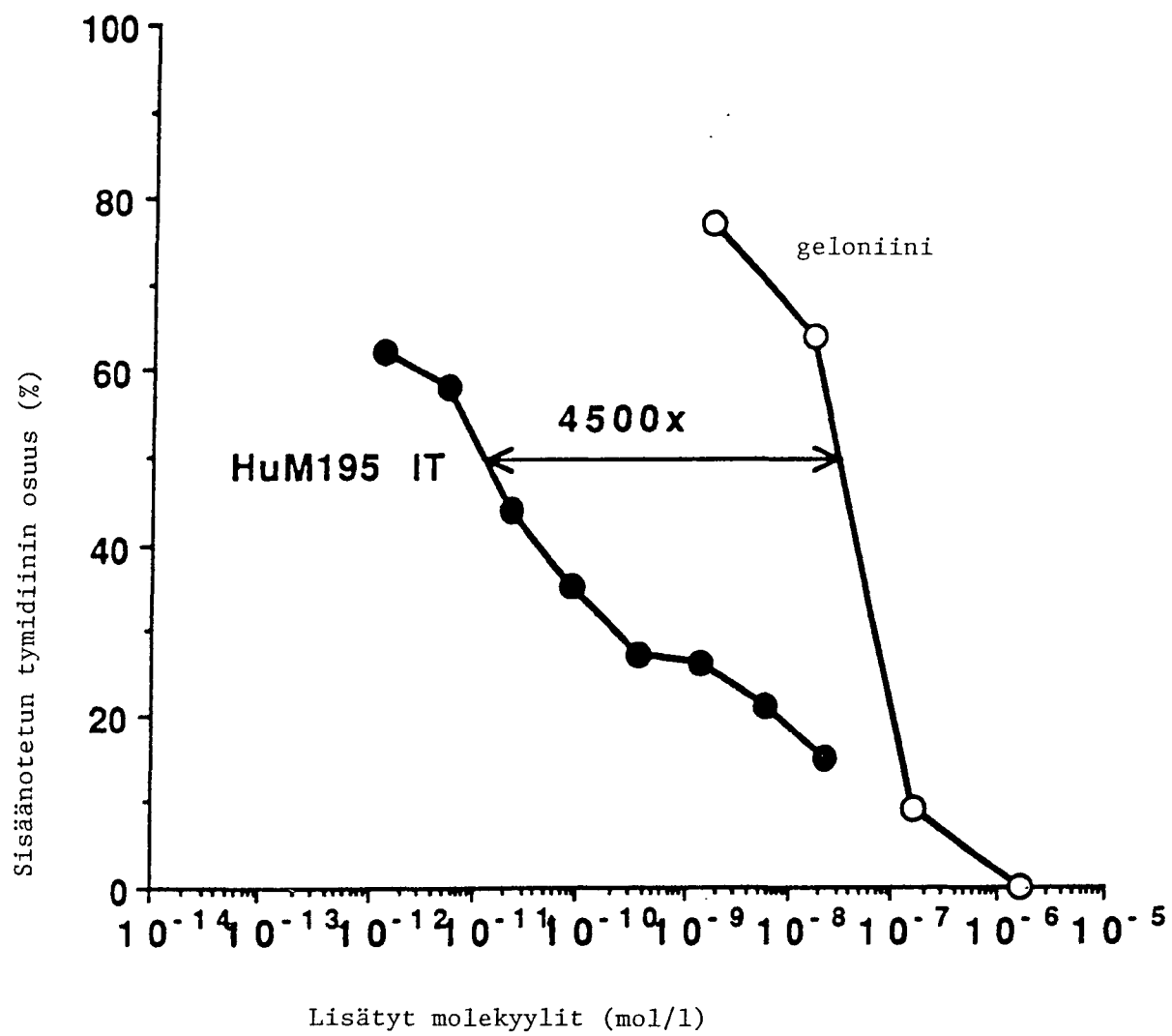


FIG. 6

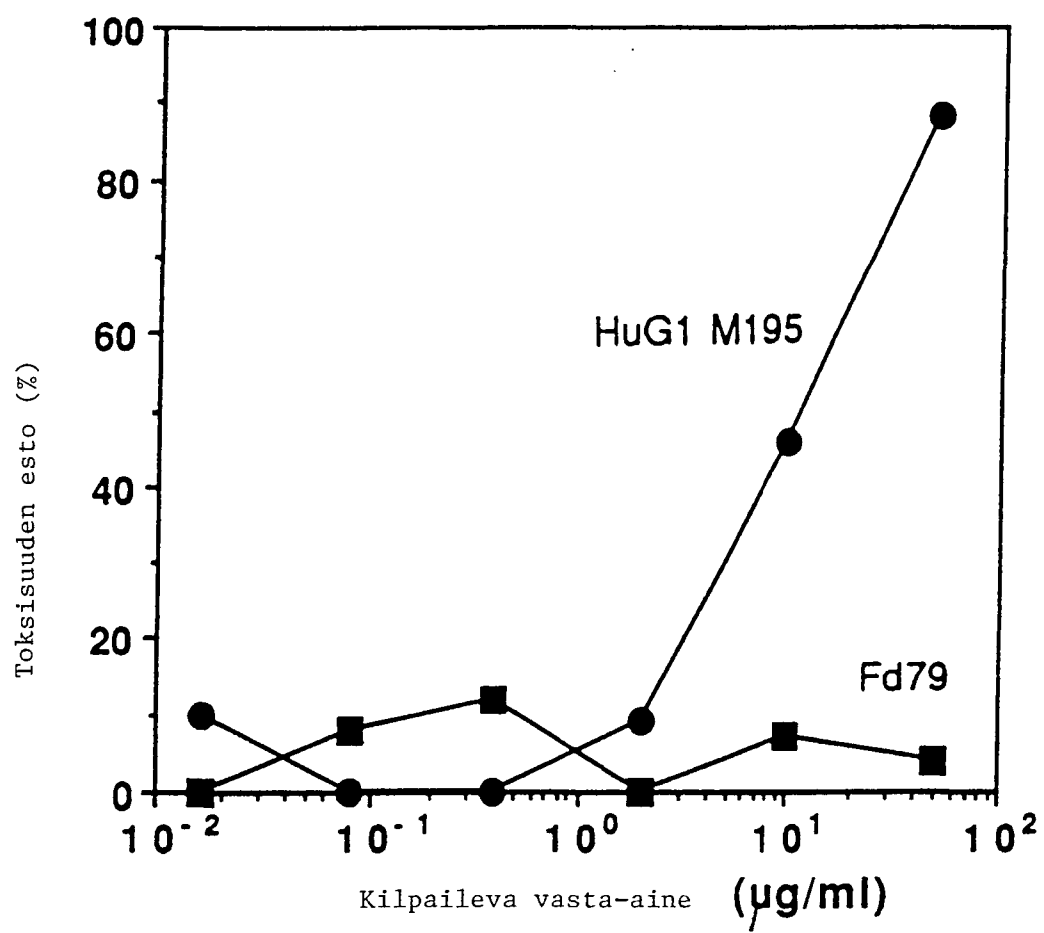
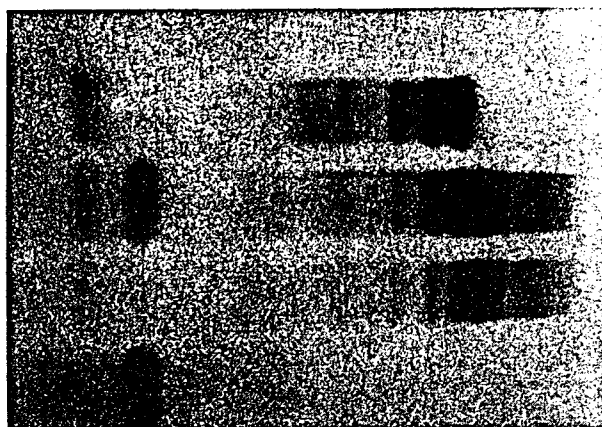


FIG. 7



- M-195
- RXN-seos
- Puhdistettu
M-195-geloniini
- geloniini

FIG. 8