



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **176480**

(13) **B**

(51) Int Cl⁶ **C 07 H 15/20, 15/203,
A 61 K 39/395, 31/70**

Styret for det industrielle rettsvern

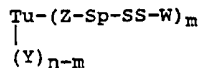
(21) Soknadsnr	884833	(86) Int. inng. dag og soknadsnummer	
(22) Inng. dag	28.10.88	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	28.10.88	(30) Prioritet	30.10.87, US, 114940
(41) Alm. tilgj.	02.05.89		
(44) Utlegningsdato	02.01.95		

(71) Patentsøker American Cyanamid Co, One Cyanamid Plaza, Wayne, NJ 07470-8426, US
(72) Oppfinner William James McGahren, Demarest, NJ, US
Martin Leon Sassiver, Spring Valley, NY, US
George A. Ellestad, Pearl River, NY, US
Phillip R. Hamann, Garnerville, NY, US
Lois M. Hinman, North Tarrytown, NY, US
Janis Upeslakis, Pomona, NY, US
(74) Fullmektig Dag Dawes, Bryn & Aarflot AS, Oslo

(54) Benevnelse **Analogifremgangsmåte ved fremstilling av målrettede former av metyltritio-antitumor midler**

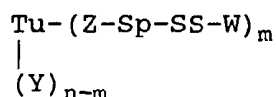
(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag **Bærer-medikamentkonjugat med formelen**



fremstilt fra en forbindelse med formelen CH₃SSS-W, hvori CH₃SSS-W er et antitumor antibiotikum betegnet som LL-E333288 α_1 Br, α_1 J, α_2 Br, α_2 J, α_3 Br, α_3 J, α_4 Br, α_1 Br, α_1 J, α_2 Br, α_2 J, γ_1 Br, γ_1 J, δ_1 J, BBM-1675, FR-900405, FR-900406, PD-114759, PD-115028, CL-1577A, CL-1577B, CL-1577D, CL-1577E eller CL-1724. Fremstilling av forbindelsene er beskrevet.

Denne oppfinnelsen vedrører en analogifremgangsmåte for å fremstille de terapeutisk aktive målrettede derivatene



av forbindelser med formelen $\text{CH}_3\text{SSS-W}$, hvori $\text{CH}_3\text{SSS-W}$ er et antitumor antibiotikum LL-E33288 α_1^{Br} , α_1^{J} , α_2^{Br} , α_2^{J} , α_3^{Br} , α_3^{J} , α_4^{Br} , β_1^{Br} , β_1^{J} , β_2^{Br} , β_2^{J} , γ_1^{Br} , γ_1^{J} , δ_1^{J} , BBM-1675, FR-900405, FR-900406, PD 114759, PD 115028, CL-1577A, CL-1577B, CL-1577D, CL-1577E eller CL-1724.

Beskrivelse av tegningene

Figur I: Ultrafiolett spekter av det antitumor antibiotikum som er betegnet som LL-E33288 γ_1^{J} -

Figur II: Protonmagnetiske resonans-spekteret for det antitumor antibiotikum som er betegnet som LL-E33288 γ_1^{J} .

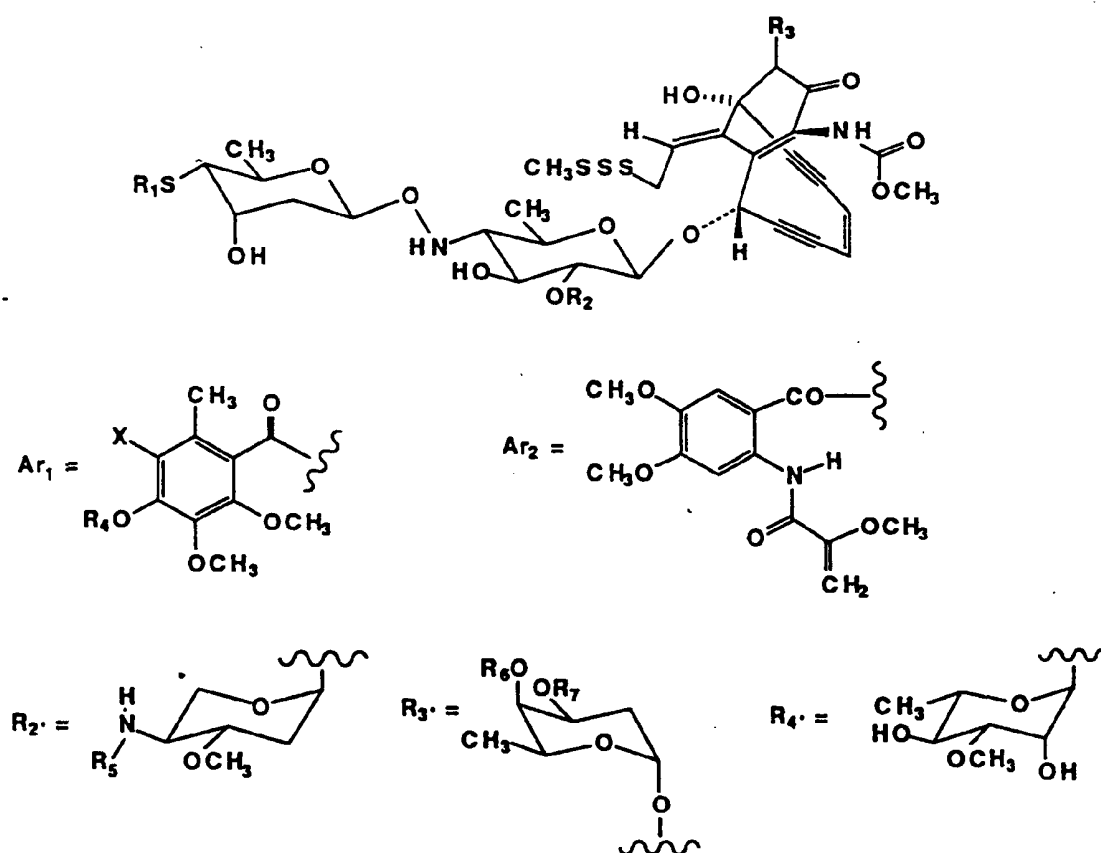
Figur III: Infrarød spekteret av det antitumor antibiotikum som er betegnet LL-E33288 γ_1^{J} .

Familien av antibakterielle og antitumor midler, kollektivt kjent som LL-E33288 komplekset, er beskrevet og krevet i en parallell U.S. patentsøknad, serie nummer 009.321, innlevert 30. januar 1987, og blir brukt til å fremstille de disvovel antitumormidlene som er utgangsmaterialer for målrettede former av antitumor-midlene ifølge vår oppfinnelse.

Søknaden med serienummer 009.321 beskriver LL-E33288 komplekset, komponentene i dette, nemlig LL-E33288 α_1^{Br} , LL-E33288 α_1^{J} , LL-E33288 α_2^{Br} , LL-E33288 α_2^{J} , LL-E33288 α_3^{Br} , LL-E33288 α_3^{J} , LL-E33288 α_4^{Br} , LL-E33288 β_1^{Br} , LL-E33288 β_1^{J} , LL-E33288 β_2^{Br} , LL-E33288 β_2^{J} , LL-E33288 γ_1^{Br} , LL-E33288 γ_1^{J} og LL-E33288 δ_1^{J} , og fremgangsmåter for deres fremstilling ved aerob fermentering ved bruk av en ny stamme av Micromonospora echinospora ssp calichensis eller naturlige eller avledete mutanter derav. Serie nr. 009.321 åpenbarer også foreslåtte strukturer for noen av de ovenfor navngitte komponenter. Disse foreslåtte strukturene er gjengitt i tabell 1.

Tabell 1Foreslåtte strukturer for CH₃-SSS-W

(hvor W er den substituenten som er bundet til
CH₃-SSS- nedenfor)



Betegnelse	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	X
LL-E33288 α_2^J	Ar ₁	R ₂ ,	H	H	C ₂ H ₅			J
LL-E33288 α_3^J	Ar ₁	H	H	R ₄ ,				J
LL-E33288 β_1^J	Ar ₁	R ₂ ,	H	R ₄ ,	(CH ₃) ₂ CH			J
LL-E33288 γ_1^J	Ar ₁	R ₂ ,	H	R ₄ ,	C ₂ H ₅			J
LL-E33288 δ_1^J	Ar ₁	R ₂ ,	H	R ₄ ,	CH ₃			J
LL-E33288 β_1^{Br}	Ar ₁	R ₂ ,	H	R ₄ ,	(CH ₃) ₂ CH			Br
LL-E33288 γ_1^{Br}	Ar ₁	R ₂ ,	H	R ₄ ,	C ₂ H ₅			Br
LL-E33288 α_2^{Br}	Ar ₁	R ₂ ,	H	H	C ₂ H ₅			Br
LL-E33288 α_3^{Br}	Ar ₁	H	H	R ₄ ,				Br
Esperamicin A ₁	CH ₃	R ₂ ,	R ₃ ,		(CH ₃) ₂ CH	H	Ar ₂	
Esperamicin A ₂	CH ₃	R ₂ ,	R ₃ ,		(CH ₃) ₂ CH	Ar ₂	H	
Esperamicin A _{1b}	CH ₃	R ₂ ,	R ₃		CH ₃ CH ₂	H	Ar ₂	

Visse andre antibiotika er nyttige i vår oppfinnelse, nemlig:

1) Esperamicin BBM-1675, en ny klasse av potente antitumor antibiotika. I. Physico-chemical data and partial structure. M. Konishi, et al., J. Antibiotics, 38, 1605 (1985). A new antitumor antibiotic complex, M. Konishi, et al., U.K. patentsøknad, GB 2.141.425A, 15. mai, 1984.

2) New antitumor antibiotics, FR-900405 og FR-900406.I. Taxonomy of the producing strain. M. Iwami, et al., J. Antibiotics 38, 835 (1985). New antitumor antibiotics FR-900405 og FR-900406.II. Production, isolation, characterization and antitumor activity. S. Kiyoto, et al., J. Antibiotics, 38, 340 (1985).

3) PD 114759 and PD 115028, novel antitumor antibiotics with phenomenal potency. I. Isolation and characterization. R.H. Bunge, et al., J. Antibiotics, 37, 1566 (1984). Biological and biochemical activities of the novel antitumor antibiotic PD 114759 and related derivativs. D.W. Fry et al., Investigational New Drugs, 4, 3 (1986).

