

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 881579 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **881579**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 47/00
A61K 9/08
A61K 9/10

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **05.08.1987**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **06.04.1988**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **06.04.1988**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **05.08.1987** **PCT/EP1987/000435**
Internationell ansökan - International
application

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

07.08.1986 AT 86810347.4

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Battelle Memorial Institute, 7, route de Drize 1227 Carouge, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Myers, Andrew, Switzerland, SVEITSI, (CH)
2 •Bichon, Daniel, France, RANSKA, (FR)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Boco IP Oy Ab, Itämerenkatu 5, 00180 Helsinki

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

Syöväntvastainen terapia ja sytotoksiset lääkkeet sen suorittamiseksi.

Anticancerterapi och cytotoxiska läkemedel för utförandet därav.

Syövänvastainen terapia ja sytotoksiset lääkkeet sen suorittamiseksi

Anticancerterapi och cytotoxiska läkemedel för utförande därav

Keksintö käsittelee uusia solumyrkkylääkkeiden selektiiviseen kuljetukseen kasvainsoluihin tarkoitettuja kemiallisia liittoyhdisteitä, konjugaatteja, sekä menetelmiä kasvainsolujen tuhoamiseksi tällaisia konjugaatteja käyttäen.

Tunnetusti tämänhetkisessä syöpäterapiassa käytetään mitoosia estäviä lääkeaineita, kuten adriamysiiniä, vinkristiiniä, cis-platinaa, daunomysiiniä ja metotreksaattia, joista jokaisella on voimakkaita epätoivottuja sivuvaikutuksia potilaan terveisiin soluihin. Tämän vuoksi olisi tärkeätä ohjata kasvainvastaisten lääkkeiden aktiivisuus kohdistumaan spesifisesti syöpäsoluihin, jolloin niiden myrkkyyvaikutus terveisiin soluihin olisi vähäinen.

Erään lähestymistavan sytotoksisten aineiden selektiiviseksi kuljettamiseksi kasvainsoluihin mukaan käytetään vasta-aineita, jotka sitoutuvat ensisijaisesti kasvainliitteisiin tai kasvainspesifisiin antigeeneihin, kuten esimerkiksi alfafetoproteiinia. Vasta-aine voi olla radioaktiivisesti leimattu tai se on mahdollisesti konjugoitu johonkin toksiiniin, kuten hematoporfyriniin, abriiniin, risiiniin, difteriatoksiiniin, Pseudomonas-eksotoksiiniin, geloniiniin tai johonkin edellä viitattuun mitoosia estävään lääkeaineeseen. Yleiskatsauksien osalta katso K. Sikora et al., (1984), Br. Med. Bull., 40, 233-9; ja P.C. Thorpe et al., (1985), in Monoclonal Antibodies B4, Biological & Clinical Applications. Edelleen Pastan kuvaa US-patenttijulkaisussa 4 545 985 Pseudomonas-eksotoksiinin sitoutumista vasta-aineisiin, esimerkiksi spesifisten humaanisolureseptorien, kuten transferriinireseptorin vasta-aineisiin.

Vasta-aineiden käyttöön kohteeseen ohjaavina aineina liittyy lukuisia haittapuolia, joita kuvaavat I. Pastan et al., Cell **47** (1986) 641...648. Ensinnäkin vasta-ainekonjugaattien siirtyminen soluihin on erittäin vaihtelevaa sen ollessa riippuvaista sekä kyseessä olevasta vasta-aineesta että kyseessä olevista soluista. Toiseksi itse vasta-aine saattaa omata vasta-aineita tuottavaa vaikutusta ja siten stimuloida potilaassa immuunivasteen, mikä rajoittaa konjugaattiyhdisteen tehokkuutta. Kolmanneksi vasta-aine saattaa sitoutua terveisiin, vasta-aineen tunnistamaa antigeeniä omaamattomiin soluihin Fc-reseptorien välityksellä, joita esiintyy useantyyppisissä ei-kasvainsoluissa ja jotka kykenevät reagoimaan useiden vasta-aineiden kanssa. Neljänneksi on vaikeata kiinnittää suurta määrää lääkemolekyyliä vasta-aineeseen vaikuttamatta kielteisesti tämän antigeenisitomisasiivisuuteen (Hurwitz et al., Cancer Res. **35** (1975) 1175...1181). Lopuksi vasta-aineiden korkea molekyylipaino heikentää niiden kykyä tunkeutua solujen välissä sijaitseviin kasvaimiin (ks. Delabye, et al., (1986), J. Clin. Invest. **77**; 301...311; Buchegger et al., (1983), J. Exp. Med. **158**: 413...427; Buchegger et al., (1986), Cancer, **58**, 665...671).

Toisen lähestymistavan mukaan lääke kiinnitetään polyamino-happokantajaan, mikä vähentää sen solumyrkkyvaikutusta terveisiin soluihin. Tämä kantaja voi käsittää suuren määrän lääkemolekyyliä. Lääkekantajakompleksissa aminohappo-osuuden tai -sekvenssin on tarkoitus edesauttaa solumyrkyn vapautumista ensisijaisesti kasvainsolujen kohdalla näiden tunnetusti korkeina pitoisuuksina sisältämien hajotusentsyymien avustuksella. Esimerkiksi lähteessä Zunino et al., Int. J. Cancer **30** (1982) 465...470, kuvataan poly-L-asparagiinihappoon kytketyn daunorubisiinin kasvainvastaista aktiivisuutta ja lähteessä Kato et al., Cancer Res. **44** (1984) 25, kuvataan polyglutaminihappoon konjugoidun sytosiiniarabinosidin kasvainvastaista aktiivisuutta. Lähteissä W.A.R. van Heeswijk et al., (1985), J. Controlled Release **1**, 301...315 ja Hoes et al., (1985), J. Controlled release **2**, 205...213, kuvataan muita polyglutamii-

nihapporungon käsittäviä konjugaatteja, joissa on sidottu adriamysiini peptidivarren avulla.

On kuvattu niinikään kasvainohjautuvan vasta-aineen ja hajoavaan polyaminohappokantajaan kiinnitetyn solumyrkkylääkkeen yhdistelmää. Esimerkiksi Kato et al., J. Medicinal Chem. 27 (1984) 1602...1607 kuvaavat daunomysiinin (DM) konjugointia polyglutamiinihappoon (PGA) sekä saatavan sytotoksisen polymeerin kytkemistä rotan alfa-fetoproteiini-(AFP-) vasta-aineeseen. Suoritetuissa kokeissa osoitettiin, että saatavan anti-AFP-PGA-DM-konjugaaatin sytotoksinen aktiivisuus oli tehokkaampaa kuin nig:n (kontrollivasta-aine), anti-AFP:n, ei-konjugoidun DM:n, PGA-DM:n tai nig-PGA-DM:n.

Vastaavasti EP-hakemusjulkaisussa 112 720 (Teijin) julkistetaan konjugaatti, joka käsittää tapettavan solutyypin omaamaan tiettyyn antigeeniin selektiivisesti sitoutumaan kykenevän immunoglobuliinin, polymeerikantajan sekä siihen liitetyn sytotoksisen aineen, kuten esim. p-(N,N-bis(2-kloorietyyli))-fenyleenidiamiini, melfalaani, l-(beta-D-arabinofuranosyyli)-sytosiini sekä sen fosfaatti, metotreksaatti, aktinomysiini D, mitomysiini C tai muu vastaava, kun taas Runge, US-patenttijulkaisussa 4 485 093, kuvaa syöpäsairauksien hoitoon tarkoitettua immunotoksiinikonjugaattia, joka koostuu arsaniliinihaposta ja polyglutamiinihapporunkoon kovalenttisesti sidotusta kasvainspesifisestä vasta-aineesta.

Valitettavasti polyaminohappokantajan käytöllä ei ratkaista kaikkia immunotoksiinien käyttöön liittyviä ongelmia. Suoraan solumyrkkyyhin konjugoitujen vasta-aineiden käyttöön liittyvien ongelmien lisäksi saattaa tällaisten kantajien lisääminen vasta-aineisiin, tai jopa pienehköihin Fab-fragmentteihin, epätoivottavalla tavalla edelleen heikentää vasta-aineiden kykyä tunkeutua tehokkaasti kasvaimiin.

Pastan, US-patenttijulkaisu 4 545 985, esittää Pseudomonas-eksotoksiinin (PE) konjugoimista erilaisiin kohdesolujen

käsittämien spesifisten reseptorien kanssa reagoiviin peptideihin, proteiineihin ja kasvutekijöihin, kuten johonkin sarkoomakasvutekijään, melanosyyttejä stimuloivaan hormoniin, somatostatiiniin, glukagoniin, insuliiniin, transferriiniin, alhaisen tiheyden omaavaan lipoproteiiniin (LDL), kalsitoniniin, alfa-2-makroglobuliiniin tai lysiinibradykiniiniin. Pastan rakensi konjugaatin Pseudomonas-eksotoksiinista (PE) sekä hiirestä eristetystä peptidihormonista, orvaskeden kasvutekijästä (EGF), liittämällä tioliryhmiä kumpaankin ja sitten kytkemällä kyseiset kaksi ainetta toisiinsa disulfidivaihtoreaktion avulla. Konjugaatti oli myrkyllinen KB-kasvainsoluille, mutta paljaat hiiret, joihin oli ruiskutettu konjugaattia, kuolivat maksan toiminnan pysähtymiseen. KytKentä poisti toksiinin kyvyn sitoutua omaan reseptoriinsa, jolloin myrkkyyvaikutus välittyi maksasoluihin niiden käsittämien EGF-reseptorien välityksellä.

N. Shimizu et al., FEBS Lett. 118 (1980) 274...278, ilmoittivat valmistaneensa kovalenttisen konjugaatin EGF:stä ja difteriatoksiinista. Lisäksi Cawley ja Herschman, Cell 22 (1980) 563...570), ja Simpson et al., Cell 29 (1982) 469...673, ovat julkistaneet konjugaatteja, joissa EGF on kovalenttisesti sidottu disulfidisillan välityksellä risiinin polypeptidi A-ketjuun tai difteriatoksiiniin. Nämä EGF-konjugaatit osoittivat yleensä korkeaa mutta epäsäännöllisesti vaihtelevaa myrkyllisyyttä erilaisille tavallisille soluille.

(Eri lajeista peräisin olevan EGF:n, mukaanlukien ihmisestä peräisin olevan muodon (kutsutaan myös urogastroniksi), tai sen muiden muunnoksien tai analogien, valmistus- ja eristysmenettelyiden sekä eri muotojen ominaisuuksia käsittelevien selostuksien osalta katso WO85/00369 (Chiron); WO83/04030 (Applied Molecular Genetics); Nishimura, US 4 523 186; EP-A 46039 (G.D. Searle); EP-A 128733 (Genentech); Komoriya, WO85/01284; Wakanuga, EP-A 131 868 ja Camble, US 3 917 824.)

Sittemmin on julkistettu muita samantapaisia ei-immunoglobuliinipeptidin ja solumyrkyn käsittäviä konjugaatteja. Esimerkiksi Bacha et al., J. Biol. Chem., 258, (1983) 1565...1570, kuvaavat tyrotropiinia vapauttavasta hormonista (TRH) sekä difteriatoksiinisukuisesta polypeptidistä koostuvia konjugaatteja, jotka olivat myrkyllisiä aivolisäkekasvainsoluille; ja O'Keefe ja Draper, J. Biol. Chem., 260 (1985) 932...937, luonnehtivat transferriinidiftgeriatoksiinikonjugaattia, joka oli myrkyllinen hiirisoluviljelmille. Lisäksi Murphy et al., Proc. Nat. Acad. Sci, USA 83 (1986) 8258...8262, kuvaavat erään geenirekombinaatioproteiinin melanoomasolujen suhteen selektiivistä sytotoksisuutta, joka on rinnastettavissa alfa(melanosyyttejä stimuloivan)hormonin (MSH) ja difteriatoksiinisukuisen solumyrkyn kovalenttiseen konjugaattiin. JP-patenttijulkaisussa 60163824 (Nippon Shinyaku KK) julkistetaan lääkeaineenkantaja, joka käsittää proteiinin, kuten seerumiproteiinin (esim. LDL:stä) saatavan apolipoproteiinin sekä lipidin ja joka on rakennettu farmaseuttisen ainesosan selektiiviseksi kuljettamiseksi kohdekudokseen.

Myös tässä tapauksessa suoraan edeltävien oppien mukaisesti johonkin peptidihormoniin tai johonkin kasvutekijään kiinnitettävien toksiinimolekyylien määrää rajoittaa välttämättömyys säilyttää reseptorisitoutumisaktiivisuus. Lisäksi tällaiset ei-immunoglobuliinin ja solumyrkyn muodostamat konjugaatit saattavat olla erittäin myrkyllisiä sopivat reseptorit sisältäville terveille soluille.

Emme myönnä, että mikään edeltävistä lähdejulkaisuista muodostaisi haitallista "tekniikan tasoa" ja kaikki esitetyt kuvaukset perustuvat julkaisuihin eikä ensikäden tietoon julkaisuissa kuvatusta tutkimustyöstä.

