



F10000976928



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT
C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 02 1997

97692

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

A 61K 47/48, 31/71, 39/395, 38/46

(21) Patentihakemus - Patentansökning	913511
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	22.07.91
(24) Alkupäivä - Löpdag	23.01.90
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	22.07.91
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.10.96
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	PCT/US90/00503
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
23.01.89 US 300999 P	

(71) Hakija - Sökande

1. AKZO N.V., Velperweg 76, 6824 BM Arnhem, Netherlands, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Bredehorst, Reinhard, 2617 42nd Street N.W., DC 20007, USA, (US)
2. Kim, Chong-ho, 14622 Myer Terrace, Rockville, MD 20853, USA, (US)
3. McCabe, Richard, 204 Currier Drive, Rockville, MD 20850, USA, (US)
4. Pomato, Nicholas, 1809 Millstream Drive, Frederick, MD 21701, USA, (US)
5. Vogel, Carl-Wilhelm, 4100 Massachusetts Avenue N.W.1403, DC 20016, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen aktivaattori-kohdistusosa -konjugaatin ja
esilääkkeen valmistamiseksi**
**Förfarande för framställning av ett terapeutiskt användbart konjugat av en aktivator och
en målsökande del**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Menetelmä sellaiseen esilääkkeen paikka-
spesifiseen in vivo -aktivaatioon eläimes-
sä, joka käyttää aktivaattori-kohdistus-
osa -konjugaattia kohdistamaan aktivaat-
torin ennalta määritettyyn käyttökohtaan
ja esilääkeyhdistettä, joka muuttuu aktii-
viseksi lääkkeeksi aktivaattorin läsnäoll-
essa. Edullisessa suoritusmuodossa kohdis-
tusosa, aktivaattori ja esilääke osoit-
tautuvat vähän tai eivät lainkaan immuno-
geenisiksi hoidettavassa eläimessä. Koh-
distusosa on suhteellisen spesifinen koh-
dekudokseen sitoutumisessaan ei-kohdeku-
dokseen verrattuna. Aktivaattoria ei
esiinny tai sitä on läsnä vain hyvin pie-
ninä määrinä verenkierrossa tai ei-kohde-

kudoksessa, sillä ei ole aktiivisuudel-
leen substraattia verenkierrossa tai ei-
kohdekudoksessa, se voidaan kytkeä kohdis-
tusosaan, ja se kykenee muuttamaan esi-
lääkkeen aktiiviseksi lääkkeeksi. Esilääke
valitaan sen kyvyn perusteella käyttää
sytotoksista aktiivisuutta kohdekudosta
kohtaan sen jälkeen kun aktivaattori on
muuttanut sen.

Förfarande för lägespecifik aktivering in vivo av ett proläkemedel i ett djur under användande av ett konjugat av aktivator och målsökande del för anbringande av en aktivator på ett i förväg bestämt användningsställe, och en proläkemedelsförening som omvandlas till ett aktivt läkemedel i närvaro av aktivatorn. I en fördelaktig utföringsform uppvisar den målsökande delen, aktivatorn och proläkemedlet mycket liten eller ingen immunogenecitet i djuret som behandlas. Den målsökande delen är relativt specifik för att binda sig vid målvävnaden i stället för vid en icke-målvävnad. Aktivatorn hittas ej eller är närvarande endast i små mängder i blodcirkulationen eller i icke-målvävnader, har ej något substrat för dess aktivitet i blodcirkulationen eller i icke-målvävnader, kan bindas vid den målsökande delen, och förmår omvandla förläkemedlet till ett aktivt läkemedel. Proläkemedlet väljs i enlighet med dess förmåga att utöva cytotoxisk aktivitet mot målvävnaden efter omvandlingen genom aktivatorn.

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen aktivaattori-kohdistusosa -konjugaatin ja esilääkkeen valmistamiseksi

Keksinnön kuvaus

5 Tämä keksintö koskee menetelmää terapeuttisesti käyttökelpoisen aktivaattori-kohdistusosa -konjugaatin valmistamiseksi, joka sisältää lysotsyymien aktivaattorina ja ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen tai sen fragmentin kohdistusosana. Keksintö koskee myös menetelmää terapeu-

10 tisesti käyttökelpoisen esilääkkeen valmistamiseksi, joka sisältää syöpää tuhoavan aineen, joka sisältää pilkottavissa olevan molekyylin, joka estää solun sisään joutumisen.

Keksinnön tausta

15 Lääkkeet eivät ole yleensä valikoivia kohde-elintensä tai -solujensa suhteen ja tämän tuloksena niillä on toksisia sivuvaikutuksia. Käsite, jossa liitetään terapeuttinen aine kantajamolekyyliin (esim. vasta-aineeseen), jolla on spesifisyyttä määrättyä kohdesolupopulaatiota

20 kohtaan on näin ollen houkutteleva, jotta saataisiin aikaan paikkaspesifinen lääkkeen vapautuminen. Viime vuosina esimerkiksi on käytetty useita monoklonaalisia vasta-aineita, jotka tunnistavat syöpään liittyviä solun pinta-antigeeneja, monien kliinisessä käytössä olevien syöpää

25 tuhoavien aineiden kantajina, kuten selostetaan katsauksessa (Vogel, C.-W., 1987). Tutkijat ovat kuvanneet sellaisten immunokonjugaattien spesifisiä ja voimakkaita sytotoksisia vaikutuksia monissa in vitro -järjestelmissä. Vähemmän vaikuttavia ja jopa pettymyksen aiheuttaneita

30 tuloksia saatiin tutkittaessa sellaisten immunokonjugaattien immunoterapeuttista vaikutusta syöpää kantavilla eläimillä samoin kuin syöpäpotilailla. Nämä tulokset osoittavat, että immunokonjugaattien käsite asettaa joukon vaikeuksia, jotka täytyy vielä voittaa, koska ei ole ollut

35 mahdollista vapauttaa riittäviä määriä monoklonaalisiin

vasta-aineisiin liitettyjä lääkkeitä (katsauksena katso Vogel., C.-W. 1987).

Varhaisessa vaiheessa tajuttiin, että entsyymit voivat olla ylivoimaisia lääkkeisiin nähden. Ribosomeja inaktivoivat proteiinit (RIP:t) ovat entsyymejä, ja niiden sytotoksista vaikutusta vahvistaa tämä entsyymaattinen aktiivisuus. Kuitenkin, lääkkeiden tavoin RIP:ien on jouduttava solun sisään, vapauduttava vasta-ainekantajasta ja päästävä asianmukaiseen solunsisäiseen osaan vaikutustaan käyttääkseen. Lisäksi, ollakseen tehokkaita RIP:t tarvitsevat sen, että jokainen kohdesolu ilmentää antigeeniä, ja niillä on luontaista sytotoksisuutta, joka rajoittaa sitä määrää joka voidaan antaa.

Toinen entsyymaattinen lähestymistapa käyttää vasta-aineeseen kytkettyä pinta-aktiivista entsyymiä. Tämä vasta-aine-entsyymikonjugaatti ei vaatisi solun sisään joutumista ja kykenisi käyttämään sytotoksista vaikutusta alueen soluihin. Yksi esimerkki pinta-aktiivisesta entsyymistä, jota on käytetty vasta-ainekonjugaattina, on fosfolipaasi C, joka hyökkää kaikkien solukalvojen fosfolipidien kimppuun suoraan tarvitsematta solun sisään joutumista. Fosfolipaasin kyky hyökätä fosfolipidien kimppuun kaikissa soluissa on kuitenkin luontaisen sytotoksisuuden merkki, mikä rajoittaa sen hyödyllisyyttä (Flickinger & Trost, 1976). Toinen vasta-ainekonjugaattina käytetty pinta-aktiivinen entsyymi on kobran myrkyn faktori (CVF), komplementtia aktivoiva entsyymi, joka sen lisäksi ettei sen tarvitse joutua solujen syömäksi ei ole luontaisesti sytotoksinen (Vogel, C.-W., 1987). Kuitenkin, kaikkien vieraiden proteiinien tavoin CVF on hyvin immuno-geeninen ja sen käyttö syöpäsolujen hoidossa on näin ollen rajoittunut.

Toinen lähestymistapa käytti vasta-aine-emäksinen fosfataasi -konjugaatteja etoposidijohdannaisen defosforylaatioon. Tämän lähestymistavan ongelmia ovat kilpailu

veressä kiertävien sisäsyntyisten substraattien kanssa, mikä rajoittaa entsyymaattista aktiivisuutta kohteessa, ja korkea entsyymiaktiivisuuden taso verenkierrrossa ja ei-kohdekudoksissa, mikä johtaa epäsuotavan sytotoksisen aktiivisuuden nousuun (Senter et al., 1988).

Erilainen entsyymaattinen käsite käytti karboksipeptidaasi-G₂:ta, joka katkaisee olennaisen kasvutekijän, folaatin (Searle et al., 1986). Riittävä folaattitason lasku vaatii kuitenkin kohdekudoksessa korkeamman entsyymikonjugaattitason kuin voidaan saavuttaa käyttämällä vasta-

10 aine-entsyymikonjugaattia in vivo.

Yllä kuvatun kaltaisten erityisten haittojen lisäksi kaikilla entsyymaattisilla lähestymistavoilla on immuunogeenisyysongelma. Vasta-aineiden kehittyminen entsyymejä vastaan johtaa vaikutuksen inaktivoitumiseen tukkimisen ja steerisen esteen kautta ja vasta-aine-entsyymin nopeaan poistumiseen verenkierrosta. Tästä syystä K.D. Bagshawen (1987) ehdottama järjestelmä, joka käyttää entsyymi-vasta-

15 ainekonjugaattia lääkkeen aktivoimiseen, antaisi parhaimmillaan hyödyllisiä tuloksia vain yhtenä annoksena, ja immuunivaste saattaa estää tehon jopa tällöin. Bagshawen käsite käyttää ei-nisäkäksperäisiä entsyymejä, joilla ei ole analogeja ihmisillä, jotta vältettäisiin muiden entsyymien kuin konjugaatissa läsnäolevan entsyymin aiheuttama aktivoituminen. Nämä entsyymit olisivat kuitenkin

20 hyvin immunogeenisiä, erityisesti konjugoituina.

Keksinnön yhteenveto

Olemme keksineet uuden lähestymistavan lääkkeen vapautumiseen käyttäen kohdistettua entsyymiä joka kiertää yllä mainitut rajoitukset. Ehdotamme kaksivaiheista menetelmää. Ensimmäiseksi olennaisesti ei-immunogeeninen kohdistusosa-aktivaattori -konjugaatti, joka sisältää aktivaattorin, tyypillisesti entsyymin, kohdistusosaan kyt-

30 kettynä. Edullisessa suoritusmuodossa kohdistusosa on vasta-aine, joka sitoutuu solun pinnalla tai syövän solunul-

35

koisella alueella (esim. nekroottisella alueella) sijaitsevaan, syöpään liittyvään antigeeniin. Vasta-aine-aktivaattori -konjugaatti pysyy spesifisesti syövässä. Jos on tarpeen, sitoutumattoman konjugaatin annetaan poistua verenkiertojärjestelmästä riittävässä määrin toksisten sivuvaikutusten välttämiseksi. Tarvittaessa tätä menetelmää voidaan nopeuttaa in vivo kompleksin muodostuksella tai ex vivo adsorboimalla spesifiseen matriisiin. Toiseksi annetaan suhteellisen myrkytön lääkejohdannainen (esilääke), jota solut eivät voi ottaa sisäänsä. Syöpäkohdassa vastaaineeseen sitoutunut entsyymi "aktivoi" lääkejohdannaisen, muuttaen esilääkkeen lääkemolekyyliseksi joka pystyy menemään antigeenipositiivisten samoin kuin antigeeninegatiivisten syöpäsolujen sisään syöpäkohdassa ja käyttämään vaikutustaan. Lisäksi lähestymistapamme sallii ei-immunogeenisen esilääkkeen toistetun antamisen, täten voimakkaasti vahvistaen tämän terapeuttisen lähestymistavan tehokkuutta. Lisäksi tämä lähestymistapa ei rajoitu syöpää tuhoavaan hoitoon, vaan sitä voidaan soveltaa mihin tahansa järjestelmään tarvittaessa terapeuttisen aineen paikkaspesifistä vapautumista. Esimerkkeihin muista taudeista, joiden kanssa tätä paikkaspesifistä aktivaatiomenetelmää voidaan käyttää, kuuluvat tarttuvat taudit, autoimmuunitaudit ja muut tulehdustaudit. Kohdistettu aktivaatio-kohta voi olla täten erityinen kudος tai erityinen solutyyppi, tartuntaa aiheuttavat organismit mukaan lukien.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle aktivaattori-kohdistusosa -konjugaatin valmistamiseksi on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään ja keksinnön mukaiselle menetelmälle esilääkkeen valmistamiseksi on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 2 esitetään.

Keksinnön etuna on, että konjugaattien ei tarvitse joutua kohdesolun syömäksi. Täten potilaassa voidaan pitää yllä toistuva ja pitkäaikainen esilääkkeen muuttaminen, mukaan lukien vasta-aine-aktivaattori -konjugaattien toistuvat injektiot.