4) New antibiotic complex CL-1577A, CL-1577B produced by Streptomyces sp ATCC 39363. Europeisk patentsøknad 0.132.081, A2.

5) CL-1577D og CL-1577E Antibiotic antitumor compounds, their production and use. U.S. patent 4.539.203.

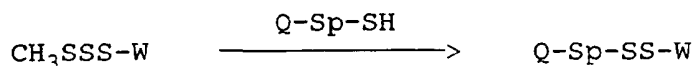
6) CL-1724 Antibiotic compounds, their production and use. U.S. patent 4.554.162.

De fullstendige strukturene av esperamicinene A_1 , A_2 og A_{1b} (BBM-1675 komplekset) er blitt rapportert og disse er tatt med i tabell 1. De fysikalske karakteristika for de ovenfor nevnte antitumor antibiotika indikerer at de alle er identiske eller svært like i struktur med esperamicinene, og alle inneholder en metyltritio funksjonell gruppe.

Som det kan sees av strukturene som er åpenbart ovenfor inneholder hvert av de antibiotiske stoffene α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , β_1 , β_2 , γ_1 og δ komponentene av LL-E33288 komplekset, såvel som BBM-1675, FR-900405, FR-900406, PD 114759, PD 115028, CL-1577A, CL-1577B, CL-1577D, CL-1577E og CL-1724 en metyltritio-gruppe i sin struktur. Metyltritiogruppen i de ovenfor nevnte antibiotika er gjenstand for utbytning med flere forskjellige tiol-holdige organiske molekyler, hvilket resulterer i dannelsen av en ny klasse midler mot kreft og mot bakterier.

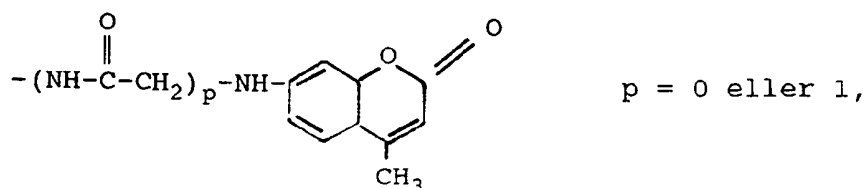
De følgende fremgangsmåtealternativer karakteriserer oppfinnelsen.

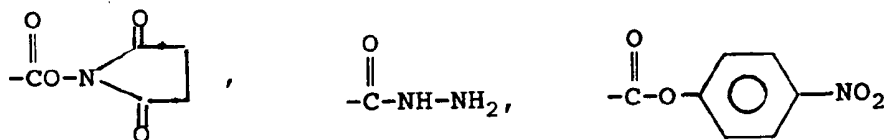
Det er nå blitt oppdaget at utbytningen av metyltritio-gruppen i de forbindelsene som er oppført i tabell 1 og som er beskrevet i skjema I, kan anvendes til å introdusere en spacer (Sp) som ved et skjønsomt valg av denne gjør det mulig å innføre målrettende enheter i forbindelsene i de ovenfor nevnte patentene og anvendelsene.



Skjema I

hvor Sp er en toverdlig (C_1 - C_{10}) alkylengruppe med rett eller forgrenet kjede, toverdlig aryl eller heteroarylradikal, og Q er H

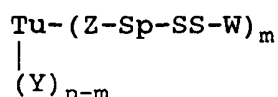




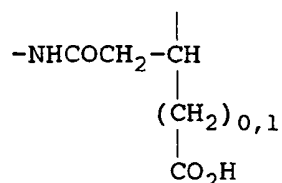
i acetonitril i nærvær av en ekvivalent av trietylamin og/eller en ekvivalent eddiksyre ved -10 til -30°C i 1 til 48 timer,

å isolere mellomproduktet med formelen Q-Sp-SS-W, hvori Q, Sp og W er som tidligere definert heri, deretter

å omsette forbindelsen med formelen Q-Sp-SS-W hvori Sp, Q og W er som tidligere definert heri, med et molekyl med formelen Tu-Y hvori Tu-Y er et mono- eller polyklonalt antistoff, dets fragmenter, dets kjemisk eller genetisk manipulerte motstykker, eller vekstfaktorer; Y er en side-kjede amino eller karboksylfunksjon av antistoffet; n er 1-100, i vandig buffer ved en pH på mellom 6,5 og 9, ved 4 til 40°C enten direkte eller i nærvær av et vannløselig karbodiimid, for å frembringe forbindelsen



hvori Tu, Sp, W, n og Y er som tidligere definert heri, m er 1-15 og Z er dannet ved kovalent reaksjon av gruppene Q og Y og er $-\text{CONH}-$, $-\text{NH}-$,



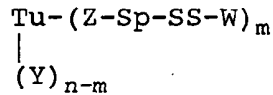
$-\text{N}=\text{CH}-$, eller $-\text{CO}_2-$
eller

å omsette forbindelsen med formelen Q-Sp-SS-W, hvori Sp og W er som tidligere definert heri, og Q er



med et molekyl med formelen $Tu-(Y)_n$.

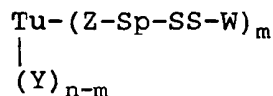
hvor Tu og n er som tidligere definert heri, og Y er en sidekjede aminogruppe, i en vandig bufret løsning med en pH mellom 6,5 og 9, ved en temperatur på mellom 4 og 40°C, innbefattet, for å frembringe forbindelser med formelen :



hvor Tu , Sp , Y og n er som tidligere definert heri, m er 1-15, og Z er dannet ved kovalent reaksjon mellom Q og Y og er definert som $-CONH-$

eller

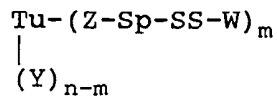
å omsette en forbindelse med formelen $Q-Sp-SS-W$, hvor Sp og W er som tidligere definert heri, og Q er $-CONHNH_2$ med salpeter-syrling i vandig acetonitril for å frembringe en forbindelse med formelen $Q-Sp-SS-W$, hvor Sp og W er som tidligere definert heri og Q er $-CON_3$ med en forbindelse med formelen $Tu-(Y)_n$, hvor Tu , Y og n er som tidligere definert heri for å frembringe en forbindelse med formelen



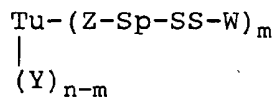
hvor Tu , Z , Sp , W , m , Y og n er som heri definert ovenfor;

eller

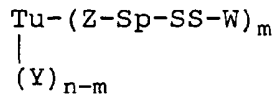
å omsette en forbindelse med formelen $Q-Sp-SS-W$ hvor Sp og W er som tidligere definert heri og Q er $-CONHNH_2$, med et molekyl med formelen $Tu-(Y)_n$ hvor Tu er som tidligere definert heri, Y er et aldehyd frembragt fra karbohydratresiduer på Tu ved oksydasjon i nærvær av et periodat av et alkalisk jordmetall i en vandig buffer med pH mellom 4,0 og 6,5, ved 4 til og med 40°C, og n er 1 til 20 for å frembringe en forbindelse med formelen:



hvor Tu , Sp , W , Y og n er som tidligere definert heri, og Z er laget ved kovalent reaksjon av Q og Y og er $-\text{CONHN}=\text{CH}-$, og m er 0,1 til 15; eller å behandle forbindelse umiddelbart ovenfor med formelen:

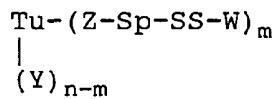


hvor Tu , Z , Sp , W , Y , n og m er som umiddelbart ovenfor definert med acetylhydrazin i en vandig buffer ved pH mellom 4,0 og 6,5, ved 4 til og med 40°C , for å frembringe en forbindelse med formelen:



hvor Tu , Z , Sp , W , n og m er som umiddelbart ovenfor definert, og Y er $-\text{CH}=\text{NNHCOCH}_3$,
og

å omsette denne forbindelsen med natriumcyanborhydrid i en vandig buffer ved pH på 4,0 til 6,5, ved en temperatur på 4 til og med 40°C , for å frembringe en forbindelse med formelen:



hvor Tu , Sp , W , m og n er som tidligere definert heri, Z er $-\text{CONHNHCH}_2-$, og Y er $-\text{CH}_2\text{NHNHCOCH}_3$.

Som et eksempel kan 3-merkaptopropionsyre-derivatet av E-33288 γ_1^J ($\text{Q}=\text{CO}_2\text{H}$, $\text{Sp}=-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), når det er omdannet til sin aktive form hydroksy-ravsyreimid ($\text{Q}=\text{CO}_2\text{Su}$, $\text{Sp}=-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) brukes til å reagere med noen av ϵ -aminogruppene i lysinrestene (f.eks. Tu =monoklonalt antistoff, $\text{Y}=-\text{NH}_2$ hvor $n=50-100$ fra tilgjengelige lysinrester), ved en pH mellom 7,0 og 9,5 i vandige bufrede løsninger ved temperaturer mellom 4 og 40°C for å frembringe målrettede former av de antibiotika som er bundet til vilkårlige seter langs protein-ryggraden (Tu =monoklonalt antistoff, $\text{Z}=-\text{NHCO}-$, $\text{Sp}=-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $m=1-10$).

