



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU 268 656

K PATENTU

(21) PV 1737-83.L
(22) Přihlášeno 14 03 83
(30) Právo přednosti od 17 03 82 FR (82/04547)

(40) Zveřejněno 14 08 89
(45) Vydáno 18 12 90

(11)

(13) B2

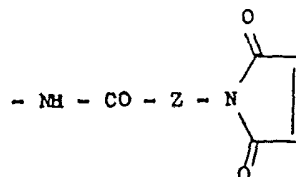
(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 39/395
A 61 K 37/48

(72) Autor vynálezu JANSSEN FRANZ, ST. MATHIEU DE TREVIER
GROS PIERRE, MONTPELLIER (FR)

(73) Majitel patentu SANOFI-SOCIÉTÉ ANONYME, PAŘÍŽ, (FR)

(54) Způsob přípravy imunoenzymatických sloučenin

(57) Způsob přípravy imunoenzymatických sloučenin z protilátky nebo fragmentu protilátky, který si zachoval schopnost rozpoznat příslušný antigen, a enzymu schopného uvolňovat amoniové ionty z přírodních substrátů dobře snášených organismy vyšších živočichů se vyznačuje tím, že se nechá ve vodném prostředí za vzniku kovalentní vazby reagovat bílkovina obsahující thiolovou skupinu, obecného vzorce P_1-SH , kde P_1 znamená uvedenou protilátku či její fragment nebo výše definovaný enzym, s jinou bílkovinou P_2 , kde P_2 znamená výše definovaný enzym nebo výše uvedenou protilátku či její fragment, do kteréžto bílkoviny P_2 byla zavedena skupina obecného vzorce $-S-S-SX$, kde X znamená aktivační zbytek, nebo skupina obecného vzorce I , kde Z znamená oddělovací skupinu, obě schopné reagovat s thiolovou skupinou bílkoviny P_1 .



Vynález se týká způsobu výroby nových sloučenin, sestávajících z enzymu a protilátky vázaných na sebe kovalentní vazbou.

Novými výrobky, připravenými způsobem podle vynálezu, jsou tedy sloučeniny, vytvořené spojením specifického enzymu kovalentní vazbou s protilátkami nebo s fragmenty protilátek namířenými proti antigenu nesenému cílovými buňkami.

V dalším popisu vynálezu jsou tyto sloučeniny označovány jako sloučeniny imunoenzymické.

Imunoenzymické sloučeniny jsou uměle vytvořené směsné molekuly, v nichž je enzym vázán kovalentní vazbou na protilátku namířenou proti antigenu nesenému cílovými buňkami.

Použité enzymy jsou známými sloučeninami. Použitá protilátka má charakter buď polyklonální, jestliže vznikne obvyklou imunizací provedenou na zvířeti, nebo monoklonální, jestliže je produkována klonem hybridních buněk vzniklých spojením lymfocytů s buňkami myelomu. Tuto protilátku je možno použít buď v podobě celých molekul imunoglobulinu, majících schopnost rozpoznat uvažovaný antigen, nebo v podobě jakéhokoliv fragmentu těchto molekul imunoglobulinu, který si zachoval schopnost rozpoznat uvažovaný antigen, a zejména fragmentů známých pod označením $F(ab')_2$, Fab a Fab'.

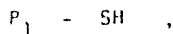
Chemická vazba mezi protilátkou (nebo fragmentem protilátky) a enzymem může být uskutečněna četnými metodami za předpokladu, že zvolená metoda

zachová biologickou aktivitu každé z obou složek vyráběné sloučeniny, tj. protilátky a enzymu, zajistí uspokojivou reprodukovatelnost postupu a dobrý výtěžek spojení, umožní ovládat hodnotu poměru enzym/protilátka ve vzniklé sloučenině, poskytne stabilní produkt rozpustný ve vodě.

Z metod, které vyhovují těmto podmínkám, je třeba dát přednost těm, které využívají alespoň jedné thiolové skupiny k vytvoření vazby mezi oběma uvedenými bílkovinami. Tyto thiolové skupiny mohou být přirozenou složkou jedné či druhé bílkoviny, které se mají spojit, nebo mohou být uměle zavedeny do jedné či druhé z těchto bílkovin, která původně nemá thiolovou skupinu nebo skupiny.

Má-li se takto uměle zavést jedna nebo několik thiolových skupin do jedné z těchto bílkovin, lze tak učinit působením anhydridu kyseliny S-acetylmerkaptojantarové na tuto bílkovinu, kterýžto anhydrid je schopen acylovat aminoskupiny této bílkoviny. Následně je pak možno uvolnit thiolové skupiny odstraněním ochranného acetylového zbytku působením hydroxylaminu, jak je to popsáno v pojednání uveřejněném v časopisu Archives of Biochemistry and Biophysics, 119, str. 41 až 49, 1967. Nadbytek reakčních složek a reakční produkty o nízké molekulové hmotnosti je možno odstranit dialýzou. Pro zavedení thiolových skupin do jedné z bílkovin, jež se mají spolu spojit, je možno použít i jiných metod popsaných v literatuře.

Předmětem vynálezu je tedy způsob přípravy imunoenzymatických sloučenin z protilátky nebo fragmentu protilátky, který se zachoval schopnost rozpoznat příslušný antigen, a enzymu schopného uvolňovat amoniové ionty z přírodních substrátů dobře snášených organismy živočichů, kterýžto způsob spočívá v tom, že se při teplotě nižší než 30 °C a při pH 5 až 9 nechá ve vodném prostředí za vzniku kovalentní vazby reagovat bílkovina obsahující thiolovou skupinu obecného vzorce

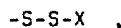


ve kterém

P_1 znamená výše uvedenou protilátku či její fragment nebo výše definovaný enzym,

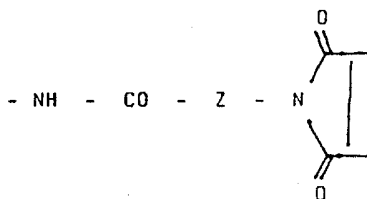
s jinou bílkovinou P_2 , kde P_2 znamená výše definovaný enzym nebo výše uvedenou protilátku či její fragment,

do kteréžto bílkoviny P_2 byla zavedena skupina obecného vzorce



ve kterém

X znamená aktivační zbytek,
nebo skupina obecného vzorce

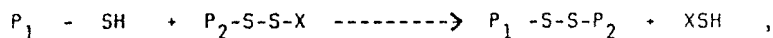


ve kterém

Z znamená oddělovací skupinu,
obě schopné reagovat s thiolovou skupinou bílkoviny P_1 .