Keksinnön yhteenveto

Keksinnön kohteena on kasvainsolujen tuhoaminen uudella konjugaattilääkkeellä, joka käsittää:

- a) ensimmäisen osan "kotiuttavan aineen", joka on ensisijaisesti kasvainsolureseptoriin sitoutuva ei-immunoglobuliini ja joka siirtyy soluun, ja
- b) toisen osan, joka on kovalenttisesti sidottu ensimmäiseen osaan ja joka käsittää biohajoavan polymeerikantajan sekä siihen kiinnitetyn yhden tai useamman tyyppisen sytotoksisen molekyylin.

Solunsisäisten entsyymien hajottaessa kantajaa solumyrkky vapautuu, mikä johtaa solun tuhoutumiseen. Edullisesti ensimmäinen osa spesifisen sitoutumisensa kasvainsoluun ohella edistää niinkään konjugaatin siirtymistä kyseiseen soluun. Konjugaatin terapeuttisen indeksin kasvattamiseksi on samoin toivottavaa, että kantaja on erityisen herkkä kasvainsoluliitteisten solunsisäisten entsyymien vaikutukselle.

Kotiuttava aine on edullisesti peptidi- tai proteiinikasvutekijä. Eräs erityisen edullinen kotiuttavien aineiden luokka käsittää hiiren orvaskeden kasvutekijän sekä muita sukulaiskasvutekijöitä, kuten humaani-EGF (urogastroni), alfa-transformoiva kasvutekijä (TGF-alfa), ja lehmänrokkoviruskasvutekijä, jotka sitoutuvat ensisijaisesti EGF:ää sitovia reseptoreita omaaviin kasvainsoluihin ja siirtyvät mainittujen reseptorien välityksellä tehokkaasti soluihin. Kasvutekijä voidaan puhdistaa luontaisista lähteistä, se voidaan syntetisoida vaiheittaisen peptidisynteesin avulla tai se voidaan eristää soluista, jotka on geneettisesti manipuloitu ilmaisemaan kyseinen tekijä. Kotiuttava aine voi olla luontaisesti esiintyvä kasvutekijä, kyseisen tekijän synteettinen kopio tai kyseisen tekijän aktiivinen analogi tai osa. Aine voi olla myös kyseisen tekijän pro-muoto, jonka kohteen elimistö muuttaa aktiivisessa muodossa olevaksi tekijäksi.

Huomattakoon, että kasvainsoluskaala, joihin nämä kotiuttavat aineet kykenevät sitoutumaan, vaihtelee aineesta toiseen. Humaani-EGF (urogastroni), TGF-alfa ja lehmänrokkoviruskasvutekijä sitoutuvat kukin samaan reseptoriin (jota tässä kutsu-

taan EGF-reseptoriksi) ja samalla affiniteetilla kuin hiiri-EGF (DeLarco and Todaro, (1978), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 4001...4005), minkä vuoksi niiden arvellaan osoittavan samankaltaista spesifistä sitoutumista kasvainsoluihin kuin hiiri-EGF. Lisäksi EGF ja sukulaiskasvutekijät stimuloivat yleensä solujen replikaatiota EGF-reseptoriin sitoutuessaan, mihin niiden nimetkin viittaavat. Lisäksi TGF-alfa tuottavat monet kiinteät humaanikasvaimet (Derynck et al., (1987) Cancer Res., 47, 707...712), joissa sen arvellaan toimivan itsestimuloivana (autokriinina) kasvutekijänä (Sporn and Todaro, (1980), N. Engl. J. Med. 303, 878...880). Vapautuvan TGF-alfaan (tai muuhun EGF-sukulaispeptidiin) kytketyn solumyrkyn tulisi olla selektiivisesti myrkyllinen näille kasvaimille, ei ainoastaan reseptorivälitteisen aineen siirtymisen soluihin ansiosta vaan myös siksi, että kasvutekijän mittoosia edistävä vaikutus oletettavasti indusoi herkkyyden lisäystä mittoosia estävien aineiden suhteen. Toisin sanoen kotiuttava aine voi tehdä reseptoreita sisältävistä soluista herkempiä lääkkeen tappavalle vaikutukselle kyseisiin soluihin siirryttyään.

Erityisesti useat tutkijat ovat osoittaneet EGF-reseptorien olevan läsnä suurina pitoisuuksina useiden suomusolusyöpien yhteydessä, kuten muidenkin syöpien ja samoin sarkoomien yhteydessä. Kyseist tulokset koskevat rinta-, keuhko-, aivo- ja ihokasvaimia. (katso seuraavat viitteet: Liberman et al., (1984), Cancer Res 44, 753...760; Merlino et al., (1984), Science 224, 417-419; Kamata et al., (1986), Cancer Res. 46, 1648...1653; Singletary et al., (1987), Cancer Res 47, 403...406; Hunts et al., (1985), Jpn. J. Cancer Res. 76, 663...660; Barknecht et al., (1985), Dermatologica 171, 16...20)

Myös muut peptiditekijät, jotka eivät ole EGF:n sukulaisyhdisteitä, voivat toimia tämän keksinnön käytännössä kotiuttavina aineina eri kasvainsolutyyppien yhteydessä. Esimerkiksi verihiutaleperäinen kasvutekijä (PDGF) on kahdesta noin 30 000 D:n molekyyllipainon omaavasta sukulaispeptidistä koostuva dimeeri, jota vapautuu verihiutalejyväsistä veripaakkujen muodostuessa.

Se on välttämätön sileiden lihaksien soluille, sidekudosta muodostaville soluille sekä muille mesenkyymisoluille, mutta ei epiteeliluonteisille tai veren muodostukseen liittyville soluille (Cochran ja Stiles Cell 33, (1983) 939...947). Sitouduttuaan solureseptoreihin PDGF siirtyy soluihin (Nilsson et al., (1983), Proc. Natl. Acad. Sci, 80, 5592...5596). Fuusio-proteiini, joka sisälsi 80 aminohappoa SV40t-antigeenista liitettyinä yhden PDGF-ketjun aminopäätyyn, siirtyi aktiivisesti soluihin (Wang and Williams, (1984), J. Bio. Chem. 259, 10645...10648), mikä viittaa siihen, että PDGF:n voidaan olettaa, samaan tapaan kuin EGF:n, kykenevän kantamaan materiaalia ensisijaisesti oikeat reseptorit käsittäviin soluihin.

Tiedetään niinikään, että tietyt kasvainsolut, mukaanlukien hermon tukisolusyöpä-, luusyöpä- ja alkiosyöpäsolut sekä syövän transformoimat sidekudosta muodostavat solut tuottavat PDGF:ää viljelmissään (Van Zoelen et al., (1985), Mol. Cell. Biol. 5, 2289...2297), mikä viittaa mahdolliseen itsestimuloivaan vaikutukseen samaan tapaan kuin TGF-alfan kohdalla oletettu. Täten PDGF saattaa soveltua viemään kyseisen keksinnön mukaisia sytotoksisia konjugaatteja kyseisten kasvaimien luo sekä siirtämään ne sitten kasvainsoluihin.

Toisella mahdollisella kotiuttavalla aineella, hermokasvutekijällä (NGF), joka on suunnilleen samansuuruisen molekyylipainon kuin EGF omaava peptidi, ei ole vaikutusta differentioituneisiin keskushermoston tukisoluihin, tai on vain vähäinen vaikutus, mutta sen sijaan se hidastaa merkittävästi differentioitumattomien hermon tukisolukasvainsolujen kasvua (Vinores and Koestner, (1980), Cancer Lett 10, 309...318). NGF:n on todettu vähentävän hermokasvainten spesifistä indusoitumista etyylinitrosoarealla (Vinores and Perez-Polo, (1980), J. Cancer Res. Clin. Oncol., 98, 59...63) sekä takauttavan anaplastisten hermon tukisolukasvainsolujen morfologista transformoitumista (Koestner, (1985), Toxicol. Pathol. 13, 90...104). Täten ilmeisesti jotkut aivokasvaimet kykenevät tunnistamaan NGF:n ja tuottamaan sille vasteen.

Koska tavalliset differentioituneet keskushermoston tukisolut eivät tuota vastetta NGF:lle oletetaan, että NGF:ään konjugoidut sytotoksiset aineet tuhoavat ensisijaisesti NGF:lle vasteen tuottavia aivokasvainsoluja. NGF:n vastaista vasta-ainetta on käytetty melanooman diagnoosissa ja hoidossa (Ross et al., EP-hakemusjulkaisu 202 005, US-patenttijulkaisu 723 760), mikä viittaa siihen, että nämä kasvaimet mahdollisesti tuottavat vasteen myös NGF:lle.

Samoin transferriiniä voitaisiin käyttää kotiuttavana aineena solumyrkkylääkkeiden viemiseksi kasvaimiin, koska samoin kuin EGF transferriinireseptorikompleksit siirtyvät soluihin (Karin ja Mintz (1981) J. Biol. Chem 256: 324...3252). O'Keefe ja Draper, (1985), J. Biol.Chem., 250, 932...937 ilmoittavat, että transferriinidifteriatoksiinikonjugaatin myrkkyyvaikutus katosi ylimäärän transferriiniä läsnäollessa, mikä osoitti tämän konjugaatin siirtyneen soluihin transferriinireseptorien välityksellä. Pastanin (US-patenttijulkaisu 4 545 985) mukaan transferriinireseptorin vastaisia vasta-aineita voidaan käyttää toksiinien kuljettamiseksi kasvaimiin erityisesti täysikasvuisen henkilön T-soluleukemian kyseessä ollen. Transferriiniä käytetään niinkään radiokuvanmuodostuksessa kasvaimista (NTIS Tech. Note (NTN85-0891) (1985), mikä osoittaa transferriinin sitoutuvan ensisijaisesti näihin kasvaimiin.

Keksinnön mukaisessa käytännössä muutkin peptidit saattavat toimia kotiuttavina aineina. Esimerkiksi alfa(melanosyyttejä stimuloiva)hormoni (alfa-MSH), edelleen pieni peptidihormoni, liitettiin geeniteknologian avulla sytotoksiseen proteiiniin ja julkaistujen tietojen mukaan saatu fuusioproteiini oli myrkyllistä melanoomasoluille (Murphy et al., (1986), Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 83, 8258-8262). Samoin tyrotropiinia vapauttava hormoni (TRH), tripeptidi, on konjugoitu difteriatoksiinisukuisiin polypeptideihin ja saatavat konjugaatit siirtyvät ilmeisesti ainoastaan TRH-reseptoreita käsittäviin

soluihin (Bacha et al., (1983), J. Biol. Chem. 258, 1565... 1570).

Kotiuttavaa ainetta valittaessa tulisi ottaa huomioon seuraavat määreet:

- a) kotiuttavan aineen tulee terveisiin soluihin verrattuna olla erittäin spesifinen kasvainsoluille;
- b) kotiuttavan aineen tulisi sitoutua laajassa valikoimassa kasvainsoluja esiintyviin reseptoreihin;
- c) kotiuttavan aineen tulisi edistää konjugaattien siirtymistä soluihin (reseptorivuorovaikutus)
- d) kotiuttavan aineen tulisi stimuloida solujen lisääntymistä ja/tai niiden metaboliaa tehden täten kohdesolut alttiimmiksi solumyrkyn mitoosia estävälle tai muulle metaboli-vastaiselle vaikutukselle;
- e) kotiuttavan aineen tulisi olla riittävän pienikokoinen tunkeutuakseen tehokkaasti kasvainsoluihin; ja
- f) käytettävissä on oltava sopivat kemialliset menettelytavat solumyrkky-yhdisteen käsittävän kantajan kytkemiseksi kotiuttavaan aineeseen.

Keksinnön mukaisen konjugaatin toisen osan muodostaa solumyrkyn polymeerikantaja ja se käsittää lukuisia toistuvia yksiköitä, joista kunkin rakenne on alla esitetyn kaavan (I) mukainen:



jossa p on edullisesti 1 tai 2, x on edullisesti noin 0...20, A on liittäjä, edullisesti aminohappojäännös, ja x:n ollessa suurempi kuin 1, aminohappojäännökset A_x voivat olla identtiset tai poiketa toisistaan. T on joko hydroksyyli-ryhmä tai sytotoksinen yhdiste. Yksiköt voivat olla identtisiä tai niissä p, x, A_x ja T voivat vaihdella. Luonnollisesti ainakin

yhden yksiköistä tulee käsittää sytotoksinen molekyyli, jotta konjugaatilla olisi sytotoksista vaikutusta.

Itse konjugaatin sytotoksisuus terveille soluille on edullisesti verraten alhainen yhdisteeseen T vapaassa muodossaan verrattuna. T vapautuu solujen sisällä sytotoksisessa muodossaan soluentisyymien vaikutuksesta, edullisesti sellaisten entsyymien, jotka ensisijaisesti ilmaistuvat kasvainsoluissa.