Bare en del av de tilgjengelige lysinrestene blir substituert på denne måten, da et høyt innhold vanligvis ikke blir betraktet som forlikelig med å befare antistoffimmunoaktiviteten. De samme vilkårlig substituerte immuno-konjugatene kan også fremstilles fra 3-merkaptopropionsyre-derivatet ved bruk av andre karboksylgruppe-aktiverende midler, så som flere forskjellige karbodiimider, eller det tilsvarende acylazidet. Alternativt, et 3-merkaptopropionylhydrazid-derivat av E-33288 γ_1^J (Q=H₂NNHCO-, Sp=-CH₂CH₂-), når det reageres med et periodatoksydert antistoff (Tu=monoklonalt antistoff, Y=-CHO, n=1-15) som beskrevet i U.S. patent nr. 4.671.958 ved en pH mellom 4 og 7, i en bufret vandig løsning ved en temperatur på mellom 4 og 40°C, reagerer bare ved aldehyd-funksjonen (avledet ved spaltning av vic-dioler av karbohydratrester plassert på Fc-delen av antistoffene) for å frembringe monoklonale antistoff-konjugater som inneholder medikamentet substituert på spesifikke seter langs ryggraden av proteinet (Tu=mono-klonalt antistoff, Z=-CH=NNHCO-, SP=-CH₂CH-, m=0,5-10). For å blokkere ureagerte aldehyd-grupper på antistoffet, og således unngå tverrbinding, såvel som for å stabilisere de hydrlytisk labile Schiff's base bindingene, foretrekkes det (selvom det ikke er nødvendig) å reagere det sistnevnte konjugatet først med en forbindelse så som acetylhydrazid eller tyrosin-hydrazid, deretter redusere med natrium-cyanborhydrid eller natriumborhydrid for å fremstille de stabiliserte konstruksjonene ifølge denne oppfinnelsen (Tu=monoklonalt antistoff, Z=-CH₂NHNHCO-, Sp=-CH₂CH₂-, m=0,5-10). Andre aldehydreaktive grupper som del av medikament-konstruksjonen er innenfor vår oppfinnelse for å frembringe produktene ifølge skjema II. Slike funksjonelle grupper er fortrinnsvis, skjønt ikke begrenset til, de som reagerer med aldehyder under sure vandige betingelser. Reaktiviteten av proteinlysiner under basiske betingelser er tilstrekkelig stor, slik at deres aminer konkurrerer med produktene ifølge skjema II om tilgjengelige aldehyder i det monoklonale antistoffet. Alternative aldehydreaktive grupper er f.eks. semikarbazidet, tiosemikarbazidet, og de oksygen-

substituerte hydroksylamin-funksjonene.

Som et annet eksempel kan et monoklonalt antistoff reageres med 3-(2-ditiopyridyl)-propionsyre-hydroksyravsyreimidester for å modifisere proteinet med lysinrester (Tu=monoklonalt antistoff, Y=NH₂, n=50-100, Q=-CO₂Su, Sp=-CH₂-CH₂-, P=2-pyridyltio). Etter reduksjon med f.eks. ditiotreitoll dannes et mellomprodukt (Tu=monoklonalt antistoff, Z=-NHCO-, Sp=-CH₂CH₂-, m=1 til 15) som kan reageres med forbindelsene i tabell 1 for å frembringe de aktuelle immunokonjugatene. På samme måten kan 2-iminotiolan reageres med et monoklonalt antistoff for å innføre tiolgrupper direkte på overflaten av proteinet, uten at det er nødvendig med et reduksjonstrinn (Tu=monoklonalt antistoff, Z=-NHCO-, SP-(CH₂)₃-m=1 til 15), og dette mellomproduktet kan reageres med forbindelsene i tabell 1 som tidligere. Alternativt kan sulfhydryl-grupper opprinnelig tilstede i strukturen av monoklonale antistoffer i dimer form som cystinrester godt brukes til å delta i reaksjonen ifølge skjema III direkte. Slike sulfhydryler blir tradisjonelt eksponert ved en kombinasjon av enzymatisk spaltning og reduksjon av naturlige monoklonale antistoffer (Tu=Fab' fragment, Z-Sp=binding, Y=SH), men bruken av genetisk forandrede konstruksjoner av monoklonale antistoffer som inneholder uparrede cystinrester blir også vurdert.

Flere forskjellige monoklonale antistoffer (MoAs'er) blir brukt som eksempler på målretting av metyltritio-forbindelsene mot kreft. MoAs'ene Lym 1 og Lym 2 kan skille mellom forskjellige antigener på modne B-lymfocytter og deres produkt lymfomas. Fremstillingen og karakteristikken av disse MoAs'ene er beskrevet av A.L. Epstein, et al., "Cancer Research" 47, 830 (1987). Man har også bemerket MoAs B72,3 mål først og fremst for karcinom i brystene og kolon, ved reaktivitet med pankreas-ovarie- og lunge-karcinom. Antistoffet er beskrevet av T.L. Klug et al., "Int. J. Cancer" 38, 661, (1986). MoAs CT-M-01, som gjenkjenner først og fremst brysttumorer, er beskrevet i EPO søknad 86 401482.4 innlevert 3. juli 1986, og MAC-68 blir fremstilt ved en subklon av hybridoma som frembringer CT-M-01, og gjenkjenner både

bryst- og kolon-karcinom. Mellomprodukter for de aktuelle forbindelsene som er nyttige for, og konjugerer med disse antistoffene, er beskrevet i den eksperimentelle delen. Det skal allikevel ikke forstås at dette patentet er begrenset til eller avgrenset ved de foran nevnte antistoffene. I stedet er metodologien tilstrekkelig generell til at det kan anvendes på alle antistoffer, uansett klasse eller isotype, deres enzymatisk avledede fragmenter, deres kjemisk manipulerte og stabiliserte fragmenter, såvel som deres respektive chimere og humaniserte motstykker. Heller ikke er de målrettende enhetene begrenset bare til monoklonale antistoffer. Andre proteiner såvel som små molekyler for hvilket det finnes reseptorer i målvev, er innenfor rammen av vår oppfinnelse som målrettende enheter.

Fremgangsmåtene ifølge denne oppfinnelsen som brukes til å frembringe monoklonale antistoff-konjugater fra forbindelsene i tabell 1, gir konstruksjoner som opprettholder god immuno-reaktivitet med målcellelinjer, som bestemt ved de følgende in vitro undersøkelsene:

Målceller

Alle målcellene ble holdt i RPMI 1640 media tilsatt 5 % fetalt kalveserum (FCS), ITS (Collaborative Research, Cat# 40351), streptomycin (50 µg/ml), penicillin (50 enheter/ml), gentamycinsulfat (50 µg/ml) og glutamin (0,03 %). Cellene ble oppbevart i en fuktig 5 % CO₂ inkubator ved 37°C.

I. Immunoreaktivitets-undersøkelser

Prosedyre I - Elisa

Egnede målceller ble høstet, tellet og suspendert i Dulbecco's fosfatbufret saltløsning (DPBS) ved optimal konsentrasjon for testing av monoklonalt antistoff (MoAs). 0,1 ml celler ble alkotert i hver av brønnene med steril vevskultur i en polystyrenplate med 96 brønner. Platene ble sentrifugert i 5 minutter ved 1.000 RPM og supernatanten ble slått vekk. Platene ble lufttørket over natten og kan lagres ved 4°C for opptil 3 måneder.

Ikke-spesifikke bindings seter ble blokkert ved å tilsette 200 μ l av en 1% gelatin i DPBS pr. brønn, og inkubere platen i 1 time ved 37°C i en fuktig inkubator. (Alle påfølgende inkubasjoner blir utført under lignende betingelser). Platene ble vasket en gang med 250 μ l av 0,05 % TWEEN-20 i DPBS (vaske-løsning) ved å bruke det automatiserte ELISA vaske-systemet fra Dynatech (Ultrawash II). Prøvene som skulle undersøkes ble fortynnet til en endelig konsentrasjon på 3 μ g/ml MoAs ekvivalenter i 0,1 % gelatin-DPBS. Seks ytterligere tre-ganger seriefortynninger ble laget fra hver 3 μ g/ml prøve, og 100 μ l ble tilsatt til angjeldende brønner i triplikat. Bare bunnrekken av brønnene fikk 100 μ l av 0,1 % gelatin som bakgrunn. Platene ble inkubert i 45 minutter og deretter vasket tre ganger. Alkalisk fosfatase-konjugerte affinitetsrensede geit anti-mus immunoglobuliner (Cappel Cat# 8611-0231) ble fortynnet 1:125 i 0,1 % gelatin, og 100 μ l ble tilsatt til hver brønn. Platene ble inkubert i 45 minutter og deretter vasket tre ganger. 200 μ l av p-nitrofenylfosfat-substratløsning (se nedenfor) ble tilsatt til hver brønn. Etter 45 minutter ved romtemperatur ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av 50 μ l 3M NaOH. Absorbansen av innholdet av hver brønn ble avlest ved 405 nm i det automatiserte spektrofotometer fra Dynatech (EIA Autoreader # EL-310).

Substrat dietanolamin-buffer (10 %)

97 ml dietanolamin

800 ml vann

0,2 g NaN_3

100 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Reagensene ble oppløst ved kontinuerlig omrøring og 1M HCl ble tilsatt inntil pH var 9,8. Samlet volum ble gjort opp til 1 liter med vann og filter-sterilisert med et 0,2 μ m filter. Bufferen ble lagret i mørke ved 4°C. Umiddelbart før bruk ble p-nitrofenylfosfat (Sigma, Cat# 104-40) løst i den 10 %-ige dietanolamin-bufferen (må være ved romtemperatur) for å gi en endelig konsentrasjon på 1 mg/ml.

Beregning av O.D. verdier

Bindingsprosenten i hver prøve ble beregnet ved følgende

$$\text{ligning: } \frac{A-B}{C-B} \times 100 = \% \text{ binding}$$

A = Gjennomsnittlig O.D. av testprøven

B = Gjennomsnittlig O.D. for bakgrunnen

C = Gjennomsnittlig O.D. av 3 $\mu\text{g/ml}$ ikke-manipulert MoAs-kontroll

Bindingsprosenten ble avsatt på ikke-log skalaen i et semi-log diagram, og MoAs konsentrasjonen ble avsatt på log-skalaen. BD_{50} (dvs. den dosen av antistoff som er nødvendig for å gi 50 % binding) av hver testprøve ble tatt ut av diagrammet, og retensjonsmengden av immunoreaktivitet ble beregnet ved følgende ligning:

$$\frac{\text{BD}_{50} \text{ av MoAs kontroll}}{\text{BD}_{50} \text{ av testprøve}} \times 100 = \% \text{ retensjon av immunoreaktivitet}$$

Prosedyre 2 - indirekte RIA

Høvelige mengder av målceller i 0,2 ml av 10 % FCS media ble alikvotert i 4 ml polystyrenrør. Prøvene som skulle testet ble fortynnet til en konsentrasjon på 2 $\mu\text{g/ml}$ MoAs ekvivalenter i 10 % FCS media. Fem tre-ganger seriefortynninger ble fremstilt fra hver 2 $\mu\text{g/ml}$ prøve og 0,2 ml ble tilsatt til hvert rør i duplikat. Bakgrunnsprøver fikk bare celler og media. Cellene ble inkubert ved 4°C i 1 time, deretter vasket to ganger (alle RIA vaskingene ble utført med et volum på 3 ml) med 2 % FCS media. 0,05 ml av sau F(ab')₂ anti-mus IgG [¹²⁵J] (DuPont, Cat # NEX 162.0142) som inneholdt om lag 500.000 CPM ble tilsatt til hvert rør; cellene ble inkubert i ytterligere 1 time ved 4°C, vasket en gang med 2 % FCS og 2 ganger med PBS. 0,5 ml PBS ble tilsatt til hvert rør, cellene ble vortex-behandlet, overført til rene rør og tellet i 1 minutt i en Packard Gamma 500.

