(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 872783 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 872783

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 15/00
A61K 45/05
C07H 15/252

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **23.06.1987**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **23.06.1987**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **26.12.1987**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

25.06.1986 JP 147119/86 25.06.1986 JP 74259/87

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Hoechst Japan Limited,** 10-16, 8-chome, Akasaka, Minato-ku, Tokyo, JAPANI, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Tone, Yukiko,** Japan, JAPANI, (JP)
2 •**Iwahashi, Toshiro,** Japan, JAPANI, (JP)
3 •**Ohkouchi, Etsuko,** Japan, JAPANI, (JP)
4 •**Kitagawa, Hiroshi,** Japan, JAPANI, (JP)
5 •**Sugawara, Isamu,** Japan, JAPANI, (JP)
6 •**Okazaki, Hiroshi,** Japan, JAPANI, (JP)
7 •**Fukuda, Akio,** Japan, JAPANI, (JP)
8 •**Berscheid, Hans Gerd,** BRD, SAKSA, (DE)
9 •**Numata, Hitoko,** Japan, JAPANI, (JP)
10 •**Usui, Junko,** Japan, JAPANI, (JP)
11 •**Senda, Shunji,** Japan, JAPANI, (JP)
12 •**Matsuo, Akihiko,** Japan, JAPANI, (JP)
13 •**Watanabe, Hiroshi,** Saitama-Ken, Japan, JAPANI, (JP)
14 •**Kurobane, Itsuo,** Japan, JAPANI, (JP)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Sytorodiini S-johdannaiset, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö lääkkeinä.

Cytorodin S-derivat, förfarande för deras framställning och deras användning som läkemedel.

Sytorodiini S-johdannaiset, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö lääkkeinä

Tämä keksintö koskee sytorodiini S-johdannaisia, erityisiä sytorodiini S-immunoglobuliini-komplekseja.

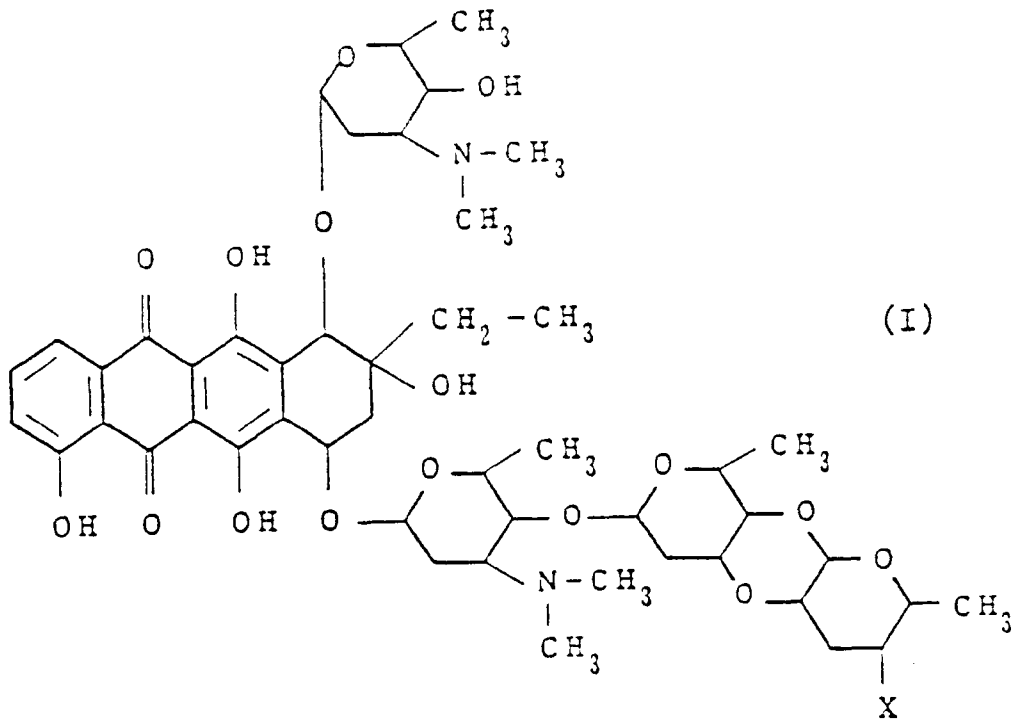
Keksinnön mukaiset sytorodiini S-johdannaiset vaikuttavat selektiivisesti syöpäsoluihin ja niitä voidaan käyttää syöpälääkkeinä.

On julkaistu, että sytorodiini S valmistetaan käsittelemällä hapolla Streptomyces Y-11472:ta (talletus nro DSM-2658) viljelemällä valmistettua sytorodiinin raakaseosta ja että sillä on syöpälääkevaikutuksia (JP-patenttihakemusjulkaisu 60-48994). Vaikka sytorodiini S itsessään on hyvin tehokas syöpälääke, halutaan kuitenkin kehittää aineita, jotka vaikuttavat selektiivisesti syöpäsoluihin ja joiden biosaatavuus (bioavailability)on suuri.

Tuloksena laajoista tutkimuksistamme, jotka ovat kohdistuneet sellaisten sytorodiini S-johdannaisten kehittämiseen, joiden selektiivinen spesifisyys syöpäsoluja kohtaan on ensiluokkainen, olemme onnistuneet valmistamaan sytorodiini S-immunoglobuliini-komplekseja, joissa itsensä sytorodiini S:n syöpälääkevaikutukset säilyvät. Tämä keksintö perustuu yllä olevaan havaintoon.

Keksinnön mukaisesti annetaan käyttöön sytorodiini S-johdannaiset, menetelmät niiden valmistamiseksi sekä niitä sisältävä syöpälääke seuraavasti:

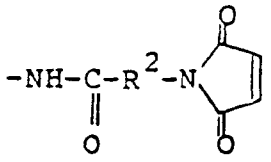
1) Sytorodiini S-johdannainen, jolla on yleinen kaava (1)



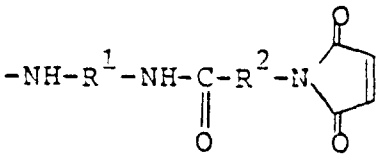
(I)

jossa X on ryhmä, jolla on kaava

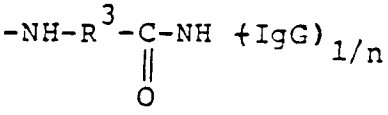
$-NH_2$, $-NH-R^1-NH_2$, $-NH-R^1-COOH$, $-NH-R^1-SH$,



,

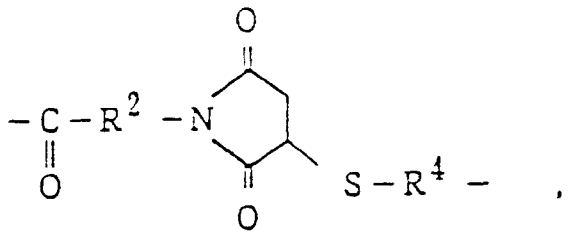


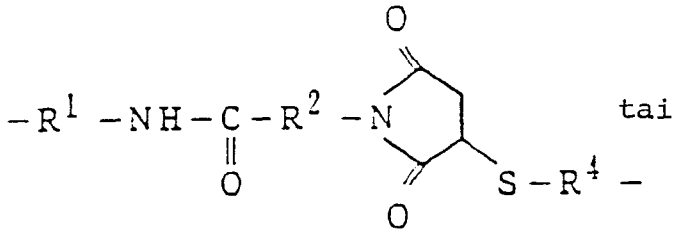
tai



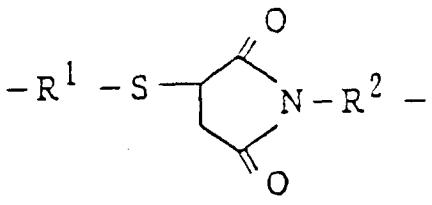
jossa R^1 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, joka voi olla substituoitu millä tahansa substituentilla, R^2 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, R^3 on kaksiarvoinen orgaaninen ryhmä, IgG on immunoglobuliiniosa ja n on luku 1 - 15, sekä sen suolat.

2) Yllä olevan kohdan (1) mukainen sytorodiini S-johdannainen, jossa R^3 on R^1 tai ryhmä, jolla on kaava





tai



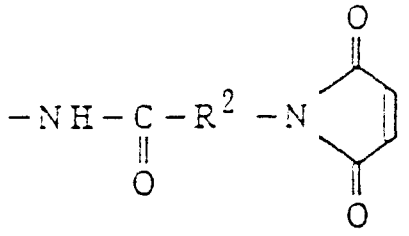
jossa R^4 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä.

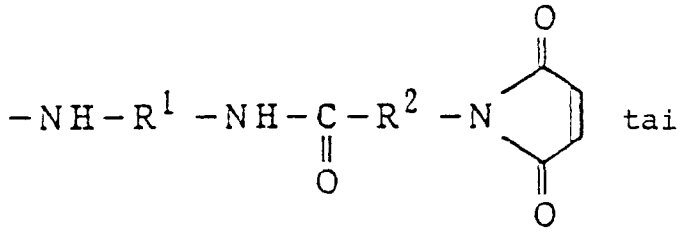
3) Yllä olevan kohdan (2) mukainen sytorodiini S-johdannainen, jossa R^2 on propyleeniryhmä ja R^4 on metyyleeniryhmä.

4) Minkä tahansa yllä olevan kohdan (1) - (3) mukainen sytorodiini S-johdannainen, jossa n on 5 - 12.

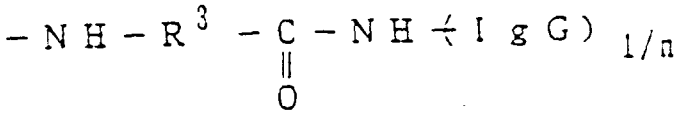
5) Minkä tahansa yllä olevan kohdan (1) - (4) mukainen sytorodiini S-johdannainen, jossa IgG on karsinoembryonaalista antigeenia (CEA) vastaan muodostettu vasta-aineryhmä.

6) Menetelmä yleisen kaavan (I) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi, jossa kaavassa X on ryhmä, jolla on kaava $-NH_2$, $-NH-R^1-NH_2$,

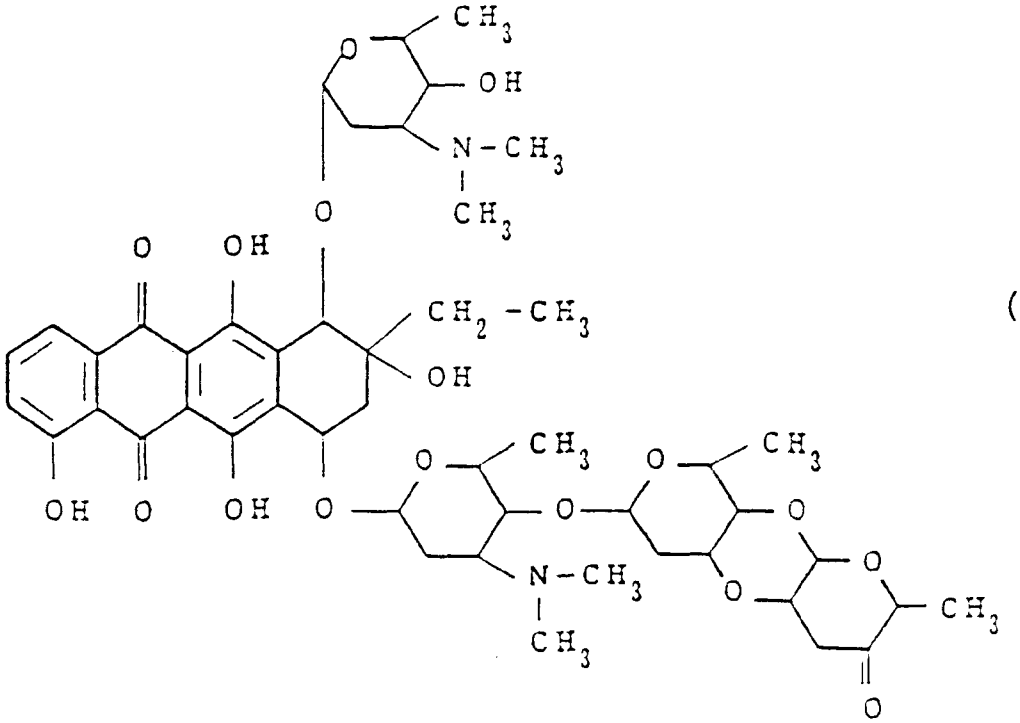




tai

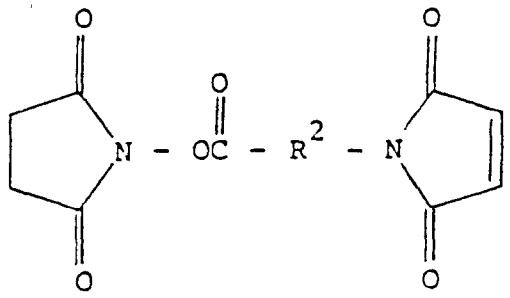


jossa R^1 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, joka voi olla substituoitu millä tahansa substituentilla, R^2 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, R^3 on kaksiarvoinen orgaaninen radikaali, IgG on immunoglobuliiniosa ja n on luku 1 - 15, jossa menetelmässä pelkistetään kaavan (II) mukainen sytorodiini S



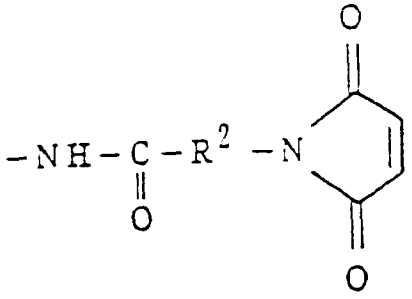
(II)

alkaalimetallisyaaniboorihydrillä ammoniumsuolan tai yhdisteen, jolla on kaava $NH_2-R^1-NH_2$, jossa R^1:llä on yllä määritelty merkitys, läsnäollessa, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen, jossa X yllä mainitussa kaavassa (1) on $-NH_2$ tai $-NH-R^1-NH_2$, tarvittaessa annetaan tuotteen reagoida kaavan (III) mukaisen maleiiniyhdisteen kanssa

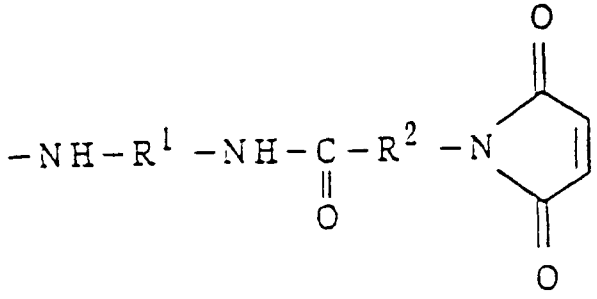


(III)

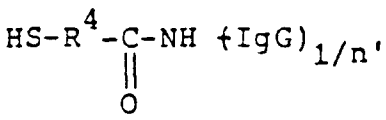
jossa R^2:lla on yllä määritelty merkitys, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen (I), jossa X on



tai

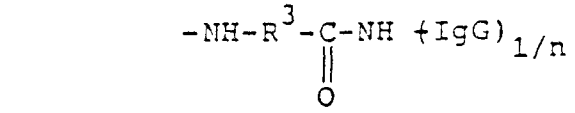


ja edelleen, tarvittaessa, annetaan tuotteen reagoida kaavan (IV) mukaisen tioloidun immunoglobuliinin kanssa

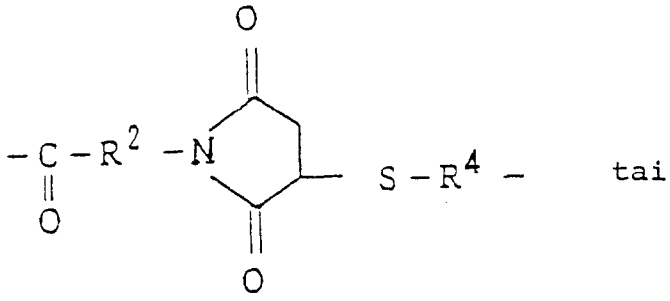


(IV)