1) Případ disulfidické vazby

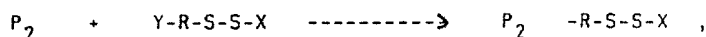
Přípravu sloučeniny podle vynálezu je tedy možno znázornit tímto schématem:



kde

$-S-S-X$ znamená aktivované smíšené disulfidické seskupení, v němž X značí aktivační zbytek.

Bílkovina P_2 substituovaná aktivovaným atomem síry se připraví ze samotné bílkoviny P_2 substitucí pomocí reakčního činidla obsahujícího aktivovaný atom síry podle reakčního schématu



kde

P_2 znamená bílkovinu, která se má substituovat,

Y znamená skupinu umožňující kovalentní připojení reakčního činidla k bílkovině,

R znamená skupinu, na níž mohou být současně vázány substituenty Y a $-S-S-X$, a

X znamená aktivační zbytek.

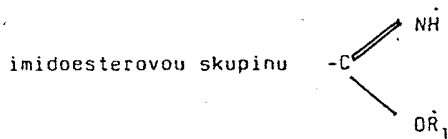
Skupinou Y je skupina, schopná se vázat kovalentní vazbou na kteroukoliv ze skupin vázaných v bočních řetězcích aminokyselin tvořících bílkovinu, která se má substituovat. Z těchto skupin to jsou zejména koncové aminoskupiny lysylových zbytků obsažených v uvedené bílkovině. v tomto případě může Y znamenat zejména

karboxylovou skupinu, která se může vázat na aminoskupiny bílkoviny v přítomnosti činidla podporujícího navázání, jako je například některý karbodiimid, zejména derivát, rozpustný ve vodě, například 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl)-karbodiimid,

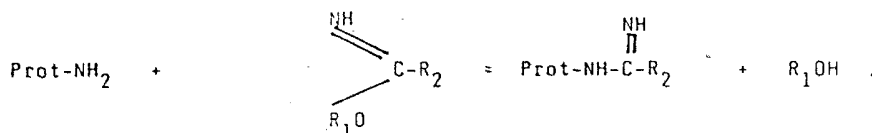
chlorid karboxylové kyseliny, který je schopen reagovat přímo s aminoskupinami, čímž je acyluje,

"aktivovaný" ester, jako je například ortho nebo para, nitro- nebo dinitro-fenyl-ester nebo ester N-hydroxysukcinimidu, který reaguje přímo s aminoskupinami, čímž je acyluje,

vnitřní anhydrid dikarboxylové kyseliny, jako je například anhydrid kyseliny jantarové, který reaguje spontánně s aminoskupinami, čímž vytváří amidové vazby, nebo

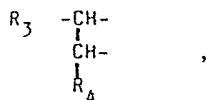


kde R_1 znamená alkylovou skupinu reagující s aminoskupinami bílkoviny podle reakčního schématu



Zbytek -S-S-X znamená aktivovaný smíšený disulfid, schopný reagovat s volnou thiolovou skupinou. V tomto smíšeném disulfidu může X znamenat zejména 2-pyridylovou nebo 4-pyridylovou skupinu, popřípadě substituovanou alespoň jednu alkylovou nebo karboxylovou skupinou nebo alespoň jedním halogenem. X může též znamenat fenyllovou skupinu, s výhodou substituovanou alespoň jednou nitroskupinou nebo karboxylovou skupinou. Dále může X též znamenat alkoxykarbonylovou skupinu, například methoxykarbonylovou skupinu.

Symbol R znamená jakýkoliv zbytek schopný se současně vázat na skupiny Y a -S-S-X. Měl by být zvolen tak, aby neobsahoval skupiny, které by mohly působit rušivě na průběh pozdějších reakcí s použitými reakčními činidly a na syntetizované produkty. Symbol R může znamenat zejména skupinu $-(\text{CH}_2)_n$, kde n značí 1 až 10, nebo skupinu



kde

R_4 znamená vodík nebo alkylovou skupinu s 1 až 8 atomy uhlíku a

R_3 znamená substituent, inertní vůči později použitým reakčním činidlům, jako je

karbamátový zbytek $-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OR}_5$, kde R_5 znamená alkylovou skupinu s 1 až 5 atomy uhlíku v přímém nebo rozvětveném řetězci, zejména terc. butylovou skupinu.

Reakce sloučeniny Y-R-S-S-X s bílkovinou P_2 se provádí v homogenní kapalně fázi, nejčastěji ve vodě nebo v pufrovaném roztoku. Jestliže to vyžaduje rozpustnost reakčních složek, je možno přidat do reakčního prostředí organické, s vodou se mísící rozpou-

štedlo, jako je například alkohol a zejména terc. butanol, v objemovém množství až 20 %.

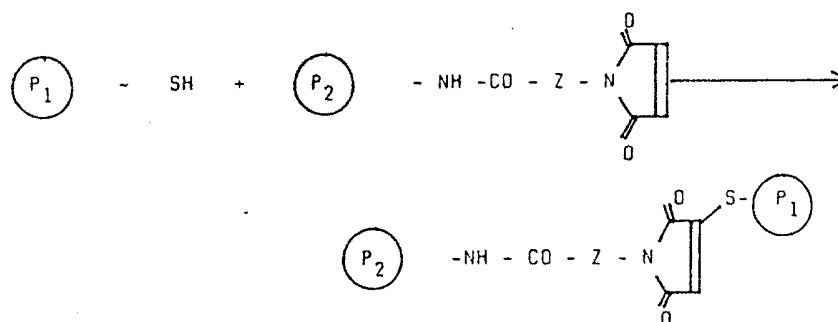
Reakce se provádí při teplotě místnosti po dobu až 24 hodin. Po skončení reakce je možno dialýzou odstranit produkty o nízké molekulové hmotnosti a zejména nadbytek reakčních složek. Tento postup umožňuje zavést, vztaženo na 1 mol bílkoviny, zpravidla 1 až 15 substituujících skupin.

Za použití takovýchto sloučenin se spojení s bílkovinou P_1 provádí zahříváním obou bílkovin ve vodném roztoku při teplotě nepřevyšující 30°C po dobu kolísající od několika hodin do 1 dne. Vzniklý vodný roztok se dialýzuje k odstranění produktů o nízké molekulové hmotnosti, načež se vzniklá sloučenina může přečistit různými známými postupy.