Sivuketjujatkeen A_x , jossa A voi vaihdella tavallisten aminohappojen välillä ja x on edullisesti noin 0...20, liittämisesä käytetään tavallisia peptidisynteesimenetelmiä. Oletetaan, että vapaille sytotoksisille yhdisteille tyypillisen myrkkyyvaikutuksen ensisijainen ilmeneminen syöpäsoluissa on konjugaatin solunsisäisen entsyymaattisen hajoamisen, jossa vapautuu joko sytotoksista yhdistettä tai sen aktiivista johdannaista, funktio. Ensisijaista vapautumista syöpäsoluissa voidaan täten ohjata pahanlaatuisten ja terveiden solujen välisen entsyymiaktiivisuuden erilaisen luonteen tai tason tuottaman differentiaalin avulla.

Lukuisiin kasvaimiin liittyy proteolyysiaktiivisuuden, mukaan lukien glutamyylitransferaasiaktiivisuuden, kohonnut taso (katso W.A.R. van Heeswijk, et al., (1984), julkaisussa Recent Advances in Drug Delivery Systems, Proc. Int. Symp., 1983, Plenum Press, N.Y., Anderson, J.M. ja Kim, S.W., eds., pp 77-100), jolloin solumyrkkyliäkkeen kasvainspesifinen vapautuminen mahdollistuu ehkä joko polyglutamiinihapon glutamiinihapposivuketjun γ -karboksyylin kanssa suoraan muodostuneesta sekundäärisestä amidisidoksesta tai sitten A_x :ään sisältyvän tai sen ketjun päättävän glutamyylijäännöksen kanssa muodostuneesta vastaavanlaisesta sidoksesta. Lisäksi tällaisen entsyymaattisen pilkkoutumisen polyglutamiinihappo- γ -karboksyylin kohdalta tai yleisen proteolyyttisen pilkkoutumisen A_x :ssä tai polyglutamiinihappopolymeerirungossa seurauksena saattaa vapautua sytotoksisen yhdisteen peptidyyli-prolääkettä, jota lysotsyymit edelleentyyöstävät, jolloin γ -glutamyylitrans-

feraasi liittyy reaktioihin silloin, kun lääke on -kytketty glutamiinihappojäännökseen A_x :ssä.

Solunsisäisen lääkkeen vapautumisen laajuuteen ja nopeuteen voi täten A_x -osuuden ketjupituuden ja luonteen vaihtelulla olla merkittävä vaikutus. Nautaseerumialbumiinidaunomysiini-konjugaatissa tällaisen lysotsyymien toimesta tapahtuvan solutyöstön ovat A. Trouet et al. ((1982), Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 626; and (1980), J. Med. Chem., 23, 1166-1171) osoittaneet vaihtelevan laajalti proteiinin ja lääkkeen välissä sijaitsevan peptidiosuuden ketjupituudesta ja sekvenssistä riippuen.

Sytotoksinen yhdiste valitaan DNA:n synteesiä ja sen toimintaa inhiboivista aineista (esim. adriamysiini, daunomysiini, bleomysiini, melfalaani, klorambusiili, cis-platina), sekä mikrotubuuli- (mitoosisukula-) muodostusta ja -toimintaa inhiboivista aineista (esim. vinblastiini, vinkristiini) tai anti-metaboliiteista (esim. metotreksaatti) tai näiden tai muiden vaikutusmekanismien yhteydessä sytotoksista yhdisteistä. Syöpälääkeyhteenvetojen osalta katso: A Synopsis of Cancer chemotherapy, R.T. Silver, R.D. Lauper, ja C.I. Jarowski, Dunn-Donnalley Publishing Corp., N.Y., 1977; Cancer Treatment Symposia: Compilation of Phase II Results with Single Anti-neoplastic Agents, NIH Publication No. 85-2739, 1985; NCI Investigational Drugs: Pharmaceutical Data, NIH Publication No. 86-2141. 1986.

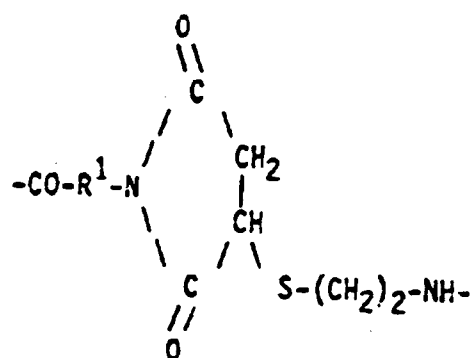
Edullisesti vähintään 10% kaavan (I) mukaisista yksiköistä sisältää sytotoksisen aineen (joka ei välttämättä ole kaikkien yksiköiden kohdalla sama). Kuitenkin edullisempana pidetään korkeampaa substituutioastetta, ellei tällöin konjugaatin soluspesifisyys oleellisesti vähene.

Toistuvien yksiköiden lukumäärä ei ole määrätty, mutta se on edullisesti noin 20-300. Polymeerikantajan molekyyllipaino on edullisesti riittävän korkea, jotta vaikka se kotiuttavasta aineesta kasvainsoluihin edeltävästi irtoaisikin se ei kuiten-

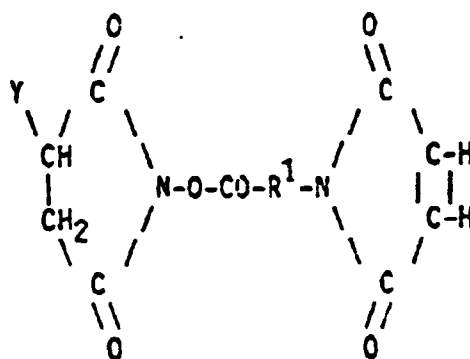
kaan passiivisen mekanismin välityksellä kulkeudu vapaasti kotiuttavan aineen reseptoreita sisältämättömiin soluihin, eli sen tulisi kulkeutua soluihin ainostaan aktiivisesti reseptorivälitteisen endosytoosin välityksellä. Lääkerakenteen polymeeriluonne oletettavasti estää sen tunkeutumisen sydänkudokseen, mikä on kyseisen rakenteen eräs etu daunomysiiniin ja muiden kasvainvastaisten lääkkeiden keskeiseen puutteeseen nähden.

Toisaalta koko konjugaatin molekyylipaino (mp) on edullisesti 10 000 - 100 000 D, jolloin erityisen edullisesti molekyylipaino on alle 50 000 D. Konjugaatin molekyylipainon tulee olla riittävän alhainen, jotta se kykenee tunkeutumaan tehokkaasti kiinteisiin kasvaimiin. Tiedetään, että vasta-aineiden Fab-fragmentit tunkeutuvat kasvaimiin paremmin kuin ehyet vasta-aineet (katso Delabye, et al., (1986), J. Clin. Invest. 77: 301-11; Buchegger, et al. (1983), J. Exp. Med. 158: 413-27; Buchegger et al. (1986), Cancer, 58, 655-61.). IgG-vasta-aineiden molekyylipaino on noin 150 000 D ennen kantomolekyylien lisäämistä ja jopa Fab-fragmentit, joskin jonkin verran pienempiä, saattavat olla kykenemättömiä tunkeutumaan kasvaimiin tehokkaasti kantajaan konjugoinnin jälkeen. Näihin verrattuina kyseisen keksinnön mukaisten valmiiden konjugaattien tyypillinen kokonaismolekyylipaino on noin 46 000 D, josta EGF:n osuus on noin 6000 D polymeerin muodostaessa valtaosan jäljelle jäävästä 40 000 D:stä. Vapaan daunomysiinin molekyylipaino on noin 500 D, jolloin sitä voitaisiin kuhunkin konjugaattiin liittää useita mooleja ja pysyä silti edullisella molekyylipainoalueella.

Edellä mainittu kotiuttava aine ja polymeeriosuus konjugoidaan joko suoralla peptidisidoksella, aminohappojen välisellä sekundäärisellä amidisidoksella kuten peptideissä ja proteiineissa tai edullisesti siltayksiköllä, jonka kaava on:



jossa R¹ on peräisin heterobifunktionaalisesta reagenssista, jonka kaava on:



jossa R¹ on yleensä mutta ei ehdottomasti: alkyleeni (C₁-C₄). edullisesti (C₃); fenyleeni, edullisesti (1,3-); sykloalkyleenialkyleeni, edullisesti sykloheksyleeni-4-metyleeni; tai alkyleenifenyleeni, edullisesti alkyleeni (C₁-C₄)-fenyleeni (1,4); ja jossa Y = H tai SO₂ONa. Voidaan käyttää myös muita kotiuttavan aineen ja polymeeriosuuden reaktiiviset funktiot erottavia heterobifunktionaalisia reagensseja.

Kyseisen keksinnön edullisimman muodon mukaan terapeutinen konjugaatti on EGF-konjugaatti, joka käsittää polyglutamiinihappokantajan sitomana yhden tai useamman daunomysiinimolekyylin. Tällaisen konjugaatin tulisi omata kolmen laatuista spesifisyyttä:

- (a) spesifisyys korkean EGF-reseptoripitoisuuden omaaviin kasvainsoluihin nähden, jolloin reseptorit

sitoutuvat silloin tehokkaammin ja siirtävät konjugaatin soluun;

- (b) spesifisyys korkean γ -glutamyyli-transpeptidaasi-entsyymipitoisuuden omaaviin kasvainsoluihin nähden, jolloin entsyymit hajottavat PGA:ta tehokkaammin ja aikaansaavat näin daunomysiinin vapautumisen;
ja
- (c) spesifisyys nopeasti jakaantuviin kasvainsoluihin nähden daunomysiinin ollessa mitoosia estävä aine.

Vaikka on luonnollisesti toivottavaa, että konjugaatti kykenee sitoutumaan mihin tahansa kasvainsoluun eikä kykene sitoutumaan mihinkään normaaliin solutyyppiin, todettakoon, että vain tiettyihin kasvainsoluihin ja tiettyihin normaalisoluihin sitoutuvat konjugaatit saattavat kuitenkin osoittaa riittävää spesifisyyttä kasvainsoluihin nähden ollakseen terapeuttisesti aktiivisia.

Vaikka konjugaatin ohjaava aine edullisessa muodossaan edistää myös siirtymistä soluun, pidetään mahdollisena tuottaa nämä funktiot erillisten osien avulla.

Oheisten patenttivaatimusten tekstiosuus sisällytetään täten viitteenä tähän selitykseen luettelona edullisista suoritusmuodoista.

LYHYT SELOSTUS KUVIOISTA

Kuvio 1a on mikrovalokuva kyseisen keksinnön mukaisten yhdisteiden vaikutuksen tutkimiseksi käytetyn ihmisen suomusyöpäsolulinjan A431 viljelmästä. Läsäolevan suuren määrän EGF-reseptoreita osoittaa epäsuora immunoperoksidaasivärjäytyminen (tumma väri).

Kuvio 1b on samankaltainen mikrovalokuva kuin kuvio 1a, mutta esittää kontrollina käytettyjen terveiden alkiosidekudosmuodos-

tussolujen W138 viljelmää. Läsnaolevan alhaisen EGF-reseptorimäärän osoittaa lähes puuttuva värjäntyminen (vaalea väri).

Kuvio 2a on mikrovalokuva A431-solulinjaviljelmästä, jota on inkuboitu 48 tunnin ajan 1 g:lla vapaata daunomysiiniä ja testattu kuolleiden solujen läsnäolo Trypan Blue-eksklusiovärillä.

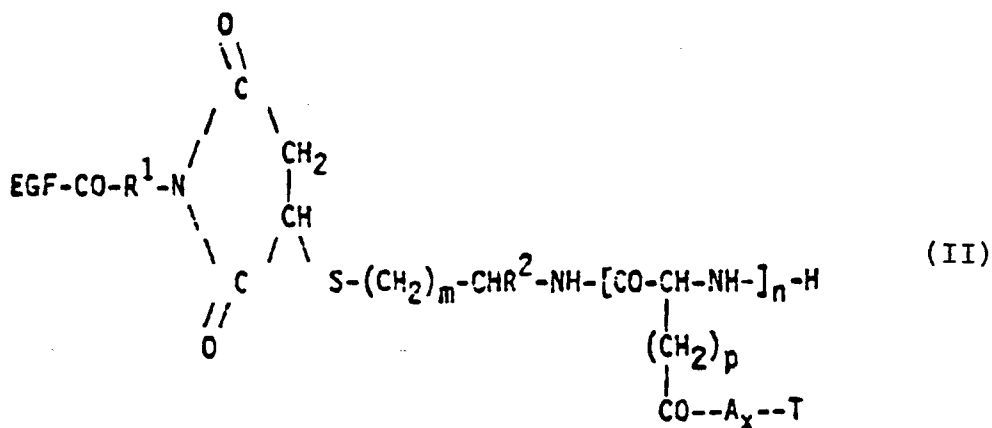
Kuvio 2b on samankaltainen mikrovalokuva kuin kuvio 2a, mutta otettuna 48 tunnin inkuboinnin jälkeen vapoaan daunomysiinin asemasta 1 g:lla/ml daunomysiiniä konjugaatin VIII muodossa. Tummat alueet edustavat kuolleita soluja.