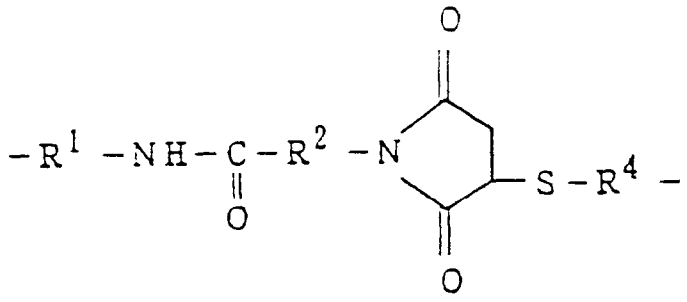
jossa R^4 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, IgG:llä on yllä määritelty merkitys ja n' on luku 1 - 20, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen (I), jossa X on



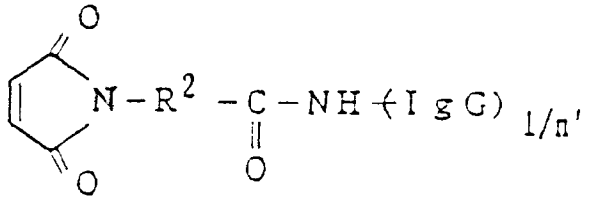
7) Menetelmä yllä olevan kohdan (6) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi, jossa johdannaisessa R^3 on



tai

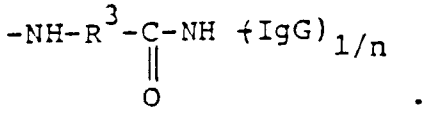


8) Menetelmä yleisen kaavan (I) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi, jossa kaavassa X on ryhmä, joka sisältää $-NH-R^1-SH$-ryhmän tai $-NH-R^3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH\text{-}(IgG)_{1/n}$-ryhmän, joissa R^1 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, joka voi olla substituoitu millä tahansa substituentilla, R^3 on kaksiarvoinen orgaaninen ryhmä, IgG on immunoglobuliiniosa ja n on luku 1 - 15, jossa menetelmässä yllä olevan kaavan (II) mukainen sytorodiini S pelkistetään alkaalimetallisyaaniboorihydridillä kaavan NH_2-R^1-SH, jossa R^1:llä on yllä määritelty merkitys, mukaisen yhdisteen läsnäollessa, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen (I), jossa X yllä mainitussa kaavassa (I) on $-NH-R^1-SH$, ja tarvittaessa annetaan tuotteen reagoida kaavan (V) mukaisen maleimidoidun immunoglobuliinin kanssa



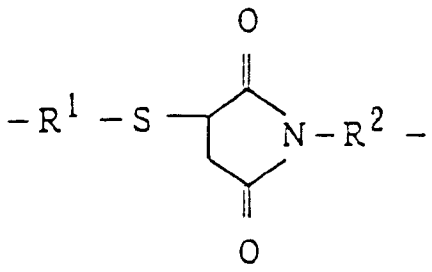
(V)

jossa R^2:lla ja IgG:llä on yllä määritellyt merkitykset ja n' on luku 1 - 20, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen (I), jossa X on



.

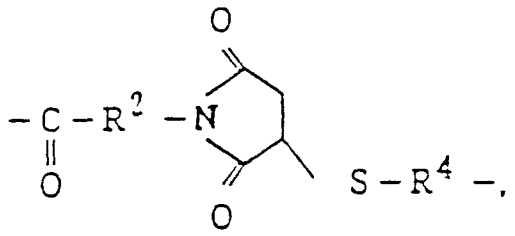
9) Menetelmä yllä olevan kohdan (8) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi, jossa johdannaisessa R^3 on



10) Menetelmä yleisen kaavan (I) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi, jossa kaavassa X on ryhmä, joka sisältää $-NH-R^1-COOH$-ryhmän tai $-NH-R^3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH\text{-}(IgG)_{1/n}$-ryhmän, joissa R^1 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, joka voi olla substituoitu millä tahansa substituentilla, R^3 on kaksiarvoinen orgaaninen ryhmä, IgG on immunoglobuliiniosa ja n on luku 1 - 15, jossa menetelmässä yllä mainitun kaavan (II) mukainen sytorodiini S pelkistetään alkaalimetallisyaaniboorihydridillä kaavan NH_2-R^1-COOH, jossa R^1:llä on yllä määritelty merkitys, mukaisen yhdisteen läsnäollessa ja tarvittaessa annetaan tuotteen reagoida kaavan (VI) mukaisen immunoglobuliinin kanssa

$$NH_2\text{-}(IgG)_{1/n} \qquad (VI)$$

jossa IgG:llä on yllä määritelty merkitys ja n on luku 1 - 15, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen (I), jossa X kaavassa (I) on



11) Menetelmä yllä olevan kohdan (10) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi, jossa johdannaisessa R^3 on R^1.

12) Syöpälääke, joka sisältää yllä mainitun kaavan (I) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen.

Kuvio 1 esittää sytorodiini S:n aminojohdannaisen massaspektriä.

Kuvio 2 esittää sytorodiini S-immunoglobuliini-kompleksin ja sytorodiini S:n pylväskromatografialla saatuja elu-uutioprofiileja.

Kuvio 3 esittää sytorodiini S-immunoglobuliini-kompleksin UV-spektriä.

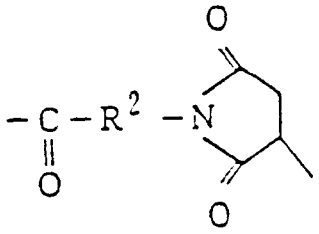
Kuvio 4 esittää graafisesti sytorodiini S:n ja sytorodiini S-kanin immunoglobuliini-kompleksin solujen kasvua inhiboivia vaikutuksia L1210-soluja vastaan.

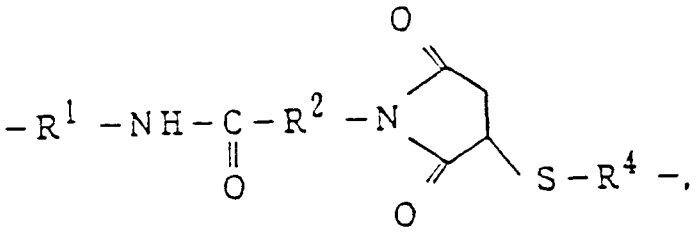
Kuvio 5 esittää graafisesti sytorodiini S:n, sytorodiini S-MA 204-immunokompleksin, sytorodiini S-kanin immunoglobuliini-kompleksin ja kontrollin solujen kasvua inhiboivia vaikutuksia Colo 205-soluja vastaan.

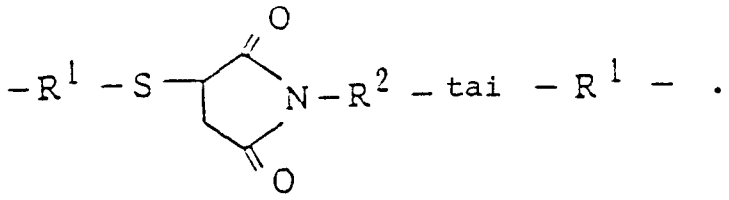
Kuvio 6 esittää graafisesti sytorodiini S-immunoglobuliini-kompleksin ja aklasinomysiini-immunoglobuliini-kompleksin solujen kasvua inhiboivia vaikutuksia L1210-soluja vastaan.

Edullisina esimerkkeinä R^1:stä yllä mainitussa kaavassa (I) mainitaan ryhmät, jotka ovat peräisin tunnetuista α-aminohapoista, β-, γ- ja ε-aminohapoista sekä β-, γ- ja ε-tiolamiineista.

Edullisina esimerkkeinä R^2:sta yllä olevassa kaavassa (I) mainitaan alemmat alkyleeniryhmät, kuten metyleeni, etyleeni ja propyleeni, fenyleeniryhmät, kuten p-fenyleeni- ja m-fenyleeni, C_4-C_7-sykloalkyleeniryhmät, kuten sykloheksyleeni, fenylenyyli-alempi alkyyli-ryhmät, kuten fenylenyylimetyyli, sekä C_4-C_7-sykloalkenyyli-alempi alkyyli-ryhmät, kuten sykloheksylenyylimetyyli. Edullisina esimerkkeinä R^3:sta mainitaan ryhmät, joilla on kaavat







Edullisina esimerkkeinä R^4:stä mainitaan alemmat alkyleeniryhmät, kuten metyleeni, etyleeni ja propyleenit, fenyleeniryhmät, kuten p-fenyleeni- ja m-fenyleeniryhmät, C_4-C_7-sykloalkyleeniryhmät, kuten sykloheksyleeni, fenylenyyli-alempi alkyyli-ryhmät, kuten fenylenyylimetyyli, sekä C_4-C_7-sykloalkylenyyli-alempi alkyyli-ryhmät, kuten sykloheksylenyylimetyyli. IgG:llä merkitty immunoglobuliiniosa

tarkoittaa immunoglobuliinimolekyyliä, jossa n amino-ryhmää on poistettu imminoglobuliinista. IgG kaavassa (I) sisältää sellaisen immunoglobuliinin, jossa jokin tioli-ryhmistä (-NH-C-R^2-SH) on lisätty jäljellä olevaan immuno-
5 O
globuliiniin. Tämä johtuu siitä, etteivät kaikki tioloi-dun immunoglobuliinin (IV) tioliryhmät reagoi sytoroiini-S-johdannaisen kanssa, vaan jotkut tioliryhmät jäävät reagoimatta.

10 Immunoglobuliiniosana on edullinen sellainen vasta-aine, joka sitoutuu spesifisesti syöpäsoluihin.

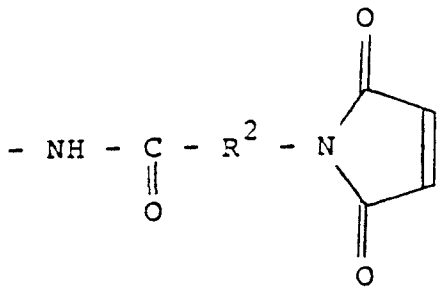
1/n tarkoittaa immunoglobuliinimolekyylien lukumäärää sytorodiini S-molekyyliä kohti ja se on välillä 1/1 - 1/15. Tämä tarkoittaa, että 1 - 15 sytorodiini S-molekyyliä
15 on sitoutunut yhteen immunoglobuliinimolekyyliin.

Kaavan (I) mukainen yhdiste, jossa X on

- NH_2, - NH - R^1 - NH_2 , -NHR^1 - COOH,

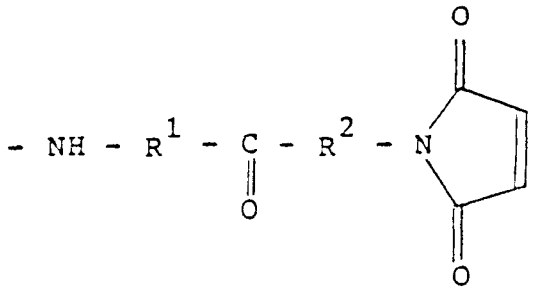
- NHR^1 - SH,

20



tai

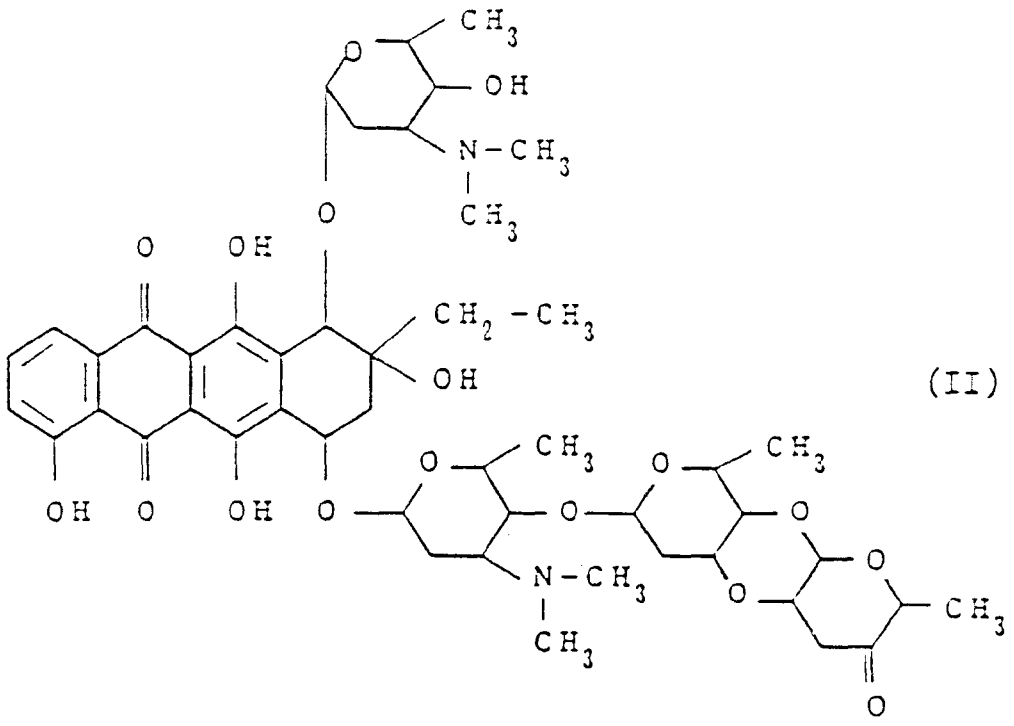
25



30

on välituoteyhdiste immunoglobuliinikompleksien muodostamiseksi, jossa kompleksissa sytorodiini S:n syöpälääke-
35 vaikutukset tietenkin säilyvät ja joka myös itse voi olla syöpälääke.

Valmistettaessa syöpälääkkeen ja immunoglobuliinin muodostamaa kompleksia syöpälääke yleensä sidotaan immunoglobuliiniin käyttämällä bifunktionaalista liittämisreagenssia (uros-linking reagent), kondensoivaa ainetta tai käsivartta (spacer). Yllä oleva saavutetaan yhdistämällä syöpälääke bifunktionaaliseen liittämisreagenssiin, kondensoivaan aineeseen tai käsivarteen ensin mainitun funktionaalisen ryhmän (kuten amino-, karboksyyli- tai tioliryhmän) kautta. Sytorodiini S:llä ei kuitenkaan ole tällaisia funktionaalisia ryhmiä ja se on modifioitava kemiallisesti, jotta voitaisiin valmistaa amino-, karboksyyli- tai tioliryhmän sisältävä johdannainen. Tällaisten sytorodiini S-johdannaisten valmistamiseksi ilman, että sytorodiini S:n syöpälääkevaikutus häviää, sakkaridiketjun oksoryhmä voidaan muuttaa aminoryhmäksi. Yleisissä menetelmissä oksoryhmän pelkistämiseksi käytetään litiumalumiinihydridiä ($LiAlH_4$), natriumboorihydridiä ($NaBH_4$) tai vastaavia aineita. Reagenssi, jota voidaan käyttää sakkaridiketjun oksoryhmän pelkistämiseksi selektiivisesti pelkistämättä antrasykliinirenkaan oksoryhmää, on natriumsyaaniboorihydridi ($NaBCNH_3$) tai litiumsyaaniboorihydridi ($LiBCNH_3$). Kun tällaista pelkistävää ainetta käytetään ammoniumsuolan tai aminoryhmän sisältävän orgaanisen yhdisteen läsnäollessa, sakkaridiketjun oksoryhmä pelkistyy selektiivisesti aminoryhmäksi, jolloin saadaan sytorodiini S:n johdannainen. Itse asiassa sytorodiini S, jolla on kaava (II)



(II)

muutetaan sytorodiini S-johdannaiseksi (I), jossa X on $-NH_2$, $-NH-R^1-NH_2$, $-NH-R^1-COOH$ tai $-NH-R^1-SH$ pelkistämällä alkaalimetallisyaaniboorihydridillä ammoniumsuolan tai aminoryhmän, joka voi olla $NH_2-R^1NH_2$, NH_2-R^1-COOH tai NH_2-R^1-SH, sisältävän orgaanisen yhdisteen läsnäollessa.

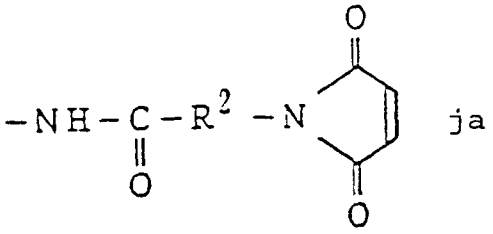
Esimerkkejä ammoniumsuolasta ovat ammoniumasetaatti, ammoniumpropionaatti ja ammoniumkloridi. Esimerkkejä aminoryhmän sisältävästä orgaanisesta yhdisteestä ovat mainitut tunnetut α-aminohapot, kuten lysiini ja kysteiini, β-, γ- ja ε-aminohapot, kuten γ-aminovoihappo, aminohappojen esterit, kuten glysiinin etyyliesteri, sekä tiolamiinit, kuten aminoetaanitioli ja aminotiofenoli. Esimerkkejä alkaalimetallisyaaniboorihydridistä ovat litium- (tai natrium-) syaaniboorihydridi.