Tiettyjen vaatimusten täytyy täyttyä keksintöä varten. Ensiksikin kohdistusosan (vasta-aineen) ja kohdistusosaan sitoutuneen aktivaattorin (entsyymin) täytyy olla alkuperää, joka on yhteensopiva hoidettavan lajin kanssa, jotta estetään konjugaattien immunologinen inaktivaatio. Siinä tapauksessa että hoidetaan ihmisiä, niiden pitäisi olla ihmisperäisiä tai ihmistyyppisiä, joko olemalla geneettisesti konservoituneita tai olemalla peräisin geneettisesti samankaltaisesta lajista, ja täten olla olennaisesti ei-immunogeenisiä jotta estetään näitä molekyylejä vastaan suuntautuneiden vasta-aineiden kehittyminen. Esilääkkeen täytyy myös olla olennaisesti ei-immunogeeninen. On osoitettu, että tapahtuu vasta-aineiden kehittymistä immunokonjugaateissa (esim. hiiren vasta-aineissa) olevia vieraita proteiineja vastaan. Ihmisen anti-hiiri -vasta-aineen muodostusta on raportoitu syöpäpotilaissa näiden saatua yksittäisiä injektioita hiiren monoklonaalisia vasta-aineita (McCallister et al., 1988), mikä täten rajaa näiden aineiden soveltuvuuden yhteen hoitosarjaan. Monilla yksilöillä on jopa ennalta olemassaolevia vasta-ainetasoja hiiren immunoglobuliinia vastaan ennen kuin he saavat ensimmäisen annoksensa hiiren vasta-ainetta (Schroff, R. W. et al, 1985). Lisäksi, kahden tai useamman injektion jälkeen 50 %:lla potilaista voidaan havaita vasta-ainevasteita jopa heikosti immunogeenisiä vasta-aineiden F_{ab} -fragmentteja vastaan (Reynolds, J. C. et al, 1986). Täten, tarkoitamme olennaisesti ei-immunogeenisellä sitä, että aktivaattori-kohdistusosa -konjugaatti ja esilääke voidaan antaa potilaalle toistuvasti aiheuttamatta potilaassa immunivastetta, joka estää konjugaattien paikantumista, esilääkkeen aktivoitumista tai aktivoituneen lääkkeen aktiivisuutta siinä määrin että terapeuttilinen teho estyy.

Toinen vaatimus on, että vasta-aineeseen sitoutuneella entsyymillä ei olennaisesti saa olla luontaisesti esiintyvää substraattia verenkierrossa tai ei-kohdesolujen

pinnalla. Luontaisesti esiintyvän substraatin olemassaolo isännässä on epäedullista, koska se kilpailee esilääkkeen aktivoitumisen kanssa ja johtaa siihen että esilääkettä aktivoituu vähemmän. Luontaisesti esiintyvien substraattien poissaolo on myös tärkeää, jotta vältetään vahingolliset sivuvaikutukset, jotka johtuvat entsyymaattisesta aktiivisuudesta isännässä ennen vasta-aine-aktivaattori-konjugaatin paikantumista. Vastaavasti sellaiset entsyymit kuten fosfolipaasi-C ja fosfataasit eivät ole soveliaita, koska niillä on luontaisia substraatteja ihmisillä. Määritellään "olennaisesti ei luontaisesti esiintyvän substraatin" sellaisten substraattimäärien poissaoloksi, jotka joutuessaan kontaktiin aktivaattorin kanssa konjugaattia annettaessa estäisivät esilääkkeen terapeutisesti tehokkaan muuttumisen lääkkeeksi syöpäkohdissa. Samoin substraatti ei voi olla läsnä määrinä, jotka aiheuttaisivat haitallisia sivuvaikutuksia luontaisesti läsnäolevaan substraattiin kohdistuvan entsyymaattisen vaikutuksen johdosta.

Kolmas tärkeä vaatimus keksinnölle on, että konjugaatin entsyymaattista aktiivisuutta ei saa olennaisesti olla läsnä tai sitä saa olla läsnä vain hyvin alhaisina määrinä verenkierrossa tai ei-kohde-elinten solujen pinnalla, jotta vältetään kohdistumaton esilääkkeen aktivoituminen, joka johtaisi aktivaatioon muualla kuin syöpäkohdassa. Esimerkiksi emäksisen fosfataasin, ihmisseerumissa varsin korkeina tasoina esiintyvän entsyymin, osoitetaan defosforyloivan molekyylipainoltaan alhaisia yhdisteitä muutamassa minuutissa ihmisseerumissa (Hamm et al, 1988). Vähäisissä määrin läsnäolevaa entsyymaattista aktiivisuutta voidaan edelleen laskea tämän keksinnön vaatimuksen saavuttamiseksi poistamalla vasta-aine verenkierrosta. Tämä voidaan tehdä in vivo muodostamalla immuunikomplekseja tai ex vivo spesifiseen matriisiin adsorboimalla. Konjugaatin entsyymaattisen aktiivisuuden olennainen poissaolo määri-

tellään niin, että esilääke ei aktivoidu muissa kohdissa kuin syöpäkohdissa siinä määrin että lääkkeen terapeuttinen vaikutus estyy tai ei-syöpäkudoksessa aiheutuu epäsuotavaa sytotoksisuutta, tai molempia.

5 **Edullisten suoritusmuotojen kuvaus**

10 Alla kuvatut esimerkit käyttävät ihmisen monoklonaalista IgM-vasta-ainetta ja ihmisen lysotsyymiä aktivaattorina ja doksorubisiinijohdannaisista efektorikomponenttina (esilääkkeenä). Tämä järjestelmä havainnollistaa keksintömme etuja, jotka ovat:

a) kaikki komponentit, kohdistusosa, aktivaattori ja esilääke ovat olennaisesti ei-immunogeenisiä, mikä sallii toistuvan kohdistuksen samoin kuin esilääkkeen toistuvan antamisen;

15 b) vasta-aine-efektori -kompleksi on myrkytön, täten sallien suurten kompleksimäärien antamisen. Esilääke käyttää täyttä sytotoksista aktiivisuuttaan vain aktivointin jälkeen;

20 c) konjugaatin joutumista solun sisään ei vaadita, täten esilääkkeen toistuvaa muuttumista lääkkeeksi voidaan käyttää peräkkäisissä antamisissa;

25 d) antigeenin ilmentymistä kohdekudoksen kaikissa soluissa ei vaadita, koska muutoksen jälkeen lääkemolekyylit kykenevät menemään sekä antigeenipositiivisten että antigeeninegatiivisten solujen sisään;

30 e) lysotsyymillä ei ole ihmisissä luonnollisesti ilmenevää substraattia aktiivisuudelleen, millä näin vältetään lysotsyymin aktiivisuudesta kilpaileminen ja tätä seuraavat haitalliset vaikutukset (Lysotsyymin luonnollisena substraattina ovat bakteerien soluseinien polymeerit, jotka koostuvat vuorottelevista N-asetyyylimuramiinihappo- ja N-asetyyli-glukosamiinitähteistä.); ja

35 f) lysotsyymiä esiintyy verenkierrrossa vain hyvin alhaisina määrinä, jotka ovat peräisin lysotsyymiä sisältävistä valkosoluista, eikä sitä ilmennetä solujen pinoilla (Briggs et al, 1966).

Tässä kuvattu menetelmä on kuitenkin sovellettavissa moniin perusvaatimukset täyttäviin vasta-aineisiin ja aktivaattorijärjestelmiin, eikä käsite ole rajoittunut lysotsyymi-aktivaattori -järjestelmiin. Todellakin, yksi lähestymistapamme etu on se, että se on paljon sallivampi vasta-aineen ominaisuuksien suhteen kuin järjestelmä, joka vaatii, että kohdesolut syövät vasta-aineen. Lisäksi aktivaattorin ei tarvitse olla entsyymi, vaan mikä tahansa yhdiste joka toimii muuttaen esilääkkeen aktiiviseksi osaksi, kuten esimerkiksi katalyyttiseksi vasta-aineeksi (Napper et al, 1987).

Kohdistusosan valinta

Tämän keksinnön mukaisesti mitä tahansa antigeenia vastaan suunnattuja vasta-aineita voidaan käyttää kohdistusosana. Vasta-aineiden lisäksi kohdistusosina voidaan käyttää muita molekyylejä joilla on affiniteettia kohdistettuihin spesifisiin soluihin, kudostyyppeihin tai tartunnanaiheuttajiin. Esimerkiksi sytokiineilla on erityistä spesifisyyttä tietyntyyppisiä soluja kohtaan ja niitä voidaan käyttää kohdistusosina. Vaikka kohdistusosana voidaan käyttää muunkintyyppisiä molekyylejä kuin vasta-aineita, kuten antigeeneja, vasta-ainefragmentteja, lektiiniä, hormoneja tai ligandia, yksinkertaisuuden vuoksi termiä vasta-aine käytetään seuraavassa pohdinnassa siinä tarkoituksessa, että muunkintyyppisiä kohdistusosia voidaan käyttää niiden sijasta.

Tavanomaisia polyklonaalisia vasta-aineita voidaan käyttää käsitteeseen kuuluvina kantajamolekyyleinä. Kuitenkin monoklonaaliset vasta-aineet tarjoavat monia etuja. Kukin monoklonaalinen vasta-aine on spesifinen yhdelle antigeeniselle determinantille. Täten monoklonaalisten vasta-aineiden kanssa normaalikudoksiin kohdistuvan epäspesifisen sitoutumisen määrä ja tätä seuraava myrkyllisyys normaaleille ei-kohdekudoksille vähenee. Lisäksi, koska voidaan tuottaa rajattomia määriä kutakin monoklo-

naalista vasta-ainetta, kaikkia yksittäisiä vasta-ainem-
valmisteita voidaan kontrolloida sen varmistamiseksi, että
antigeenispesifisyys pysyy vakiona vasta-ainetuotteen kes-
toian ajan. Erilaisia monoklonaalisia vasta-aineita, jotka
5 ovat spesifisiä eri epitoopeille samoilla kudosspesifi-
syyksillä, voidaan yhdistää. Täten, kun käytetään mono-
klonaalista vasta-ainetta tai monoklonaalisten vasta-ai-
neiden seosta, vapautumissysteemin tehokkuus ja hallinta
paranee ilman, että uhrataan mitään sellaisia myötävaiku-
10 tuksia järjestelmän tehokkuuteen, jotka voidaan saavuttaa
tavanomaisilla polyklonaalisilla reagensseilla.

Edullinen lähestymistapa on käyttää monoklonaalisia
tai polyklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat peräisin
samasta lajista kuin hoitoa saava eläin. Enimmäkseen,
15 poikkeuksena eläinlääketieteelliset sovellutukset, on
suotavinta käyttää ihmisen, ihmistyyppiseksi tehtyjä tai
yhdistelmä-vasta-aineita, jotka ovat koostumukseltaan
lähinnä ihmistyyppiä. Monia monoklonaalisia ihmisvasta-
aineita on kuvattu. Myös on kuvattu lähestymistapoja,
20 joissa tehdään ihmistyyppiseksi vasta-aineita jotka ovat
kehittyneet ei-ihmislajin imusoluista, ja menetelmiä jotka
käyttävät ei-ihmisvasta-aineiden vaihtelevan alueen geene-
jä, jotka on geneettisesti liitetty ihmisen vasta-aineen
vakioalueen geeneihin. Homologisten ja geneettisesti muo-
25 kattujen vasta-aineiden edut ovat lukuisia. Toisin kuin
heterologisille, esim. hiiren tai rotan vasta-aineille,
immuunivaste homologiselle vasta-aineelle on minimaalinen.
Enintään ilmenee heikko vaste ihmisvasta-aineen idiotyypp-
pisille determinanteille ja silloinkin vain monien anto-
30 kertojen jälkeen. Ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta
16-88 käyttävissä kliinisisissä tutkimuksissamme emme ole
havainneet mitään immuunivasteen induktiota vasta-aineen
minkään alueen, idiotyyppisen, allotyyppisen tai runko-
osan (framework) suhteen, toistettujen annosten - jopa 200
35 mg/viikko - jälkeenkään (Steis et al, 1990). Tämä etu sal-

lii koskemattoman, kokonaisen immunoglobuliinin pikemmin-
kin kuin nopeammin metaboloituvien vasta-ainefragmenttien
käytön, sallii koskemattoman, kokonaisen immunoglobuliinin
korkeiden annosten antamisen, ja sallii monien vasta-ai-
neen antokertojen käytön. Homologisissa lajeissa tuote-
tuilla vasta-aineilla on lisäetuja, sillä ne tunnistavat
hienoja antigeenisia eroja, joita heterologiset vasta-
aineet tai edes geeniteknologisin menetelmin käsiteltyt
ihmisvasta-aineet eivät tunnista.

Vasta-aine voidaan suunnata mitä kohdetta vastaan
tahansa, esim. syöpä-, kudosis-, bakteeri-, sien-, virus-,
lois-, mykoplasma-, kudostyyppi- tai erilaistumisanti-
geeneja tai -reseptoreja ja jne. Vasta-aine voi olla mistä
luokasta tahansa, IgG, IgA, IgE tai IgM, ja voidaan käyt-
tää yhdistelmänä vasta-aineita, jotka reagoivat erilaisten
antigeenisten determinanttien kanssa. Yksinkertaisuuden
vuoksi kohteeseen viitataan seuraavassa kohdekudoksena,
mikä on mikä tahansa näistä materiaaleista joille kohdis-
tusosalla on affiniteettia.

Keksinnön sovellutuksissa, joissa sytotoksiset ai-
neet aktivoidaan syöpäsolujen ympäristössä, syöpäsolujen
ei tarvitse syödä kohde-antigeenia tai -vasta-ainetta jot-
ta sytotoksinen aine menee solun sisään, kuten tapauksessa
jossa vasta-aine on kemiallisesti sitoutuneena sytotoksi-
seen aineeseen.

Aktivaattorin valinta

Aktivaattoriaktiivisuuden ei normaalisti pitäisi
olla läsnä verenkierrossa tai saatavilla olevissa ei-koh-
dekudoksissa, tai sen pitäisi olla läsnä hyvin matalina
tasoina, niin että verenkierrossa ja ei-kohdekudoksissa
olevan lääkkeen epäsuotavaa aktivaatiota tapahtuu vain
hyvin vähäisessä määrin, joka ei johda haitallisiin sivu-
vaikutuksiin. Lisäksi aktivaattorin substraattien tai ak-
tivaattorin inhibiittoreiden ei pitäisi olla läsnä veren-
kierrossa tai kohdekudoksissa siinä määrin, että se vaa-

rantaa terapeuttisen edun. Ylivertainen etu saavutetaan, jos konjugaatti valitaan niin että se on ei-immunogeeninen valitsemalla samasta lajista peräisin oleva entsyymi kuin hoitoa saava eläin tai lähes identtinen entsyymi. Monet
5 entsyymit ovat säilyneet hyvin evoluutiossa, niin että alemmista lajeista eristetyt molekyylit ovat lähes identtisiä ihmisentsyymien kanssa.

Vasta-aineeseen kiinnittynyt aktivaattori voi olla minkä luokan entsyymi tahansa; hydrolaasi, oksidoreduktaasi, transferaasi, isomeraasi, lyaasi tai ligaasi, tai vasta-aine jolla on samanlaisia katalyyttisiä vaikutuksia
10 (viite Napper et al, 1987).

