



C (15) Patenttihakemus
Patent published 11 03 1980

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

A 61K 39/395, C 07D 519/04

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	841260
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	29.03.84
(24) Alkuperä - Löpnummer	29.03.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	01.10.84
(44) Nähtäväksiannon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	28.02.90
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
30.03.83 GB 8308857	

(71) Hakija - Sökande

1. Lilly Industries Limited, Lilly House, Hanover Square, London, United Kingdom, (GB)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Cullinan, George Joseph, R.T.1, Box 124B, Trafalgar, Ind., USA, (US)
2. Rowland, George Ferdinand, 55 Dukes Wood Drive, Gerrards Cross, Buckinghamshire, United Kingdom, (GB)
3. Simmonds, Robin George, 36, Oaklands Drive, Wokingham, Berkshire, United Kingdom, (GB)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten immunoglobuliinikonjugaattien valmistamiseksi
Förfarande för framställning av ett terapeutiskt användbart immunoglobulinkonjugat

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 820020 (A 61 K 39/395),
Chemical Abstracts vol. 96 (1982) 45940e, Chemical Abstracts vol. 98 (1983) 154983h,
Chemical Abstracts vol. 98 (1983) 172695v

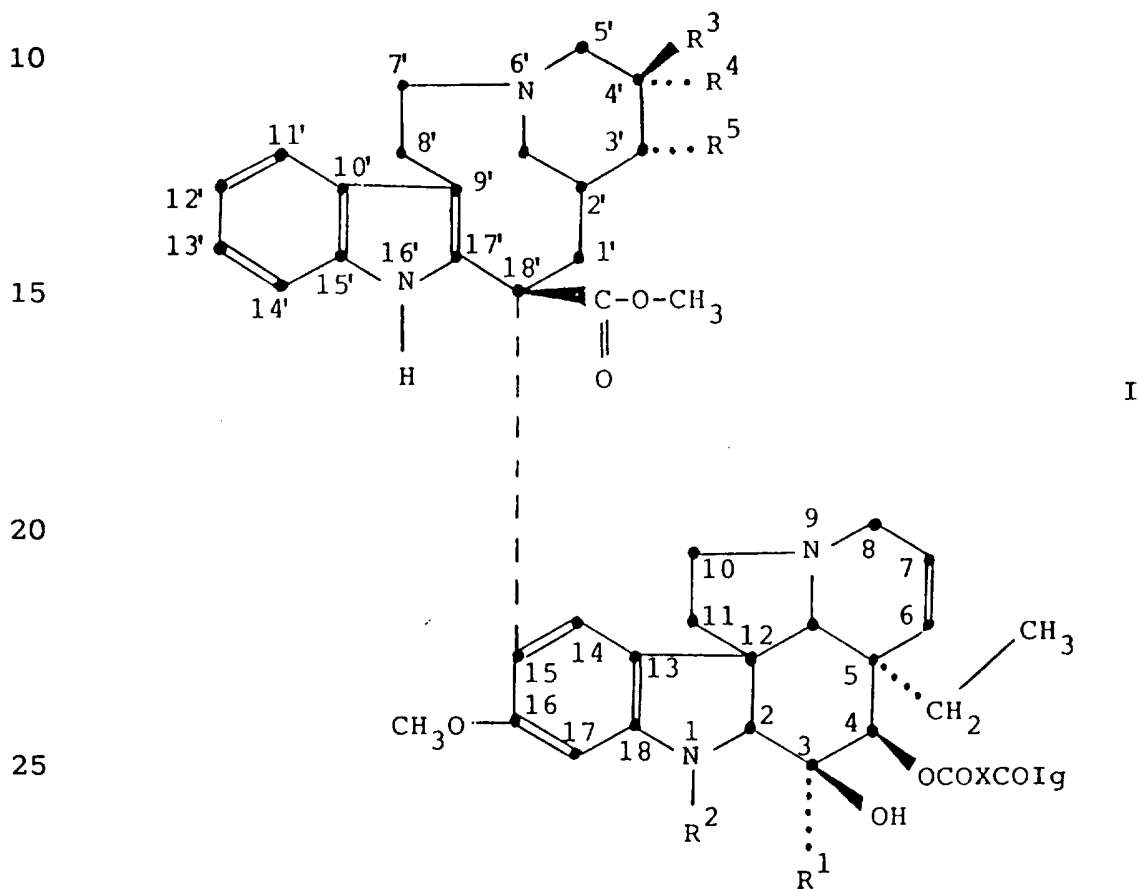
(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee immunoglobuliinikonjugaattia, joka sisältää Vinca-alkaloidiosan, joka on liittynyt kovalenttisesti 4-aseman kautta kaavan -OCOXCO-, jossa X on yksinkertainen kemiallinen sidos tai, mahdollisesti substituoitu, 1 - 10 hiiliatomia sisältävä ketju, mukaisen ryhmän välityksellä immunoglobuliiniin tai immunoglobuliinifragmenttiin, sekä sen valmistusta.
Kyseiset konjugaatit ovat käyttökelpoisia syövän hoidossa.

Uppfinningen hänför sig till ett immunoglobulinkonjugat, vilket innehåller en Vinca-alkaloiddel som kovalent i 4-ställningen bundits via en grupp med formeln -OCOXCO-, vari X betecknar en kemisk enkelbindning eller en eventuellt substituerad C₁₋₁₀-kedja, vid ett immunoglobulin eller ett immunoglobulinfragment, samt till framställningen av detsamma. Ifrågasvarande konjugat är användbara vid behandlingen av cancer.

Menetelmä terapeutisesti käyttökelpoisten immunoglobuliinikonjugaattien valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee menetelmää terapeutisesti käyttökelpoisen konjugaatin valmistamiseksi, joka sisältää Vinca-alkaloidiosan, joka on kovalenttisesti liittynyt immunoglobuliiniin tai immunoglobuliinifragmenttiin, ja jolla on kaava I



jossa Ig merkitsee immunoglobuliinia tai immunoglobuliinifragmenttia, johon on liittynyt yksi tai useampi Vinca-alkaloidiryhmä; ja X on suoraketjuinen C_{1-4} -alkyleeni; R^1 on $COOC_{1-3}$ -alkyyli tai $CONH_2$; R^2 on CH_3 tai CHO ; ja käsiteltäessä R^4 ja R^5 erillisinä, R^5 on H, R^4 on etyyli ja R^3 on H tai OH; ja käsiteltäessä R^4 ja R^5 yhdessä niiden hiiliatomien kanssa, joihin ne ovat sitoutuneet, ne muo-

dostavat oksiraanirenkaan ja R³ on etyyli. Uusilla immuno-
globuliinikonjugaateilla on farmaseuttisia ominaisuuksia
ja erityisesti sytostaattista aktiivisuutta.

Eräs ryhmä yhdisteitä, jotka ovat sytostaattisia
5 ja laajasti käytettyjä syövän hoidossa, ovat Vinca-suvun
kasveista saatavat indoli-dihydroindolialkaloidit sekä
niistä valmistetut lääkkeaineet. Näiden lääkkeiden kemote-
rapeuttisen käytön tehokkuutta rajoittavat potilaassa il-
menevät haitalliset sivuvaikutukset, ja näiden vaikutusten
10 minimoimista on paljon tutkittu. Esimerkiksi GB-patentti-
julkaisussa 2 090 837 kuvataan vindesiinin, joka on yksi
niistä Vinca-alkaloidilääkkeaineista, joihin edellä viitat-
tiin, immunoglobuliinin kanssa muodostamaa konjugaattia,
jossa vindesiiniosa on liittynyt suoraan vindesiinimole-
15 kyylin 3-aseman kautta. Koska immunoglobuliini on vasta-
aine, konjugaatti kerääntyy vaikutuskohtaan vähentäen myr-
kyllistä vaikutusta muihin kudoksiin ja mahdollisesti vä-
hentäen potilaassa ilmeneviä haitallisia sivuvaikutuksia.

Uusi konjugaatti on Vinca-alkaloidin, kuten esimer-
20 kiksi kasvaimia vastaan vaikuttavan dimeerisen 4-asetoksi-
tai 4-hydroksi(indoli-dihydroindoli)alkaloidin, johdannai-
nen ja immunoglobuliiniosaan voi olla kovalenttisesti
liittyneenä yksi tai useampia sellaisia Vinca-alkaloidi-
osia.

25 Immunoglobuliini tai immunoglobuliinifragmentti on
vasta-aine tai vasta-ainefragmentti, jolla on antigeenia
tunnistavat ominaisuudet. Edullinen immunoglobuliinimate-
riaali on vasta-aine tai vasta-ainefragmentti, joka sovel-
tuu ihmiskehossa esiintyvien ei-toivottujen solujen pin-
30 nalla olevien antigeenien tunnistamiseen. Myös toisenlai-
set immunoglobuliinimateriaalit voivat tulla kysymykseen,
koska niillä saattaa olla käyttöä eläinten hoidossa ja
vertailukokeissa sekä varsinaisissa kokeissa.