Kuvio 3a on mikrovalokuva otettuna ajankohtana 0 A431- ja W138-solulinjojen sekaviljelmästä. Kasvainsoluja ovat pyöreät solut.

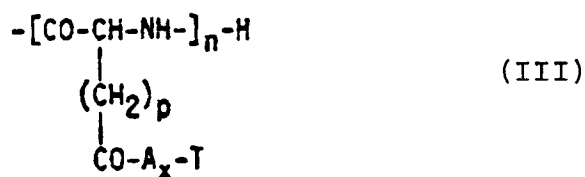
Kuvio 3b on samankaltainen mikrovalokuva kuin kuvio 3a, jossa kuitenkin tilanne esitetään 48 tunnin inkuboinnin 1 g:lla/ml konjugaattia VIII jälkeen. Pyöreiden kasvainsolujen määrä on suuresti pienentynyt.

KEKSINNÖN YKSITYISKOHTAINEN KUVAUS

Kyseisen keksinnön mukaisten edullisten uusien terapeuttisten yhdisteiden, joissa käytetään EGF:ää tai sen analogia kotiuttavana aineena, kaava on kaava (II):



jossa m on 1 tai 2, n on 20-300, p on 1 tai 2, x on noin 0-20, R¹ on alkyleeni-(C₁-C₄), 1,3-fenyleeni, sykloheksyleeni-4-metyyleeni, tai alkyleeni-(C₁-C₄)-fenyleeni-(1,4); ja R² on H, tai karboksyyli, A on aminohappojäännös, tai muu bivalenttinen osuus, joka on sisällytetty tuottamaan funktionaalisuutta sytotoksisen yhdisteen kytkemiseksi, ja T on hydroksyyli tai sytotoksinen yhdiste. Polymeeriosuuden monomeeriyksiköissä, joiden kaava on kaava (III):



p, x, A_x tai T voivat vaihdella, jolloin T on sytotoksinen yhdiste ainakin yhdessä yksikössä.

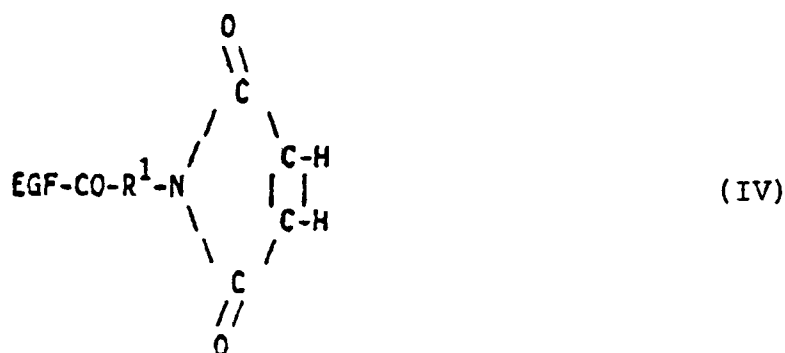
EGF, joka on yksisäikeinen 53 aminohappojäännöksen muodostama polypeptidi, voidaan uuttaa hiiren yläleuanalussytkirauhasesta (katso J. Savage et al., (1972) J. Biol.Chem. 247, 7609) tai se voidaan syntetisoida kemiallisesti tai geenimanipulaatiomenetelmillä esimerkiksi käyttäen kloonattua geenää. EGF voi olla peräisin myös ihmisestä.

Tavallisesti kaavan (II) mukainen sytotoksinen yhdiste T ja A_x-osuus ovat kovalenttisesti toisiinsa sidotut sidoksen luonteen ollessa T- ja A_x-rakenneosissa käytetystä funktionaalisuudesta riippuvainen. Sekundäärisen amidisidoksen yhteydessä A_x-osuuden päätykarboksyyli ryhmän kanssa käytetään tavallisesti sytotoksisen yhdisteen T (adriamysiini, daunomysiini, bleomysiini tai melfalaani) primääristä amiinifunktionaalisuutta. Hydroksyylifunktion käsittävät sytotoksiset yhdisteet (kuten vinblastiini ja vinkristiini) sidotaan vastaavalla tavalla esterisidoksella tai karbonaattisidoksen välityksellä (A = aminoalkoholijäännös, x = 1), josta esimerkki on noretindronin sitominen poly-N-3-hydroksipropyyliglutamiiniin (katso R. V. Petersen et al., (1979) Polymer Preprints, 20, 20). Sytotoksisen yhdisteen käsittämä karbioksyyli happofunk-

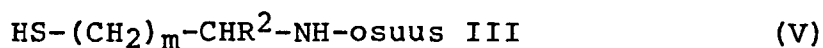
tionaalisuus (kuten metotreksaatin tai klorambusiilin kyseessä ollen) saatetaan sekundääriseen amidisidokseen A_x :n käsittämän sivuketju-amiinifunktionaalisuuden avulla (esim. A_x sisältää diaminohappojäännöksen), tai esterisidokseen (A = aminoalkoholijäännös, $x = 1$).

Sytotoksinen yhdiste T voi olla myös cis-platinaan nähden analoginen sytotoksinen platinakompleksi. Platinayhdisteiden ja polymeerikantajan välinen koordinaatiosidos voidaan muodostaa käyttämällä ligandina polyglutamiinihapon γ -karboksiosuutta tai A_x :ään sisältyviä amiini- tai aminohappo-osuuksia tai muita ligandiosuuksia; katso Arnon, EP-A 190 464.

Kaavassa II R^1 on heterobifunktionaalisesta reagenssista, jota käytetään konjugoitaessa edullinen kotiuttava aine EGF ja polymeeriosuus III, peräisin oleva ryhmä. Konjugointi suoritetaan kytkemällä toisiinsa N-substituoitu EGF-johdannainen IV:

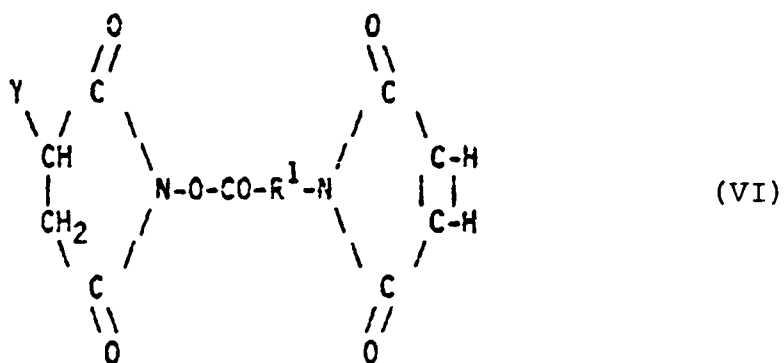


sekä polymeeriosuuden III johdannainen (V):



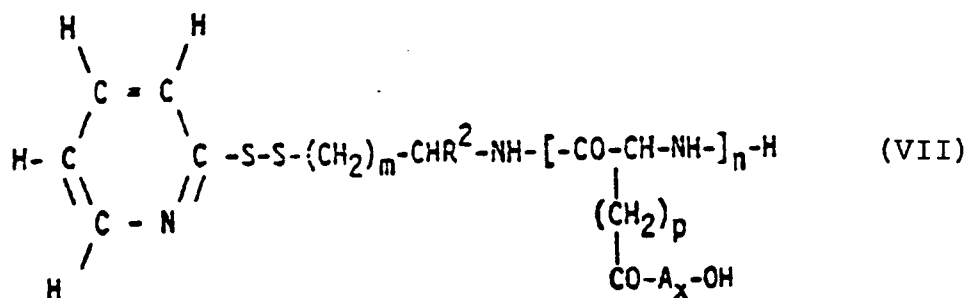
jossa m ja R^2 ovat kuten edellä määritelty.

Tiolireaktiivinen yhdiste IV valmistetaan saattamalla reagoimaan EGF ja heterobifunktionaalinen reagenssi VI:



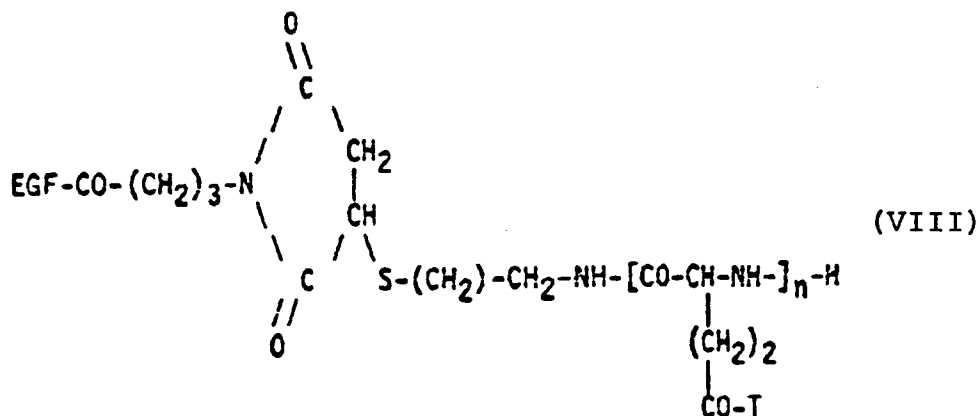
jossa R^1 ja Y ovat kuten edellä määritelty. Tämän reagenssin kuten muidenkin reagenssien (alla) hyödyllisyys perustuu sekä asyloivan osuuden, N-hydroksisukkinimidoesteriosuuden, että alkyloivan osuuden, maleimidojäännöksen, läsnäoloon. Muut tämän heterobifunktionaalisen luonteen omaavat reagenssit, joita voidaan käyttää EGF:n alkylointijohdannaisten muodostamiseksi, ovat m-maleimidobentsoyyli-N-hydroksisukkinimidiesteri, m-maleimidobentsoyylisulfosukkinimidiesteri, sukkinimidyyli-4-(n-maleimidometyyli)sykloheksaani-1-karbosyklaatti, sukkinimidyyli-4-(p-maleimidofenyyli)butyraatti, sulfosukkinimidyyli-4-(N-maleimidometyyli)sykloheksaani-1-karboksylaatti ja sulfosukkinimidyyli-4-(p-maleimidofenyyli)butyraatti. Hyvä kuvaus näiden sillanmuodostusreagenssien käytöstä löytyy käsikirjasta Pierce 1985-1986 Handbook & General Catalog, sivulta 326 eteenpäin. Kyseeseen tulee myös muiden edeltävän luonteen omaavien tai konjugaatin rakenneosien muita funktionaalisia ominaisuuksia erottavien heterobifunktionaalisten reagenssien käyttö.

Tiolisubstituoitu polymeeri V valmistetaan Katon et al., J. Med. Chem. 27 (1984) 1602-1607, mukaan. Lyhyesti selostettuna tällöin muodostetaan suojatun tioliryhmän käsittävä polymeerijohdannainen VII:

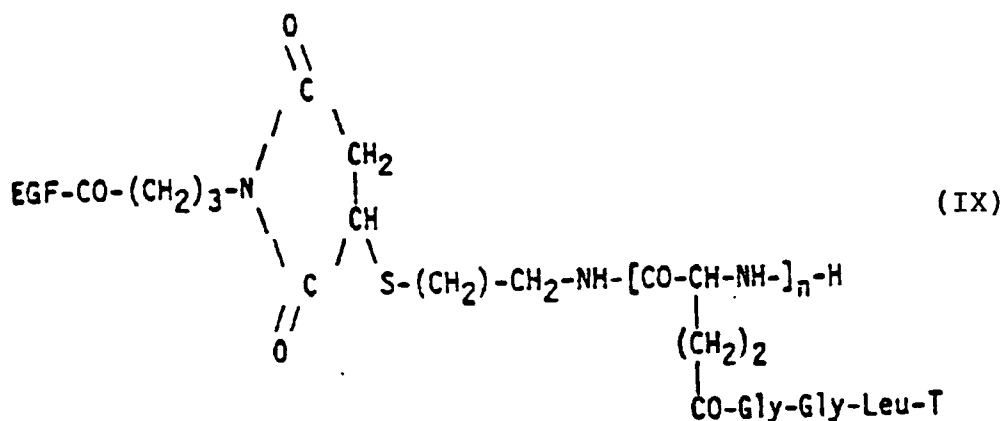


jossa m , n , p , x ja R^2 ovat kuten edellä määriteltä, ja substituoidaan osittain polymeerisivuketjua sytotoksisella aineella T, mitä seuraa 2-pyridyylitiosuojaryhmän poistaminen.

Edullisessa tapauksessa T:n ollessa daunomysiini sytotoksinen aine voidaan liittää karbodi-imidivälitteisen asylointireaktion avulla. Seuraavat kaavat (VIII ja IX) esittävät kahta kokeellisesti valmistettua spesifistä konjugaattia:



jossa m on 1, n on 20-300, p on 2, x on 0, R^1 on $(\text{CH}_2)_3$, R^2 on H, ja T on daunomysiini tai hydroksyyli suhteessa noin 1:6;



jossa m on 1, n on 20-300, p on 2, x on 3, A_x on Gly-Gly-Leu, R¹ on (CH₂)₃, R² on H, ja T on daunomysiini tai hydroksyyli suhteessa noin 1:6.

