



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) 178138

(13) B

(51) Int Cl⁶ A 61 K 39/44, 37/48, 47/48, C 12 P 21/08

Styret for det industrielle rettsvern

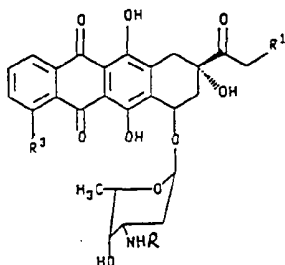
(21) Søknadsnr	883414	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	02.08.88	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	02.08.88	(30) Prioritet	04.08.87, US, 81382
(41) Alm. tilgj.	06.02.89		25.02.88, US, 161068
(44) Utlegningsdato	23.10.95		29.06.88, US, 211301

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

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff-enzymkonjugat**

(56) Anførte publikasjoner CA A 1168150, CA A 1216791, DE A1 3500023, FR 2122695, JP A 60-104082, WO 87/03205, WO 86/03201
C.A. 79: 1245336, 1973

(57) Sammendrag Et antistoff-enzymkonjugat, hvori et antistoff som kan reagere med et antigen på overflaten av tumorceller, konjugeres med et enzym som kan omdanne et svakt cytotoxisk prolegemiddel til den tilsvarende mere aktive stamlegemiddelform, fremstilles ved å omsette antistoffet og enzymet med kryssbindende heterobifunksjonelle midler slik at en thioether- eller disulfidbinding dannes mellom antistoffet og enzymet.



Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff-enzymkonjugat.

Anvendelse av immunokonjugater til selektiv fremføring av cytotoxiske midler til tumorceller ved behandling av cancer er kjent innen teknikken. Fremføring av cytotoxiske midler til tumorområdene er meget ønskelig, da systemisk administrering av disse midler ofte resulterer i tilintetgjørelse av normale celler i legemet, såvel som de tumorceller som søkes tilintetgjort. Ifølge de for tiden anvendte antitumor-legemiddelfremføringssystemer konjugeres et cytotoxisk middel med et tumorspesifikt antistoff under dannelse av et immunokonjugat som bindes til tumorcellene og derved "avleverer" det cytotoxiske middel i tumorområdet. Immunokonjugatene anvendt i disse målrettede systemer, omfatter antistoff-legemiddelkonjugater [se f.eks. R.W. Baldwin et al. "Monoclonal Antibodies For Cancer Treatment", *Lancet*, s. 603-05 (15. mars 1986)] og antistoff-toksinkonjugater [se f.eks. P.E. Thorpe "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" i *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, A. Pinchere et al. (red.), s. 475-506 (1985)].

Både polyklonale antistoffer og monoklonale antistoffer er blitt anvendt i disse immunokonjugater [se f.eks. K. Ohkawa et al. "Selective In Vitro And In Vivo Growth Inhibition Against Human Yolk Sac Tumor Cell Lines By Purified Antibody Against Human α -Fetoprotein Conjugated With Mitomycin C Via Human Serum Albumin", *Cancer Immunol. Immunother.*, 23, s. 81-86 (1986) og G.F. Rowland et al. "Drug Localisation And Growth Inhibition Studies Of Vindesine-Monoclonal Anti-CEA Conjugates in A Human Tumor Xenograft", *Cancer Immunol. Immunother.*, 21, s. 183-87 (1986)]. De anvendte legemidler i disse immunokonjugater omfatter daunomycin (se f.eks. J. Gallego et al. "Preparation Of Four Daunomycin-Monoclonal Antibody 791T/36 Conjugates With Anti-Tumor Activity", *Int. J. Cancer*, 33, s. 737-44 (1984) og R. Arnon et al. "In Vitro And In Vivo Efficacy Of Conjugates Of Daunomycin With Anti-Tumor Antibodies", *Immunological Rev.*, 62, s. 5-27 (1982)], methotrexat

[N. Endo et al. "In Vitro Cytotoxicity Of A Human Serum Albumin-Mediated Conjugate Of Methotrexate With Anti-MM46 Monoclonal Antibody", *Cancer Research*, 47, s. 1076-80 (1987)], mitomycin C [K. Ohkawa et al., supra], og vindesin
5 [G.F. Rowland et al., supra]. De anvendte toksiner i antistoff-toksinkonjugatene omfatter bakterielle toksiner slik som difterintoksin og plantetoksiner slik som ricin [se f.eks. F.L. Moolten et al. "Antibodies Conjugated to Patent Cytotoxins As Specific Antitumor Agents", *Immunol. Rev.*, 62, s. 47-73 (1982)].
10

Til tross for omfanget av forskningen rettet mot anvendelse av immunokonjugater til terapeutiske formål, er adskillige begrensinger forbundet med disse fremføringsmetoder, blitt tydelige [se f.eks. M.J. Embleton "Targeting
15 Of Anti-Cancer Therapeutic Agents By Monoclonal Antibodies", *Biochemical Society Transactions*, 14, s. 393-395 (615th Meeting, Belfast 1986)]. For det første er den store mengde legemiddel som det er nødvendig å fremføre til tumorcellen for å fremkalle tilintetgjørelse av cellen, ofte uopp-
20 nåelig på grunn av begrensninger som skyldes antallet av tumor-assosierte antigener på overflaten av cellene, og antallet av legemiddelmolekyler som kan bindes til et gitt antistoffmolekyl. Denne begrensning har ført til anvendelse av kraftigere cytotoxiske midler slik som plante-
25 toksiner i disse konjugater, og til utvikling av polymerbundne antistoff-legemiddelkonjugater med meget høye legemiddel-multiplisitetsforhold [se f.eks. P.E. Thorpe, supra, s. 475-506, og R.W. Baldwin et al. "Design And Therapeutic Evaluation of Monoclonal Antibody 791T/36 -
30 Methotrexate Conjugates" i *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, s. 215-31 (Alan R. Liss, Inc. 1985)]. Selv med store legemiddelmengdeforhold eller ved anvendelse av kraftige toksiner, utviser mange immunokonjugater imidlertid stadig sub-optimal cytotoxiske aktivitet og er ikke
35 i stand til å fremkalle fullstendig tilintetgjørelse ved doser hvor alle tilgjengelige antigene steder er mettet.

For det annet er det åpenbart at den cytotoxiske aktivitet av et immunokonjugat ofte avhenger av den av antistoff-komponenten i konjugatet, formidlede opptagelse

derav i tumorcellen [se f.eks. J.M. Lambert et al.

"Purified Immunotoxins That Are Reactive With Human Lymphoid Cells", J. Biol. Chem., 260 (nr. 22, s. 12035-12041 (1985)].

Denne internalisering er avgjørende når det anvendes et

antistoff-legemiddelkonjugat hvor legemidlet har et intra-
cellulært virkningsområde, eller når antistoff-toksin-

konjugater anvendes. Hoveddelen av tumor-assosierte

antigener, og således antistoff-legemiddel- eller antistoff-
toksinkonjugater bundet til disse antigener, er imidlertid

ikke internalisert. De konjugater som er internalisert,

transporteres ofte til cellens lysosom hvor legemidlet

eller toksinet nedbrytes [se E.S. Vitetta et al., Science,
238, s. 1098-1104 (1987)]. Selv om et antistoff-legemiddel-

eller antistoff-toksinkonjugat kan utvise fremragende

tumorbindingsegenskaper, kan konjugatet ikke desto mindre

utvise begrenset cytotoxisk anvendelighet som følge av

manglende evne til å nå sitt virkningsområde innen cellen.

Det er dessuten velkjent at tumorcellepopulasjoner

ofte er heterogene med hensyn til antigen-ekspresjon [se

f.eks. A.P. Albino et al. "Heterogeneity In Surface

Antigen and Glycoprotein Expression of Cell Lines Derived

From Different Melanoma Metastases of The Same Patient",

J. Exp. Med., 154, s. 1764-78 (1981)]. I tillegg er det

blitt vist at antigen-positive tumorceller kan fremkalle

antigen-negative avkom [se f.eks. M. Yeh et al. "Clonal

Variation for Expression of a Human Melanoma Antigen

Defined by a Monoclonal Antibody", J. Immunol., 126 (nr. 4),

s. 1312-17 (1981)]. I enhver populasjon av tumorceller vil

det således være et visst antall celler som ikke utviser det

antigen for hvilket et bestemt immunokonjugat utviser

spesifisitet. Immunokonjugatet vil derfor ikke kunne bindes

til disse celler og formidle deres tilintetgjørelse.

Som følge av disse ulemper har de for tiden anvendte

antitumor-legemiddel- eller toksinfremføringssystemer en

begrenset suksess, særlig ved anvendelse til in vivo-

behandling.

Foruten de ovenfor beskrevne immunokonjugater er

antistoff-enzymkonjugater blitt undersøkt in vitro i kom-

binasjon med et annet ikke-målrettet enzym til omdannelse

av jodid eller arsfenamin til de toksiske former derav, med henblikk på å forsterke antistoff-formidlet cytotoksisitet [se f.eks. C.W. Parker et al. "Enzymatic Activation and Trapping of Luminol-Substituted Peptides and Proteins. A Possible Means of Amplifying the Cytotoxicity of Anti-Tumor Antibodies", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72 (nr. 1), s. 338-42 (1975), og G.W. Philpott et al. "Affinity Cytotoxicity of Tumor Cells With Antibody-Glucose Oxidase Conjugates, Peroxidase, and Arsp η enamine", Cancer Research, 34, s. 2159-64 (1974)].

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

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

Sluttelig omhandler Europapatentsøknad nr. 84302218.7 en fremgangsmåte for behandling av en sykelig cellepopulasjon slik som en tumor, ved hvilken fremgangsmåte et antistoff anvendes til å rette et ikke-metabolisert antigen mot tumorcellene. Antigenet akkumuleres innen i det minste en prosentdel av tumorcellene som deretter lyseres under frigjørelse av antigenet i en ubikvitær fibronektin-oppfangelsesmatrise dannet i tumorområdet. På dette tidspunkt administreres ved metoden ifølge denne oppfinnelse en jodholdig ligand som er spesifikk for, og som vil bindes til det til matrisen bundne antigen. Det cytotoksiske jod reagerer deretter til tilintetgjørelse av tumorcellene på dette sted. Det er beskrevet mange utførelsesformer i denne søknad, og en av disse foreslår anvendelse av et

antistoff-enzymkonjugat til å målrette enzymet mot tumor-området, og tilsetning av et ikke-letalt substrat som enzymet kan omdanne til et cytotoxisk materiale [se angitte Europapatentsøknad side 34-35]. I søknaden er det imidlertid ikke
5 noe sted beskrevet hvordan denne utførelsesform skal utøves. Tilsvarende foreslår Hellstrom et al. "Antibodies For Drug Delivery" i Controlled Drug Delivery (2. utg.), Robinson og Lee (red.), s. 639 (1987), at "[d]rugs which would be non-toxic until 'activated' by an agent (e.g. an enzyme) localized
10 to tumor may be considered as another approach

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

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for
15 fremstilling av et antistoff-enzymkonjugat hvor antistoffet reagerer med et antigen på overflaten av tumorceller og er konjugert med et enzym som er i stand til å omdanne et svakt cytotoxisk prolegemiddel til det tilsvarende mer aktive stamlegemiddel, idet antistoffet er L6, som produseres av det ved
20 ATCC under deponeringsnummer HB 8677 deponerte hybridom, det monoklonale antistoff 96,5, som er spesifikt for p97, som er et melanoma-assosiert antigen, eller 1F5, som produseres av det ved ATCC under deponeringsnummer HB 9646 deponerte hybridom, enzymet er en alkalisk fosfatase, penicillin-amidase,
25 arylsulfatase, cytosindeaminase, protease, D-alanylkarboksy-peptidase, et karbohydratpaltende enzym eller en β -laktamase, prolegemidlet er et fosfatholdig prolegemiddel, et sulfatholdig prolegemiddel, et peptidholdig prolegemiddel, et glukosylert prolegemiddel, et β -laktamholdig prolegemiddel,
30 et D-aminosyremodifisert prolegemiddel, et fenoksyacetamidholdig prolegemiddel, et fenylacetamidholdig prolegemiddel eller et substituert fenylacetamidholdig prolegemiddel, og stamlegemidlet er et etoposid, teniposid, et adriamycin, daunomycin, carminomycin, aminopterin, dactinomycin, mitomycin, et cis-platin, en cis-platinanalog, et bleomycin,
35 esperamicin, et 5-fluoruracil eller et melfalan eller annen nitrogensenepsgass, hvilken fremgangsmåte er kjennetegnet ved at antistoffet og enzymet omsettes

med et kryssbindende, heterobifunksjonelt middel slik at en tioeter eller disulfidbinding dannes mellom antistoffet og enzymet.

Ifølge foretrukne utførelsesformer er antistoff-
5 enzymkonjugater inneholdende enzymet alkalisk fosfatase ("AP") blitt anvendt sammen med det hittil ukjente prolegemiddel etoposid-4'-fosfat eller 7-(2'-aminoethylfosfat)-mitomycin eller en kombinasjon derav, til å fremkalle tilintetgjørelse av tumorceller. Ifølge en annen utførelsesform er et anti-
10 stoff-enzymkonjugat inneholdende enzymet penicillin V amidase ("PVA") blitt anvendt sammen med et hittil ukjent prolegemiddel N-(p-hydroxyfenoxyacetyl)-adriamycin til å fremkalle tilintetgjørelse av tumorceller. En ytterligere utførelsesform angår anvendelse av et antistoffenzymkonjugat som inneholder
15 enzymet cytosin-deaminase ("CD") i kombinasjon med prolegemidlet 5-fluorcytosin til å fremkalle tilintetgjørelse av tumorceller.

Immunkonjugatene og prolegemidlene kan anvendes i antitumorpreparater slik som preparater inneholdende en
20 farmasøytisk effektiv mengde av minst ett immunkonjugat eller prolegemiddel ifølge oppfinnelsen, og en farmasøytisk akseptabel bærer. Enn videre kan immunkonjugatene og prolegemidlene anvendes i kombinasjoner og ved metoder til behandling av tumorer i pattedyr, hvorved et pattedyr behandles med en
25 farmasøytisk effektiv mengde av preparatene ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen belyses nærmere i det etterfølgende i forbindelse med tegningene hvori

figur 1 avbilder den strategi til aktivering av pro-
30 legemidler ved tumorceller som binder antistoffenzymkonjugater,

figur 2 avbilder en SDS-polyacrylamidgelanalyse (5-12,5 % gradientgel, ikke-reduserende) av: (A) 96,5-AP immunkonjugat, (B) L6-AP immunkonjugat, (C) AP, (D) det monoklonale
35 antistoff 96,5 og (E) det monoklonale antistoff L6.

Figur 3 avbilder fremstilling og hydrolyse av etoposidfosfat og etoposidthiofosfat-prolegemidler.

Figur 4 avbilder høytrykssvækekromatografi-(HPLC) bestemmelse ved 254 nm) av: (A) etoposid-4'-fosfat alene, dvs.

i fravær av AP- eller AP-L6-konjugatet, (B) etoposid alene, (C) produktet fremstilt 5 minutter etter omsetning av etoposid-4'-fosfat-prolegemidlet med AP, og (D) produktet fremstilt 5 minutter etter omsetning av etoposid-4'-fosfatprolegemidlet med L6-AP-konjugatet.

Figur 5 er en sammenlignende grafisk fremstilling av den prosentvise etoposid-friggjørelse mot tiden ved å utsette etoposid-4'-fosfat eller etoposid-4'-thiofosfat for alkalisk fosfatase.

Figur 6 avbilder en sammenligning av bindingen av de monoklonale antistoffer L6 og 96,5 og L6-AP- og 96,5-AP-konjugatene til H3347 tumorceller.

Figur 7 avbilder en sammenligning av bindingen av de monoklonale antistoffer L6 og 1F5 og L6-AP- og 1F5-AP-konjugatene til H3347 tumorceller.

Figur 8 er en sammenlignende grafisk fremstilling av det prosentvise antall tilintetgjorte tumorceller i forhold til den molare konsentrasjon av etoposid eller etoposidfosfatprolegemiddel. Kurven av bilder den økte prosentvise tilintetgjørelse som fremkommer ved reaksjonen av det relativt ikke-cytotoksiske prolegemiddel med enten L6-AP-konjugatet eller 96,5-AP-konjugatet.

Figur 9 er en sammenlignende grafisk fremstilling av den prosentvise inhibering av ^3H -thymidin-inkorporering i DNA av H3347 tumorceller, behandlet med ● : etoposid, ○ : EP, □ : L6-AP+EP eller ■ : 1F5-AP+EP. Kurven avbilder den iakttatte økning av cytotoksisk aktivitet i det tilfelle hvor tumorcellene behandles med L6-AP og EP i sammenligning med den iakttatte aktivitet ved behandling med EP alene.

Figur 10 avbilder analyser av fosfatase-aktivitet i tumorer som var ubehandlet eller behandlet med konjugatene. Figur 10A avbilder den samlede fosfatase-aktivitet hos H3347-tumorer mot tiden i ubehandlede mus i forhold til mus behandlet 24 timer tidligere med L6-AP-konjugatet. Figur 10B viser tumor-tverrsnitt fra ubehandlede eller L6-AP- eller 1F5-AP-forbehandlede mus og farget enten med hematoxylin og eosin eller med et AP-substrat. Mørke områder angir høy fosfatase-aktivitet.

Figur 11 er en sammenlignende grafisk fremstilling av tumorvolumet i mus mot tiden, idet kodepunktene har følgende betydning. Ubehandlet: ●, behandlet med etoposid: ○, behandlet med EP: ■, behandlet med 1F5-AP+EP: □ eller behandlet med L6-AP+EP: ▲. Pilene angir starten på legemiddelbehandling, og hvor konjugatene ble administrert, skjedde dette 18-24 timer tidligere. Kurven avbilder den utpregede antitumorvirkning som ble iaktatt etter behandling med L6-AP og EP.

Figur 12 avbilder den kjemiske struktur for mitomycinderivatene som anvendes, herunder det hittil ukjente prolegemiddel 7-(2'-aminoethylfosfat)mitomycin ("MOP").

Figur 13 avbilder reaksjonen av MOP med alkalisk fosfataseenzym mot tiden. Reaksjonsforløpet ble registrert ved hjelp av HPLC under bestemmelse av frigjøringen av MOH som er mitomycin-alkoholderivatet av MOP.

Figur 14 avbilder en sammenligning av de monoklonale antistoffer L6 og 1F5, og L6-AP- og 1F5-AP-konjugatene til H2981 tumorceller.

Figur 15 er en grafisk fremstilling av den prosentvise inhibering av ³H-thymidin-inkorporering i DNA av H2981 tumorceller, behandlet med ▲ : etoposid, ■ : EP, □ : AP+EP, ● : L6-AP+EP eller ○ : 1F5-AP+EP. Kurven avbilder den iaktatte økning av cytotoxisk aktivitet når tumorcellene forbehandles med L6-AP-konjugatet ifølge oppfinnelsen i forhold til EP alene.

Figur 16 er en sammenligning av den prosentvise inhibering av ³H-thymidin-inkorporering i DNA av H1981 tumorceller behandlet med - : mitomycin C (MMC), ▲ : MOH, ■ : MOP, Δ : MOP+AP, ● : L6-AP+MOP eller ○ : 1F5-AP+MOP. Kurven avbilder den iaktatte økning i cytotoxisk aktivitet når tumorcellene ble penetrert med L6-AP-konjugatet, etterfulgt av MOP-behandling, sammenlignet med aktiviteten som ble iaktatt etter behandling med MOP alene.

Figur 17 er en sammenlignende grafisk fremstilling av den prosentvise inhibering av ³H-thymidin-inkorporering i DNA av CEM-celler, behandlet med ▲ : MMC, □ : MOH, ■ : MOP, ● : L6-AP+MOP eller ○ : 1F5-AP+MOP. Denne kurve viser spesifisiteten av den økte cytotoxisitet som fremgår fra figur 16 ovenfor, da en signifikant økning ikke ble iaktatt på CEM-

celler som mangler L6-antigenet.

Figur 18 er en sammenlignende grafisk fremstilling av tumorvolumet mot tiden i mus som var ubehandlet (kontroll): ● eller behandlet med MOH: ■, MOP: o, 1F5-AP+MOP: ▲ eller L6-AP+MOP: □. Pilene angir de tidsmessig atskilte legemiddelbehandlingene, og hvor det var praktisk, ble konjugatene administrert 18-24 timer tidligere før hver legemiddelbehandling. Kurven viser den uttalte antitumorvirkning som ble iaktatt ved behandling av tumorene med L6-AP+MOP.

Figur 19 er en sammenlignende grafisk fremstilling av tumorvolumet mot tiden i mus som var ubehandlet (kontroll): ■ eller behandlet med MOP/EP: □, 1F5-AP+MOP/EP: o eller L6-AP+MOP/EP: ●. Pilene angir de tidsmessig atskilte legemiddelbehandlingene, og hvor det var praktisk, ble konjugatene administrert 18-24 timer tidligere enn hver legemiddelbehandling. Kurven viser den uttalte antitumorvirkning som ble iaktatt ved behandling av tumorene med L6-AP-konjugatet og en kombinasjon av prolegemidlene MOP og EP.

Figur 20 avbilder den kjemiske struktur av et adriamycin-prolegemiddel ("APO") og dets fremstilling fra adriamycin.

Figur 21 er en sammenlignende grafisk fremstilling av den prosentvise adriamycin-frigjørelse mot tiden ved omsetning av APO med Δ: fritt penicillin V amidaseenzym eller o og □: L6-PVA-konjugatet ved i alt hhv. 10 og 100 µg protein/ml. Reaksjonens forløp ble registrert med HPLC.

Figur 22 avbilder en sammenligning mellom bindingen av det monoklonale antistoff L6 og L6-PVA- og 1F5-PVA-konjugatene til H2981 tumorceller.

Figur 23 er en sammenlignende grafisk fremstilling av den prosentvise inhibering av ³H-thymidin-inkorporering i DNA av H2981 tumorceller behandlet med o: adriamycin (ADM), ●: APO, Δ: L6-PVA+APO eller ▲: 1F5-PVA+APO. Kurven avbilder den iaktatte økning i cytotoksisk aktivitet når tumorcellene ble penetrert med L6-PVA-konjugatet, etterfulgt av APO-behandling, sammenlignet med aktiviteten som ble iaktatt ved behandling med APO alene.

Figur 24 avbilder en sammenligning mellom bindingen av de monoklonale antistoffer L6 og 1F5 og L6-PVA- og 1F5-PVA-

konjugatene til Daudi lymfomaceller.

Figur 25 er en sammenlignende grafisk fremstilling av den prosentvise inhibering av ^3H -thymidin-inkorporering i DNA av Daudi lymfomaceller behandlet med ● : ADM, ○ : APO. ■ : L6-PVA+APO eller □ : 1F5-PVA+APO. Kurven avbilder den iaktttatte økning i cytotoxisk aktivitet når tumorcellene ble penetrert med 1F5-PVA-konjugatet, etterfulgt av APO-behandling, sammenlignet med den cytotoxiske virkning som ble iaktatt etter behandling av cellene med APO alene.

Figur 26 avbilder de kjemiske strukturer av 5-fluor-cytosin ("5-FC") og f-fluoruracil ("5-FU"). 5-FC er et prolegemiddel som omdannes til 5-FU.

Figur 27 er en sammenlignende grafisk fremstilling av den dannede mengde produkt mot tiden ved omsetning av cytosin (cyto) med ● : CD, ○ : L6-CD eller ■ : 1F5-CD eller ved omsetning av 5FC med □ : CD, ▲ : L6-CD eller Δ : 1F5-CD. Det dannede produkt under anvendelse av cytosin som substrat, var uracil, og det dannede produkt under anvendelse av 5-FC som substrat, var 5-FU. Reaksjonsforløpet ble registrert spektrofotometrisk.

Figur 28 avbilder en sammenligning av bindingen av det monoklonale antistoff L6 og L6-CD og 1F5-CD-konjugatene til H2981 tumorcelle.

Figur 29 er en grafisk fremstilling av den prosentvise inhibering av ^3H -thymidin-inkorporering i proteinet av H2981 tumorceller behandlet med ● : 5-FU, □ : 5-FC, ○ : L6-CD+5-FC eller ■ : 1F5-CD+5-FC. Kurven avbilder den iaktttatte økning i cytotoxisk aktivitet når tumorcellene var forbehandlet med L6-CD-konjugatet, etterfulgt av 5-FC-behandling, sammenlignet med aktiviteten som ble iaktatt etter behandling med 5-FC alene.

Antistoffkomponenten i immunkonjugatet omfatter ethvert antistoff som spesifikt bindes til et tumor-assosiert antigen. Eksempler på slike antistoffer omfatter slike antistoffer som spesifikt bindes til antigen er som finnes på carcinoma, melanoma, lymfoma og sarcoma i knokler og bløtt vev, så vel som andre tumorer. Antistoff er som forblir bundet til celleoverflaten i lengre tids rom, eller som internaliserer meget langsomt, foretrekkes. Disse antistoffer kan være

polyklonale eller fortrinnsvis monoklonale, kan være intakte antistoffmolekyler eller fragmenter inneholdende det aktive bindingsområde av antistoffet, f.eks. Fab eller $F(ab')_2$, og kan fremstilles under anvendelse av kjente metoder innen faget [se f.eks. R.A. DeWeger et al. "Eradication Of Murine Lymphoma And Melanoma Cells By Chlorambucil-Antibody Complexes, Immunological Rev., 62, s. 29-45 (1982) (tumor-spesifikke monoklonale antistoffer fremstilt og anvendt i konjugater), M. Yeh et al. "Cell Surface Antigens Of Human Melanoma Identified By Monoclonal Antibodies", Proc. Natl. Acad. Sci., 76, s. 2927 (1979), J.P. Brown et al. "Structural Characterization Of Human Melanoma-Associated Antigen p97 with Monoclonal Antibodies", J. Immunol., 127 (nr. 2), s. 539-546 (1981) (fremstilling av tumor-spesifikke, monoklonale antistoffer), og J.P. Mach et al. "Improvement Of Colon Carcinoma Imaging: From Polyclonal Anti-CEA Antibodies And Static Photoscanning to Monoclonal Fab Fragments And ECT", i Monoclonal Antibodies for Cancer Detection And Therapy, R.W. Baldwin et al. (red.), s. 53-64 (Academic Press 1985) (fremstilling av antistofffragmenter og anvendelse derav til lokalisering av tumorceller)]. Hvis monoklonale antistoffer anvendes, kan antistoffene dessuten være av museopprinnelse eller human opprinnelse, eller være kimære antistoffer [se f.eks. V.T. Oi "Chimeric Antibodies", BioTechniques, 4, (nr. 3), s. 214-221 (1986)].