Bindingsprosenten for hver verdi ble bestemt og grafisk fremstilt som den foregående ELISA ligningen, untatt at CPM

ble substituert for O.D. enheter og C = gjennomsnittlig CPM for 1 µg/ml ikke-manipulert MoAs kontroll. Prosent retensjon av immunoreaktiviteten for hver prøve ble beregnet som tidligere diskutert.

Prosedyre 3 - Direkte RIA

Høvelige mengder av målceller i 1 ml 10 % FCS media ble alikvotert i 4 ml polystyren prøverør, sentrifugert og supernatanten kastet. Prøver som skulle testes ble fortynnet til en konsentrasjon på 200 µg/ml MoAs ekvivalenter i 10 % FCS media. 5 ytterligere fem-ganger seriefortynninger ble fremstilt fra hver 200 µg/ml prøve, og 0,05 ml ble tilsatt til hvert rør i duplikat. 0,05 ml av ¹²⁵J-MoAs ble tilsatt til hvert rør (optimal mengde bestemmes individuelt for hvert MoAs og porsjon). Prøver for positiv kontroll inneholdt celler, media og ¹²⁵J-MoAs. Bakgrunnsprøver inneholdt ikke-spesifikke celler, media og ¹²⁵J-MoAs. Cellene ble inkubert i 1 time ved 4°C, vasket en gang med 2 % FCS media, to ganger med PBS, overført og tellet som tidligere nevnt.

% ¹²⁵J-MoAs bindingshemmingen for hver prøve ble beregnet ved følgende formel:

$$\frac{A-B}{C-B} \times 100 = \% \text{ } ^{125}\text{J-MoAs bindingshemming}$$

A = Gjennomsnittlig CPM for prøven

B = Gjennomsnittlig CPM for bakgrunn

C = Gjennomsnittlig CPM for positiv kontroll

Diagrammet og % retensjon av immunoreaktivitet for hver prøve ble beregnet som tidligere diskutert, untatt at BD₅₀ i virkeligheten er BID₅₀ (dose av MoAs som er nødvendig for å gi 50 % hemming av bindingen av ¹²⁵J-MoAs).

Bemerkninger:

- 1) Rørene ble alltid kraftig vortex-behandlet umiddelbart etter tilsetning av hvert reagens i RIA.
- 2) En indre kontrollprøve som var lik 50 % av den ikke-manipulerte MoAs kontrollen ble innbefattet i hvert sett undersøkelser for å bekrefte hvorvidt den enkelte prosedyre

hva kvantitativt kunne forutsi konjugatets retensjon av immunoreaktivitet.

Resultatene av disse undersøkelsene er opplistet nedenfor i tabell 2.

Tabell 2
Immunoreaktivitet for MoAs konjugater

<u>Ikke-spesifikke konjugater som anvender produktet modifisert fra eks. 3 med:</u>	<u>Preparat</u>	<u>Immunoreaktivitet % av ikke-MoAs kontroll</u>
Lym 1	# 1	15
B72,3	# 1	70
	# 2	10
<u>Hydrazid av 3-merkaptopropionsyre disulfid analog av E33288γ_1^J (eks. 4) konjugert med:</u>		
Lym 1	# 1	100
	# 2	87
	# 3	64
	# 4	80
	# 5	100
Lym 2	# 1	57
	# 2	85
	# 3	39
	# 4	70
B72,3	# 1	100
	# 2	90
CT-M-01	# 1	60
MAC-68	# 1	40
	# 2	28
<u>Hydrazid konjugater fremstilt ved å bruke produktet fra eks. 5 med:</u>		
Lym 1	# 1	100
	# 2	100

De monoklonale antistoff-konjugatene fremstilt ifølge denne oppfinnelsen er aktive som midler mot kreft. Undersøkelsen som er beskrevet nedenfor for å bestemme cytotoxiciteten in

vitro, viser hvordan konstruksjonene dramatisk foretrekker målcelle-linjene i motsetning til ikke-målcellene, og gir et mål for brukbarheten av målrettede former av forbindelsene sammenlignet med deres ikke-målrettede motstykker.

Undersøkelser av cytotoxicitet In vitro

Prøver som skal undersøkes ble fortynnet til en konsentrasjon på 0,2 eller 0,02 $\mu\text{g/ml}$ av LL-E33288 γ_1^J ekvivalenter (utgangs-konsentrasjonen er avhengig av den cellelinjen som skal testes). Tre ytterligere fem-ganger fortynninger ble fremstilt fra hver opprinnelige prøvefortynning, og 0,2 ml ble tilsatt til sterile 15 ml polystyrenrør. Minst ett lignende konjugat bestående av LL33288 γ_1^J og et irrelevant MoAs ble innbefattet i hver undersøkelse for å bestemme spesifisiteten av det relevante konjugatet. 10^5 høvelige målceller i 0,2 ml av 10 % FCS media ble alikvotert i rørene og vortex-behandlet. I tillegg ble en identisk test utført ved å anvende de irrelevante celler som mål for ytterligere å bekrefte spesifisiteten av relevant konjugat. MoAs kontroller fikk bare ekvivalente mengder av MoAs, og positive kontrollprøver fikk bare 10 % FCS media.

Cellene ble inkubert ved 37°C i 7 minutter, deretter vasket 4 ganger med 8 ml av 2 % FCS media. 0,1 ml av 10 % FCS ble tilsatt til hvert rør, cellene ble vortex-behandlet og 0,2 ml ble alikvotert til hver av brønnene i en steril 96-brønners polystyrenplate med vevskultur.

Platene ble inkubert i to døgn i en fuktig 37°C inkubator med 5 % CO_2 . Halvpartene av mediene ble fjernet og erstattet med friske media inneholdende 2 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H thymidin (DuPont, NEN, Cat# NET-027). Inkubasjonen ble fortsatt i 24 timer, cellene ble flosset, tint og høstet med en PHD cellehøster (Cambridge Technology, Inc.). Hver prøve ble tellet i 1 minutt i en Beckman LS 5800 scintillasjonsteller på kanal 1.

% veksthemming ble beregnet som følger:

$$\frac{\text{Gjennomsnittlig CPM for testverdien}}{\text{Gjennomsnittlig CPM for mediakontroll}} \times 100 = \% \text{ vekst}$$

$$100 - \% \text{ vekst} = \% \text{ Hemming}$$

Hemmingsprosenten ble avsatt på ikke-log skalaen i et semi-log diagram og LL-E33288 γ_1^J konsentrasjonen ble avsatt på log skalaen. IC₅₀ (konsentrasjonen av LL-E33288 γ_1^J som er nødvendig for å gi 50 % hemming) av hver testprøve ble tatt ut fra diagrammet, og mengden retensjon av cytotoxissitet ble beregnet ved følgende ligning:

$$\frac{\text{IC}_{50} \text{ av LL-E33288}\gamma_1^J}{\text{IC}_{50} \text{ av testprøve}} \times 100 = \% \text{ retensjon av cytotoxissitet}$$

Resultatene av cytotoxissitets-undersøkelsen in vitro er listet opp nedenfor i tabell 3.

Tabell 3

In vitro cytotoksisitet av MoAs konjugater

	MoAs	Preparat	Cytotoksisitet	
			$\%E33288\gamma_1^J$	$\%$ produkt av eksempel 1
Ikke-spesifikke konjugater fremstilt ved å bruke produktet fra eksempel 3 med:				
	Lym 1	# 1	0,9	11,3
	B72,3	# 1	0,001	
		# 2	1,4	3,8

	MoAs	Preparat	Cytotoksisitet	
			$\%E33288\gamma_1^J$	$\%$ produkt av eksempel 4
Hydrazid-konjugater fremstilt ved å bruke produktet fra eksempel 4 med:				
	Lym 1	# 1		80
		# 2	56	191
		# 3	40	60
	Lym 1	(# 3 mot ikke-målrettede celler)	0	0
	Lym 2	# 1		29
		# 2	2	100
		# 3	2	55
	B72,3	# 1	0	0
		# 2	0	0
	MAC-68	# 1		90
	CTM-01	# 1	111	830

	MoAs	Preparat	Cytotoksisitet	
			$\%E33288\gamma_1^J$	$\%$ produkt av eksempel 5
Hydrazid-konjugater fremstilt ved å bruke produktet fra eksempel 5 med:				
	Lym 1	# 1	300	
		# 2	100	

Følgende undersøkelses-system ble brukt for å måle in vivo aktiviteten av konjugatene fremstilt ifølge denne oppfinnelsen.

In vivo tester for antitumor aktivitet på medikament-monoklonale antistoff-konjugater ble utført ved å bruke humane tumor xenografer på atymiske (nakne) mus.

Burkitt lymphoma (Raji) og myeloma (HS Sultan) celler ble høstet fra kulturflasker og inokulert subkutant ($\geq 80 \times 10^6$ Raji celler eller 40×10^6 HS Sultan celler) i forsøksmus. Faste tumorer, ovarie-karcinom (CA73, Ovcara-3) og bryst-karcinom (MX-1) ble frembragt i atymiske mus, fjernet, skåret i 2 mm^3 fragmenter og implantert subkutant i forsøksmus (5-8 fragmenter pr. mus).

Medikamenter, monoklonale antistoffer og medikament-monoklonalt antistoff-konjugater ble administrert intra-peritonealt en gang hver tredje dag med tilsammen 3 eller 5 injeksjoner, begynnende på dag 2, 3, 4, 6, 7 eller 8 dager etter tumor-implantering. Målinger av tumor (lengden og bredden av tumoren) ble utført ved hjelp av en Fowler ultra CAL II elektronisk caliper hver 7. dag i 4 eller 5 uker etter tumor-implantering. Tumormasse i mg ble anslått fra formelen:

$$\frac{\text{Lengde (mm)} \times \text{bredde (mm)}}{2}$$

2

Hemmingen av tumorveksten ble beregnet for hver forsøksgruppe som en prosent av kontrollen (midlere mg av behandlet (T) dividert med midlere mg av kontroll (C) x 100). En T/C verdi $\leq 42 \%$ i grupper med $\geq 65 \%$ overlevende dyr ansees som nødvendig for å demonstrere aktivitet.