Yllä oleva reaktio voidaan helposti suorittaa liuottamalla sytorodiini S ja ammoniumsuola tai aminoryhmän sisältävä orgaaninen yhdiste veteen liukenevaan orgaaniseen liuottimeen (kuten esimerkiksi metanoliin tai etanoliin)

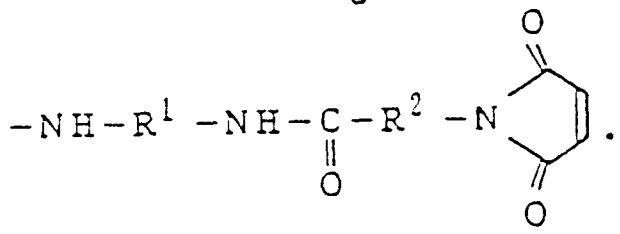
tai puskuriliuokseen, joka ei sisällä primaarisia eikä sekundaarisia amiineja ja jonka pH säädetään 8:ksi (kuten esimerkiksi fosfaatti- tai boraattipuskurin tai 2,4,6-trimetyylipyridiini-kloorivetyhappopuskuriin) ja lisäämällä liuokseen alkaalimetallisyaaniboorihydridi huoneenlämpötilassa tai jäillä jäähdyttäen.

Reaktioseoksen tuote voidaan ottaa talteen tavanomaisilla tavoilla. Se voidaan ottaa talteen esimerkiksi säätämällä reaktioseoksen pH 8:ksi, uuttamalla se sopivalla orgaanisella liuottimella, kuten dikloorimetaanilla, ja tislaamalla liuotin uutteesta tai käyttämällä preparatiivista HPLC:tä.

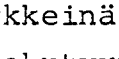
Näin tuotetun sytorodiini S:n aminojohdannaisen, jossa X on $-NH_2$ tai $-NH-R^1-NH_2$, annetaan sitten reagoida yllä olevan kaavan (III) mukaisen maleimidiyhdisteen kanssa, jolloin saadaan yllä olevan kaavan (I) mukainen sytorodiini S-johdannainen, jossa X on



ja



Sivutuotteena muodostuu N-hydroksisukkinimidiä.

Esimerkkeinä maleimidiyhdisteestä (III) mainitaan N-γ-maleimidobutyryloksisukkinimidi (GMBS, R^2: $-(CH_2)_3-$), sukkinimidyyli-4-(N-maleimidometyyli)sykloheksaanikarboksylaatti (R^2: , meta-maleimidobentsoyyli-N-hydroksisukkinimidiesteri (R^2: ) sekä sukkinimidyyli-4-(p-maleimidofenyyli)butyraatti (R^2: ).

Yllä oleva reaktio voidaan helposti suorittaa käsittelemällä sytorodiini S:n aminojohdannaista maleimidiyhdisteellä sopivassa liuottimessa (esim. dikloorimetaanissa, dikloorietaanissa, kloroformissa, pyridiinissä, trietyyliamiinissa jne.) huoneenlämpötilassa tai jäillä jäähdyttäen.

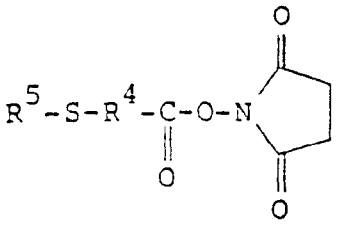
Näin saadut sytorodiini S-johdannaiset, joihin on viety maleimidiryhmä, pystyvät additioreaktioon minkä tahansa tioliryhmän sisältävien proteiinien tai yhdisteiden kanssa. Maleimidiryhmän kaksoissidos osallistuu elektrofiiliseen additioreaktioon tioliryhmän kanssa, kuten alla on kuvattu, maleimidiryhmän ja immunoglobuliiniin viedyn tioliryhmän välinen additioreaktio mahdollistaa siten kompleksin muodostamisen.

Yleisesti, kompleksin valmistamiseen käytetty immunoglobuliini on edullisesti erityisesti syöpäsolujen kalvoproteiinia vastaan muodostettu monoklonaalinen tai polyklonaalinen vasta-aine. Kliinisissä sovellutuksissa on myös toivottavaa käyttää vasta-ainetta, josta Fc-osa on poistettu, jos käytetään ei-ihmisperäistä vasta-ainetta. Tehokkuuden kannalta on kuitenkin edullista käyttää sytorodiini S:n lisäksi kokonaista vasta-ainetta.

Erityisen edullisena immunoglobuliinina mainitaan syövälle spesifistä proteiinia, kuten karsinoembryonaalista antigeenia (CEA) tai α-fetoproteiinia (AFP), vastaan muodostettu monoklonaalinen vasta-aine. Karsinoembryonaalista antigeenia vastaan muodostettu monoklonaalinen vasta-aine valmistetaan tavanomaisella tavalla, jossa hiiret käsitellään antigeenilla, hiirten pernat eristetään, pernasolut fuusioidaan HAT-herkkien myeloomasolujen kanssa polyetyleeniglykolimenetelmällä ja hybridooma valikoidaan käyttäen HAT-väliainetta valikoivana väliaineena ja istutetaan hiiriin.

Ennen immunoglobuliinin reaktiota maleimidiryhmän sisältävän sytorodiini S:n kanssa kompleksin muodostamiseksi immunoglobuliiniin viedään tioliryhmä. Tioliryhmän

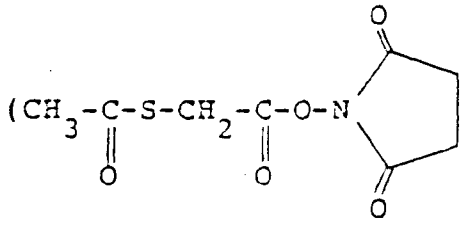
liittämiseksi immunoglobuliinin annetaan reagoida yleisen kaavan (VII) mukaisen N-sukkinimidiyhdisteen kanssa



(VII)

jossa R^4:llä on yllä määritelty merkitys ja R^5 on tiolin suojaryhmä, esimerkiksi asyyliryhmä, kuten asetyyli, tai 2-pyridyylitioryhmä, jolloin saadaan tioloitu immunoglobuliini, jolla on yllä mainittu kaava (IV).

Edullisena esimerkkinä N-sukkinimidiyhdisteestä (VII) mainitaan N-sukkinimidyyli-S-asetyylitioasetaatti



, SATA).

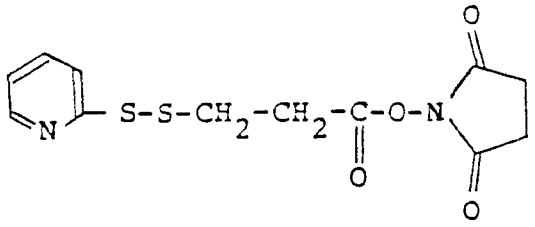
SATA:n annetaan reagoida immunoglobuliinin aminoryhmän kanssa, jolloin muodostuu amidisidos $-NH-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH-S-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH_3$,

jossa asetyyliryhmä suojaa tioliryhmää, ja N-hydroksisukkinimidiä muodostuu sivutuotteena. Tioliryhmän suojaryhmä poistetaan esimerkiksi hydroksyyliamiinilla pH 7,5:ssä, jolloin ensinmainittu muuttuu reaktiiviseksi ryhmäksi $-NH-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH_2-SH$.

Tioliryhmä hapettuu helposti tietyissä olosuhteissa, jolloin muodostuu immunoglobuliinipolymeereja. Asetyylisuojaryhmän poistaminen on siksi edullista suorittaa 25°C:ssa noin yhden tunnin ajan välittömästi ennen reaktiota maleimidiryhmän sisältävän sytorodiini S-johdannaisen kanssa.

Tioliryhmä lisätään suhteessa 1 - 20, edullisesti 5 - 20, immunoglobuliinimolekyyliä kohti käytetystä SATAn määrästä riippuen. Tämä lisääminen ei aiheuta immunoglobuliinin vasta-aineaktiivisuuden menetystä.

N-sukkinimidyyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaatin,



käyttö tiolinlisäysreagenssina SATAn asemasta ja ditiotreitolin käyttö suojaryhmän poistavana aineena johtaa ryhmän $-NH-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH_2CH_2-SH$ sekä aminoryhmän muodostumiseen immunoglobuliiniin.

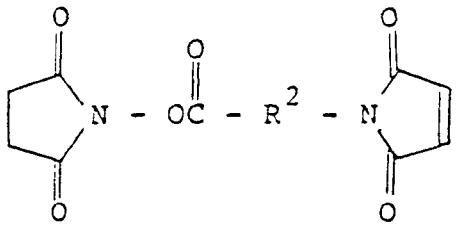
Näin tuotetun tioliryhmän sisältävän immunoglobuliinin (IV) annetaan reagoida maleimidin sisältävän sytorodiini S:n kanssa keksinnön mukaisen immunoglobuliinikompleksin valmistamiseksi.

Yllä oleva reaktio voidaan helposti suorittaa sekoittamalla liuos, joka sisältää maleimidiryhmät sisältävän sytorodiini S-johdannaisen veteen liukenevassa orgaanisessa liuottimessa (esim. metanolissa, etanolissa, dimetyyliformamidissa), tioliryhmät sisältävän immunoglobuliinin vesipitoiseen liuokseen pH:ssa 7,5.

Tioliryhmän sisältävät sytorodiini S-johdannaiset, joissa X on $-NH-R^1-SH$, pystyvät additioreaktioon minkä tahansa maleimidiryhmän sisältävän proteiinin tai yhdisteen kanssa. Maleimidiryhmän kaksoissidoksen annetaan reagoida tioliryhmän kanssa elektrofiilisellä additioreaktiolla. Siksi, kuten alla on kuvattu, kompleksi voidaan muodostaa liittämällä tioliryhmä maleimidiryhmän sisältävän immunoglobuliinin maleimidiryhmään.

Kompleksin muodostamiseen käytettävä immunoglobuliini on yllä kuvattu.

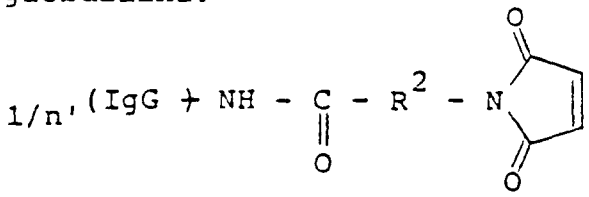
Ennen immunoglobuliinin reaktiota tioliryhmän sisältävän sytorodiini S:n kanssa immunoglobuliiniin viedään maleimidiryhmät. Maleimidiryhmien lisäämiseksi immunoglobuliinin annetaan reagoida kaavan (III) mukaisen maleimidiyhdisteen kanssa



(III)

jossa R^2:lla on yllä määritelty merkitys, jolloin saadaan maleimidoitu immunoglobuliini, jolla on yllä mainittu kaava (V). Edullisia esimerkkejä maleimidiyhdisteestä (III) ovat N-γ-maleimidobutyryloksisukkinimidi sekä muut yllä mainitut vastaavat yhdisteet.

Maleimidiyhdiste (III) muodostaa amidisidoksen immunoglobuliinin aminoryhmien kanssa nukleofiilisella substituutioreaktiolla, jolloin saadaan kaavan (V) mukainen maleimidoitu immunoglobuliini.



ja sivutuotteena N-hydroksisukkinimidi.

Maleimidiyhdisteen (III) määrästä riippuen maleimidiryhmä lisätään suhteessa 1 - 20 ja edullisesti 5 - 20 immunoglobuliinimolekyyliä kohti. Ryhmien lisääminen ei kuitenkaan aiheuta immunoglobuliinin vasta-aineaktiivisuuden menetystä.

Keksinnön mukaiset immunoglobuliinikompleksit valmistetaan antamalla maleimidiryhmiä sisältävän immunoglobuliinin (V) reagoida tioliryhmän sisältävän sytorodiini S:n kanssa.

Reaktio suoritetaan helposti sekoittamalla pH 7,5:ssä liuos, joka sisältää tioliryhmän sisältävää sytorodiini S:ää veteen liukenevassa liuottimessa (esimerkiksi metanolissa, etanolissa, dimetyyliformamidissa tai vastaavassa liuottimessa) tai puskuriliuoksessa pH 7,5:ssä (sama puskuri kuin immunoglobuliinin liuottamiseen käytetty puskuri), maleimidiryhmiä sisältävän immunoglobuliinin vesipitoisen liuoksen kanssa.

Sytorodiini S-johdannaiset, joissa X on $-NH-R^1-COOH$, pystyvät sitoutumaan proteiinin tai yhdisteen aminoryhmiin peptidisidoksella sopivan kondensoivan aineen avulla. Peptidisidos muodostuu kondensoivan aineen avulla muodostetun karboksyyliryhmän aktiivisen esterin nukleofiilisellä reaktiolla proteiinin tai yhdisteen aminoryhmän kanssa.

Siten kompleksi voidaan muodostaa lisäämällä sytorodiini S-johdannainen immunoglobuliinin alunperin sisältämään aminoryhmään (sivuketjuun, kuten lysiinitähteeseen), vastalisätyn karboksyyliryhmän kanssa muodostetun peptidisidoksen kautta.

Sytorodiini S-johdannaiset, joissa X on $-NH-R^1-COOH$, muutetaan kondensoivan aineen avulla aktiiviseksi esteriksi kompleksin muodostamiseksi. Aktiivisen esterin valmistamiseksi sytorodiini S-johdannainen, jossa X yllä mainitussa kaavassa (1) on $-NH-R^1-COOH$, annetaan reagoida karbodi-imidin kanssa.

Edullisia esimerkkejä karbodi-imidistä mainitaan disykloheksyylikarbodi-imidi, 1,3-dimetyyliaminopropyyli)-3-etyylikarbodi-imidihydrokloridi, dietyylikarbodi-imidi, difenyylikarbodi-imidi, dibentsyylikarbodi-imidi, sianamidi ja vastaavat. Reaktio suoritetaan antamalla sytorodiini S-johdannaisen liuoksen reagoida karbodi-imidin kanssa veteen liukenevassa orgaanisessa liuottimessa (esimerkiksi metanolissa, etanolissa, dimetyyliformamidissa tai vastaavassa liuottimessa) tai puskuriliuoksessa pH 7,5:ssä (sama puskuri kuin immunoglobuliinin liuottamiseen käytetty puskuri)

huoneenlämpötilassa yhden tunnin ajan, jonka jälkeen reaktioseos lisätään immunoglobuliinin vesipitoiseen liuokseen, pH 7,5:ssä.

Reaktioon käytettävän sytorodiini S-johdannaisen määrästä riippuen sytorodiini S-johdannainen sitoutuu suhteessa 1 - 20 ja edullisesti 5 - 20 immunoglobuliinimolekyyliä kohti. Sitoutuminen ei kuitenkaan aiheuta globuliinin vasta-aineaktiivisuuden menetystä.

Sytorodiini S:n sitoutumissuhde immunoglobuliiniin keksinnön mukaisessa kompleksissa on 1 - 15, tämä tarkoittaa 1 - 15 sytorodiini S-molekyyliä sitoutuu yhtä immunoglobuliinimolekyyliä kohti.

Tällaisella syöpälääkekomponentin suurella osuudella saadaan korkeita syöpälääkeaktiivisuuksia.

Keksinnön mukaisen sytorodiini S-johdannaisen kliinistä annosta voidaan vaihdella antoreitistä riippuen ja annos on aikuisilla välillä 1 - 20 mg päivässä sytorodiini S:nä ilmaistuna.

Se voidaan annostella suoneen, ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti tai peräsuolen kautta. Suoneen annon ollessa kyseessä suonensisäistä tiputusta voidaan myös käyttää tavallisen suonensisäisen injektion lisäksi.

Sytorodiini S-johdannaista (1) sisältävät farmaseuttiset koostumukset valmistetaan tavanomaisella menetelmällä tavanomaisia kantajia ja lisäaineita käyttäen.