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

Enzymer som er anvendbare ved metoden, omfatter alkalisk fosfatase som er anvendbar til omdannelse av fosfat- holdige prolegemidler til frie legemidler, arylsulfatase som er anvendbar til omdannelse av sulfatholdige prolegemidler til 5 frie legemidler, cytosindeaminase som er anvendbar til omdannelse av ikke-toksisk 5-fluorcytosin til anti-cancerlegemidlet, 5-fluoruracil, proteaser slik som serratia protease, termolysin, subtilisin, carboxypeptidaser og cathepsiner (slik som cathepsin B og L) som er anvendbare til, omdannelse av peptid- 10 holdige prolegemidler til frie legemidler, D-alanylcarboxypeptidaser som er anvendbare til omdannelse av prolegemidler som inneholder D-aminosyresubstituent, carbohydrat-spaltende enzymer slik som β -galactosidase og neuraminidase, som er anvendbare til omdannelse av glycosylerte prolegemidler til 15 frie legemidler, β -lactamase som er anvendbar til omdannelse av legemidler derivatisert med β -lactamer, til frie legemidler, og penicillin-amidaser slik som penicillin V amidase og penicillin G amidase, som er anvendbare til omdannelse av legemidler som er derivatisert ved deres aminnitrogenatomer 20 med hhv. fenoxycetyl eller fenylacetyl, til frie legemidler. Alternativt kan antistoffer med enzymatisk aktivitet, også kjent innen teknikken som abzymer, anvendes til å omdanne prolegemidlene ifølge oppfinnelsen til frie aktive legemidler [se f.eks. R.J. Massey, Nature, 328, s. 457-458 (1987)]. Anti- 25 stoff-abzymkonjugater kan fremstilles som her beskrevet, til fremføring av abzymet til en tumorcellepopulasjon.

Prolegemidlene omfatter tilsvarende de ovenfor angitte prolegemidler, f.eks. fosfatholdige prolegemidler, thiofosfat- holdige prolegemidler, sulfat- holdige prolegemidler, 30 peptid- holdige prolegemidler, D-aminosyre-modifiserte prolegemidler, glycosylerte prolegemidler, β -lactam- holdige prolegemidler, eventuelt substituerte fenoxycetamid- holdige prolegemidler, eller eventuelt substituerte fenylacetamid- holdige prolegemidler, 5-fluorcytosin og andre 5-fluoruridin-prolege- 35 midler, som kan omdannes av enzymet i konjugatet til det mer aktive, cytotoxiske frie legemiddel. Eksempler på cytotoxiske legemidler som kan derivatiseres til en prolegemiddel- form, omfatter etoposid, teniposid, adriamycin, daunomycin, carminomycin, aminopterin, dactinomycin, mitomyciner, cis-

platin og cis-platinanaloge, bleomyciner, esperamiciner [se US patentskrift nr. 4.675.187], 5-fluoruracil, melfalan og andre beslektede nitrogen-sennepsgasser.

Enzymene kan bindes kovalent til antistoffene ved
5 hjelp av velkjente metoder innen faget, slik som ved anvendelse av de heterobifunksjonelle, kryssbindende reagenser SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat) eller SMCC (Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat [se f.eks. P.E. Thorpe et al. "The Preparation And Cytotoxic
10 Properties of Antibody-Toxin Conjugates", Immunological Rev., 62, s. 119-58 (1982), J.M. Lambert et al., supra, på side 12038, G.F. Rowland et al., supra, på side 183-84, og J. Gallego et al., supra, på side 737-38]. Kondenserte proteiner som minst omfatter antigen-bindingsområdet av et antistoff, og
15 som er bundet til minst én funksjonell aktiv del av et enzym, kan alternativt oppbygges under anvendelse av den velkjente, rekombinante DNA-teknikk [se f.eks. M.S. Neuberger et al., Nature, 312, s. 604-608 (1984)]. Disse kondenserte proteiner virker hovedsakelig på samme måte som de her beskrevne antistoff-enzymkonjugater.
20

Ifølge en foretrukket utførelsesform konjugeres et antistoff med spesifisitet for et humant cancerantigen med enzymet alkalisk fosfatase, og anvendes i overensstemmelse med metoden til å omdanne et 4'-fosfatderivat av epipodofyllo-
25 toksinglucosidene til et aktivt anti-cancerlegemiddel. Slike derivater omfatter etoposid-4'-fosfat, etoposid-4'-thiofosfat og teniposid-4'-fosfat (se fig. 3 hvor strukturformlene for disse derivater er angitt, idet teniposidderivatet inneholder en 2-thienylgruppe istedenfor metylgruppe i sukkerdelen av de
30 viste strukturformler). Andre utførelsesformer kan omfatte fosfatderivater av disse glucosider, hvori fosfatdelen er anbrakt ved andre hydroxylgrupper i glucosidene. I overensstemmelse med en mer foretrukket utførelsesform er det som prolegemiddel anvendte fosfatderivat imidlertid etoposid-4'-
35 fosfat eller etoposid-4'-thiofosfat.

Alkalisk fosfatase AP ble kovalent bundet til det monoklonale antistoff L6 som er et IgG2a antistoff som bindes til et glycoprotein-antigen på humane lungecarcinomaceller [I. Hellstrom et al. "Antitumor Effects of L6, An IgG2a Antibody

That Reacts With Most Human Carcinomas", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, s. 7059-63 (1986)]. Det dannede immunkonjugat utviste ikke noe tap av enzymatisk aktivitet i sammenligning med aktiviteten av det ukonjugerte enzym. I tillegg kommer at
5 det meste av bindingsaktiviteten hos L6-antistoffet ble bevart i immunkonjugatet.

Under anvendelse av *in vitro* cytotoxissitetsundersøkelser ble det påvist at behandling av celler fra en human carcinomacellelinje med L6-AP immunkonjugat, etterfulgt av at
10 cellene ble utsatt for et etoposidfosfatprolegemiddel, resulterte i en cytotoxissitet som var sammenlignbar med anvendelse av etoposid alene på disse cancerceller. Derimot utviste etoposidfosfat alene liten cytotoxissitet.

I tillegg påviste *in vivo*-undersøkelser i nakne mus
15 at L6-AP-immunkonjugatet er lokalisert til L6-positive tumortransplantater. Histologisk vurdering av disse tumorer indikerte at det målrettede AP-enzym ble fordelt i hele tumor-massen.

I tillegg utviste L6-AP-immunkonjugatet sterk *in vivo*
20 antitumoraktivitet ved terapiforsøk hvor konjugatet ble administrert til nakne mus med subkutane L-positive tumorer, etterfulgt av behandling med et etoposidfosfatprolegemiddel. Antitumorvirkningen ved denne behandling omfattet fullstendig regresjon av enkelte tumorer og overgikk virkningen ved
25 behandling med prolegemidlet eller stamlegemidlet alene.

I overensstemmelse med en annen foretrukket utførelsesform ble L6-AP-immunkonjugatet anvendt til å omdanne et hittil ukjent mitomycinfosfat prolegemiddel til et aktivt mitomycinlegemiddel. Som tilfelle er med etoposidfosfat-prolegemidlet, fjerner AP-enzymet i konjugatet fosfatgruppen fra
30 prolegemidlet, hvorved et aktivt antitumormiddel frigjøres. Mitomycinfosfat-prolegemidlet kan være et N^7-C_{1-8} -alkylfosfatderivat av mitomycin C eller porfiromycin, eller farmasøytisk akseptable salter derav. N^7 viser til nitrogenatomet som er
35 bundet i 7-stillingen av mitosankjernen i stamlegemidlet. Ifølge en mer foretrukket utførelsesform er det anvendte derivat 7-(2'-aminoethylfosfat)-mitomycin ("MOP") (se fig. 12 hvori strukturformlene for mitomycin C og MOP i form av et

dinatriumsalt er angitt, idet porfiromycinderivatet, svarende til MOP, inneholder en methylgruppe på aziridin-nitrogenatomet i mitomycin C). Alternativt kan MOP-forbindelsen betegnes som 9a-methoxy-7-[(fosfonooxy)-ethyl]amino]-mitosan, dinatrium-
5 salt. Andre utførelsesformer kan omfatte anvendelse av N⁷-alkyl-mitomycin-fosforthioater som prolegemidler.

In vitro-undersøkelser indikerte at behandling av celler fra en human lungetumorlinje med L6-AP-immunkonjugatet, etterfulgt av at cellene ble ekspōnert for MOP, resulterte i
10 en cytotoxiskitet som kunne sammenlignes med anvendelse av det anerkjente anti-tumormiddel mitomycin alene på tumorcellene. Anvendelse av mitomycinfosfatprolegemidlet alene på tumorcellene resulterte i liten cytotoxiskitet. Tilsvarende utviste L6-AP-immunkonjugatet en uttalt anti-tumorvirkning *in vivo* ved
15 terapiforsøk hvor konjugatet ble administrert til nakne mus med humane lungetumorer, etterfulgt av behandling med mitomycinfosfatprolegemidlet. Denne anti-tumorvirkning oversteg virkningen som ble oppnådd under anvendelse av prolegemidlet alene eller stamlegemidlet alene, eller når prolegemidlet ble
20 administrert sammen med et ikke-bindende antistoff-AP-konjugat.

I henhold til en ytterligere utførelsesform ble et penicillin-amidase-enzym kovalent bundet til det monoklonale L6 antistoff, og det resulterende immunkonjugat ble anvendt
25 til å omdanne et hittil ukjent adriamycin-prolegemiddel til det aktive anti-tumor-legemiddel adriamycin. Den bestemte anvendte amidase var en fra *Fusarium oxysporum* isolert penicillin V amidase ("PVA") som hydrolyserer fenoksyacetylamid-bindinger. Således var det særlig anvendte prolegemiddel
30 N-(p-hydroxyfenoksyacetyl)adriamycin ("APO"), som ble hydrolysert av amidasen under frigivelse av det kraftige anti-tumormiddel adriamycin. L6-PVA-immunkonjugatet utviste ikke noe tap av enzymatisk aktivitet ved sammenligning med aktiviteten av det ukonjugerte enzym, og det meste av bindings-
35 aktiviteten av L6-antistoffet ble bibeholdt i konjugatet.

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

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

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

En utførelsesform omfatter enn videre anvendelsen av
15 andre amidaser slik som penicillin G amidase som enzymkomponent i immunkonjugatet, så vel som andre tilsvarende derivatiserte prolegemidler, slik at den bestemte amidase kan hydrolyserer dette prolegemiddel til en aktiv antitumorform. Når en penicillin G amidase eksempelvis anvendes som enzym, bør prolegemidlet inneholde en fenylacetylamid-gruppe (i motsetning
20 til fenoxycetylamidgruppen i APO), da penicillin G amidase hydrolyserer denne type amidbinding [se f.eks. A.L. Margolin et al., Biochim. Biophys. Acta, 616, s. 283-89 (1980)]. Andre prolegemidler omfatter således N-(p-hydroxyfenylacetyl)-
25 adriamycin, N-(fenylacetyl)-adriamycin og andre eventuelt substituerte N-fenylacetylderivater av adriamycin, eller generelt ethvert prolegemiddel som er oppnådd ved omsetning av amingruppen i stamlegemidlet med carboxylgruppen i fenoxycetyl-
30 eddiksyre, fenyleddiksyre eller andre beslektede syrer. Prolegemidler av anthracycliner, som avviker fra adriamycin, og som kan derivatiseres og virke hovedsakelig på samme måte som de her beskrevne adriamycin-prolegemidler, kan også anvendes. Andre prolegemidler som eksempelvis kan fremstilles og
35 anvendes omfatter hydroxyfenoxycetylammidderivater, hydroxyfenylacetylammidderivater, fenoxycetylammidderivater og fenylacetylammidderivater av anthracycliner, slik som daunomycin og carminomycin. Andre aminholdige legemidler slik som melfalan, mitomycin, aminopterin, bleomycin og dactinomycin, kan også

modifiseres som her beskrevet, under dannelselse av prolegemidler.

Ytterligere en foretrukket utførelsesform omfatter konjugering av enzymet cytosindeaminase ("CD") med det monoklonale L6-antistoff. Deaminase-enzymet katalyserer omdannelsen av 5-fluorcytosin ("5-FC"), en forbindelse som mangler antineoplastisk aktivitet, til det kraftige anti-tumorlegemiddel 5-fluoruracil ("5-FU") (se fig. 24). L6-CD-immunkonjugatet ble således anvendt til omdannelse av prolegemidlet 5-FC til 5-FU, hvilket fremkaller en signifikant cytotoxisk virkning på tumorceller *in vitro*.

Som tilfellet var for de ovenfor beskrevne immunkonjugater, utviste L6-CD-konjugatet ikke noe signifikant tap av enzymatisk aktivitet eller bindingsaktivitet som følge av konjugering. *In vitro*-undersøkelser påviste enn videre at behandling av humane lungetumorceller med L6-CD-konjugatet, etterfulgt av at cellene ble utsatt for prolegemidlet 5-F, resulterte i en cytotoxisk virkning svarende til den cytotoxiske virkning som oppnås ved behandling av cellene med det kraftige antitumorlegemiddel 5-FU alene. Behandling av disse tumorceller med prolegemidlet alene resulterte i en usignifikant cytotoxisk virkning.

Det fremgår tydelig av de her angitte, omfattende data, at immunkonjugat/prolegemiddelkombinasjonen tilveiebringer en selektiv mekanisme til tilintetgjørelse av tumorceller, hvilken mekanisme omfatter administrering av et prolegemiddel som utviser redusert cytotoxisk aktivitet, hvilket prolegemiddel omdannes til en sterkt cytotoxisk tilstand i tumorcelleområdet som følge av nærvær av det der målrettede antistoff-enzymkonjugat. Den cytotoxissitet som oppnås ved denne metode, overstiger enn videre den som oppnås ved målretning av antistoff i henhold til konvensjonelle metoder, da det aktive legemiddel, frigjort i tumorområdet, ikke er hindret av de fysiske begrensninger som ledsager antistofflegemiddelkonjugat-fremføringssystemer slik som ovenfor diskutert. Det er derfor klart at metoden tilveiebringer en måte til å øke den selektive cytotoxissitet med hensyn til tumorceller ved behandling av cancer og andre tumorer.

En annen utførelsesform tilveiebringer en metode til kombinasjon av kjemoterapi under anvendelse av flere prolegemidler og bare ett enkelt antistoff-enzymkonjugat. I denne utførelsesform anvendes et antall prolegemidler som alle er
5 substrater for samme enzym i et immunkonjugat. Et bestemt antistoffenzymkonjugat omdanner således et antall prolegemidler til den cytotoxiske form, hvilket resulterer i økt antitumoraktivitet i tumorområdet. En uttalt antitumorvirkning oppnås eksempelvis ved *in vivo*-undersøkelser hvor L6-AP-
10 immunkonjugatet ifølge oppfinnelsen ble administrert til nakne mus med humane lungetumorer, etter fulgt av behandling med en kombinasjon av hittil ukjente prolegemidler, dvs. et etoposidfosfat-prolegemiddel og et mitomycinfosfatprolegemiddel inngitt samtidig. Tilsvarende resulterte administrering
15 av et etoposidfosfat, adriamycinfosfat [se US patentskrift nr. 4.185.111] og 5-fluoruridinmonofosfat [se f.eks. C. Heidelberger et al. "Fluorinated Pyrimidines And Their Nucleosides" i Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 54, s. 57-119 (1983)] etter behandling med et antitumor-antistoff-AP-
20 konjugat, i dannelsen av en kombinasjon av kraftige antitumorlegemidler i tumorområdet, dvs. etoposid, adriamycin og 5-fluoruridin.

I henhold til en annen utførelsesform anvendes et antall forskjellige immunkonjugater hvor enzymkomponenten i
25 konjugatet varierer. Hvert immunkonjugat kan anvendes til å omdanne dets respektive prolegemiddel eller prolegemidler til den cytotoxiske form i tumorområdet. Et antitumorantistoff kan eksempelvis bindes til AP under dannelsen av et konjugat og kan bindes til cytosin-deaminase under dannelsen av et annet
30 konjugat. Begge immunkonjugater administreres deretter til en vert med tumorer og vil bindes til tumor-antigenet i tumorområdet via antistoffspesifisiteten. Administrering av prolegemidlene etoposidfosfat og 5-fluorcytosin, vil resultere i dannelsen i tumorområdet av etoposid og 5-fluoruracil, som
35 begge er kraftige antitumormidler.

Ytterligere en utførelsesform omfatter anvendelse av et antall immunkonjugater, ved hvilken anvendelse spesifisiteten av antistoffkomponenten i konjugatet varierer, dvs. det

anvendes et antall immunkonjugater som hvert især utviser et antistoff som spesifikt bindes til forskjellige antigener på den angjeldende tumor. Enzymkomponenten i disse immunkonjugater kan være den samme eller kan variere. Denne utførelsesform kan særlig være nyttig i situasjoner hvor mengdene av de forskjellige antigener på overflaten av en tumor er ukjent, og det ønskes visshet om at tilstrekkelig enzym er rettet mot tumorområdet. Anvendelse av et antall konjugater med forskjellige antigene spesifisiteter for tumoren øker sannsynligheten for å oppnå en tilstrekkelig mengde enzym i tumorområdet til omdannelse av et prolegemiddel eller en rekke prolegemidler. Denne utførelsesform er enn videre viktig med hensyn på å oppnå en høy grad av spesifisitet for tumoren, fordi sannsynligheten for at normalt vev vil utvise samtlige tumorassosierte antigener, er liten [se I. Hellstrom et al. "Monoclonal Antibodies To Two Determinants of Melanoma Antigen p97 Act Synergistically In Complement-Dependent Cytotoxicity", J. Immunol., 127 (nr. 1), s. 157-160 (1981)].

Ifølge en foretrukket utførelsesform administreres antistoff-enzymkonjugatet før administrering av prolegemidlet til verten. Tilstrekkelig tid bør forløpe mellom administrering av konjugatet og prolegemidlet for å muliggjøre at antistoffet i konjugatet rettes mot og lokaliserer enzymet til tumorområdet. En slik tilstrekkelig tid kan være fra 12 timer til en uke, avhengig av det anvendte konjugat.

Konjugatene og prolegemidlene kan administreres under anvendelse av konvensjonelle administreringsmetoder, slik som intravenøs, intraperitoneal, oral, intralymfatisk eller direkte administrering i tumoren. Intravenøs administrering foretrekkes.

En effektiv dose av antistoff-enzymkonjugatet kan ligge i området fra ca. 1,0 til 100 mg/m². En effektiv dose av prolegemidlet vil avhenge av det anvendte spesielle prolegemiddel og stamlegemidlet, hvorfra det er avledet. Da prolegemidlet er mindre cytotoxisk enn stamlegemidlet, kan doser utover de i teknikken for stamlegemidlene anerkjente doser anvendes. En effektiv dose av etoposid-prolegemidlene kan f.eks. foreligge i intervallet fra ca. 75-500 mg/m². En effektiv dose av mitomycinfosfat-prolegemidler kan eksempelvis

foreligge i området fra ca. 50-1000 mg/m². En effektiv dose av adriamycin-prolegemidlene kan eksempelvis være i området fra 15-150 mg/m². Enn videre kan en effektiv dose av 5-fluorcytosin og andre 5-fluoruridin-prolegemidler være i området fra 600-
5 2000 mg/m².

Oppfinnelsen beskrives ytterligere i de etterfølgende eksempler.

Eksempel 1

10 Det etterfølgende eksempel illustrerer anvendelsen av immunkonjugatene til omdannelse av et etoposidfosfat-prolege-
middel til etoposid ved hjelp av antistoffbundet alkalisk
fosfatase, og den resulterende *in vitro* cytotoxicitet mot
tumorceller og *in vivo* antitumorvirkning.

15

Fremstilling av antistoff-alkalisk fosfatase-konjugater ifølge oppfinnelsen

I dette eksempel ble det fremstilt og undersøkt tre immunkonjugater som omfattet enten det monoklonale antistoff
20 L6, 96,5 eller 1F5, som var konjugert til enzymet alkalisk fosfatase (AP). L6 er et monoklonalt antistoff av IgG2a-und-
klassen, hvilket antistoff er spesifikt for og bindes til et glycoprotein-antigen på humane lungecarcinomaceller [se I.
Hellstrom et al., (1986), supra]. 96,5 er et monoklonalt IgG2a
25 antistoff som er spesifikt for p97, som er et melanoma-assosiert antigen [se J.P. Brown et al., "Structural Character-
ization of Human Melanoma-Associated Antigen p97 With Mono-
clonal Antibodies", J. Immunol., 127 (nr. 2), s. 539-46
(1981)]. 1F5 er et monoklonalt IgG2a antistoff som er spesi-
30 fikt for CD-20-antigenet på normale og neoplastiske B-celler [se E.A. Clark et al., "Role Of The Bp35 Cell Surface Polypep-
tide In Human B-Cell Activation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, s. 1766-70 (1985)]. L6-hybridomet som danner det mono-
klonale L6 antistoff, er deponert ved American Type Culture
35 Collection (ATCC) under deponeringsnr. HB8677 i forbindelse med innlevering av Europapatentsøknad nr. 207963. 1F5-hybrido-
met som danner det monoklonale 1F5-antistoff, er deponert ved ATCC den 12. februar 1988 under deponeringsnr. HB 3645.

Det monoklonale 96,5 antistoff er kommersielt tilgjengelig.

Antistoff-enzymkonjugatene fremstilles ved kovalent å binde AP til de monoklonale antistoffer L6, 96,5, eller 1F5 via en thioetherbinding under anvendelse av en fremgangsmåte svarende til metoden som er beskrevet i J.M. Lambert et al., "Purified Immunotoxins That Are Reactive With Human Lymphoid Cells", J. Biol. Chem., 260 (nr. 22), s. 12035-12041 (1985). I overensstemmelse med en forsøksprotokoll ble konjugatene L6-AP og 96,5-AP fremstilt som følger: 2-iminothiolan (50 mM i 0,5 M triethanolaminhydroklorid med 10 mM EDTA ved pH 8,0) ble tilsatt til en 8,0 mg/ml løsning av L6- eller 96,5-antistoff (i 50 mM triethanolamin-hydroklorid og 1 mM EDTA ved pH 8,0), slik at sluttkonsentrasjonen av 2-iminothiolan var 1,3 mM. Etter 90 minutter ved 0 °C ble reaksjonen avsluttet ved gelfiltrering på "Sephadex G-25" under eluering med fosfatbufret saltvann (PBS) ved pH 7,2). Omsetningen av antistoffene med 2-iminothiolan innførte sulfhydrylgrupper hvis antall ble bestemt under anvendelse av Ellmans reagens [se P.W. Riddles et al., "Ellman's Reagent: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoid Acid)-A Reexamination", Analytical Biochemistry, 94, s. 75-81 (1979)].

Alkalisk fosfatase (kalvetarmer, Boehringer Mannheim, 10 mg/ml) i 100 mM fosfatbuffer ved pH 7,0 ble behandlet med sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (sulfo-SMCC) (Pierce Chemical Co., 20 mM i dimethylformamid (DMF)), slik at sluttkonsentrasjonen av sulfo-SMCC var 2,4 mM. Etter 30 minutter ved 30 °C ble det modifiserte enzym rensset ved gelfiltrering på "Sephadex G-25" og ble eluert med PBS.

Det modifiserte AP ble deretter tilsatt til det thiolerte antistoff i et molforhold på 2:1. Omsetningen av AP med sulfo-SMCC innførte maleimidogrupper i enzymet, hvilke grupper resulterte ved omsetning med sulfhydrylgruppene på hvert av de modifiserte anti stoffer i dannelsen av en thioetherbinding mellom antistoffet og AP. Jodacetamid (sluttkonsentrasjon 1 mM) ble tilsatt til proteinløsningen etter 1 times reaksjonstid for å blokkere eventuelle uomsatte thiol, og konjugatene ble rensset på en "Sephacryl S-300"-kolonne under eluering med PBS. Fraksjoner ble overvåket ved 280 nm, og AP-aktiviteten for hver fraksjon (fortynnet 64.000 ganger) ble bestemt ved pH 9,5 under anvendelse av p-nitrofenylfosfat

som substrat [P. Tijssen, Laboratory Techniques In Bio-chemistry And Molecular Biology, s. 366-67, (Elsevier Press 1985)]. De fraksjoner som inneholdt konjugater med passende nivåer av . AP-antistofforhold, ble bestemt ved SDS-PAGE på en
5 5-12,5 % gradientgel (se fig. 2) og ble deretter forenet. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved 280 nm, hvor en 0,1 % oppløsning av antistoffene og AP utviser en optisk densitet (OD) på hhv. 1,4 og 0,76. Analyse av konjugatene på gelen indikerte at de primært besto av 1:1 forhold mellom antistoff
10 og enzym. Under de denaturerende betingelser som ble anvendt ved gelen, vandret AP, som forekommer i naturen som en homo-dimer med en molekylvekt på 140 kd, som et enkelt bånd med en molekylvekt på 70 kd. Dette 70 kd proteinbånd ble iaktatt på gelen i de kolonner som også inneholdt konjugatbåndene med
15 høyere molekylvekt, da en av subenhetene av enzymet dissosierte fra det kovalent bundne antistoff enzymkonjugat (se fig. 2, bane A og B). Gelfiltrering på en "S-300 Sephacryl"-kolonne indikerte at det ikke forekom fritt enzym i konjugatpreparatet.

20 En annen tilsvarende forsøksprotokoll ble også anvendt for fremstilling av L6-AP- og 1F5-AP-konjugatene, hvorved antistoffet ble modifisert med iminothiolan (0,5 mM) for innføring av en enkelt fri thiolgruppe, og AP ble modifisert med succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-
25 carboxylat (SMCC) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL), slik at sluttkonsentrasjonen av SMCC var 1,0 mM. De modifiserte proteiner ble deretter kombinert, og de resulterende konjugater ble rensert ved gelfiltrering på "Sephacryl S-300". Etterfølgende SDS-PAGE-analyse indikerte at disse konjugat-
30 preparater ikke inneholdt ukonjugerte proteiner eller aggregater. Som ovenfor beskrevet, ble proteinkonsentrasjonene av preparatene bestemt ved hjelp av absorbansen ved 280 nm, hvor 1 mg/ml oppløsninger av antistoffet (molekylvekt 160 kd) og AP (molekylvekt 140 kd) absorberte hhv. 1,4 og 0,76 OD-enheter.

35

Fremstilling av prolegemidlene etoposid-fosfatet og etoposid-thiofosfatet

I overensstemmelse med neste trinn ved metoden ifølge oppfinnelsen ble hvert antistoff-enzymkonjugat omsatt med et

hittil ukjent etoposid-fosfat- eller etoposidthiofosfat-prolegemiddel. Nærmere bestemt var de anvendte prolegemidler hhv. 4'-dinatriumfosfatesteren av etoposid, og 4'-dinatriumthiofosfatesteren av etoposid, hvilke prolegemidler har den i fig. 3 viste formel.