2) Příklad thioetherové vazby

Příprava sloučeniny podle vynálezu spočívá v tomto případě v tom, že se nechá reagovat sloučenina $P_1\text{-SH}$ s bílkovinou P_2 , do níž byl předem zaveden maleinimidový zbytek.

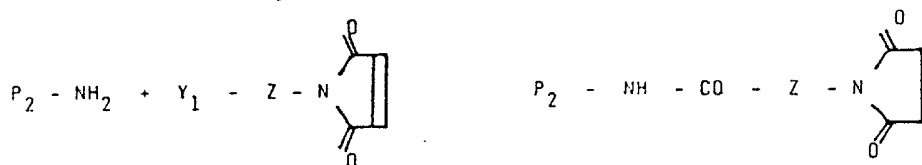
Reakci lze tedy znázornit schematem



kde

Z znamená oddělovací alifatický nebo aromatický zbytek s 1 až 10 atomy uhlíku.

Bílkovina P_2 substituovaná maleinimidovým zbytkem se připraví ze samostatné bílkoviny P_2 substituováním jejích aminoskupin činidlem obsahujícím maleinimidový zbytek podle schematu

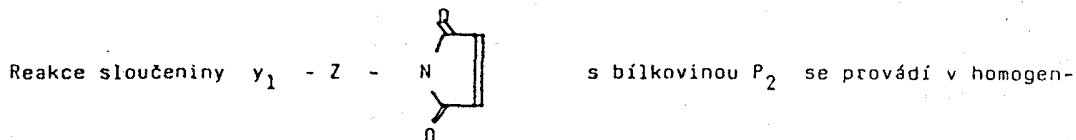


kde

Y_1 znamená buď karboxylovou skupinu, v kterémžto případě se reakce provádí po aktivaci karboxylové skupiny v přítomnosti kondenzačního činidla, jako je například karbodiimid, zejména sloučenina rozpustná ve vodě, jako je 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl)-karbodiimid,

nebo "aktivovaný" ester, jako je ortho- nebo paranitro- nebo dinitrofenylster, nebo ester N-hydroxysukcinimidu, který reaguje přímo s aminoskupinami, čímž je acyluje.

Příprava takovýchto reakčních činidel je popsána zejména v časopisu *Helvetica Acta Chimica*, 58, str. 531 až 541, (1975). Jiná reakční činidla téže třídy jsou komerčně dostupná.



ní kapalně fázi, nejčastěji ve vodě nebo v pufrovaném roztoku. Jestliže to vyžaduje rozpustnost reakčních složek, je možno k reakčnímu prostředí přidat až 20 % objemu organického rozpouštědla mísícího se s vodou, jako je některý alkohol, zejména terc. butanol.

Reakce se provádí při teplotě místnosti po dobu, kolísající od několika do 24 hodin. Pak je možno pomocí dialýzy odstranit produkty o nízké molekulové hmotnosti a, zejména, nadbytek reakčních složek. Tento postup umožňuje zavést 1 až 15 substituujících skupin, vztaženo na 1 mol bílkoviny.

Použitím výše uvedených sloučenin se spojení s bílkovinou P_1 dosáhne uvedením obou bílkovin ve styk ve vodném roztoku při teplotě nepřesahující 30°C , kterážto reakce probíhá po dobu od několika do 24 hodin. Vzniklý roztok se dialyzuje k odstranění produktů o nízké molekulové hmotnosti, načež se získaná sloučenina může přefiltrit různými známými postupy.

Tyto imunoenzymické sloučeniny je možno připravit z jakéhokoliv enzymu. Avšak vzhledem k jejich terapeutickému použití, o kterém bude pojednáno v dalším, jsou výhodnými enzymy ty, které jsou schopny uvolňovat amonné ionty z přírodních substrátů, dobře snášených organismy vyšších živočichů.

Podle mezinárodního třídění, jak bylo uvedeno například v příručce od M. Florkina a E.H. Stortze "Comprehensive Biochemistry, sv. 13, 3. vydání (1973), (Elsevier), jsou enzymy, terapeuticky použitelné při způsobu podle vynálezu, obsaženy hlavně

ve skupině 1 (oxydoreduktázy) a zejména v podskupině 1-4, zahrnující dehydrogenázy aminokyselin a aminoxydázy,

ve skupině 3 (hydrolázy) a zejména v podskupině 3-5, zahrnující enzymy hydrolyzující amidy, amidiny a jiné vazby C-N (s výjimkou peptidických vazeb), a

ve skupině 4 (lyázy) a zejména v podskupinách 4-2 a 4-3, zahrnujících enzymy katalyzující odbourávací reakce za vzniku nenasycených sloučenin.

Níže je uveden výčet výhodných enzymů pro přípravu imunoenzymatických sloučenin způsobem podle vynálezu. Je rovněž uvedeno označení těchto enzymů podle mezinárodního názvosloví.

- 1-4-1-1 : alanindehydrogenáza
- 1-4-1-3 : glutamátdehydrogenáza NAD (P)^+
- 1-4-1-5 : dehydrogenáza L-aminokyselin
- 1-4-3-2 : oxydáza L-aminokyselin
- 3-5-1-1 : asparagináza
- 3-5-1-2 : glutamináza
- 3-5-1-4 : amidáza
- 3-5-1-5 : ureáza
- 3-5-3-6 : arhinindesimináza
- 3-5-4-4 : adenosindesamináza
- 3-5-4-6 : adenosinmonofosfát-desamináza
- 3-5-4-21 : kreatinindesamináza
- 4-2-1-13 : L-serindehydratáza

- 4-2-1-16 : L-theonindehydratáza
- 4-3-1-1 : aspartat-amonia-lyáza (či aspartáza)
- 4-3-1-3 : histidin-amonia-lyáza (či histidáza)
- 4-3-1-5 : fenylalanin-amonia-lyáza.

Vynález se rovněž týká použití imunoenzymatických sloučenin vyrobených způsobem podle vynálezu, v humánní medicíně.

Je popsána příprava protirakovinových sloučenin vyrobených spojením řetězce A ricinu kovalentní vazbou s protilátkami nebo fragmenty protilátek namířenými proti antigenu nesenému buňkou, jež se má rozrušit. Sloučeniny tohoto typu jsou v dalším označovány generickým názvem imunotoxiny.