Sivuketjujatkeen A_x, jossa A on jonkin tavallisen aminohapon jäännös, ja x on edullisesti noin 0-20, liittämiseksi käytetään tavanomaisia peptidisynteesin menetelmiä (katso esimerkiksi W.A.R. van Heeswijk, et al., (1985), J. Controlled Release 1, 301-315, ja Hoes et al., (1985), J. Controlled Release 2, 205-213.).

Yhdiste II osoittaa syöpäterapiassa erittäin hyödyllisiä ominaisuuksia. Erityisesti yhdiste II kulkeutuu pahanlaatuisiin soluihin, joissa sytotoksisen aineen, daunomysiinin, myrkyllisyys syöpäsoluille ilmaistuu. Sen vaikutuksen selektiivisyys syöpäsolujen suhteen on parempi kuin tunnettujen solumyrkky-lääkkeiden. Täten sen ensimmäinen arvokas ominaisuus liittyy sen syöpäsoluihin nähden terveisiin soluihin verrattuna korkeaan affiniteettiin.

Tämän ominaisuuden osoittamiseksi valittiin ihmisen suomusyöpäsolulinja, esimerkiksi kuviossa la esitetty A431-solulinja (katso M.D. Waterfield (1982), J. Cell. Biochem., 20, 149-161), jolloin kuitenkin yhtä hyvin olisi voitu käyttää jotain muuta kasvainsolutyyppiä. Näiden solujen solumembraani käsittää hyvin korkean EGF-reseptoripitoisuuden, mikä tekee soluista erittäin sopivia yhdistettä II koskevissa kokeissa käytettäväksi. Näiden reseptorien läsnäolon osoittaa epäsuora immuuniperoksidaasivärjäntyminen, joka näkyy kuviossa la tummana värinä. Kontrollisolulinjoja, esimerkiksi alhaisen EGF-reseptoripitoisuuden omaavia W138-alkiosidekudosmuodostus-soluja (katso kuvio 1b), käsiteltiin vertailun suorittamiseksi samalla tavalla ja ne näkyvät mikrovalokuvassa vaaleina alueina. Huomattakoon, että jonkin tietyn kasvaimen soveltuvuus hoidettavaksi yhdisteellä II, jossa kotiuttavana aineena on EGF, voidaan määrittää määrittämällä EGF-reseptorien lukumäärä esimerkiksi sellaisilla kokeilla kuin on kuvattu esimer-

kissä 2 jatkotekstissä. Muiden kotiuttavien osuuksien reseptorit voidaan niinkään tunnistaa sopivien vasta-aineiden sitoutumisen tai itse kotiuttavan aineen sitoutumisen avulla.

Inkuboitessa tunnettua määrää yhdistettä II, erityisesti konjugaattia VIII ($p = 2,; x = 0, T = \text{daunomysiini}$ tai OH suhteessa 1:6), ^{125}I :llä radioaktiivisesti leimattuna (jodi muodostaa osan EGF-osuutta) ja A431-soluja käyttäen W138-soluja kontrollina jäi 31% radioaktiivisen jodin kokonaismäärästä solunsisäiseen tilaan 2%:n löytyessä kasvainsolumembraanista, kun puolestaan kontrollisoluissa vastaavat arvot olivat 2% ja vastaavasti 0%. Käytettäessä näissä kokeissa konjugaatin VIII asemesta vapaata EGF:ää saatiin vastaavasti arvot 14%/0% ja 7%/0%. Konjugaatin VIII vapaaseen EGF:ään verrattuna voimakkaampi akkumuloituminen johtuu mahdollisesti siitä, että solunsisäiset rakkulat pitävät EGF:n konjugaatin VIII polymerirungossa, kun puolestaan vapaa EGF resykloituu vapaasti takaisin kasvualustaan. Alla esimerkissä 3 kuvatun kaltaisten kokeiden avulla, joissa tutkitaan jonkin konjugaatin siirtymistä sopivat reseptorit käsittäviin soluihin, voidaan määrittää, onko tietyn konjugaatin käsittämä kotiuttava aine säilyttänyt kykynsä siirtyä soluihin ja täten mahdollisesti kasvainten hoitoon soveltuva.

Yhdisteen II toinen arvokas ja odottamaton ominaisuus liittyy sen vapaaseen daunomysiiniin verrattuna suurempaan myrkyllisyyteen syöpäsoluille. Tätä havainnollistavat kuviot 2a ja 2b.

Kuviossa 2a on esitetty A431-soluviljelmä 48 tunnin inkuboinnin 1 g:n/ml daunomysiiniä sisältävässä kasvualustassa jälkeen. Elinkelpoisuus arvioitiin Trypan Blue-ekskluusiovärijäysmenetelmän avulla. Solujen jääminen värjäätymättä oli osoitus niiden elinkelpoisuudesta. Tätä vastoin käytettäessä samanlaisessa kokeessa (katso kuvio 2b) vastaavaa määrää daunomysiiniä konjugaatin VIII muodossa erittäin suuri osa soluista kuoli, mikä ilmeni kokoonkutistuneina soluina sekä tummina alueina, joihin väri oli kerääntynyt.

Konjugaatin VIII selektiivisyyttä kasvainsolujen suhteen tutkittiin edelleen. Esimerkiksi kuvioista 3a ja 3b ilmenee konjugaatin VIII vaikutus, kun kyseessä oli A431- ja W138-solujen sekaviljelmä. Pyöreät solut ovat A431-kasvainsoluja ja pitkulaiset solut ovat W138-kontrollisoluja. Kasvualusta valokuvattiin ajankohtana 0 (kuvio 3a). Kuvioista 3b ilmenee tilanne 24 tunnin kuluttua $1 \mu\text{g:n/ml}$ konjugaattia VIII sisältävässä kasvualustassa. Voidaan todeta, että pyöreät tummemmat syöpäsolut ovat voimakkaasti vähentyneet. Esimerkeissä 4, 5 ja 7 jatkok tekstissä kuvatus kaltaisia kokeita voidaan suorittaa minkä tahansa tietyn solumyrkyn kuljetettuna minkä tahansa halutun yhdisteen I muodon avulla lisääntyneen selektiivisyyden ja/tai tehokkuuden määrittämiseksi.

Loppupäätelmänä todettakoon, että konjugaatin VIII on ekvivalettisina moolipitoisuuksina (daunomysiiniin verrattuna) osoitettu tappavan suomusyöpäsoluja huomattavasti tehokkaammin kuin pelkkä vapaa daunomysiini. Lisäksi konjugaatti VIII osoittaa kasvainsoluihin nähden selektiivistä solut tappavaa aktiivisuutta, mutta jättää terveet solut eloon, kun taas samoissa olosuhteissa vapaa daunomysiini tappaa terveetkin solut.

Seuraavat esimerkit havainnollistavat keksintöä yksityiskohtaisemmin.

Esimerkki 1.

EGF- ja daunomysiiniliitteisen polyglutamiini-happokonjugaatin (konjugaatin VIII) synteesi.

Konjugaatti VIII käsittää polyglutamaattirunkorakenteen omaavan polymeeriyhdisteen (VII, $p = 2$, $x = 0$), jonka rungossa γ -karboksyyli-ryhmistä on kondensoitunut daunomysiiniin, joka omaa 2-pyridyyliditioetyyliamidojohtoryhmän ($m = 1$, $R^2 = H$) ja

joka valmistettiin Y. Katon et al., J. Med. Chem. 27 (1984) 1602-1607, mukaan (yhdiste 5 Katon kaaviossa II).

Yhdisteen identiteetti varmistettiin analyttisesti: mp = 29 000 D kvantitatiivisen 2-pyridyyliditioryhmän määrityksen mukaan; daunomysiini/karbosyklaattisuhde = 1/6 määritettynä daunomysiinin spektrofotometrisellä kvantitoinnilla 480 nm:n aallonpituudella.

Lisättiin 25 mg:aan polymeeriä liuotettuna 2 ml:aan 10 mM natriumfosfaattipuskuria, pH 7, 0,1 ml 0,3 ditiotreitolii (DDT-) liuosta. Liuosta pidettiin tunnin ajan 40° C:ssa, minkä jälkeen sitä dialysoitiin yön yli 0,1 M natriumfosfaattipuskuria, pH 6,0, vastaan (SPECTRAPOR-kalvo, läpäisyraja mp = 3500); menettely regeneroi molekyylin tioetyyliamidoryhmän (yhdiste 6 Katon kaaviossa II), saanto 23 mg punaista yhdistettä kylmäkuivausta seuraten (poly(DM)-Glu-SH). Poly-(DM)-Glu-SH-polymeeri saatettiin reagoimaan ylimäärän tiopropyyli SEPHAROSE:a kanssa tämän pyridyylisulfidimuodossa (4°C, 12 tuntia, fosfaattipuskuri, pH 6) ja huuhdottiin geeliä ylimäärällä samaa puskuria SH-jatketta osaamattoman polymeerin poistamiseksi. Polymeeriä säilytettiin tässä muodossa kylmässä. Se regeneroitiin sitten käsittelemällä geeliä ylimäärällä merkaptetaanolia (12 tuntia), minkä jälkeen dialysoitiin vettä vastaan (yön yli, 4°C) ja kylmäkuivattiin ennen saattamista reagoimaan EGF:n kanssa.

Liuotettiin 100 µg EGF:ää (SIGMA) 500 µl:aan liuosta 10 mM fosfaattipuskuri, pH 7,0, joka sisälsi 0,14 M NaCl. Sitten lisättiin ¹²⁵I-EGF:ää riittävä määrä tuottamaan aktiivisuus 10 000 tuiketta/min/µg EGF:ää ja tämän jälkeen 50 µl N-sukkinimidyyli-4-(N-maleimido)butyraatin (SMBU:n) lähde: SIGMA 32 mM liuosta dimetyyliformamidissa. Seos jätettiin tunniksi 25°C:seen, minkä jälkeen sitä dialysoitiin liuosta 0,1 M natriumfosfaattipuskuri, 0,1 M NaCl, pH 6,0, vastaan SMBU-ylimäärän poistamiseksi.

Haluttua SMBU:n ja EGF:n välisellä kondensaatiolla muodostettua tuotetta (IV, $R^1 = (CH_2)_3$) ei eristetty, vaan lisättiin 500 μ l:aan dialysoitua EGF-liuosta 1 mg poly-(DM)-Glu-SH:ta ja sekoitettiin saatua seosta hitaasti yön yli 4°C:ssa. Sitten seokseen lisättiin 5 ml tiopropyyliisefaroosia (pyridyylisulfi-dimuoto) ja reaktion annettiin jatkua 4°C:ssa 12 tunnin ajan. Geeliä pestiin toisiaan seuraten kolmella 1 ml:n erällä natriumfosfaattipurskuria, konsentroitiin eluaatti alipaineessa ja suoritettiin sitten geelisuodatus SEPHADEX G75-geeliä käyttäen (kolonni 40 x 0,8 cm) 0,1 M ammoniumkarbonaattiliuoksella eluoiden, pH 7,0. Otettiin talteen EGF-poly-(DM)-Glu-konjugaatin (VIII) sisältävä fraktio, todettuna absorbanssista 480 nm:ssä, sekä kylmäkuivattiin se. Saanto oli 80 μ g kiinteää materiaalia.

Esimerkki 2.

A431-koisolulinjan valinta epäsuoralla immunoperoksidaasiväryäyksellä todetun solumembraanin reseptoripitoisuuden perusteella.

Solulinjojen epäsuora immunoperoksidaasiväryäys suoritettiin käyttäen trypsiinillä käsiteltyjä soluja 35 mm:n PVC-maljoissa. Maljapintaa esikäsiteltiin fosfaatilla puskuroidulla suolaliuoksella (PBS), pH 7,2, poistettiin sitten ylimäärä ja lisättiin maljoihin PBS:llä pestyt solut (10^5 solua/kuoppa 50 μ l:ssa PBS:ää) ja sentrifugoitiin 5 min. ajan 2000 kierr./min kierrosnopeudella. Sitten kuoppiin lisättiin liuosta 0,5% glutaarialdehydiä kylmässä PBS:ssä 50 μ l/kuoppa ja inkuboitiin 15 minuutin ajan huoneen lämpötilassa. Pestiin kahdesti PBS:llä, minkä jälkeen kuopat täytettiin liuoksella 100 mM glysiiniä 0,1%:ssa BSA-liuoksessa ja jätettiin seisomaan 30 minuutiksi huoneen lämpötilaan glutaarialdehydiaktiivisuuden salpaamiseksi. Pestiin kahdesti PBS:llä, minkä jälkeen suoritettiin epäsuora immunoperoksidaasiväryäys denaturoimalla ensin soluja jääkylmällä 99:1 etanoli/etikkahapposeoksella 30 minuutin ajan 4°C:ssä. Tällä välin laimennettiin 3 μ l vasta-

ainetta liuokseen 1 ml PBS + 1% vasikansikiöseerumi (FCS). Sitten kuopat pestiin kahdesti PBS:llä ja inkuboitiin 5 minuuttia liuoksella 20% FCS:ää PBS:ssä. Tämä korvattiin sitten 200 μ l:lla/kuoppa vasta-aineliuosta ja inkuboitiin 30 minuuttia huoneen lämpötilassa. Sitten kuopat pestiin kahdesti PBS:llä, kerran liuoksella PBS + 0,1% Tween ja vielä kerran PBS:llä. Sitten lisättiin 200 μ l/kuoppa 1:400 laimennettua sian (antihiiri peroksidaasiin (POD) konjugoitua)- vasta-ainetta (DAKO) 1%:n FCS:ää sisältävässä PBS:ssä ja inkuboitiin 30 minuutin ajan huoneen lämpötilassa. Sitten kuopat pestiin kahdesti PBS:llä, kerran liuoksella PBS + 0,1% Tween ja kahdesti tislattulla vedellä. In situ-värjäntyminen tuotettiin inkuboimalla soluja huoneen lämpötilassa liuoksella 10 ml 0,01 M fosfaattipuskuri, pH 6,0, 5 μ l 35%-nen hapetettu vesi, 100 μ l 1%-nen orto-dianisidiini (Merck) metanolissa.