Etoposid-fosfat og etoposid-thiofosfat ble syntetisert ved omsetning av etoposid med hhv. fosforoxyklorid eller thiofosforylklorid under dannelse av enten et diklorfosfat- eller diklorthiofosfat-mellomprodukt. Fosforyleringsreaksjonen ble utført i et egnet vannfritt, organisk løsningsmiddel, eksempelvis acetonitril, og fortrinnsvis i nærvær av en tertiær aminbase, eksempelvis N,N-diisopropylethylamin. Reaksjonsforløpet ble overvåket ved tynnsjiktskromatografi (TLC), hvorved den optimale reaksjonstid kan bedømmes via tilsynekomst av produkt eller forsvinning av utgangsmateriale, eller begge. Ifølge den derved oppnådde erfaring kan reaksjonen ta fra 4 timer til 72 timer, avhengig av kvaliteten av det anvendte fosforreagens. Hydrolyse av diklorfosfat- eller diklorthiofosfat-mellomproduktene til hhv. dinatriumfosfat- eller -thiofosfatprolegemidlet ble utført ved direkte å tilsette en løsning av natriumbicarbonat (20-50 ganger overskudd) i vann til reaksjonsblandingen og omrøre blandingen ved romtemperatur i hhv. 1,5 eller 3 timer. Hydrolyseproduktet ble fordelt mellom ethylacetat og vann, og det vandige lag ble underkastet omvendt fase-kromatografi under anvendelse av vannmethanol, hvilket ga de ønskede prolegemidler etter lyofilisering eller inndampning i vakuum av det vandige medium.

En mer detaljert beskrivelse av fremstillingen av 4'-dinatriumfosfat-etoposidderivatet som anvendes som prolegemiddel ved metoden, er angitt i det etterfølgende:

En magnetisk omrørt suspensjon av 2,30 g (3,91 mmol) etoposid i 210 ml tørt acetonitril ble oppvarmet under dannelse av en nesten fullstendig oppløsning, ble avkjølt til romtemperatur og behandlet med 2,36 ml (13,5 mmol) N,N-diisopropylethylamin. Blandingen ble deretter avkjølt til 0 °C og ble behandlet i løpet av 30 sekunder med 666 mg (4,34 mmol) fosforylklorid POCl₃, under anvendelse av en sprøyte. Blandingen fikk langsomt anta romtemperatur i løpet av 2-3 timer og

ble omrørt ved romtemperatur i 63 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter behandlet med en oppløsning av 6,0 g (71,4 mmol) natriumbicarbonat i 110 ml avionisert H₂O, blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 80 minutter og ble fordelt mellom en blanding av 20 ml mettet, vandig natriumbicarbonat og 125 ml avionisert vann og 350 ml ethylacetat. Det organiske lag ble ekstrahert ytterligere med 1 x 50 ml avionisert H₂O, og de kombinerte, vandige lag ble vasket med 250 ml ethylacetat og deretter underkastet vakuum på 0,5 mm ved romtemperatur i 1 time for å fjerne løsningsmidler. Den vandige del ble deretter overført til en kolonne med diameter på 4 cm og inneholdende 15 cm octadecylsilan (C-18), bundet til en silicagel, hvilket innhold var pakket i metanol og deretter ekvilibrert med H₂O. Etter overføring av hele den vandige del ble kolonnen eluert med 175 ml H₂O for å fjerne uorganiske salter, og produktet ble deretter eluert med 20 % methanol i vann. Konsentrering av løsningen ved 0,5 torr ga 744 mg (36 %) av den rene etoposidfosfatforbindelse som et fargeløst, fast materiale. Alternativt ga lyofilisering den rene forbindelse som et meget fnuggaktig, fast materiale med lav densitet.

I overensstemmelse med en annen utførelsesform ble etoposidfosfat-prolegemidlet fremstilt som følger:

En magnetisk omrørt suspensjon av 10,50 g (17,84 mmol) etoposid, tørket over P₂O₅ ved 80 °C/0,5 torr, i 450 ml tørt acetonitril ble behandlet med 4,20 ml (24,1 mmol) diisopropylethylamin. 2,00 ml (9,65 mmol) difenylklorfosfat ble deretter tilsatt ved hjelp av en sprøyte. Blandingene ble omrørt under N₂ i 2 timer ved 50 °C, hvorefter alt etoposid var oppløst. Ytterligere 1,80 ml (8,68 mmol) difenylklorfosfat ble tilsatt, og reaksjonsblandingen fikk stå ved 45 °C i 72 timer. Deretter ble det tilsatt ytterligere 0,75 ml av aminbasen og 0,80 ml (3,86 mmol) difenylklorfosfat, og blandingen ble omrørt ved 40-45 °C i 27 timer, ble behandlet med ytterligere 0,40 ml difenylklorfosfat og fikk stå ved 40-45 °C i 22 timer. 20 ml isopropanol ble deretter tilsatt, og løsningsmidlet ble avdampet i vakuum, og det faste residuum ble oppløst i 500 ml CH₂Cl₂ og ble fordelt mellom den organiske løsning og 400 ml H₂O. Det vandige lag ble ekstrahert ytterligere med 100 ml CH₂Cl₂, og de kombinerte, organiske ekstrakter ble vasket med

250 ml saltvann og ble tørket ($\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{MgSO}_4$). Rotasjonsfordampning, etterfulgt av flashkromatografi på silikagel under anvendelse av 2-3 % CH_3OH i CH_2CO_2 ga 12,50 g (85 %) etoposid-4'-difenylfosfat som et fargeløst, fast materiale.

5 0,198 g (0,87 mmol) platinaoxyd fra en nyåpnet flaske ble deretter tilsatt til en oppløsning av 0,79 g (0,962 mmol) etoposid-4'-difenylfosfat i 95 ml absolutt ethanol. Løsningen ble hydrogenert på en Parr-apparatur under 310-345 kPa i 4 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble filtrert
10 gjennom en pute av celitt under anvendelse av ethanol som elueringsmiddel. Konsentrering i vakuum og tørking over P_2O_5 i 14 timer i vakuum ga etoposid-4'-fosfat som et hvitt, fast materiale (0,627 g, 94 %).

FAB MS m/e 669 (M+H)⁺

15 IR (KBr) 3440, 2930, 1778, 1604, 1498 cm^{-1}

¹H NMR (DMSO- d_6) δ 6,93 (s,1H), 6,46 (s,1H), 6,12 (s,2H), 5,94 (m,2H), 5,17 (bs,1H), 4,86 (d,J=3,93Hz,1H), 4,64 (q,J=7,5, 5,8Hz,1H), 4,51-4,42 (m,2 H), 4,20 (d,J=10,7Hz, 1H), 4,01 (dd,J=12,1, 5,3Hz,1H), 3,51 (s,6H), 3,51-2,75 (m,7H),
20 2,83 (m,1H), 1,16 (d,J=5,1Hz,3H) .

¹³C NMR (DMSO- d_6) δ 174,5, 151,2, 151,1, 147,7, 146,2, 126,1, 132,3, 128,8, 109,8, 109,7, 107,9, 101,5, 101,2, 98,5, 80,0, 74,3, 72,7, 71,7, 67,6, 67,2, 65,7, 55,8, 43,0, 37,1, 20,2, 18,5.

25 Analyse beregnet for $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{O}_{16}\text{P}$, 0,85 % H_2O :

C 50,95, H 5,11

Funnet: C 51,42, H 4,97.

Etoposid-4'-fosfatet ble deretter omdannet til dinatriumsaltet ved at 50 ml avionisert H_2O og 3,00 g (35,7 mmol)
30 fast natriumbicarbonat ble tilsatt til 2,90 g (4,34 mmol) av etoposid-4'-fosfatproduktet. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1/2 time, i løpet av hvilket tidsrom CO_2 -utviklingen opphørte. Denne blanding ble deretter overført direkte til en C-18-kolonne som beskrevet under den ovenfor angitte
35 utførelsesform. Kolonnen ble først eluert med 300 ml avionisert H_2O for fjerning av overskudd av salter, og ble deretter eluert med 4:1 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$, som etter lyofilisering ga 1,90 g (61 %) rent etoposid-4'-fosfat-dinatriumsalt som et fnokket, hvitt, fast materiale.

4'-dinatriumfosfat- eller -thiofosfatderivatene av etoposid er sterkt vannløselige prolegemidler av etoposid med redusert cytotoxisk aktivitet. Omsetningen av disse forbindelser med alkalisk fosfatase fjerner imidlertid henholdsvis fosfat- eller thiofosfatdelen og frigjør det kraftige anti-cancerlegemiddel etoposid (se fig. 3).

Et forsøk hvori etoposid-4'-fosfat og etoposid-4'-thiofosfat hver for seg ble omsatt med alkalisk fosfatase, viste at begge prolegemidler er substrater for enzymet. Som vist i fig. 5, hydrolyseres etoposid-fosfatet hurtigere av enzymet enn etoposid-thiofosfat-prolegemidlet. Etoposidthiofosfatet kan imidlertid under visse betingelser være av særlig nytte på grunn av dets økede stabilitet overfor hydrolyse.

15 Omsetning av antistoff-alkalisk fosfatasekonjugatene med et etoposid-fosfat-prolegemiddel

Konjugatene utviste ikke noe tilsynelatende tap av enzymatisk aktivitet som følge av bindingen av enzymet til antistoffet, hvilket fremgår av at konjugatene og det frie enzym utviser like aktiviteter på substratene p-nitrofenylfosfat [se P. Tijssen, supra] eller etoposid-fosfat.

Eksempelvis ble enten AP alene eller det ovenfor beskrevne antistoff-enzymkonjugat L6-AP (sluttelig AP-konsentrasjon 5 µg/ml) tilsatt til en oppløsning av etoposid-4'-fosfat (0,1 mM) i 100 mM Tris-buffer inneholdende MgCl₂ (1 mM) og ZnCl₂ (0,1 mM) ved pH 7,0. Reaksjonen ble overvåket ved HPLC under anvendelse av en "IBM C-18"kolonne (3 µ, 4,5 x 100 mm) og 50 % vandig methanol som elueringsmiddel (0,5 ml/min., overvåkning ved 254 nm). Det viste seg innenfor 5 minutter fra reaksjonens start at AP både på fri enzymform og som en del av L6-antistoffenzymkonjugatet ved hydrolyse hadde omdannet minst 85 % av etoposid-4'-fosfatet til etoposid (se fig. 4C og 4D). Som det fremgår av figurene, forekom det ikke noe tap av AP-enzymaktivitet som en følge av enzymets binding til antistoffet i konjugatet. I fravær av enzym forekom det ingen fosfathydrolyse (se fig. 4A). Vandige løsninger av etoposid-fosfat eller etoposid-thiofosfat var stabile i minst 8 timer ved romtemperatur og i flere dager ved 4 °C.

Binding av antistoff-alkalisk fosfatasekonjugatene til H3347 tumorceller

I fig. 6 er det vist resultatene av en konjugatbindingsprøve som ble utført for å teste evnen hos L6 AP og 96,5-AP-konjugatene, så vel som de frie L6- og 96,5-antistoffer til å bindes til tumorceller fra den metastatiske, humane koloncarcinoma-cellelinje H3347.

Bindingsprøven ble utført som følger: Immunkonjugatene eller de frie antistoffer ble seriefortynnet i modifisert Dulbeccos ufullstendige medium (IMDM), og 100 µl aliquoter ble inkubert ved 4 °C med 10^6 celler i 30 minutter. Cellene ble vasket og inkubert med 50 µl FITC-geite-anti-museantistoff (fortynnet 1:12,5) i ytterligere 30 minutter ved 4 °C. Cellene ble vasket og analysert på en "Coulter Epics-C"-celle-fluorescensanalysator. Døde celler ble utelukket, og den logaritmiske middelvei for den grønne fluorescensintensitet hos hver prøve ble beholdt. Dette tall ble omdannet til en lineær skala, og forhold mellom den negative kontroll (celler + FITC-geite-antimuse-antistoff) og alle testprøver ble beregnet.

Fra fig. 6 fremgår det at det meste av bindingsevnen hos antistoffene ble bibeholdt i konjugatene, dvs. konjugeringen påvirket ikke antistoffenes bindingsevne. I tillegg viser figuren bindingsspesifisiteten hos antistoffene, og herav fremgår at både det frie 96,5-antistoff og 96,5-AP-konjugatet bindes langt svakere til tumorcellene enn L6-antistoffet og L6-AP-konjugatet. Dette kan forventes i betraktning av at H3347 tumorcellene stammer fra en human carcinoma, og at 96,5-antistoffet er spesifikt for et melanomaantigen.

Tilsvarende bindingsforsøk under anvendelse av L6, L6-AP, 1F5 og 1F5-AP viste også at L6 og L6-AP ble bundet til H3347 carcinomacellelinjen (metning ved 10 µg/ml antistoff), mens det ble iaktatt meget liten eller ingen påviselig binding ved 1F5 eller 1F5-AP (se fig. 7). Dette resultat viste igjen spesifisiteten av bindingen av konjugatene, idet L6-AP-konjugatet ble bundet til den L6-positive tumorcellelinje, og 1F5-AP-konjugatet med spesifisitet overfor B-lymfomaceller ikke utviste noen binding.

In vitro cytotoxissitet av en konjugat/prolegemiddelkombinasjon

Den cytotoxiskevirkning av konjugat/prolegemiddelkombinasjonene ble deretter påvist *in vitro*, enten under
5 anvendelse av en klon og en cytotoxissitetsprøve eller en H-thymidin-opptagelsesprøve.

Den klonogene cytotoxissitetsprøve som ble anvendt, var koloni-inhiberingsprøven beskrevet av I. Hellstrom et al. "Colony Inhibition And Cytotoxicity Assays", i *In Vitro*
10 *Methods In Cell-Mediated Immunity*, Bloom and Glade (red.), s. 409-14 (1971). De anvendte celler til påvisning av cytotoxissitet, var de ovenfor beskrevne H3347 tumorceller. Både L6-AP- og 96,5-AP-konjugatene ble prøvet med hensyn til evnen til å omdanne prolegemidlet til det frie legemiddel.

15 I korthet ble H3347-cellene (10^6 /ml) suspendert i IMDM-vekstmediet (inneholdende 10 µg/ml av hvert immunkonjugat, basert på antistoffkonsentrasjonen) og ble inkubert i 30 minutter ved 37 °C. Cellene ble vasket to ganger, ble resuspendert i IMDM, og legemidlet eller prolegemidlet ble
20 tilsatt mediet. Inkubering ved 37 °C ble fortsatt i 15 timer. Etter to gangers vaskinger ble cellene anbrakt på plater, og antall kolonier (>8 celler/koloni) ble opptalt 7-10 dager senere.

Resultatene av prøven fremgår fra fig. 8 (den
25 prosentvise inhibering er gjennomsnittet av seks prøver). Som det fremgår fra figuren, var etoposid ($IC_{50} = 0,20$ µM) langt mer cytotoxisk enn etoposid-4'-fosfat (EP) ($IC_{50} = 5,8$ µM). Prolegemidlet alene utviste meget svak cytotoxisk aktivitet. Behandling av H3347-cellene med L6-AP-konjugat, etterfulgt av
30 innvirkning av etoposid-fosfat, resulterte i en meget sterk økning i cytotoxisk aktivitet i forhold til aktiviteten som ble iaktatt med prolegemidlet alene, idet den økte cytotoxiske aktivitet kunne sammenlignes med den cytotoxiske aktivitet som ble iaktatt ved behandling med etoposid alene.
35 Behandling av cellene med 96,5-AP-konjugatet og etoposid-fosfat utviste en langt mindre økning i cytotoxisk aktivitet i forhold til aktiviteten som ble iaktatt med prolegemidlet alene. Dette resultat kan tilskrives den lille mengde 96,5-AP-

konjugat som bindes til H3347-cellene, slik det er angitt ovenfor (se fig. 6). Konjugatene er ikke i seg selv cytotoksiske, da behandling av cellene med konjugatene alene ikke forårsaket noen celledød.

5 Den cytotoksiske virkning av konjugatene ble også undersøkt ved anvendelse av en ^3H -thymidinopptagelsesprøve. Ifølge denne prøve ble en suspensjon på 10^6 H3347 tumorceller inkubert i 0,1 ml IMDM med 10 % kalvefosterserum i 1 time ved 4 °C i nærvær av 5 µg/ml av konjugatet. Cellene ble vasket to
10 ganger med mediet som inneholdt 10 % kalvefosterserum, ble resuspendert (i 1 ml) og anbrakt på mikrotiterplater med 96 brønn er (10.000 celler/ brønn). Legemidlet eller prolegemidlet i IMDM ble deretter tilsatt, og inkuberingen ble fortsatt i 6 timer ved 37 °C. Cellene ble vasket to ganger, og
15 inkuber ingen ble fortsatt i ytterligere 12 timer, etterfulgt av radioaktivering i 6 timer med ^3H -thymidin (1,0 µCi/brønn). Platene ble nedfrosset ved -20 °C for å løsne cellene, og cellene ble høstet på glassfiberskiver. Filtrene ble under kastet telling på en "Beckman 3801"-scintillasjonsteller.

20 Under anvendelse av denne prøve ble inhiberingen av ^3H -thymidin-inkorporering i tumorcellenes DNA målt, og således den cytotoksiske virkning av etoposid eller prolegemidlet EP på cellene i fravær eller nærvær av L6-AP- eller 1F5-AP-konjugatene. Som det fremgår av fig. 9, var etoposid (IC_{50} =
25 1 µM) over 100 ganger mer toksisk enn EP (35 % inhibering ved 100 µM). Forbehandling av cellene med 1F5-AP før innvirkning av EP resulterte ikke i noen økning i cytotoxicitet. Imidlertid ble det iaktatt en dramatisk økning av cytotoxicitet når cellene først ble utsatt for innvirkning av L6-AP og
30 deretter av EP. Ved begge prøver som ble anvendt til bestemmelse av *in vitro*-cytotoxicitet, var den cytotoxickevirking av konjugat/prolegemiddelkombinasjonen således sammenlignbar med virkningen av etoposid alene, og denne virkning var antigenspesifikk, slik som det fremgår av den kjensgjerning at EP-cytotoxicitet ikke ble økt tilsvarende ved behandling av
35 H3347-cellene med de respektive kontroll konjugater 96,5-AP og 1F5-AP.

Lokalisering av konjugatene i tumor-xenotransplantater hos mus

In vivo lokaliseringsundersøkelser ble deretter utført for å bestemme hvor hurtig og i hvilken grad konjugatene ifølge oppfinnelsen ble akkumulert i en tumor. Denne informasjon vil kunne være nyttig ved bestemmelse av et passende tidsintervall mellom administrering av antistoff-enzymkonjugatet og prolegemidlet ved tumorterapi-undersøkelsene.

Balb/C nu/nu-hunnmus (4-6 uker gamle) ble først injisert 10^7 H3347 tumorceller subkutant (s.c.) i venstre og høyre side. Tumorceller ble oppnådd fra *in vitro*-kulturer som var blitt suspendert ved behandling i 10 minutter med trypsin (0,5 g/l) og EDTA (0,2 g/l). Cellene ble vasket to ganger med IMDM og ble inkubert i 1 time ved 37 °C i IMDM med 10 % kalvefosterserum. Cellene ble vasket, suspendert i PBS og ble oppbevart ved 4 °C inntil injeksjon. Både den her beskrevne lokaliseringsundersøkelse og den beskrevne terapiundersøkelse ble startet når tumorene nådde en gjennomsnittsstørrelse på 225 mm³.

Til lokaliseringsundersøkelsene ble L6 og L6-AP merket med ¹²⁵I, og 1F5 og 1F5-AP ble merket med ¹³¹I under anvendelse av jodogenmetoden [se P.J. Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, s. 849-857 (1978)]. To dager før lokaliseringsforsøkene ble dyrene satt på en 0,5 % (volum/basis) Lugols jodopløsning. Hver mus fikk injisert i.p. 100 µg (basert på hvert monoklonalt antistoff) av en av følgende løsninger: L6-AP (5 µCi) og 1F5-AP (2,5 µCi) i 0,2 ml PBS ved pH 7,2 eller en kombinasjon av L6 (5 µCi) og 1F5 (2,5 µCi) i 0,2 ml PBS. Med periodiske intervaller ble musene bedøvet, ble tappet for blod via den orbitale plexis og avlivet. Vevene ble veiet og deretter underkastet telling på en gammateller. Lokalisering ble bestemt ved å sammenligne ¹²⁵I-L6-lokalisering med lokaliseringen for ¹³¹I-1F5, dvs. ved å bestemme forholdene mellom spesifikt (¹²⁵I) opptak og ikke-spesifikt (¹³¹I) opptak ved hjelp av tellinger i forskjellige vev. Resultatene for tumor- og leveropptak fremgår av tabell 1 i det etterfølgende.

Tabell 1

PROSENTVIS INNHOLD AV INJISERT DOSE PR. GRAM
VEVSVEKT AV ADMINISTRERTE PROTEINER

	16		L6-AP	
	<u>tumor</u>	<u>lever</u>	<u>tumor</u>	<u>lever</u>
2 timer	1,6 (8,0)	4,9 (2,0)	1,5 (7,5)	5,2 (0,7)
10 24 timer	3,6 (12,0)	2,3 (1,4)	1,0 (10,0)	1,3 (1,3)
48 timer	4,0 (8,0)	2,5 (1,3)	0,5 (5,0)	0,8 (1,0)

Tall i parenteser angir forholdene L6/1F5 eller L6-AP/1F5-AP.

Som det fremgår fra tabellen, lokaliserte ukonjugert L6 effektivt tumoren innen 24 timer og forble der i minst 48 timer. Forholdet mellom L6 og 1F5 i tumoren befant seg i dette tidsrom i intervallet fra 8-12, mens forholdet i leveren var ganske lavt (1,3-1,4). Den maksimale grad av spesifikk opptakelse i tumoren for L6-AE forekom etter ca. 24 timer, på hvilket tidspunkt forholdet mellom L6-AP og 1F5-AP var 10,0. Disse resultater angir at L6-AP-konjugatet ble lokalisert langt bedre innen tumoren enn 1F5-AP, men ikke så godt som umodifisert L6.

Deretter ble omfanget av naturlig fosfataseaktivitet i tumoren bestemt, og den grad hvortil denne aktivitet kunne heves ved å målrette AP mot tumoren under anvendelse av konjugatene. Tumorer ble kirurgisk fjernet fra mus som var blitt behandlet i 24 timer med 100 µg (basert på L6) L6-AP, og den totale fosfataseaktivitet ble bestemt under anvendelse av p-nitrofenylfosfat som et substrat som følger: Den kirurgisk fjernede tumor ble vasket og dreiet forsiktig rundt ved 23 °C med p-nitrofenylfosfat (1 µg/ml) i pH 9,5 Tris (100 mM), inneholdende 100 mM NaCl og 5 mM MgCl₂. Reaksjonens forløp ble overvåket ved måling av frigjort p-nitrofenol ved 410 nm, og resultatene ble korrigert for tumorvekten. Det viste seg at tumorer fra mus som hadde mottatt L6-AP-konjugatet, utviste så

meget som 10 ganger høyere fosfataseaktivitet enn aktiviteten som ble iakttatt i tumorer fra ubehandlede mus (se fig. 10A).

En nærmere histologisk analyse av fosfataseaktiviteten i tumorer ble utført på tverrsnitt av tumorer oppnådd fra mus som var ubehandlet eller var behandlet 24 timer tidligere med 300 µg (basert på antistoff) av enten L6-AP eller 1F5-AP. Fosfataseaktiviteten ble anslått ved immunhistologi under anvendelse av et fosfatasesubstrat som avsatte en mørk utfelling i området for enzymaktivitet som følger: Tumorer fjernet ved kirurgi, ble hurtig nedfrost til -28 °C, og en rekke 8 µm tverrsnitt ble fremstilt under anvendelse av en Reichert-Jung mikrotom. Fosfataseaktiviteten ble målt med et AP-substratsett fra Vector Laboratories, og resultatene ble sammenlignet med tverrsnitt som var farget med hematoxylin og eosin (H. og E., se fig. 10B).

Som det fremgår fra fig. 10B, ble det påvist liten enzymaktivitet i tumorer fra mus som var ubehandlet eller behandlet med 1F5-AP. Mus som mottok L6-AP, utviste imidlertid sterkt forøket fosfataseaktivitet som kunne iakttas for delt i hele tumoren. Mikroskopisk vurdering avslørte at de fleste tumorceller i L6-AP-behandlede mus utviste sterk positiv farging for fosfataseaktivitet.

In vivo antitumorvirkning av en konjugat/etoposid-fosfatprolegemiddelkombinasjon

Terapiforsøk ble utført på nakne mus som utviste s.c. tumorer med volumer på ca. 225 mm³. Konjugatene L6-AP og 1F5-AP ble administrert (i.p.) 18-24 timer før behandling med EP. Tumorveksten ble sammenlignet med veksten hos ubehandlede mus, og hos mus behandlet med de maksimalt tolererbare doser av etoposid eller EP alene.

Nærmere bestemt ble en gruppe bestående av 8 nakne mus med bilaterale H3347 tumorer, behandlet enten med etoposid (0,2 ml, inneholdende 1,2 mg etoposid i 2:3 DMSO:H₂O) eller EP (0,2 ml, inneholdende 2 mg EP i H₂O) alene, eller med L6-AP (0,1 ml, inneholdende 300 µg antistoff i PBS), eller 1F5-AP (0,1 ml, inneholdende 300 µg antistoff i PBS), etterfulgt av EP-behandling. Hvert forsøk omfattet en kontrollgruppe mus som

ikke var behandlet. Tumorvolumer ble anslått forskjellige dager etter tumorimplantasjon under anvendelse av formelen:

$$[(\text{perpendikulær bredde}^2/2)] \times \text{lengste lengde.}$$

Resultatene av disse forsøk frem går fra fig. 11.

5 Etoposid utviste meget liten virkning på tumorvekst i den anvendte dose, og høyere doser ble ikke tolerert godt. Prolege- midlet EP var mindre toksisk for dyrene, og den høyere dose som derfor kunne administreres, resulterte i en større anti- tumorvirkning enn hva som ble iaktatt med etoposid i seg
10 selv. En tilsvarende grad av anti-tumorvirkning ble iaktatt hos mus som mottok kontrollkonjugatet 1F5-AP før behandling med EP. Når imidlertid mus ble behandlet med L6-AP, etterfulgt av EP, ble det iaktatt en langt mere uttalt anti-tumor-
15 virkning. L6-AP alene utviste ingen virkning på tumorvekst (data er ikke vist).

En oppsummering av hver av de individuelle tumorers reaksjoner overfor behandlingen fremgår av tabell 2 i det etterfølgende. Av 16 tumorer hos 8 mus behandlet med L6-AP og EP, gjennomgikk 6 tumorer fullstendig regresjon, og to andre
20 ble mindre i størrelse enn ved behandlingens start. Ingen fullstendige eller delvise reaksjoner ble iaktatt ved noen av de andre behandlingsforskrifter.

