



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

235525

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³

C 07 D 519/04
C 07 G 7/00
/A 61 K 37/04

(22) Přihlášeno 11 01 82
(21) (PV 226-82)
(32) (31)(33) Právo přednosti od 12 01 81
(8100847) Velká Británie

(40) Zveřejněno 31 08 84

(45) Vydáno 15 11 86

(72) Autor vynálezu

ROWLAND GEORGE FERDINAND, BUCKINGHAMSHIRE,
SIMMONDS ROBIN GEORGE, BERKSHIRE (Velká Británie)

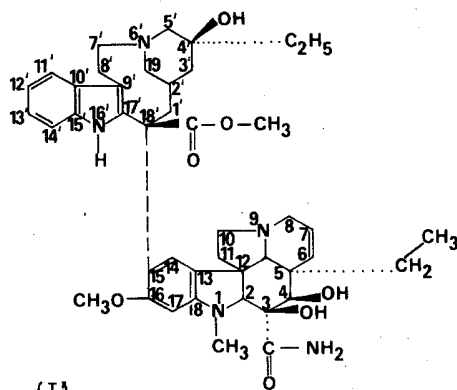
(73) Majitel patentu

LILLY INDUSTRIES LIMITED, LONDÝN (Velká Británie)

(54) Způsob přípravy konjugátu obsahujícího imunoglobulin
nebo imunoglobulinový fragment

Vynález se týká nových imunoglobulinových konjugátů, které jsou prostředky proti rakovině.

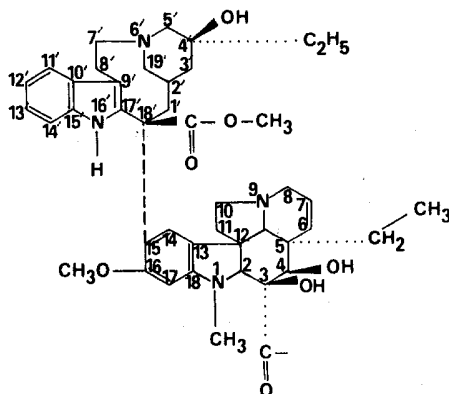
Při chemoterapeutickém ošetřování rakoviny je často nutné používat léčiv, která jsou ve své účinnosti omežována vedlejšími účinky na nemocného a proto se stále věnuje úsilí snižovat takové vedlejší účinky na minimum. Jedním takovým léčivem je vindesin, což je sloučenina následujícího vzorce I



(I)

Způsob přípravy a biologická účinnost vindesinu jsou popsány například v britském patentovém spise číslo 1 463 575.

Tento vynález se týká nového konjugátu obsahujícího imunoglobulin nebo imunoglobulinový fragment, kterým je Fab, Fab' nebo $F(ab)_2$ nebo IgM monomer modifikovaný jednou skupinou následujícího vzorce II,



(II)

která je na něj kovalentně vázána.

Imunoglobulin nebo imunoglobulinový fragment je protilátka nebo fragment protilátky se zjišťovacími vlastnostmi pro antigen. Výhodným imunoglobulinovým materiálem je protilátka nebo fragment protilátky přizpůsobené pro zjišťování povrchových antigenů maligních buněk t typu vyskytujícího se v lidském těle. Vynález se však týká také imunoglobulinových materiálů jiných druhů, jelikož je jich možno použít při ošetřování zvířat a při kontrolních a pokusných zkouškách.

Nové konjugáty jsou užitečné při ošetřování rakoviny. Jsou potenciálně účinnější a mají méně vedlejších účinků kromě jiného pro možnost zvýšení koncentrace cytotoxického léčiva v místě jeho působení.

Vynález se též týká konjugátů pro použití v nepřímém systému, ve kterém se jich používá pro zjištění protilátky specifické k buněčným povrchovým antigenům.

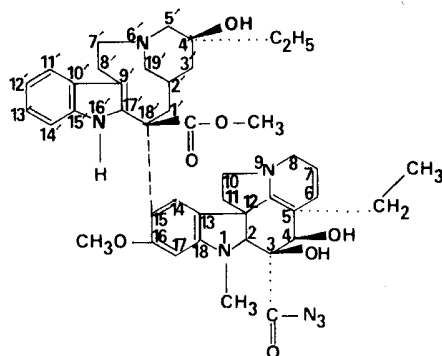
Imunoglobuliny specifické k antigenům na povrchu usmrcovaných buněk a techniky jejich přípravy ze séra imunizovaných zvířat nebo kultivací monoklonálních produktů vylučujících hybridomy, jsou dobře známy. Výhodným typem protilátky je imunoglobulin skupiny IgG. Jakožto některé reprezentativní imunoglobuliny se uvádějí:

- I. Ig z kozy nebo z ovce imunizované karcinoembryonickým antigenem;
- II. Ig z králíčího antiakutního lymfoblastického leukemického sera;
- III. Ig z antiser různých primátů proti akutní lymfoblastické leukemii, akutní myeloblastické leukemii, proti chronické lymfoblastické leukemii a proti chronické granulocytické leukemii;
- IV. Ig z koz a z ovcí imunizovaných materiálem z plicního karcinomu;
- V. monoklonální Ig z maších hybridomů vylučujících anti-humánní kolorektální karcinomatické protilátky;

- VI. monoklonální Ig z myších hybridomů vylučujících antihumánní melanomtické protilátky;
- VII. monoklonální Ig z myších hybridomů vylučujících protilátky reagující s lidskými leukemickými buňkami;
- VIII. monoklonální Ig z myších hybridomů vylučujících protilátky reagující s lidskými neuroblastomovými buňkami;
- IX. monoklonální Ig z myších hybridomů vylučujících protilátky reagující s lidskými antigeny rakoviny prsu;
- X. monoklonální Ig z myších hybridomů vylučujících protilátky reagující s buňkami lidského karcinomu vaječníků;
- XI. monoklonální Ig z myších hybridomů vylučujících protilátky reagující s lidskými osteosarkomovými buňkami.

Jak shora uvedeno, může se konjugát připravit také s imunoglobulinovými fragmenty, označovanými jako Fab, Fab' nebo $F(ab)_2$ nebo IgM monomer odvozený od antilátky například digestí s proteolytickým enzymem. Takové materiály a způsoby přípravy jsou dobře známy a připomíná se, že výhodnými proteolytickými enzymy jsou pepsin a papain.

Vindesin vzorce I se může vázat na imunoglobulinový materiál přes atom uhlíku karboxylového zbytku v poloze 3 reakcí se vhodným azidovým derivátem, přičemž se tedy vynález týká způsobu přípravy protirakovinového činidla reakcí imunoglobulinu nebo imunoglobulinového fragmentu s azidovou sloučeninou vzorce III



(III)

Tento způsob znamená vhodnou cestu vázání léčiva vindesin na imunoglobulin za mírných podmínek za zachování strukturální integrity imunoglobulinu.

Způsob se s výhodou provádí ve vodném prostředí a při teplotě 5 až 25 °C, například při teplotě místnosti, a při hodnotě pH 8,5 až 9,5, s výhodou při hodnotě pH 9,0 a vede k vázání kovalentní vazbou alespoň jednoho zbytku vinca na volné aminoskupiny imunoglobulinové molekuly například na volné aminoskupiny odvozené od lysinových zbytků. Počet vázaných zbytků závisí na koncentraci reakčních složek a na době trvání reakce, avšak střední počet je zpravidla alespoň 1, například 2 až 5.

Například při provádění reakce se pomalu po kapkách přidává roztok azidu ve vhodném rozpouštědle, jako je dioxan, do pufovaného roztoku imunoglobulinu, například do 0,34 M borátového pufru o hodnotě pH 9. Konjugát se izoluje gelovou filtrací a skladuje se v nasyceném roztoku síranu amonného, přičemž se snadno převádí zpět do roztoku dialýzou borátovým puforem, nebo se může skladovat v lednici při teplotě 4 °C nebo ve zmrazeném stavu například při teplotě -20 °C.

Azidová reakční složka vzorce III se může snadno připravit z vinblastinu, vinblastinsulfátu nebo z desacetylvinblastinu výhodně hydrazinolýzou C³-esteru následovanou diazotací například způsobem popsaným v J. Med. Chem., 1978, svazek 21, číslo 1, strana 88 až 96 a ve shora uvedeném britském patentovém spise číslo 1 463 575. Způsob hydrazinolýzy vinblastinu při mírných teplotách v methanolovém roztoku vede převážně ke vzniku monohydrazinu a reakcí tohoto produktu při teplotě 0 až 10 °C s chlorovodíkovou kyselinou a s dusitanem sodným ve vhodném vodném rozpouštědle se získá žádaný azid vzorce III (azid desacetylvinblastinové kyseliny).

Nebo se azid vzorce III může připravovat při teplotách pod 5 °C, jak shora popsáno, a bez izolace azidu se hodnota pH upraví na 9 a přidá se s vodou mísitelné rozpouštědlo, jako je například dioxan. Pak se přidá imunoglobulin v borátovém pufru o hodnotě pH 9 a teplota reakční směsi se nechá zvýšit na teplotu místnosti. Nadbytek azidu se rozruší zředěným amoniakem a konjugát se čistí gelovou filtrací.