Esimerkki 3.

Konjugaatin VIII siirtyminen A431-suomusyöpäsoluihin verrattuna (siirtymiseen) W138-sidekudostussoluihin.

Inkuboitiin konjugaattia VIII, ^{125}I :llä EGF-osuudessa radioaktiivisesti leimattuna, sekä yhteenkasvanutta A431- tai W138-soluviljelmää 6 tunnin ajan 37°C:ssa liuoksessa A (4 osaa DMEM, 1 osa 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 0,1% BSA, pH säädetty 7,4:ksi). Sitten solut pestiin neljään kertaan jääkylmällä liuoksella PBS + 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 . Lisättiin suhteessa 1:5 50%:sta trikloorietikkahappoa yhdistettyyn liuokseen A + PBS ja laskettiin seos gamma-laskijalla. Solumembraania destabiloitiin käsittelemällä jäissä liuoksella 200 mM etikkahappo, 150 mM NaCl (liuos B) kuuden minuutin ajan. Sitten poistettiin liuos B ja pestiin solut kahdesti liuoksella B. Yhdistetyistä liuoksista B määritettiin ^{125}I . Tällä käsittelyllä vapautetaan solun pintaan sitoutuneet EGF-reseptorit. Sitten solut suspendoitiin täydellisesti 0,2 N NaOH-liuokseen. Tästä liuoksesta todettu radioaktiivisuus edusti soluihin siirtynyttä konjugaatti VIII-määrää. Kontrollikokeissa, joissa käytettiin

vapaata EGF- ^{125}I :tä, osa EGF:stä resykloitui takaisin kasvu-
alustaan alentaen täten solunsisäistä EGF-pitoisuutta. Seuraa-
vassa taulukossa 1 on esitetty ^{125}I -leimatun EGF:n ja konju-
gaatin VIII siirtymistä W138- ja A431-soluviljelmiin koskevis-
sa kokeissa saadut tulokset, jolloin ilmoitetaan tuikkeina
minuutissa (tausta 30 tuiketta/min) toisiaan seuraten: solun
ulkopuolelle jäänyt EGF, solumembraaniin sitoutunut EGF ja
solunsisäisessä tilassa esiintyvä EGF. Osuus kokonaisradio-
aktiivisuudesta on ilmoitettu prosentteina sulkeissa.

Taulukko 1

Vapaan EGF:n ja konjugaatin VIII siirtyminen soluihin

		EGF	Konjugaatti VIII
		tuiketta/min (%)	tuiketta/min (%)
W138	Sitoutumaton	530 (93)	1169 (98)
	" Sitoutunut membraaniin	29 (0)	28 (0)
	" Solunsisäinen	67 (7)	52 (2)
A431	Sitoutumaton	536 (86)	831 (67)
	" Sitoutunut membraaniin	31 (0)	57 (2)
	" Solunsisäinen	111 (14)	390 (31)
=====			

Nämä tulokset osoittavat, että konjugaatti VIII siirtyy tehok-
kaammin syöpäsoluihin (31%) kuin terveisiin soluihin (2%).

Esimerkki 4.

Vapaan ja konjugoidun daunomysiinin A431-suomusyöpäsoluille tuottaman myrkkyyvaikutuksen vertailu.

Soluja oli säilytetty liuoksessa Dulbeccon modifioitu kasvu-
alusta (DMEM), 10% vasikansikiöseerumi (FCS) (Gibco), 2% peni-
silliinistreptomysiini (Gibco), 1% fungitsoni (Gibco) ja 5%:n
CO₂-ilmakehässä. Solut maljoitettiin 50-60%:n yhteenkasvamis-
asteeseen 24 tuntia toksiinilisäystä edeltävästi. Lisättiin 1
µg/ml daunomysiiniä, tai vastaava määrä konjugaattia VIII,
liuoksessa DMEM, 10% FCS ja visualisoitiin solujen kuolemis-
nopeus Trypan Blue-ekskluusiovärjäyksen avulla. Sekoitettiin
juuri käyttöä edeltävästi neljä tilavuutta 0,2%:sta (w/v)
Trypan-Blue-väriin vesiliuosta yhteen tilavuuteen 4,25%:sta
(w/v) NaCl-suolan vesiliuosta. Sekoitettiin yksi tilavuus tätä
liuosta yhteen tilavuuteen yksisolukerros-PBS:ää tai yhteen
tilavuuteen solususpensiota PBS:ssä. Havainnot ja arviointi
suoritettiin 48 tunnin kuluttua toksiinin lisäämisestä (katso
kuviot 2a ja 2b). Nämä tulokset osoittavat daunomysiinin ole-
van konjugaatin VIII muodossa syöpäsoluja vastaan huomatta-
vasti tehokkaampi kuin vapaassa muodossa ollessaan.

Esimerkki 5.

Konjugaatin VIII vaikutus kasvain- (A431) solujen ja terveiden
(W138-) solujen sekaviljelmässä.

Soluja oli säilytetty kuten kuvattu esimerkissä 4. Ensin mal-
joitettiin W138-sidekudosmuodostussolut ja A431-suomusyöpä-
solut maljoitettiin seuraavana päivänä. Sekaviljelmää kasva-
tettiin 24 tunnin ajan, minkä jälkeen lisättiin 1 µg/ml konju-
gaattia VIII kasvualustaan DMEM, 10% FCS. Lisäyksen seurauk-
sena lähes kaikki A431-solut kuolivat valikoidusti 24-48 tun-
nissa, kun puolestaan W-138 solut jäivät eloon. Sekaviljelmä

siis vapautui kasvainsoluistaan, mikä osoitti, että konjugaattia VIII voidaan käyttää terveiden solujen erottamiseksi syöpäsoluista. Koe toistettiin käyttäen tällä kertaa vain 0,1 µg/ml konjugaattia VIII (kontrollikokeissa käytettiin vastaava määrä vapaassa muodossa olevaa daunomysiiniä). Viljelmien tarkastelu 15 vrk:n kuluttua osoitti koenäytteiden vapautuneen A431-soluista, mistä asiantilasta varmistuttiin jatkamalla kasvatusta 6 viikon ajan tavanomaisissa olosuhteissa, jolloin kasvainsoluja ei uudelleenmuodostunut. Sitä vastoin kontrolli-viljelmissä kaikki solut, sekä syöpäsolut että terveet solut, olivat kuolleet 16 vrk:n kuluttua.

Esimerkki 6.

EGF:n ja glysyili-glysyili-leusyyli-daunomysiini-liitteisen polyglutamiinihapon muodostaman konjugaatin (konjugaatti IX) synteesi.

Konjugaatti IX käsittää polyglutamaattirunkorakenteen omaavan polymeeriyhdisteen (VII) ($p = 2$, $x = 0$), jossa osa γ -karboksyyli-ryhmistä on kondensoitunut daunomysiiniin, joka käsittää 2-pyridyyliditioetyyliamidojohtoryhmään ($m = 1$, $R^2 = H$), ja joka valmistettiin Y. Katon et.al., J. Med. Chem. 27 (1984) 1602-1607, mukaan (yhdiste 5 Katon kaaviossa II).

Polymeerillä suoritettiin Hesswijkin et.al., J. of Controlled Release 1:4 (1985) 312, kuvaama menettely sivuketjun jatkamiseksi sekvenssillä -Gly-Gly-Leu-(A_x kaavassa II) seuraavasti: liuotettiin 40 mg polymeeriä ja 68 mg sakkariinia (0,31 mmol) 1 ml:aan DMF:ää ja annettiin saadun liuoksen seistä muutaman tunnin ajan (liuos A).

Samoin lisättiin hitaasti 0,32 mmol (40 µl) N,N,N'-tetrametyyli-guanidiinia (TMG) sekoitettuun suspensioon 0,32 mmol (80 mg) yhdistettä H-Gly-Gly-Leu-OH DMF:ssä. Sekoitusta jatkettiin, kunnes kiinteä aines oli kokonaisuudessaan liuennut (liuos B).

Sitten liuokseen A lisättiin 0,43 mmol (70,3 mg) N,N'-karbo-nyylidiimidatolia ja 30 minuutin sekoituksen jälkeen lisättiin liuos B. Seosta sekoitettiin edelleen 3 vrk:ta huoneen lämpötilassa. Seos kaadettiin sitten 15 ml:aan 0,1 M fosfaattipuskuria (pH 7,0) ja dialysoitiin saatua seosta vettä vastaan (12 tunnin ajan), suodatettiin se milliporekalvoa (0,45 μm) käyttäen ja kylmäkuivattiin suodos. Analyysien suorittamiseksi hydrolysoitiin polymeeristä (saanto oli 80%) otettua näyteerää 6 N suolahapossa 12 tunnin ajan 180°C:ssa.

Hydrolysaatin aminohappomääritys suoritettiin HPLC:n avulla aminohappojen ftaalaldehydijohdannaisia käyttäen (määritys fluoresenssin perusteelle). Saatiin seuraava glutamiinihappo: glysiini:leusiini-suhde: 0,95:2:1.

Pyridiini-S-ryhmä poistettiin ditiotretolin avulla Katon et al. mukaan ja vapautuneen pyridiini-2-tionin määritys suoritettiin mittaamalla absorbanssi 343 nm:n aallonpituudella. Jättäen huomioonottamatta TMG⁺-ionin läsnäolo todettiin molekyylipainoksi 25 000 D, mikä osoittaa tuotteen polymeroitumisasteen olevan noin 75-80%.

Daunomysiinin kytkeminen suoritettiin seuraavasti: liuotettiin 33,7 mg (74,7 μmol) sivuketjulla jatkettua polymeeriä 15 ml:aan NaCl:n 2% vesiliuosta ja lisättiin 20 mg (35,5 μmol) daunomysiinikloridia. Säädettiin pH 5,5:ksi 0,1 N NaOH-liuoksen avulla, minkä jälkeen lisättiin samalla sekoittaen 28 mg (0,1 mmol) 1-etyyli-3-(3-(dimetyyliamino))karbodi-imidihydrokloridia (ECD:tä).

Sekoitettiin 18 tunnin ajan, minkä jälkeen seosta laimennettiin 15 ml:lla 1 M NaCl-liuosta ja dialysoitiin sitten vettä vastaan. Kylmäkuivaamalla jäännös saatiin 31,6 mg polymeeriä. Lohkaisemalla disulfididitiotretolin avulla kuten edellä ja määrittämällä vapautunut pyridiinitioni spektrofotometrisesti

todettiin läsnä olevan noin 10 DM-molekyyliä/molekyyli, jolloin toisin sanoen leimautuneiden sivuketjujen ja leimautumattomien sivuketjujen välinen määräsuhte on noin 1:7.

Edeltävästä disulfidista otetun näyte-erän konversio halutuksi tioliksi suoritettiin seuraavasti: liuotettiin 2 mg polymeeriä 2 ml:aan 0,1 M fosfaattipuskuria (pH 7,0) ja lisättiin 150 μ l 0,3 M DTT-liuosta. Seoksen annettiin seistä tunnin ajan 42°C:ssa, minkä jälkeen liuosta dialysoitiin 24 tunnin ajan välittömästi käyttöä edeltävästi kaasuista vapautettua fosfaattipuskuria (pH 6,0) vastaan; käytettiin Spectrapor-pussia (läpäisyraja mp = 1000 D).

Samanaikaisesti oli aktivoitu EGF:ää liuottamalla 0,2 mg EGF:ää (Sigma) 0,75 ml:aan liuokseen 10 mM fosfaattipuskuri, 0,14 M NaCl, pH 7,0; ja lisäämällä sitten 0,5 ml SMBU:n 10 mg/ml liuosta DMF:ssä. Kahden tunnin 20°C:ssa kuluttua seosta dialysoitiin 4°C:ssa, liuosta 0,1 M fosfaattipuskuri, 0,1 M NaCl, pH 6,0, vastaan (kalvon läpäisyraja mp = 1000 D).