Uudet konjugaatit ovat käyttökelpoisia muun muassa syöpien hoidossa. Ne voivat olla tehokkaampia ja niillä on vähemmän sivuvaikutuksia, koska ne kykenevät lisäämään sytotoksisen lääkeaineen pitoisuutta vaikutuskohdassa.

- 5 Lääkeaineosan sitoutuminen "väliryhmän" -OCOXCO- välityksellä tekee usein mahdolliseksi suuremman lääkeainemäärän liittämisen tuotettavaan immunoglobuliinin ja voi siten lisätä konjugaatin tehokkuutta. Konjugaatit soveltuvat myös käytettäväksi epäsuorissa menetelmissä, joissa niitä
10 käytetään solun pinnan antigeeneille spesifisten vasta-aineiden tunnistamiseen.

Immunoglobuliini tai immunoglobuliinifragmentti voidaan muuntaa yhtä tai useampaa esitettyä Vinca-alkaloidiryhmää käyttäen.

- 15 Jotkut tunnetuista Vinca-alkaloideista, joista edellä mainittuja konjugaatteja valmistetaan, sisältävät esimerkiksi edellä esitetyn kaavan I mukaisen Vinca-alkaloidiosan, jossa 4-asema on eri tavoin substituoitu, kuten esimerkiksi:

- 20 vinblastiini, jossa R^1 on COOCH_3 , R^2 on metyyli, R^3 on hydroksyyli, R^4 on etyyli, R^5 on vety ja substituenttina 4-asemassa on asetoksi;

- vindesiini, jossa R^1 on CONH_2 , R^2 on metyyli, R^3 on hydroksyyli, R^4 on etyyli, R^5 on vety ja substituenttina 4-
25 asemassa on -OH;

- vinkristiini, jossa R^1 on COOCH_3 , R^2 on formyyl, R^3 on hydroksyyli, R^4 on etyyli, R^5 on vety ja substituenttina 4-
asemassa on asetoksi;

- leurosidiini, jossa R^1 on COOCH_3 , R^2 on metyyli, R^3 on etyyli, R^4 on hydroksyyli, R^5 on vety ja substituenttina
30 4-asemassa on asetoksi;

VLB "A" (4'-deoksivinblastiini), jossa R^1 on COOCH_3 , R^2 on metyyli, R^3 ja R^5 ovat vetyjä, R^4 on etyyli ja substituenttina 4-asemassa on asetoksi;

VLB "B" (4'-deoksileurosiidiini), jossa R^1 on COOCH_3 , R^2 on metyyli, R^3 on etyyli, R^4 ja R^5 ovat vetyjä ja substituenttina 4-asemassa on asetoksi;

leurosiini, jossa R^1 on COOCH_3 , R^2 on metyyli, R^3 on etyyli, R^4 ja R^5 muodostavat yhdessä α -epoksidirenkaan (oksi-
5 raanirenkaan) ja substituenttina 4-asemassa on asetoksi;
ja

leuroformiini (N-formyyllileurosiini), jossa R^1 on COOCH_3 , R^2 on formyyli, R^3 on etyyli, R^4 ja R^5 muodostavat yhdessä
10 α -epoksidirenkaan ja substituenttina 4-asemassa on asetoksi.

4-desasetyylijohdannaisten kanta-alkaloideja koskevat kirjallisuusviitteet ovat seuraavat:

leurosiini - US-patenttijulkaisu 3 370 057;

15 VBL - US-patenttijulkaisu 3 097 137;

leurosidiini (vinrosidiini) ja leurokristiini (vinkristiini) - molempia käsittelee US-patenttijulkaisu 3 205 220;

desmetyyli-VLB - US-patenttijulkaisu 3 354 163;

vindesiini ja muut 3-karboksamidit - US-patenttijulkaisu
20 4 203 898;

vinblastiinihappo, vinkristiinihappo jne. - US-patenttijulkaisu 4 102 390;

4'-epivinkristiini - US-patenttijulkaisu 4 143 041;

leuroformiini, formyyllileurosiini - US-patenttijulkaisu
25 4 279 816; ja

deoksi-VLB "A" sekä "B" - Tetrahedron Letters 1958, 783.

Muita Vinca-alkaloideja kuvataan US-patenttijulkaisuissa
4 166 810 ja RE 30 560.

Esimerkkejä niistä ryhmistä, joita X voi merkitä,
30 ovat metyleeni, etyleeni, propyleeni, butyleeni ja 1,2-dimetyylietyleeni ja vastaavat.

Tuhottavien solujen pinnan antigeeneille spesifiset immunoglobuliinit ja menettelytavat niiden tuottamiseksi
immunisoitujen eläinten seerumista tai viljelemällä mono-
35 klonaalisia tuotteita erittäviä hybridoomia ovat tunnet-

tuja. Tyypiltään edullinen vasta-aine tämän keksinnön mukaisesti käytettäväksi on IgG-ryhmän immunoglobuliini. Joitakin tyypillisiä immunoglobuliineja ovat seuraavat:

5 (i) ihmisen tai eläinten kasvaimiin liittyvien antigeenien monoklonaaliset tai polyklonaaliset vasta-aineet,

(ii) ihmisen B- tai T-soluantigeenien monoklonaaliset tai polyklonaaliset vasta-aineet,

10 (iii) ihmisen Ia-antigeenien monoklonaaliset tai polyklonaaliset vasta-aineet,

(iv) virus-, sieni- ja bakteeriantigeenien monoklonaaliset tai polyklonaaliset vasta-aineet, ja

15 (v) ihmisen tulehdusreaktioihin tai allergisiin reaktioihin liittyvien solujen monoklonaaliset tai polyklonaaliset vasta-aineet.

Ihmisten tai eläinten kasvaimiin liittyvien antigeenien vasta-aineista voidaan mainita

(i) karsinoembryanaalisella antigeenillä immunisoiduista vuohista tai lampaista eristetty Ig,

20 (ii) epäakuuttia varhaisimusoluleukemiaa sairastavan kaniinin seerumista eristetty IG,

(iii) erilaisten kädellisten antiseerumista, joka on muodostunut akuuttia varhaisydinsoluleukemiaa, kroonista varhaisimusoluleukemiaa ja kroonista jyvässoluleukemiaa vastaan, eristetty Ig,

25 (iv) keuhkokarsinoomamateriaalilla immunisoiduista vuohista tai lampaista eristetty Ig,

30 (v) ihmisen paksusuolen ja peräsuolen syövän vastaaineita erittävistä hiiren hybridoomista peräisin oleva monoklonaalinen Ig,

(vi) ihmisen melanooman vastaaineita erittävistä hiiren hybridoomista peräisin oleva monoklonaalinen IG,

35 (vii) ihmisen leukemiasolujen kanssa reagoivia vastaaineita erittävistä hiiren hybridoomista peräisin oleva monoklonaalinen Ig,

(viii) ihmisen varhaishermosolukasvainsolujen kanssa reagoivia vasta-aineita erittävistä hiiren hybridoomista peräisin oleva monoklonaalinen Ig,

5 (ix) ihmisen rintasyöpäantigeenien kanssa reagoivia vasta-aineita erittävistä hiiren hybridoomista peräisin oleva monoklonaalinen Ig,

(x) ihmisen munasarjasyöpäsolujen kanssa reagoivia vasta-aineita erittävistä hiiren hybridoomista peräisin oleva monoklonaalinen Ig,