Tabell 2

25

VIRKNINGER AV FORSKJELLIGE BEHANDLINGER PÅ TUMORVEKST

Middel	Reaksjon*			
	progresjon	stabil	partiell	komplett
Intet	16	0	0	0
Etoposid	12	4	0	0
EP	6	10	0	0
35 1F5-AP + EP	9	7	0	0
L6-AP + EP	3	5	2	6

Verdiene angir reaksjoner i 16 tumorer i hver gruppe 23 dager etter tumorimplantasjon.

*Reaksjon: progresjon = fortsatt tumorvekst; stabil = ingen ytterligere tumorvekst; partiell = reduksjon i størrelse; komplett = regresjon som fører til ingen åpenbar tumor.

Eksempel 2

I foreliggende eksempel belyses omdannelsen av et relativt ikke-cytotoksisk mitomycinfosfat-prolegemiddel til et aktivt mitomycinlegemiddel under anvendelse av immunkonjugatene, hvilket fører til *in vitro* cytotoxiskitet mot tumorceller. Som illustrert i eksempel 1 ovenfor, belyser følgende eksempel ytterligere anvendeligheten av immunkonjugatene, prolegemidlene og metodene til fremføring av et cytotoxisk anti-tumorlegemiddel til tumorceller *in vivo*.

Ifølge foreliggende eksempel ble det anvendt L6-AP og 1F5-AP-immunkonjugatene som ble fremstilt som beskrevet i eksempel 1. I overensstemmelse med denne utførelsesform ble hvert av disse antistoffenzymkonjugater omsatt med et hittil ukjent mitomycinfosfat-prolegemiddel. Nærmere bestemt var det anvendte prolegemiddel et dinatriumsalt av et N⁷-C₁₋₈-alkylfosfat av mitomycin C. Det frigjorte anti-tumormiddel som et resultat av denne omsetning, var et mitomycin-alkoholderivat. L6-AP/mitomycinfosfat-prolegemiddelkombinasjonen ifølge oppfinnelsen resulterte i cytotoxiskitet mot tumorceller *in vitro* og en uttalt *in vivo* anti-tumorvirkning i mus.

Fremstilling av det hittil ukjente mitomycinfosfatprolegemiddel

Det hittil ukjente mitomycinfosfat-prolegemiddel 7- (2'-aminoethylfosfat)-mitomycin (i det etterfølgende angitt som "MOP") er 2-aminoethylfosfatderivatet av mitomycin C ("MMC") og ble fremstilt som følger:

En løsning av 56 mg (0,4 mmol) 2-aminoethyldihydrogenfosfat i 0,35 ml vann og 0,3 ml (2 mmol) triethylamin ble tilsatt til mitomycin å (i det følgende angitt som "MMA") (140 mg, 0,4 mmol) i 6 ml methanol, og reaksjonen fant sted

ved romtemperatur over natten. 1,4 ml mettet, vandig natriumbicarbonat ble der etter tilsatt, og løsningen ble fordelt mellom vann og metylenklorid. Den vandige fase ble konsentrert til tørrhet, og flere porsjoner methanol ble tilsatt og avdampet. Residuet ble tatt opp i methanol, ble filtrert og overført til en 2 x 10 cm omvendt fase "C-18" silicagelkolonne. Produktet ble eluert med vann, og alt flyktig materiale ble avdampet. Methanol ble tilsatt og avdampet som før, og residuet ble tørket i 24 timer under høyvakuum i en eksikator med fosforpentoxyd. Mitomycinfosfatderivatet MOP ble erholdt som et fint blått pulver (190 mg, 97 %).

360 MHz ¹H-NMR (D₂O) δ 1,94 (s, 3H, CH₃), 2,9-3,1 (m, 4H), 3,20 (s, OCH₃), 3,28 (s, 1H), 3,36 (s, 1H), 3,5-3,65 (m, 4H), 4,1-4,25 (m, 2H), 4,50-4,57 (dd, 1H, 10-H).

MOP ble således fremstilt ved fortrenkning av 7-methoxygruppen i MMA med 2-aminoethylfosforsyre (se fig. 12). Produktet ble omdannet til det vannløselig dinatriumsalt ved behandling med natriumbicarbonat.

Det tilsvarende kjente mitomycin alkoholderivat 7-[(2-hydroxyethyl)-amino]-9a-methoxymitosan (i det etterfølgende angitt som "MOH") ble fremstilt ved å omsette 100 mg (0,286 mmol) MMA med 26 mg (0,429 mmol) ethanolamin i overensstemmelse med den av B.S. Iyengar et al. "Mitomycin C and Porfiromycin Analogues With Substituted Ethylamines At Position 7", J. Med. Chem., 26, s. 16-20 (1983) beskrevne fremgangsmåte. Produktet ble erholdt som et fint blått pulver (58 mg, 54 %).

Reaktivitet og stabilitet av mitomycinfosfat-prolegemidlet

MOP-prolegemidlet ble deretter undersøkt med hensyn til dets reaktivitet med AP. Til en oppløsning av 1 mM MOP i 100 mM Tris, pH 7,2 buffer ved romtemperatur ble det tilsatt enten intestinalt kalve- eller placentalt, human-AP (sluttkonsentrasjon 1 µg/ml). Reaksjonsforløpet ble registrert ved hjelp av HPLC under anvendelse av en "C-18"-kolonne (4,6 x 150 mm) og følgende betingelser: Påvisning ved 280 nm, 30-95 % methanol i acetatbuffer (100 mM, pH 5,2) i løpet av 8 minutter, re-ekvilibrering etter 15 minutter, strømningshastighet på 0,8 ml/minutt. Under disse betingelser ble MMC

eluert etter 7,0 minutter, MOH etter 8,5 minutter og MOP etter 4,0 minutter. Som det fremgår fra fig. 13, ble fosfatgruppen på MOP-prolegemidlet hurtig spaltet med AP. HPLC tjente til bekreftelse av at den tilsvarende alkohol MOH ble dannet.

5 Under de anvendte reaksjonsbetingelser var halveringstiden for hydrolyse av MOP ca. 10 minutter, og reaksjonen var fullført i løpet av 40 minutter.

Stabiliteten av MOP og EP i humant serum ble bestemt under anvendelse av HPLC ved måling av både hastigheten for prolegemidlenes forsvinning og hastigheten for dannelse av MOH og etoposid. Således ble eksempelvis en løsning av MOP (1 mM i 10 100 mM Tris, pH 7,2) tilsatt til friskt, humant serum slik at legemidlets sluttkonsentrasjon var 0,1 mM. Aliquoter (0,25 ml) ble fortynnet med methanol (0,25 ml) og EDTA (50 µl, 100 mM) 15 for utfelling av serumproteinene og avbrytelse av reaksjonen. Prøvene ble sentrifugert og analysert ved HPLC som ovenfor beskrevet. Det viste seg at 50 % hydrolyse av EP fant sted etter 1 time, men at bare 25 % MOP ble hydrolysert etter 4 timer. Fullstendig hydrolyse kunne hurtig oppnås ved å til- 20 sette AP til nevnte serum.

Binding av antistoff-alkalisk fosfatasekonjugater til H2981 tumorceller

Evnen hos L6-AP og 1F5-AP antistoff-enzymkonjugatene 25 ifølge oppfinnelsen til å bindes til H2981 tumorceller, ble deretter målt. I H2981-cellelinjen ble erholdt fra en human, primær adenocarcinom i lungene [se I. Hellstrom et al. "Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinomas", Cancer Res., 46, (nr. 8), s. 3917-23 (1986)]. Det er kjent at 30 L6-antistoffet sterkt bindes til H2981 celler (metning ved 10 µg/ml), mens 1F5 utviser meget liten binding til disse celler.

Bindingsprøven ble utført som beskrevet i eksempel 1. FACS-analyse antydte at L6 og L6-AP ble bundet sterkt til 35 cellene, mens 1F5 og 1F5-AP utviste langt svakere binding (se fig. 14).

In vitro cytotoxicitet for konjugat/prolegemiddelkombinasjonen ifølge oppfinnelsen på H2981 tumorceller

Den cytotoxiciske virkning av konjugat/prolegemiddelkombinasjonene ble påvist *in vitro* via ^3H -thymidin-opptagelsesforsøket beskrevet i eksempel 1, idet H2981 tumorceller i dette tilfelle ble anvendt til *in vitro* cytotoxicitetstesten, og CEM-celler ble anvendt som kontroll. T-celle ALL-cellelinjen CEM ble erholdt fra ATCC og binder ikke de monoklonale L6- eller 1F5-antistoffer. De cytotoxiciske virkninger av prolegemidlene EP og MOP på tumorcellene i fravær eller nærvær av L6-AP- eller 1F5-AP-immunkonjugatene ble analysert. De cytotoxiciske virkninger av disse kombinasjoner ble også sammenlignet med den cytotoxiciske virkning av hvert stamlegemiddel alene.

Kort angitt ble en suspensjon av 10^6 H2981- eller CEM-celler inkubert i 0,1 ml IMDM inneholdende 10 % kalvefosterserum i 1 time ved 4 °C i nærvær av 10 µg/ml konjugat. Cellene ble vasket to ganger med mediet inneholdende 10 % kalvefosterserum, ble resuspendert i 1 ml fosfatbufret saltvann, pH 7,2 (PBS), og cellene ble anbrakt på mikrotiterplater med 96 brønner (10.000 celler/brønn). Prolegemidlet i PBS ble deretter tilsatt, og inkubering ved 37 °C ble utført i 1 time (for MOP) eller 5 timer (for EP). Cellene ble deretter vasket to ganger, og inkuberingen ble fortsatt i totalt 24 timer (inklusive radioaktivering i 6 timer med ^3H -thymidin, 1,0 µCi/brønn). Platene ble nedfrost ved -70 °C til løsning av celler, og etter opptining ble cellene høstet på glassfiber-skiver. Filtrene ble underkastet telling på en "Beckman 3801"-scintillasjonsteller, og de cytotoxiciske virkninger av konjugat/prolegemiddelkombinasjonene ble sammenlignet med den iakttatte cytotoxicitet ved behandling av cellene med prolegemidlet eller stamlegemidlet alene. Resultatene fremgår fra fig. 15-17.

Som det fremgår fra fig. 15, var etoposid (IC_{50} ved 2 µM) signifikant mere toksisk overfor H2981 celler enn EP (20 % tilintetgjørelse ved 30 µM). Forbehandling av cellene med 1F5-AP før prolegemiddel-innvirkning resulterte i meget liten økning av cytotoxicitet. En dramatisk økning av cyto-

toksisk aktivitet ble imidlertid iaktatt når cellene først ble utsatt for L6-AP og deretter for EP. Den cytotoxiske virkning kunne sammenlignes med virkningen av etoposid alene.

Et tilsvarende resultat ble iaktatt ved anvendelse
5 av mitomycinderivater. Som det fremgår fra fig. 16, var MMC og MOH like cytotoxiske overfor H2981 celler og utviste IC_{50} -verdier på ca. 1 μM . Fosfat-prolegemidlet MOP var langt mindre cytotoxiske (5 % celle-tilintetgjørelse ved 10 μM), muligens som følge av dets manglende evne til å penetrere cellen.
10 Aktiviteten av MOP kunne imidlertid sammenlignes med MOH og MMC når tumorcellene på forhånd hadde vært utsatt for L6-AP-konjugatet. Denne økning var antagelsesvis, da det ikke-bindende konjugat 1F5-AP ikke signifikant påvirket den cytotoxiske aktivitet av prolegemidlet. Verken L6-AP eller 1F5-AP
15 ga en dramatisk økning av den cytotoxiske virkning av MOP overfor CEM-celler, hvilket stemmer overens med at konjugatene ikke binder til denne cellelinje (se fig. 17). Disse resultater viser således at fosfatgruppen i hvert av de prøvede prolegemidler inaktiverte legemidlet, og at hvert av pro-
20 legemidlene EP og MOP etter hydrolyse av denne fosfatgruppe med et antistoff-enzymkonjugat, bundet til tumorcelleoverflaten, ga aktive cytotoxiske legemidler.

In vivo anti-tumorvirkning av konjugat/mitomycin-prolegemiddelkombinasjonen ifølge oppfinnelsen
25

Før undersøkelsen av *in vivo* anti-tumoraktivitet av MOP i kombinasjon med L6-AP-konjugatet, ble de relative toksisiteter av prolegemidlet og dets frigjorte, aktive derivat MOH i Balb C nu/nu mus bestemt. Når legemidlene ble
30 administrert (i.p.) i to like store doser med 4 dagers mellomrom, ble det oppnådd LD_{50} -verdier på 45 og 90 mg legemiddel/kg kroppsvekt for hhv. MOH og MOP. Det viste seg også at betydelig mer legemiddel kunne administreres under anvendelse av mindre doser over et lengre tidsrom. Totale mengder på opp til
35 40 mg/kg MOH og 100 mg/kg MOP ble godt tolerert ved administrering i 4 like store doser i løpet av et tidsrom på 25 dager. Disse undersøkelser indikerer at signifikant mer av mitomycinprolegemidlet ble tolerert som følge av dets redu-

serte toksisitet.

Terapiundersøkelser ble deretter utført på nakne Balb C nu/nu hunnmus (6 mus i hver behandlingsgruppe) (4-6 uker gamle), hvilke mus hadde fått implantert (s.c., høyre bakerste side) en H2981 tumor erholdt fra en *in vivo* kilde. Forsøkene ble utført når tumorene nådde et volum på ca. 100 mm³. L6-AP- og 1F5-AP-konjugatene (0,1 ml, inneholdende 250 µg antistoff i PBS) ble administrert hver for seg (i.p.) 18-24 timer før behandling med MOP (0,2 ml, inneholdende 0,6 µg MOP i H₂O). Tumorveksten ble sammenlignet med den i ubehandlede mus og i mus behandlet med maksimalt tolererte doser av MOP (0,2 ml, inneholdende 0,6 mg MOP i H₂O) eller MOH (0,2 ml, inneholdende 0,2 mg MOH i H₂O).

Som det fremgår fra figur 18, utviste både MOH og MOP signifikante *in vivo* anti-tumoraktiviteter. Den nødvendige tid til å anta et gjennomsnittlig tumorvolum på 750 mm³, var 45 dager hos mus behandlet med MOH-prolegemidlet, 63 dager hos mus behandlet med MOP-prolegemidlet og 27 dager hos kontrollgruppen. Som ovenfor anført, var MOP-prolegemidlet mindre toksisk overfor dyr, og derfor bevirket de høyere doseringer som kunne administreres i en sterkere anti-tumorvirkning enn den som ble oppnådd med MOH-derivatet. Selv om det ikke-bindende konjugat, 1F5-AP, til en viss grad øket aktiviteten av MOP, ble det iaktatt en langt sterkere uttalt virkning hos gruppen som mottok L6-AP før MOP-behandling. Som det fremgår av figuren, hadde tumorer som på forhånd var behandlet med L6-AP-konjugatet (etterfulgt av MOP-behandling) på dag 70, en størrelse som var ca. 1/3 av størrelsen av tumorer som på forhånd var behandlet med 1F5-AP-konjugatet.

Som det ytterligere fremgår fra tabell 3, hadde 3 av 6 tumorer i de L6-AP + MOP-behandlede mus på dag 63 etter implantasjon gjennomgått fullstendig rekreasjon, og de resterende 3 tumorers størrelse var ikke øket fra behandlingens start. I motsetning til dette øket 3 av 5 tumorer hos den 1F5-AP + MOP-behandlet gruppe faktisk i størrelse, 2 av 5 tumorer var stabile, og det forekom ingen delvise eller fullstendige rekreasjoner.

Tabell 3

TUMORREAKSJON ETTER 63 DAGER OVERFOR BEHANDLING
MED ANTISTOFF AP-KONJUGATER OG MITOMYCINDERIVATER

5

Tumorreaksjoner				
Gruppe	Progresjon	Stabil	Partiell regresjon	Komplett regresjon
Kontroll	6/6			
MOH	6/6			
MOP	4/5	1/5		
1F5-AP + MOP	3/5	2/5		
L6-AP + MOP		3/6		3/6

Disse forsøk påviser tydelig spesifisiteten og den økede *in vivo* anti-tumorvirkning hos den målrettede enzym/MOP-kombinasjon.

Eksempel 3

I foreliggende eksempel påvises anvendeligheten hos immunkonjugatene og prolegemidlene til fremføring av et antall forskjellige legemidler til tumorceller. Under anvendelse av antistoff-alkalisk fosfatasekonjugat, L6-AP, i kombinasjon med prolegemidlene, EP og MOP, ble øket *in vivo* anti-tumorvirkning påvist. Således kan et enkelt antistoff-målrettet enzym anvendes med en rekke prolegemidler til kombinasjonskemoterapi mot tumorer.

Prolegemidler EP og MP ble fremstilt som beskrevet i hhv. eksempel 1 og 2. Fremstillingen av L6-AP- og 1F5-AP-immunkonjugatene er beskrevet i eksempel 1. *In vivo*-undersøkelsene på nakne mus ble utført som beskrevet i eksempel 1 og 2 ovenfor. Således fikk nakne mus som hadde fått implantert en H2981-tumor, administrert L6-AP eller 1F5-AP-konjugatet 18-24 timer før behandlingen med en kombinasjon av MOP/EP (0,2 ml

inneholdende 1 mg EP og 0,3 mg MOP i H₂O). Tumorveksten ble sammenlignet med veksten iaktatt hos ubehandlede mus og hos mus behandlet med MOP/EP-kombinasjonen alene.

Som det fremgår fra figur 19, var anti-tumor-aktivitetene for MOP/EP-kombinasjonen alene og MOP/EP-kombinasjonen pluss 1F5-AP-behandlingen omtrent like. Som det likeledes fremgår fra tabell 4 nedenfor, vokste størrelsen av tumorene hos disse to grupper så vel som tumorene hos ubehandlede kontrollmus. Forbehandling av de tumorbærende mus med L6-AP-konjugatet, etterfulgt av MOP/EP-kombinasjonen resulterte imidlertid i en uttalt anti-tumorreaksjon. Som det fremgår fra figur 19, hadde tumorer som var forbehandlet med L6-AP (etterfulgt av kombinert MCP/EP-behandling) på dag 70, ca. 1/3 størrelse av tumorene som var forbehandlet med 1F5-AP-konjugatet. Som det fremgår fra tabell 4, utviste 1 av 6 tumorer hos den L6-AP-forbehandlede gruppe mus 63 dager etter implantasjon fullstendig rekreasjon, 3 av 6 tumorer var opphørt å vokse, og kun 2 av 6 tumorer utviste en progresjon.

Tabell 4

TUMORREAKSJON 63 DAGER ETTER BEHANDLING MED ANTISTOFF-
AP-KONJUGATER OG MITOMYCIN/ETOPOSIDKOMBINASJONER

Tumorreaksjoner				
Gruppe	Progresjon	Stabil	Partiell regresjon	Komplett regresjon
Kontroll	6/5			
MOP/EP	5/5			
1F5-AP + MOP/EP	6/6			
L6-AP + MOP/EP	2/6	3/6		1/6

Anvendeligheten av konjugatene og prolegemidlene til kombinasjonsterapi mot tumorer fremgår således av disse *in vivo*-undersøkelser.

Alternativt kan konjugatene slik som L6-AP, anvendes

med andre kombinasjoner av prolegemidler, slik som EP, adriamycin-14-fosfat og 5-fluoruridin-monofosfat, til fremføring av et antall forskjellige cytotoxiske midler til tumorceller.

Fremstilling av antistoff-enzymkonjugatet, L6-AP og prolegemidlet, etoposid-4'-fosfat, skjer igjen som beskrevet i eksempel 1. Adriamycin-14-fosfat fremstilles som beskrevet i US patentskrift 4.185.111. 5-fluoruridin-monofosfat fremstilles som beskrevet i M.J. Robins et al., Can. J. Chem., 53, s. 1302-1306 (1975).

Omsetning av L6-AP med de tre ovennevnte prolegemidler utføres som følger: enten tilsettes AP alene eller L6-AP-konjugatet (AP-sluttkonsentrasjon 5 µg/ml) til løsninger av etoposid-4'-fosfat eller adriamycin-14-fosfat (0,1 mM) i Tris-buffer (100 mM) inneholdende MgCl₂ (1 mM) og ZnCl₂ (0,1 mM) ved pH 7,0. Med hensyn til 5-fluoruridin-prolegemidlet krever reaksjonsbetingelsene en løsning av 5-fluoruridin (3 µM) i fosfatbuffer (100 mM) ved pH 8,0. Omsetningen av L6-AP med enten etoposidfosfat eller 5-fluoruridin-prolegemidlet overvåkes som beskrevet i eksempel 1. Omsetningen av L6-AP med adriamycin-14-fosfat overvåkes med HPLC under anvendelse av "IBM C-18"-kolonne (3 µ, 4,5 x 100 mm) og 65 % methanol i vann inneholdende 3 % ammoniumacetat som elueringsmiddel (0,5 ml/minutt, påvisning ved 495 nm).

Omsetningen av antistoff-AP-konjugatet med hvert prolegemiddel resulterer i hydrolytisk fjerning av fosfatrestene som skal frigjøres fra de fri legemidler (se f.eks. B. McComb et al., Alkaline Phosphatase, Plenum Press (New York, 1979)).

Cytotoksisiteten overfor tumorceller for hvert av de tre prolegemidler i nærvær av L6-AP-konjugatet kan påvises under anvendelse av koloni-inhiberingsprøven beskrevet ovenfor i eksempel 1. Etter fjerning av fosfatresten fra hvert av prolegemidlene ved hjelp av konjugatet, frigjøres etoposid, adriamycin og 5-fluoruridin. Hvert av disse legemidler har vist seg å være kraftige anti-tumormidler (se f.eks. P.J. O'Dwyer et al., "Etoposide: Current Status of an Active Anticancer Drug", New England Journal of Medicine, 312, s. 692-700 (1985), M.J. Embleton et al., "Antibody Treating of Anti-Cancer Agents", i Monoclonal Antibodies for Cancer

Detection and Therapy, R.W. Baldwin og V.S. Byers (red.), s. 321-322 (Academic Press 1985), US patentskrift nr. 4.185.111, supra, S.T. Crooke og S.D. Reich (red.), Anthracyclines: Current Status and New Developments, Academic Press (New York 1980), og C. Heidelberger et al., "Fluorinated Pyrimidines and Their Nucleosides", i Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 54, s. 57-119 (1983)).

Prolegemidlene av etoposid, adriamycin og 5-fluoruridin kan derfor anvendes sammen med eller sekvensvis til frigjøring av de tilsvarende kjente anti-tumormidler i tumorområdet ved hjelp av antistoff-alkalisk fosfatasekonjugatene. Det er eksempelvis blitt påvist at anti-tumormidler som administreres i kombinasjon med andre, kan virke synergistisk (f.eks. S. Monfardini et al., Manual of Cancer Chemotherapy, UICC Technical Report Series, 56 (1981)). Denne utførelsesform tilveiebringer derfor en metode til kombinert kjemoterapi mot tumorer.

Eksempel 4

Foreliggende eksempel omhandler anvendelse av ytterligere andre immunkonjugater og prolegemidler til omdannelse av et relativt ikke-cytotoksisk prolegemiddel til et aktivt anti-tumormiddel som utviser *in vitro* cytotoxicitet mot tumorceller. I overensstemmelse med dette eksempel ble det anvendt et L6-penicillin V amidase (i det etterfølgende angitt som "PVA")-immunkonjugat til å omdanne et N-fenoxyacetyl-derivat av adriamycin til det kjente anti-tumormiddel adriamycin.

Fremstilling av antistoff-penicillin V amidasekonjugater ifølge oppfinnelsen

I overensstemmelse med foreliggende eksempel ble et L6-PVA-immunkonjugat og et 1F5-PVA-konjugat fremstilt. Antistoffene L6 og 1F5 og deres opprinnelse er blitt beskrevet tidligere. Det anvendte amidaseenzym var en penicillin V amidase isolert fra en soppkultur av *Fusarium oxysporum* i overensstemmelse med fremgangsmåtene beskrevet av D.A. Lowe et al., "Enzymatic Hydrolysis of Penicillin V to 6-Amino-

penicillanic Acid by *Fusarium oxysporum*", *Biotechnology Letters*, 8 (3), s. 151-156 i (1986). *Fusarium oxysporum*-stammer hvorfra dette enzym kan isoleres, er deponert ved ATCC. PVA er således et lett tilgjengelig enzym som omdanner penicillin-V til penicilansyre. Nærmere bestemt hydrolyserer PVA fenoksyacetylamidbindingen i penicillin-V under dannelse av penicilansyre. Enzymet som reagerer med fenoksyacetamider, kan derfor anvendes til spaltning av prolegemidler av kjente cytotoxiske midler som er derivatisert med fenoksyeddiksyre eller p-hydroxyfenoksyeddiksyre.

Antistoff-PVA-konjugatene ifølge denne utførelsesform ble fremstilt på hovedsakelig samme måte som beskrevet for AP-konjugatene i eksempel 1. Antistoffene L6 og 1F5 ble omsatt med iminothiolan som beskrevet, og antallet av innførte sulfhydrylgrupper i hvert av antistoffene ble bestemt til mellom 1 og 2.

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

Hver reaksjonsblanding ble deretter rørt gjennom en gelfiltreringskolonne ("G-25") under eluering med 20 mM Tris, pH 7,2, med 50 mM NaCl. De resulterende blandinger ble renset på "DEAE Sephadex"-kolonner (2,5 x 10 cm). Fraksjonene ble overvåket ved 280 nm. Det uomsatte antistoff i hver blanding ble ikke bundet til kolonnen, og konjugatet og uomsatt PVA ble eluert med 20 mM Tris, pH 7,2, med 0,5 M NaCl. Fraksjonene inneholdende PVA og konjugat, ble deretter konsentrert under anvendelse av et "Amicon YM-30"-ultrafiltreringsfilter og ble

renset på en "Sephacryl S-300"-kolonne (2,5 x 95 cm) under eluering med PBS. Fraksjonene ble overvåket ved 280 nm, og de fraksjoner som inneholdt rent konjugat ifølge bestemmelse ved SDS-PAGE (4-12 % gradientgel), ble forenet.

5

Fremstilling av et hittil ukjent adriamycin-prolegemiddel

Hvert av de ovenfor fremstilte antistoff-PVA-konjugater ble omsatt deretter med et hittil ukjent adriamycin-prolegemiddel. Nærmere bestemt var det anvendte prolegemiddel N-
10 (p-hydroxyfenoxyacetyl)-adriamycin (i det etterfølgende angitt som "APO"), hvor aminogruppen i sukkerdelen av adriamycin er acylert med p-hydroxyfenoxyeddiksyre som angitt i figur 20.