Je rovněž popsána schopnost amonných iontů (v podobě jakýchkoliv jejich solí, zejména chloridu) zesilovat účinným způsobem cytotoxický účinek těchto imunotoxinů.

Schopnost amonných iontů zesilovat selektivní cytotoxickou účinnost imunotoxinů skýtá četné výhody v situacích dvou typů:

- a) když se imunotoxin použije in vitro jakožto selektivní cytotoxické činidlo k rozrušení cílových buněk

Při terapeutickém použití k tomu dochází zejména tehdy, když se imunotoxin použije jakožto cytotoxické činidlo pro ošetření kostní dřeně pacientů trpících leukémií, jimž se pak takto ošetřená kostní dřev transplantuje.

- b) když se imunotoxin použije in vitro na člověku jakožto terapeutické činidlo pokaždé, když je možno pacientovi před, současně nebo následně po aplikaci imunotoxinu podat amonnou sůl zajišťující potencializaci účinku imunotoxinu, jak je to popsáno ve výše zmíněné patentové přihlášce.

Přesto však v tomto posledně uvedeném případě použití imunotoxinu in vivo má použití amonné soli in vivo za účelem využití jejího potencializačního účinku určité hranice, vyplývající z vlastní toxicity amonných iontů a z okolnosti, že je značně obtížné trvale udržovat dostačující koncentraci amonných iontů v biologických tekutinách nemocného.

Další výzkumy umožnily velmi značně snížit uvedené omezení využití amonných iontů za současného zachování výhod, spočívajících v potencializaci cytotoxické účinnosti a v urychlení kinetiky účinku imunotoxinů těmito ionty. Z těchto výzkumů vyplynulo, že potencializačního a urychlujícího účinku, dosaženého přidáním amonné soli vhodné koncentrace k imunotoxinům, je rovněž možno dosáhnout, jestliže jsou amonné ionty uvolňovány v bezprostředním okolí cílových buněk enzymatickou reakcí z netoxického substrátu, buď přirozeně přítomného nebo uměle zavedeného do bezprostředního okolí těchto buněk.

Tyto výzkumy dále ukázaly, že se tohoto výsledku dosáhne obzvláště účinným způsobem, když je enzym, který katalyzuje reakci uvolňující amonné ionty, vázán na protilátku (nebo fragment protilátky) mající schopnost rozpoznat antigen přítomný na povrchu cílových buněk.

Tento postup má četné velmi důležité výhody, z nichž lze uvést zejména:

- a) Použitý enzym se takto koncentruje na buněčné stěně cílových buněk následkem afinity protilátky (nebo fragmentu protilátky) k antigenu přítomnému na této buněčné stěně. Proto bude uvolňování iontů NH_4^+ jakožto produktu enzymatické reakce probíhat pouze v bezprostředním okolí buněčné stěny cílových buněk, což zmenšuje nebezpečí vyplývající z obecné toxicity amonných iontů a zároveň to usnadňuje působení těchto iontů na cílovou buňku, jehož je zapotřebí, aby se dosáhlo potencializace.

b) Vzhledem k tomu, že enzymatická reakce produkující ionty NH_4^+ probíhá nepřetržitě po celou dobu, po kterou je přítomen substrát, a protože se tento substrát volí tak, aby byl netoxický, umožňuje tento postup velkou pružnost využívání mechanismu potencializace.

Jestliže totiž je substrát endogenní a má dostatečnou koncentraci, je možno imuno-enzymatickou potencializující sloučeninu aplikovat před nebo současně nebo po podání imunotoxinu, podle optimální potřeby v tom kterém případě.

Jestliže se dále enzym zvolí tak, že jeho substrát není v krvi a mimobuněčných tekutinách pacienta přítomen v dostatečně vysoké koncentraci a musí se proto pacientovi rovněž podávat, projeví se maximální pružnost využívání tohoto léku v tom, že je možno libovolně a nezávisle volit okamžik aplikace, dobu trvání aplikace a dávku každé ze tří aplikovaných složek, tj. imunotoxinu, imunoenzymatické sloučeniny a substrátu, podle optimální potřeby při léčení toho kterého pacienta.

c) Za výše uvedených podmínek se budou selektivně aplikovat proti cílovým buňkám alespoň dvě z účinných látek nezbytných k dosažení požadovaného účinku:

jednak řetězec A ricinu, který je cytotoxickým faktorem ve sloučenině označované jako imunotoxin;

jednak enzym, který je podstatnou složkou potencializační soustavy obsažené v imunoenzymatické sloučenině.

Tyto účinné látky jsou ve všech případech vázány, se zřetelem k jejich zaměření a selektivní fixaci na cílových buňkách, na protilátky (nebo fragmenty protilátek) rozpoznávající antigeny přítomné na povrchu cílových buněk. Jestliže je k dispozici protilátka rozpoznávající antigen přísně specifický pro buněčnou populaci, jež se má rozrušit, je možno použít tuto protilátku ve spojení s různými účinnými faktory. V nejobecnějším případě je však snaha volit odlišné protilátky rozpoznávající různé antigeny nesené však společně cílovými buňkami. Takže, i když žádný z těchto antigenů není přísně specifický pro cílové buňky, je pravděpodobnost, že oba uvažované antigeny budou společně přítomny na necílových buňkách, velmi nepatrná a je tudíž k dispozici mimořádně účinný prostředek, jímž lze ještě více zvýšit specifický charakter cytotoxicity imunotoxinů.

Dále uvedené příklady vynález blíže objasňují, aniž by omezovaly jeho rozsah.

Příklad 1

Imunoenzymatická sloučenina, připravená reakcí anti-dinitrofenylové protilátky, substituované aktivovanou disulfidickou skupinou, s ureázou rostlinného původu

a) Anti-dinitrofenylová (anti-DNP) protilátka

Tato protilátka je monoklonální protilátkou, která byla přečištěna obvyklým postupem z tekutiny v břišní dutině myši kmene Balb/C, jímž byl transplantován hybridom F_9 .