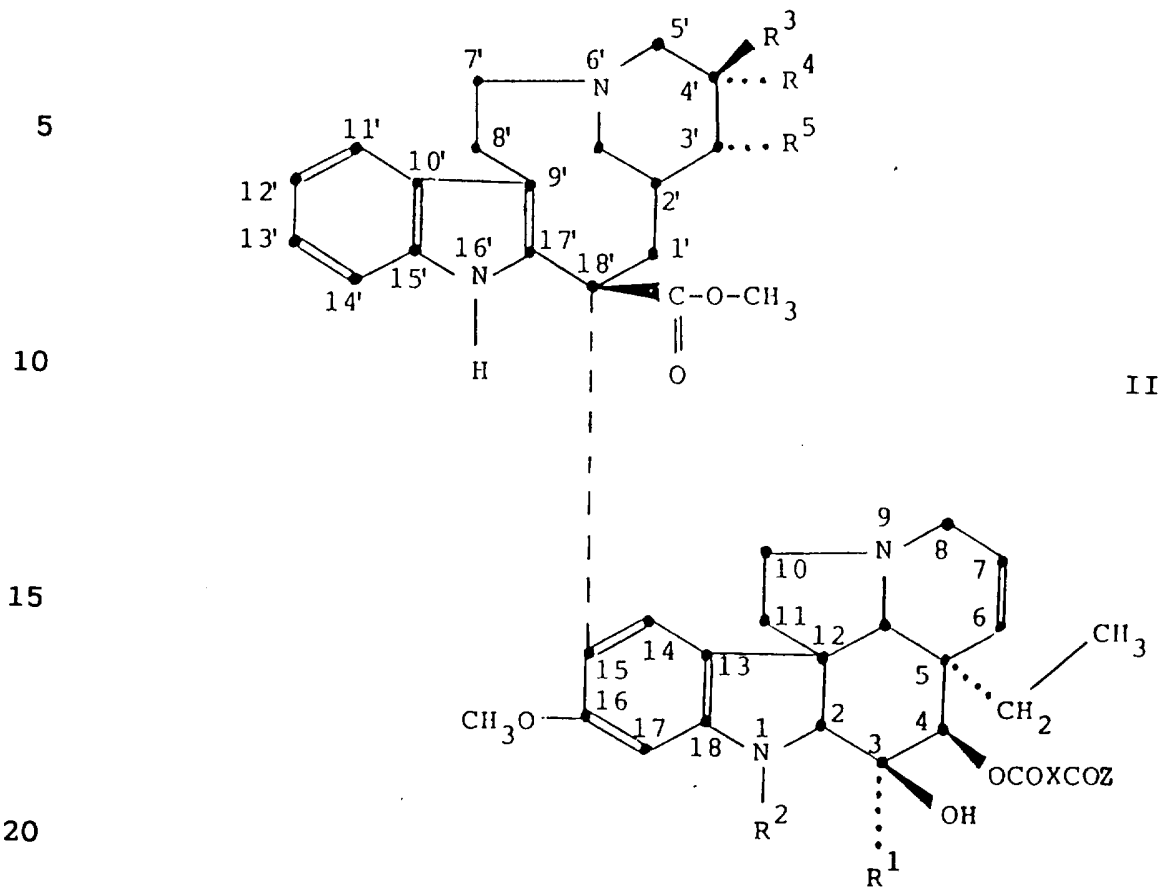
10 (xi) ihmisen luusarkoomasolujen kanssa reagoivia vasta-aineita erittävistä hiiren hybridoomista peräisin oleva monoklonaalinen Ig, ja

(xii) keuhkokarsinooman vasta-aineita erittävistä hiiren hybridoomista peräisin oleva monoklonaalinen Ig.

15 Kuten edellä on mainittu, konjugaatti voidaan valmistaa myös käyttäen immunoglobuliinifragmentteja, joista käytetään merkintöjä Fab, Fab' tai $F(ab')_2$, tai IgM-mono-meeria, joita saadaan vasta-aineesta esimerkiksi proteolyyttisellä entsyymillä hajottamalla. Kyseiset aineet ja
20 valmistusmenetelmät ovat tunnettuja, ja voidaan mainita, että edullisia proteolyyttisiä entsyymejä ovat pepsiini ja papaiini.

Edullisia keksinnön mukaisesti valmistettuja konjugaatteja ovat konjugaatit, joilla on edellä esitetty
25 kaava I, jossa R^1 on COOMe tai $CONH_2$, R^3 on hydroksyyli, R^4 on etyyli ja R^5 on vety; erityisesti konjugaatit, joita saadaan desasetyylivinblastiinista ja vindesiinistä. Ig on edullisesti ihmisen tai eläimen kasvaintigeenin monoklonaalinen vasta-aine.

30 Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että saatetaan immunoglobuliini tai immunoglobuliinifragmentti reagoimaan puolihappojohdannaisen kanssa, jolla on kaava



jossa X, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 ja R^5 merkitsevät samaa kuin kaavassa I edellä ja Z on irtoava ryhmä, joka on atsid-
 (-N₃)-ryhmä, halogeeniatomi, asyylioksi-ryhmä, jolla on
 kaava $R^7.CO.O$, jossa R^7 on alifaattinen tai aromaattinen
 ryhmä, alkoksi- tai aryylioksi-ryhmä, metaanisulfonyyliok-
 si-, tosyloksi- tai bentseenisulfonyylioksi-ryhmä, imidat-
 soylliradikaali tai N-asyylihydroksyyliamiiniryhmä.

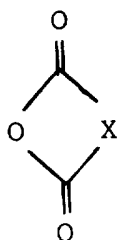
Irtoava ryhmä Z on siis peptidikemiassa yleisesti
 käytetty ryhmä kovalenttisen amidisidoksen (-CONH) muodos-
 tamiseen konjugaatin ja immunoglobuliinimolekyylissä tai
 -fragmentissa olevan vapaan aminoryhmän välille. Z:n kal-
 taiset ryhmät ovat tunnettuja tällä alalla, ja niitä käsi-
 tellään esimerkiksi teoksessa M. Bodanszky, Y. S. Klauser

ja M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, 2. painos, John Wiley & Sons, 1976, erityisesti sivuilla 85 - 136. Mainittakoon, että X:n merkityksistä halogeeniatomi voi olla esimerkiksi bromi ja erityisesti kloori, R' on esimerkiksi C₁₋₃-alkyyli, alkoksiryhmä on edullisesti C₁₋₃-alkoksi, tai Z on esimerkiksi sukkinimidoksi, ftalimidoksi tai bentsotriatsolyylioksi. Edullisia esimerkkejä ovat yhdisteet, joissa Z on N-asyylihydroksyyliamiiniryhmä, esimerkiksi N-hydroksisukkinimidiesterit, joita valmistetaan käyttämällä 1-sykloheksyyli-3-(2-morfoliinietyyli)karbodi-imidi(meto-p-tolueenisulfonaattia) tai 1,3-disykloheksyylikarbodi-imidiä tai seka-anhydridin kautta, kuten isobutyrylikloori-formiaattia käytettäessä saatavan seka-anhydridin kautta. Kun Z on imidatsoyyliryhmä, se voidaan muodostaa käyttämällä karbonyylidi-imidatsolia, ja kun Z on R'CO-O, jossa R' on C₁₋₃-alkyyli, erityisesti etyyli tai isobutyryli, se voidaan valmistaa käyttämällä vastaavasti 1-etoksikarbonyyli-2-etoksi-1,2-dihydrokinoliinia tai isobutyrylikloori-formiaattia.

Yhdisteitä, joilla on kaava II, valmistetaan antamalla vastaavan, edellä mainitun kaavan II mukaisen vapaan hapon, jossa Z on OH, reagoida sopivan aktivoivan yhdisteen kanssa inertissä liuottimessa, kuten esimerkiksi dietyyliformamidissa, ja edullisesti -20...+75°C:n lämpötilassa. Vapaat hapot (Z on OH) valmistetaan seuraavilla menetelmillä.

Ensin valmistetaan soveltuva 4-desasetyyli(indoli-dihydroindoli) esimerkiksi Hargove'n menettelytapaa käyttäen (US-patenttijulkaisu 3 392 173).

4-desasetyyliyhdiste asyloidaan sen jälkeen karboksyylihappoanhydridillä, jonka kaava on



jossa X:llä on aikaisemmin ilmoitettu merkitys.

Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää asyloivaa yhdistettä, jonka kaava on $Z^1\text{COXCOZ}^2$, jossa Z^1 on aktivoiva ryhmä ja Z^2 on karboksyyli­ryhmän suojaryhmä, ja poistaa karboksyyli­ryhmää suojaava ryhmä, jolloin saadaan kaavan II mukainen yhdiste, jossa Z on OH. Sellaiset yhdisteet muutetaan sitten aktiivisiksi yhdisteiksi reaktiolla sopivan aktivoivan yhdisteen kanssa.

Kun indoli-dihydroindolin on määrä reagoida meripihkahappoanhydridin tai vastaavan kanssa, jotta saadaan kaavan II mukainen yhdiste, jossa R^1 on COOH, sekä asemassa C-3 että asemassa C-4 oleva esteriryhmä on hydrolysoitava ensin, jolloin saadaan esimerkiksi VLB:stä 4-desasetyyli­vinblastiinihappo (US-patenttijulkaisu 4 012 190). Seuraavaksi asemassa C-3 oleva karboksyyli­ryhmä on suojattava jollakin karboksyyli­ryhmän suojaryhmällä, joita on mainittu edellä. Tämän johdannaisen, jonka C-3-karboksyyli­ryhmä on suojattu ja joka sisältää asemassa C-4 vapaan hydroksyylin, annetaan sitten reagoida edellä esitetyllä tavalla anhydridin kanssa. Syntyvä yhdiste voidaan sen jälkeen käsitellä kemiallisesti siten, että saadaan kaavan II mukaisia yhdisteitä, joissa Z on aktivoiva ryhmä, kunhan reaktio-olosuhteet ovat neutraalit tai emäksiset, jotta C-3-karboksyyli­ryhmää suojaavan ryhmän irtoaminen vältetään. Sen jälkeen kun haluttu pääteryhmä Z on paikallaan, C-3-karboksyyli­ryhmää suojaava ryhmä poistetaan, jolloin saadaan kaavan II mukaisia yhdisteitä, joissa R^1 on COOH.