Endoglykosidaasientsyymi täyttää yllämainitut vaatimukset aktivaattorin aktiivisuudelle. Lisäksi sen pieni
15 molekyylipaino, yhdestä ketjusta koostuva rakenne ja hyvin tutkitut kemialliset ja rakenneominaisuudet (Imoto et al, 1972) mahdollistavat entsyymien kemiallisen liittämisen vasta-aineeseen. Lysotsyymi on 129-130 aminohapon emäksinen endoglykosidaasi, joka on hyvin konservoitunut. Niin-
20 kin erilaisista lajeista kuin kanasta, viiriäisestä ja ihmisestä peräisin olevat lysotsyymit ovat lähes identtisiä aminohappotähteiden lukumäärän, primaaristen amiinien lukumäärän ja tässä katalyyttisessä mekanismissa mukanaolevien aminohappojen lukumäärän suhteen. Lysotsyymi on sta-
25 biili välillä pH 2 - pH 11 aina 77 °C lämpötiloihin saakka. Lisäksi lysotsyymi kestää epätavallisen hyvin useimpien denaturoivien aineiden alhaisia konsentraatioita. Täydellinen disulfidisidoksien pelkistyminen eliminoi lysotsyymien entsyymiaktiivisuuden. Ihmisessä lysotsyymiä
30 esiintyy maidossa, kyynelissä, syljessä, istukassa, perässä, valkosoluissa ja monosyyteissä. Veressä oleva lysotsyymi on peräisin valkosoluista ja monosyyteistä. Normaalit veren tasot ovat noin 1 % kyynelten tasoista (Os-
35 serman ja Lawlor, 1966). Lysotsyymi hyökkää N-asetyyli-glukosamiinin (GlcNAc) ja N-asetyyli-muramiinihapon välisen β -

(1 → 4) -sidoksen kimppuun joidenkin bakteerien soluseinässä ja hyökkää kitiiniin, lineaaristen β -(1 → 4) -sidoksisten Nasetyylijuglukosamiinipolymeerien kimppuun. Edulliset substraatit ovat polymeereja, jotka ovat yhtä suuria tai suurempia kuin (GlcNAc)₆.

Aktivaattorin kytkentä vasta-aineeseen

Tämän keksinnön menetelmän mukaisesti aktivaattori-entsyymi tai katalyyttinen vasta-aine kytkeytyy kohdistusvasta-aineeseen tavalla, joka säilyttää kompleksin kyvyn sitoutua antigeeniin ja aktivoida esilääkekomponentti. Tämä saadaan aikaan käyttämällä homo- tai heterobifunktionaalisia ristisidoksia muodostavia aineita tai suoraan proteiinia muokkaavia reagensseja, jolloin saadaan aikaan hyvin reaktiivisia ryhmiä sekä aktivaattorikomponenttiin että kohdistusosaan. Näillä reaktiivisilla ryhmillä derivatisoituina aktivaattori ja kohdistuskomponentit kytkeytyvät yhteen kovalenttisella sidoksella kun ne sekoitetaan yhteen.

Proteiineihin tai peptideihin voidaan tuoda kytkentäryhmiä (linkers) saattamalla ne reagoimaan amino-, karboksyyli- tai sulfhydryyliryhmien kanssa (Wawrzynczak ja Thorpe, 1987) ja glykoproteiiniin ja hiilihydraatteihin sokerin hapetuksen jälkeen, jolloin saadaan aldehydejä (Sela ja Hurwitz, 1987). Aldehydit voidaan saattaa reagoimaan kytkentäryhmän aminoryhmien kanssa (esim. hydratsidin), jolloin muodostuu Shiffin emäs (esim. hydratsoni).

Sulfhydryyliryhmiä voidaan saada aikaan monien biologisten molekyylien kysteinitähteistä, mukaan lukien vasta-aineet ja entsyymit. Nämä tähteet voidaan derivatisoida reaktiivisten ryhmien kanssa muuttamatta molekyylien biologista toimintaa. Vasta-ainemolekyylien joukossa kaikki luokat sisältävät ketjun sisäisiä ja ketjujen välisiä disulfidisidoksia, jotka stabiloivat molekyylin tertiääri- ja kvaternäärirakennetta. IgM-luokan vasta-aineiden tapauksessa raskaan ketjun rakenne sisältää useita disul-

fidisidoksia, jotka voidaan derivatisoida miedon pelkistuksen jälkeen vasta-aineen menettämättä toimintaansa. Vapaat sulfhydryyliryhmät reagoivat sitten halogeenialkyyli-
5 liryhmien, p-elohopea(2)bentsoaattiryhmien ja Michael-tyypin additioreaktioon kykenevien ryhmien kanssa, mukaan lukien esimerkiksi malemiidit ja sentyyppiset ryhmät joita on kuvattu Mitran ja Lawtonin (1979) artikkelissa.

Useimmin käytetyt proteiineihinliittämismenetelmät perustuvat lysiinin nukleofiillisten epsilon-aminoryhmien
10 hyökkäykseen. Aminoryhmä voi reagoida karbonyylifunktioiden kanssa joita ovat saaneet aikaan hyvin reaktiiviset sukkinimidiesterit, anhydridit tai sykliset tioesterit, tai aktivoimalla karbonyylifunktioita karbodi-imidien kanssa, jolloin muodostuu karboksiamidisidoksia. Vaihtoehtoisesti voidaan muodostaa amidiniumsidos hyökkäämällä
15 aminoryhmään metyyli-imidaattiestereillä.

Efektorimolekyylien valinta

Käytettävät efektoriyhdisteet valitaan aiotun sovelluksen tarkoituksen mukaan (esim. tappaminen, solun
20 lisääntymisen estäminen, hormoniterapia tai geeniterapia). Nämä yhdisteet voivat sisältää esimerkiksi farmaseuttisia aineita, toksineja, alkyloivia aineita, entsyymejä, antibiootteja, antimetaboliitteja, lisääntymistä estäviä aineita, hormoneita, hermoston välittäjä-aineita, DNA:ta, röntgensäteitä läpäisemättömiä väriaineita, paramagneettisia väriaineita, radioaktiivisia isotooppeja, fluorogeenisia yhdisteitä, markkeriyhdisteitä, solukalvon läpäisevyyttä muuttavia yhdisteitä ja liukenemattomia matriiseja. Ylläolevan ei millään tavoin ole tarkoitus olla kattava
25 lista eikä sen ole tarkoitus rajoittaa keksinnön suojaalaa. Lopuksi, voidaan käyttää yhdisteiden yhdistelmää. Esimerkkeihin syöpää tuhoavista aineista, joita voidaan käyttää esilääkkeiden valmistuksessa keksinnön mukaisesti kuuluvat nukleosidianalogit, syklofosfamidit ja analogit,
30 nitrosokarbamidit, mitromysiinit, alkyloivat aineet, alka-

loidit, bleomysiini, antrasykliinit ja sisplatiini ja analogit.

5 Edullinen esimerkki antrasykliinistä on doksorubisiini, joka voidaan konjugoida negatiivisesti varautuneisiin tähteisiin katkaistavissa olevalla väliryhmällä. Negatiivisesti varautuneiden tähteiden läsnäolon vuoksi solut eivät ota sisäänsä koskematon lääketoimintaa eikä se voi käyttää solunsisäistä sytotoksista aktiivisuuttaan. Kuitenkin, väliryhmän pilkkoutuessa (esim. entsymaattisesti) negatiivisesti varautuneet tähteet poistetaan ja lääkejohdannainen voi mennä solujen sisään käyttämään vaikutustaan.

Suunnittelimme lääkejohdannaisen, joka koostuu seuraavista osista:

- 15 a) syöpää tuhoava aine doksorubisiini;
b) kitiini-oligomeeriväliryhmä, joka on konjugoitu doksorubisiiniin pelkistävän päänsä välityksellä lääkkeen C13-karbonyyliryhmään; ja
c) kaksi tauriinitähdettä, jotka ovat liittyneet
20 kahteen aldehydiryhmään, jotka ovat syntyneet kitiini-oligomeeriväliryhmän ei-pelkistävään päähän periodaattihape-
tuksella.

Doksorubisiini kuuluu ryhmään antrasykliinilääkkeitä, joita on tutkittu laajasti kasvaimia tuhoavina aineina
25 syöpäpotilaiden hoidossa (Young ja Ozols, 1981). Doksorubisiinilla on tärkeä rooli monien kasvainsairauksien, kuten leukemian, rintasyövän ja sarkoomien tehokkaassa hoidossa. Doksorubisiinin tehokasta käyttöä ovat kuitenkin vaikeuttaneet tavanomaiset myrkyllisyydet (veren muodostuksen suppressio, pahoinvointi ja oksentelu sekä tuken-
30 lähtö) samoin kuin ainutlaatuiset myrkyllisyydet (sydänlihassairaus). Tässä hahmotellun kaltainen paikkaspesifinen aktiivisten doksorubisiinimolekyylien vapautus vähentää suuresti lääkkeen epäsuotavia sytotoksisia vaikutuksia ja täten avaa kokonaisen uuden aikakauden tämän ja muiden
35 antrasykliinien käytössä.

Kitiini-oligomeerit (N-asetyyli-glukosamiinin oligomeerit) valittiin väliryhmiksi, koska kitiini-oligomeerit ovat alttiita ihmislysotsyymin aiheuttamalle katkaisulle (Holler et al, 1975a; Holler et al, 1975b). Lysotsyymin
5 valinta tarjoaa useita etuja ehdotetulle hoitoperiaatteelle. Ensiksikin, lysotsyymiä on runsaasti nisäkkäiden eritteissä (syljessä, kyyneleissä, maidossa, kohdunkaulan limassa) ja solunsisäisesti kudosten lysosomeissa (erityisesti valkosoluissa ja munuaisissa), mutta lysotsyymitasot
10 seerumissa ovat suhteellisen alhaisia. Tuloksena lääkejohdannaisten epäsuotavan pilkkoutumisen määrä verenkierrossa on oleva rajoittunut. Toiseksi, lysotsyymille ei ole verenkierrossa luonnollista substraattia, joka kykenisi kilpailemaan lääkejohdannaisten kanssa kohdistettujen entsyymimolekyylien aktiivisista kohdista.
15

Lääkejohdannaisten soluun ottamisen estämiseksi hiilihydraattitilaan kiinnitetään kaksi sulfonihappotähdettä. Negatiivisesti varautuneiden sulfonihapporyhmien estävä vaikutus molekyylipainoltaan pienten yhdisteiden ottoon
20 solun sisään on dokumentoitu hyvin monilla molekyyleillä, kuten värin eksklusiotesteissä käytetty Trypan blue (Phillips, 1973) tai Evans blue, jota käytetään apuna diagnostiikassa määritettäessä ihmisen veren tilavuutta (The Merck Index, yhdeksäs painos, 1976).

25 Kuvioiden lyhyt kuvaus

Kuvio 1. SPDP-muokatun 16.88:n immunoreaktiivisuus.

Kuvio 2. TPCH-muokatun 16.88:n immunoreaktiivisuus.

Kuvio 3. 16.88-lysotsyymin -konjugaatin immunoreaktiivisuus.

30 Kuvio 4. Standardikäyrä: lysotsyymin aktiivisuus.

Kuvio 5. 16.88-lysotsyymin pysyminen seerumissa "nude"-hiirissä, joilla on toisesta lajista saatu syöpäsiirre.

35 Kuvio 6. 16.88-lysotsyymin pysyminen syöpäkasvaimessa "nude"-hiirissä, joilla on toisesta lajista saatu syöpäsiirre.

Kuvio 7. Doksorubisiinin derivatisointi pyridyyli-disulfiditähteellä.

Kuvio 8. Tioesteri-derivatisoitujen kitiinioligosakkaridien valmistus.

5 Kuvio 9. Tioesteri-derivatisoitujen kitiinioligomeerien liittäminen pyridyylidisulfidi-derivatisoituun doksorubisiiniin.

Kuvio 10. Tauriinitähteiden kiinnitys tioesteri-derivatisoituihin kitiinioligomeereihin.

10 Kuvio 11. Doksorubisiinijohdannainen, joka sisältää tauriinitähteitä pilkottavissa olevan kitiinioligomeeriväliryhmän välityksellä.

Kuvio 12. Doksorubisiinin annosvaste A2780-munasarjasyöpäsoluja vastaan.

15 Kuvio 13. Doksorubisiinijohdannaisen, joka sisältää tauriinitähteitä pilkottavissa olevan kitiinioligomeeriväliryhmän välityksellä, sytotoksinen aktiivisuus.

Esimerkki 1

20 **Vasta-aine-entsyymikonjugaattien valmistus lysotsyymientsyymiä ja ihmisen monoklonaalista vastaainetta 16.88 käyttäen**

Ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen 16.88 derivatisointi pyridyylidisulfidiryhmillä

25 Seuraavat kokeet osoittavat sulfhydryyli-derivatisoituun lysotsyymiin (aktivaattoriin) konjugoidun pyridyylidisulfidi-derivatisoidun vasta-aineen muodostuksen. Monia aktivoituja disulfidiryhmiä tuodaan vasta-aineeseen N-sukkinimidyyli-3-(2-pyridyyliditio)propionaattia (SPDP) käyttäen ennemmin kuin destabiloidaan vasta-ainetta ketjujen välisiä tai ketjunsisäisiä disulfidisiltoja pelkistämällä, jolloin saataisiin aikaan sulfhydryyliryhmiä lysotsyymiin liitettäväksi.