Tento hybridom se připraví spojením slezinových buněk myši kmene Balb/C imunizovaných pomocí hovězího γ -globulinu, do něhož bylo předem zavedeno, vztaženo na 1 mol, 20 dinitrofenylových zbytků, s dceřinými buňkami myelomu murin NS 1, načež se izoluje známým postupem. Vzniklou protilátkou je imunoglobulin třídy G a isotypu 2b, jehož konstanta afinity (změřená pro ligand ϵ -dinitrofenyllysin) je $1,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

b) Aktivovaná anti-dinitrofenylová protilátka

Tato látka se připraví z výše zmíněné protilátky výše uvedeným postupem. Tím se získá 20 mg anti-dinitrofenylové protilátky, mající 1,2 aktivační skupiny, vztaženo na 1 mol.

c) Ureáza

Enzymem použitým v tomto příkladu je ureáza původu SIGMA (typ VII, označení U 0376) o titru 170 jednotek v 1 mg. Jednou jednotkou je takové množství enzymu, které při teplotě 20 °C a pH 7,0 uvolní z močoviny 1 mikromol iontů NH_4^+ za minutu.

Tento enzym obsahuje v 1 molekule o molekulové hmotnosti 480 000 27 thiolových skupin. Tyto thiolové skupiny, titrovatelné Ellmanovou metodou, nejsou všechny nutné pro enzymatickou aktivitu. Několik jich může proto sloužit k zajištění spojení s aktivovanou protilátkou.

d) Spojení protilátky s enzymem

5 mg ureázy se rozpustí v 0,625 ml roztoku aktivované protilátky o koncentraci 7,2 mg/ml, pufovaného 0,125 M fosforečnanu, o pH 7,0, obsahujícího tedy 4,5 mg aktivované protilátky, a směs se ponechá v inkubátoru při teplotě 25 °C 14 hodin.

Pak se reakční směs chromatografuje na sloupci gelu Sepharose 6 B (Pharmacia), ekvilibrovaného s puforem PBS (10mM fosforečnanu, 140 mM chloridu sodného, pH 7,4). Po eluci následuje měření optické hustoty při 280 nm a měření ureázové aktivity Summerovou metodou (viz S.B. Colowick a N.O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, sv. II, str. 378, vyd. Academic Press, 1955).

Frakce obsahující nejsilnější ureázové aktivity se sdruží a tím se získá 8 ml roztoku sloučeniny podle vynálezu obsahujícího v 1 ml 6,5 jednotky. Jestliže se alikvotní podíl tohoto roztoku absorbuje na sloupci séra hovězího albuminu substituovaného šesti dinitrofenylovými zbytky, vztaženo na 1 mol, a insolubilizovaného na matici gelu Sepharose 4 B předem aktivovaného bromkyanem, zjistí se, že ureázová aktivita zůstává zcela absorbována na sloupci. Toto současně dokazuje, že protilátka, přítomná ve sloučenině podle vynálezu, si zachovala svou schopnost rozpoznat dinitrofenylhaptenu a že ureáza je náležitě vázána na tuto protilátku.

P ř í k l a d 2

Potencializace účinku imunotoxinu anti T65

Sloučenina podle vynálezu, připravená jak popsáno v předchozím příkladu, se podrobí zkouškám ke zjištění jejich biologických vlastností, zejména její schopnosti potencializovat účinnost imunotoxinu anti T65 v příslušném buněčném modelu.

Tento model je tvořen buňkami CEM nádorového bujení lidské mízní tkáně, které od přírody obsahují antigen T65. Tento antigen, proti němuž je namířen použitý imunotoxin, tvoří první cílový antigen modelu. Kromě toho je možno tyto buňky označit pomocí trinitrofenylhaptenu (TNP). Tento hapten je velmi dobře rozpoznáván anti-dinitrofenylovou protilátkou, obsaženou ve zkoušené imunoenzymatické sloučenině a tvoří proto druhý cílový antigen modelu. Bylo zjištěno, že značení buněk trinitrofenylhapténem nemění životaschopnost buněk a nepůsobí rušivě na fixaci imunotoxinu anti T65 na těchto buňkách.

Poněvadž základní vlastnosti imunotoxinů je schopnost inhibovat syntézu bílkovin v cílových buňkách, spočívá použitý test v tom, že se stanoví účinek zkoumaných látek na inkorporaci ^{14}C -leucinu do kultury rakovinných buněk.

Toto stanovení se provádí postupem, vzniklým úpravou postupu popsaného v časopise *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249 (11), str. 3557 až 3562, při němž se používá označeného ^{14}C -leucinu pro určení stupně syntézy bílkovin. Stanovení množství inkorporované radioaktivity se zde provádí na celých buňkách izolovaných filtrací.

Na základě těchto stanovení je možno narysovat křivky znázorňující závislost velikosti účinku na dávce; na tomto diagramu je na ose úseček vynesena molární koncentrace řetězce A zkoumaných látek a na ose pořadnic množství inkorporovaného ^{14}C -leucinu, vyjádřeno v procentech množství inkorporovaného kontrolními buňkami v nepřítomnosti jakékoliv látky ovlivňující syntézu bílkovin.

Takto je možno u každé zkoumané látky stanovit koncentraci, která inhibuje z 50 % inkorporaci ^{14}C -leucinu, čili "inhibiční koncentraci 50" (CI 50).

Výše zmíněné zkoušky se provádějí níže popsanými postupy. Výsledky, získané při těchto zkouškách, jsou znázorněny na obr. 1.

a) Buňky CEM se inkubují 18 hodin při teplotě 37°C v přítomnosti známých koncentrací ricinu nebo izolovaného řetězce A, použitých jako referenční látky, načež se do těchto buněk inkorporuje radioaktivní značkovací látka. Zjištěné hodnoty CI 50 činí $4 \cdot 10^{-12}$ M u ricinu a $4,5 \cdot 10^{-8}$ M u řetězce A. Bylo zjištěno, že se tyto hodnoty neliší od hodnot, které se získají u buněk CEM značených trinitrofenylhapténem (křivka 1, ricin na buňkách CEM - a křivka 2, řetězec A ricinu na buňkách CEM).

b) Buňky CEM značené trinitrofenylhapténem se inkubují 18 hodin při teplotě 37°C v přítomnosti imunotoxinu o anti-DNP specifitě, načež se do nich inkorporuje radioaktivní značkovací látka. Tvar získané křivky cytotoxicity a hodnota CI 50 ($1,5 \cdot 10^{-9}$ M) ukazují, že tyto buňky jsou normálně citlivé na cytotoxický účinek anti-DNP imunotoxinu, z čehož vyplývá, že značení těchto buněk pomocí trinitrofenylhaptenu je provedeno správně (křivka 3).