Immunoglobuliinin tai immunoglobuliinifragmentin reaktio kaavan II mukaisen yhdisteen kanssa toteutetaan edullisesti vettä sisältävässä väliaineessa 5 - 25°C:n lämpötilassa, pH:n ollessa 7,5 - 9,5, edullisesti 8,0-9,0. Prosessin tuloksena yksi tai useampia Vinca-alkaloidiryhmiä liittyy kovalenttisella sidoksella immunoglobuliinimolekyylin vapaisiin aminoryhmiin, esimerkiksi lysii-

nitähteen aminoryhmiin. Sitoutuvien ryhmien lukumäärä mää-
räytyy reagoivien aineiden pitoisuuden ja reaktion keston
mukaan, mutta keskimääräinen lukumäärä on tavallisesti
esimerkiksi yhdestä tai kolmesta 14:ta tai 20:een.

5 Esimerkiksi, reaktioita toteutettaessa lisätään
liuos, joka sisältää kaavan II mukaista yhdistettä sopi-
vassa liuottimessa, kuten dimetyyliformamidissa, hitaasti
pisaroittain puskuroituun liuokseen, joka sisältää immuno-
globuliinia esimerkiksi 0,34 M boraattipuskurissa (pH
10 8,6). Konjugaatti eristetään geelisuodatuksella, ja sitä
säilytetään kyllästetyssä ammoniumsulfaattiliuoksessa,
josta se saadaan helposti takaisin liuosmuotoon dialysoi-
malla käyttäen puskuriliuosta, esimerkiksi fosfaattipus-
kuroitua suolaliuosta, jonka pH on 7,4, tai sitä voidaan
15 vaihtoehtoisesti säilyttää jääkaapissa 4°C:ssa tai jäähdy-
tettynä, esimerkiksi -20°C:ssa.

Konjugaatin arviointi voidaan suorittaa tunnettuja
menettelytapoja, kuten affiniteettikromatografiaa käyt-
tään. Konjugaatin tehokkuutta voidaan arvioida laskemalla
20 elävien solujen lukumäärä sen jälkeen, kun kasvainsolus-
pensio on käsitelty konjugaatilla, tai tritium-merkityn
uridiinin soluihin ottamista koskevien mittausten perus-
teella. Proteiini- ja lääkeainepitoisuudet määritetään
mittaamalla konjugaattiliuosten optiset tiheydet kahdella
25 aallonpituudella, esimerkiksi aallonpituuksilla 270 ja 280
nm, ja korreloimalla saadut arvot samoja aallonpituuksia
käyttäen saatuihin vapaan lääkeaineen ja konjugoimattoman
immunoglobuliinin arvoihin.

Uudet keksinnön mukaisesti valmistetut konjugaatit
30 ovat käyttökelpoisia syöpien hoidossa, ja sellaisina niitä
valmistetaan edullisesti ruiskeina annettaviksi soveltu-
vissa valmisteissa käytettäviksi. Farmaseuttinen valmiste,
esimerkiksi ruiskeina annettava valmiste sisältää keksin-
nön mukaista konjugaattia yhdistettynä alalla tunnettuun,
35 farmaseuttisesti hyväksyttävään kantaja- tai laimennusai-

neeseen. Se on edullisesti yksikköannosmuodossa, jokaisen annoksen sisältäessä esimerkiksi 0,01 - 2 mg vaikuttavaa aineosaa (joka määrä tarkoittaa Vinca-lääkeaineosien määrää).

- 5 Uudet konjugaatit ovat tehokkaita suuresti vaihtelevilla annoksilla ja esimerkiksi aikuisia ihmisiä hoidettaessa normaaliannos viikossa on 1 - 10 mg/kg (Vinca-lääkeaineosaa), vielä tavallisemmin 3 - 9 mg/kg. Tulee kuitenkin ymmärtää, että käytännössä annettavan yhdisteen
10 määrän määrää hoitava lääkäri asiaan vaikuttavien seikkojen, muun muassa hoidettavan potilaan tilan ja käytettävän antotien perusteella.

Keksintöä valaistaan seuraavin valmistusmenetelmin ja esimerkein.

- 15 Valmistusmenetelmä 1

4-sukkinoyyli(desasetyylivinblastiini)

- 2 g 4-desasetyylivinblastiinia liuotettiin pyridiiniin ja tähän liuokseen lisättiin 2 g meripihkahappoanhydridiä. Reaktioseosta sekoitettiin ympäristön lämpötilassa
20 5 tuntia. (Lämpötila-alue 0 - 50°C on käyttökelpoinen tässä reaktiossa.) Haihtuvat aineosat poistettiin haihduttamalla alipaineessa ja jäännökseen lisättiin CH_2Cl_2 :a. CH_2Cl_2 -kerros pestiin natriumvetykarbonaatin 5-%:isella vesiliuoksella ja sen jälkeen vedellä. Orgaaninen kerros
25 kuivattiin ja liuotin poistettiin siitä alipaineessa, jolloin saatiin 4-sukkinoyyli(desasetyylivinblastiinia).

Edellä esitettyä menettelytapaa käytettiin seuraavien yhdisteiden valmistamiseksi:

- 4-sukkinoyylivindesiini,
30 4-sukkinoyyli(desasetyylivinkristiini) ja
4-sukkinoyyli-4'-epideoksidesasetyylivinblastiini.

Samankaltaista menettelytapaa käytettiin 4-glutarooyyli(desasetyylivinblastiinin) valmistamiseksi käyttäen meripihkahappoanhydridin tilalla glutaarihappoanhydridiä.

Kaikissa edellä mainituissa asylointireaktioissa, mahdollinen sivureaktiona tapahtuva 3-OH-ryhmän asyloitu-
minen voidaan kumota käsittelemällä määrällä silikageelillä
Hargrove'n esittämän menettelyn mukaisesti (US-patentti-
5 julkaisu 3 392 173). Vaihtoehtoisesti yhdisteet voidaan
puhdistaa mahdollisesta 3-asyyli johdannaisesta tai muista
reaktion sivutuotteista kromatografisesti käyttäen taval-
lisesti adsorbenttina silikageeliä ja eluenttina etyyli-
asetaatteja-metanoliseosta.

10 Valmistusmenetelmä 2

Aktivoitu 4-sukkinoyyli(desasetyylinblastiini)

1 g 4-sukkinoyylivindesiiniä sekoitettiin 380
mg:aan N-metyylimorfiinia 20 ml:ssa dikloorimetaania ja
seokseen lisättiin 390 mg isobutyliklooriformiaattia.
15 Reaktioseosta sekoitettiin 0°C:ssa typpikaasukehän alla
noin 45 minuuttia. Lisättiin 795 mg N-hydroksisukkinimidiä
ja reaktioseosta sekoitettiin typen alla ja samalla se-
koittaen noin 45 minuuttia. Reaktioseos jäähdytettiin ja
jäähdytetty seos pestiin deionisoidulla vedellä ja kuivat-
20 tiin välittömästi Na₂SO₄:lla. Kuivausaine erotettiin suo-
dattamalla ja suodos haihdutettiin kuiviin alipaineessa.

Esimerkki 1

Vindesiinisukkinoyyli-kaniinin anti-hiiri-IgG-kon-
jugaatti

25 Liuokseen, joka sisälsi 4-sukkinoyylivindesiiniä
(25 mg) kuivassa dimetyyliformamidissa (DMF; 0,4 ml), li-
sättiin samalla sekoittaen 0,3 ml liuosta, joka sisälsi
N-hydroksisukkinimidiä kuivassa DMF:ssä liuoksen pitoisuu-
den ollessa 11,4 mg/ml, ja sen jälkeen 0,3 ml liuosta,
30 joka sisälsi 1-sykloheksyyli-3-(2-morfoliinietyyli)kar-
bodi-imidi(meto-p-tolueenisulfaattia) kuivassa DMF:ssä
liuoksen pitoisuuden ollessa 41,7 mg/ml. Seosta pidettiin
pimeässä huoneen lämpötilassa 48 tuntia, jolloin saatiin
liuos, joka sisälsi 4-sukkinoyylivindesiinin N-hydroksi-
35 sukkinimidiesteriä (25 mg/ml).

90 µl edellä saatua liuosta lisättiin samalla nopeasti sekoittaen 0,9 ml:aan liuosta, joka sisälsi kaniinin anti-hiiri-IgG:a 0,34 M boraattipuskurissa (pH 8,6) liuoksen pitoisuuden ollessa 10,7 mg/ml. Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 5,5 tuntia, ja tuote eristettiin geelisuodatuksella käyttäen pylvästä, jonka koko oli 1 x 27 cm (21 ml) ja joka sisälsi Bio-Gel[®] P-6:a, joka oli saatettu tasapainotilaan fosfaattipuskuroitua suolaliuosta käyttäen. Pitoisuushuippu kerättiin (4,9 ml) ja siitä määritettiin proteiini ja vindesiini spektroskooppisesti käyttäen aallonpituuksia 270 ja 380 nm. Näin valmistettu konjugaatti sisälsi 7,9 mol vindesiiniä moolia kohden Ig:a.