30 **Vaihtoehtoisia kytkentäryhmiä voidaan käyttää siinä tapauksessa, että vasta-aine menettää immunologisen aktiivisuutensa SPDP:llä derivatisoitaessa. Uusi väliryhmä**

S-(2-tiopyridyyli)-L-kysteiinihydratsidi (TPCH) (Zara et al, 1989) on kuvattu. TPCH tuo mukaan kytkentäryhmän, jolla on päässään reaktiivinen pyridyylidisulfiditähte, joka on liitetty vasta-aineen hapetettuihin hiilihydraattitäh-

5 teisiin. TPCH saattaa sallia useampien väliryhmien mukaan tuomisen vasta-aineen toiminnan heikentymättä kuin ne kytkentäryhmät, jotka kytkeytyvät vasta-aineen epsilon-aminoryhmien välityksellä, kuten SPDP. Yhteen sekoitettuna sulhydryylit, jotka on tuotu aktivaattoriensyymiin 2-iminotiolaanilla (2-IT), reagoivat pyridyylidisulfiditähteiden kanssa, jotka on tuotu vasta-aineeseen SPDP:llä tai

10 TPCH:lla, jolloin muodostuu disulfidisisidos. Disulfidisisidoksin kytketyillä vasta-aine-toksiini -konjugaateilla tehdyt tutkimukset viittaavat siihen, että vasta-aineen ja

15 aktivaattoriensyymien välinen disulfidisisidos voi olla osittain epästabiili in vivo, mikä johtaa aktivaattoriensyymien vapautumiseen vasta-aineesta ennen kuin se on kohdistunut kasvaimeen. Tämä voitaisiin estää kytkemällä vasta-aine ja aktivaattori käyttämällä stabiilimpaa tio-

20 eetterisidosta, joka tuodaan mukaan käyttämällä ristisidoksia muodostavaa reagenssia kuten N(gamma-maleimidobutyryylioksi)sukkinimidia (GMBS) SPDH:n tai TPCH:n sijasta. GMBS saa aikaan terminaalisen reaktiivisen maleimidi-

ryhmän pikemminkin kuin sulfhydryylin, jolloin muodostuu

25 stabiilimpi tioeetterisidos sulfhydryylin kanssa, joka tuotiin mukaan lysotsyymiin 2-IT:llä.

Esitetyssä esimerkissä vasta-aine on ihmisen syöpää vastaan suunnattu IgM-luokan monoklonaalinen vasta-aine 16.88 (Haspel et al, 1985), joka reagoi antigeenin (CTA#1)

30 kanssa, jota löytyy tietyn tyyppisten syöpäsolujen solulinimasta, mukaan lukien paksusuoli-, rinta-, munasarja-, haima- ja keuhkosyöpä. Pyridyylidisulfiditähteet saatiin aikaan kahdella eri menetelmällä.

Menetelmä A: Vasta-aine 16.88 derivatisoitiin

35 lysiinitähteiden aminoryhmissä käyttäen heterobifunktio-

naalista kytkentäryhmää, N-sukkinimidyyli-3-(2-pyridyyli-ditio)propionaattia (SPDP). Kahdeksan moolia SPDP:tä voitiin tuoda per mooli 16.88:aa 16.88:n vasta-aine-aktiivisuuden vähentyessä hyväksyttävässä määrin (kuva 1). Jotta saataisiin aikaan sisällytyssuhde 8:1, 10 moolia SPDP:tä saatettiin reagoimaan kunkin 16.88-moolin kanssa 30 minuutin ajan huoneenlämmössä 0,01 M fosfaattipuskurissa, pH 7,0, joka sisälsi 0,1 M natriumkloridia. Konjugoitu vasta-aine erotettiin ylimääräisestä SPDP:stä Sephadex G-25 -geelisuodatuksella. Immunoreaktiivisuus arvioitiin modifioimattoman 16.88-referenssin suhteen vertaamalla SPDP-muokatun ja muokkaamattoman 16.88-referenssin kykyä kilpailla I-125-leimatun muokkaamattoman 16.88-referenssin kanssa samaa alkuperää olevan antigeenin CTA#1 sitomisessa. Sisällytyssuhteella 8,6:1 se SPDP-16.88:n määrä, joka vaadittiin vähentämään ¹²⁵I-16.88:n sitomista 50 %:lla, kasvoi nelinkertaiseksi.

Menetelmä B: 16.88:n hiilihydraattiosat hapetettiin aldehydifunktioiden luomiseksi, joihin kiinnitettiin heterobifunktionaalinen väliryhmä S-(2-tiopyridyyli)-L-kysteiniinhydratsidi (TPCH). Toisin kuin SPDP, joka liittyy vasta-aineeseen proteiinissa olevien aminoryhmien välityksellä, TPCH:n hydratsidiosa muodostaa hydratsoneja aldehydiryhmiensä kanssa, jotka saatiin aikaan 16.88:n hiilihydraattiosiin miedolla periodaattihapetuksella. Kuten kuvassa 2 näkyy, voitiin saada aikaan niinkin monen kuin 17 TPCH-moolin sisällytys per 16.88-mooli ilman havaittavaa vasta-aineaktiivisuuden menetystä.

16.88:n derivatisointi tehtiin saattamalla reagoimaan 16.88-liuos konsentraatiossa 2 mg/ml 0,1 M natriumasetaatipuskurissa, pH 5,5, 10 mM natriumperiodaatin kanssa +4 °C lämpötilassa 10 minuutin ajan. TPCH lisättiin suhteessa 7 000 TPCH-moolia/16.88-mooli (vastaa noin 20-kertaista molaarista ylimäärää TPCH:ta 16.88:n primaarisien aminoryhmien suhteen) 0,1 M natriumasetaatipuskurissa.

sa, pH 5,5. Ylimääräinen TPCCH poistettiin Sephadex G-25 -geelisuodatuksella 0,01 M fosfaattipuskurissa, pH 7,0, joka sisälsi 0,1 M natriumkloridia.

5 Derivatisoidun vasta-aineen immunoreaktiivisuus arvioitiin kompetitiivisella sitoutumisanalyysillä. Ver-
rattiin derivatisoidun ja alkuperäisen 16.88-vasta-aineen
kykyä kilpailla radioleimatun alkuperäisen 16.88-vasta-
aineen kanssa spesifiseen antigeeniin sitoutumisessa. Ver-
rattiin ID₅₀-arvoja derivatisoidulle ja alkuperäiselle vas-
10 ta-aineelle.

Lysotsyymien derivatisointi

Lysotsyymien aminoryhmät voidaan derivatisoida ami-
noreaktiivisilla heterobifunktionaalisilla reagensseilla
16.88:aan liittämistä varten. Aminoryhmän derivatisointia
15 tutkittiin SPDP:llä, GMBS:llä ja 2-IT:llä. Sekä SPDP että
GMBS häittasivat kovasti entsyymiaktiivisuutta jopa niin-
kin alhaisilla sisällytysuhteilla kuin 2 kytKentäryhmä-
molekyyliä/lysotsyymi (Taulukko 1). Derivatisointi
2-IT:llä suhteessa 2 väliryhmämolekyyliä/lysotsyymi johti
20 lysotsyymiaktiivisuuden säilymiseen 60-68 -prosenttisesti.

Lysotsyymi derivatisoitiin 100-kertaisella molaari-
sella ylimäärällä 2-IT:tä 0,01 M fosfaattipuskurissa,
pH 8,0, joka sisälsi 0,1 M natriumkloridia ja 0,001 M di-
tiotreitolia, 10 minuutin ajan huoneenlämmössä. Reaktio
25 pysäytettiin lisäämällä 10-kertainen molaarinen ylimäärä
(2-IT:n suhteen) etanoliamiinia. Derivatisoitu lysotsyymi
poistettiin ylimääräisestä 2-IT:stä ja etanoliamiinista
Sephadex G-10 -geelisuodatuskromatografialla samassa pus-
kurissa, pH 7,0, joka sisälsi 2 mM etyleenidiamiinitetra-
30 etikkahappoa ja se käytettiin välittömästi pyridyylidisul-
fididerivatisoituun 16.88-vasta-aineeseen liittämiseen.
Lysotsyymiaktiivisuus mitattiin käyttäen Micrococcus lyso-
dekticus -suspensiota (Shugar, 1949).

Taulukko 1

Lysotsyymin muokkauksen vaikutus entsyyminaktiivisuuteen

	Heterobifunktio- naalinen ryhmä	Molaariset suhteet (kytkentäryhmä: lysotsyymi)	Jäljelläoleva lysotsyymi- aktiivisuus (%)	
			Koe I	Koe II
5				
10	2-iminotiolaani	2,1:1	60 %	68 %
	SATA	2,0:1	10 %	
	GMBS	1,8:1	5 %	18 %

* Mitattuna Micrococcus lysodeikticus -määrityksellä
15 (Shugar, 1949).

16.88-lysotsyymi -konjugaattien synteesi

2-IT-derivatisoitu lysotsyymi liitettiin SPDP-deri-
vatisoituun 16.88:aan (menetelmä A) tai TPCH-derivatisoi-
tuun 16.88:aan (menetelmä B).
20

Menetelmä A: 16.88-SPDP ja 2-IT-derivatisoitu
lysotsyymi liitettiin yhteen sekoittamalla kaksi kompo-
nenttia suhteessa 1:1 (w/w). Liuosta huuhdeltiin typpi-
kaasulla 24-48 -tuntisen liittämisreaktion aikana 4 °C
25 lämpötilassa. 16.88-lysotsyymi erotettiin vapaasta lysot-
syymistä Fractogel 55F-geelifiltraatiolla 0,01 M fosfaat-
tipuskurissa (pH 7,0) joka sisälsi 0,1 M natriumkloridia.

Menetelmä B: 2-IT-derivatisoitu lysotsyymi sekoi-
tettiin TPCH-derivatisoidun 16.88:n kanssa 1:1 (w/w) suh-
teessa ja saatettiin reagoimaan yli yön huoneenlämpöti-
30 lassa. 16.88-lysotsyymi erotettiin vapaasta lysotsyymistä
geelifiltraatiolla kuten menetelmässä A.

Liittämisaantojen vertailu SPDP-derivatisoidun
16.88:n ja TPCH-derivatisoidun 16.88:n välillä osoitti
35 korkeamman kokonaissaannon SPDP-muokatun vasta-aineen

5 kanssa. Rutiininomaisesti 3-4 moolia lysotsyymiä voitiin liittää per mooli SPDP-muokattua 16.88:aa. 16.88-lysotsyymi -konjugaatin antigeenia sitova aktiivisuus mitattiin kompetitiivisessa sitoutumismäärityksessä muokkaamattoman 16.88-referenssin suhteen. Kuviossa 3 näytetyt tulokset osoittavat, ettei vasta-aineaktiivisuutta enää menetetty 16.88-lysotsyymi -konjugaatissa SPDP-muokattuun 16.88:aan verrattuna, kuten näytetään kuviossa 1.

10 Konjugaattien entsymaattinen aktiivisuus mitattiin uudella määrityksellä, joka käytti esilääkkeen kaltaista liukoista substraattia. Määrityksen substraatti oli N-asetyyli-glukosamiini-pentameeri (GlcNAc)₅ (1 mM) 0,005 M sitraattipuskurissa, pH 4,5. Pilkottu (GlcNAc)₅ erotettiin substraattista 4 tunnin jälkeen 37 °C lämpötilassa ohutker-
15 roskromatografialla piin päällä käyttäen 2-propanoli/vesi/ammoniumhydroksidi (62/37/1) liuotinjärjestelmää. (GlcNAc)₅ ja pilkottu substraatti visualisoitiin sumuttamalla päälle 10 % rikkihappoa etanolissa. Kvantitaatio tehtiin densitometrisellä skannauksella. Menetelmä mittaa
20 lysotsyymin aktiivisuutta konsentraatioalueella 6,25 - 50 µg/ml. Standardikäyrä (kuvio 4) osoitti, että määritys on herkin lysotsyymin konsentraatioalueella 6,25 - 10 µg/ml. Taulukko 2 osoittaa, että 16.88-lysotsyymillä on noin 90 % vastaavan 2-IT-derivatisoidun lysotsyymimäärän aktiivisuudesta.
25

16.88-lysotsyymin stabiilisuutta on seurattu 4 °C ja huoneenlämpöisissä (25 °C) varasto-olosuhteissa. Tulokset (taulukko 3) osoittavat, että lysotsyymin aktiivisuus ei laske merkittävästi yhden kuukauden aikana 4 °C tai 25
30 °C lämpötilassa. Yhden kuukauden varastoinnin jälkeen havaittiin 16.88 -vasta-aineen aktiivisuuden vähentyvän 54 % huoneenlämmössä ja vasta-aineen aktiivisuuden vähentyvän 33 % 4 °C lämpötilassa.

Taulukko 2

5	Vasta-aineen liittämisen vaikutus		lysotsyymin	ak-
	tiivisuuteen			
	Lysotsyymi-johdannainen	Molaariset suhteet (Lysotsyymi:16.88)	Jäljelläoleva lysotsyymi-	aktiivisuus (%)

10	Lysotsyymi-IT		100	
	Lysotsyymi-16.88	4:1	92	
		3:1	90	

15

Taulukko 3

20

Lysotsyymi-16.88 -immunokonjugaattien stabiilisuus

25	Päivämäärä	Tarvittava vasta-aineen määrä (µg) sitoutumisen 50 %:een inhiboitumiseen		Jäljellä oleva lysotsyymi-aktiivisuus (%)	
		25 °C	4 °C	25 °C	4 °C

30	10/13/89	6 µg (100 %)	7 µg (100 %)	100 %	100 %
	11/13/89	13 µg (46 %)	10,5 µg (67 %)	90 %	106 %

Syöpäkasvaimen paikallistaminen in vivo ja 16.88-lysotsyymin farmakologinen kinetiikka ihmisen paksusuolensyövän syöpäsiirremallissa "nude"-hiirissä

16.88-lysotsyymi tai 16.88, joka oli leimattu I-125:llä spesifiseen aktiivisuuteen 1 mCi/mg, injektoidiin suonensisäisesti (50 mCi, 50 µg) 15 Balb/c kateenkorvattomien "nude" hiiren ryhmiin, joilla oli 0,2 gramman ihonalaista ihmisen paksusuolensyövän siirteitä. Paksusuolensyöpä (THO) ilmentää antigeenia, jonka ihmisen monoklonaalinen vasta-aine 16.88 tunnistaa. Tarkoitus oli verrata vasta-aine-lysotsyymi -konjugaattia (1:4) ja konjugoitumatonta 16.88-vasta-ainetta arvioitaessa lysotsyymin vaikutusta normaaliin syövän etenemiseen ja vasta-aineen säilymiseen seerumissa (veressä). Seerumissa säilyminen (kuvio 5) oli arviolta sama 16.88-lysotsyymin ja 16.88:lle ajanjaksona neljä tuntia - kaksi päivää injektion jälkeen, ja 16.88:n puoliintumisajaksi seerumissa osoittautui 12,4 tuntia ja 16,88-lysotsyymin puoliintumisajaksi seerumissa 11,8 tuntia. Injektioajankohdasta yhteen tuntiin injektion jälkeen, 16.88-lysotsyymi vaikutti poistuvan nopeammin seerumista. 16.88-lysotsyymin tai 16.88:n määrät syöpäsiirteessä olivat suurimmillaan yhden tunnin kuluttua injektion jälkeen; 4 % 16.88-lysotsyymin, 3,5 % 16.88:lle. Sekä 16.88-lysotsyymin että 16.88:lla poistumisnopeudet syöpäkasvaimesta olivat samanlaiset yhden tunnin - kahden päivän jälkeen antamisesta (kuvio 6).