c) Buňky CEM značené pomocí trinitrofenylhaptenu se nejprve inkubují 1 hodinu při teplotě 4°C v přítomnosti nevázané ureázy o koncentraci 4 j./ml, načež se promyjí a inkubují 18 hodin při teplotě 37°C v přítomnosti imunotoxinu anti T65 a 5 mM močoviny; pak se jim inkorporuje radioaktivní značkovací jehla. Naměřená hodnota CI 50 činí $5 \cdot 10^{-9}$ M. Tato hodnota se neliší od hodnoty, která se zjistí za týchž podmínek při použití buněk CEM, neznačených pomocí trinitrofenylhaptenu, bez zpracování ureázou a v nepřítomnosti močoviny v inkubačním prostředí po vymytí ureázy. Tato zkouška ukazuje, že inkubace v přítomnosti nevázané ureázy nemá za následek spojení ureázy s buňkami a proto nedochází k žádné potencializaci účinku imunotoxinu anti T65 (křivka 4).

d) Buňky CEM, značené trinitrofenylhapténem, se nejprve inkubují 1 hodinu při teplotě 4°C v přítomnosti výše popsané imunoenzymatické sloučeniny, použité v koncentraci 6,5 j./ml. Bylo ostatně ověřeno, že tato sloučenina, použitá za těchto podmínek, nevykazuje žádnou vlastní cytotoxicitu vůči uvažovaným buňkám. Tyto buňky se pak promyjí k odstranění případně zbylého množství sloučeniny, které nebylo na buňkách fixováno, načež se inkubují 18 hodin při teplotě 37°C v přítomnosti imunotoxinu anti T65 a 5 mM močoviny. Nakonec se těmto buňkám inkorporuje radioaktivní značkovací látka. Zjištěná hodnota CI 50 je $3,5 \cdot 10^{-13}$ M (křivka 5).

Tento výsledek ukazuje, že potencializační účinek imunoenzymatické sloučeniny zvyšuje přibližně 14 000 krát cytotoxickou účinnost imunotoxinu vůči cílovým buňkám. Z výsledků této zkoušky vyplývá, že potencializační účinek předpokládá fixaci imunoenzymatické sloučeniny na antigen podle její imunologické specifity. Tato fixace vzdoruje promývání buněk a ponechává na jejich povrchu enzymaticky aktivní ureázu, která uvolňuje ionty NH_4^+ z močoviny, přítomné v inkubačním prostředí s imunotoxinem, což vyvolává známý potencializační účinek iontů NH_4^+ . Dosažený potencializační účinek je zcela analogický účinek, kterého - jak bylo ukázáno - se dosáhne přidáním 10 mM chloridu amonného do inkubačního prostředí.

Tak jako v případě umělého přídavku chloridu amonného se tento potenciální účinek neprojeví ani u ricinu, ani u řetězce A ricinu, ani u imunotoxinu nespecifického pro uvažované buňky.

V podmínkách tohoto příkladu je cytotoxická účinnost imunotoxinu anti T65 v přítomnosti použité imunoenzymatické sloučeniny přibližně 130 000-násobkem účinnosti řetězce A ricinu a předčí účinnost ricinu přibližně 11krát.

P ř í k l a d 3

Imunoenzymatická sloučenina získaná reakcí anti-dinitrofenylové protilátky, substituované maleinimidovou skupinou, s ureázou rostlinného původu

a) Anti-dinitrofenylová protilátka

Tato protilátka je monoklonální protilátkou, která byla získána přečištěním obvyklým postupem z tekutin z břišní dutiny myši kmene Balb/C, jimž byl transplantován hybridom F₉.

Tento hybridom se připraví spojením slezinných buněk myši kmene Balb/C imunizovaných pomocí hovězího γ -globulinu, do něhož bylo předem zavedeno, vztaženo na 1 mol, 20 dinitrofenylových zbytků, s dceřinnými buňkami myelomu murin NS 1, načež se hybridom izoluje známým postupem. Vzniklou protilátkou je imunoglobulin třídy G a isotypu 2 b, jehož konstanta afinity (stanovená pro ligand γ -dinitrofenyllysin) je $1,8 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$.

b) Aktivovaná anti-dinitrofenylová protilátka

K 2,5 ml anti-dinitrofenylové protilátky o koncentraci 9,7 mg/ml v roztoku o pH 7,0 pufrovaném 125 mM fosforečnanu, se přidá 10 μ l dimethylformamidu, obsahujícího 0,4 mg esteru N-hydroxysukcinimidu kyseliny m-maleinoimidobenzoové. Směs se inkubuje 1/2 hodiny při teplotě 25 °C. Roztok se pak vnese na sloupec 10 ml Sephadexu G 25 ekvilibrovaného s pufrovaným roztokem o pH 7,0, obsahujícím 125 mM fosforečnanu. Po eluci následuje měření optické hustoty při 280 nm. Zachytí se 2,5 ml z množství prošlého sloupcem. Stanovení stupně substituce se provádí na alikvotním podílu reakcí s nadbytkem ^{14}C -cysteinu.

Tím se získá roztok protilátky o koncentraci 8 mg v 1 ml, se stupněm substituce 3,5 maleinimidových skupin, vztaženo na 1 mol protilátky.

c) Ureáza

Použitým enzymem je ureáza původu SIGMA (typ VII, označení U 0376) o titru 170 jednotek v 1 mg. Jednou jednotkou je takové množství enzymu, kterým se při teplotě 20 °C a pH 7,0 uvolní z močoviny 1 mikromol iontů NH_4^+ za minutu.

Tento enzym obsahuje v 1 molekule o molekulové hmotnosti 480 000 27 thiolových skupin. Tyto thiolové skupiny, titrovatelné Ellmanovou metodou, nejsou všechny nutné pro enzymatickou aktivitu; několik jich může proto sloužit k zajištění spojení s aktivovanou protilátkou.

d) Spojení protilátky s enzymem

Bezprostředně po odstranění solí na gelu Sephadex G 25 se 2,4 ml roztoku aktivované protilátky smísí se 2,0 ml roztoku ureázy o koncentraci 24 mg/ml a pH 7,0, pufovaném 125 mM fosforečnanu. Směs se inkubuje 1 hodinu při teplotě 25 °C a po odstředění se vnese na sloupec 450 ml gelu Sephadex G 200, ekvilibrovaného s puforem PBS. Po eluci následuje měření optické hustoty při 280 nm a stanovení ureázové aktivity Summerovou metodou.