Esimerkki 2

Vindesiinisukkinoyyli-hiiren monoklonaalinen luusarkooman vasta-aine-konjugaatti

300 µl liuosta, joka sisälsi 4-sukkinoyylivindesiinin N-hydroksisukkinimidiesteriä kuivassa DMF:ssa liuoksen pitoisuuden ollessa 28 mg/ml ja joka oli valmistettu esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, lisättiin samalla nopeasti sekoittaen 1,5 ml:aan liuosta, joka sisälsi hiiren monoklonaalista luusarkooman vasta-ainetta 0,34 M boraattipuskurissa (pH 8,6) liuoksen pitoisuuden ollessa 19,8 mg/ml. Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 4 tuntia, sen jälkeen se sentrifugoitiin kirkkaaksi, ja tuote eristettiin geelisuodattamalla supernatantti käyttäen pylvästä, jonka koko oli 1,5 x 26,5 cm (46,8 ml) ja joka sisälsi Bio-Gel[®] P-6:a, joka oli saatettu tasapainotilaan fosfaattipuskuroitua suolaliuosta käyttäen. Pitoisuushuippu kerättiin (5,52 ml) ja siitä määritettiin vindesiini ja proteiini spektroskooppisesti käyttäen aallonpituuksia 270 ja 280 nm. Näin valmistettu konjugaatti sisälsi 8,7 mol vindesiiniä moolia kohden Ig:a.

Esimerkki 3Vindesiinisukkinoyyli-hiiren monoklonaalinen melanooma-antigeenin vasta-aine-konjugaatti

200 µl liuosta, joka sisälsi 4-sukkinoyylivindesiini-
5 nin N-hydroksisukkinimidiesteriä kuivassa DMF:ssa liuoksen
pitoisuuden ollessa 20 mg/ml, ja joka oli valmistettu esi-
merkissä 1 kuvatulla tavalla, lisättiin samalla nopeasti
sekoittaen 1,0 ml:aan liuosta, joka sisälsi hiiren mono-
klonaalista melanooma-antigeenin vasta-ainetta 0,34 M bo-
10 raattipuskurissa (pH 8,6) liuoksen pitoisuuden ollessa
21,1 mg/ml. Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 4
tuntia, ja tuote eristettiin geelisuodatuksella käyttäen
pylvästä, jonka koko oli 1,5 x 26,0 cm (45,9 ml) ja joka
sisälsi Bio-Gel[®] P-6:a, joka oli saatettu tasapainotilaan
15 fosfaattipuskuroitua suolaliuosta käyttäen. Pitoisuushuip-
pu kerättiin (12,31 ml) ja siitä määritettiin vindesiini
ja proteiini spektroskooppisesti käyttäen aallonpituuksia
270 ja 280 nm. Näin valmistettu konjugaatti sisälsi 9,1
mol vindesiiniä moolia kohden Ig:a.

20

Esimerkki 4Vindesiinisukkinoyyli-hiiren monoklonaalinen karsinoembryonaalisen antigeenin vasta-aine-konjugaatti

1,0 ml liuosta, joka sisälsi 4-sukkinoyylivindesiini-
25 nin N-hydroksisukkinimidiesteriä kuivassa DMF:ssa
liuoksen pitoisuuden ollessa 22 mg/ml, ja joka oli valmis-
tettu esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, lisättiin samalla
nopeasti sekoittaen 7,0 ml:aan liuosta, joka sisälsi hii-
ren monoklonaalista karsinoembryonaalisen antigeenin vas-
30 ta-ainetta 0,34 M boraattipuskurissa (pH 8,6) liuoksen
pitoisuuden ollessa 21,4 mg/ml. Reaktioseosta sekoitettiin
huoneen lämpötilassa 4 tuntia, sen jälkeen se laimennet-
tiin 3,5 ml:lla seosta, joka sisälsi natriumkloridia (0,8
M) ja fosfaattipuskuria (0,05 M; pH 7,4), ja tuote eris-
35 tettiin geelisuodatuksella käyttäen pylvästä, jonka koko

oli 3,2 x 24,4 cm (196 ml) ja joka sisälsi Bio-Gel® P-6:a, joka oli saatettu tasapainotilaan fosfaattipuskuroitua suolaliuosta käyttäen. Pitoisuushuippu kerättiin (28,24 ml) ja siitä määritettiin vindesiini ja proteiini spektroskooppisesti käyttäen aallonpituuksia 270 ja 280 nm. Näin valmistettu konjugaatti sisälsi 5,8 mol vindesiiniä moolia kohden Ig:a.

Esimerkki 5

Desasetyylivinblastiinisukkinoyyli-kaniinin anti-hiiri-Ig-konjugaatti

Liuokseen, joka sisälsi 4-sukkinoyyli(desasetyyli-vinblastiinia) (18 mg) kuivassa DMF:ssa (0,4 ml), lisättiin samalla sekoittaen 0,3 ml liuosta, joka sisälsi N-hydroksisukkinimidiä kuivassa DMF:ssa liuoksen pitoisuuden ollessa 7,97 mg/ml, ja sen jälkeen 0,3 ml liuosta, joka sisälsi 1,3-disykloheksyylikarbodi-imidiä kuivassa DMF:ssa liuoksen pitoisuuden ollessa 14,4 mg/ml. Seosta pidettiin pimeässä huoneen lämpötilassa 19 tuntia, jolloin saatiin liuos, joka sisälsi 4-sukkinoyyli(desasetyylivinblastiinin) N-hydroksisukkinimidiesteriä (18 mg/ml).

200 µl edellä saatua liuosta lisättiin samalla nopeasti sekoittaen 1,8 ml:aan liuosta, joka sisälsi kaniinin anti-hiiri-Ig:a 0,34 M boraattipuskurissa (pH 8,6) liuoksen pitoisuuden ollessa 8,02 mg/ml. Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 3,5 tuntia; se sentrifugoitiin kirkkaaksi, ja tuote eristettiin geelisuodatuksella käyttäen pylvästä, jonka koko oli 1,5 x 25 cm (44 ml) ja joka sisälsi Bio-Gel® P-6:a, joka oli saatettu tasapainotilaan fosfaattipuskuroitua suolaliuosta käyttäen. Pitoisuushuippu kerättiin (6,47 ml) ja siitä määritettiin desasetyyli-vinblastiini ja proteiini spektroskooppisesti käyttäen aallonpituuksia 270 ja 280 nm. Näin valmistettu konjugaatti sisälsi 9,0 mol desasetyylivinblastiinia moolia kohden Ig:a.

Esimerkki 6Desasetyylivinkristiinisukkinoyyli-hiiren mono-
klonaalinen melanooma-antigeenin vasta-aine-kon-
jugaatti

5 Liuokseen, joka sisälsi 4-sukkinoyyli(desasetyyli-
vinkristiiniä) (10 mg) kuivassa DMF:ssa (0,1 ml), lisät-
tiin 0,2 ml liuosta, joka sisälsi N-hydroksisukkinimidiä
kuivassa DMF:ssa liuoksen pitoisuuden ollessa 6,5 mg/ml,
ja sen jälkeen 0,2 ml liuosta, joka sisälsi 1-sykloheksyy-
10 li-3-(2-morfoliinietyyli)karbodi-imidi(meto-p-tolueenisul-
fonaattia) kuivassa DMF:ssa liuoksen pitoisuuden ollessa
24 mg/ml. Seosta pidettiin pimeässä huoneen lämpötilassa
65 tuntia, jolloin saatiin liuos, joka sisälsi 4-sukkinoy-
yli(desasetyylivinkristiinin) N-hydroksisukkinimidieste-
15 riä (20 mg/ml).

200 µl edellä saatua liuosta lisättiin samalla no-
peasti sekoittaen 1,0 ml:aan liuosta, joka sisälsi hiiren
monoklonaalista melanooma-antigeenin vasta-ainetta 0,34 M
boraattipuskurissa (pH 8,6) liuoksen pitoisuuden ollessa
20 22,7 mg/ml. Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 4
tuntia ja tuote eristettiin geelisuodatuksella käyttäen
pylvästä, jonka koko oli 3,2 x 24,5 cm (197 ml) ja joka
sisälsi Bio-Gel[®] P-6:a, joka oli saatettu tasapainotilaan
fosfaattipuskuroitua suolaliuosta käyttäen. Pitoisuushuip-
25 pu kerättiin (14,16 ml) ja siitä määritettiin desasetyyli-
vinkristiini ja proteiini spektroskooppisesti käyttäen
aallonpituuksia 270 ja 280 nm. Näin valmistettu konjugaat-
ti sisälsi 13,3 mol desasetyylivinkristiiniä moolia kohden
Ig:a.