Dette adriamycin-prolegemiddel ble fremstilt som følger:

15 Til 10 ml tetrahydrofuran ble det tilsatt 84 mg (0,5 mmol) p-hydroxyfenoxyeddiksyre, 57 mg (0,5 mmol) N-hydroxysuccinimid og 100 mg (0,49 mmol) dicyclohexylcarbodiimid. Denne blanding ble omrørt i 2 timer, hvorefter løsningen ble filtrert og filtratet ble tilsatt til 200 mg
20 (0,35 mmol) adriamycin-hydroklorid. 0,1 ml triethylamin ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og omrøringen ble fortsatt i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter filtrert gjennom glassull og ble inndampet til et residuum under høyvakuum. Den resulterende blanding ble renset på en "Silicagel 60"-kolonne
25 (2,5 x 20 ml) under eluering med 95:5 diklormethan:methanol. De forenede fraksjoner ble igjen renset på samme type kolonne, hvor ved det ble erholdt 70 mg (0,1 mmol, 30 % utbytte) rent N-(p-hydroxyfenoxyacetyl)-adriamycin.

FAB MS m/e 694,2125 (M+H)⁺. Beregnet for C₃₅H₃₆NO₁₄,
30 694,2136. 360 MHz ¹H NMR (CDCl₃) δ : 1,06 (d, 3H, sukker CH₃), 1,5-2,2 (m, 6H, sukker H), 3,0 (q, 2H), 4,0 (s, 3H, OCH₃), 4,35 (s, 2H, COCH₂O), 4,8-5,0 (m, 3H), 5,2 og 5,4 (s, 1H), 6,6-6,8 (dd, 4H, fenoxyl ArH), 7,4-7,9 (m, 3H, 2,3,4-H), 9,0 (s, 1H, Ar'OH), 11,61 og 12,39 (s, 1H, ArOH).

35 Det vil være åpenbart at andre fenoxylacetamid-derivater av adriamycin kan fremstilles ved hovedsakelig å anvende samme fremgangsmåte som ovenfor beskrevet. Eksempelvis kan N-(fenoxylacetyl)-adriamycin fremstilles som ovenfor beskrevet ved å erstatte p-hydroxyfenoxyeddiksyre med

0,5 mmol (76 mg) fenoxyceddiksyre. Tilsvarende kan N-(p-hydroxyfenoxycetyl)-melfalan- eller daunomycinprolegemidler eller N-(fenoxycetyl)-melfalan- eller daunomycin-prolegemidler fremstilles ved hjelp av denne synteseoppskrift under anvendelse av 100 mg melfalan eller 200 mg daunomycin (0,35 mmol).

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

Evnen hos antistoff-PVA-konjugatet, L6-PVA, til å om-danne det hittil ukjente prolegemiddel APO til adriamycin ble bestemt som følger: enten ble det tilsatt a) PVA alene (slutt-konsentrasjon: 50 µg/ml), b) 100 µg/ml L6-PVA-konjugat (PVA-sluttkonsentrasjon: 25 µg/ml) eller c) 10 µg/ml L6-PVA (PVA-sluttkonsentrasjon: 2,5 µg/ml) til en løsning av APO (0,1 mM) i PBS. Hver reaksjon ble overvåket ved hjelp av HPLC under anvendelse av en "Phenominox C-18"-kolonne (3 µm, 4,5 x 100 mm) og gradienteluering med 20-60 % tetrahydrofuran i vann med 0,1 % H₃PO₄ (1,0 ml/minutt, påvisning ved 495 nm). Under disse betingelser ble adriamycinet eluert etter 8,9 minutter, og APO ble eluert etter 12,2 minutter. Resultatene fremgår fra figur 21.

Som det fremgår fra figuren, ble amidgruppen i APO hydrolysert ved hjelp av PV, hvilket fremgår av dannelsen av adriamycin. Under disse anvendte betingelser var halverings-tiden for hydrolyse av APO ved hjelp av PVA ca. 20 minutter. Enn videre viste det seg at innen 40 minutter fra reaksjonens start kunne både enzymet alene og antistoff PVA-konjugatet bevirke hydrolyse av minst 80 % av APO til adriamycin. 10 µg/ml (2,5 µg/ml PVA) kunne bevirke hydrolyse i denne størrelsesorden i løpet av 120 minutter. Endelig fremgår det tydelig fra disse undersøkelser at antistoff-PVA-konjugatet ifølge oppfinnelsen ikke utviste noe tilsynelatende tap av enzymatisk aktivitet som følge av bindingen av enzymet til antistoffet, hvilket fremgår av at konjugatet og det frie enzym utviste like egenskaper med hensyn til hydrolysering av APO til adriamycin.

Serumstabilitet av det hittil ukjente adriamycin-prolegemiddel ifølge oppfinnelsen

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

Binding av antistoff-PVA-konjugatene til H2981-tumorceller

Evnen hos L6-PVA- og 1F5-PVA-konjugatene ifølge oppfinnelsen til å bindes til H2981-tumorceller ble målt som beskrevet i eksempel 1 og 2. Resultatene av bindingsprøven er avbildet i figur 22.

FACS-analyse indikerer at både L6- og L6-PVA-konjugatet utviste kraftig binding til tumorcellene, mens 1F5-PVA-konjugatet ikke utviste binding av noen signifikant størrelsesorden. Denne bindingsundersøkelse indikerer for det første at konjugeringen til enzymet ikke på noen vesentlig måte påvirket bindingsevnen hos antistoffkomponenten i immunkonjugatene. For det andre demonstrerer denne prøve igjen spesifisiteten av bindingen av konjugatene, idet L6-PVA-konjugatet bindes til de L6-positive H2981-tumorceller, og 1F5-PVA-konjugatet som følge av den manglende spesifisitet hos 1F5-antistoffet for tumorcellene, hovedsakelig ikke utviser noen binding.

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

Den *in vitro* cytotoksiske virkning av antistoff-PVA/adriamycin-prolegemiddelkombinasjonen mot H2981-tumorceller ble målt under anvendelse av den i eksempel 1 og 2 beskrevne ³H-thymidin-opptagelsesprøve. I korthet ble H2981-tumorceller anbrakt på mikrotiterplater inneholdende 96

brønner i IMDM (10.000 celler/brønn) og fikk stå for å bli bundet i 18 timer ved 37 °C. Antistoff-PVA-konjugatene, L6-PVA eller 1F5-PVA, ble deretter tilsatt i en konsentrasjon på 10 µg/ml antistoff, og platene ble inkubert i 30 minutter ved 4 °C. Brønnene ble deretter vasket 4 ganger med IMDM, og APO ble tilsatt i forskjellige konsentrasjoner i IMDM. Etter 2 timer ble brønnene igjen vasket, IMDM ble tilsatt, og cellene fikk stå i 18 timer ved 37 °C. På dette tidspunkt ble ³H-thymidin (1 µCi/brønn) tilsatt, og etter 6 timer ble platene nedfrost ved -70 °C for å løse cellene. Etter opptining ble cellene høstet på glassfiberfiltre. Inkorporering av ³H-thymidin ble målt under anvendelse av en "Beckman 3801"-scintillasjonsteller og ble sammenlignet med celler behandlet med APO eller adriamycin (ADM) alene.

Under anvendelse av denne prøve ble inhiberingen av ³H-thymidin-inkorporeringen i tumorcellenes DNA målt, og den cytotoxiske virkning av prolegemidlet APO på celler med eller uten forbehandling av cellene med L6-PVA- eller 1F5-PVA-konjugatene ble deretter målt. De cytotoxiske virkninger av disse kombinasjoner ble sammenlignet med cytotoxisiteten som ble iaktatt ved behandling av cellene med stamlegemidlet adriamycin alene. Som det fremgår fra figur 23, var adriamycin med IC₅₀-verdi på 38 nM signifikant mer toksisk overfor tumorceller som ikke var behandlet med konjugat, enn APO med en IC₅₀-verdi på 2 µM. Dette var forventet under hensyn til tidligere rapporter, hvorav det fremgår at adriamycinamider er mindre toksiske enn adriamycin (se f.eks. Y. Levin og B. A. Sela, FEBS Letters, 98, s. 119 (1979) og R. Baurail et al., J. Med. Chem., 23, s. 1171 (1980)). Forbehandling av cellene med L6-PVA øket cytotoxisiteten av APO 20 ganger, til et nivå som kan sammenlignes med cytotoxisiteten for adriamycin alene. Forbehandling av celler med 1F5-PVA påvirket på ingen måte toksiteten av APO. Disse resultater indikerer at L6-PVA-konjugatet vil kunne hydrolysere det relativt ikke-cytotoxiske prolegemiddel APO for tilintetgjørelse av tumorceller i en utstrekning som er sammenlignbar med anvendelse av adriamycin alene, og at den ikke-cytotoxisitet er antigenspesifikk, hvilket fremgår av at 1F5-PVA-konjugatet som ikke signifikant bindes til denne bestemte tumorcellelinje, ikke

bevirket en slik cytotoxiskitet.

Binding av antistoff-PVA-konjugatene til Daudi-lymfoceller

Evnen hos L6-PVA- og 1F5-PVA-konjugatene ifølge opp-
5 finnelse til å bindes til den kjente Daudi-cellelinje ble
også målt. Denne cellelinje er en Burkitt-lymfoma-cellelinje
som er definert ved ATCC (ATCC nr. CCL 213) og som uttrykker
CD-20-antigenet hvortil 1F5-antistoffet bindes. Bindingsprøven
ble utført som beskrevet i eksempel 1, bortsett fra at de
10 anvendte celler var Daudi-celler, og resultatene er avbildet i
figur 24.

I dette tilfelle ble både det monoklonale 1F5-anti-
stoff og 1F5-PVA-konjugat bundet sterkt til lymfocellene.
Denne undersøkelse indikerte igjen at bindingsevnen hos
15 konjugatene ikke signifikant ble påvirket av konjugerings-
metoden.

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

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

Den *in vitro* cytotoxiske virkning av L6-PVA- eller
30 1F5-PVA-konjugatet i kombinasjon med APO-prolegemidlet ble
deretter prøvet på Daudi-celler.

³H-thymidinprøven ble utført hovedsakelig som
beskrevet i de ovenfor angitte eksempler, med lette modifika-
sjoner som følge av at Daudi-cellene er ikke-adhererende.
35 Således ble ca. 250.000 Daudi-celler i IMDM anbrakt i hver
brønn i en mikrotiterplate med 96 brønner, og antistoffenzym-
konjugatet ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble inkubert ved
4 °C i 30 minutter. Ubundet antistoff-enzymkonjugat ble

fjernet ved sentrifugering ved 500 x g i 5 minutter, og supernatanten ble fjernet. Cellene ble resuspendert i IMDM, og vaskeprosedyren ble gjentatt 3 ganger for fjerning av alt ubundet konjugat. Deretter ble APO i IMDM tilsatt, og etter
5 henstand i 2 timer ble cellene vasket én gang som ovenfor beskrevet. Den resterende del av prøven ble utført som beskrevet i de foregående eksempler.

Under anvendelse av denne prøve ble inhiberingen av ³H-thymidin-inkorporering i Daudi-cellenes DNA målt, og således
10 den cytotoxiske virkning av APO-prolegemidlet på cellene med eller uten forbehandling av cellene med L6-PVA- eller 1F5-PVA-konjugatet. De cytotoxiske virkninger av disse kombinasjoner ble sammenlignet med den iaktatte cytotoxisitet etter
15 behandling av cellene med adriamycin alene. Som det fremgår fra figur 25, var adriamycin signifikant mere toksisk enn APO overfor Daudi-celler som ikke var behandlet med noe konjugat. Forbehandling av cellene med 1F5-PVA-konjugatet øket signifikant cytotoxisiteten av APO-prolegemidlet til et nivå, som kunne sammenlignes med cytotoxisiteten av adriamycin alene,
20 mens forbehandling med L6-PVA-konjugatet ikke resulterte i en slik økning.

Det skal bemerkes at de oppnådde resultater ved disse bindings- og cytotoxisitetsundersøkelser er de motsatte av resultatene som ble oppnådd med disse konjugater ved de tid-
25 ligere beskrevne undersøkelser under anvendelse av H2981-tumorceller hvor L6-PVA pluss APO-kombinasjonen utviste øket cytotoxisisk virkning og 1F5-PVA pluss APO-kombinasjonen ikke utviste en slik virkning. Dette kunne forventes under hensyn til de forskjellige spesifisiteter hos L6- og 1F5-antistoffene
30 i konjugatene og demonstrerer tydelig spesifisiteten av de cytotoxiske virkninger oppnådd med konjugat/prolegemiddelkombinasjonene.

Denne undersøkelse antyder enn videre nytten av 1F5-PVA-konjugatet i kombinasjon med APC til frembringelse av
35 cytotoxiske virkninger på tumorceller *in vitro*. Således påviser *in vitro*-cytotoxisitetsundersøkelsene i dette eksempel at ethvert av de oppnådde konjugater som inneholder et anti-stoff som reagerer med et tumorassosiert antigen, kan anvendes

til behandling av tumorer, hvormed dette antistoff reagerer.

Eksempel 5

5 Dette eksempel angår anvendelse av immunkonjugatene til å omdanne prolegemidlet 5-flourcytosin (i det etterfølgende angitt som "5-FC") til anti-tumorlegemidlet 5-fluoruracil (i det etterfølgende angitt som "5-FU") ved hjelp av et anti-stoff-bundet cytosindeaminase (CD)-enzym (se figur 26). Anti-stoff-CD-konjugat/5-FC-prolegemiddelekombinasjonen ifølge denne 10 utførelsesform utviste en signifikant cytotoxisk virkning mot tumorceller *in vitro*.

Fremstilling av antistoff-cytosin-deaminasekonjugater ifølge oppfinnelsen

15 L6-CD og 1F5-CD-immunkonjugater ble fremstilt under anvendelse av de ovenfor angitte monoklonale L6- og 1F5-antistoffer og et cytosin-deaminaseenzym. Selv om CD-enzym er blitt påvist i og isolert fra forskjellige mikroorganismer (se f.eks. West et al., Biochem. Biophys. Acta., 719, s. 251-258 20 (1982)) var det i foreliggende eksempel anvendte, bestemte CD renses fra presset bakegjær på en måte som svarte til den som er beskrevet av P.L. Ipata et al., "Baker's Yeast Cytosine Deaminase. Some Enzymatic Properties and Allosteric Inhibition by Nucleosides and Nucleotides", Biochemistry, 10, s. 4270- 25 4276 (1971).

I korthet ble gjærceller (*Sacchromyces cerevisiae*) (2,0 kg) plasmolysert med ethylacetat, og ammoniumsulfatutfelling (50-73 %) ble utført to ganger under dannelsen av et urent enzympreparat. Ammoniumsulfatutfellingen ble dialysert mot 30 10 mM Tris-Cl-buffer, pH 8,0, ble overført på en "Q-Sepharose"-anionbytterkolonne (Pharmacia) og ble eluert med en KCl-gradient (0-0,3 M).

Fraksjoner ble analysert med hensyn til CD-aktivitet under anvendelse av 3 mM cytosin (eller 5-FC) som substrat i 35 PBS ved 27 °C i overensstemmelse med metoden beskrevet av T. Niskiyama et al., "Antineoplastic Effects in Rats of 5-Fluorocytosine in Combination with Cytosine Deaminase Capsules", Cancer Research, 45, s. 1753-1761 (1985)). Ifølge denne metode

ble en liten mengde av enzympreparatet tilsatt til substratet cytosin (eller 5-FC), og reaksjonsforløpet ble overvåket med hensyn til dannelse av uracil (eller 5-FU) ved hjelp av UV-spektrofotometri på aliquoter som ble behandlet med 0,1 N HCl.

5 Forholdene 250/280 (for cytosin) og 255/290 (for 5-FC) ble anvendt til måling av mengden av dannet uracil eller 5-FU. Denne metode til bestemmelse av CD-aktivitet ble anvendt på hvert rensetrinn for CD-enzymet, så vel som de nedenfor beskrevne CD-holdige konjugater ifølge oppfinnelsen.

10 De aktive fraksjoner fra KCl-gradienten ble deretter forenet, konsentrert og renset på en "G-75 Sephadex"-kolonne. På dette trinn indikerte SDS-PAGE (14 %, ikke-reduserende) at fraksjonen inneholdende CD-aktivitet, inneholdt en hovedmengde av et protein med en molvekt på 18 kd og mindre mengder av
15 proteiner med molvekter på 20 og 30 kd. CD-aktiviteten i denne fraksjon var 10 U/mg protein (under anvendelse av cytosin som substrat). Andre preparater ga materiale med en aktivitet så høy som 17 U/mg protein. Alle proteinundersøkelser ble utført under anvendelse av det fra Pierce (Rockford, IL) oppnåelige
20 BCA-proteinprøvereagens.

Det rensede CD ble deretter konjugert med det monoklonale L6- eller 1F5-antistoff på hovedsakelig samme måte som beskrevet for AP-konjugatene i eksempel 1. De urene konjugater (ikke behandlet med jodacetamid) ble renset ved gelfiltrering
25 på "S-200 Sepharose" under eluering med PBS. Fraksjoner ble overvåket ved 280 nm, og CD-aktiviteten for hver fraksjon ble prøvet som beskrevet umiddelbart ovenfor. Fraksjoner inneholdende konjugater med passende CD-antistoff-forhold, ble forenet og analysert ved SDS-PAGE på en 4-12 %, ikke-reduserende
30 gradientgel, hvilket ga rensede L6-CD og 1F5-CD-konjugatpreparater.

Omsetning av antistoff-cytosin-deaminasekonjugat med prolegemidlet 5-fluorcytosin

35 Evnen hos L6-CD- og 1F5-CD-konjugatene ifølge oppfinnelsen til å omdanne prolegemidlet 5-FC til 5-FU eller substratet cytosin til uracil, ble bestemt som følger: enten ble fritt CD (sluttkonsentrasjon: 5 µg/ml), L6-CD-konjugatet (CD-sluttkonsentrasjon: 5 µg/ml) eller 1F5-CD-konjugat (CD-slutt-

konsentrasjon: 5 µg/ml) tilsatt til en oppløsning av 3 mM
a) cytosin, eller b) 5-FC i PBS ved 27 °C, og den i løpet av
tiden dannede mengde av produktet ble bestemt spektrofotomet-
risk som beskrevet ovenfor i foreliggende eksempel. Resul-
5 tatene fremgår fra figur 27.

Som det fremgår fra figuren, ble 5-FU dannet ut fra
prolegemidlet 5-FC både ved innvirkning av det fri CD-enzym og
antistoff-CD-konjugatene. Figuren viser også at det ikke fore-
kom noe signifikant tap av CD-enzymaktivitet som følge av
10 bindingen av enzymet til antistoffet i de to konjugater,
hvilket fremgår av at konjugatene utviste aktiviteter som
svarte til aktivitetene av CD alene. Den spesifikke aktivitet
av det fri enzym og av konjugatene var ca. 4 U/mg enzym.

Til sammenligning ble reaktiviteten av konjugatet
15 under anvendelse av cytosin som substrat prøvet i stedet for
5-FC. Som det fremgår fra figuren, utviste konjugatene med
cytosin som substrat også CD-aktiviteter som hovedsakelig
svarte til aktivitetene av det fri CD-enzym alene. Den spesi-
fikke aktivitet av konjugatene - 10 U/mg bundet enzym -
20 indikerte enn videre at den Opprinnelige enzymaktivitet hos CD
ble bibeholdt i konjugatet. Dette aktivitetsnivå ble opprett-
holdt i flere uker når konjugatene ble oppbevart i PBS ved
4 °C.

25 Binding av antistoff-CD-konjugatene til H2981-tumorceller

Evnen hos L6-CD- og 1F5-CD-konjugatene ifølge opp-
finnelsen til å bindes til H2981-tumorceller ble målt som
beskrevet i eksempel 1 og 2. Resultatene av bindingsprøven er
avbildet i figur 28.

30 FACS-analyse indikerte at både L6 og L6-CD ble sterkt
bundet til tumorcellene, mens 1F5-CD-konjugatet ikke utviste
noen binding til cellene. Som i forbindelse med de tidligere
bindingsundersøkelser beskrevet ovenfor, indikerer denne prøve
at bindingsaktiviteten hos disse konjugater, til tross for
35 konjugering av antistoffet med enzymet, så vel som bindings-
spesifisiteten hos konjugatene, ble bevart.

In vitro-cytotoksisitet av antistoff-CD-konjugat/5-FC-prolegemiddelkombinasjonen på H2981-tumorceller

In vitro-cytotoksisiteten av antistoff-CD/5-FC-prolegemiddelkombinasjonen mot H2981-tumorceller ble målt under anvendelse av en ³H-leucinopptagelsesprøve svarende til ³H-thymidin-opptagelsesprøven beskrevet i eksempel 1 og 2.

I overensstemmelse med denne prøve ble en suspensjon av 10⁴ H2981-celler i 0,1 ml IMDM med 10 % (volumbasis) kalvefosterserum anbrakt på mikrotiterplater med 96 brønner og fikk festes til platene ved henstand over natten ved 37 °C. Platene ble deretter vasket, og L6-CD- eller 1F5-CD-konjugatet (totalt 10 µg protein/ml inneholdende 10 U/mg bundet CD-enzymaktivitet under anvendelse av cytosin som substrat) i 0,1 ml IMDM ble tilsatt. Etter 30 minutter ved 4 °C ble platene vasket 4 ganger, og 0,15 ml leucin-fritt RPMI-medium inneholdende varierende konsentrasjoner av legemidlene 5-FC eller 5-FU, ble tilsatt til brønnene. Cellene ble inkubert i 18 timer ved 37 °C og ble radioaktivert i 6 timer med ³H-leucin (1 µCi/brønn) i 0,05 ml leucinfritt RPMI. Platene ble deretter behandlet med hensyn til ³H-thymidin-opptagelsesprøven som beskrevet i eksempel 1 og 2.

Under anvendelse av denne prøve ble inhiberingen av opptaket av ³H-leucin i proteinet i tumorcellene målt, og således den cytotoxiske virkning av prolegemidlet 5-FC på cellene etter eller uten foregående behandling av cellene med L6-CD- eller 1F5-CD-konjugatene. De cytotoxiske virkninger av disse kombinasjoner ble sammenlignet med den iakttatte cytotoxissitet ved behandling av cellene med stamlegemidlet 5-FU alene. Som det fremgår fra figur 29, utviste 5-FC meget liten cytotoxisisk virkning på tumorceller som ikke var behandlet med konjugat, mens 5-FU med en IC₅₀-verdi på 20 µM inhiberte cellevekst. Forutgående behandling av cellene med L6-CD-konjugatet øket imidlertid cytotoxissiteten av 5-FC til et nivå svarende til cytotoxissiteten av 5-FU alene. Dette resultat stemmer overens med at antigenbundet L6-CD er i stand til å omdanne det ikke-toksiske prolegemiddel 5-FC til 5-FU. Det ikke-bindende konjugat 1F5-CD ga ikke en slik økning, hvilket er en indikasjon på denne økede cytotoxissitets antigen-spesifikke

natur.

P a t e n t k r a v

5

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff-enzym-konjugat hvor antistoffet reagerer med et antigen på overflaten av tumorceller og er konjugert med et enzym som er i stand til å omdanne et svakt cytotoksisk prolegemiddel til det tilsvarende mer aktive stamlegemiddel, idet antistoffet er L6, 10 som produseres av det ved ATCC under deponeringsnummer HB 8677 deponerte hybridom, det monoklonale antistoff 96,5, som er spesifikt for p97, som er et melanoma-assosiert antigen, eller 1F5, som produseres av det ved ATCC under deponeringsnummer HB 15 9646 deponerte hybridom, enzymet er en alkalisk fosfatase, penicillin-amidase, arylsulfatase, cytosindeaminase, protease, D-alanylkarboksypeptidase, et karbohydratspaltende enzym eller en β -laktamase, prolegemidlet er et fosfatholdig prolegemiddel, et sulfatholdig prolegemiddel, et peptidholdig prolegemiddel, et glukosylert prolegemiddel, et β -laktamholdig prolegemiddel, et D-aminosyremodifisert prolegemiddel, et 20 fenoksyacetamidholdig prolegemiddel, et fenylacetamidholdig prolegemiddel eller et substituert fenylacetamidholdig prolegemiddel, og stamlegemidlet er et etoposid, teniposid, et 25 adriamycin, daunomycin, carminomycin, aminopterin, dactinomycin, mitomycin, et cis-platin, en cis-platinanalog, et bleomycin, esperamicin, et 5-fluoruracil eller et melfalan eller annen nitrogenseppgass, k a r a k t e r i s e r t v e d at antistoffet og enzymet 30 omsettes med et kryssbindende, heterobifunksjonelt middel slik at en tioeter eller disulfidbinding dannes mellom antistoffet og enzymet.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, 35 k a r a k t e r i s e r t v e d at det som reaktanter anvendes det monoklonale antistoff L6, som produseres av det ved ATCC under deponeringsnummer HB 8677 deponerte hybridom, og enzymet alkalisk fosfatase, penicillin V amidase eller cytosindeaminase, det monoklonale antistoff 96,5, som er

spesifikt for p97, som er et melanoma-assosiert antigen, og enzymet alkalisk fosfatase, eller det monoklonale antistoff 1F5, som produseres av det ved ATCC under deponeringsnummer HB 9646 deponerte hybridom, og enzymet alkalifosfatase eller
5 cytosindeaminase.