Frakce obsahující nejsilnější ureázové aktivity se sdruží, čímž se získá 14 ml roztoku sloučeniny podle vynálezu, obsahujícího v 1 ml 102 jednotky.

Jestliže se alikvotní podíl tohoto roztoku chromatografuje na sloupci gelu Protein A-Sepharosa, zjistí se, že se na sloupci nezadrží 30 % ureázové aktivity. Zbytek ureázové aktivity se eluuje současně s protilátkou pufovaným roztokem o pH 3,5. Kontrolní zkouškou se zjistí, že ureáza navázaná na protilátku není sloupcem gelu vůbec zachycena. To dokazuje, že 70 % ureázové aktivity spojených frakcí patří sloučenině protilátky s ureázou. U dále popsaných zkoušek není roztok zbaven volné znečišťující ureázy, která je za použitých podmínek bez účinku, jak je to popsáno v následujícím příkladu.

P ř í k l a d 4

Potenciální imunotoxinu anti T65 imunoenzymatickou sloučeninou z příkladu 3

Sloučenina podle vynálezu, připravena postupem popsaným v příkladu 3, se podrobí zkouškám pro zjištění jejich biologických vlastností, zejména její schopnosti potencializovat účinnost imunotoxinu anti T65 na vhodném buněčném modelu.

Tento model je tvořen dcefinnými buňkami CEM nádorovým bujením lidské mízní tkáně, které od přírody obsahují antigen T65. Tento antigen, proti němuž je namířen použitý imunotoxin, tvoří první cílový antigen modelu. Nadto je možno tyto buňky označit pomocí trinitrofenylhaptenu. Tento haptén je velmi dobře rozpoznáván anti-dinitrofenylovou protilátkou obsaženou v testované imunoenzymatické sloučenině a tvoří proto druhý cílový antigen modelu. Bylo zjištěno, že značení buněk trinitrofenylhapténem nemění životaschopnost buněk a nepůsobí rušivě na fixaci imunotoxinu anti T65 na těchto buňkách.

Poněvadž základní vlastností imunotoxinů je schopnost inhibovat syntézu bílkovin v cílových buňkách, spočívá použitý test v tom, že se stanoví účinek testovaných látek na inkorporování ¹⁴C-leucinu do kultury rakovinných buněk.

Toto stanovení se provádí postupem, vzniklým úpravou postupu popsaného v časopisu Journal of Biological Chemistry, 1974, 249 (11), str. 3557 až 3562, při němž se používá značeného ¹⁴C-leucinu pro určení stupně syntézy bílkovin. Stanovení množství inkorporované radioaktivity se zde provádí na celých buňkách izolovaných filtrací.

Na základě těchto stanovení je možno narysovat křivky znázorňující závislost velikosti účinku na dávce; na tomto diagramu je na ose úseček vynesena molární koncentrace řetězce A testovaných látek a na ose pořadnic množství inkorporovaného ¹⁴C-leucinu, vyjádřené v procentech množství, inkorporovaného kontrolními buňkami v nepřítomnosti jakékoliv látky ovlivňující syntézu bílkovin.

Takto je možno u každé testované látky stanovit koncentraci, která z 50 % inhibuje inkorporaci ¹⁴C-leucinu čili "inhibiční koncentraci 50" (CI 50).

Výše zmíněné testy se provádějí jak níže popsáno. Výsledky těchto testů jsou znázorněny na obr. 2.

a) Kontrolní testy popsané v příkladu 2 a) zde nebyly opakovány, poněvadž je možno jejich výsledky považovat za platné i v tomto příkladu.

b) Buňky CEM označené trinitrofenylhapténem se inkubují 18 hodin při teplotě 37 °C v přítomnosti imunotoxinu o specifitě anti T65, načež se do nich inkorporuje radioaktivní značkovácí látka. Ivar křivky cytotoxicity je shodný s tvarem křivky, která se získá při použití těchto buněk, avšak neznačených trinitrofenylhapténem, za týchž inkubačních podmínek, což ukazuje, že značení těchto buněk trinitrofenylhapténem je řádně provedeno (křivka 6).

c) Buňky CEM značené pomocí trinitrofenylhaptenu se nejprve inkubují 1 hodinu při teplotě 4 °C v přítomnosti nesloučené ureázy o koncentraci 1 j./ml, načež se po promytí inkubují 18 hodin při teplotě 37 °C v přítomnosti imunotoxinu anti T65 o koncentraci 10^{-9} M a v přítomnosti 5 mM močoviny; pak se do nich inkorporuje radioaktivní značkovácí látka.

Poměrné množství inkorporovaného ^{14}C -leucinu, které se dosáhne při tomto testu (65 %), je shodné s množstvím, získaným toutéž koncentrací imunotoxinu anti T65 při testu, popsaném v odstavci b). Tento výsledek ukazuje, že inkubace v přítomnosti nesloučené ureázy nemá za následek žádné spojení ureázy s buňkami, a tudíž žádnou potencializaci účinku imunotoxinu anti T65.

d) Buňky CEM značené trinitrofenylhapténem se nejprve inkubují 1 hodinu při teplotě 4 °C v přítomnosti výše popsané imunoenzymatické sloučeniny, použité v koncentraci 1,02 j./ml. Ostatně bylo ověřeno, že tato sloučenina, použitá za uvedených podmínek, nevykazuje žádnou vlastní cytotoxicitu vůči použitým buňkám. Tyto buňky se pak promyjí k odstarnění popřípadě zbylého množství sloučeniny, které nebylo na buňkách fixováno, načež se inkubují 18 hodin při teplotě 37 °C v přítomnosti imunotoxinu anti T65 a 5 mM močoviny. Nakonec se do nich inkorporuje radioaktivní značkovácí látka. Získaná hodnota CI 50 je $2,4 \cdot 10^{-13}$ M (křivka 7).

Tato hodnota, zcela srovnatelná s hodnotou získanou za použití sloučeniny z příkladu 1, představuje významnou potencializaci účinku imunoenzymatické sloučeniny na imunotoxin.

Tento test demonstruje, že potencializační účinek předpokládá fixaci imunoenzymatické sloučeniny na anti- podle imunologické specifity. Tato fixace vzdoruje promývání buněk a ponechává na jejich povrchu enzymaticky aktivní ureázu, která uvolňuje ionty NH_4^+ z močoviny přítomné v inkubačním prostředí s imunotoxinem, což má za následek potencializační účinek iontů NH_4^+ .