30

Esimerkki 7Desasetyylivinblastiinisukkinoyyli-hiiren monoklo-
naalinen keuhkoadenokarsinooman vasta-aine-konju-
gaatti

35 350 µl liuosta, joka sisälsi 4-sukkinoyyli(desaset-
tyylivinblastiinin) N-hydroksisukkinimidiesteriä DMF:ssa

liuoksen pitoisuuden ollessa 14,7 mg/ml, lisättiin samalla nopeasti sekoittaen 2,0 ml:aan liuosta, joka sisälsi hiiren monoklonaalista pienisoluisen keuhkokarsinooman vasta-

5 ainetta 0,34 M boraattipuskurissa (pH 8,6) liuoksen pitoisuuden ollessa 20,0 mg/ml. Reaktioseosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 4 tuntia ja sen jälkeen sen pH säädettiin arvoon 7,4 käyttäen 1 N suolahappoa ja seos sentrifugoitiin kirkkaaksi. Tuote eristettiin geelisuodatuksella käyttäen pylvästä, jonka koko oli 2,0 x 22,0 cm (67,0 ml)

10 ja joka sisälsi Bio-Gel® P-6:a, joka oli saatettu tasapainotilaan fosfaattipuskuroitua suolaliuosta käyttäen. Pitoisuushuippu kerättiin (9,7 ml) ja siitä määritettiin desasetyylivinblastiini ja proteiini spektroskooppisesti käyttäen aallonpituuksia 270 ja 280 nm. Näin valmistettu

15 konjugaatti sisälsi 7,5 mol desasetyylivinblastiinia moolia kohden Ig:a.

Samalla tavalla valmistettiin asianmukaisia eristettyjä N-hydroksisukkimimidiestereitä käyttäen seuraavat konjugaatit:

20 vindsiinisukkinoyyli-hiiren monoklonaalinen karsinoembryonaalisen antigeenin vasta-aine-konjugaatti, vindsiinisukkinoyyli-hiiren monoklonaalinen keuhkoadenokarsinooman vasta-aine-konjugaatti,

25 desasetyylivinblastiiniglutaroyyli-hiiren monoklonaalinen karsinoembryonaalisen antigeenin vasta-aine-konjugaatti ja

4'-epideoksidetasetyylivinblastiinisukkinoyyli-hiiren monoklonaalinen karsinoembryonaalisen antigeenin vasta-aine-konjugaatti.

30 Esimerkki 8

Preparaatti, joka sisälsi viljelmässä kasvavia soluja, jaettiin pieniin putkiin siten, että jokaiseen putkeen tuli 10^5 solua. Sen jälkeen kun solut oli tiivistetty sentrifugoimalla, lisättiin 0,2 ml konjugaattivalmisteita, joiden väkevyys vaihteli. Solut suspendoitiin uu-

35

delleen, inkuboitiin 37°C:ssa 30 minuuttia ja sen jälkeen sentrifugoitiin sekä poistettiin supernatantti. Sen jälkeen solut suspendoitiin kudosisviljelyelatusaineeseen ja jaettiin mikroviljelymaljoihin siten, että jokaiseen syvennykseen tuli 10^4 solua. 6 vuorokauden viljelyn jälkeen kussakin syvennyksessä olevien solujen lukumäärä määritettiin ja määriä verrattiin pelkällä fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella käsiteltyyn solupreparaattiin.

Yhdessä kokeessa ihmisen melanoomasoluja käsiteltiin joko vindesiinisukkinoyyli-hiiren monoklonaalinen melanooma-antigeenin vasta-aine-konjugaatilla (esimerkki 3) tai desasetyylivinkristiinisukkinoyyli-hiiren monoklonaalinen melanooma-antigeenin vasta-aine-konjugaatilla (esimerkki 6), ja määritettiin vaikutukset solujen kasvuun. Tulokset olivat seuraavat:

Taulukko

Liittynyt lääkeaine	Liittyneen lääkeaineen pitoisuus µg/ml	Solujen kasvu %:eina fosfaat- tipuskuroidulla suolaliuok- sella käsiteltyjen vertailu- solujen kasvusta
Vindesiini	50	16,0
	5,0	61,8
	0,5	84,2
Desasetyyli- vinkristiini	50	21,5
	5,0	74,5
	0,5	100,0

30

Toisessa kokeessa ihmisen paksusuolen ja peräsuolen syövän soluja käsiteltiin vindesiinisukkinoyyli-hiiren monoklonaalinen karsinoembryonaalisen antigeenin vasta-aine-konjugaatilla (esimerkki 4) seuraavin tuloksin:

35

Taulukko

Liittyneen lääkeaineen pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$)	Solujen kasvu %:eina fosfaattipus- kuroidulla suolaliuoksella käsitel- tyjen vertailusolujen kasvusta
120	3,2
60	39,9
30	89,9
15	104,8

Esimerkki 9

Jotta saataisiin testatuksi in vivo konjugaattien
 tehokkuus kasvaimia vastaan vaikuttavina aineina, hiiriin,
 joilta puuttui kateenkorva ja jotka oli jaettu ryhmiin,
 siirrettiin ihonalaisesti solususpensioita, jotka sisälsi-
 vät ihmisen paksusuolen ja peräsuolen syövän soluja, ja
 hiiriä hoidettiin sen jälkeen 5 viikon ajan kahdesti vii-
 kossa annetuin vatsakalvonsisäisin ruiskein. Hiiriin ruis-
 kutettiin joko fosfaattipuskuroitua suolaliuosta, hiiren
 monoklonaalista vasta-ainetta (karsinoembryonaalista anti-
 geenia vastaan) tai tämän vasta-aineen vindesiinikonju-
 gaattia, joka oli valmistettu esimerkissä 4 kuvatulla ta-
 valla. Kullakin kerralla yhteen hiireen ruiskutettu vasta-
 aineannos oli 3,3 - 3,7 mg. Kullakin kerralla yhteen hii-
 reen ruiskutetun konjugaatin sisältämä vindesiiniannos oli
 119 - 128 μg .

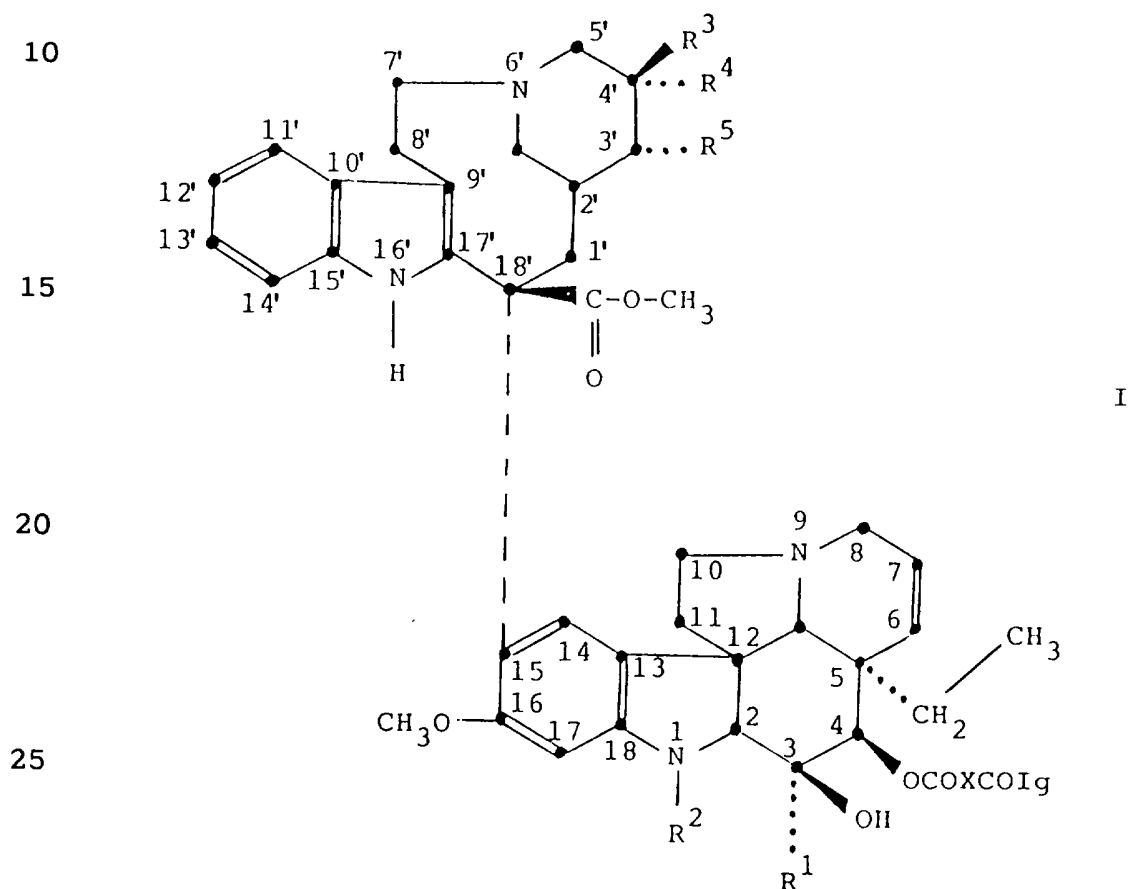
61 vrk:n kuluttua kasvaimen istuttamisesta PBS:a
 tai pelkkää vasta-ainetta saaneisiin ryhmiin kuuluvat hii-
 ret tapettiin ja kasvaimet poistettiin ja punnittiin. Vin-
 desiini-vasta-aine-konjugaattia saaneet hiiret tapettiin
 90 vrk:n kuluttua kasvaimen istuttamisesta. Kasvainten
 keskimääräiset painot esitetään seuraavassa taulukossa.