Injektoitava valmiste voi olla esimerkiksi jauhemuodossa oleva valmiste injektioita varten. Tämä valmistetaan lisäämällä yhtä tai useampaa sopivaa apuainetta, kuten esimerkiksi mannitolia, sakkaroosia, laktoosia, maltoosia, glukoosia tai fruktoosia sytorodiini S-johdannaiseen (1), liuottamalla seos veteen ja jakamalla liuos pulloihin tai ampulleihin, jotka tämän jälkeen kylmäkuivataan ja suljetaan.

Peräsuolen kautta annosteltava valmiste voidaan valmistaa lipofiilisestä emäksestä, kuten kaakaoöljyä tai

rasvahappotriaglyseridiä ja rasvahappomonoglyseridiä tai rasvahappodiglyseridiä eri suhteissa sekoittamalla valmistetusta puolisynteettisestä emäksestä tai hydrofiilisestä emäksestä, kuten polyetyleeniglykolista tai glyserogelatiinista lämmittämällä seos liuokseksi, lisäämällä liuos homogeeniseen seokseen ja muodostamalla valmiste muotissa.

Alla annetaan esimerkkejä keksinnöstä.

Esimerkki 1

Kahteen millilitraan metanolia liuotetaan 10 mg sytorodiini S:ää. Liuokseen lisättiin metanoliliuos (pitoisuus 10 mg/ml), joka sisälsi 5,8 mg ammoniumasetaattia, joka vastaa 10 molaarista ekvivalenttia sytorodiini S:ää, sekä metanoliliuos (pitoisuus 10 mg/ml), joka sisälsi 1,4 mg natriumsyaaniboorihydridiä, joka vastaa 3 molaarista ekvivalenttia. Seoksen annettiin reagoda 25°C:ssa 4 tunnin ajan. Reaktioseos kaadettiin 20 ml:aan jäähdytettyä 0,5 % vesipitoista etikkahappoa ja seos uutettiin kahdella 5 ml:n annoksella dikloorimetaania reagoimattoman sytorodiini S:n poistamiseksi. Saadun vesipitoisen etikkahappoliuoksen pH säädettiin pH 8:ksi kyllästetyllä natriumbikarbonaatin vesiliuoksella. Vesipitoinen liuos uutettiin kolmella 20 ml:n annoksella dikloorimetaania, jolloin saatiin aminojohdannainen. Dikloorimetaaniliuos kuivattiin vedettömän natriumsulfaatin päällä ja dikloorimetaani poistettiin vakuumitislauksella. Sytorodiini S:n aminojohdannaista (jota kutsutaan tässä alla aminosytorodiini S:ksi) saatiin 4,8 mg. Tuotteen puhtaus analysoitiin korkeapaineneste-kromatografisesti. Olosuhteet ovat seuraavat: pylväs, SSC-Aquasil PE-2, 4,6 mm x 250 mm (Senshu Kagaku); liuotin, 2,0 % trietyyliammoniumfosfaatti (pH 3), 75 %, ja asetonitriili, 25 %; retentioaika, sytorodiini S (25,0 min), aminosytorodiini S (12,9 min). Lisäksi HPLC:llä saadun mainitun sytorodiini S-johdannaisen massaluku mitattiin käyttäen FAB/MS-spektrometriä (Nihon Denshi JMS-DX300), jolloin saatiin massaspektri 942 ($M+H^+$), joka oli identtinen lasketun massaluvun kanssa.

Johdannaisen absorptiospektrissä havaittiin aallonpituudella 495 nm spesifinen absorptio, joka on peräisin sytorodiini S:n antrasykliinirenkaasta. Tällä on sama spektri kuin alkuperäisellä sytorodiini S:llä, mikä osoittaa, että syöpälääkevaikutukset ovat tallella johdannaisessa.

Esimerkki 2

Kahteen millilitraan dikloorimetaania liuotettiin 4,8 mg esimerkissä 1 valmistettua aminosytorodiini S:ää. Liuokseen lisättiin dikloorimetaaniliuos (pitoisuus 10 mg/ml), joka sisälsi, 3,8 mg N-γ-maleimidobutyryloksisukkinimidiä (valmistaja Behring Diagnostics, reagenssia nimitetään GMBS:ksi tässä alla) ja joka vastaa 5 molaarista ekvivalenttia aminosytorodiini S:ää. Seoksen annettiin reagoida 25°C:ssa 2 tunnin ajan. Reaktioseos puhdistettiin preparatiivisella ohutlevykromatografialla, jolloin saatiin sytorodiini S:n GMBS-johdannainen. Ohutlevykromatografian olosuhteet olivat seuraavat: ohutlevy, 2 mm:n silikageeli 60F-254 (valmistaja Merck); kehitysliuos, metanoli: dikloorimetaani suhteessa 1:4; R_f-arvo, GMBS-johdannainen (0,82), aminosytorodiini S (0,29). Näin valmistettu GMBS-johdannainen uutettiin ohutlevyltä, uutos kuivattiin vedettömän natriumsulfaatin päällä ja liuotin poistettiin vakuumitislauksella. Sytorodiini S:n GMBS-johdannaista saatiin 2,7 mg.

Lisäksi GMBS-johdannaisen puhtaus analysoitiin HPLC:llä ja johdannainen puhdistettiin. Analyysissä käytetyt pylväs ja olosuhteet ovat seuraavat: pylväs, SSC-Aquasil PE-2, 4,6 mm x 250 mm, (Senshu Kagaku); liuotin, asetonitriiliä lisättiin 2,0 % trietyyliammoniumfosfaattiin (TEAP, pH 3,0) 30 minuutin kuluessa 0 - 30 %:n lineaarigradientin muodostamiseksi ja eluointia liuoksella, jonka asetonitriilipitoisuus oli 30 %, jatkettiin vielä 30 minuutin ajan; virtausnopeus, 1 ml/min; retentioaika, 36 min sytorodiini S:lle ja 38 min sekä 38,6 min GMBS-

johdannaiselle. Puhdistuksessa käytetyt pylväs ja olosuhteet ovat seuraavat: pylväs, Senshu Pak NP-318-4252, 10 mm x 250 mm (Senshu Kagaku); liuotin asetonitriiliä 2,0 % TEAP:ssä (pH 3,0) lisättiin 20 minuutin kuluessa 10 - 30 %:n lineaarigradientin muodostamiseksi ja eluointia liuoksella, jonka asetonitriilipitoisuus oli 30 %, jatkettiin vielä 15 min. Samalla tavalla gradientti muutettiin 30 - 100 %:ksi 5 minuutin kuluessa: virtausnopeus, 4 ml/min; retentioaika, 28 min ja 29,5 min GMBS-johdannaiselle. HPLC:llä saatu eluaatti ajettiin SEP-PAK (C_{18}) -pylvääseen (valmistaja Nihon Waters) sytorodiini S-johdannaisen assorboimiseksi, jonka jälkeen pylväs pestiin 0,5 %:isella vesipitoisella etikkahapolla ja eluoitiin 0,5 % etikkahappo-metanoli-liuoksella. Eluaatti otettiin talteen ja kuivattiin alennetussa paineessa, jolloin saatiin 3,2 mg GMBS-johdannaista. Tuotteen puhtaus analysoitiin taas HPLC:llä yllä kuvatuissa olosuhteissa.

Lisäksi mainitun HPLC:llä saadun sytorodiini S-johdannaisen massaluku mitattiin käyttäen FAB/MS-spektrometriä (valmistaja Nihon Denshi, JMS-DX300), jolloin saatiin massaspektri 1215 ($M+H^+$), joka varmistettiin lasketuksi massaluvuksi ja joka oli massaspektrin mittauksessa käytetyn tioglyserolin kanssa muodostuneen kompleksin massaluku. Johdannaisen absorptiospektissä oli hyvin tallella antrasykliinirenkaan spesifinen absorptio aallonpituudella noin 495 nm.

Lisäksi maleimidiryhmän lisäys varmistettiin taas käyttäen reaktiota aminoetaanitiolin kanssa, jolloin täplien ja piikin paikat TLC:ssä ja HPLC:ssä muuttuivat. HPLC-analyysissä käytetyt pylväs ja olosuhteet ovat yllä-kuvatut. Retentioaika: 19,5 min ja 20,5 min aminosytorodiini S:lle sekä 23 min ja 23,5 min GMBS-johdannainen - aminoetaanitioli-adduktille. Kontrollikokeena annettiin samoissa olosuhteissa kuin GMBS-johdannainen valmistetun alkuperäisen aminosytorodiini S:n ja aminoeteenitiolin seoksen reagoida. Havaittiin, ettei tiolin lisääminen lainkaan vaikuttanut aminosytorodiini S:n HPLC-piikkiin.)

Esimerkki 3

Yhteen millilitraan 50 mmol/l fosfaattipuskuriliuosta (pH 7,5), joka sisälsi 1 mmol/l EDTA:ta liuotettiin 18 mg kanin immunoglobuliinia (valmistaja Sigma). Liuokseen lisättiin 10 µl 100 mmol/l N-sukkimidyyli-S-asetyylitioasetaatin (valmistaja Behring Diagnostics, reagenssia nimitetään tässä alla SATA:ksi) dimetyyliformamidiliuosta ja seoksen annettiin reagoida 25°C:ssa 20 minuutin ajan. Reaktioseokseen lisättiin 50 µl 1 mol/l Tris-HCl-liuosta (pH 7,8) ja seoksen annettiin seisoa 25°C:ssa 5 minuutin ajan. Sitten reaktioseos fraktioitiin PD-10-pylväässä (valmistaja Pharmacia) joka oli tasapainotettu EDTA:ta sisältävällä 50 mmol/l fosfaattipuskuriliuoksella (pH 7,5). Näin saatiin immunoglobuliinin SATA-johdannainen. SATA-johdannaiseen lisättiin 0,5 mmol/l vesipitoinen hydroksyyliamiiniliuos (pH 7,5), joka sisälsi 0,25 mmol/l EDTA:ta ja joka vastaa 50 ekvivalenttia SATA:a. Seoksen annettiin reagoida 25°C:ssa yhden tunnin ajan, jolloin asetyyliryhmä poistui. Yllä olevaan SH-ryhmän sisältävän immunoglobuliinin vesipitoiseen liuokseen lisättiin liuos, joka sisälsi GMBS-johdannaista 10-kertaisen ekvivalenttimäärän SH-ryhmään nähden 20 µl:ssa dimetyyliformamidia, ja seoksen annettiin reagoida 5°C:ssa 12 tunnin ajan. Kun reaktio oli tapahtunut, reaktioseos fraktioitiin Sephandex G-25-pylväällä, 20 mm x 400 mm, (valmistaja Pharmacia), joka oli tasapainotettu 50 mmol/l fosfaattipuskuriliuoksella (pH 7,5), joka sisälsi 1 mmol/l EDTA:ta. Molekyylipainoltaan 160 000 daltonin globulaarista proteiinia vastaava fraktio eristettiin. Eluaattia monitoroitiin aallonpituuksilla 280 nm ja 495 nm proteiini- ja sytorodiini S-fraktioiden identifioimiseksi.

Näin saadusta sytorodiini S-immunoglobuliinikompleksista poistettiin suolat dialysoimalla ja kompleksi kylmäkuivattiin, jolloin saatiin 20 mg tuotetta. Sidotun sytorodiini S:n määrä immunoglobuliinimolekyyliä kohti

laskettiin sytorodiini S:n aallonpituudella 495 nm spesifisen absorption sekä kompleksin kuivapainon avulla, jolloin havaittiin, että yhtä immunoglobuliinimolekyyliä kohti sitoutui 5 molekyyliä sytorodiini S:ää. Edelleen SATAn määrää lisäämällä kompleksiin voitiin sitoa 12 sytorodiini S-molekyyliä.

Kuvio 3 esittää sellaisen kompleksin UV-spektriä, jossa yhtä immunoglobuliinimolekyyliä kohti on sitoutunut noin 12 sytorodiini S-molekyyliä. Kompleksien UV-spektrit osoittavat, että kun sitoutuneen sytorodiini S:n määrää lisätään, sytorodiini S:n absorptiomaksimi kasvaa.

Esimerkki 4

Liuokseen, joka sisälsi 5 mg sytorodiini S:ää 1 ml:ssa metanolia, lisättiin 2,6 mg γ-aminovoihappoa sisältävä metanoliliuos (pitoisuus 1 mg/ml), joka vastasi 6 moolia yhtä sytorodiini S-moolia kohti. Kun pH oli säädetty pH 8:ksi trietyyliamiinilla, 1,4 mg natriumsyaaniboorihydridiä, joka vastasi 3 molaarista ekvivalenttia, lisättiin ja seoksen annettiin reagoida 24°C:ssa 24 tunnin ajan. TLC:llä varmistettiin, sisälsikö näin saatu seos tuotetta, ja sen jälkeen tuotteen puhtaus analysoitiin HPLC:llä ja tuote puhdistettiin. Rf-arvot TLC:ssä esimerkin 2 olosuhteissa olivat 0,57 sytorodiini S:lle ja 0,28 γ-aminobutyraattijohdannaiselle. Retentioajat HPLC-analyysissä esimerkin 2 olosuhteissa olivat 36 min sytorodiini S:lle ja 29 min γ-aminobutyraattijohdannaiselle. Puhdistus HPLC:llä esimerkin 2 olosuhteissa tuotti noin 1,5 mg γ-aminobutyraattijohdannaista.

Lisäksi mainitun johdannaisen massaluvun mittauksessa FAB/MS-spektrometriä (JMS-DX300) käyttäen saatiin massaspektri 1028 ($M+H^+$), joka oli identtinen lasketun massaluvun kanssa.

Edelleen, johdannaisen absorptiospektrissä säilyi hyvin sytorodiini S:n antrasykliinirenkaan spesifinen absorptio aallonpituudella noin 495 nm.

Esimerkki 5

Liuokseen, joka sisälsi 2,5 mg sytorodiini S:n γ-aminobutyraattijohdannaista DMF:ssä (pitoisuus 50 mg/ml), lisättiin 515 µg disykloheksyylikarbodi-imidiä sisältävä DMF-liuos (pitoisuus 50 mg/ml), joka vastasi molaarisuudeltaan yhtä suurta määrää sytorodiini S-johdannaista. Seoksen annettiin reagoida huoneenlämpötilassa yhden tunnin ajan.

Liuokseen, joka sisälsi 20 mg kanin immunoglobuliinia (valmistaja Sigma) 1 ml:ssa 50 mmol/l fosfaattipuskuriliuosta (pH 7,5), lisättiin sytorodiini S-johdannaisen yllä valmistettu DMF-liuos. Seoksen annettiin reagoida huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan. Sytorodiini S:n γ-aminobutyraattijohdannainen vastaa 20 molaarista ekvivalenttia kanin immunoglobuliinia. Sitten seokseen lisättiin nopeasti 1 mol/l Tris-HCl-puskuriliuos (pH 7,8) ja seosta sekoitettiin ja sen annettiin seisoa 10 minuutin ajan. Saatu massa erotettiin ja puhdistettiin PD-10-pylväässä (valmistaja Pharmacia), joka oli tasapainotettu 50 mmol/l fosfaattipuskuriliuoksella.

Esimerkki 6

Liuokseen, joka sisälsi 5 mg sytorodiini S:ää 1 ml:ssa metanolia, lisättiin 3,3 mg lysiiniä sisältävä 1 mol/l vesipitoinen etikkahappoliuos (pitoisuus 10 mg/ml), joka vastasi 6 molaarista ekvivalenttia sytorodiini S:ää, sekä 1,4 mg natriumsyaaniboorihydridiä, joka vastasi 3 molaarista ekvivalenttia. Seoksen annettiin reagoida 25°C:ssa 24 tunnin ajan. Kun oli varmistettu, sisälsikö näin saatu reaktioseos tuotetta, tuotteen puhtaus analysoitiin HPLC:llä, jonka jälkeen tuote puhdistettiin. Rf-arvo lysiinijohdannaiselle TLC:ssä esimerkin 2 olosuhteissa oli 0,20. Retentioaika lysiinijohdannaiselle HPLC-analyysissä esimerkin 2 olosuhteissa oli 27 min ja 28 min. Puhdistus HPLC:llä esimerkin 2 olosuhteissa tuotti noin 2,6 mg lysiinijohdannaista.