Esimerkki 2

Doksorubisiini johdannaisen valmistus

Lääkejohdannainen koostuu seuraavista osista:

- 30 a) doksorubisiinista;
- b) kitiini-oligomeeriväliryhmästä, joka on konjugoitu pelkistävän päänsä välityksellä doksorubisiiniin, lääkkeen C13-karbonyyliryhmään; ja
- 35 c) kahdesta tauriinitähteestä, jotka ovat liittyneet kahteen aldehydiryhmään, jotka on tehty kitiini-

oligomeeriväliryhmän ei-pelkistävään päähän periodaattihapetuksella.

Doksorubisiinin derivatisointi pyridyylidisulfiditähteellä

5 Jotta saataisiin liitettyä doksorubisiini kitiini-oligomeeriväliryhmän pelkistävään päähän, molekyyliä muokataan sen C13-karbonyyliryhmässä hydratsidijohdannaisella julkaistujen menetelmien mukaisesti (Hurwitz et al, 1980; Hurwitz et al, 1983). Tässä esimerkissä käytetty hydratsidijohdannainen on heterobifunktionaalinen reagenssi, joka sisältää yhden hydratsidiosan ja yhden pyridyylidisulfidiosan (kuva 7). Hydratsidijohdannaisen [3-(2-pyridyyliditio)propionihappohydratsidin (PDPH)] synteesi suoritetaan kolmivaiheisena menetelmänä: 3-merkaptopropionihapon pyridyylidisulfidijohdannaisen valmistus, karboksyyli-ryhmän kondensatio *t*-butyyli-karbatsaatilla, jota seuraa suojauksen poisto HCl:llä kyllästetyllä etyyliasetaatilla.

10
15

Doksorubisiini·HCl -liuos (58 mg, 0,1 millimoolia) 0,85 ml:ssa H₂O:ta käsiteltiin liuoksella, joka koostui PDPH:sta (380 mg, 1 millimooli) ja NaOAc:sta (84 mg, 1,02 millimoolia) 0,6 ml:ssa vettä. Tähän kirkkaanpunaiseen liuokseen lisättiin 4,8 ml 0,1 M Na₂CO₃:a ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa (RT) yli yön. Reaktioseos uutettiin CHCl₃/MeOH:lla (3/1), yhdistetty uute haihdutettiin ja puhdistettiin preparatiivisella TLC:llä (ohutkerroskromatografialla) (Tapered Preparative Uniplate-T, CHCl₃/MeOH/NH₄OH=90/10/1), jolloin saatiin yhdiste 1. FAB-MS; m/z = 755(M+1).

20
25

Tioesteri-derivatisoitujen kitiini-oligosakkaridien valmistus

30

(Kuvio 8)

Kitiini hydrolysoitiin Rupleyn (1964) kehittämällä menetelmällä ja puhdistettiin P2-geelisuodatuspylvään läpi. Täten saadut kitiini-oligosakkaridit derivatisoitiin kuten näytetään kuvassa 8. Penta-N-asetyylikitopentaosi

35

(2e) palvelee esimerkkinä. Penta-N-asetyylikitopentaoosin (2e) seos (0,44 g, 0,42 millimoolia) 10 ml:ssa vettä, 8 ml:ssa etanolia ja 1 ml:ssa fenyylihydratsinia kuumentettiin 125 °C lämpötilaan kahdeksi päiväksi. Reaktioseos
5 jäähdytettiin huoneenlämpötilaan, lisättiin 20 ml vettä ja tehtiin eetteriuutto (25 ml x 3). Vesipitoinen kerros lyofilisoitiin ja tuote puhdistettiin edelleen käänteisfaasipylvään läpi (C18) (40 % MeOH/H₂O). Yhdiste 3e (0,33 g, 0,29 millimoolia) liuotettiin veteen (20 ml), lisättiin
10 1/4 teelusikallinen Raney Nickel W-2:ta ja hydrattiin Parr-laitteessa yli yön. Reaktioseos suodatettiin Celite-kerroksen läpi, konsentroitiin ja ladattiin Dowex 50-WK2 (H⁺) -ioninvaihtopylvääseen. Pylväs eluoitiin ensin 80 ml:lla vettä, jota seurasi 50 ml 2N-NH₄OH:ta. Eluaatti
15 lyofilisoitiin, jolloin saatiin 0,15 g yhdistettä 4e. Yhdiste 4e (0,15 g, 0,15 millimoolia) liuotettiin veteen (5 ml), sekoitettiin 0,067 g (0,29 millimoolia) SATA-määrän kanssa 0,8 ml:ssa DMF:ää ja sekoitettiin huoneenlämpötilassa yli yön. Reaktioseos laimennettiin vedellä (20
20 ml), uutettiin kloroformilla (20 ml x 3) ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin yhdiste 5e, joka hydrolysoitiin 10 ml:lla 0,1 M NaOH:ia huoneenlämmössä kahden tunnin ajan ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin kellertävä jauhe 6e.

**Tioesteri-derivatisoitujen kitiini-oligomeerien
25 kiinnitys pyridyylidisulfididerivatisoituun dokso-
rubisiiniin**

(kuva 9)

PDPH-derivatisoitu doksorubisiini 1 (0,01 g, 0,013 millimoolia) liuotettiin etanoliin (12 ml), lisättiin
30 katalyyttinen määrä HOAc:tä, jonka jälkeen 0,25 g (0,023 millimoolia) yhdistettä 6e, ja sekoitettiin yli yön huoneenlämmössä. Liuotin haihdutettiin ja jäännös liuotettiin veteen (10 ml), uutettiin (CHCl₃/MeOH=7/3) ja yhdistetyt
uutteet haihdutettiin, jolloin saatiin tummanruskeaa jauhetta 7 [TLC ei osoittanut havaittavaa määrää tioesteri-
35

derivatisoitua kitiinioligomeeriä (6e). Piigeeli, 2-propanoli/vesi/ NH_4OH =72/27/1].

Tauriinitähteiden kiinnitys tioesteri-derivatisoituihin kitiinioligomeereihin

5 (Kuvio 10)

Tioesteri-derivatisoidun kitiinioligomeerin hapetus NaIO_4 :llä muodosti dialdehydejä ei-pelkistävässä päässä, jotka saatettiin reagoimaan tauriinin kanssa, jolloin muodostui Schiffin emäs (8). Yhdiste 8 pelkistettiin stabiilimmaksi amiiniksi NaBH_4 :llä, jolloin saatiin yhdiste 9. Yhdisteen 9 hydrolyysi 0,1 M NaOH :lla muodosti derivatisoidun kitiinoligomeeriväliryhmän, joka sisälsi vapaan sulfhydryylin pelkistävässä päässä (10).

15 **Doksorubiini johdannaisen valmistus, joka sisältää tauriinitähteitä pilkottavissa olevan kitiinioligomeeriväliryhmän välityksellä**

Disulfidisidoksen (7) välityksellä kitiinioligomeerin sisältävä doksorubisiini johdannainen saatettiin miedon NaIO_4 -käsittelyn alaiseksi pH:ssa 6,0 60 minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Kun ylimääräinen NaIO_4 oli sammutettu etyleeniglykolilla, reaktioseokseen lisättiin 10-kertainen molaarinen ylimäärä tauriinia (doksorubisiini johdannaisen suhteen). Kun oli inkuboitu yksi lisätunti huoneenlämpötilassa, johdannaista käytettiin sytotoksisuusmäärityksiin sen jälkeen kun pH oli säädetty 7,2:een. Yhdisteen 7 muuttuminen tauriini johdannaiseksi vahvistettiin TLC-analyysillä piin päällä (2-propanoli/vesi/ NH_4OH =72/27/1).

30 **Vaihtoehtoinen synteesimenetelmä sallii stabiiliman lääkejohdannaisen valmistuksen, jossa käytetään kuvassa 10 esitettyä kitiiniväliryhmää. Pyridyylidisulfidi-derivatisoitu doksorubisiini (1) saatetaan reagoimaan tauriini-derivatisoidun kitiinioligomeerin kanssa, joka sisältää vapaan sulfhydryyliryhmän pelkistävässä päässä (10), jolloin muodostuu doksorubisiini johdannainen (11),**
35 **joka näytetään kuvassa 11.**

Sulfonihappotähteiden lukumäärä per doksorubisiini-johdannainen

Tarvittaessa sulfonihappotähteiden lukumäärää per lääkejohdannainen voidaan helposti muuttaa. Esimerkiksi
5 neljä sulfonihappotähdettä kahden asemesta voidaan liittää lääkejohdannaista kohti käyttäen hydratsidijohdannaista, joista kukin kantaa kahta sulfonihappotähdettä. Lisäksi negatiivisesti varautuneiden ryhmien sisällyttäminen ei rajoitu sulfonihappotähteisiin. Esimerkiksi voidaan myös
10 käyttää fosfaatteja tai fosfonihappotähteitä (esim. 3-aminopropyylifosfonihappoa).

Kitiinioligomeeriväliryhmän pituus esilääkkeessä

Lysotsyymin aikaansaama suhteellinen kitiinioligomeerien pilkkoutumisnopeus on suhteessa ketjun pituuteen.
15 Esimerkiksi kitoheksaoosi pilkkoutuu 30 000 kertaa nopeammin kuin kitotrioosi (Imoto et al, 1972). Näin ollen pentameereja suurempien kitiinioligomeeriväliryhmien voidaan odottaa muodostavan lääkkeitä, jotka lysotsyymi aktivoi helpommin.

Eripituisia kitiinioligosakkarideja sisältävien doksorubisiinijohdannaisten sytotoksinen aktiivisuus

In vitro -sytotoksisuus mitattiin käyttäen ³H-tymidiinin sisäänoton inhibitiota A2780-munasarjasyöpäsoluilla. Lyhyesti, 0,1 ml solususpensiota, joka sisälsi 2 x 10⁴
25 solua Eaglen modifioidussa MEM-ravintoliemessä, lisättiin 96-kaivoisen mikroviljelylevyn kaivoihin. Lisättiin neljä kertaa 0,1 ml:n tilavuuksia doksorubisiinia tai doksorubisiinijohdannaista 0,6 - 10 µg/ml konsentraatioina ja sekoituksia inkuboitiin 4 tuntia 37 °C lämpötilassa kosteute-
30 tetussa CO₂-lämpökaapissa. 0,1 ml ³H-tymidiiniä (10 µCi/ml) lisättiin kuhunkin kaivoon ja inkuboitiin 16 tuntia. Sen jälkeen solut pestiin, kerättiin 0,5 N natriumhydroksidilla ja mitattiin laskurilla ³H-tymidiinin sisäänotto. Kuvio
35 12 näyttää tulokset tyypillisessä doksorubisiinia käyttä-

vässä määrityksessä. Taulukko 4 vertailee sellaisen doksorubisiinin aktiivisuutta, joka on muokattu väliryhmällä (PDPH) jota käytetään liittämään (GlcNAc)_n, ja doksorubisiinia joka on liitetty (GlcNAc)₁:aan tai (GlcNAc)₅:aan.

- 5 Doksorubisiinin muokkauksen määrästä riippumatta lääkkeen aktiivisuus ei havaittavasti heikentynyt. Tämä tulos osoittaa, että lysotsyymien toiminnan aikaansaama lääke on yhtä sytotoksinen kuin alkuperäinen doksorubisiini.

10 **Taulukko 4**

Doksorubisiinijohdannaisen sytotoksisuus

Johdannainen	Sytotoksisuus (%)*
-----	-----
Dox-PDPH	67,1
Dox-(GlcNAc) ₁	99,6
Dox-(GlcNAc) ₅	100,0

- 20 * sytotoksisuus (%) doksorubisiiniin verrattuna. Lääkkeen konsentraatio vastaa 0,625 µg/ml.

25 **Tauriinijohdannaisia pilkottavissa olevan kitiinioligomeeriväliryhmän välityksellä sisältävän doksorubisiinijohdannaisen sytotoksinen aktiivisuus**

- Kuvio 13 näyttää tauriinitähteitä sisältävän doksorubisiinijohdannaisen sytotoksisen aktiivisuuden verrattuna doksorubisiinijohdannaiseen, joka sisältää kitopen-taoosiväliryhmän ilman kiinnittyneitä tauriinitähteitä.
- 30 Sytotoksisuus suoritettiin aikaisemmin kuvatulla tavalla. Tauriinia sisältävä lääke oli noin 20-kertaisesti vähemmän sytotoksinen. Kiinnittyneitä tauriinitähteitä sisältävän kitiinioligomeeriväliryhmän altistuminen lysotsyymille johti väliryhmän pilkkoutumiseen, mikä vahvistettiin
- 35 TLC:llä (2-propanoli/vesi/NH₄OH=67/32/1). Nämä tiedot vah-

vistavat, että tauriinia sisältävä esilääke voidaan muuttaa eripituisia kitiinioligomeereja sisältäviksi aktiivisiksi lääkelajeiksi, jotka ovat yhtä aktiivisia kuin lähtölääke (taulukko 4).

5

Viitteet

- Bagshawe, K.D. Antibody Directed Enzymes Revive Anti-Cancer Prodrugs Concept. Br. Med. J. 56, 531-537 (1987).
- 10 Briggs, R.S., Perillie, P.E. ja Finch, S.C. Lysozyme in Bone Marrow and Peripheral Blood Cells. J. Histochem. Cytochem. 14, 167-170 (1966).
- 15 Ellman, G.L. Tissue Sulfhydryl Groups. Arch. Biochem. Biophys. 87, 70-79 (1959).
- Flanagan, P. ja Lionetti, F. Lysozyme Distribution in Blood. J. Hematology 10, 497-501, 1955.
- 20 Flickinger, R.A. ja Trost, S.R. Cytotoxicity of Antibody Phospholipase C Conjugate on Cultured Friend Leukemia Cells. Eur. J. Cancer 12, 159-160 (1976).
- 25 Gallego, J., Price, M.R. ja Baldwin, R.W. Preparation of Four Daunomycin-Monoclonal Antibody 79IT/36 Conjugates with Anti-Tumor Activity. Int. J. Cancer 33, 737-744 (1984).
- 30 Hamm, C.W., Kupper, W., Bredehorst, R., Hilz, H., Bleifeld, W. Quantitation of Coronary Venous Adenosine in Patients: Limitations Evaluated by Radioimmunoassay. Cardiovascular Res. 22, 236-243 (1988).