Taulukko

Hoitoryhmä	Kasvaimen keskipaino (mg) ± standardi- poikkeama	
	Hiirien lukumäärä	
5		
PBS	11	1793 ± 1609
Pelkkä vasta-aine	10	527 ± 477
Vindesiini- vasta-aine-konjugaatti	8	22 ± 19
10		

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen kon-
 jugaatin valmistamiseksi, joka sisältää Vinca-alkaloidi-
 5 osan, joka on kovalenttisesti liittynyt immunoglobuliiniin
 tai immunoglobuliinifragmenttiin, ja jolla on kaava

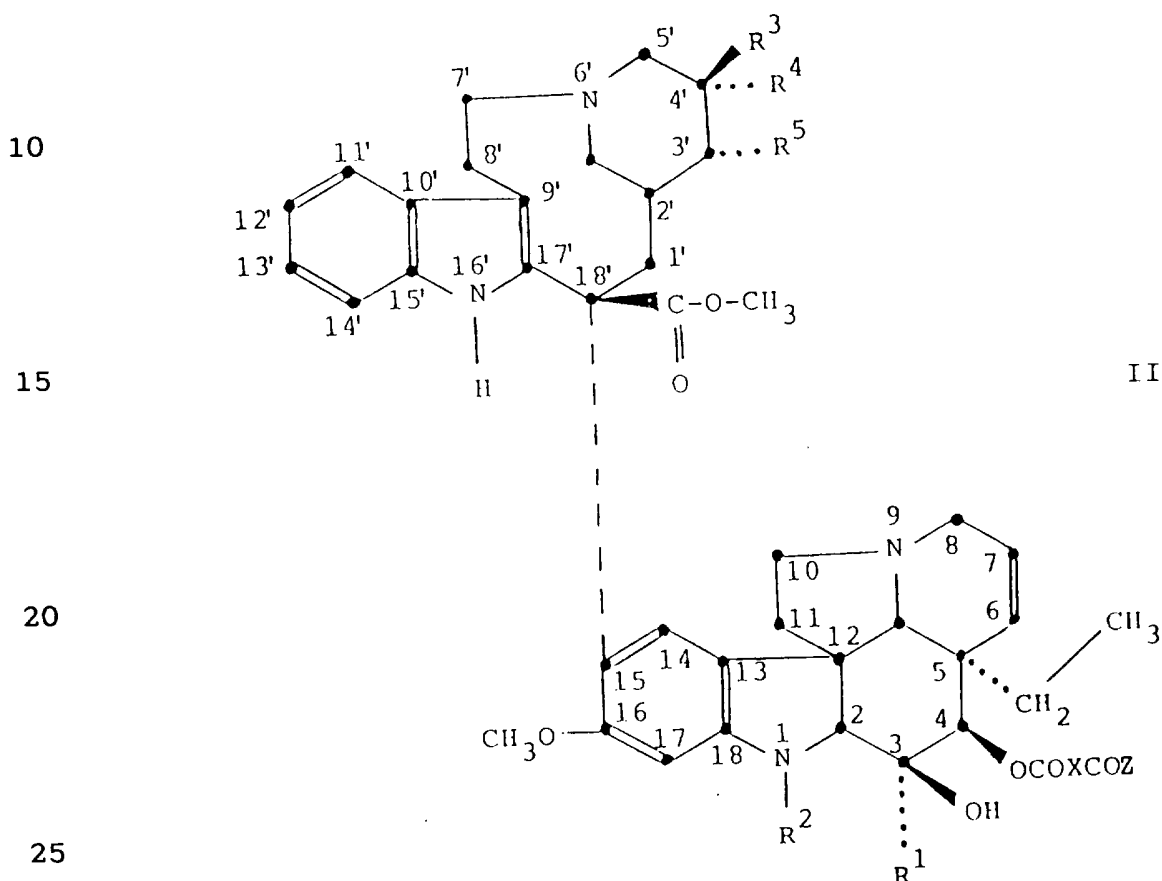


30

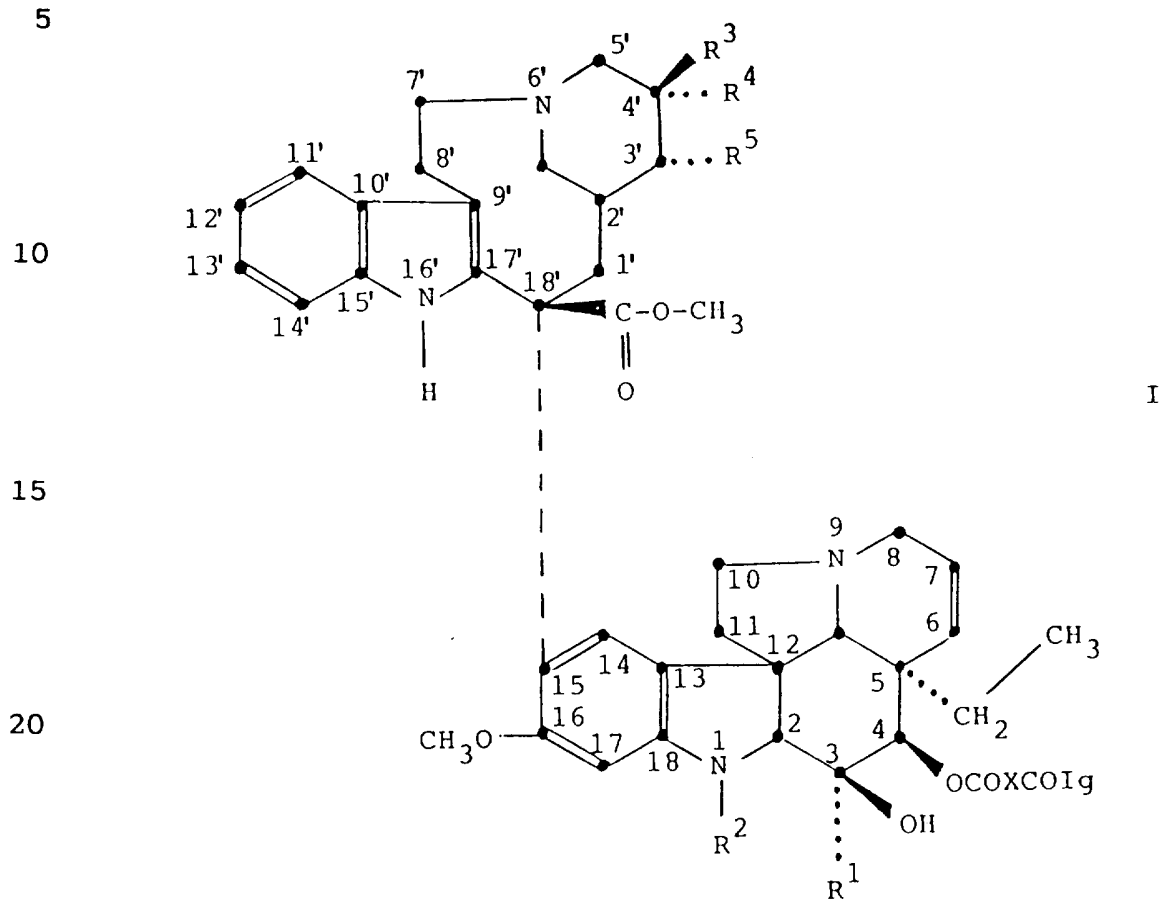
jossa Ig merkitsee immunoglobuliinia tai immunoglobuliini-
 fragmenttia, johon on liittynyt yksi tai useampi Vinca-
 alkaloidiryhmä; ja X on suoraketjuinen C_{1-4} -alkyleeni; R^1
 on $COOC_{1-3}$ -alkyyli tai $CONH_2$; R^2 on CH_3 tai CHO ; ja käsi-
 35 teltäessä R^4 ja R^5 erillisinä R^5 on H, R^4 on etyyli ja R^3

on H tai OH; ja käsiteltäessä R^4 ja R^5 yhdessä niiden hiiliatomien kanssa, joihin ne ovat sitoutuneet, ne muodostavat oksiraanirenkaan ja R^3 on etyyli,

tunnettu siitä, että saatetaan immunoglobuliini tai immunoglobuliinifragmentti reagoimaan puolihap-
 5 pojohdannaisen kanssa, jolla on kaava