Lisäksi mainitun johdannaisen massaluku mitattiin käyttäen FAB/MS-spektrometriä (JMS-DX300), jolloin saatiin massaspektri 1071 ($M+H^+$), joka oli identtinen lasketun massaluvun kanssa.

Edelleen johdannaisen absorptiospektri säilyi hyvin sytorodiini S:n antrasykliinirenkaan spesifinen absorptio aallonpituudella noin 495 nm.

Esimerkki 7

Liuokseen, joka sisälsi 5 mg sytorodiini S:ää 1 ml:ssa metanolia, lisättiin 1,7 mg aminoetaanitiolia sisältävä metanoliliuos (pitoisuus 1 mg/ml), joka vastasi 6 molaarista ekvivalenttia sytorodiini S:ää, sekä 1,4 mg natriumsyaaniboorihydridiä, joka vastasi 3 molaarista ekvivalenttia. Seoksen annettiin reagoida 25°C:ssa 24 tunnin ajan. Kun TLC:llä oli varmistettu, sisälsikö näin saatu reaktioseos tuotetta, tuotteen puhtaus analysoitiin HPLC:llä, jonka jälkeen tuote puhdistettiin. R_f-arvo aminoetaanitiolijohdannaiselle TLC:ssä esimerkin 2 olosuhteissa oli 0,25. Retentioaika aminoetaanitiolijohdannaiselle HPLC-analyysissä esimerkin 2 olosuhteissa oli 28 min. Puhdistus HPLC:llä esimerkin 2 olosuhteissa tuotti noin 1,6 mg aminoetaanitiolijohdannaista.

Lisäksi mainitun johdannaisen massaluku mitattiin käyttäen FAB/MS-spektrometriä (JMS-DX300), jolloin saatiin massaspektri 1002 ($M+H^+$), joka oli identtinen lasketun massaluvun kanssa.

Edelleen, johdannaisen absorptiospektrissä säilyi hyvin sytorodiini S:n antrasykliinirenkaan spesifinen absorptio aallonpituudella noin 495 nm.

Toisaalta, -SH-ryhmän lisäys varmistettiin taas käyttäen reaktiota N-etyylimaleimidin kanssa, jolloin täplien ja piikin paikat TLC:ssä ja HPLC:ssä muuttuivat. (Aminoetaanitiolijohdannaisella havaittuja muutoksia ei havaittu sytorodiini S:llä eikä aminosytorodiini S:llä.)

Esimerkki 8

Liuokseen, joka sisälsi 5 mg sytorodiini S:ää 1 ml:ssa metanolia, lisättiin 2,7 mg kysteiiniä sisältävä metanoliliuos (pitoisuus 1 mg/ml), joka vastasi 6 molaarista ekvivalenttia sytorodiini S:ää, sekä 1,4 mg natriumsyaaniboorihydridiä, joka vastasi 3 molaarista ekvivalenttia. Seoksen annettiin reagoida 25°C:ssa 24 tunnin ajan. Kun TLC:llä oli varmistettu, sisälsikö näin saatu reaktioseos tuotetta, tuotteen puhtaus analysoitiin HPLC:llä, jonka jälkeen tuote puhdistettiin. R_f-arvo kysteiinijohdannaiselle TLC:ssä esimerkin 2 olosuhteissa oli 0,35. Retentioaika kysteiinijohdannaiselle HPLC-analyysissä esimerkin 2 olosuhteissa oli 32 min. Puhdistus HPLC:llä esimerkin 2 olosuhteissa tuotti noin 1,8 mg kysteiinijohdannaista.

Lisäksi mainitun johdannaisen massaluku mitattiin käyttäen FAB/MS-spektrometriä (valmistaja Nihon Denshi), jolloin saatiin massaspektri 1046 ($M+H^+$), joka oli identtinen lasketun massaluvun kanssa.

Edelleen, -SH-ryhmän lisäys varmistettiin esimerkin 7 mukaisella tavalla käyttäen reaktiota N-etyylimaleimidin kanssa, jolloin täplien ja piikin paikat muuttuivat (TLC ja HPLC).

Esimerkki 9

Liuokseen, joka sisälsi 11 mg kanin immunoglobuliinia (valmistaja Sigma) 1 ml:ssa 1 mmol/l EDTA:ta sisältävää 50 mmol/l fosfaattipuskuriliuosta, lisättiin 191 µg N-γ-maleimidobutyryloksisukkinimidiä (valmistaja Behring Diagnostics, reagenssia nimitetään tässä alla GMBS:ksi) sisältävä DMF-liuos (pitoisuus 50 mg/ml). Seoksen annettiin reagoida 25°C:ssa 2 tunnin ajan. Reaktioseokseen lisättiin 50 µl 1 mol/l Tris-HCl-puskuriliuosta (pH 7,8) ja seoksen annettiin seisoa 25°C:ssa 5 minuuttia. Sitten reaktioseos fraktioitiin PD-10-pylväässä (valmistaja Pharmacia), joka oli tasapainotettu 1 mmol/l EDTA:ta

sisältävällä 50 mmol/l fosfaattipuskuriliuoksella (pH 7,5), jolloin saatiin kanin immunoglobuliini, johon oli lisätty maleimidiä.

Esimerkissä 7 aikaisemmin tuotetun sytorodiini S-johdannaisen, johon oli lisätty -SH-ryhmä, annettiin reagoida kanin immunoglobuliinin kanssa, johon oli lisätty maleimidiä.

Liuoks, joka sisälsi 1,5 mg sytorodiini S:n aminoetaanitiolijohdannaista DMF:ssä (pitoisuus 100 mg), joka vastasi 2 molaarista ekvivalenttia maleimidiryhmän sisältävää kanin immunoglobuliinia, lisättiin yllä valmistettuun maleimidiä sisältävään kanin immunoglobuliinin vesipitoiseen liuokseen. Seoksen annettiin reagoida 5°C:ssa 12 tunnin ajan.

Esimerkki 10

Liuokseen, joka sisälsi 5 mg sytorodiini S:ää 1 ml:ssa metanolia, lisättiin 3,2 mg glysiinietyyliesteriä sisältävä metanoliliuos (pitoisuus 1 mg/ml), joka vastasi 6 molaarista ekvivalenttia sytorodiini S:ää, sekä 1,4 mg natriumsyaaniboorihydridiä, joka vastasi 3 molaarista ekvivalenttia. Seoksen annettiin reagoida 25°C:ssa 24 tunnin ajan. Kun oli varmistettu TLC:llä, sisälsikö näin saatu reaktioseos tuotetta, tuotteen puhtaus analysoitiin HPLC:llä, jonka jälkeen tuote puhdistettiin. Rf-arvo glysiinietyyliesterijohdannaiselle TLC:ssä esimerkin 2 olosuhteissa oli 0,34. Retentioaika glysiinietyyliesterijohdannaisella HPLC-analyysissä esimerkin 2 olosuhteissa oli 32 min ja 33 min. Puhdistus HPLC:llä esimerkin 2 olosuhteissa tuotti noin 1,4 mg glysiinietyyliesterijohdannaista.

Lisäksi mainitun johdannaisen massaluku mitattiin käyttäen FAB/MS-spektrometriä (JMS-DX300), jolloin saatiin massaspektri 1028 ($M+H^+$), joka oli identtinen lasketun massaluvun kanssa.

Edelleen, johdannaisen absorptiospektrissä säilyi hyvin sytorodiini S:n antrasykliinirenkaan spesifinen absorptio aallonpituudella noin 495 nm.

Esimerkki 11

7 - 10 viikon ikäisiin BALB/C-naarashiiriin annosteltiin vatsaonteloon 25 µg puhdistettua ihmisen CEA:ta hiirtä kohti Freund's complete adjuvant -adjuvantin kanssa. 10 viikon kuluttua hiiriin annosteltiin liuos, joka sisälsi 25 µg CEA:ta fysiologisessa suolaliuoksessa, suoneen. Kolmantena päivänä immunogeenin annon jälkeen perna eristettiin ja pernasolut fuusioitiin non-productive-tyyppisten myeloomasolujen X63-Ag 8 653 kanssa. Solufuusio ja sitä seuranneet viljely ja kloonaus suoritettiin periaatteessa Oi et al. 'n menetelmän mukaisesti (Oi, V. T. & Herzenberg, L. A., Selected Methods in Cellular Immunology, Michell, B. B. & Shiigi, S. M., toim., s. 351, Freeman & Co, San Francisco, 1980). Pernasolujen suhde myeloomasoluihin oli 10:1. Seos sentrifugoitiin lyhyesti, jolloin saatiin solunappi. Solunappiin lisättiin tipoittain 0,5 ml 42,5 % polyetyleeniglykolia (MP 2 000), joka sisälsi 15 % dimetyylisulfoksidia, ja seosta sekoitettiin hitaasti 37°C:ssa 2 minuutin ajan. Saatu seos laimennettiin suhteessa 20:1 RPMI-väliaineella. Sentrifugoinnin jälkeen se suspendoitiin nauhan alkion seerumia sisältävään RPMI-1640-väliaineeseen. Suspensio jaettiin 96-kuoppaiselle mikrotiitterilevylle 5×10^5 solua kuoppaa kohti. Kun soluja oli viljelty 37°C:ssa yli yön, jokaiseen kuoppaan lisättiin yksi tippa HAT-väliainetta (100 µmol/l hypoksantiini, 4×10^{-4} µmol/l aminopteriiniä, $1{,}6 \times 10^{-2}$ tymidiiniä). Hybridoomien valikointi HAT-väliaineen avulla suoritettiin toisena, kolmantena, viidentenä, seitsemäntenä, kymmenentenä ja kolmantenatoista päivänä vaihtaen puolet kussakin kuopassa olevasta väliaineesta tuoreeseen HAT-väliaineeseen. Viljelmän supernatantin anti-CEA-aktiivisuus määritettiin RIA:lla tai EIA:lla. Solut, jotka

analyysin perusteella olivat aktiivisia, siirrettiin suurempaan viljelysysteemiin tai kloonattiin käyttäen rajoittava laimennus-menetelmää. Näin saadut fuusioidut solut siirrettiin samaa lajia olevien, etukäteen 0,5 ml:lla tetrametyylipentadekaania käsiteltyjen hiirien vatsaonteloon. Yhdestä kahteen viikon kuluttua siirrosta saatiin muutamia millilitroja askites-nestettä, joka sisälsi homogeenistä monoklonaalista vasta-ainetta pitoisuudessa 5 - 10 mg/ml.

Näin saadun CEA:ta vastaan muodostetun monoklonaalisen vasta-aineen (MA 204) sytorodiini S-kompleksi valmistettiin esimerkissä 3 kuvatulla tavalla.

Sytorodiini S-immunoglobuliini-kompleksin syöpälääkevaikutuksen toteamiseksi suoritettu koe

96-kuoppaiselle mikrotiitterilevylle jaettiin 200 µl RPMI 1640 -10 % vasikan sikiön seerumi-väliaineessa (1×10^4 solua/kuoppa) viljeltyä. Soluviljelmään lisättiin 10 µl sekä sytorodiini S:ää (CYT) että sytorodiini S-immunoglobuliini-kompleksia (CYT-kanin IgG). Seosta inkuboitiin 37°C:ssa 18 tunnin ajan. Sitten seokseen lisättiin 25 µl tritiumilla leimattua tymidiiniä pitoisuutena 0,5 µCi/kuoppa ja seosta inkuboitiin 37°C:ssa 6 tunnin ajan. Tämän jälkeen solut otettiin talteen suodattimelle solunkerääjän avulla, kuivattiin ja solun sisältämän leimatun tymidiinin määrä määritettiin käyttäen nestetuikelaskijaa solun DNA-synteesiaktiivisuuden vertaamiseksi. Tulokset on esitetty kuviossa 4. Kuvio 4 osoittaa, että CYT:n syöpälääkevaikutus säilyy suunnilleen CYT-kanin IgG-kompleksissa.

Samoin sytorodiini S-johdannaisen (sytorodiini S-monoklonaalinen anti-CEA-vasta-aine-kompleksi) vaikutus testattiin CEA:ta tuottavien Colo 205-solujen suhteen. Tulokset on esitetty kuviossa 5. Koemateriaalien määrät ovat seuraavat:

Näytteet	Lääkeaineet/vasta-aineet	Suhde
CYT	0,2 /ug/ml	
CYT-MA 204*	0,2 /ug**/6,3 /ug/ml	2:1
CYT-Rab IgG	0,2 /ug*/12,5 /ug/ml	2:1
MA 204*	0,5 /ug/ml	
Cell	Colo 205, 5 x 10^4/kuoppa	

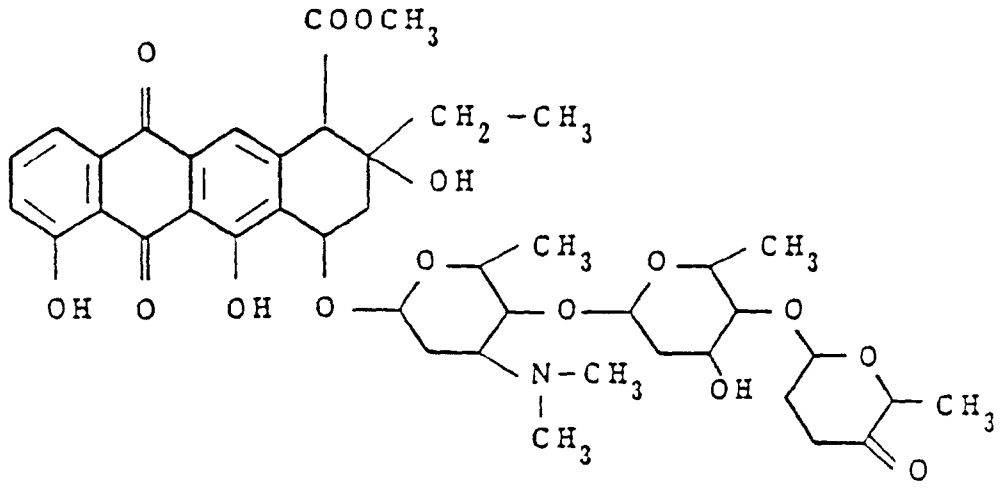
*MA 204 on monoklonaalinen anti-CEA-vasta-aine

** osoittaa CYT-aktiivisuusekvivalenttia (CYT-ekviv.).

Koska MA 204:n selektiivinen spesifisyys on suurempi kuin Rab IgG:n, kuviossa 5 esitetty CYT-MA 204-kompleksin suurempi solujen kasvua inhiboiva vaikutus kuin CYT-Rab IgG-kompleksin solujen kasvua inhiboiva vaikutus viittaa siihen, että keksinnön mukainen sytorodiini S-imminoglobuliini-kompleksi vaikuttaa selektiivisesti syöpäsoluihin.

Vertailu aklasinomysiini-immunoglobuliini-kompleksiin

Vertailun vuoksi immunoglobuliinikompleksi aklasinomysiini A:n kanssa

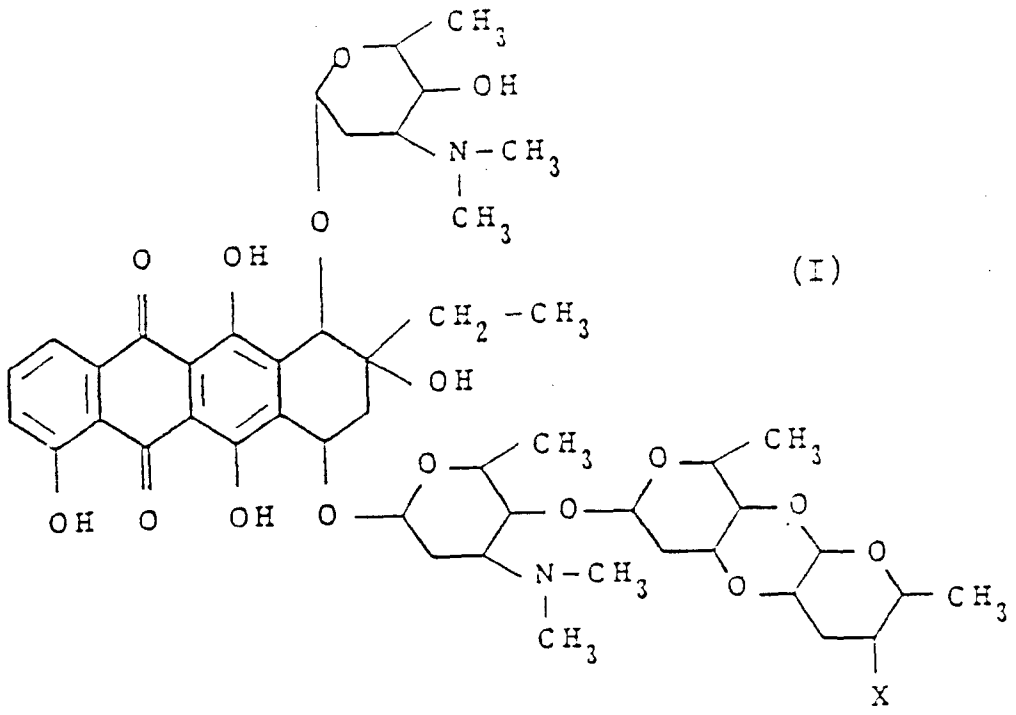


joka on rakenteellisesti samanlainen kuin sytorodiini S, valmistettiin esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Kun sytorodiini S:ää lisättiin suhteessa 5 - 12 molekyyliä vasta-ainemolekyyliä kohti, aklasinomysiiniä lisättiin niin pienessä suhteessa kuin 2 molekyyliä vasta-ainemolekyyliä kohti.