Resultatene fra denne undersøkelsen vises i tabell 4.

Tabell 4

In vivo antitumor forsøksresultater

	<u>Dosering (mcg)</u>		<u>Tumor-størrelse</u>	<u>S/T</u>
	<u>MoAs</u>	<u>Medika- ment</u>	<u>(T/C) % kontroll</u>	
Hydrazid av 3-merkaptopropionsyre disulfid analog av E33288 _{r1} ^J konjugert med Lym 2	14,5	0,26	12	5/6
Hydrazid alene	-	0,26	34	4/6
MoAs Lym 2 alene	14,5	-	32	6/6
Blanding, hydrazid + MoAs Lym 2	14,5	0,26	20	5/6

ip behandling mot human melanoma cellelinje H.S. Sultan, 3 injeksjoner begynnende på dag 5 etter tumor-implantering, de gitte målingene utført på dag 35 etter implanteringen.

	<u>Dosering (mcg)</u>		<u>Tumor-størrelse</u>	<u>S/T</u>
	<u>MoAs</u>	<u>Medika- ment</u>	<u>(T/C) % kontroll</u>	
Hydrazid av 3-merkaptopropionsyre disulfid analog av E33288 _{γ1} ^J konjugert med MAC-68	15,5	0,25	39	7/7
Hydrazid alene	-	0,25	-	0/6
MoAs MAC-68 alene	31	-	78	6/6
Blanding, hydrazid + MoAs MAC-68	15,5	0,25	-	0/6
Melphalan (som positiv kontroll)	-	10	43	6/6

ip behandling mot human ovariekreft linje CA73, tre injeksjoner påbegynt tre døgn etter tumor-implantering, de gitte målinger utført på dag 35 etter implanteringen

Tabell 4 (fortsatt)

	<u>Dosering (mcg)</u>		<u>Tumor-størrelse</u> <u>(T/C) % kontroll</u>	<u>S/T</u>
	<u>MoAs</u>	<u>Medika- ment</u>		
Hydrazid av 3-merkaptopropionsyre disulfid analog av E33288 _{r1} ^J konjugert med CT-M-01	8,75	0,25	14	4/6
Hydrazid alene	-	0,25	-	0/6
MoAs CT-M-01 alene	8,75	-	75	5/6
Blanding, hydrazid + MoAs CT-M-01	8,75	0,25		0/6
Vincristin (positiv kontroll)	-	1,0	0	4/4

ip behandling mot human brystkreft cellelinje MX-1, tre injeksjoner startet på dag 2 etter tumor-implantering, de gitte målinger utført på dag 35 etter implanteringen.

	<u>Dosering (mcg)</u>		<u>Tumor-størrelse</u> <u>(T/C) % kontroll</u>	<u>S/T</u>
	<u>MoAs</u>	<u>Medika- ment</u>		
Hydrazid av 3-merkaptopropionsyre disulfid analog av E33288 _{r1} ^J konjugert med B72,3	6,2	0,125	62	6/6
Hydrazid alene	-	0,125	85	6/6
MoAs B72,3 alene	6,2	-	96	6/6
Blanding, hydrazid + MoAs B72,3	6,2	0,125	105	5/6
E33288 _{r1} ^J (3 behandlinger)	-	0,005	141	5/6
Cis platina (positiv kontroll, 3 behandlinger)	-	3,0	6	6/6

ip behandlinger mot human ovariecellelinje OVCAR-3, fem injeksjoner som startet på dag 4 etter tumor-implantering (dersom intet annet er bemerket), de gitte målingene utført på dag 35 etter implanteringen.

Tabell 4 (fortsatt)

	<u>Dosering (mcg)</u>		<u>Tumor-størrelse</u> <u>(T/C) % kontroll</u>	<u>S/T</u>
	<u>MoAs</u>	<u>Medika-</u> <u>ment</u>		
Hydrazid av 3-merkaptopropionsyre disulfid analog av E33288 _{r1} ^J konjugert med Lym 1	27	0,26	6	3/6
Hydrazid alene	-	0,26	72	6/6
MoAs Lym 1 alene	27	-	72	6/6
Blanding, hydrazid + MoAs Lym 1	13	0,13	61	4/6

ip behandling mot human Burkitt lymfoma cellelinje Raji TC, tre injeksjoner som begynte på dag 7 etter tumor-implantering, de gitte målingene utført på dag 28 etter implantering.

Oppfinnelsen vil bli ytterligere beskrevet i forbindelse med følgende ikke-begrensede eksempler som omfatter både fremstilling av mellomprodukter og sluttprodukter.

Eksempel 1

3-Merkaptopropionsyre disulfid analog av

LL-E33288_{r1}^J

Til en løsning av 90 mg av LL-E33288_{r1}^J i 90 ml av acetonitril ble tilsatt 10,6 mg av 3-merkaptopropionsyre i 1 ml acetonitril. Løsningen ble vortex-behandlet og deretter lagret ved -20°C i 6 døgn. Løsningsmiddelet ble fjernet in vacuo og residuet kromatografert over 10 ml silicagel i metylenklorid. Kolonnen ble utviklet med 50 ml metylenklorid, 50 ml 4 % metanol i metylenklorid og til slutt med 100 ml 8 % metanol i metylenklorid. Inndamping av denne siste fraksjonen ga et residuum som ble tatt opp i etylacetat ved hjelp av litt aceton og tilsatt dråpevis til et overskudd av heksan. Bunnfallet ble oppsamlet og tørket, og ga 39 mg av det ønskede produktet (FABMS, M+H 1394). Retensjonstiden på C₁₈ reversfase HPLC: 18 minutter med 50 % acetonitril/0,1 M vandig ammoniumklorid. (LL-E33288_{r1}^J: 8,0 minutter, esterhydrolyseprodukt: 1,5

minutter).

Eksempel 2

Reaksjon av LL-E33288 γ_1^J med p-nitrofenylesteren
av 3-merkaptopropionsyre

(A) Fremstilling av p-nitrofenylester av 3-merkaptopropionsyre

Kommersiell 3-merkaptopropionsyre i metylenklorid inneholdende en katalytisk mengde av konsentrert svovelsyre ble behandlet med isobutylene i 20 minutter. Løsningen ble deretter ekstrahert med 1N natriumbikarbonat-løsning, hvoretter metylen-kloridløsningen ble tørket ved bruk av vannfritt magnesiumsulfat. Løsningen ble deretter inndampet til en fargeløs mobil væske, hvis NMR og masse-spektroskopiske data indikerte at det var S-t-butylmerkaptopropionsyren, t-butylesteren.

En alikvot av denne esteren ble oppvarmet med tilbakeløp med 6N saltsyre i dioksan i 2,5 timer. Løsningsmiddelet ble fordampet, etylacetat ble tilsatt og denne løsningen ble ekstrahert med natriumkarbonat. Natriumkarbonat-ekstraktet ble behandlet med 6N saltsyre inntil pH av suspensjonen var 2,0. Suspensjonen ble deretter ekstrahert med etylacetat, ekstraktet tørket over vannfritt magnesiumsulfat og løsningsmiddelet inndampet til en fargeløs væske hvis $^1\text{H-NMR}$ og masse-spektroskopiske data indikerte at den var S-t-butyl-merkaptopropionsyre.

Denne forbindelsen ble omdannet til p-nitrofenylesteren ved behandling med ekvimolare mengder av p-nitrofenol og dicykloheksylkarbodiimid i tetrahydrofuran i 4 timer. Dicykloheksylure bi-produktet ble fjernet ved filtrering og filtratet ble inndampet til en olje som ble rensert ved å passere den over nøytral silicagel ved bruk av løsningsmiddelsystemet heksan: metylenklorid (50:50). Det rene p-nitrofenylester-derivatet var en svakt gul, mobil olje.

Den frie merkaptanen ble demaskert ved følgende fremgangsmåte. S-t-butylmerkaptopropionsyre p-nitrofenylesteren ble løst i trifluoreddiksyre, og et svakt molart overskudd (10 %) av kvikksølv (II) acetat ble tilsatt. Blandingen ble omrørt i

30 minutter, deretter ble trifluoreddiksyren fordampet, og residuet tatt opp i dimetylformamid. Denne løsningen ble behandlet med hydrogensulfidgass i 15 minutter, deretter ble det sorte kvikksølv (II) sulfidet filtrert av, og filtratet inndampet under redusert trykk for å eliminere opptil 99 % av dimetylformamidet. Den resulterende svakt brunaktige mobile væsken ble rensset over nøytral silicagel ved å bruke heksan: metylenklorid (50:50). Hovedkomponenten ble vist ved ^1H NMR å inneholde en liten mengde av *t*-butylmerkpto-derivatet.

Analytisk HPLC over to Perkin-Elmer Pecosphere C_{18} kolonner i tandem (4,6 x 33 mm og 4,6 x 83 mm) og bruk av et gradient-system med 37,5/62,5 til 47,5/52,5 acetonitril og 0,1 M ammoniumacetat buffer ved pH 6,5 (eddiksyre) over en 12 minutters periode indikerte at produktet var 88 % av *p*-nitrofenylesteren av 3-merkaptopropionsyre og 10 % av den mindre polare *S-t*-butylmerkaptopropionsyre *p*-nitrofenylesteren. Det var også en mindre mengde fri *p*-nitrofenol tilstede.

(B) Reaksjon av *p*-nitrofenylester av 3-merkaptopropionsyre
med LL-E33288 γ_1^J

En 100 mg porsjon av LL-E33288 γ_1^J ble løst i 50 ml acetonitril. Til denne ble tilsatt en løsning av 25,7 mg *p*-nitrofenylester av 3-merkaptopropionsyre i en 1 ml acetonitril. Reaksjonen fikk stå ved -20°C i 48 timer. HPLC indikerte at reaksjonen var fullstendig. Løsningen ble inndampet til tørrhet og residuet tatt opp i 4-5 ml etylacetat ved bruk av ultralyd for å bringe dette i løsning. Blandingen ble filtrert og filtratet dryppet inn i 45 ml omrørt heksan. Det resulterende svakt gule faste stoffet ble oppsamlet og tørket under redusert trykk, og ga 93 mg av *p*-nitrofenylesteren av propionsyre-derivatet av LL-E33288 γ_1^J som påvist ved ^1H NMR. Ved FABMS kom $[\text{M}+\text{H}]$ -ionet tilsyne ved $\text{M}/\text{Z}=1515$.