Posuzování konjugátu je možné za použití dobře známých způsobů, jako je afinitní chromatografie. Účinnost konjugátu se může posoudit sečtením počtu živých buněk po ošetření suspenze tumorových buněk konjugátem, nebo měřením příjmu tritiovaného uridinu. Koncentrace proteinu a léčiva se stanoví měřením optické hustoty konjugátových roztoků při dvou vlnových délkách, například 270 a 280 nm, a porovnáním získaných hodnot s hodnotami pro volné léčivo a pro nekonjugovaný imunoglobulin, získanými při stejných vlnových délkách.

Nové konjugáty, připravené způsobem podle vynálezu, jsou užitečné při ošetřování rakoviny a s výhodou se připravují pro použití ve formě prostředků pro vstřikování. Takové farmaceutické přípravky, například přípravky pro vstřikování, obsahující konjugát připravený způsobem podle vynálezu spolu s farmaceuticky vhodným nosičem nebo ředidlem, jsou v oboru dobře známy. S výhodou jsou v takové jednotkové dávkovací formě, aby každá dávka obsahovala například 0,01 až 2 mg účinné složky (vindesinového podílu).

Nové konjugáty jsou účinné v širokém oboru dávek, například pro ošetřování dospělých lidí v dávkách zpravidla 1 až 10 mg/kg za týden a výhodně v dávkách 3 až 9 mg/kg (množství vztaženo vždy na vindesinový podíl). Ovšem skutečné množství podávané účinné látky stanoví vždy lékař se zřetelem na všechny okolnosti, včetně podmínek ošetřování a volené způsoby podání léčiva.

Způsob podle vynálezu objasňují následující příklady praktického provedení.

P ř í k l a d 1

Příprava konjugátu vindesinu a ovčího antikarcinoembryonického antigenu

Hydrazid desacetylvinblastinové kyseliny (6 mg) se rozpustí v 1 N chlorovodíkové kyselině (340 μ l); roztok se ochladí na teplotu 4 °C. Přidá se 60 mikrolitrů 10 mg/ml vodného roztoku dusitanu sodného a reakční směs se míchá při teplotě 4 °C. Po pěti minutách se za intenzivního míchání přidá 1N roztok hydroxidu sodného (300 μ l) a dioxan (120 μ l), načež se přidá 280 μ l 21,3 mg/ml roztoku ovčího anti-CEA v 0,34M borátovém pufru o hodnotě pH 8,6. Směs se míchá při teplotě místnosti po dobu dvou hodin za udržování hodnoty pH 9 použitím N/10 roztoku hydroxidu sodného. Nadbytek azidu se rozruší přidáním 1 N roztoku hydroxidu amonného (60 μ l) za míchání po dobu další hodiny. Produkt se izoluje gelovou

filtrací na 1 x 25,5 cm (20 ml) koloně Bio-Gel^{RP}-6, uvedené do rovnovážného stavu fosfátem pufovanou solankou. Vyloučený produkt se oddělí (2,66 ml) a zkouší se na obsah proteinu metodou podle Lowry a na obsah vindesinu diferenciální spektroskopií. Takto připravený konjugát obsahuje 4,6 mol vindesinu na mol Ig.

P ř í k l a d 2

Příprava konjugátu vindesinu a myšího monoklonálního antikarcinoembryonického antigenu

Hydrazid desacetylvinblastinové kyseliny (10 mg) se rozpustí v 1N chlorovodíkové kyselině (0,56 ml) a roztok se ochladí na teplotu 4 °C. Přidá se 100 mikrolitrů 10 mg/ml roztoku dusitanu sodného a reakční směs se míchá při teplotě 4 °C. Po 5 minutách se přidá 1 N roztok hydroxidu sodného (0,5 ml) a dioxan (0,2 ml) za intenzivního míchání a pak se přidá 0,5 ml 15,6 mg/ml roztoku myšího monoklonálního anti-CEA v 0,34N borátovém pufru o hodnotě pH 8,6. Směs se míchá při teplotě místnosti po dobu dvou hodin za udržování hodnoty pH 9 použitím N/10 roztoku hydroxidu sodného. Nadbytek azidu se rozruší přidáním 1N roztoku hydroxidu amonného (0,1 ml) za míchání po dobu další jedné hodiny. Produkt se izoluje gelovou filtrací na 1 x 27 cm (21 ml) koloně Bio-Gel^{RP}-6 uvedené do rovnovážného stavu fosfátem pufovanou solankou. Vyloučený produkt se oddělí (4,07 ml) a zkouší se na obsah proteinu a na obsah vindesinu spektroskopií při vlnové délce 270 a 280 nm. Takto připravený konjugát obsahuje 2,1 mol vindesinu na mol Ig.