Näiden kahden vasta-ainekompleksin DNA-synteesiä inhiboiva vaikutus L1210-soluissa määritettiin soluihin sisäänotetun tritiumilla leimatun tymidiinin määränä. Tulokset on esitetty kuviossa 6. Kuvio 6 osoittaa, että sytorodiini S-kompleksin aktiivisuus soluja vastaan oli suurempi kuin aklasinomysiinikompleksin vaikutus.

Patenttivaatimukset:

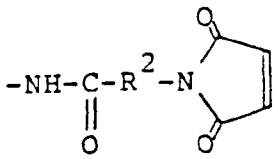
1. Sytorodiini S-johdannainen, t u n n e t t u siitä, että sillä on yleinen kaava (I)



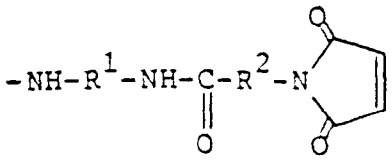
(I)

jossa X on ryhmä, jolla on kaava

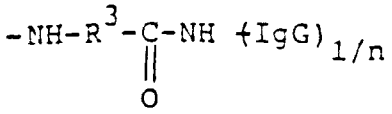
$-NH_2$, $-NH-R^1-NH_2$, $-NH-R^1-COOH$, $-NH-R^1-SH$,



,

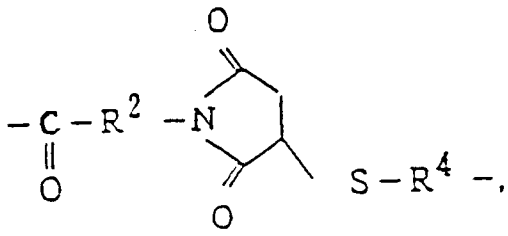


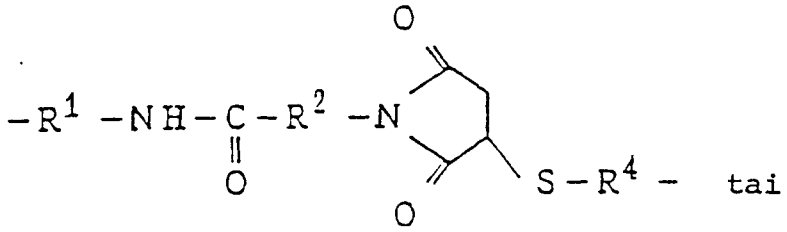
tai



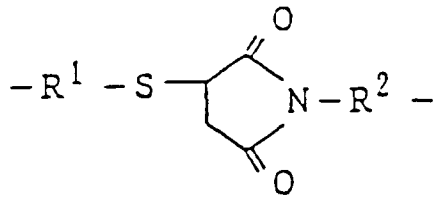
jossa R^1 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, joka voi olla substituoitu millä tahansa substituentilla, R^2 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, R^3 on kaksiarvoinen orgaaninen ryhmä, IgG on immunoglobuliiniosa ja n on luku 1 - 15, sekä sen suola.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sytorodiini S-johdannainen, t u n n e t t u siitä, että R^3 on R^1 tai ryhmä, jolla on kaava





tai



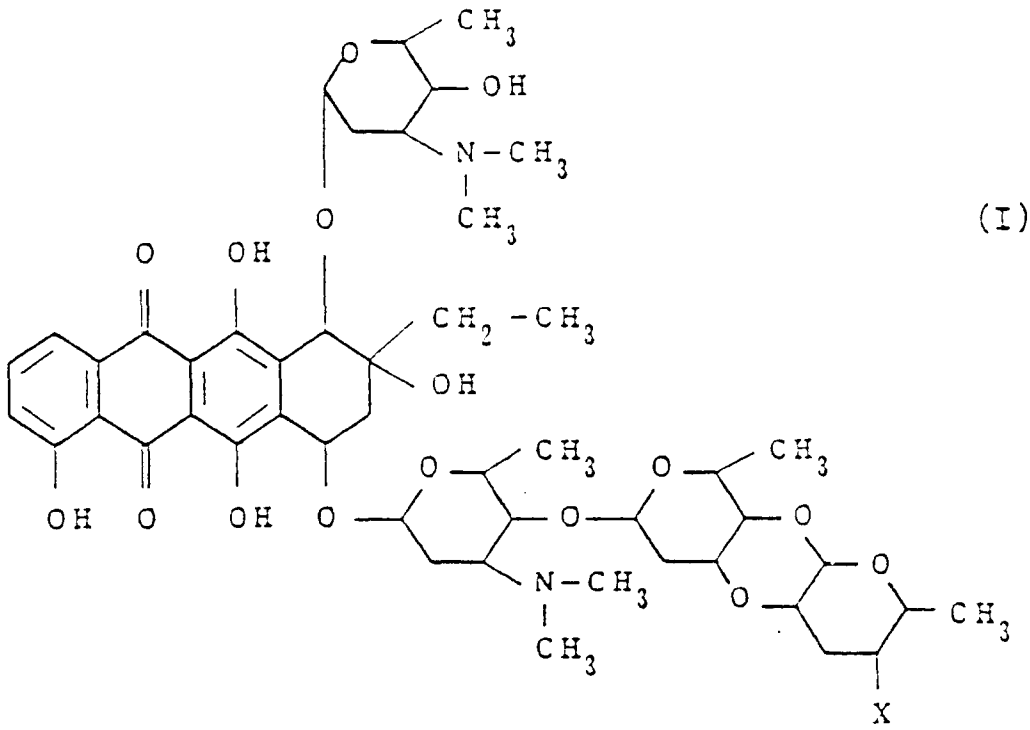
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen sytorodiini S -johdannainen, t u n n e t t u siitä, että R^2 on propyleeniryhmä ja R^4 on metyleeniryhmä.

jossa R^4 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä.

4. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen sytorodiini S-johdannainen, t u n n e t t u siitä, että n on 5 - 12.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen sytorodiini S-johdannainen, t u n n e t t u siitä, että IgG on karsinoembryonaalista antigeenia (CEA) vastaan muodostettu vasta-aineryhmä.

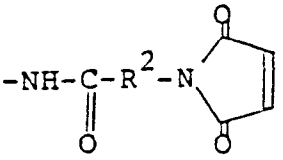
6. Menetelmä yleisen kaavan (I) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi



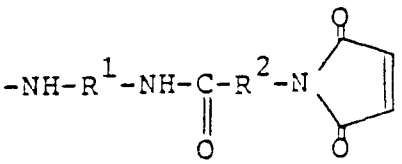
(I)

jossa X on ryhmä, jolla on kaava

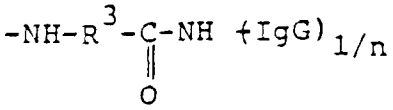
$-NH_2$, $-NH-R^1-NH_2$,



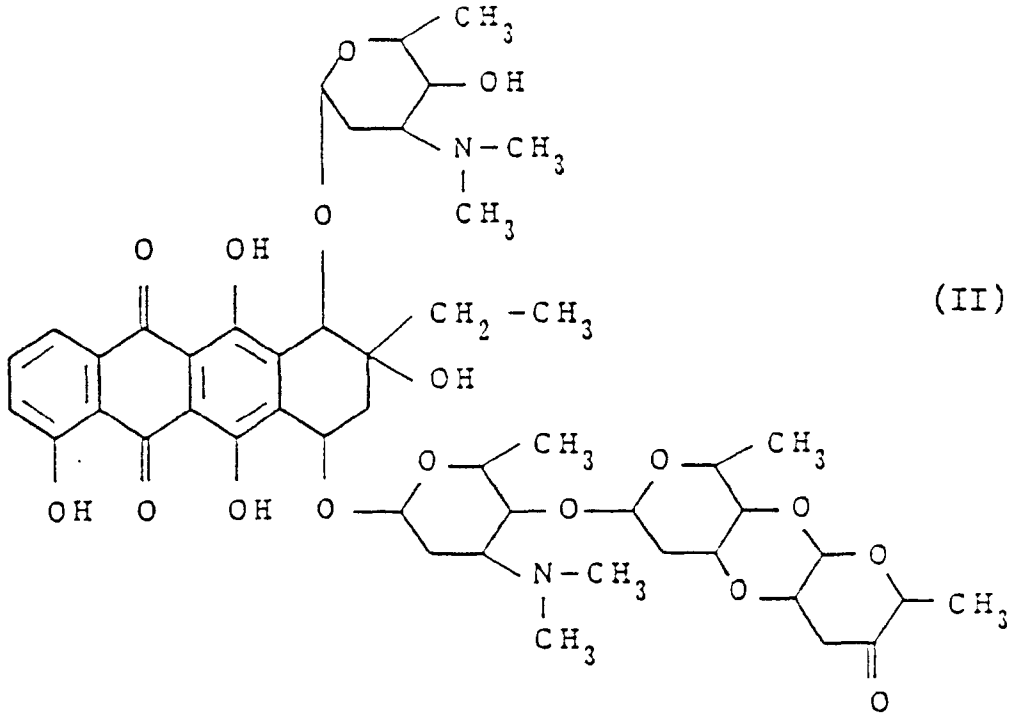
,



tai

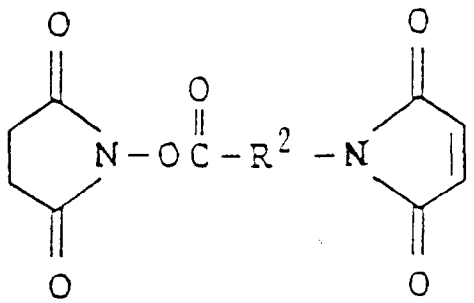


jossa R^1 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, joka voi olla substituoitu millä tahansa substituentilla, R^2 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, R^3 on kaksiarvoinen orgaaninen radikaali, IgG on immunoglobuliiniosa ja n on luku 1 - 15, t u n n e t t u siitä, että siinä pelkistetään kaavan (II) mukainen sytorodiini S



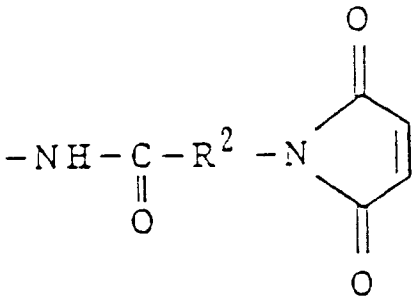
(II)

alkaalimetallisyaaniboorihydridillä ammoniumsuolan tai yhdisteen, jolla on kaava $NH_2-R^1-NH_2$, jossa R^1:llä on yllä määritelty merkitys, läsnäollessa, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen, jossa X yllä mainitussa kaavassa on $-NH_2$ tai $-NH-R^1-NH_2$, tarvittaessa, annetaan tuotteen reagoida kaavan (III) mukaisen maleimidiyhdisteen kanssa

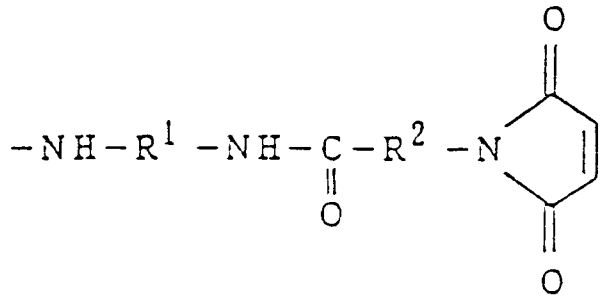


(III)

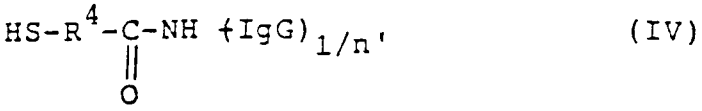
jossa R^2:lla on yllä määritelty merkitys, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen, jossa X kaavassa (I) on



tai

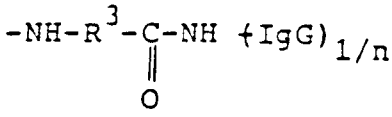


ja edelleen, tarvittaessa, annetaan tuotteen reagoida kaavan (IV) mukaisen tioloidun immunoglobuliinin kanssa



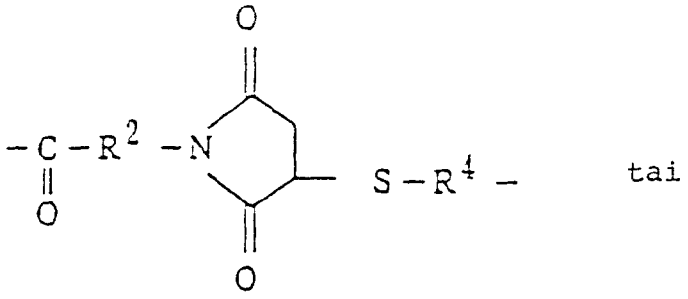
(IV)

jossa R^4 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, IgG:llä on yllä määritelty merkitys ja n' on luku 1 - 20, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen, jossa X on

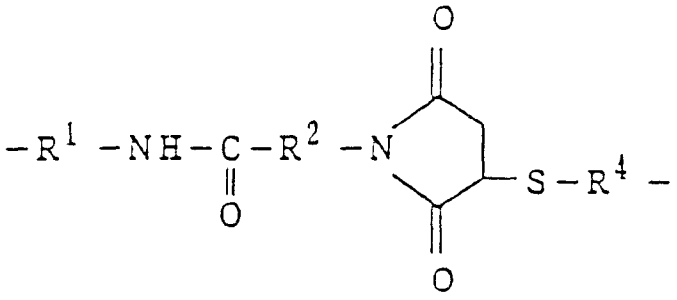


.