Eksempel 3

N-hydroksyravsyreimidyl 3-merkaptopropionat disulfid
analog av LL-E33288 γ_1^J

Til en løsning av 5 mg av 3-merkaptopropionsyredisulfid analogen av LL-E33288 γ_1^J fra eksempel 1 i 0,5 ml tetrahydro-

furan ble tilsatt 0,45 mg N-hydroksyravsyreimid i 0,1 ml tetrahydrofuran og deretter 1,8 mg av dicykloheksylkarbodiimid i 0,2 ml tetrahydrofuran. Reaksjonen ble omrørt ved romtemperatur i 4 timer og ble deretter stoppet med et stort overskudd av heksaner. Det faste stoffet ble isolert ved filtrering og løst i etylacetat. Den resulterende løsningen ble vasket 3 ganger med saltløsning, tørket med magnesiumsulfat, og inndampet til 5 mg av det ønskede produktet som et brunfarget pulver som ble anvendt uten videre rensning. Retensjonstiden ved revers fase C₁₈ HPLC: 15 minutter med 40 % acetonitril/0,1 M vandig ammoniumklorid (utgangsmateriale: 6,0 minutter).

Eksempel 4

3-merkaptopropionylhydrazid-disulfid analog

LL-E33288 γ_1^J

Til 5,4 ml (3 ekv.) vannfritt hydrazin i 100 ml tilbake-løpende tetrahydrofuran under argon ble tilsatt dråpevis 9,2 ml (83 mmol) metyl 3-merkaptopropionat i 50 ml tetrahydrofuran i løpet av 2 timer. Løsningen ble oppvarmet med tilbake-løp i ytterligere 2 timer, inndampet, og deretter fortynnet og inndampet 2 ganger fra 300 ml toluen. Produktet ble tilført til en plugg av silicagel med 5 % etylacetat/kloroform og eluert fra pluggen med 20 % metanol/kloroform. Det resulterende 3-merkaptopropionylhydrazidet var en svakt rosa olje som størknet ved avkjøling, men smeltet ved romtemperatur.

Til 50 mg LL-E33288 γ_1^J i 50 ml acetonitril ved -15°C ble tilsatt 6,6 mg 3-merkaptopropionylhydrazid i 1 ml tetrahydrofuran. En ekvivalent trietylamin og/eller en ekvivalent eddiksyre ble tilsatt som katalysator. Reaksjonen ble omrørt ved 0°C i 1 time og løsningsmiddelet ble deretter fordampet. Residuet ble kromatografert på silicagel med en gradient på 10-15 % metanol i kloroform for å gi 26 mg av det ønskede produktet. Retensjonstiden ved revers fase C₁₈ HPLC: 5,0 minutter i 41 % acetonitril/0,1 M vandig ammoniumklorid.

Eksempel 5N-[[[(4-metyl-coumarin-7-yl)amino]acetyl]cysteinhydrazid
disulfid analog LL-E33288_γ^J

En blanding av 1,0 g (5,7 mmol) av 4-metyl-7-amino-coumarin, 3,0 ml etylbromacetat (5 ekv.), 90 mg (0,1 ekv.) natriumjodid, og 30 ml dimetylformamid ble oppvarmet under argon ved 80°C i 5 timer. Blandingen ble avkjølt, fortynnet med etyleter, vasket tre ganger med 50 % saltløsning, tørket med magnesiumsulfat, og inndampet til tørrhet. Det rå produktet ble løst i kloroform som inneholdt 1 % etylacetat, og filtrert gjennom en plugg av silicagel. Omkrystallisering fra dietyleter som inneholdt spor av kloroform, ga ren etyl N-[(4-metyl-coumarin-7-yl)amino]acetat.

Til 1,96 g (7,5 mmol) av esteren ovenfor i 15 ml metanol og 15 ml tetrahydrofuran ble tilsatt 10 ml 1N vandig natriumhydroksyd. Etter 30 minutter ble tilsatt 4 ml 10 % vandig saltsyre. De organiske løsningsmidlene ble fordampet, og det resulterende krystalline produktet ble filtrert og vasket med kald etanol og deretter eter. Dette stoffet ble løst i 20 ml tetrahydrofuran og 4 ml dimetylformamid. Dicykloheksylkarbonyl-diimidazol (1,3 g, 2,2 ekv.) ble tilsatt og reaksjonen omrørt i 15 minutter. Cysteinetylesterhydroklorid (1,6 g, 2,5 ekv.) og trietylamin (1,2 ml) ble deretter tilsatt. Etter ytterligere 3 timer, ble reaksjonen fortynnet med etyleter inneholdende 5 % metylenklorid og vasket en gang med 10 % vandig saltsyre og 2 ganger med saltløsning. Etter tørking med magnesiumsulfat og fordampning av løsningsmidlene, ble det rå produktet krystallisert ved oppløsning i kloroform inneholdende en minimal mengde etanol og deretter tilsetning av et overskudd av eter. Krystallene ble filtrert og tørket for å gi ren N-[[[(4-metyl-coumarin-7-yl)amino]acetyl]-cysteinetylester.

En blanding av 5 ml kloroform, 20 ml metanol, og 0,4 ml hydrazinhydrat ble oppvarmet til tilbakebø under argon. Til dette ble tilsatt 550 mg N-[[[(4-metyl-coumarin-7-yl)amino]acetyl]-cysteinetylester. Etter 9 timers tilbakebø ble blandingen avkjølt, og det faste produktet ble filtrert og

vasket med kloroform og deretter etyleter. Det rå produktet (som inneholdt thiol og disulfid) ble løst i dimetylformamid inneholdende ditiotreitol og trietylamin. Etter 30 minutter ble produktet utfeldd med overskudd av etyleter og oppsamlet ved filtrering. Dette stoffet ble rensset videre ved omkrySTALLISERING fra avgasset acetonitril som inneholdt ditiotreitol og spor av trietylamin for å gi rent N-[[[4-metyl-coumarin-7-yl)amino]-acetyl]cysteinhydrazid.

Til 12 mg 70 % rent LL-E33288 γ_1^J i 12 ml acetonitril ved 0°C ble tilsatt 4 mg N-[[[4-metyl-coumarin-7-yl)amino]acetyl]-cysteinhydrazid i 1,2 ml dimetylformamid. Etter omrøring over natten ble tilsatt ytterligere 2 mg N-[[[4-metyl-coumarin-7-yl)amino]acetyl]cysteinhydrazid i 0,6 ml dimetylformamid. Reaksjonen ble omrørt i 3 døgn ved 0°C og filtrert. Acetonitrilet ble inndampet, og den resulterende dimetylformamid-løsningen ble fortynnet med overskudd av 1:1 heksaner/eter. Produktet ble isolert ved filtrering og ytterligere rensset ved kromatografi på silicagel med en 15-20 % gradient av metanol i kloroform for å gi 3 mg av det ønskede produktet. Retensjonstiden ved revers fase C₁₈ HPLC: 3,5 minutter ved bruk av 45 % acetonitril/0,1 M vandig ammoniumklorid.

Eksempel

3-merkaptopropionylhydrazid disulfid analog

LL-E33288 α_3^J

Til 10 mg LL-E33288 α_3^J i 9 ml acetonitril ved -15°C ble tilsatt 6,6 mg av 3-merkaptopropionylhydrazid i 1 ml acetonitril. En ekvivalent trietylamin og/eller en ekvivalent eddiksyre ble tilsatt som katalysator. Reaksjonen ble omrørt ved 0°C i 1 time, og løsningsmiddelet ble deretter fordampet. Residuet ble kromatografert på silicagel med en gradient på 10-15 % metanol i kloroform for å gi det ønskede produktet. Retensjonstiden ved revers fase C₁₈ HPLC: 3,5 minutter i systemet 45 % acetonitril/0,1 M vandig ammoniumklorid.

Eksempel 7Ikke-spesifikk konjugasjon med proteiner

Hydroksyravsyreimidesteren beskrevet i eksempel 3 ble kovalent bundet til antistoffer under svakt alkaliske betingelser. Det følgende er en generell fremgangsmåte som brukes for å lage de antistoffkonjugatene som er oppført i tabell 5. Antistoff ved en konsentrasjon på 3-5 mg/ml i fosfatbuffer inneholdende 0,1M natriumklorid, pH 7,5, ble omsatt med et 5-20 ganger molart overskudd av produktet fra eksempel 3 med omrøring, ved romtemperatur i fra 1-4 timer. Det konjugerte proteinet ble avsaltet kromatografisk, og aggregert protein ble separert fra monomert materiale ved gelfiltrering HPLC. Monomere fraksjoner ble oppsamlet og konsentrert.

Tabell 5

Ikke-spesifikke konjugater fremstilt ved bruk av produktet fra eksempel 3

MoAs	Medikament-innhold
	<u>M/M</u>
Lym 1	5,2
B72,3	6,0
B72,3	2.9

Eksempel 8Fremstilling av sete-spesifikt konjugat

Den generelle fremgangsmåten for å binde hydrazid-derivater av medikamenter til oksyderte antistoffer er beskrevet i T.J. McKearn, et al., i U.S. patent Nr. 4.671.958. Fremgangsmåten er blitt anvendt for å fremstille antistoff-konjugater fra produktene i eksemplene 4 og 5 med spesielle modifikasjoner som beskrevet nedenfor. Produktene fra disse reaksjonene og deres karakteristika er sammensatt i tabell 6.

(A) Oksydasjon av antistoff. Antistoff ved en konsentrasjon på 5 til 10 mg/ml ble dialysert over natten mot et 200 gangers volum av 50 mM natriumacetatbuffer, pH 5,5, inneholdende 0,1 M natriumklorid (buffer A). Etter dialyse ble MoAs oksydert ved 15 mM til 200 mM perjodsyre i 0,2 M natriumacetat. Oksyda-

sjonen fikk foregå i mørke under omrøring, ved 4°C i 45 minutter, hvorefter det oksyderte MoAs ble avsaltet på en kolonne med ≥ 5 bed volum Sephadex G-25. Oksydasjonsgraden for antistoffet ble bestemt ved å omsette med p-nitrofenylhydrazin og sammenligne absorbansen av proteinet ved 280 nm mot p-nitrofenylhydrazin ved 395 nm.