P ř í k l a d 3

Příprava konjugátu vindesinu a antimyšího králičího Ig

Hydrazid desacetylvinblastinové kyseliny (12 mg) se rozpustí v 1N chlorovodíkové kyselině (0,67 ml) a roztok se ochladí na teplotu 4 °C. Přidá se 120 mikrolitrů 10 mg/ml roztoku dusitanu sodného a reakční směs se míchá při teplotě 4 °C. Po 5 minutách se za intenzivního míchání přidá 1N roztok hydroxidu sodného (0,6 ml) a dioxan (0,24 ml) a pak se přidá 1,0 ml 11,7 mg/ml roztoku králičího anti-myšího Ig v 0,34M borátovém pufru o hodnotě pH 8,6. Směs se míchá při teplotě místnosti po dobu dvou hodin za udržování hodnoty pH 9 použitím N/10 roztoku hydroxidu sodného. Nadbytek azidu se rozruší přidáním 1 N roztoku hydroxidu amonného (0,12 ml) a míchá se po dobu další jedné hodiny. Produkt se izoluje gelovou filtrací na 1,5 x 26 cm (46 ml) koloně Bio-Gel^{RP}-6 uvedené do rovnovážného stavu fosfátem pufovanou solankou. Vyloučený produkt se oddělí (6,22 ml) a zkouší se na obsah proteinu a vindesinu spektroskopií při vlnové délce 270 a 280 nm. Takto připravený konjugát obsahuje 3,2 mol vindesinu na mol Ig.

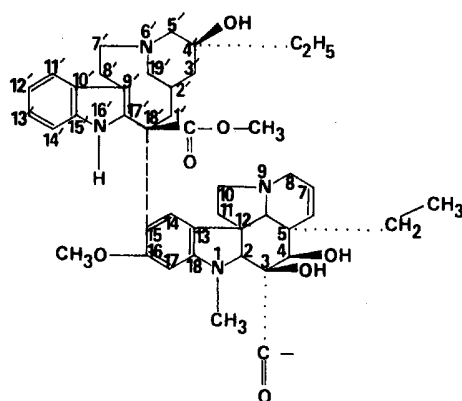
P ř í k l a d 4

Přípravek buněk rostoucích v kultuře se rozptýlí do mikrotitrových kultivačních mís za koncentrace 10⁴ buněk na důlek. Buňky se ponechají po dobu 24 hodin a pak se jednotlivé odpočítávají dle řady ošetřené řadou koncentrací konjugátu nebo kontrolního přípravku. Po šesti dnech se přímým počítáním zjistí počet buněk v důlcích za použití obrazového analyzátoru připojeného na invertní mikroskop. V jednom příkladu se na linie buněk adenokarcinomu lidského tlustého střeva působí vindesinem vázaným na monoklonální anti-karcinoembryonickou antigenní protilátku v molárním poměru 2,1 mol vindesinu na mol Ig (konjugát podle příkladu 2) a zjistí se cytostatické působení počítáním buněk:

Koncentrace léčiva v konjugátu (vindesin, $\mu\text{g/ml}$)	Počet buněk na dřílek po 6 dnech (střední $\pm$ standardní odchylka) 4 opakování	% kontroly
0	$16,3 \pm 4,8 \times 10^4$	100
0,08	$13,8 \pm 2,5 \times 10^4$	84,6
0,40	$12,6 \pm 1,9 \times 10^4$	77,4
2,00	$10,8 \pm 3,9 \times 10^4$	66,7
10,00	$1,9 \pm 0,6 \times 10^4$	11,9

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy konjugátu obsahujícího imunoglobulin nebo imunoglobulinový fragment, kterým je Fab, Fab' nebo F(ab')_2 nebo IgM monomer, modifikovaný alespoň jednou skupinou obecného vzorce II,



(II)

která je na něj kovalentně vázána, vyznačený tím, že se nechá reagovat imunoglobulin nebo i imunoglobulinový fragment s azidem desacetylvinblastinové kyseliny při teplotě 5°C až 25°C a při pH 8,5 až 9,5.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že imunoglobulin nebo imunoglobulinový fragment je modifikován průměrně 2 až 5 skupinami vzorce II.