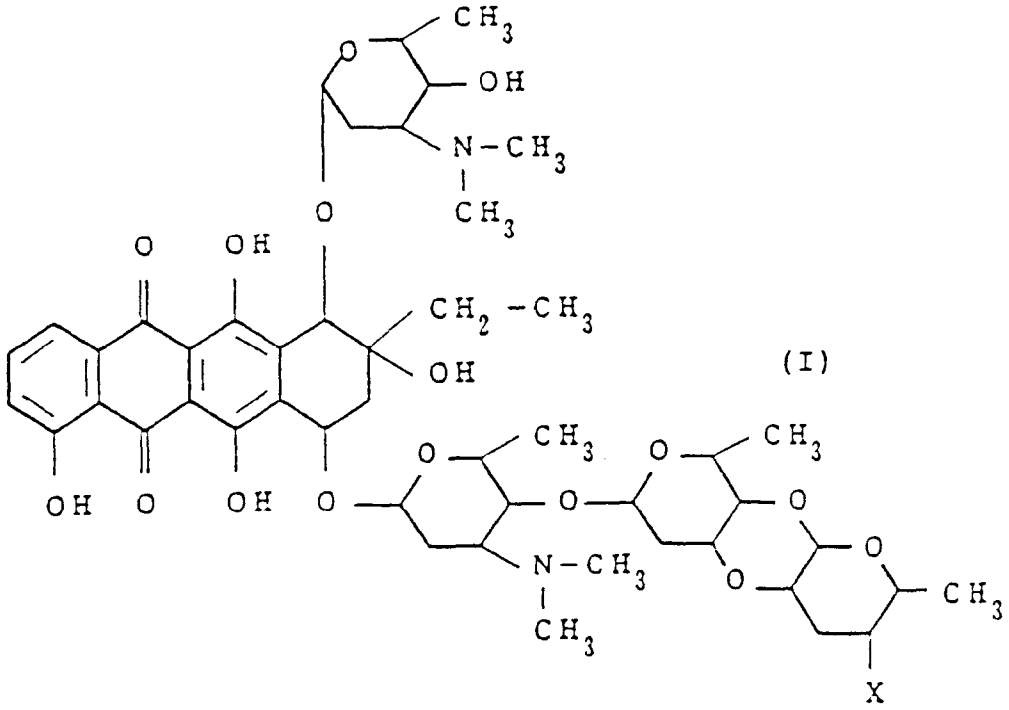
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että R^3 on



tai

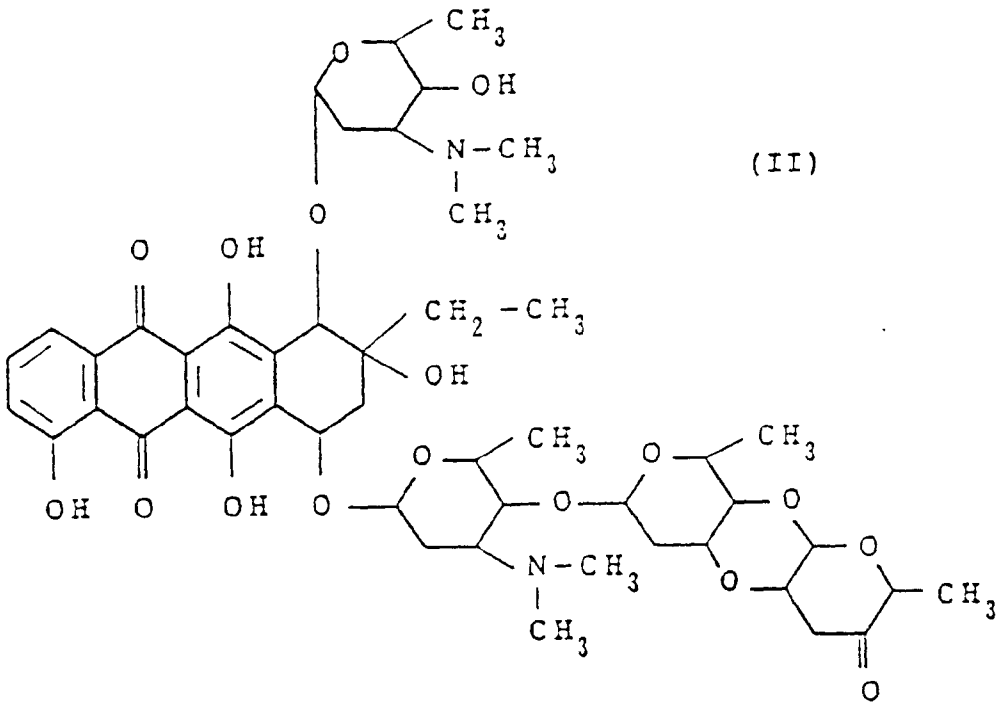


8. Menetelmä kaavan (I) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi



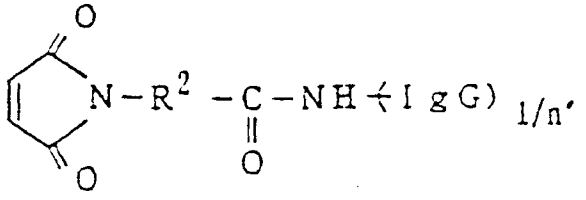
(I)

jossa X on ryhmä, joka sisältää $-NH-R^1-SH$-ryhmän tai $-NH-R^3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH\text{-}(IgG)_{1/n}$-ryhmän, jossa R^1 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, joka voi olla substituoitu millä tahansa substituentilla, R^3 on kaksiarvoinen orgaaninen ryhmä, IgG on immunoglobuliiniosa ja n on luku 1 - 15, t u n n e t t u siitä, että kaavan (II) mukainen sytorodiini S pelkistetään



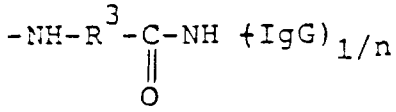
(II)

alkaalimetallisyaaniboorihydridillä yhdisteen, jolla on kaava NH_2-R^1-SH, jossa R^1:llä on yllä määritelty merkitys, läsnäollessa, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen, jossa X yllä mainitussa kaavassa (I) on $-NH-R^1-SH$, ja, tarvittaessa, annetaan tuotteen reagoida kaavan (V) mukaisen maleimidiloidun immunoglobuliinin kanssa

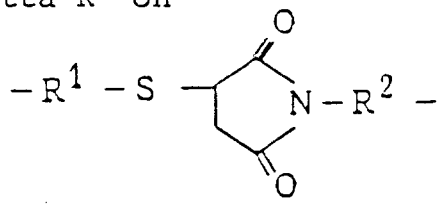


(V)

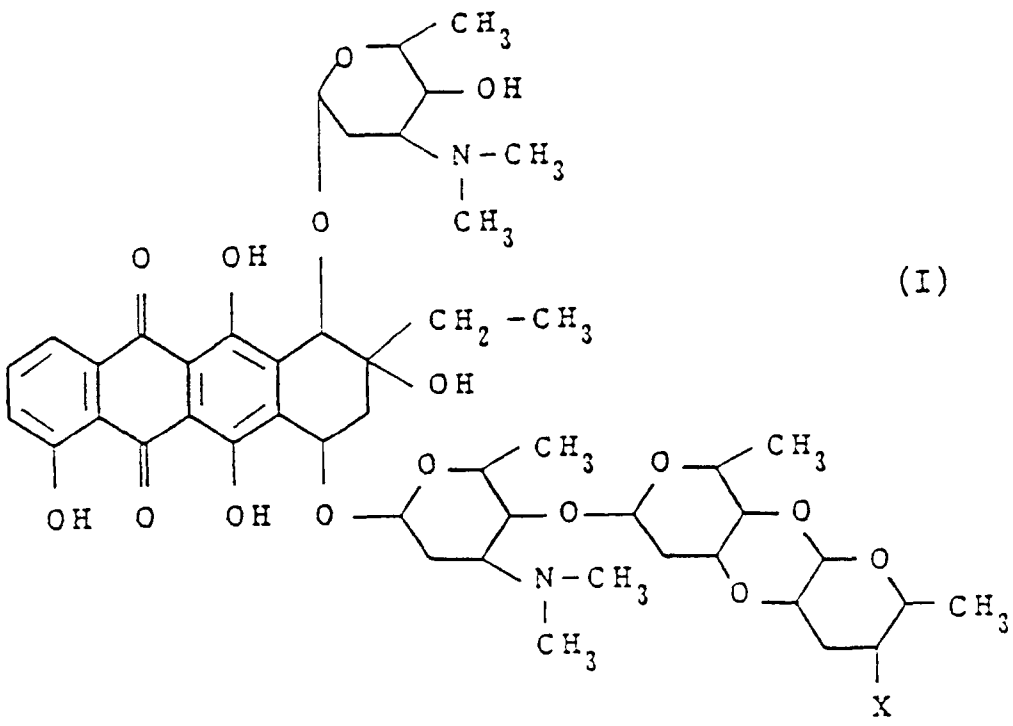
jossa R^2:lla ja IgG:llä on yllä määritellyt merkitykset ja n' on luku 1 - 20, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen, jossa X kaavassa (I) on



9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että R^3 on



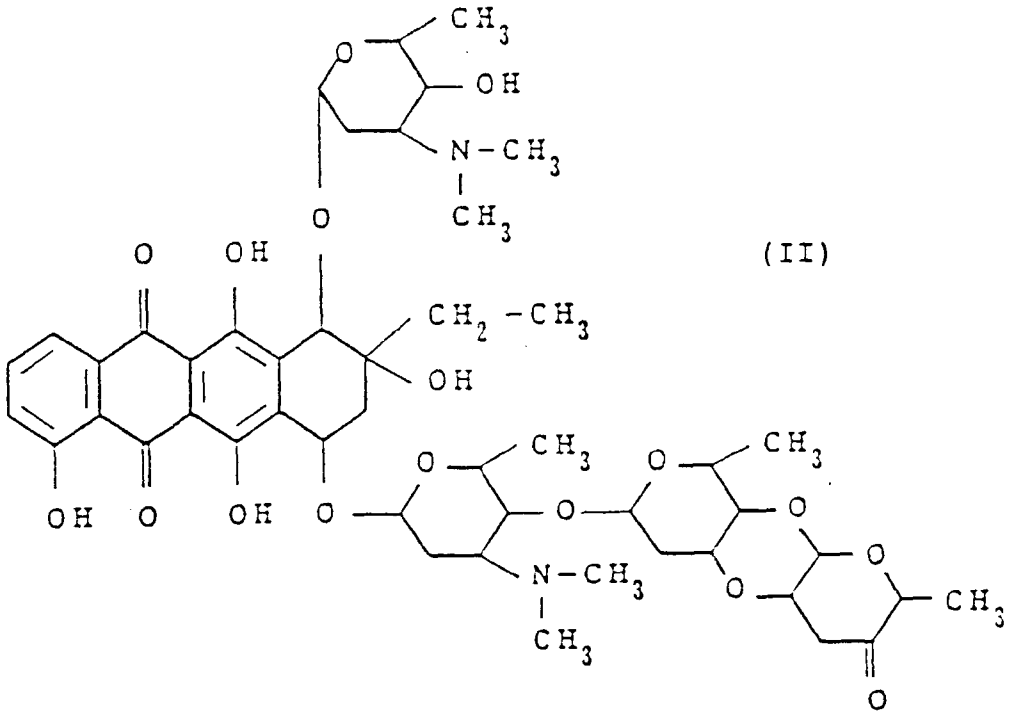
10. Menetelmä kaavan (I) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi



(I)

jossa X on ryhmä, joka sisältää $-NH-R^1-COOH$-ryhmän tai $-NH-R^3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH\{IgG\}_{1/n}$-ryhmän, jossa R^1 on kaksiarvoinen

hiilivetyryhmä, joka voi olla substituoitu millä tahansa substituentilla, R^3 on kaksiarvoinen orgaaninen ryhmä, IgG on immunoglobuliiniosa ja n on luku 1 - 15, t u n n e t t u siitä, että kaavan (II) mukainen sytorodiini S pelkistetään



(II)

alkaalimetallisyaaniboorihydridillä yhdisteen, jolla on kaava NH_2-R^1-COOH, jossa R^1:llä on yllä määritelty merkitys, läsnäollessa, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen, jossa X yllä mainitussa kaavassa (I) on $-NH-R^1-COOH$ ja, tarvittaessa, annetaan tuotteen reagoida kaavan (VI) mukaisen immunoglobuliinin kanssa

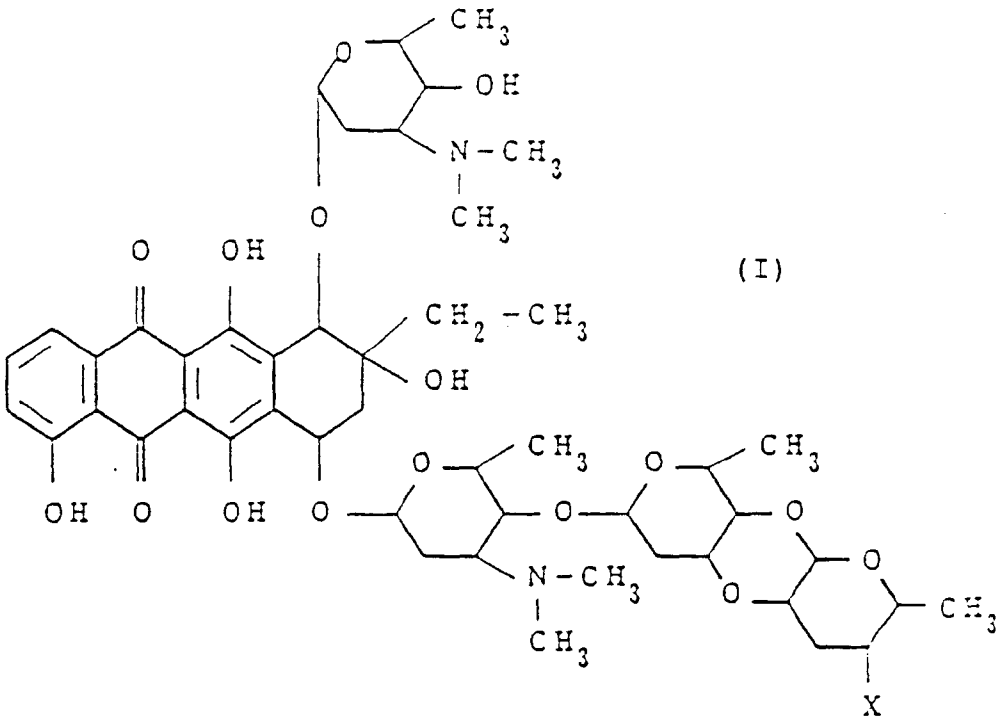
$$NH_2\text{-}(IgG)_{1/n} \qquad (VI)$$

jossa IgG:llä on yllä määritelty merkitys ja n on luku 1 - 15, jolloin saadaan sytorodiini S-johdannainen, jossa X kaavassa (I) on

$$-NH-R^3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH\text{-}(IgG)_{1/n}$$

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä sytorodiini S-johdannaisen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että R^3 on R^1.

12. Syöpälääke, t u n n e t t u siitä, että se sisältää yleisen kaavan (1) mukaisen sytorodiini S-johdannaisen

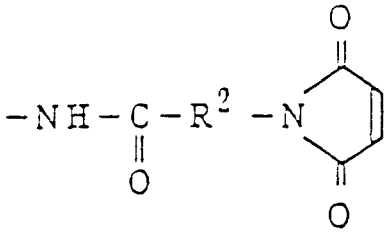


(I)

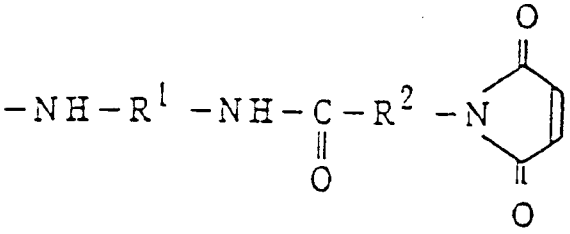
jossa X on ryhmä, jolla on kaava

$-NH_2$, $-NH-R^1-NH_2$,

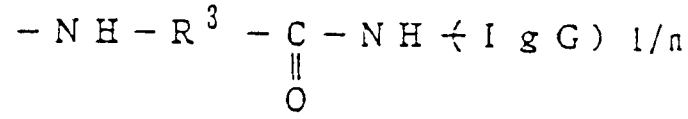
$-NH-R^1-COOH$, $-NH-R^1-SH$,



,

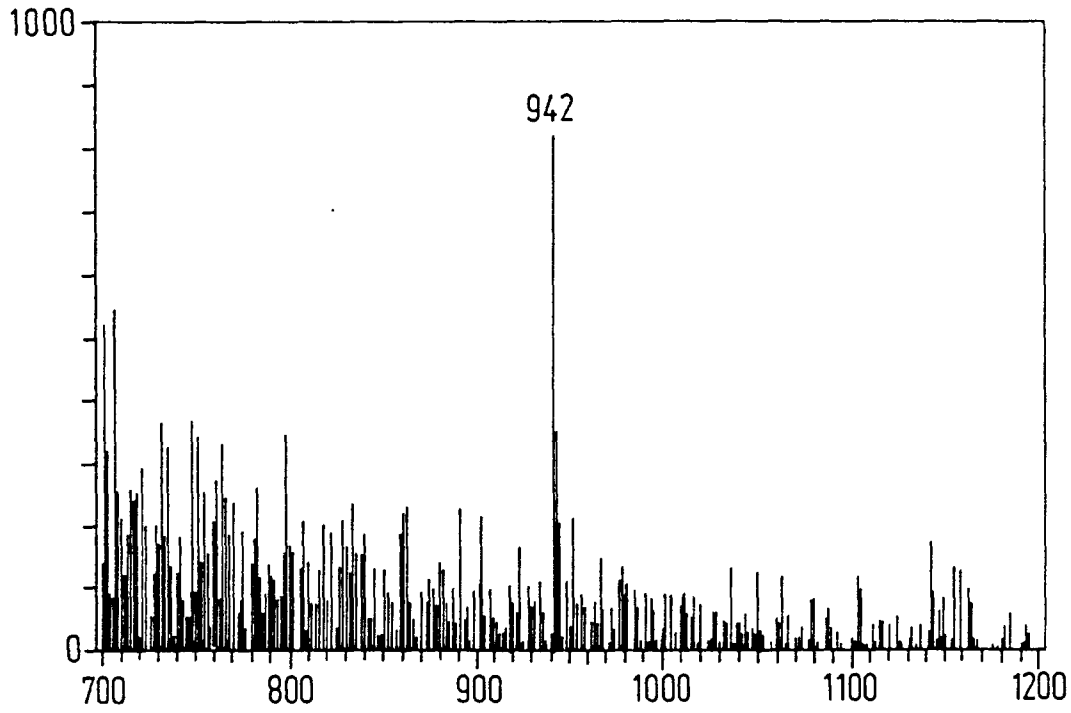


tai



jossa R^1 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, joka voi olla substituoitu millä tahansa substituentilla, R^2 on kaksiarvoinen hiilivetyryhmä, R^3 on kaksiarvoinen orgaaninen ryhmä ja n on luku 1 - 15.