Sekä dialysoidun polymeeriliuoksen että dialysoidun EGF-liuoksen kokonaistilavuus pienennettiin 1 ml:ksi imeyttämällä CMC-jauheeseen, minkä jälkeen dialysoidut liuokset sekoitettiin keskenään ja jätettiin yhteen (samaan) dialyysipussiin 24 tunniksi. Seoksella suoritettiin kromatografia-ajo Sephadex G75-geelissä 0,1 M NH_4CO_3 -liuoksella eluoiden ja otettiin talteen aallonpituudella 480 nm absorboivat fraktiot, jotka puhdistettiin reagoimatta jääneestä polymeeristä käsittelemällä tiopropyyliisefaroosilla yön yli 4°C:ssa. Geeliä pestiin 0,1 M NH_4CO_3 -liuoksella ja saatiin talteen 22,5 ml liuosta (OD = 0,176). Saanto oli noin 80% konjugaattia IX. DM:n ja EGF:n paino-osuudet tuotteessa ovat likimain samansuuruiset.

EGF-tekijän läsnäolo konjugaatissa IX varmistettiin ja sen sitoutumistehokkuus määritettiin suorittamalla immuunisaostus EGF:n vastaisella vasta-aineella ja kiinnittämällä muodostunut

immuunikompleksi proteiini A - Sepharose-geeliin (CL4B, Pharmacia). Menettelyt suoritettiin seuraavasti: proteiini A - Sepharose-geeliin rehydratoitiin 50%:ksi (v/v) liuokseksi NET-NP40-puskuriin (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,5, 0,5% NP40). Lisättiin nautaseerumialbumiinia (BSA:ta) 120 μ l:aan puskuroitua sefaroosiliuosta 0,3 p-%:isen BSA-liuoksen saamiseksi (S). Samanaikaisesti oli lisätty BSA:ta 12 μ l:aan EGF-vastaseerumiliuosta (Collaborative Research) 0,3 p-%:isen BSA-liuoksen vasta-seerumissa saamiseksi (Ab). Inkuboitiin sekä liuosta (S) että liuosta (Ab) yön yli 4⁰C:ssa, minkä jälkeen näytteeseen Ab lisättiin 120 μ g:aa daunomysiiniä vastaava määrä konjugaattia IX ja inkuboitiin 7 tunnin ajan 4⁰C:ssa samalla sekoittaen. Sitten lisättiin liuos (S) ja seosta sekoitettiin 12 tunnin ajan 4⁰C:ssa. Kontrolli (C) valmistettiin lisäämällä sama määrä konjugaattia IX identtiseen liuos (S)-erään. Sekä edeltävää seosta (M) että kontrollia sentrifugoitiin 5 minuutin ajan 2000 kierr./min kierrosnopeudella ja mitattiin supernatanttien absorbanssit (A) 480 nm:n aallonpituudella. Lukemiksi saatiin 0,41 seokselle M ja 0,955 kontrollille C, mikä osoittaa konjugaatin IX sisältävän EGF:ää, jonka rakenteen geeliin sidottu vasta-aine tunnista.

Esimerkki 7.

Konjugaatin IX sekä vapaan daunomysiinin myrkyllisyys A431-syöpäsoluille sekä W138- (kontrolli-) soluille.

Verrattiin konjugaatin IX sekä vapaan daunomysiinin myrkyllisyyttä A431-syöpäsoluille ja W138- (kontrolli-) soluille. Näiden lääkkeiden vaikutus määritettiin solun proteiinisynteesin inhibitioasteena. Määritys suoritettiin miittaamalla ³⁵S-metioniini- (³⁵S-Met, NEN) pitoisuus syntetisoituneissa proteiineissa, kun soluja oli edeltävästi altistettu 48 tunnin ajan vaihteleville lääkepitoisuuksille.

Solut maljoitettiin 1,5 cm:n (halkaisijan omaaviin) petri-

maljoihin 50-60%:n yhteenkasvamisasteeseen ja lisättiin myrkky. Lisättiin 0,1, 0,5 tai 1 g:n/ml annos daunomysiiniä (kontrollit) tai sitä vastaava määrä konjugaattia IX kasvualustaliuoksessa DMEM, 10% FCS. Tätä lisäystä seuraava solujen kuoleminen määritettiin seuraavasti: soluja inkuboitiin tunnin ajan 37°C:ssa 500 l:ssa alhaisen metioniinipitoisuuden käsittelevää DMEM-kasvualustaa (Gibco), johon oli lisätty radioaktiivista ³⁵S-Met-valmistetta. Sitten kasvualusta poistettiin ja maljat pestiin PBS-puskurilla, 2,7 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, pH 7,2). Nämä liuokset säilytettiin beta-laskentaa varten. Aikaansaatiin solulyysi 1 ml:lla 0,1 N NaOH-liuosta ja sijoitettiin lysaatti koeputkeen, joka sisälsi proteiinien saostamiseksi 500 l 10%:sta trikloorietikkahappoa (TCA:ta). Tämä seos suodatettiin reagoimatta jääneen ³⁵S-Met:n poistamiseksi GF/A-suodattimia (Whatman) käyttäen. Suodattimet pestiin kahdesti 1 ml:lla 10%:sta TCA:ta ja kerran absoluuttisella etanoolilla. Suodattimia kuivattiin 2 tunnin ajan 80°C:ssa ja laskettiin beta-tuikkeit Econofluor- (NEN) tuikeväliaineessa. Seuraavassa taulukossa 2 esitetyt osoittavat, että konjugaatti IX on erittäin myrkyllinen soluille, mutta ei niin myrkyllinen kuin daunomysiini yksinään.

Taulukko 2

Konjugaatin IX ja vapaan daunomysiinin myrkyllisyys

	lääkkeen pitoisuus (µg/ml)	proteiinisynteesin inhibitio-%	
		A431	W138
	0,1	30	10
vapaa daunomysiini	0,5	68	46
	1,0	97	80
	0,1	4	0
konjugaatti IX	0,5	17	6
	1,0	47	4

Esimerkki 8.Konjugaatin VIII testaus in vivo.

Ruiskutimme 5×10^6 A431-solua paljaisiin hiiriin ja muodostuneiden kasvainten yltäessä 3-5 mm:n halkaisijakokoon ruiskutimme kahteen hiiriryhmään 0,1 mg/kg daunomysiiniä joko konjugaatin VIII muodossa (katso esimerkki 1) tai vapaassa muodossa. Alan aiemmassa tutkimuksessa on hiirissä käytetty jopa 10 mg:n/kg annoksia (S. Schwarz et al., 1975, Cancer Chem. Rep., 6, 2, 107-114). Lääkettä ruiskutettiin joko suoraan kasvaimeen

tai häntälaskimoon 4 kertaa 3 vrk:n välein. Mittaukset suoritettiin viikon kuluttua viimeisestä ruiskeesta.

Eläinten visuaalisessa tarkastelussa todettiin kasvainten kasvun hidastuneen merkittävästi konjugaatilla VIII käsitellyissä eläimissä vapaalla daunomysiinillä annosteltuihin kontrollihiiriin verrattuna. Tulokset olivat samankaltaisia riippumatta siitä, oliko lääke ruiskutettu suoraan kasvaimen vai häntälaskimoon, mikä osoittaa sytotoksisen yhdisteen biohajoamista ja vapautumista tapahtuvan oleellisesti vain kohdesoluissa. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa 3.

Taulukko 3

Konjugaation VIII testaus in vivo

	ruiske	kasvaimen lähtöpinta-ala (A)	kasvaimen loppupinta-ala (B)	kasvu- kerroin (B/A)
daunomysiini	I.V.*	30,5	500	16,4
konjugaatti VIII	I.V.	25	54	2,2
daunomysiini	I.T.**	9	170	18,7
konjugaatti VIII	I.T.	9	50	5,6
kontrolli ***		9	320	35,6

* I.V. = laskimonsisäiset

** I.T. = kasvaimensisäiset

*** placebo-ruiske

Kokeen päätyttyä kasvaimet irrotettiin ja punnittiin. Tulokset on esitetty taulukossa 4. Jos otetaan huomioon koetta aloitettaessa esiintyneet pienet eroavaisuudet kasvainkoossa, voidaan todeta, että taulukon 4 tulokset korreloivat hyvin edellisessä taulukossa 3 esitettyihin pinta-ala-arvoihin.

Taulukko 4

Konjugaatin VIII testaus in vivo (kasvainpainot)

daunomysiini	I.T.	:	1,178 g
konjugaatti VIII	I.T.	:	0,359 g
daunomysiini	I.V.	:	6,789 g
konjugaatti VIII	I.V.	:	0,816 g

Loppupäätelmänä todettakoon, että kyseisen keksinnön mukaiset yhdisteet suoriutuvat paremmin suomusyöpäsolujen selektiivisistä tuhoamisesta kuin daunomysiini, sekä in vitro että in vivo. Eläinkokeissamme totesimme, että jo erittäin pienillä konjugaatti VIII-määrillä on huomiotaherättävä vaikutus kasvainten kasvuun.

Esimerkki 9.Konjugaatin IX testaus in vivo.

Toistettiin esimerkissä 8 kuvattu in vivo-koe käyttäen konjugaattia IX. Näinollen ruiskutettiin 2 mg/kg daunomysiiniä, joko vapaassa muodossa tai konjugaatissa IX, joka 3. vuorokausi 9 päivän aikana A431-kasvaimia potevien paljaiden hiirien häntälaskimoon. Konjugaatin IX tuottama kasvainkasvun

inhibitio oli merkittävästi voimakkaampi kuin vapaan daunomysiinin (D), vapaan EGF:n tai DM-leimatun mutta kotiuttavaa ainetta sisältämättömän polymeerin (DMA). Nämä tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa 5, jossa ilmoitetut lukemat merkitsevät muutaman vuorokauden kuluttua harpilla mitattuja kasvainhalkaisijoita (mm:inä). Konjugaatin VIII tai konjugaatin IX tappavaa annosta ei määritetty, mutta niiden arvelaan olevan vähemmän myrkyllisiä kuin vapaa daunomysiini, joka pääsee vapaasti kulkeutumaan useimpiin terveisiin solutyyppeihin.

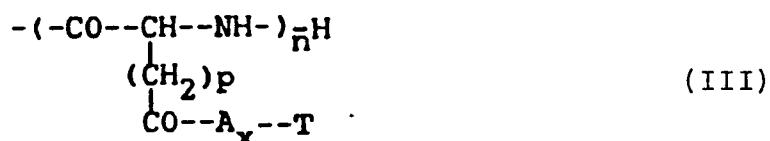
Taulukko 5

Konjugaatin IX testaus in vivo

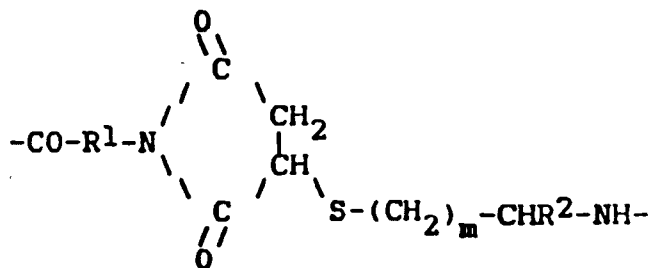
päivänä:	0	4	7	11	14
kontrolli	10	14	17	22	24
daunomysiini	10	12	15	20	21
vapaa EGF	10	13	14	17	17
Polyglu-DM	10	11	12	16	17
konjugaatti IX	10	11	12	14	15

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisen valmisteon valmistamiseksi, joka valmiste käsittää kasvainsoluihin siirtyvän kemiallisen konjugatin, joka sisältää ensimmäisen osan, joka on muu kuin immunoglobuliini tai sen osanen ja joka sitoutuu ensisijaisesti kasvainsoluihin, sekä ensimmäiseen osaan liitetyn toisen osan, jossa on n yksikköä, joiden rakenne on



jossa p ja x ovat kokonaislukuja ja n on 20-300, A_x on bifunktionaalinen liittäjä ja T valitaan vapaan hydroksyylin ja sytotoksisen aineen muodostamasta ryhmästä, jolloin sanotut yksiköt voivat olla identtiset tai poiketa toisistaan T:n ollessa sytotoksinen aine ainakin yhdessä sanotuista yksiköistä, joka menetelmä on t u n n e t t u siitä, että sidotaan kovalenttisesti sanottu ensimmäinen osa sanottuun toiseen osaan joko peptidisidoksen avulla tai rakenteen avulla, jonka kaava on



jossa R¹ on: alkyleeni (C₁-C₄); 1,3-fenyleeni; sykloheksyleeni-4-metyleeni; tai alkyleeni (C₁-C₄)-fenyleeni (1,4); R² on H, tai karboksyyli; ja m = 1 tai 2.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että p on 1 tai 2, x on noin 0-20, A_x on aminohappo, joka on sisällytetty tuottamaan funktionaalinen ryhmä erilais-

ten sytotoksisten aineiden sopivaksi kytkemiseksi, jolloin x:n ollessa suurempi kuin 1 aminohapot A_x voivat olla keskenään identtisiä tai poiketa toisistaan.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ensimmäinen osa valitaan seuraavasta ryhmästä: hiiren orvaskeden kasvutekijä (EGF), muusta eläimestä peräisin oleva EGF-laji, humaani-EGF (kutsutaan myös urogastroniksi), alfa-transformoiva kasvutekijä (TGF), lehmänrokkoviruskasvutekijä (VGF), ja mikä tahansa muu peptidi, joka sitoutuu ensisijaisesti kasvainsolujen EGF:reseptoreihin ja siirtyy soluihin mainittujen reseptorien välityksellä.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ensimmäinen osa valitaan seuraavasta ryhmästä: hermokasvutekijä (NGF), verihiutaleperäinen kasvutekijä (PDGF), melanosyyttejä stimuloiva hormoni (MSH), tyrotropiinia vapauttava hormoni (TRH), transferriini, alhaisen tiheyden omaava lipoproteiini (LDL), ja mikä tahansa muu ei-immunoglobuliiniyhdiste, joka sitoutuu samoihin kasvainsolureseptoreihin kuin edeltävät aineetkin.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ensimmäinen osa edistää konjugaatin siirtymistä kasvainsoluun.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ensimmäisellä osalla on kasvainsoluun mitoosia estävä vaikutus.