(B) Medikamenthydrazid-konjugasjon. Det oksyderte MoAs ble omsatt med 25 til 200 ganger molart overskudd av medikamenthydrazid. Hydrazidene ble løst i dimetylformamid og tilsatt til den vandige løsningen av MoAs. For å unngå utfelling av MoAs overskred ikke det totale tilsatte volumet av dimetylformamid 10 % av det totale reaksjonsvolumet. Reaksjonen fikk foregå i 3 timer ved romtemperatur under røring. For å forhindre tverrbinding av ikke-omsatte aldehyder og påfølgende aggregering, ble tilsatt et blokkeringsmiddel, acetylhydrazid i 100-ganger molart overskudd 3 timer etter tilsetning av medikamenthydrazidet. For å stabilisere Schiff's base-bindingen mellom aldehyd og medikamenthydrazid (et hydrazon), ble produktet vanligvis redusert til et alkylhydrazin ved tilsetning av 10 mM natriumcyanborhydrid, og reaksjonen fikk fortsette i ytterligere en time (samlet konjugeringstid - 4 timer). Konjugatet ble kromatografisk avsaltet og fullstendig dialysert (minimum tid 48 timer) over i pH 6,5 fosfatbuffer for lagring og utprøving.

Konjugatene ble analysert på tilstedeværelse av aggregater ved gelfiltrering HPLC og på fritt medikament ved revers fase HPLC. Medikamentinnholdet ble bestemt spektroskopisk ved bruk av ekstinksjons-koeffisienter for både antistoffet og medikamentet for å bestemme molare konsentrasjoner av medikament i konjugatene.

Tabell 6

Hydrazidkonjugater fremstilt av produktet fra eksempel 4

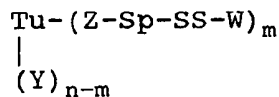
<u>MoAs</u>	<u>Preparat</u>	<u>Medikament-innhold</u>
Lym 1	# 1	1,4
	# 2	2,4
	# 3	1,0
	# 4	6,7
	# 5	3,3
Lym 2	# 1	2,9
	# 2	1,9
	# 3	2,0
	# 4	2,8
B72,3	# 1	2,3
	# 2	1,3
CTM-01		3,1
MAC-68		1,7

Hydrazidkonjugater fremstilt av produktet fra eksempel 5

Lym 1	# 1	0,15
	# 2	0,76

P A T E N T K R A V

1. Analogifremgangsmåte for å fremstille de terapeutisk aktive målrettede derivatene



av forbindelser med formelen $\text{CH}_3\text{SSS-W}$, hvori $\text{CH}_3\text{SSS-W}$ er et antitumor antibiotikum LL-E33288 α_1^{Br} , α_1^{J} , α_2^{Br} , α_2^{J} , α_3^{Br} , α_3^{J} , α_4^{Br} , β_1^{Br} , β_1^{J} , β_2^{Br} , β_2^{J} , γ_1^{Br} , γ_1^{J} , δ_1^{J} , BBM-1675, FR-900405, FR-900406, PD 114759, PD 115028, CL-1577A, CL-1577B, CL-1577D, CL-1577E eller CL-1724,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter

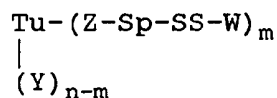
eller

å omsette forbindelsen med formelen Q-Sp-SS-W, hvori Sp og W er som tidligere definert heri, og Q er



med et molekyl med formelen Tu-(Y)_n,

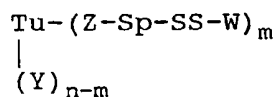
hvor Tu og n er som tidligere definert heri, og Y er en sidekjede aminogruppe, i en vandig bufret løsning med en pH mellom 6,5 og 9, ved en temperatur på mellom 4 og 40°C, innbefattet, for å frembringe forbindelser med formelen :



hvori Tu, Sp, Y og n er som tidligere definert heri, m er 1-15, og Z er dannet ved kovalent reaksjon mellom Q og Y og er definert som -CONH-

eller

å omsette en forbindelse med formelen Q-Sp-SS-W, hvori Sp og W er som tidligere definert heri, og Q er -CONH₂ med salpeter-syrling i vandig acetonitril for å frembringe en forbindelse med formelen Q-Sp-SS-W, hvori Sp og W er som tidligere definert heri og Q er -CON₃ med en forbindelse med formelen Tu-(Y)_n, hvori Tu, Y og n er som tidligere definert heri for å frembringe en forbindelse med formelen

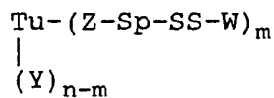


hvori Tu, Z, Sp, W, m, Y og n er som heri definert ovenfor;

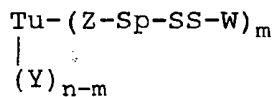
eller

å omsette en forbindelse med formelen Q-Sp-SS-W hvori Sp og W er som tidligere definert heri og Q er -CONH₂, med et molekyl med formelen Tu-(Y)_n hvori Tu er som tidligere defi-

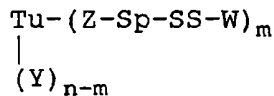
nert heri, Y er et aldehyd frembragt fra karbohydratresiduer på Tu ved oksydasjon i nærvær av et periodat av et alkalisk jordmetall i en vandig buffer med pH mellom 4,0 og 6,5, ved 4 til og med 40°C, og n er 1 til 20 for å frembringe en forbindelse med formelen:



hvor Tu, Sp, W, Y og n er som tidligere definert heri, og Z er laget ved kovalent reaksjon av Q og Y og er -CONHN=CH-, og m er 0,1 til 15; eller å behandle forbindelse umiddelbart ovenfor med formelen:

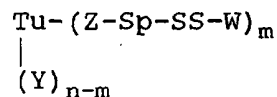


hvor Tu, Z, Sp, W, Y, n og m er som umiddelbart ovenfor definert med acetylhydrazin i en vandig buffer ved pH mellom 4,0 og 6,5, ved 4 til og med 40°C, for å frembringe en forbindelse med formelen:



hvor Tu, Z, Sp, W, n og m er som umiddelbart ovenfor definert, og Y er -CH=NNHCOCH₃,
og

å omsette denne forbindelsen med natriumcyanborhydrid i en vandig buffer ved pH på 4,0 til 6,5, ved en temperatur på 4 til og med 40°C, for å frembringe en forbindelse med formelen:



hvor Tu, Sp, W, m og n er som tidligere definert heri, Z er -CONHNHCH₂-, og Y er -CH₂NHNHCOCH₃.

2. Fremgangsmåte ved fremstilling av derivatene ifølge krav 1, hvor CH₃SSW er LL-E33288γ₁^J, Q er 4-nitrofenylesteren av en karboksylgruppe, Sp er -CH₂CH₂-, Tu er det monoklonale antistoffet CT-M-01, Y er -NH₂, Z er -CONH-, og m er 0,5 til

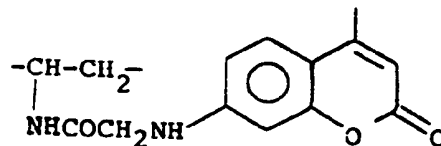
15,

karakteriseret ved at man anvender tilsvarende substituerte utgangsmaterialer.

3. Fremgangsmåte ved fremstilling av derivatene ifølge krav 1, hvori CH_3SSW er LL-E33288 γ_1^J , Q er hydroksyravsyreimidesteren av en karboksylgruppe, Sp er $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, Tu er det monoklonale antistoffet MAC-68, Y er $-\text{NH}_2$, Z er $-\text{CONH}-$, og m er 0,5 til 15, karakteriseret ved at man anvender tilsvarende substituerte utgangsmaterialer.

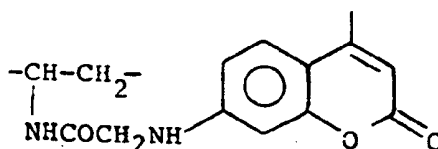
4. Fremgangsmåte ved fremstilling av derivatene ifølge krav 1, hvori CH_3SSW er LL-E33288 γ_1^J , Q er $-\text{CONHNH}_2$, Sp er $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, Tu er det monoklonale antistoffet Lym 1, Y er $-\text{CHO}$, Z er $-\text{CONHNHCH}_2-$, og m er 0,1 til 10, karakteriseret ved at man anvender tilsvarende substituerte utgangsmaterialer.

5. Fremgangsmåte ved fremstilling av derivatene ifølge krav 1, hvori CH_3SSW er LL-E33288 γ_1^J , SpQ er



Tu er det monoklonale antistoffet B72,3, Y er $-\text{CHO}$, Z er $-\text{CONHNHCH}_2-$, og m er 0,1 til 10, karakteriseret ved at man anvender tilsvarende substituerte utgangsmaterialer.

6. Fremgangsmåte ved fremstilling av derivatene ifølge krav 1, hvori CH_3SSW er LL-E33288 γ_1^J , SpQ er



176480

35

Tu er det monoklonale antistoff Lym 2, Y er -CHO, Z er
-CONHNHCH₂-, og m er 0,1 til 10,
k a r a k t e r i s e r t v e d at man anvender tilsvarende
substituerte utgangsmaterialer.