- 5 Haspel, M.V., McCabe, R.P., Pomato, N., Janesch, N.J., Knowlton, J.V., Peters, L.C., Hoover, H.C., Jr. ja Hanna, M.G., Jr. Generation of Tumor Cell-Reactive Humor Monoclonal Antibodies Using Peripheral Blood Lymphocytes from Actively Immunized Colorectal Carcinoma Patients. Cancer Res. 45:3931-3961, 1985.
- 10 Holler, E., Rupley, J.A. ja Hess, G.P. Productive and Unproductive Lysozyme-Chitosaccharide Complexes. Equilibrium Measurements. Biochemistry 14, 1088- (1975a).
- 15 Holler, E., Rupley, J.A. ja Hess, G.P. Productive and Unproductive Lysozyme-Chitosaccharide Complexes. Kinetic Investigations. Biochemistry 14, 2377- (1975b).
- 20 Hurwitz, E., Wilchek, M. ja Phita, J. Soluble Macromolecules as Carriers for Daunomycin. J. Appl. Biochem. 2, 25-35 (1980).
- 25 Hurwitz, E., Arnon, R., Sahar, E. ja Danon, Y. A Conjugate of Adriamycin and Monoclonal Antibodies to Thy-1 Antigen Inhibits Human Neuroblastoma Cells In Vitro. Ann. N. Y. Acad. Sci 417, 125-136 (1983).
- Imoto, T., Johnson, L.N., North, A.C.T., Phillips, D.C. ja Rupley, J.A. Vertebrate Lysozymes. Teoksessa: The Enzymes (toim. P.D. Boyer) Vol. 7, 665-868 (1972).
- 30 McCallister, T.J., Halpern, S.E., Dillman, R.O. ja Shawler, D.L. Human Anti-Mouse Antibody (HAMA) Formation in Cancer Patients Following Single Injections of Murine Monoclonal Antibodies. FASEB J. 2:690 (1988).

- Mitra, S. ja Lawton, R.G. Reagents For the Cross-Linking of Proteins by Equilibrium Transfer Alkylation. J. Amer. Chem. Soc. 101, 3097-3110 (1979).
- 5 Napper, A.D., Benkovic, S.J., Tramontano, A. ja Lerner, R.A. A Stereospecific Cyclization Catalyzed by an Antibody. Science 237, 1041-1043 (1987).
- 10 Osserman, E.F. ja Lawlor, D.P. Serum and Urinary Lysozyme (Muramidase) in Monocytic and Monomyelocytic Leukemia. J. Exp. Med. 124, 921-951 (1966).
- 15 Phillips, H.J. Teoksessa: Tissue Culture: Methods and Applications (toim. P.F. Kruse, Jr. ja M.K. Patterson, Jr.) s. 406 (1973).
- 20 Prakash, C. ja Vijay, I.K. A New Fluorescent Tag for Labeling of Saccharides. Analyt. Biochem. 128, 41-46 (1983).
- 25 Raftery, M.A., Rand-Meir, T., Dahlquist, F.W., Parsons, S.M., Borders, Jr., C.L., Wolcott, R.G., Beranek, Jr., W., ja Jao, L. Separation of Glucosaminoglycan Saccharide and Glycoside Mixtures by Gel Filtration. Analyt. Biochem. 30, 427-435. (1969).
- 30 Reynolds, J.C., Carrasquillo, J.A., Keenan, A.M., Lora, M.E., Sugarbaken, P., Abrams, P., Foon, K., Mulshine, J.L., Roth, J., Colcher, D., Schlom, J. ja Larson, S.M. Human Anti-murine Antibodies Following Immunoscintigraphy on Therapy With Radiolabeled Monoclonal Antibodies. J. Nucl. Med., 27, 1022 (1986).

- Rodwell, J.D. ja McKearn, T.J. Antibody Conjugates for the Delivery of Compounds to Target Sites. US-patentti 4 671 958, 9. kesäkuuta 1987.
- 5 Rupley, J.A. The Hydrolysis of Chitin. Biochem. Biophys. Acta 83, 245-255 (1964).
- Schroff, R.W., Foon, K.A., Bratty, S.M., Oldham, R.K. ja Morgan, Jr. A.C., Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy. Cancer Res. 45, 879-885 (1985).
- 10
- Searle, F., Bier, C., Buckley, R.G. ja 8 muuta. The Potential of Carboxypeptidase G₂-Antibody Conjugates as Anti-Tumour Agents. Br. J. Cancer 53, 377 (1986).
- 15
- Sela, M. ja Hurwitz, E. Conjugates of Antibodies with Cytotoxic Drugs. Teoksessa: Immunoconjugates. Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (toim. C.-W. Vogel), 189-216 (1987).
- 20
- Senter, P.D., Saulnier, M.G., Schreiber, G.J., Hirschberg, D.L., Brown, J.P., Hellstroem, I. ja Hellstroem, K.E. Anti-Tumor Effects of Antibody Alkaline Phosphatase Conjugates in Combination with Etoposide Phosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4842-4846 (1988).
- 25
- Shugar, D. Measurement of Lysozyme Activity and the Ultraviolet Inactivation of Lysozyme. Biochem. Biophys. Acta, 8, 302-309, 1949.
- 30
- Steis, R., Carrasquillo, J.A. ja 16 muuta. An Evaluation of the Toxicity, Immunogenicity, and Tumor Radioimmuno-detecting Ability of Two Human Monoclonal Antibodies in

Patients with Metastatic Colorectal Carcinoma. J. Clin. Oncology, 1990 (painossa).

- 5 Thorpe, P.E., Wallace, P.M., Knowles, P.P., Relf, M.G., Brown, A.N.F., Watson, G.J., Knyba, R.E., Wawrzynczak, E.J. ja Blakey, D.C. New Coupling Agents for the Synthesis of Immunotoxins Containing a Hindered Disulfide Bond with Improved Stability In Vivo. Cancer Res. 47, 5924-5931 (1987).
- 10 Vogel, C.-W (toim.) Immunoconjugates. Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer. Oxford University Press, New York, 1987.
- 15 Wawrzynczak, E.J. ja Thorpe, P.E. Methods for Preparing Immunotoxins: Effect of the Linkage on Activity and Stability. Teoksessa: Immunoconjugates. Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer. (toim. C.-W. Vogel), 28-55 (1987).
- 20 Young, R.C. ja Ozols, R.F. The Anthracycline Antineoplastic Drugs. N. Engl. J. Med. 305, 139-153 (1981).
- 25 Zara, J.J., Wood, R.C., McCabe, R.P., Pomato, N., Hanna Jr., M.G., Bredehorst, R. ja Vogel, C-W., Synthesis of a Novel Site-Specific Heterobifunctional Crosslinker: Use for the Preparation of Antibody Conjugates with Cobra Venom Factor. Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer, San Diego, CA. 30. maaliskuuta - 1. huhtikuuta 1989.
- 30

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen akti-
vaattori-kohdistusosa -konjugaatin valmistamiseksi, joka
5 sisältää lysotsyymien aktivaattorina ja ihmisen monoklonaa-
lisen vasta-aineen tai sen fragmentin kohdistusosana,
t u n n e t t u siitä, että kytketään kovalenttisella si-
doksella mainittu aktivaattori mainittuun kohdistusosaan
tavalla, joka säilyttää konjugaatin kyvyn sitoutua anti-
10 geeniin ja aktivoida esilääke, joka sisältää pilkottavissa
olevan molekyylin.

2. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen esi-
lääkkeen valmistamiseksi, joka sisältää syöpää tuhoavan
aineen, joka sisältää pilkottavissa olevan molekyylin,
15 joka estää solun sisään joutumisen, t u n n e t t u sii-
tä, että mainittu pilkottavissa oleva molekyyli konjugoi-
daan syöpää tuhoavaan aineeseen.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että syöpää tuhoava aine on deri-
20 vatisoitu kitiinioligomeeriväliryhmällä.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että syöpää tuhoava aine on antra-
sykliini.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä,
25 t u n n e t t u siitä, että kitiinioligomeeriväliryhmä on
kiinnittynyt aminoryhmän välityksellä kohtaan, joka on va-
littu ryhmästä, joka koostuu antrasykliinin C13-karbonyy-
likohdasta ja antrasykliinin sokeriosasta.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,
30 t u n n e t t u siitä, että kitiinioligomeerijohdannainen
sisältää $(\text{GlcNAc})_n$:n, jossa n on 1 - 10, joka sisältää ne-
gatiivisesti varautuneita ryhmiä ja reaktiivisen ryhmän,
joka sallii kovalenttisen kiinnittymisen antrasykliiniin.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä,
35 t u n n e t t u siitä, että negatiivisesti varautuneet
ryhmät ovat sulfonaatteja, fosfaatteja, karboksylaatteja
tai fosfonaatteja.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että negatiivisesti varautuneiden
ryhmien lukumäärä on 1 - 10.

5 9. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kitiinioligomeeriväliryhmä on
sitoutunut kovalenttisesti lääkkeeseen aktiivisen ryhmän
välityksellä, joka valitaan disulfidi-, tioesteri-, imi-
di-, halogeeni-, amiini-, karboksyyli-, esteri-, tioli- ja
alkoholiryhmistä.

10 10. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että reaktiivinen ryhmä valitaan
disulfidi-, tioesteri-, imidi-, halogeeni-, amiini-, karb-
oksyyli-, esteri-, tioli- ja alkoholiryhmistä.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett terapeutiskt användbart konjugat av en aktivator och en målsökande del
5 innehållande lysozym som aktivator och en human monoklonal antikropp eller ett fragment därav som målsökande del, k ä n n e t e c k n a t därav, att man kopplar nämnda aktivator till nämnda målsökande del med en kovalent bindning på så sätt att konjugatet bibehåller förmågan att
10 binda antigen och att aktivera ett proläkemedel som innehåller en spjälkbar molekyl.

2. Förfarande för framställning av ett terapeutiskt användbart proläkemedel innehållande ett antikancermedel som innehåller en spjälkbar molekyl som förhindrar upp-
15 tagning i cellen, k ä n n e t e c k n a t därav, att man konjugerar nämnda spjälkbara molekyl med ett antikancermedel.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att antikancermedlet derivatiserats
20 med en chitinoligomermellangrupp.

4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att antikandermedlet är ett antracyklin.

5. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att chitinoligomermellangruppen är
25 fäst via en aminogrupp vid ett ställe, vilket valts bland C13-karbonylstället i antracyklinet och sockerdelen av antracyklinet.

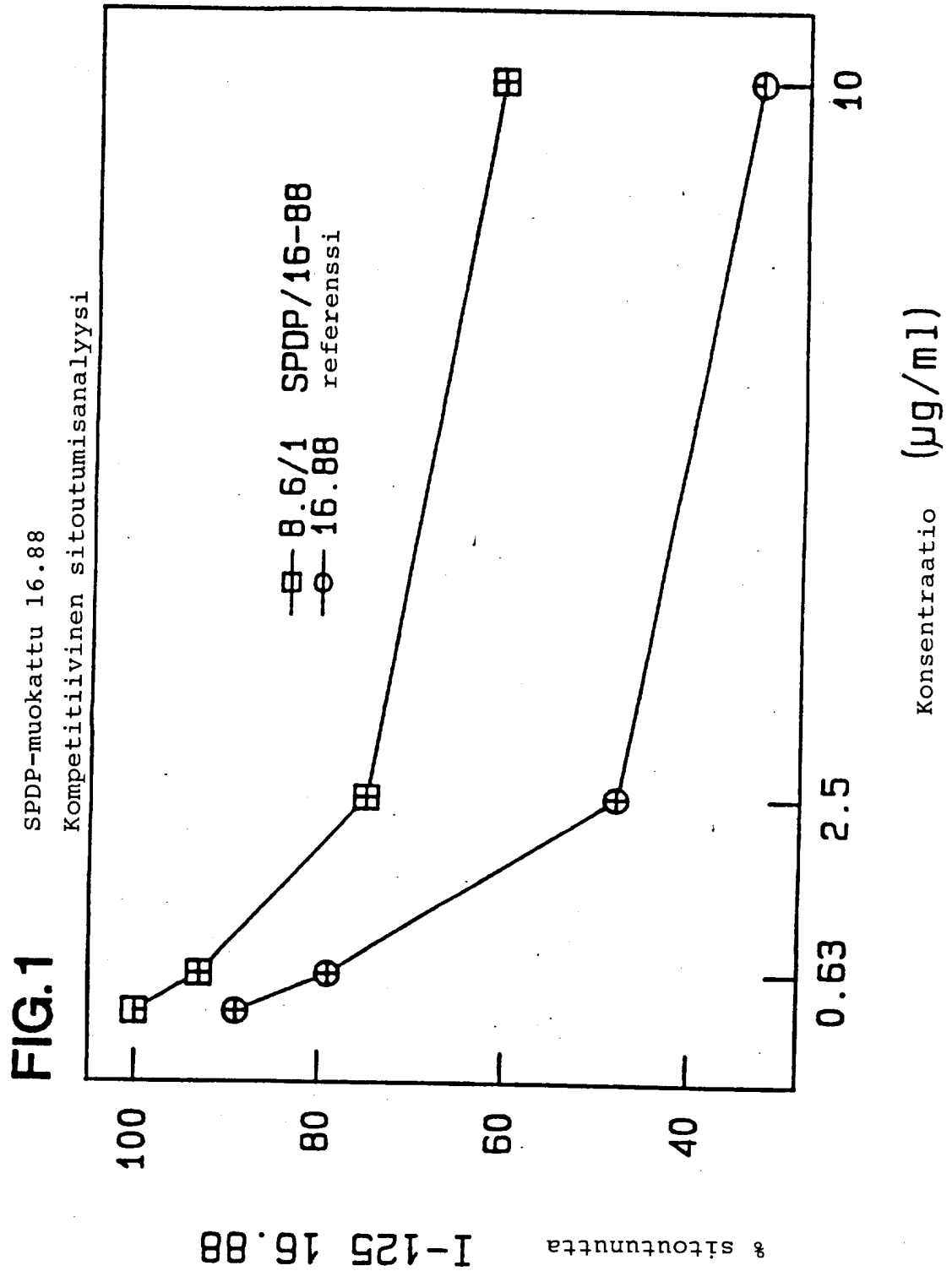
6. Förfarande enligt patentkrav 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att chitinoligomerderivatet inne-
30 håller (GlcNAc)_n, vari n är 1 - 10, bär negativt laddade grupper och en reaktiv grupp, vilken tillåter kovalent bindning vid antracyklinet.