10

15

20

25

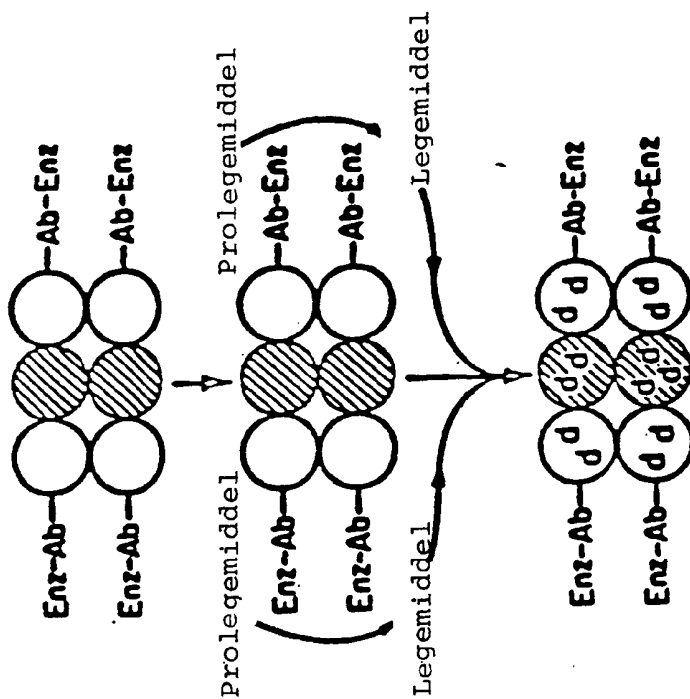
30

35

Figur 1

Målrrettede enzymer til prolegemiddelaktivering

Antistoff-enzym-konjugat
bindes til cellepopulasjon

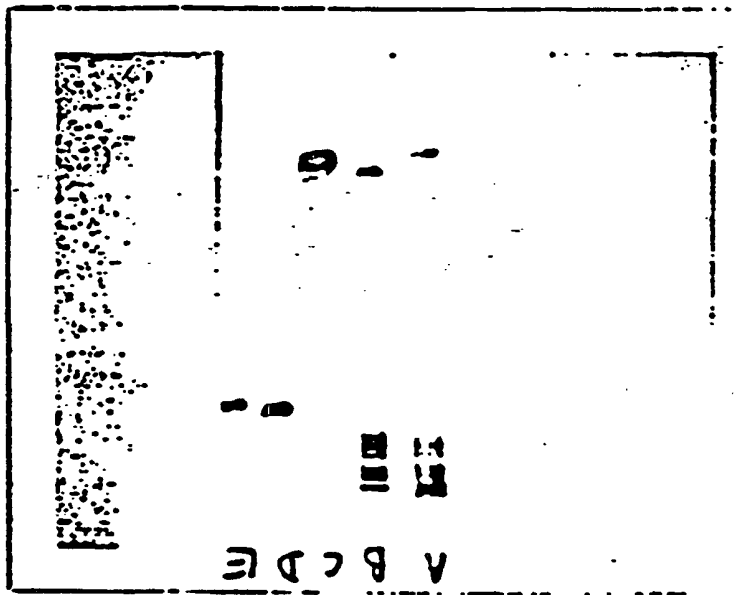


Enzym omdanner prolegemiddel
til aktivt legemiddel

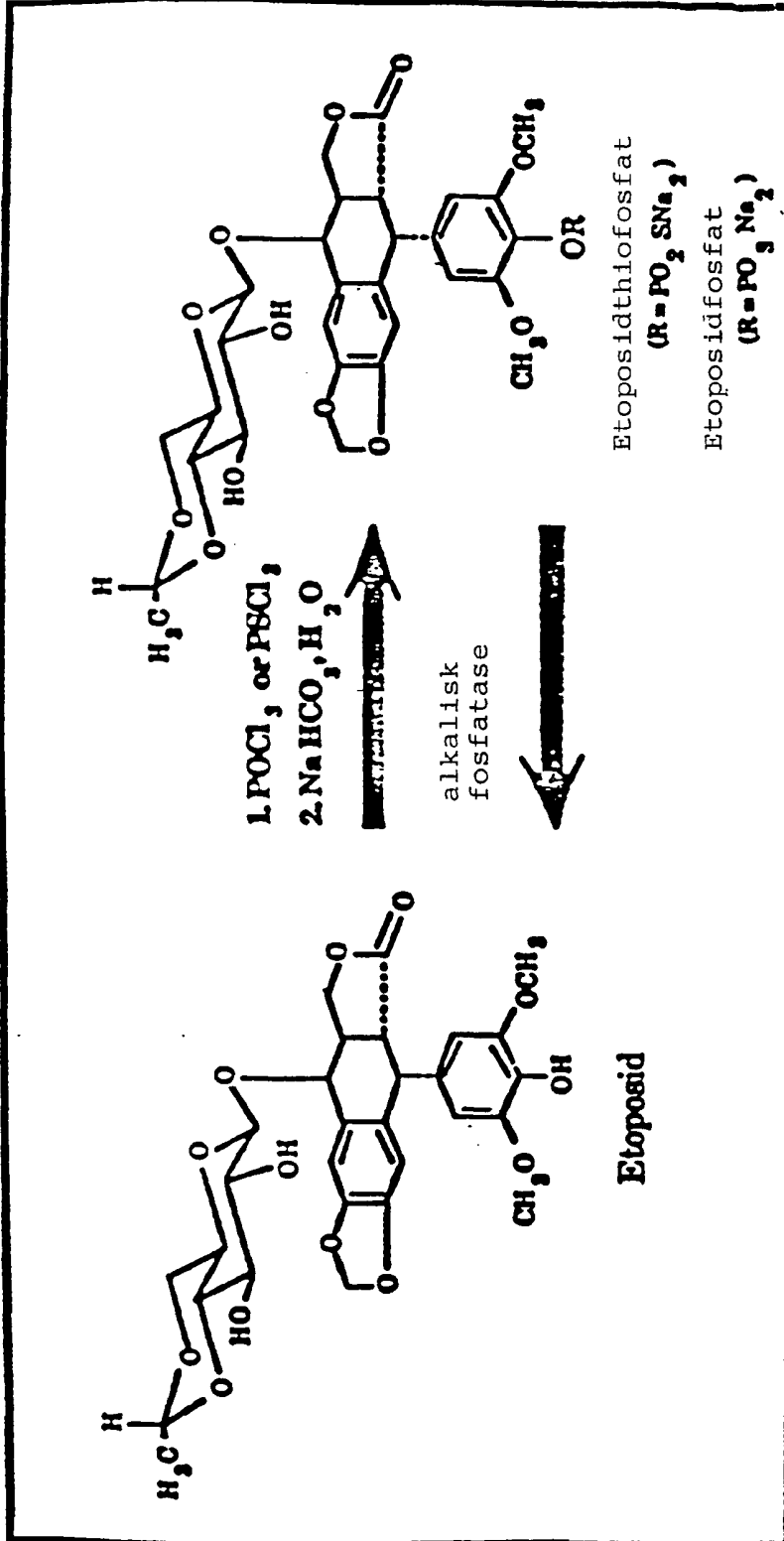
Legemiddel (d) trenger inn i
celler og fremkaller tilintet-
gjørelse herav

178138

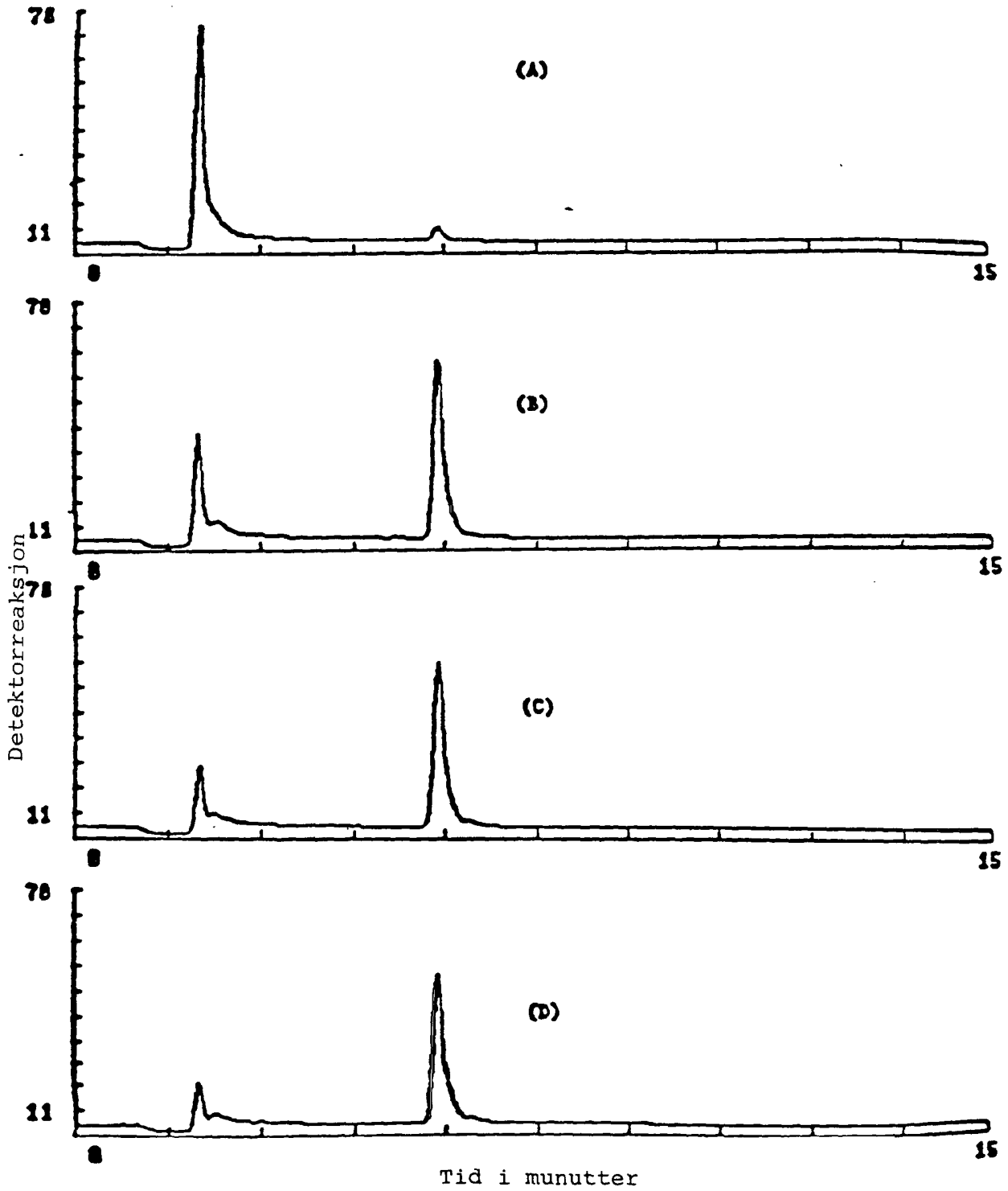
Figur 2



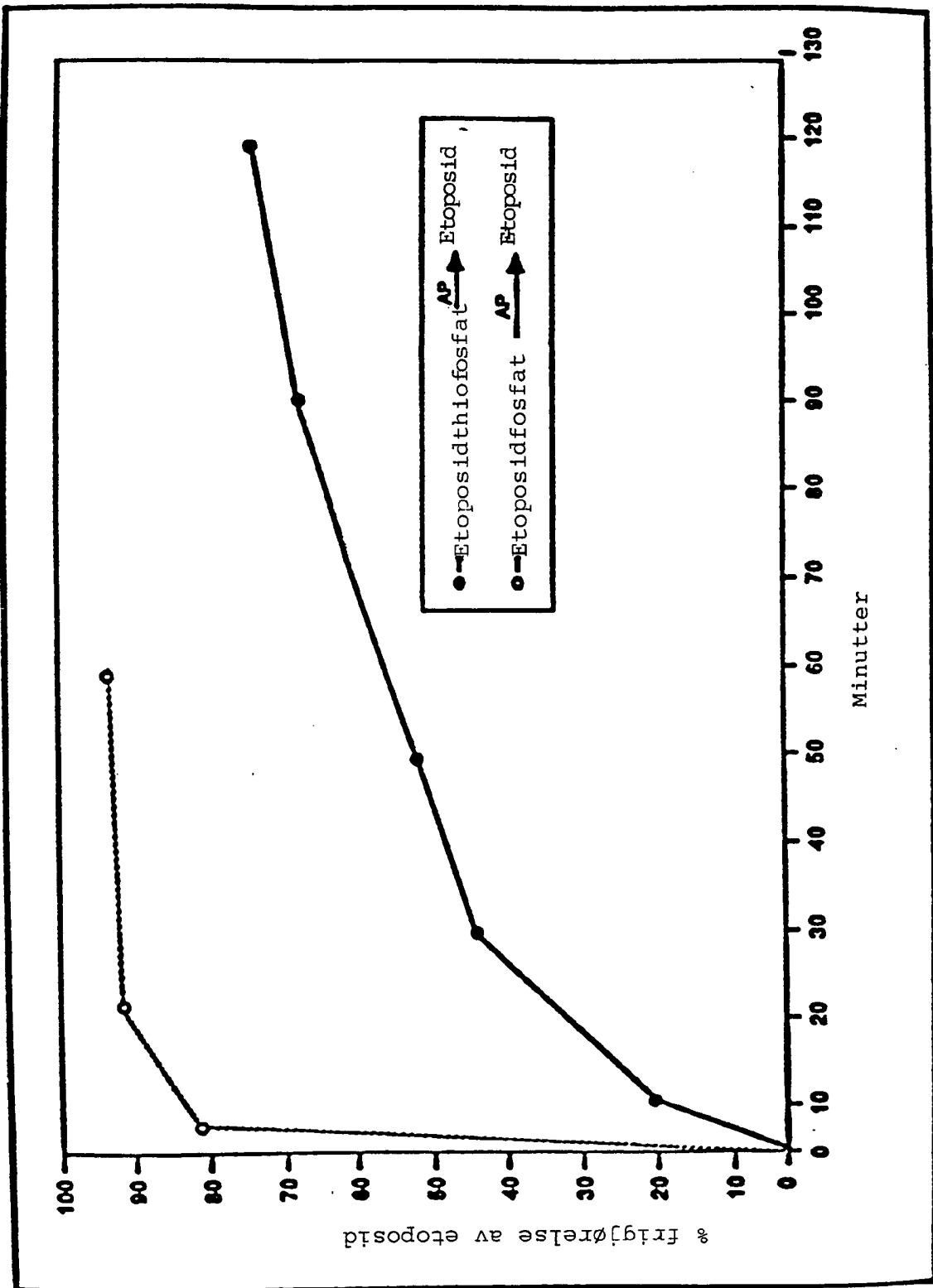
Figur 3



Figur 4

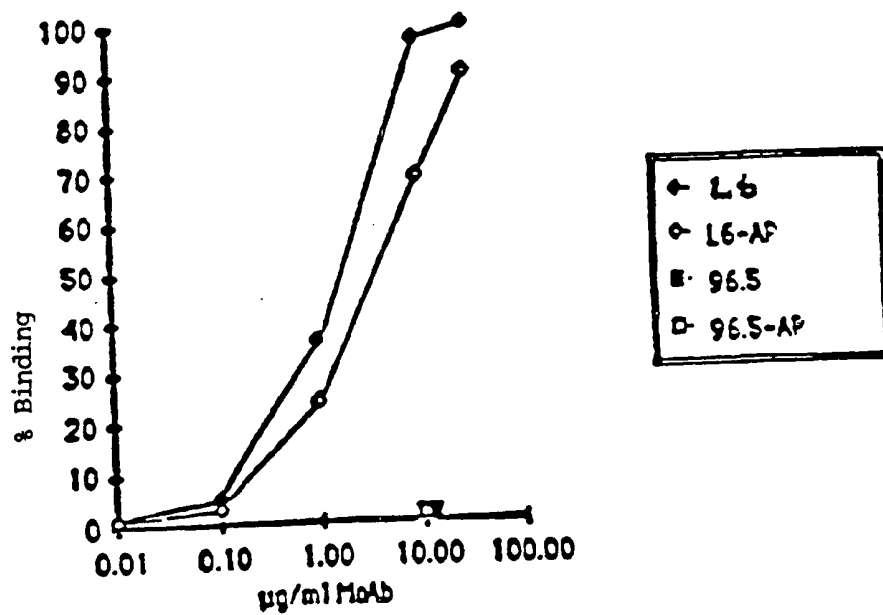


Figur 5



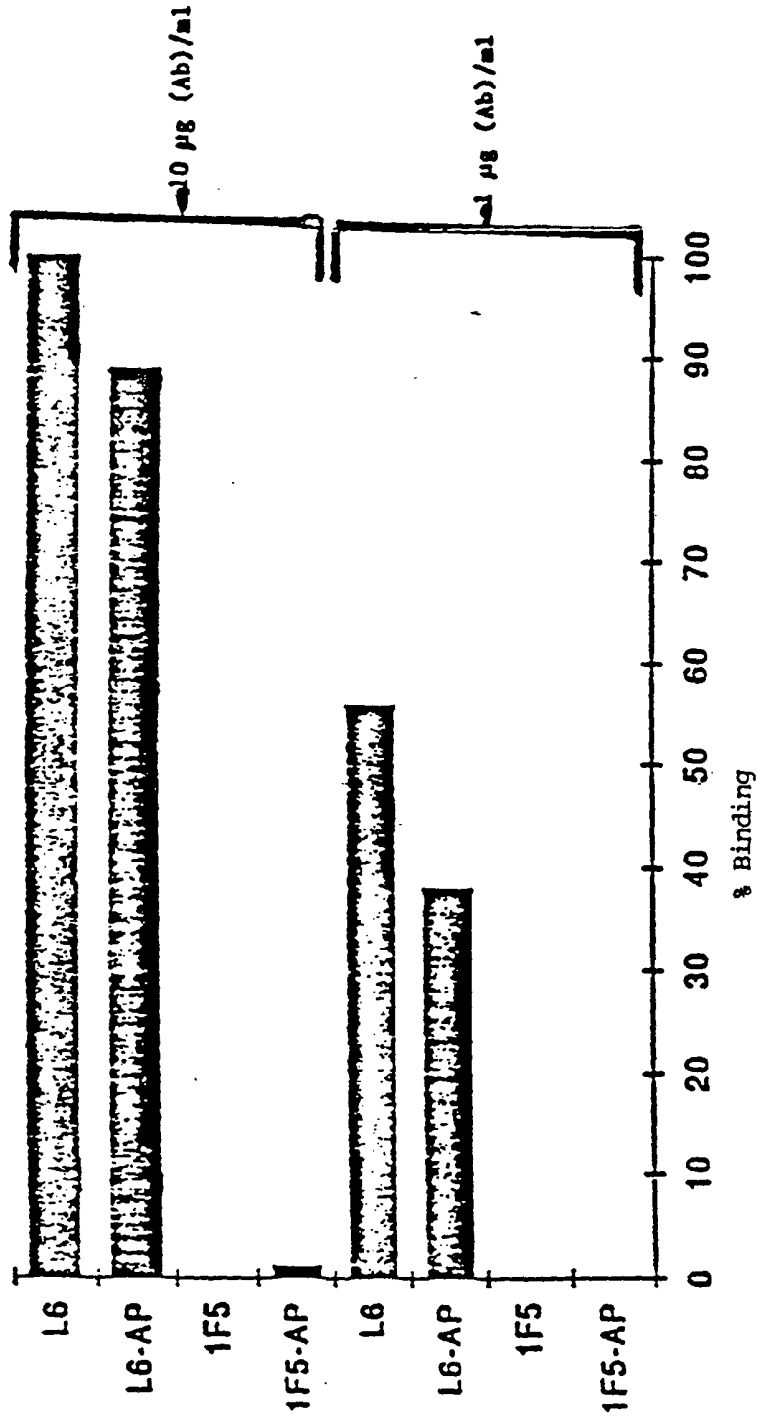
Figur 6

Antistoff- og konjugatbinding til H3347-celler

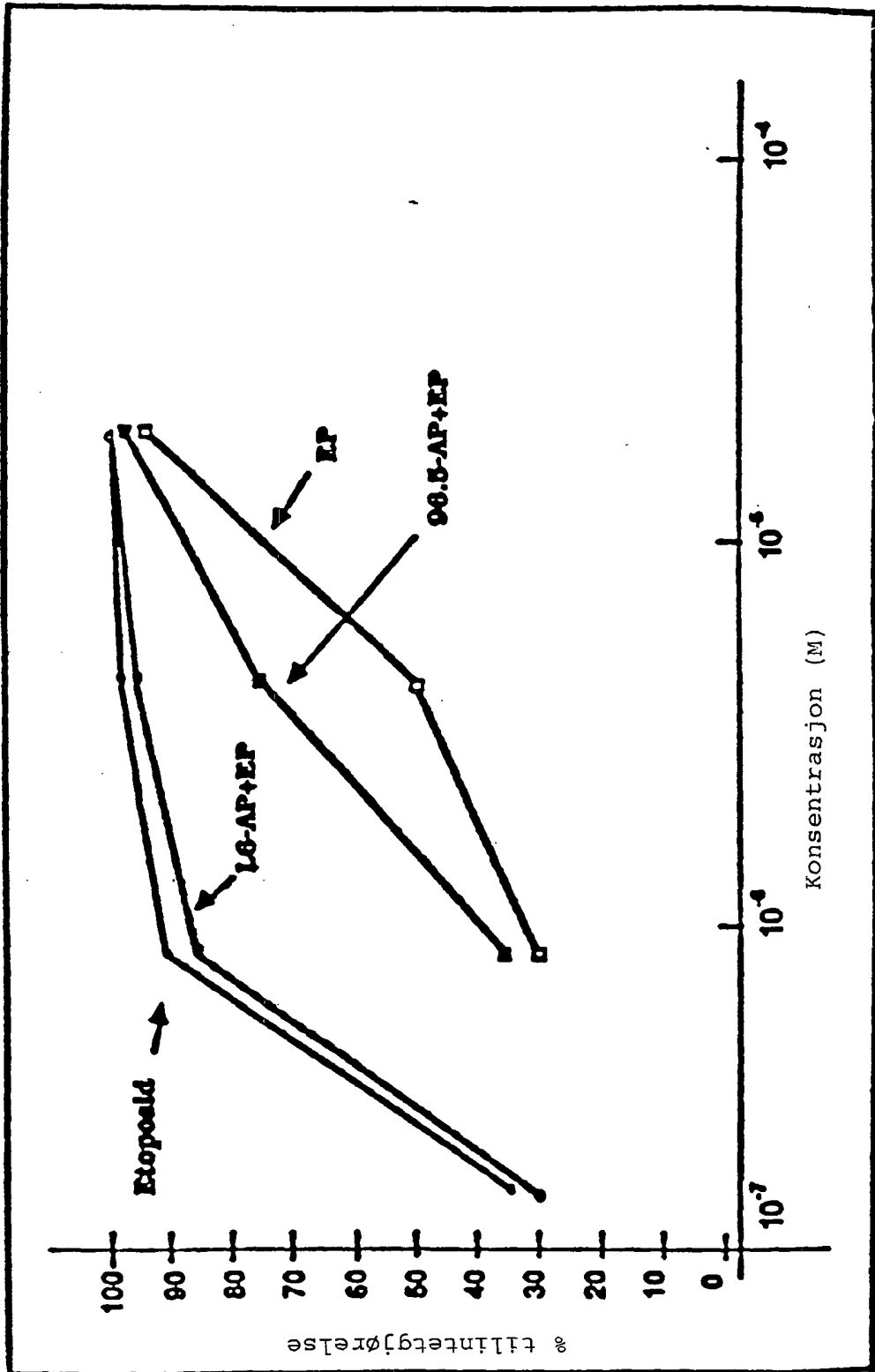


Figur 7

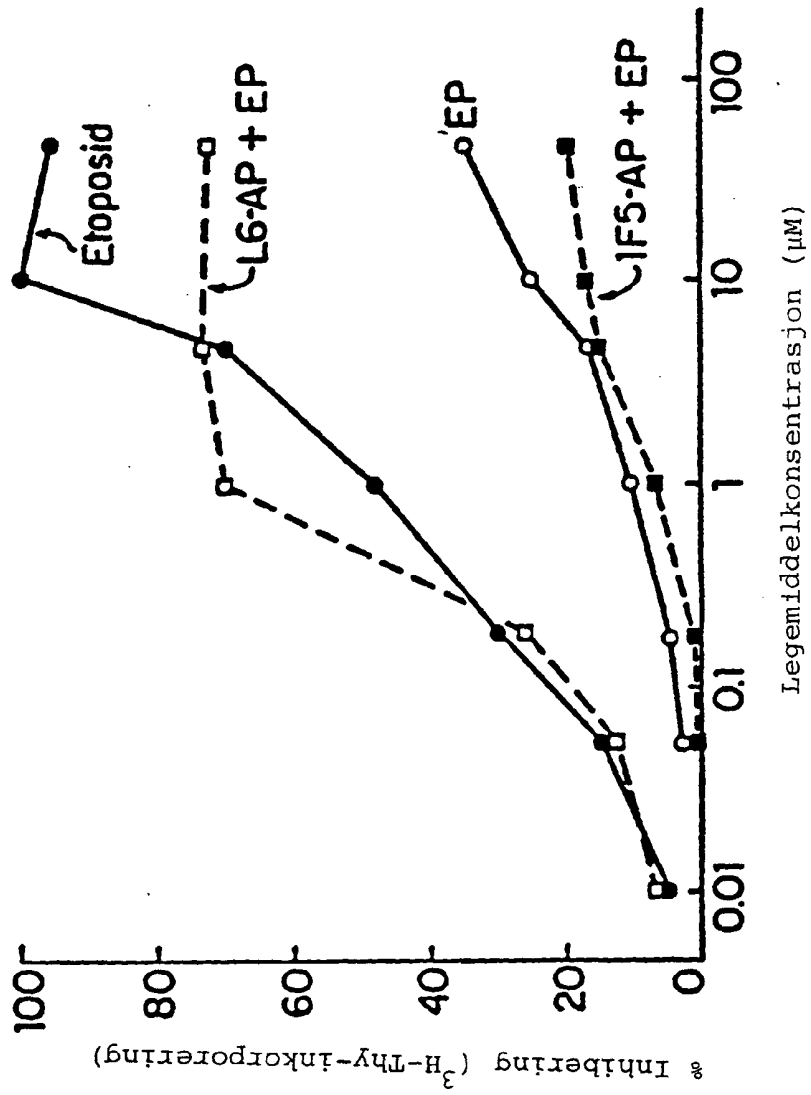
Bindingsprøve med alkaliske fosfatkonjugater



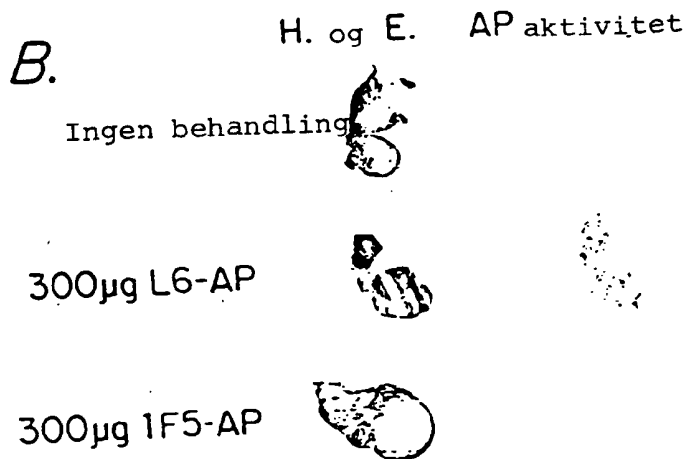
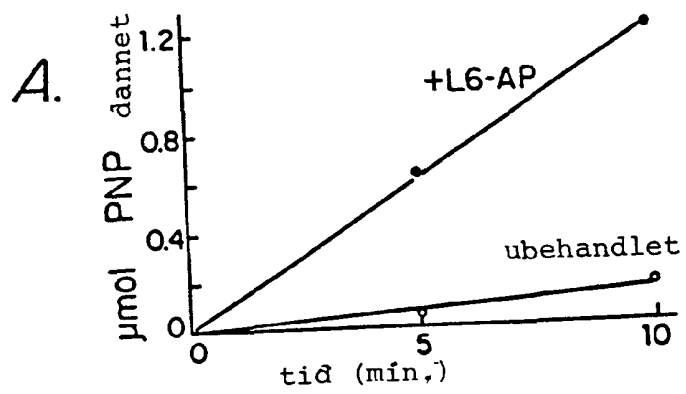
Figur 8