FIG. 1



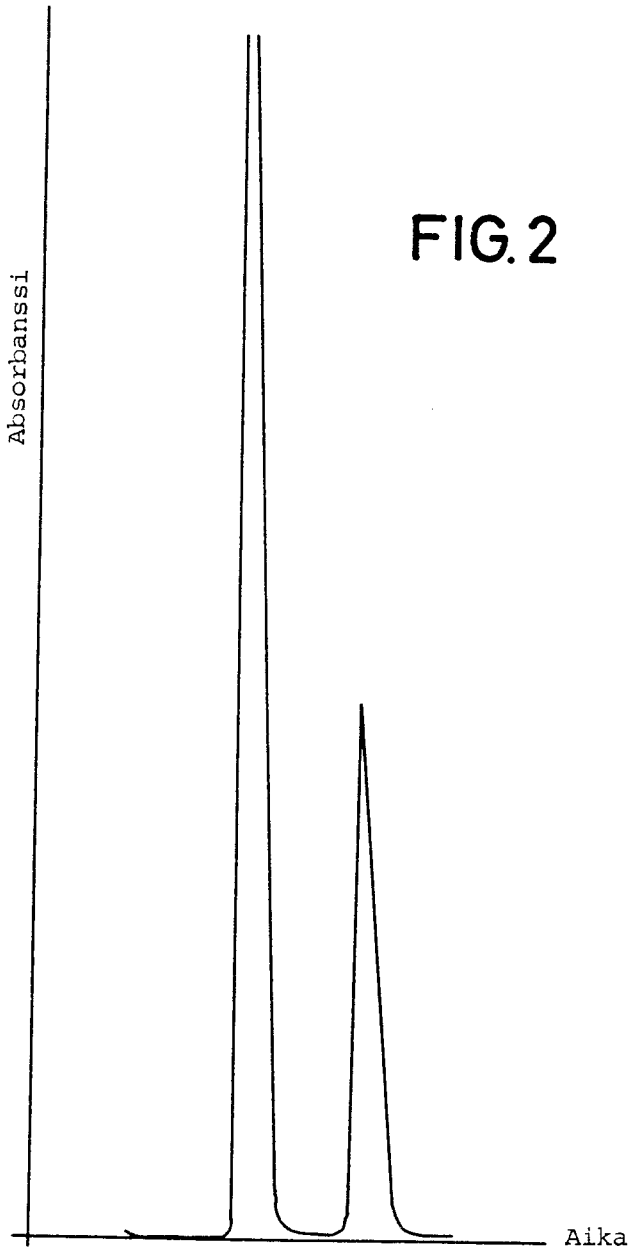


FIG. 2

FIG. 3

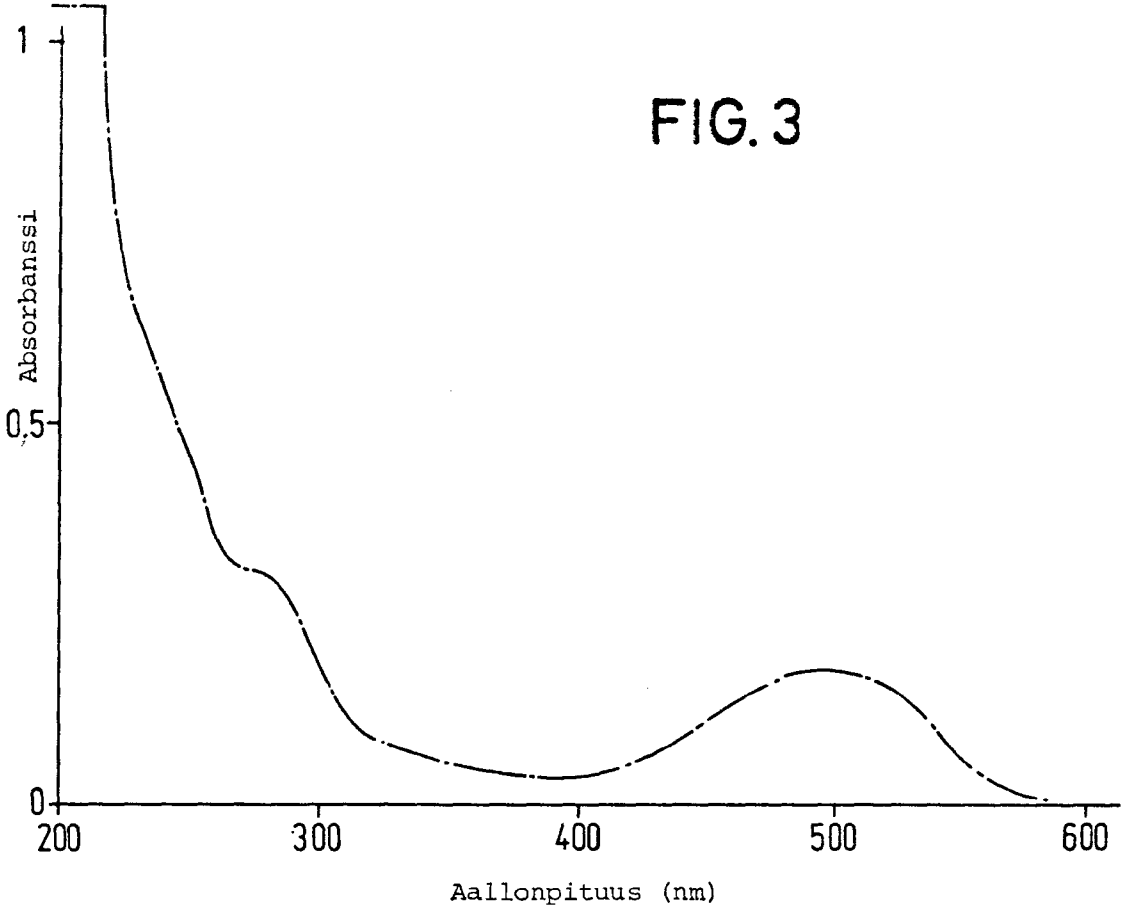

1
0,5
0
Absorbanssi
200
300
400
500
600
Aallonpituus (nm)

FIG. 4

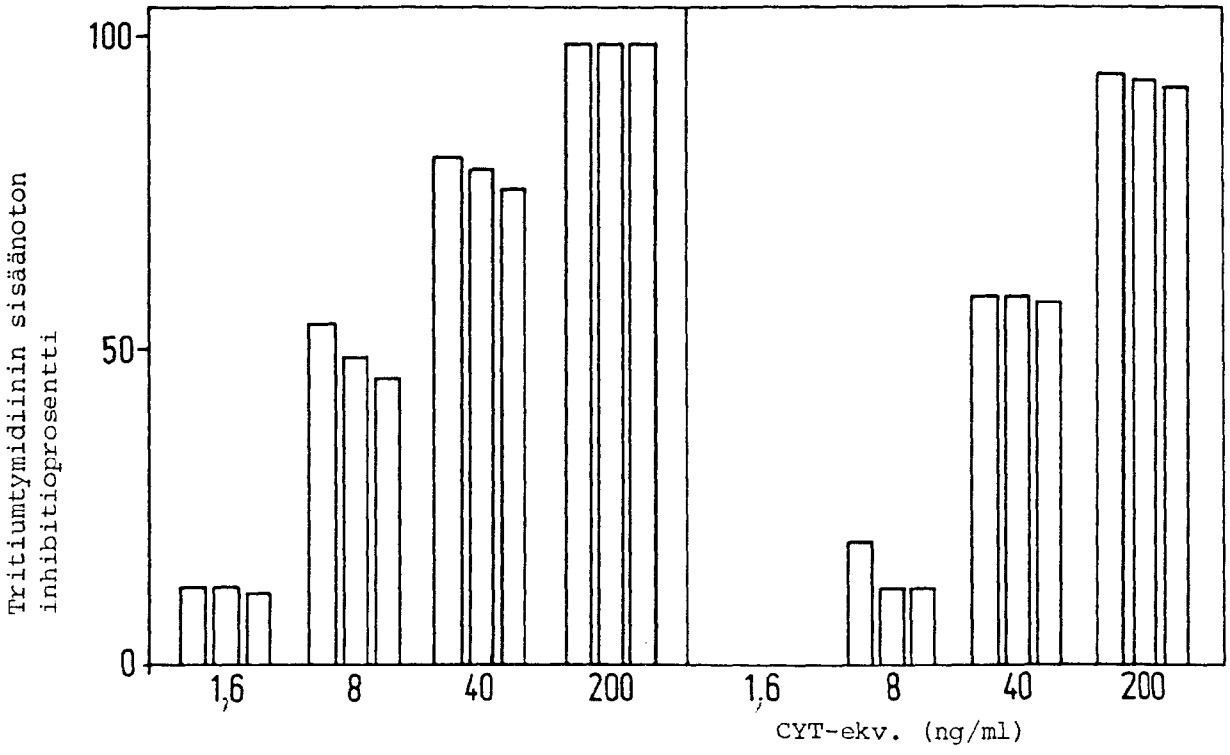

100
50
0
Tritiumtymidiinin sisäänoton inhibitioprosentti
1,6
8
40
200
1,6
8
40
200
CYT-ekv. (ng/ml)

FIG. 5

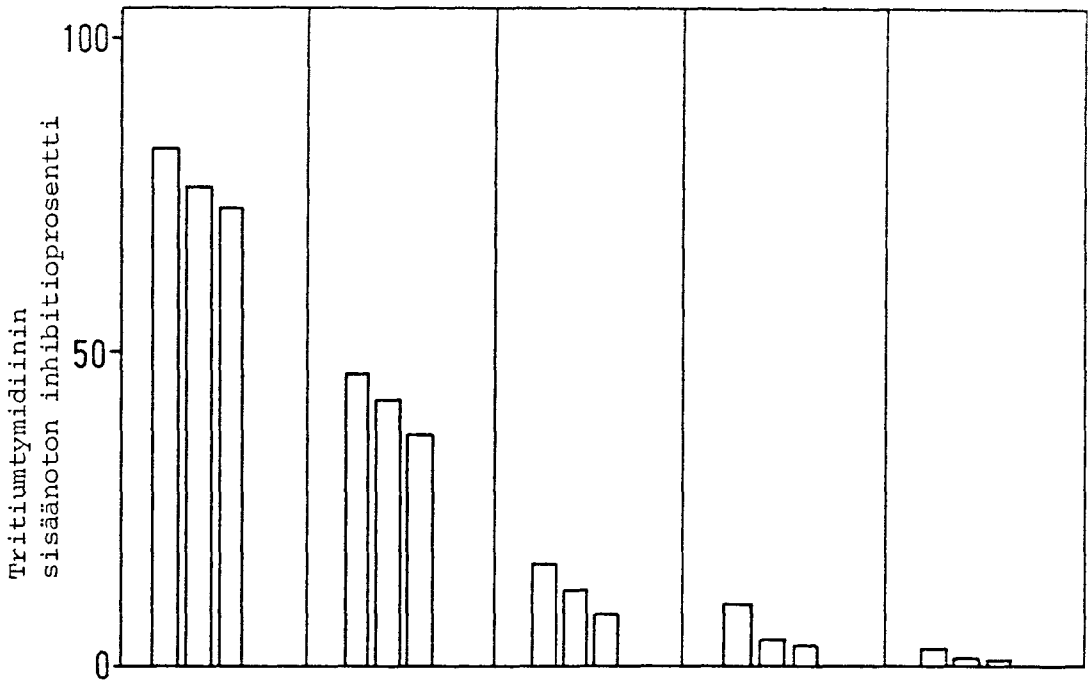
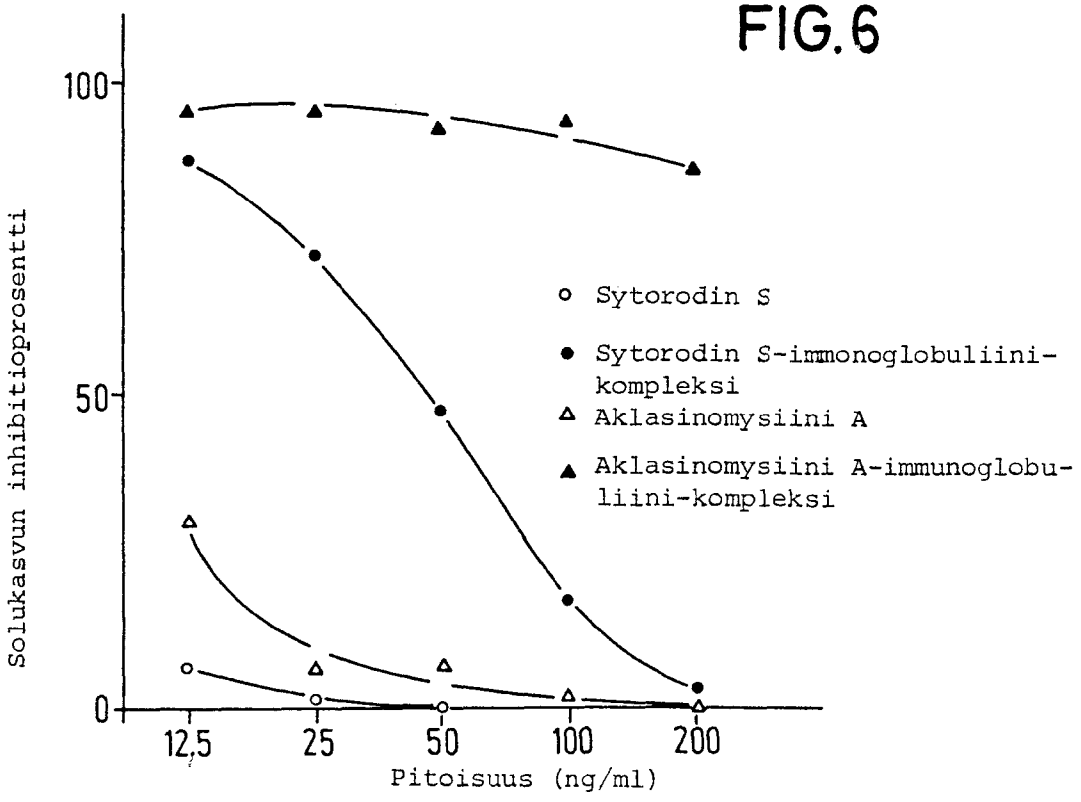

100
50
0
Tritiumtymidiinin
sisäänoton inhibitioprosentti

FIG. 6


100
50
0
Solukasvun inhibitioprosentti
12,5
25
50
100
200
Pitoisuus (ng/ml)
Sytorodin S
Sytorodin S-immonoglobuliini-kompleksi
Aklasinomysiini A
Aklasinomysiini A-immunoglobuliini-kompleksi

Hak.n:o 860456

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

FI 820020 (A61K 39/395) FI 841260 (A61K 39/395)

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

Käännä Vänd

EP H-124502 (C07D 519/04)

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chemical Abstracts vol 96 (1982) 45940e
Chemical Abstracts vol 98 (1983) 154983h
Chemical Abstracts vol 98 (1983) 172695v
Cancer Immunology and Immunotherapy vol 19 (1985) no 1 s 1-7

Anja Kivilaas

Allekirjoitus