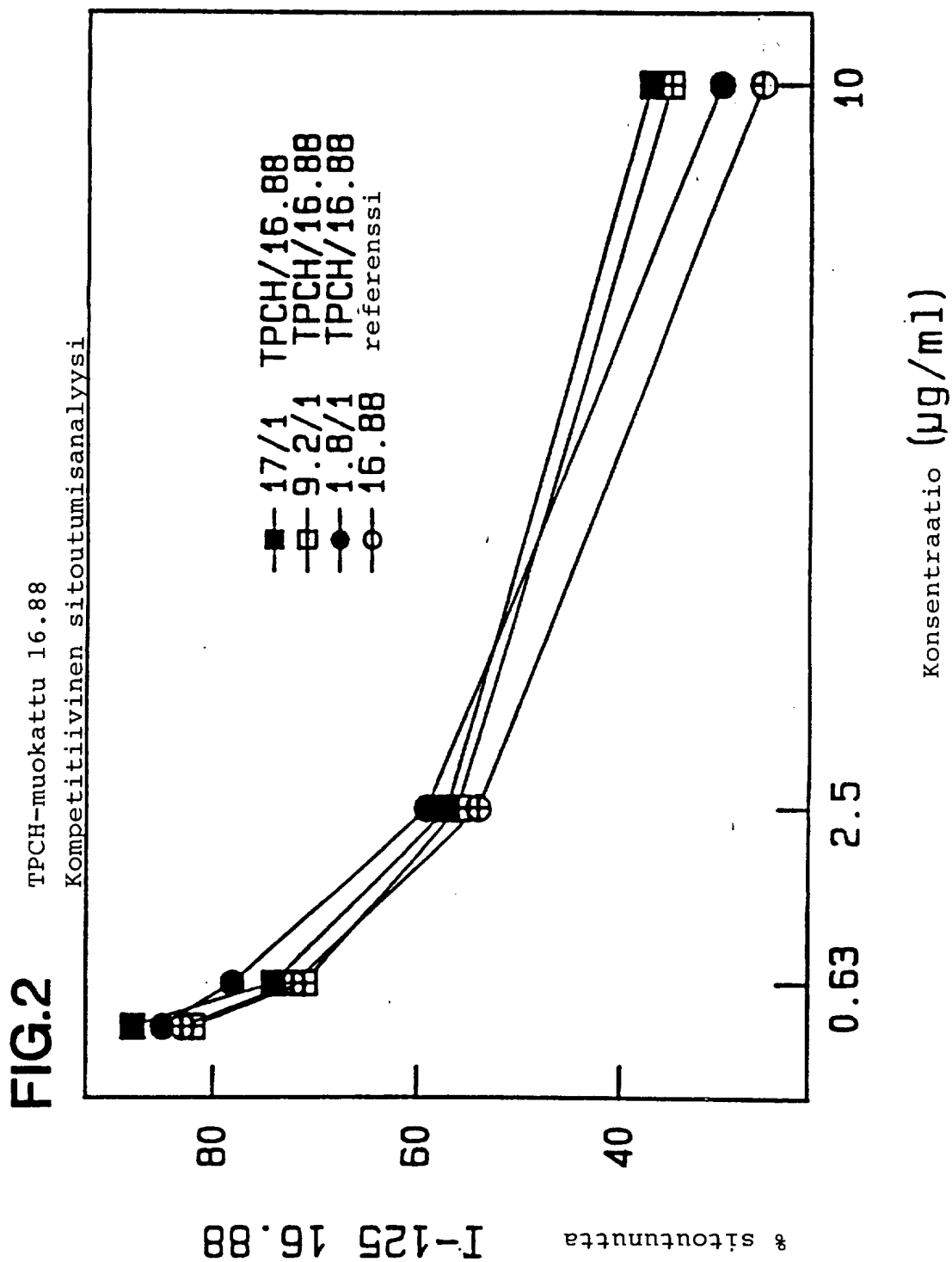
7. Förfarande enligt patentkrav 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att de negativt laddade grupperna är
35 sulfonater, fosfater, karboxylater eller fosfonater.

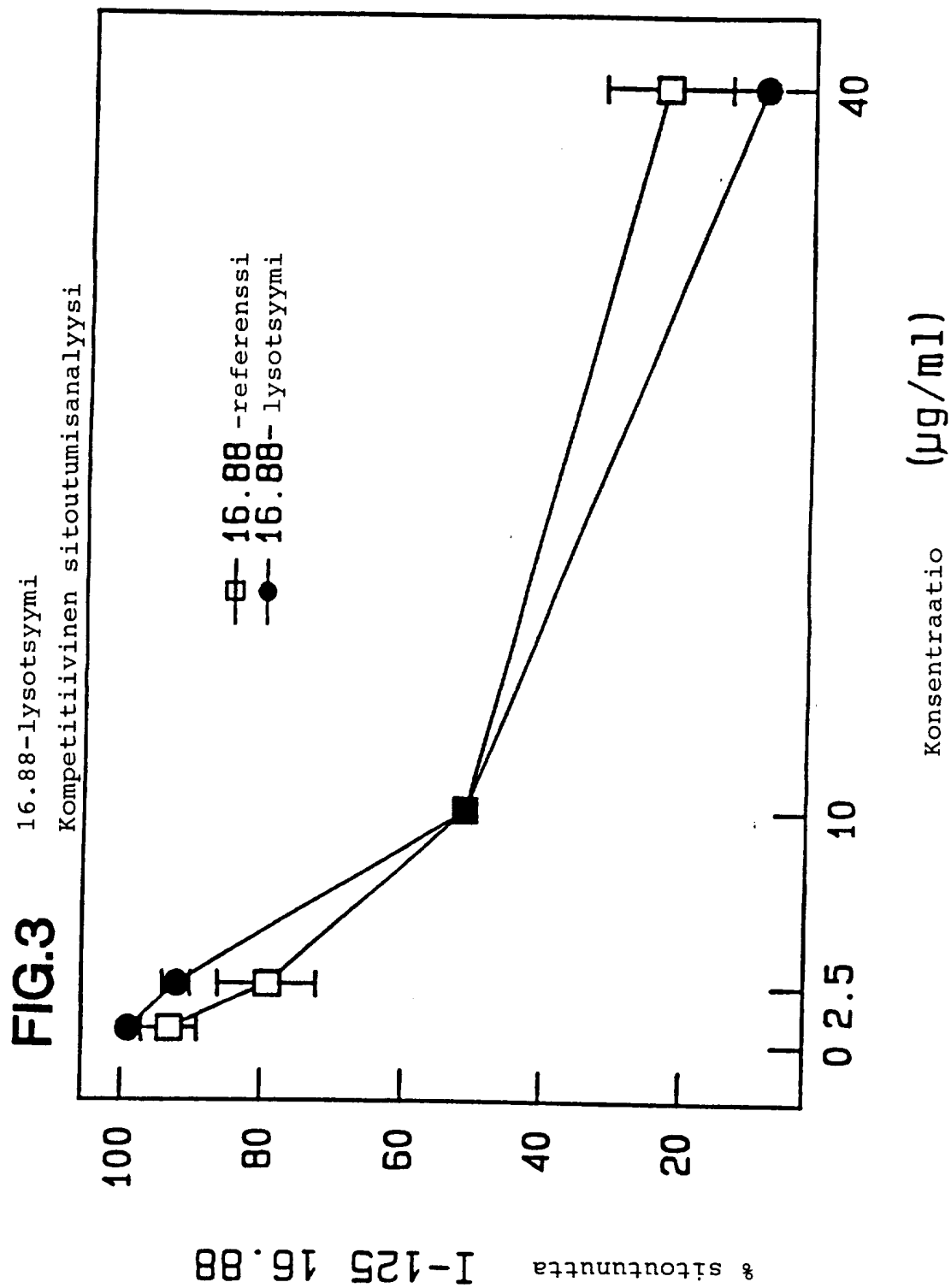
8. Förfarande enligt patentkrav 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att antalet negativt laddade grup-
per är 1 - 10.

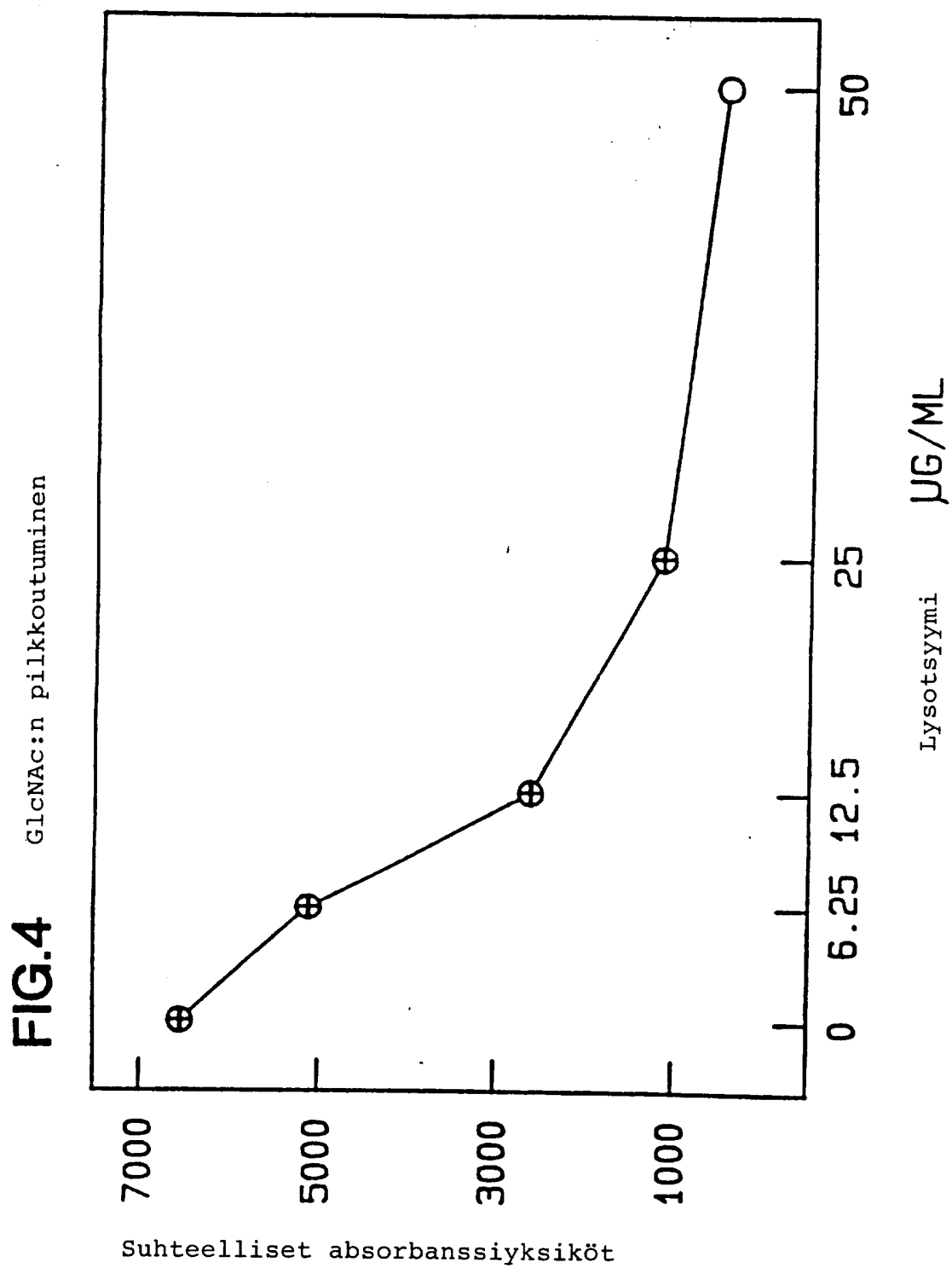
5 9. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att chitinoligomermellangruppen är
bunden kovalent vid läkemedlet via en aktiv grupp, vilken
valts bland disulfid-, tioester-, imid-, halogen-, amin-,
karboxyl-, ester-, tiol- och alkoholgrupper.

10 10. Förfarande enligt patentkrav 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den reaktiva gruppen väljs bland
disulfid-, tioester-, imid-, halogen-, amin-, karboxyl-,
ester-, tiol- och alkoholgrupper.