UV AV LL-E33288 γ , I

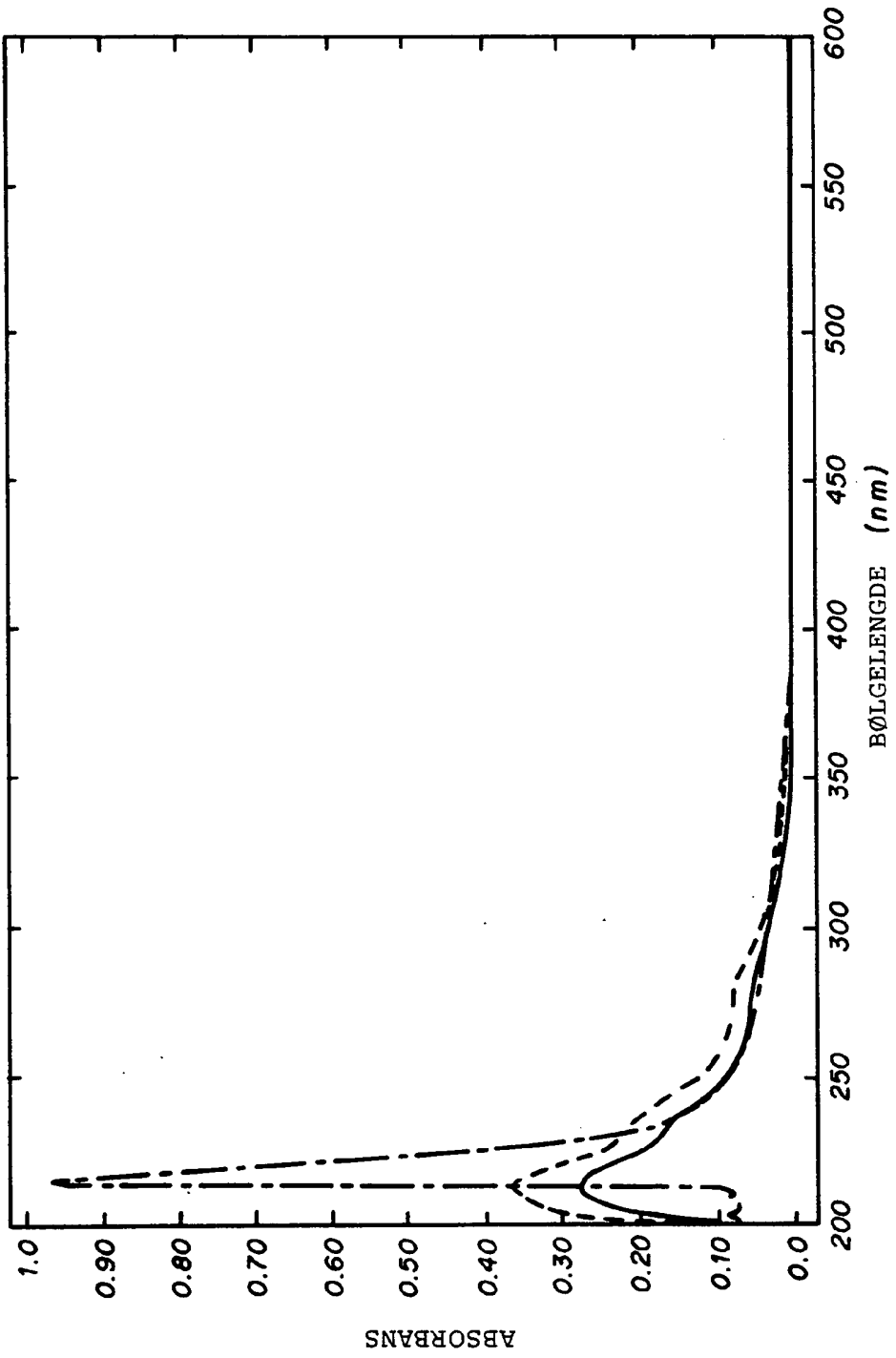


FIG. 1

PMR AV LL-E33288, 8, I

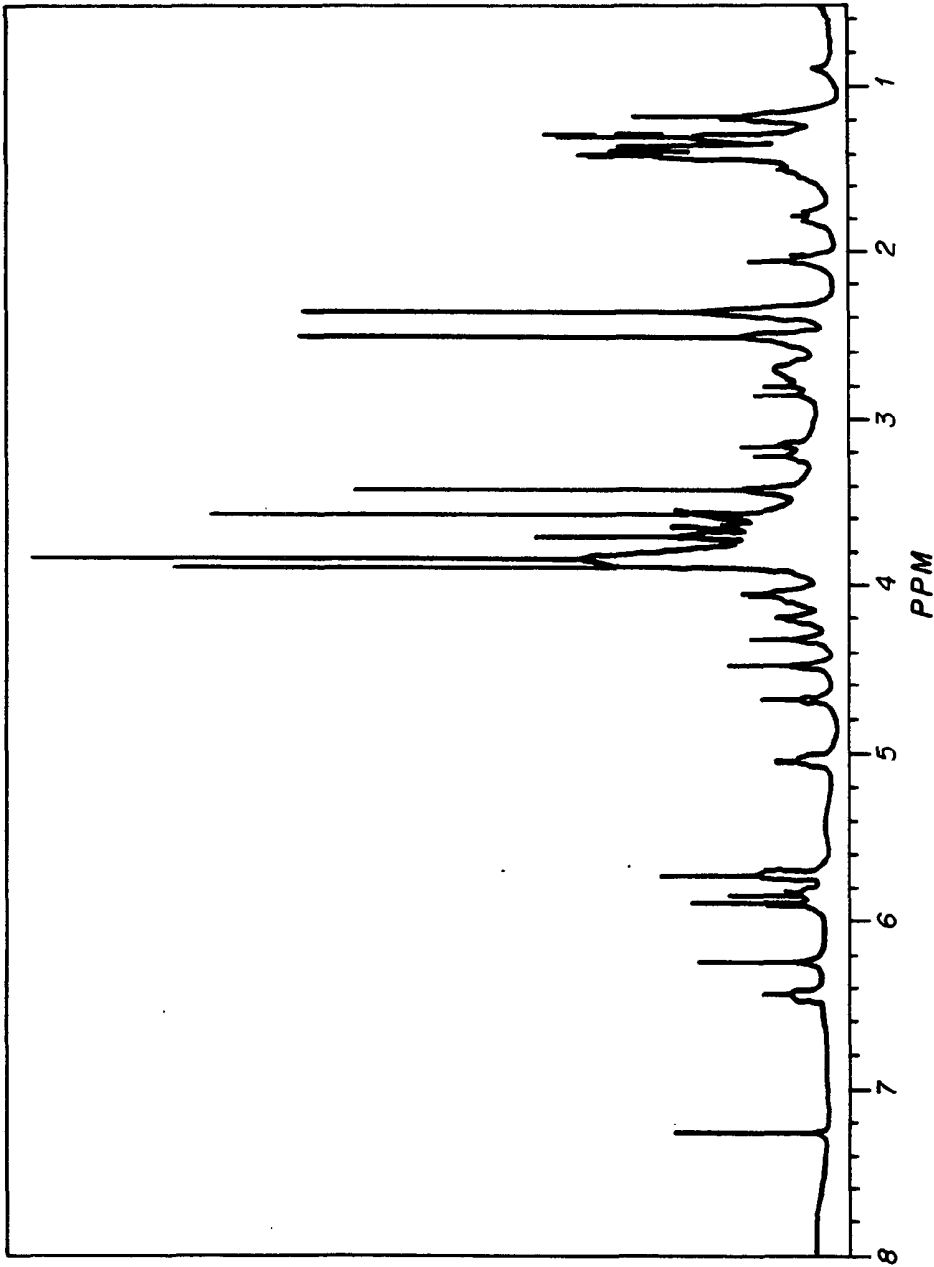


FIG. 2

176480

3/3

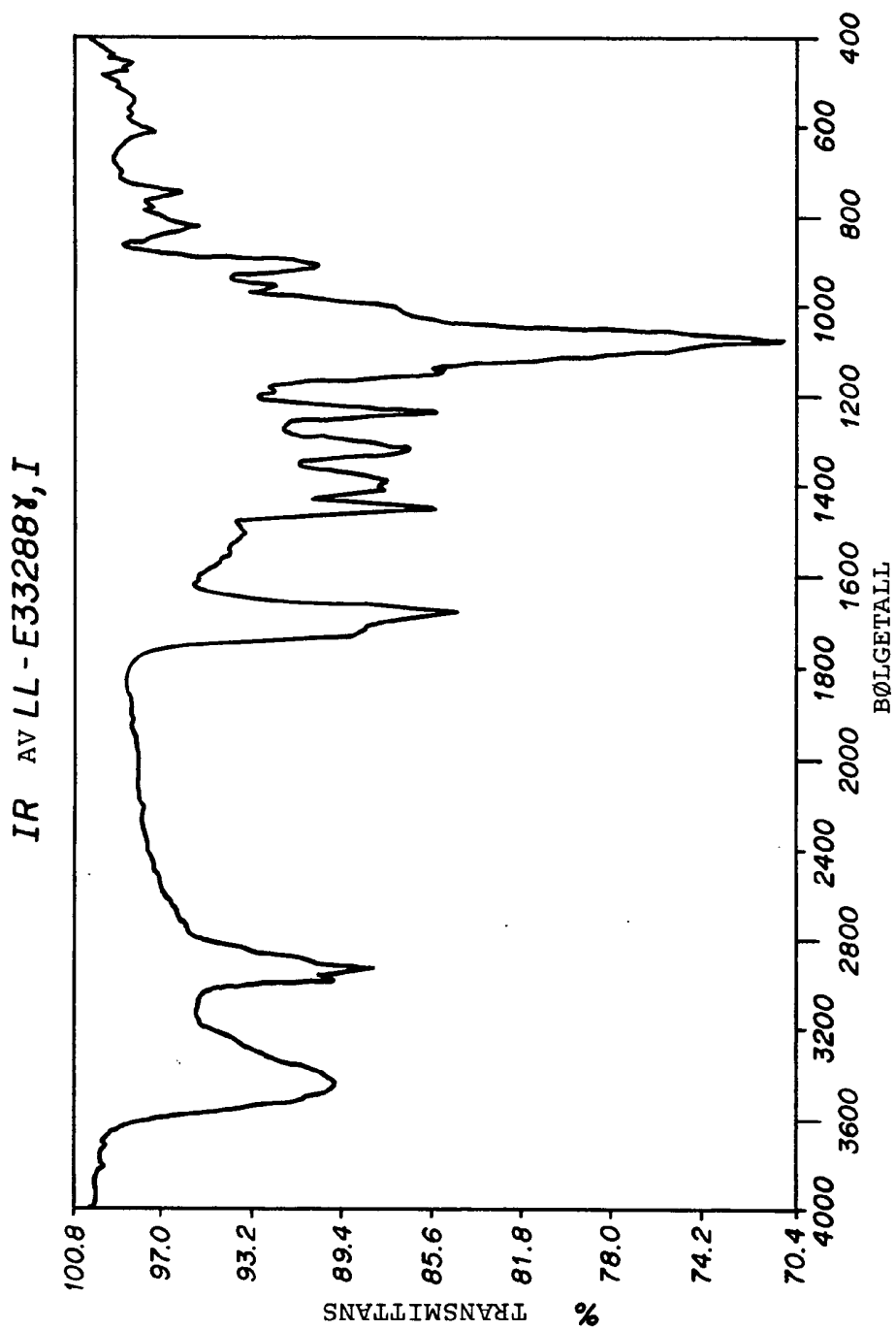


FIG. 3