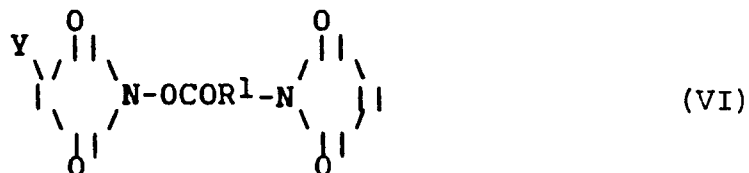
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisäksi konjugaatin molekyylipaino on alle noin 100 000 D.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että T on sytotoksinen aine ainakin 10%:ssa yksiköistä.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sytotoksinen aine inhiboi DNA:n synteesiä sekä sen toimintaa.
10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sytotoksinen aine valitaan ryhmästä: antra-sykliinilääkeaineet, bleomysiini, melfalaani, klorambusiili ja cis-platina.
11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sytotoksinen aine valitaan ryhmästä: adria-mysiini, daunomysiini ja daunorubisiini.
12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sytotoksinen aine inhiboi mikrotubuulien muodostusta ja niiden toimintaa, ja on esimerkiksi vinblas-tiini tai vinkristiini.
13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sytotoksinen aine on antimetaboliitti, esim. metotreksaatti, tai on radioaktiivinen aine.
14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sytotoksinen aine on entsymaattinen meta-boliainhibiittori, esim. jokin seuraava ehyt proteiini, sen osanen tai modifioitu muoto: risiini (erityisesti A-ketju), difteroatoksiini, Pseudomonas-eksotoksiini ja abriini.
15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sytotoksinen aine valitaan ryhmästä: aureo-mysiini, geloniini ja hematoporfyriini.
16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sytotoksinen aine on daunomysiini.
17. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u

t u siitä, että sanottu kovalenttinen sitominen suoritetaan seuraavasti:

- a) sidotaan sanottu ensimmäinen osa heterobifunktionaaliinseen reagenssiin, jonka kaava on kaava VI:

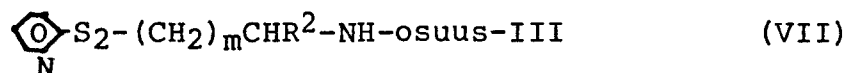


jossa Y on vety tai sulfonaatti, välituotteen saamiseksi, jonka kaava on kaava IV:

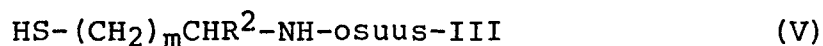


jossa EGF on sanottu ensimmäinen osa;

- b) kiinnitetään tiolia suojaava ryhmä sanottuun toiseen osaan III, jossa T on OH, välituotteen VII saamiseksi, jossa T on OH:



mitä seuraa substituointi sytotoksisella aineella välituotteen VII saamiseksi, jossa T on ainakin osittain sanottu sytotoksinen yhdiste, ja suojaryhmän poisto tiolin V saamiseksi:



- c) ja kytketään lopuksi yhdisteen V tiolirikkiatomi yhdisteen VI kaksoissidokseen sanotun kokoonpanon mukaisen kemiallisen konjugaatin saamiseksi.

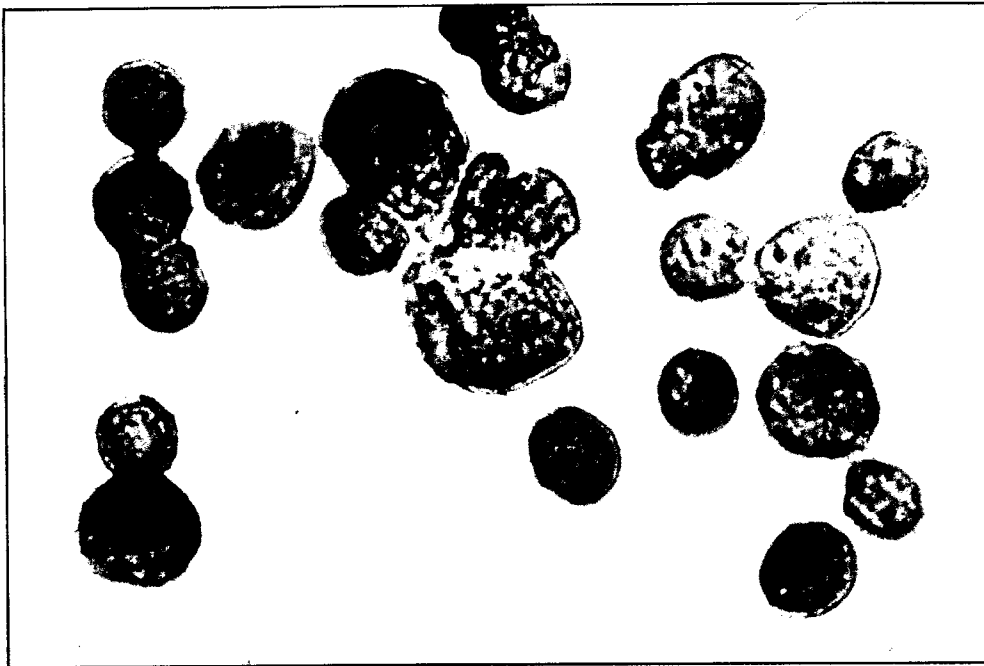


FIG. 1a

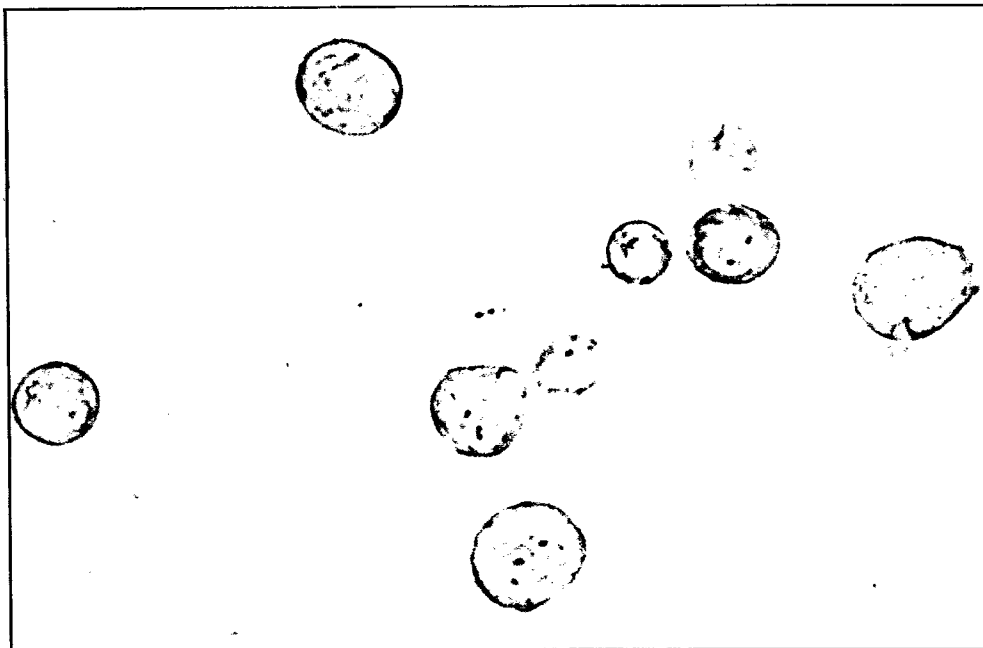


FIG. 1b

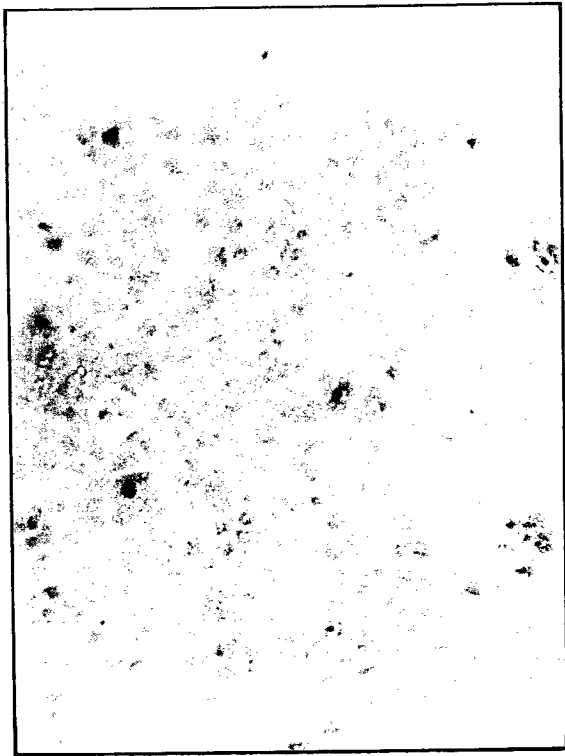


FIG. 2a

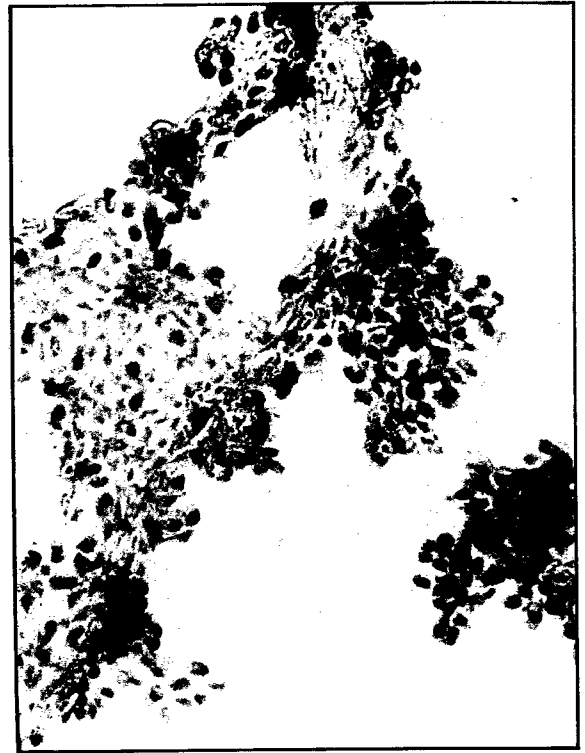


FIG. 2b



FIG. 3a

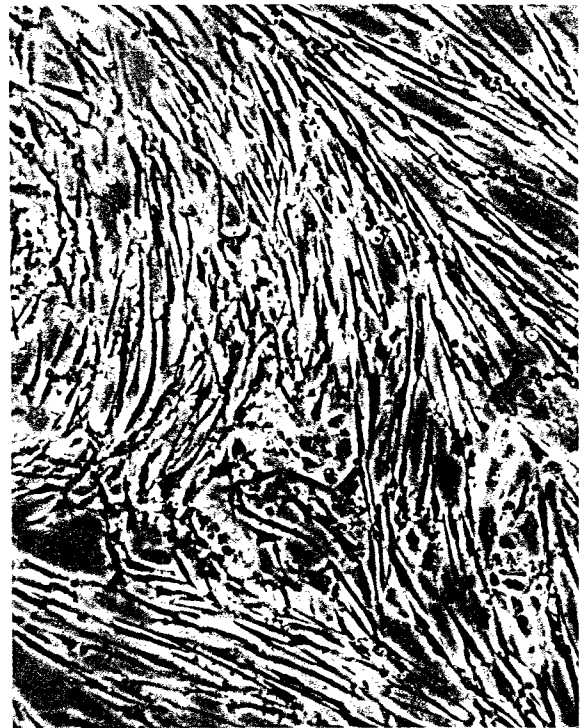


FIG. 3b