Dosažený potencializační účinek je zcela analogický účinku, kterého se dosáhne, když se inkubace provádí v přítomnosti 10 mM chloridu amonného, přidaného do inkubačního prostředí místo soustavy imunoenzymatická sloučenina/substrát.

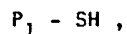
V případě přidání chloridu amonného je získaná hodnota CI 50 $3,8 \cdot 10^{-13}$ M, jak to ukazuje příslušná křivka na obr. 2 (křivka 8).

Z výše uvedených příkladů vyplývá, že sloučenin, vyrobených způsobem podle vynálezu, je možno použít v humánní terapii.

Tyto nové léky, vyrobené způsobem podle vynálezu, se formulují pro použití jako injekce, výhodně intravenózní. Je možno jich použít pro léčení chorobných stavů, rakovinových i jiných, které jsou citlivé na protilátky použité k přípravě imunotoxinu. Používají se v dávkách a za podmínek, které je nutno stanovit pro každý jednotlivý případ zvlášť podle povahy onemocnění.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

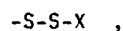
1. Způsob přípravy imunoenzymatických sloučenin z protilátky nebo fragmentu protilátky, který si zachoval schopnost rozpoznat příslušný antigen, a enzymu schopného uvolňovat amoniové ionty z přírodních substrátů dobře snášených organismy vyšších živočichů, vyznačující se tím, že se při teplotě nižší než 30 °C a při pH 5 až 9 nechá ve vodném prostředí za vzniku kovalentní vazby reagovat bílkovina obsahující thiolovou skupinu obecného vzorce



ve kterém

P_1 znamená výše uvedenou protilátku či její fragment nebo výše definovaný enzym, s jinou bílkovinou P_2 , kde P_2 znamená výše definovaný enzym nebo výše uvedenou protilátku či její fragment,

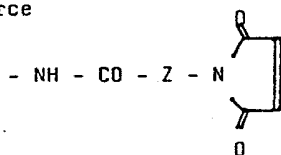
do kteréžto bílkoviny P_2 byla zavedena skupina obecného vzorce



ve kterém

X znamená aktivační zbytek,

nebo skupinu obecného vzorce



ve kterém

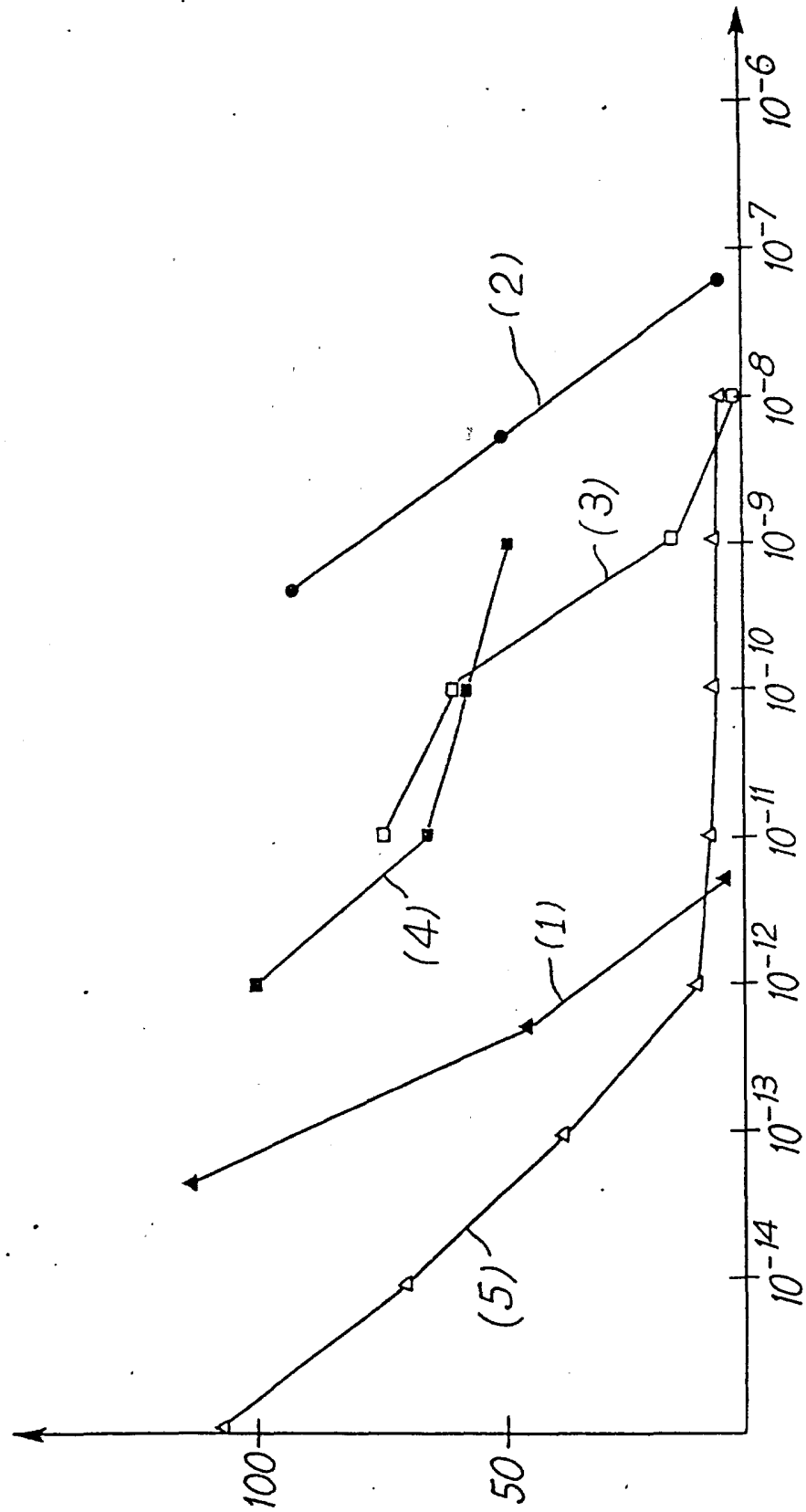
Z znamená oddělovací skupinu, obě schopné reagovat s thiolovou skupinou bílkoviny P_1 .

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije bílkoviny P_2 , do níž byla zavedena disulfidická skupina.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije bílkoviny P_2 , do níž byla zavedena maleinimidová skupina.

2. výkresy

0br. 1



Obv. 2