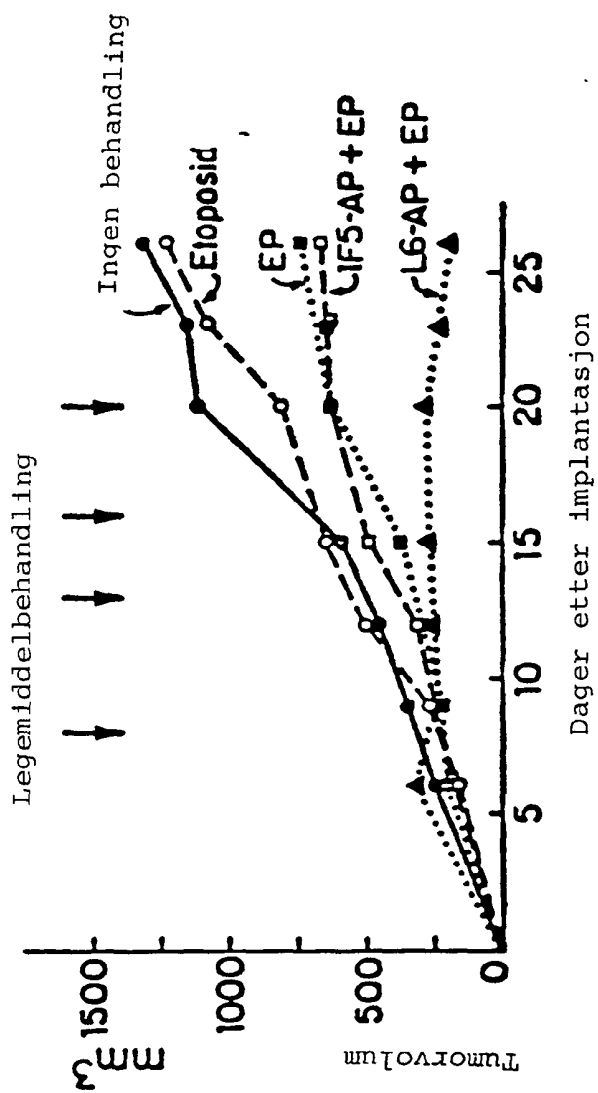
Figur 9



Figur 10

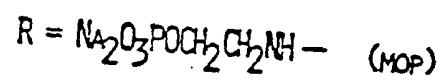
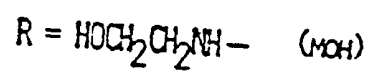
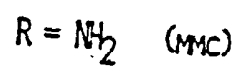
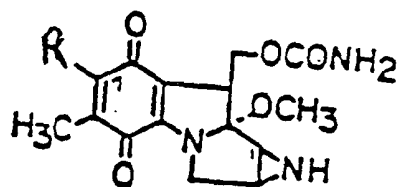


Figur 11



178138

Figur 12



Figur 13

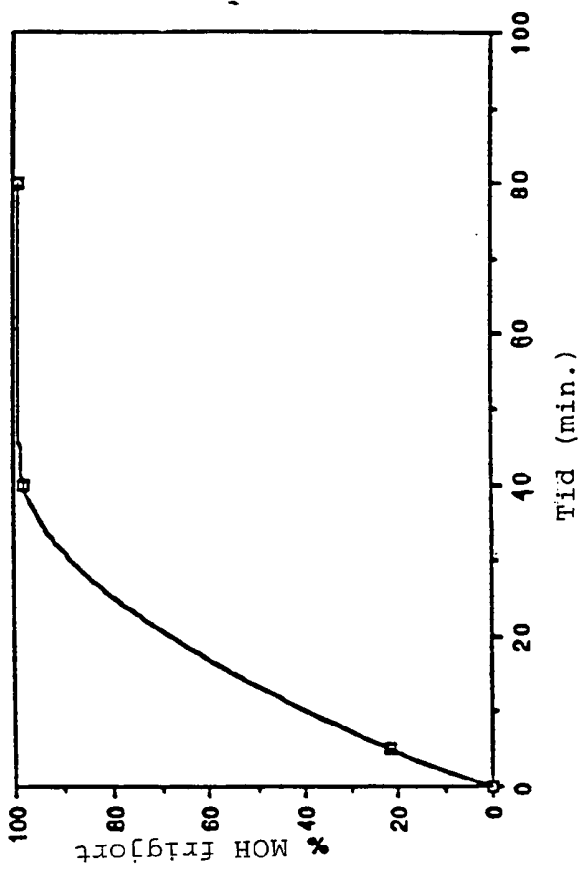
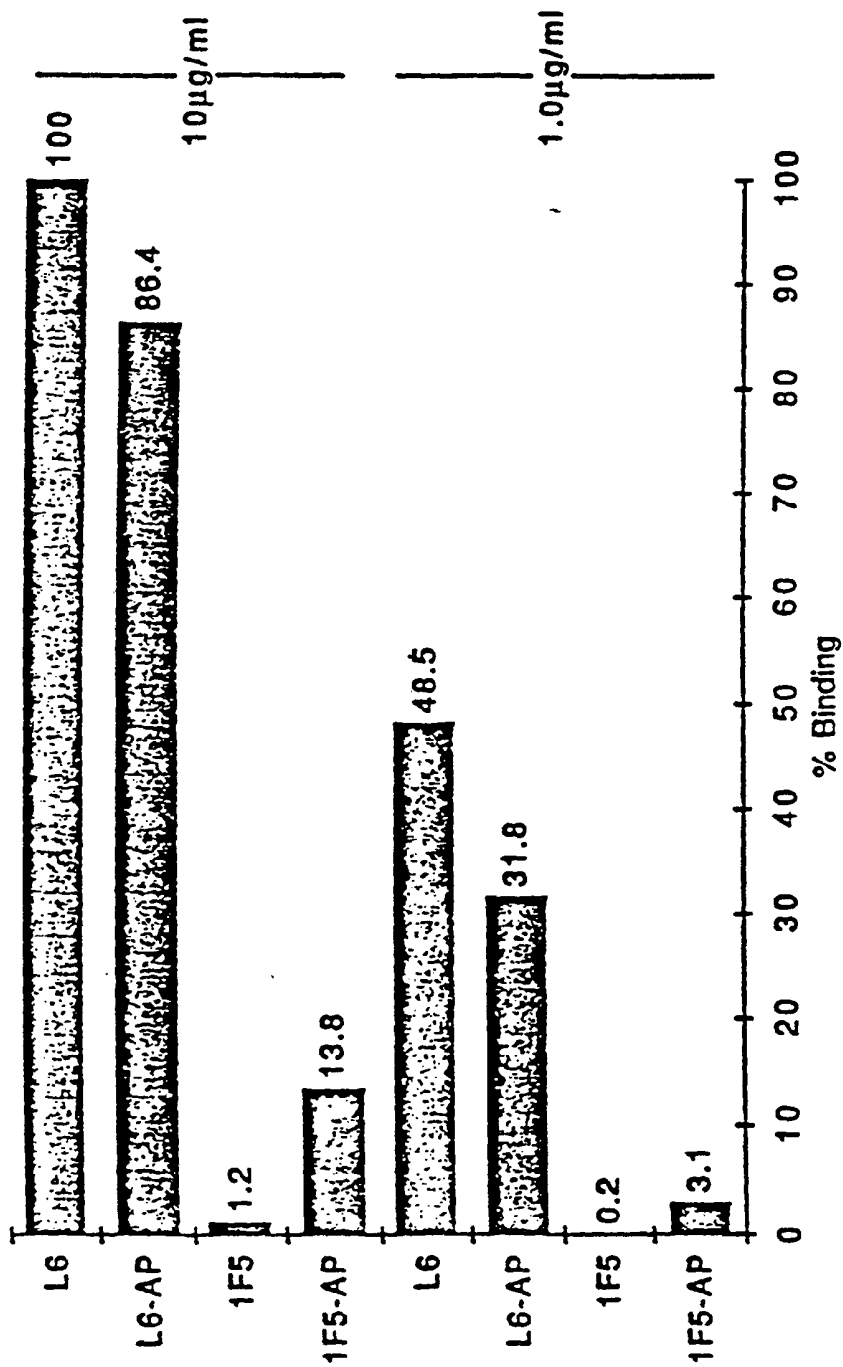
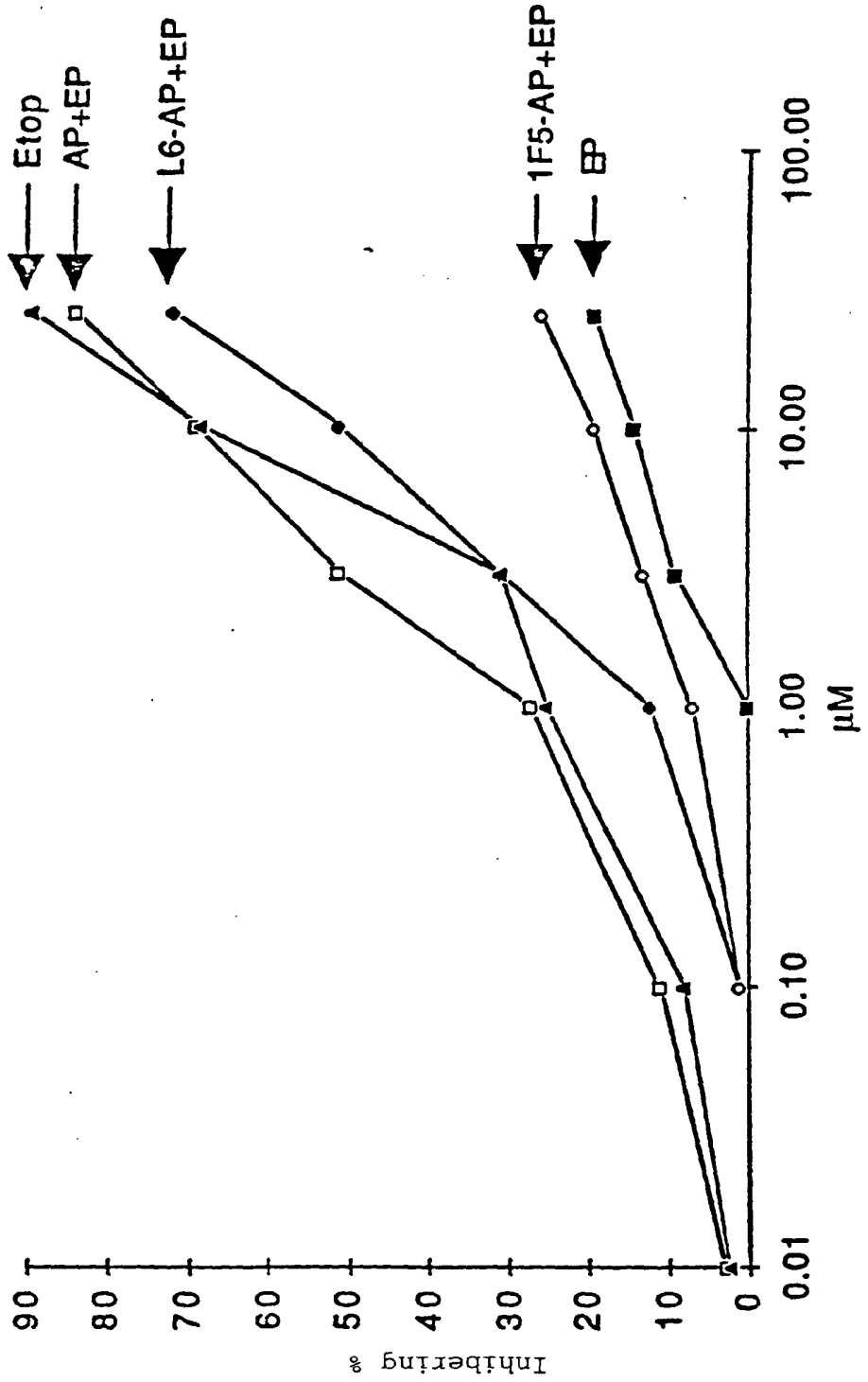


Figure 14

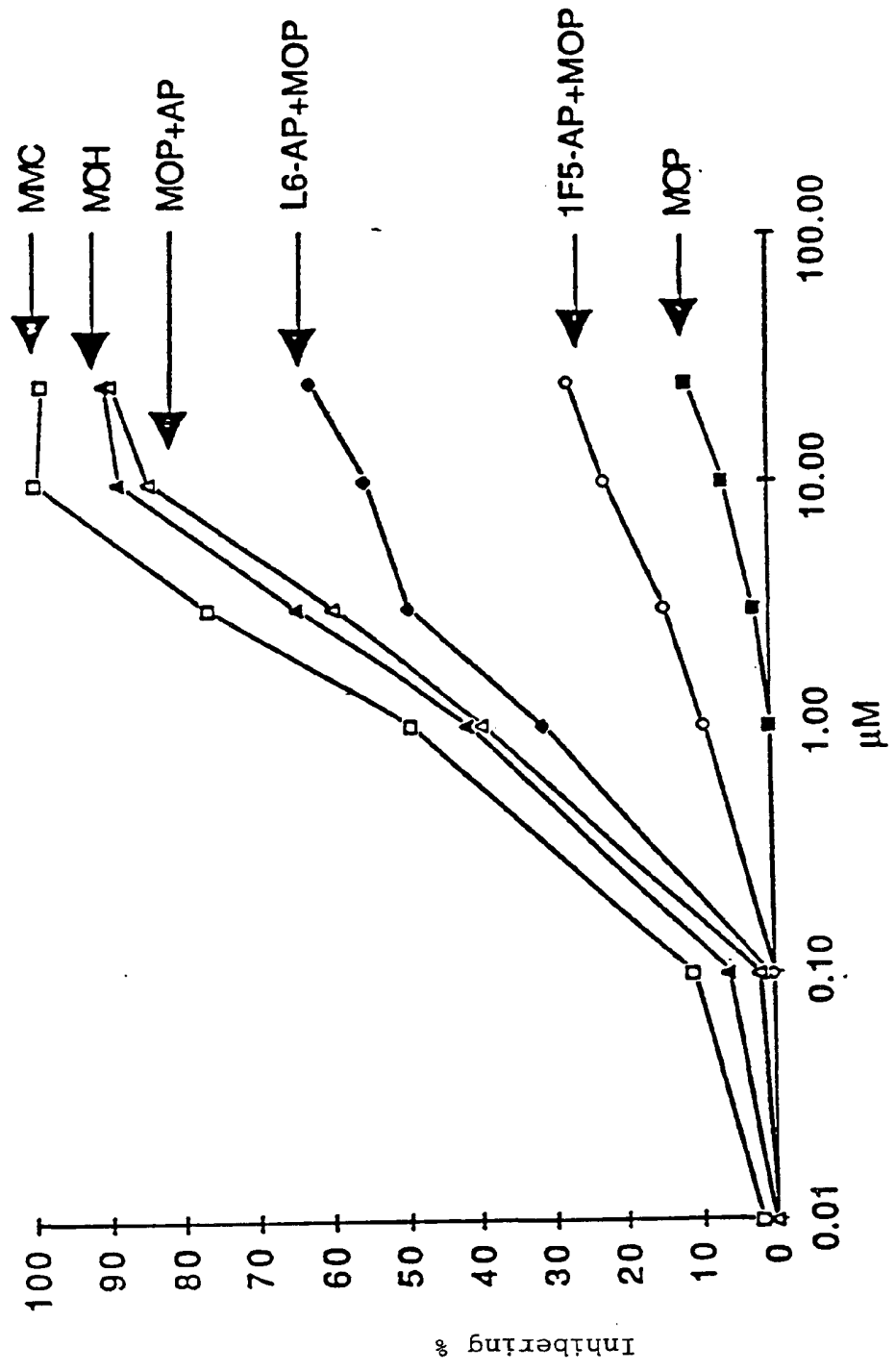


178138

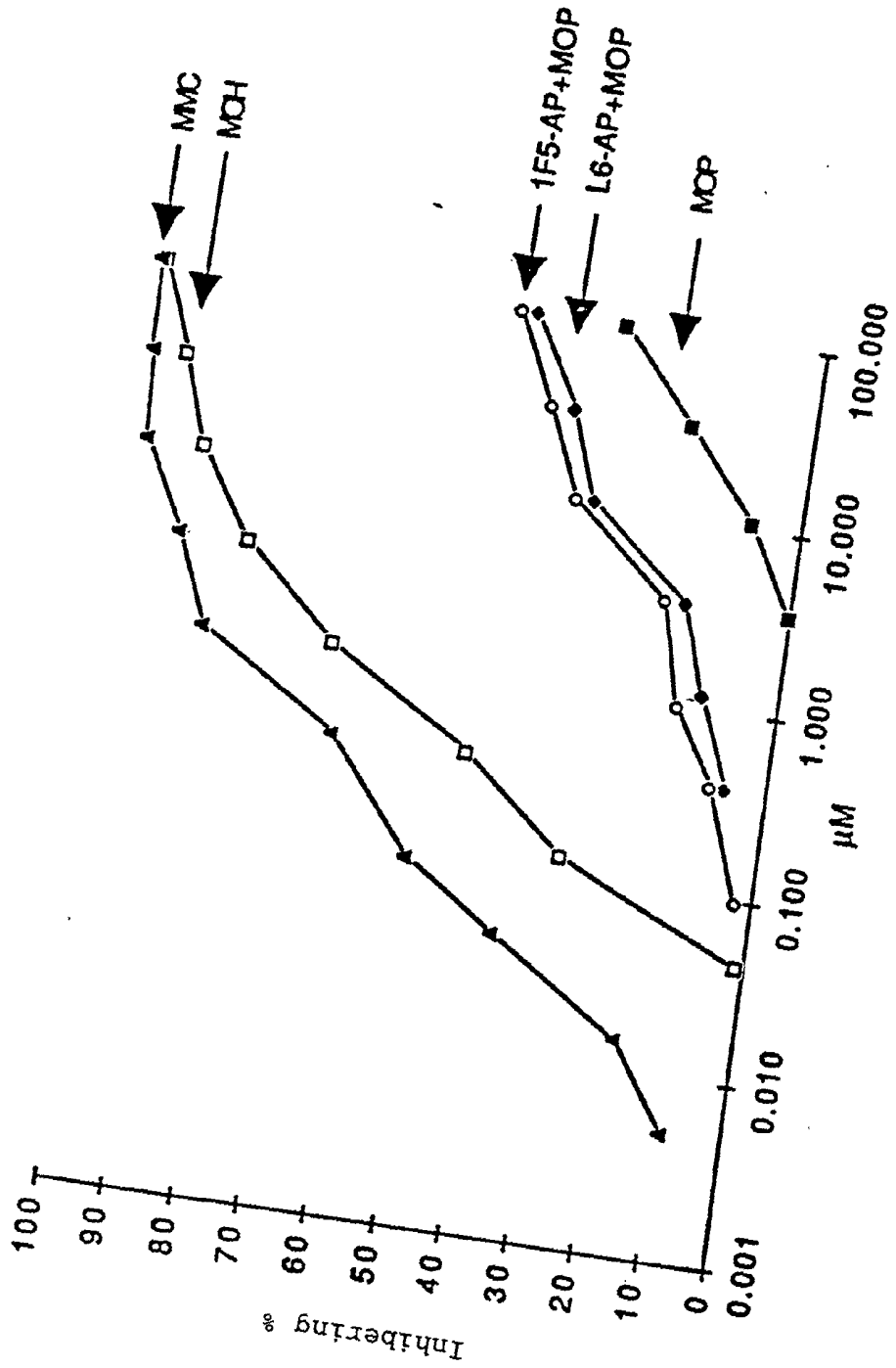
Figur 15



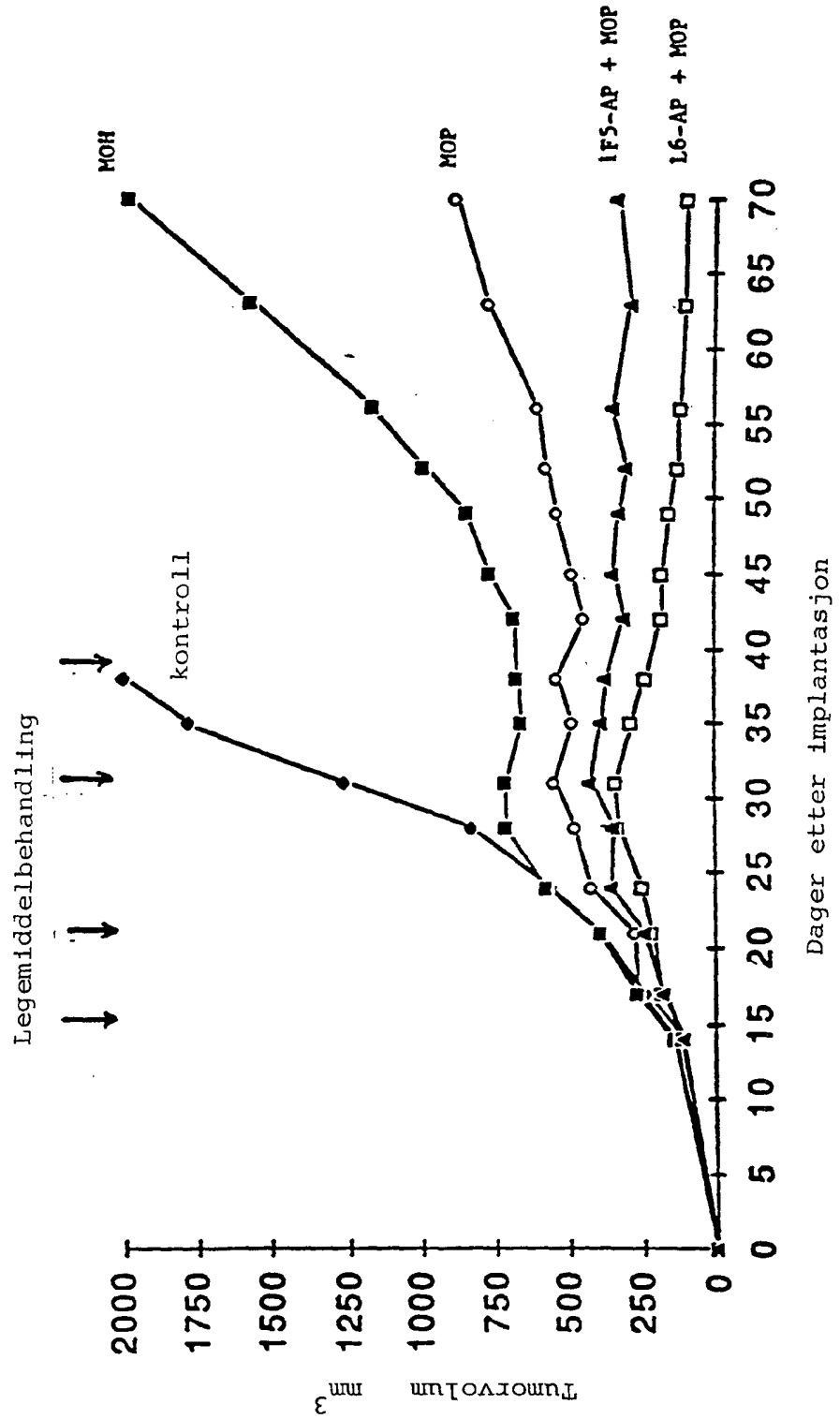
Figur 16



Figur 17

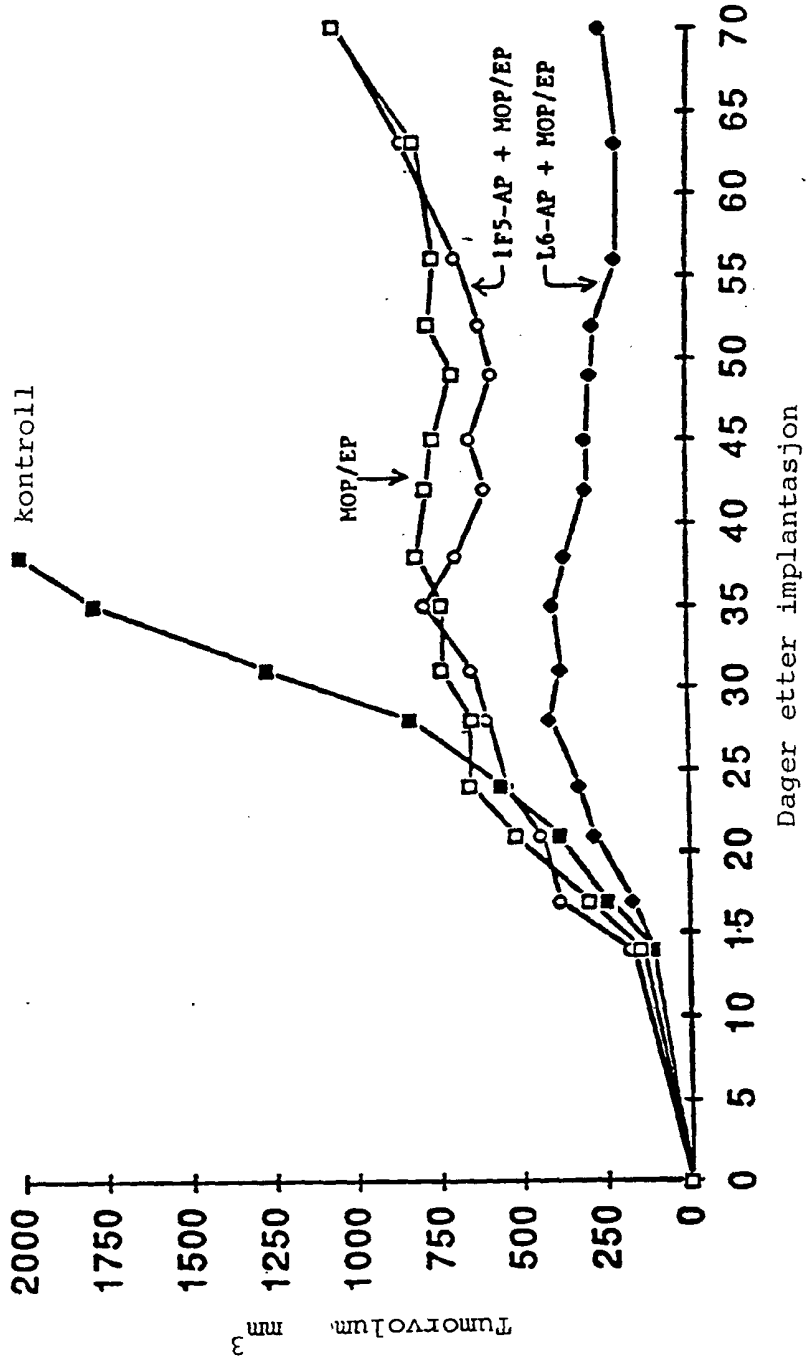
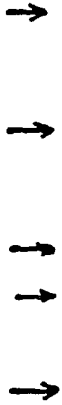