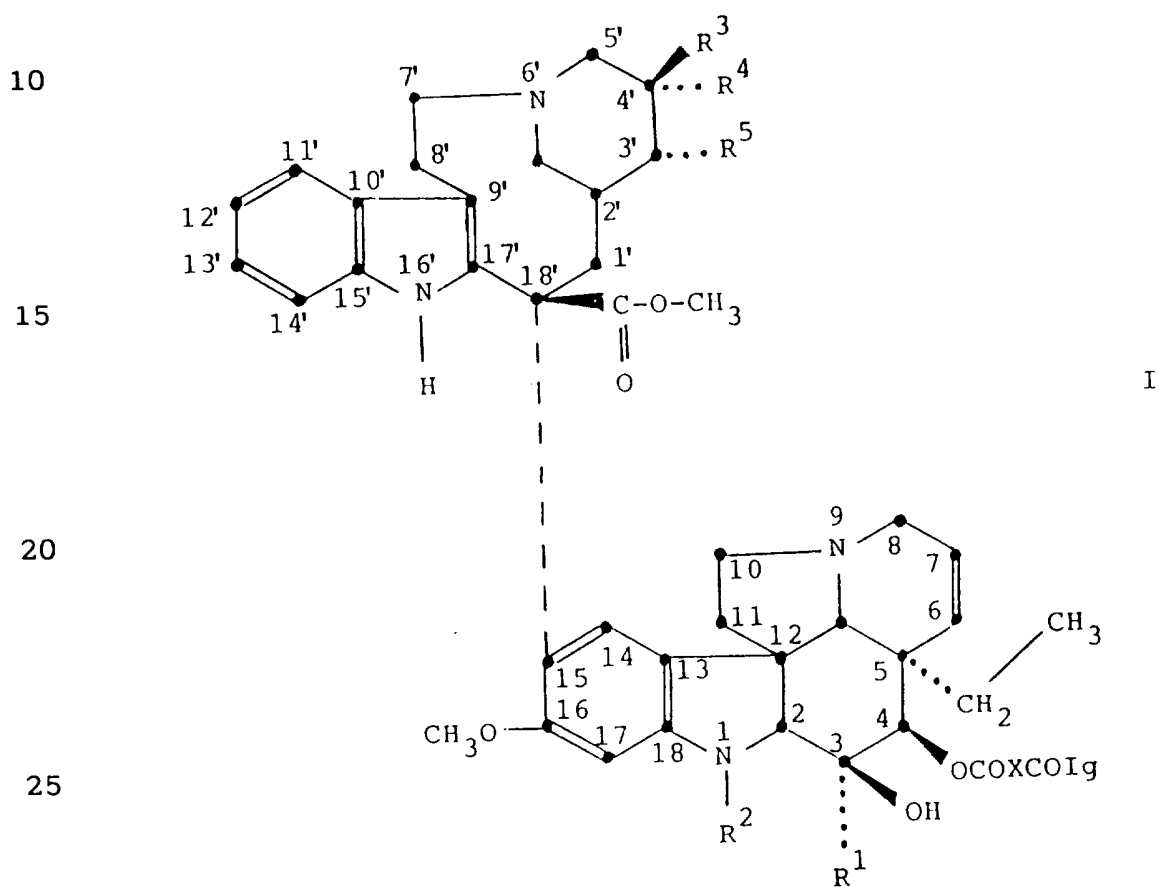
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
tunnettu siitä, että valmistetaan terapeuttisesti
käyttökelpoinen konjugaatti, jolla on kaava



jossa Ig on ihmisen kasvaimen liittyvän antigeenin vas-
tainen monoklonaalinen vasta-aine, johon on liittynyt 3-
14 Vinca-alkaloidiryhmää; X on $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$; ja R^1 on COOCH_3 ;
30 R^2 on CH_3 ; R^3 on OH ; R^4 on etyyli, ja R^5 on H.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett terapeutiskt användbart konjugat, vilket innehåller en Vinca-alkaloiddel som är kovalent bunden till ett immunoglobulin eller immunoglobulinfragment och med formeln

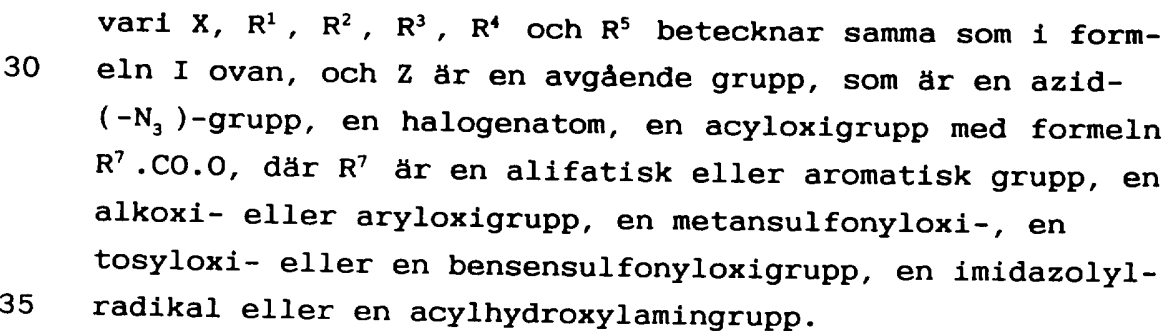


30

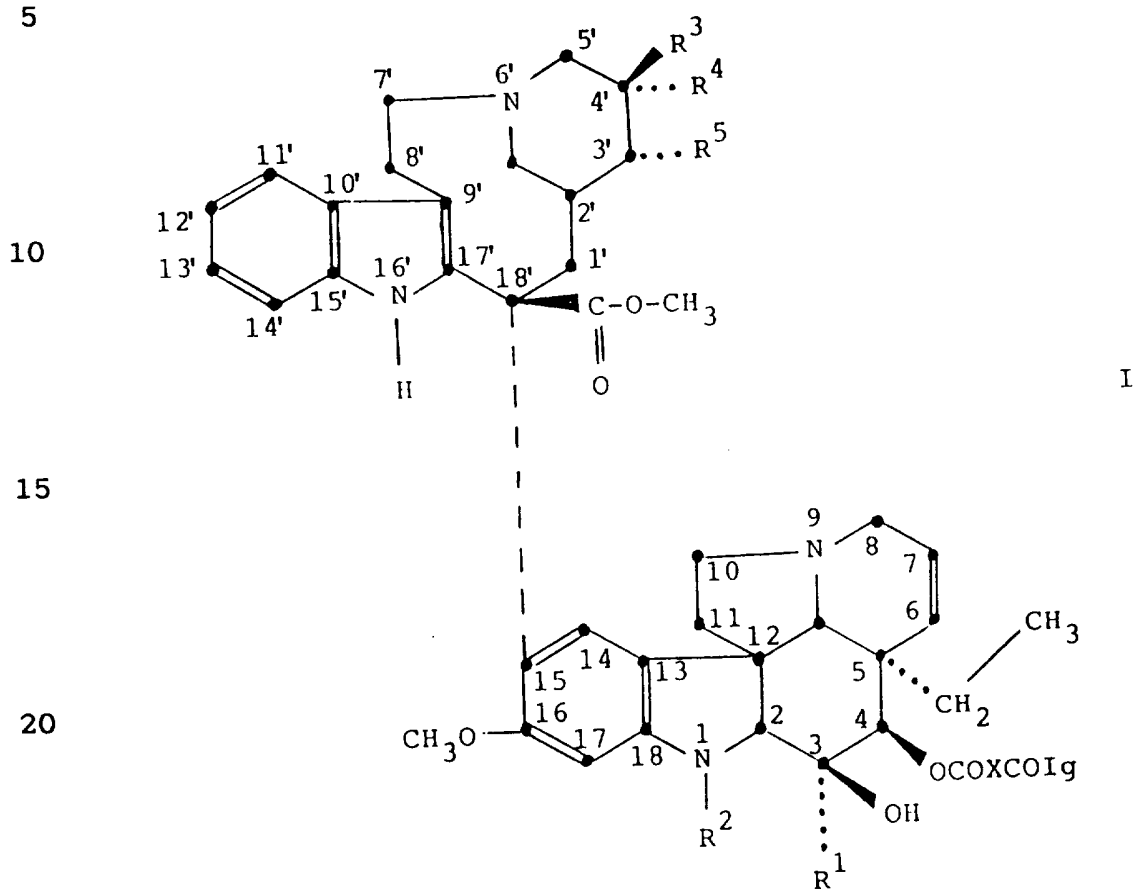
vari Ig betecknar ett immunoglobulin eller ett immunoglobulinfragment, vilket är förbundet med en eller flera Vinca-alkaloidgrupper; och X är en C_{1-4} -alkylen med rak kedja; R^1 är en $COOC_{1-3}$ -alkyl eller $CONH_2$; R^2 är CH_3 eller

35

5 k ä n n e t e c k n a t därav, att ett immunoglobulin
eller ett immunoglobulinfragment bringas att reagera med
ett hemisyraderivat med formeln



2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att man framställer ett terapeutiskt
användbart konjugat med formeln



vari Ig är en monoklonal antikropp, mot en med humantumör
associerad antigen, till vilken antikropp kopplats 3 - 14
30 Vinca-alkaloidgrupper; X är $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$; och R^1 är COOCH_3 ;
 R^2 är CH_3 ; R^3 är OH ; R^4 är etyl och R^5 är H .