Figur 18

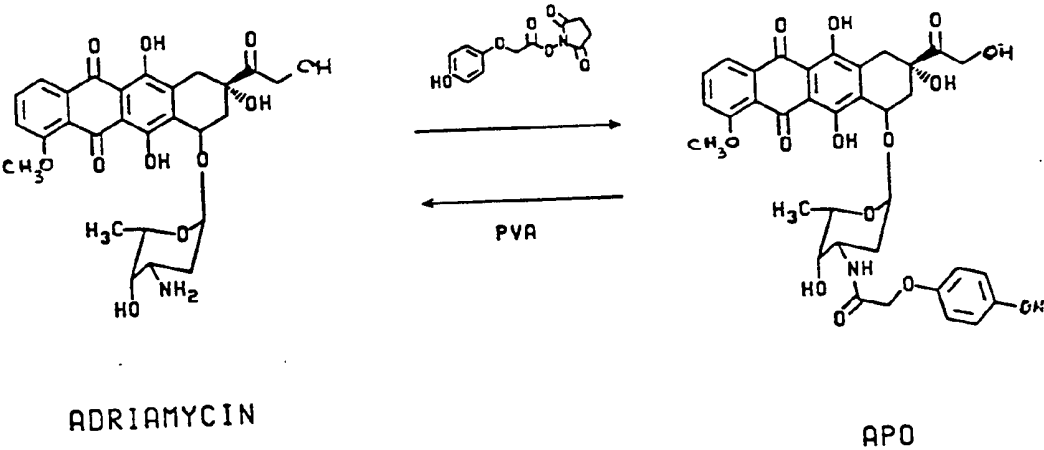


Figur 19

Legemiddelbehandling

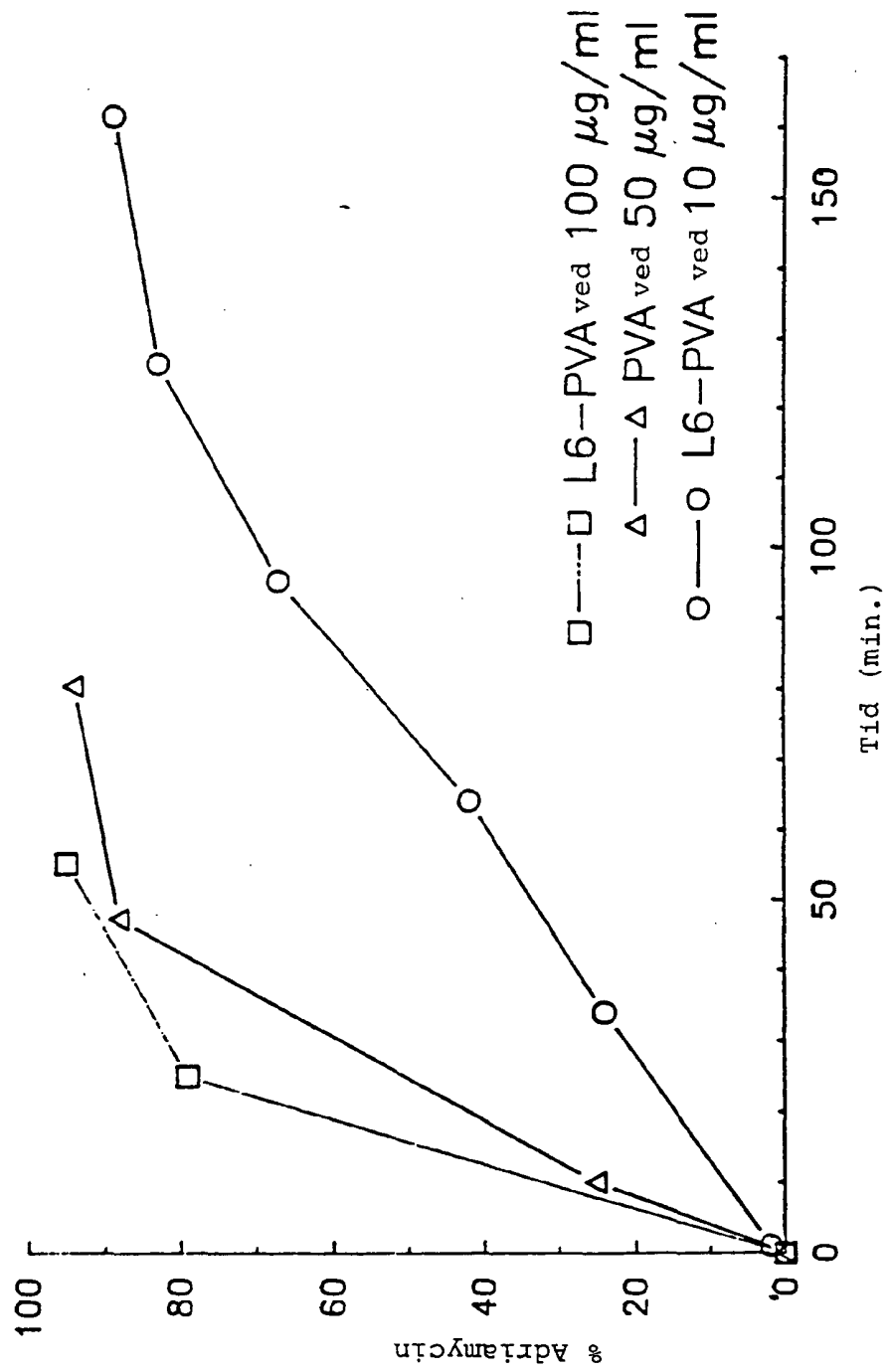


Figur 20

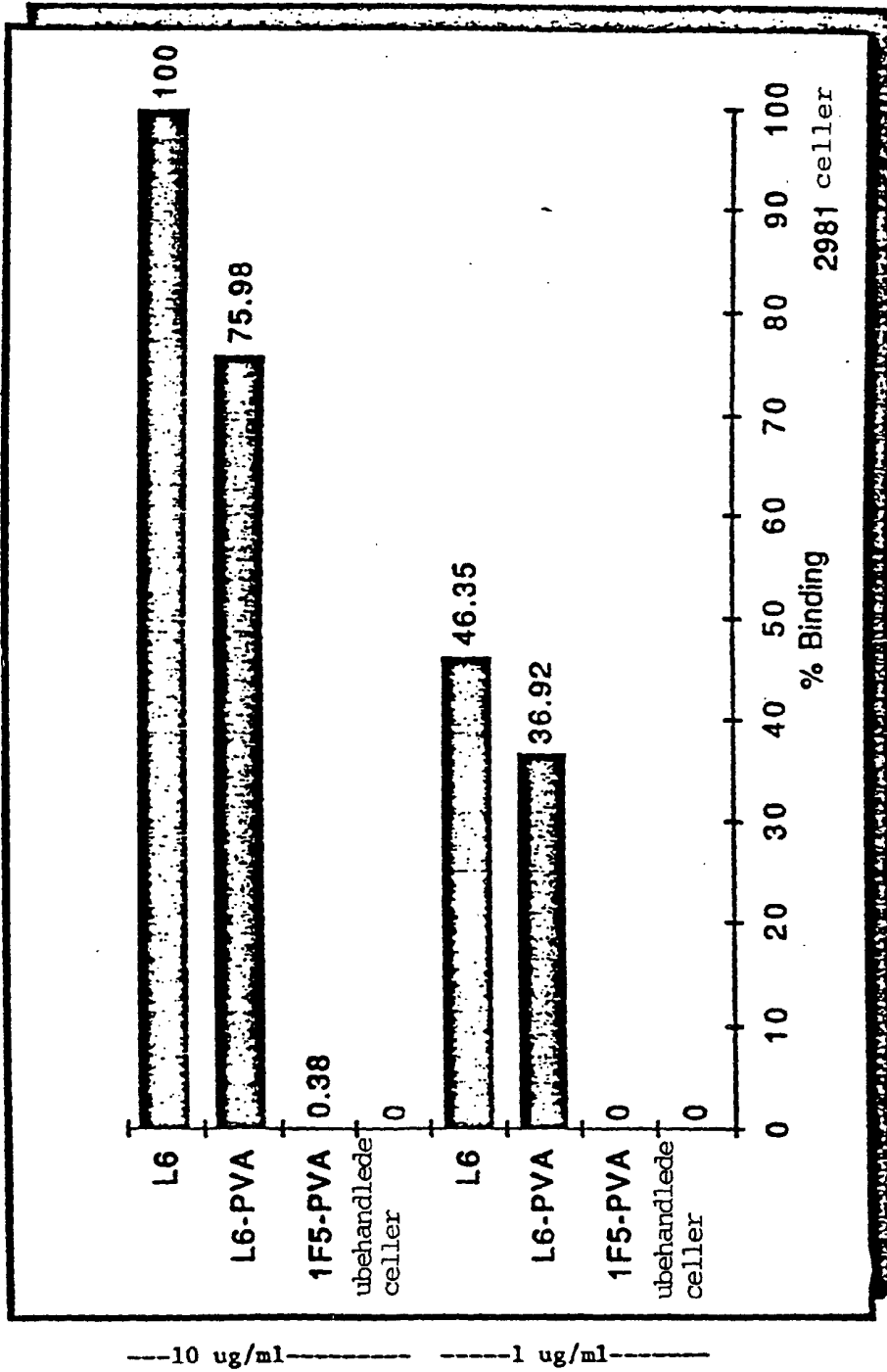


Figur 21

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

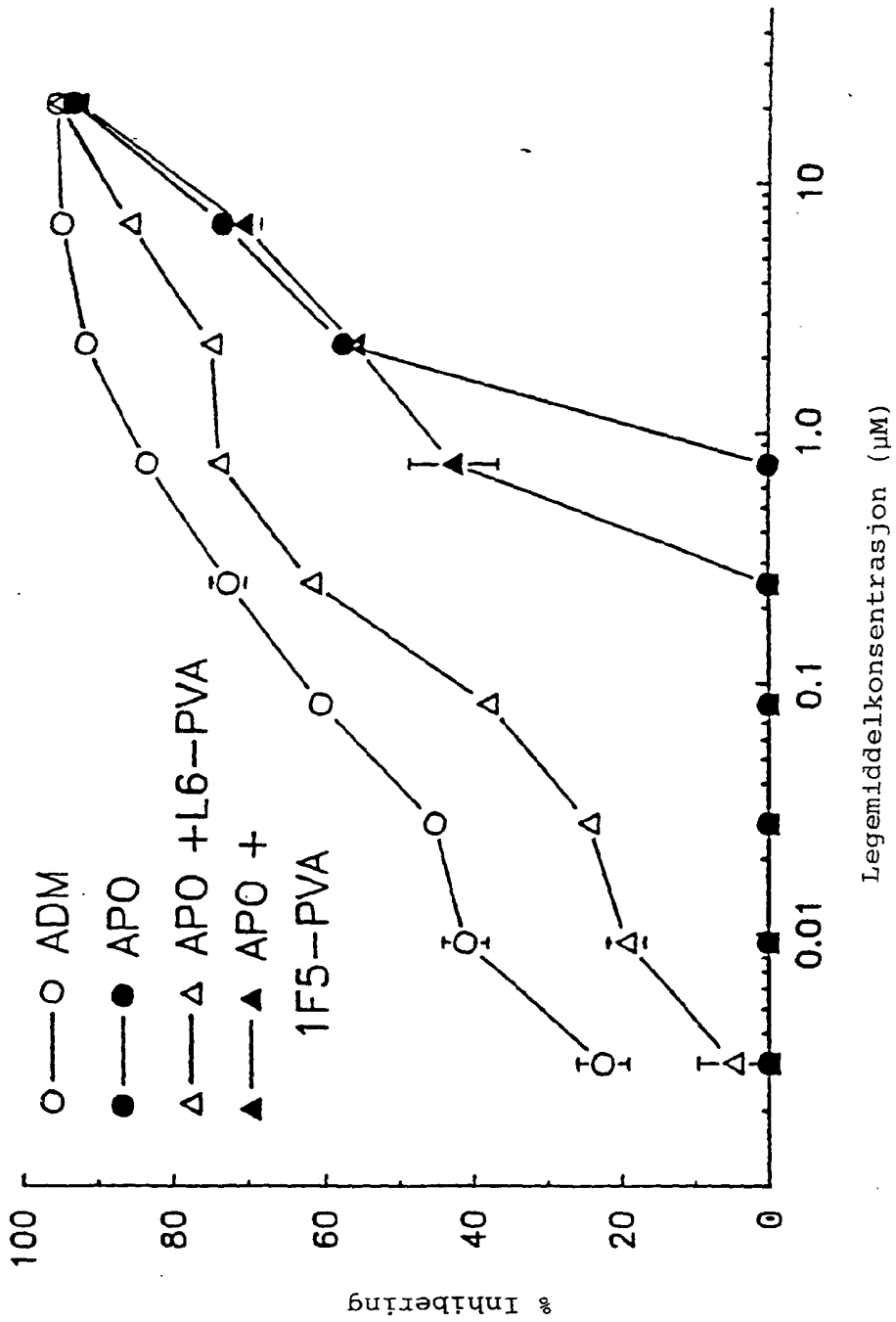


Figur 22

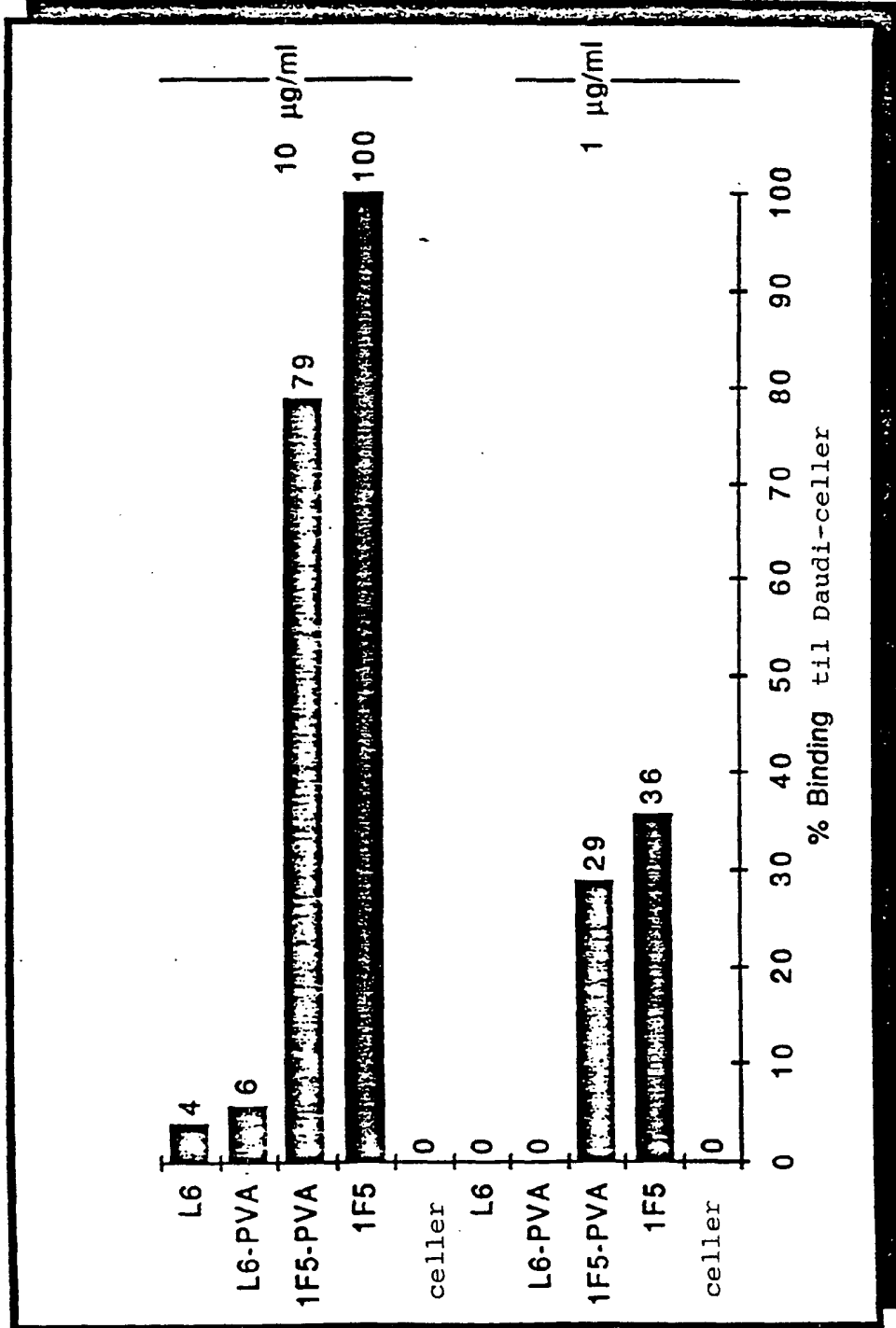


Figur 23

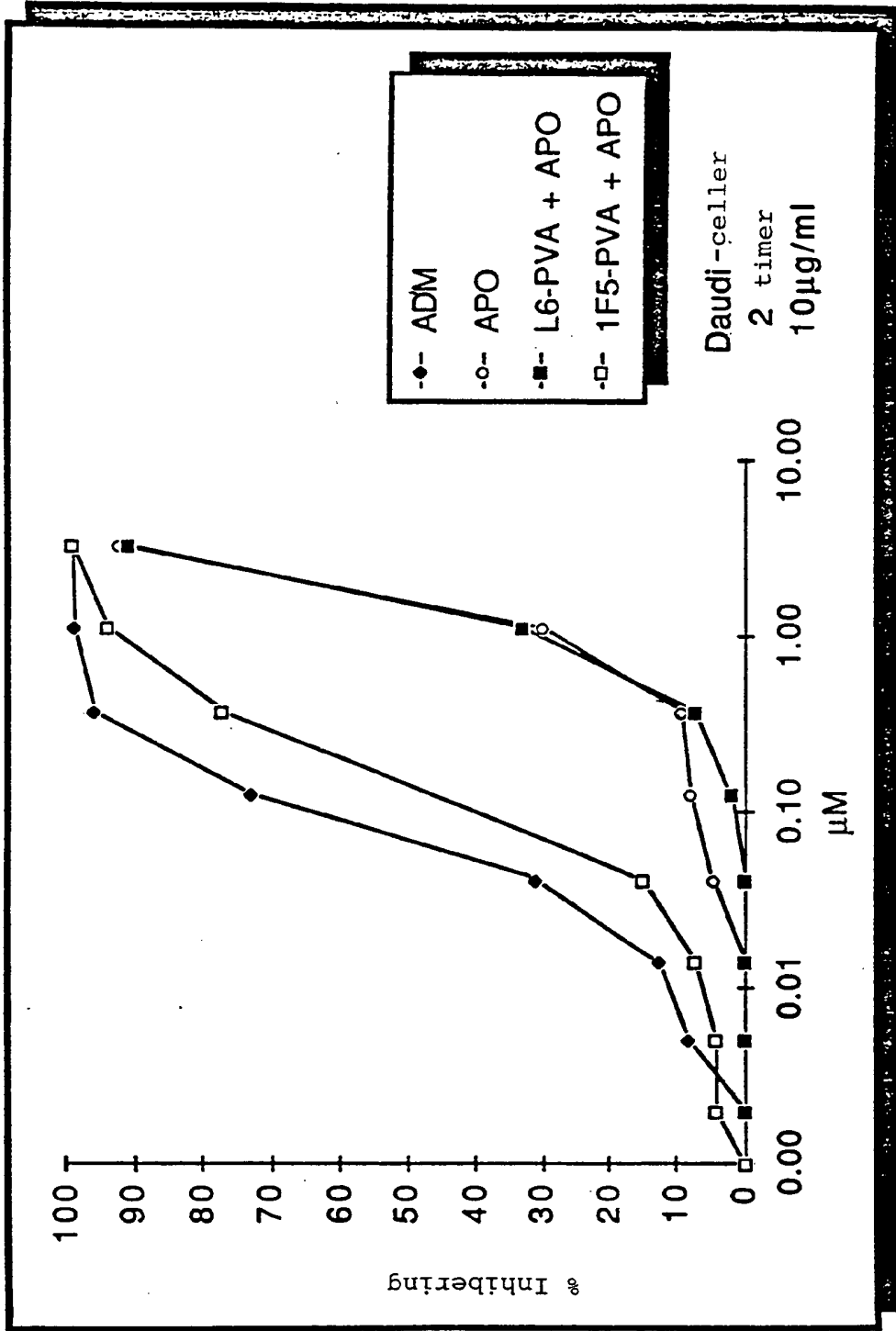
Inhibering av 2981 celler med ADM, APO og APO + PVA-konjugater



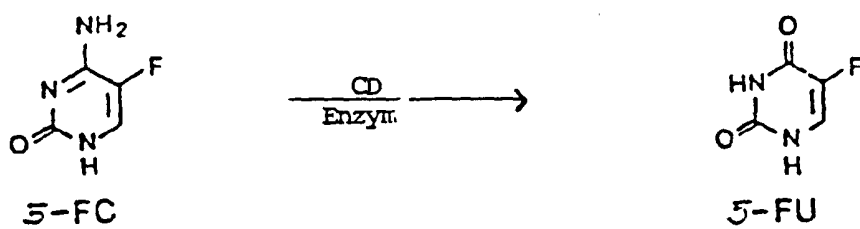
Figur 24



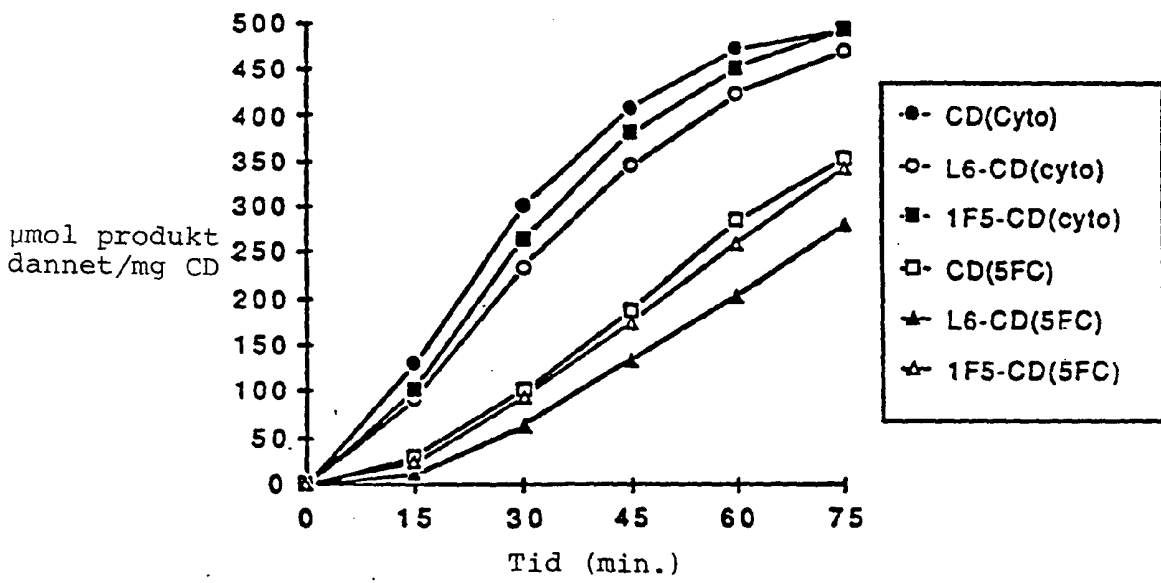
Figur 25



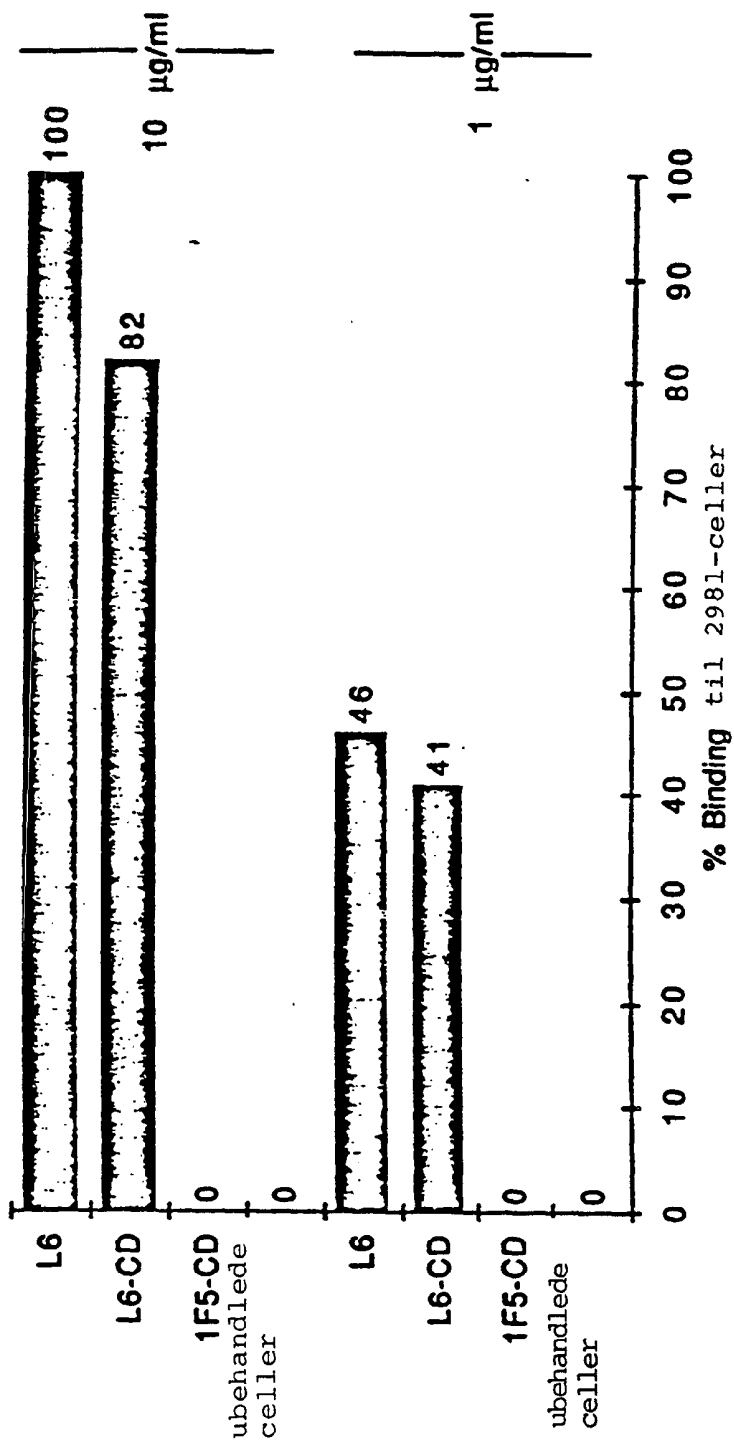
Figur 26



Figur 27



Figur 28



Figur 29