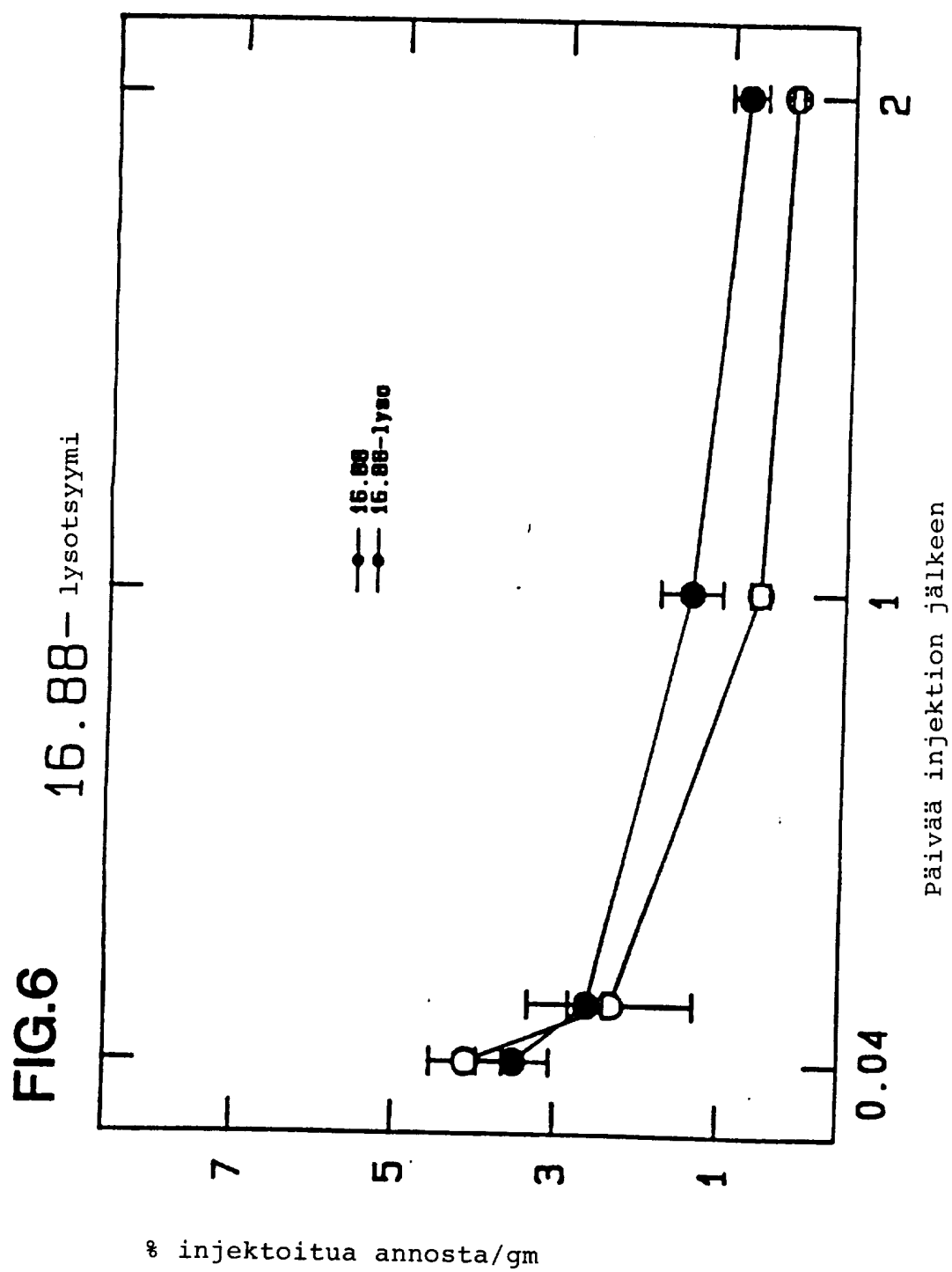


FIG.7

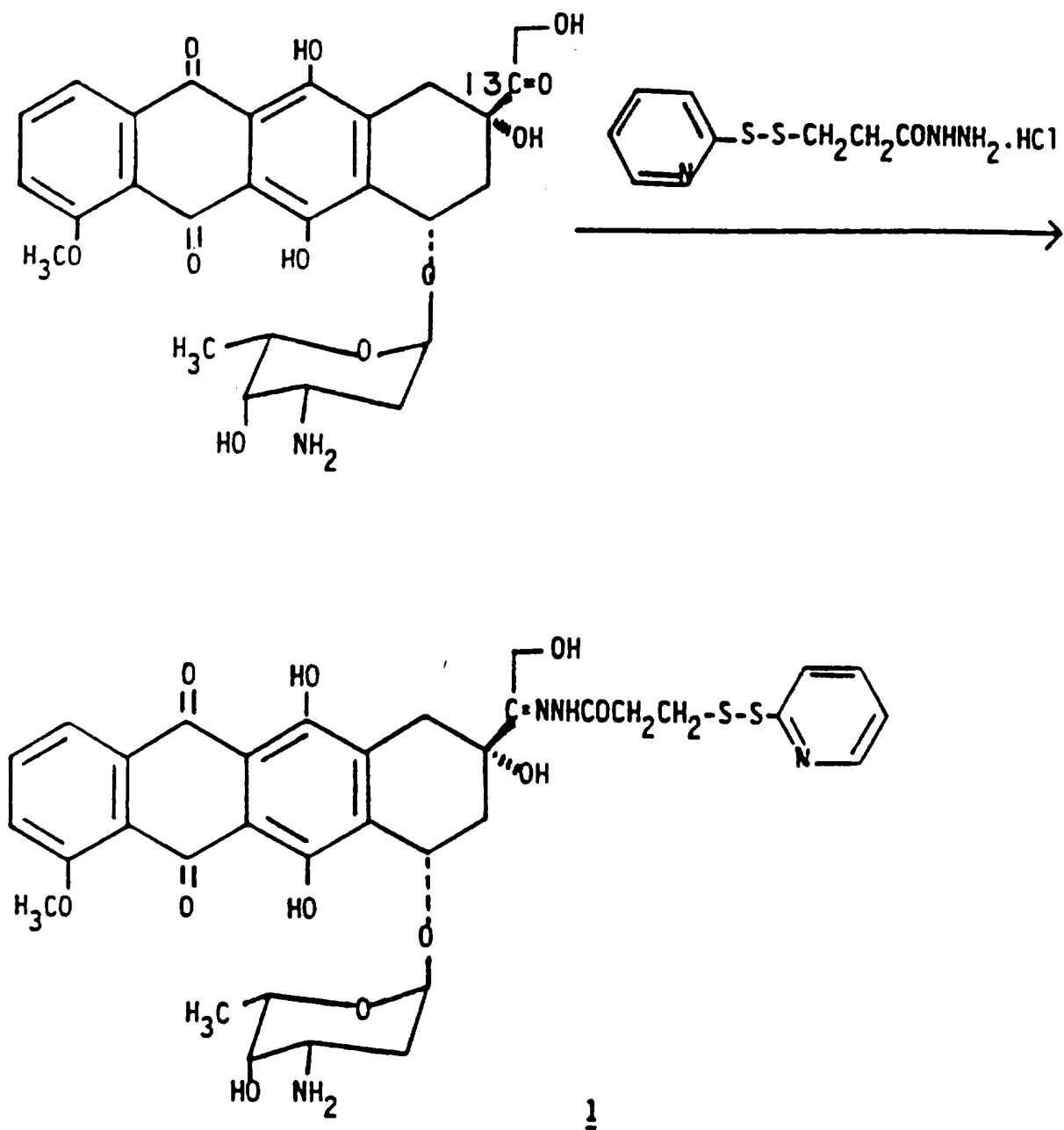
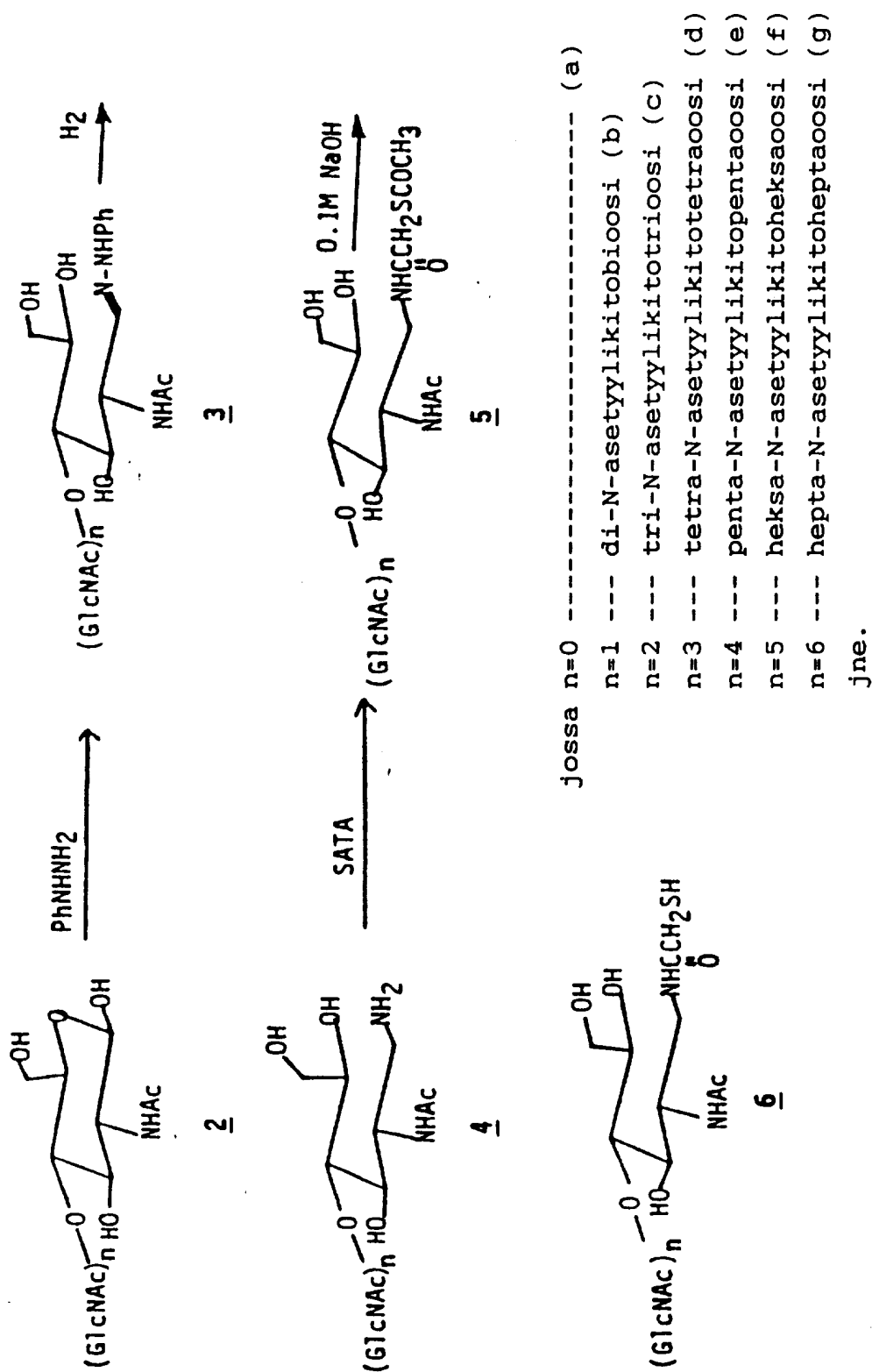


FIG.8



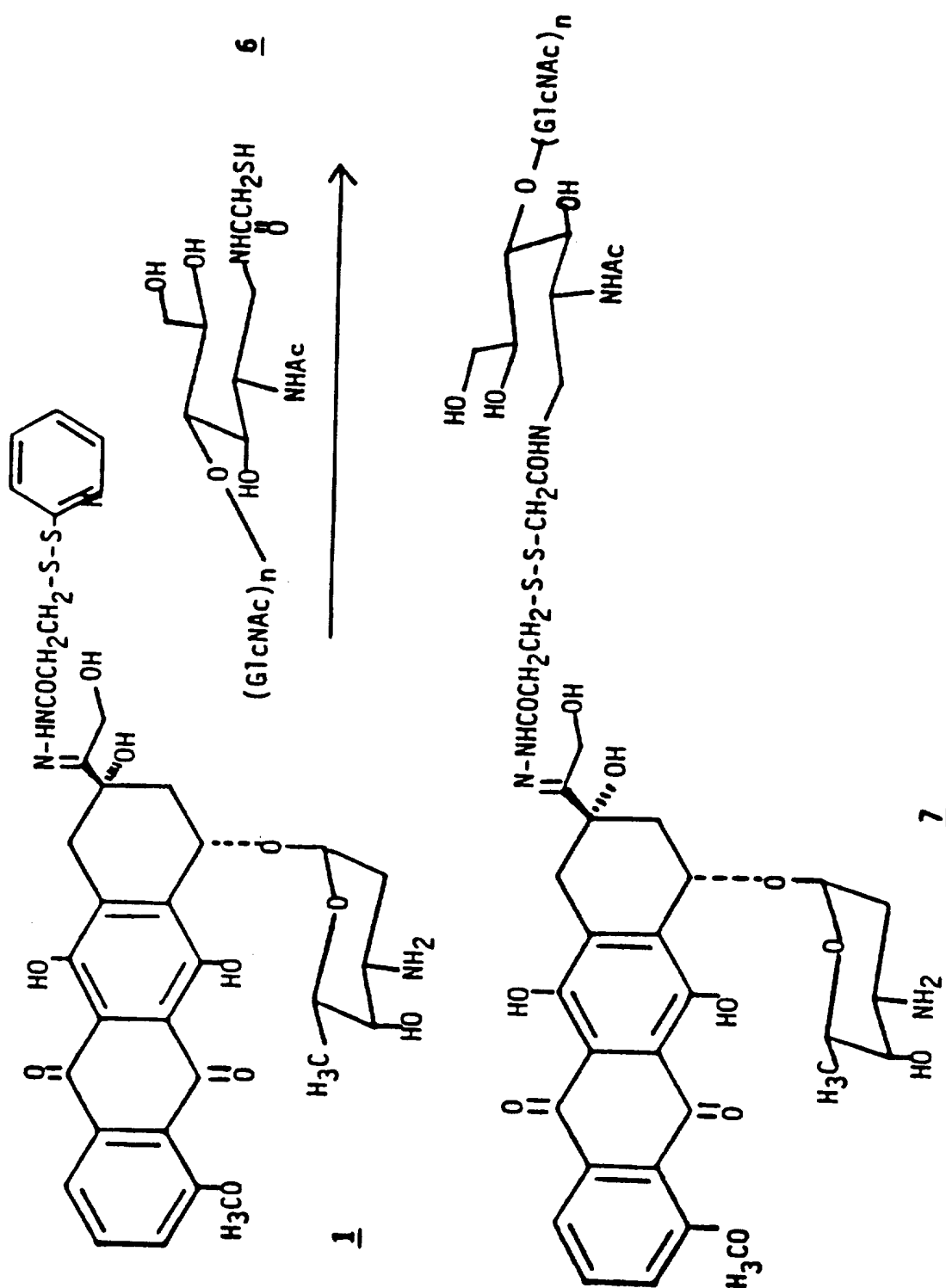
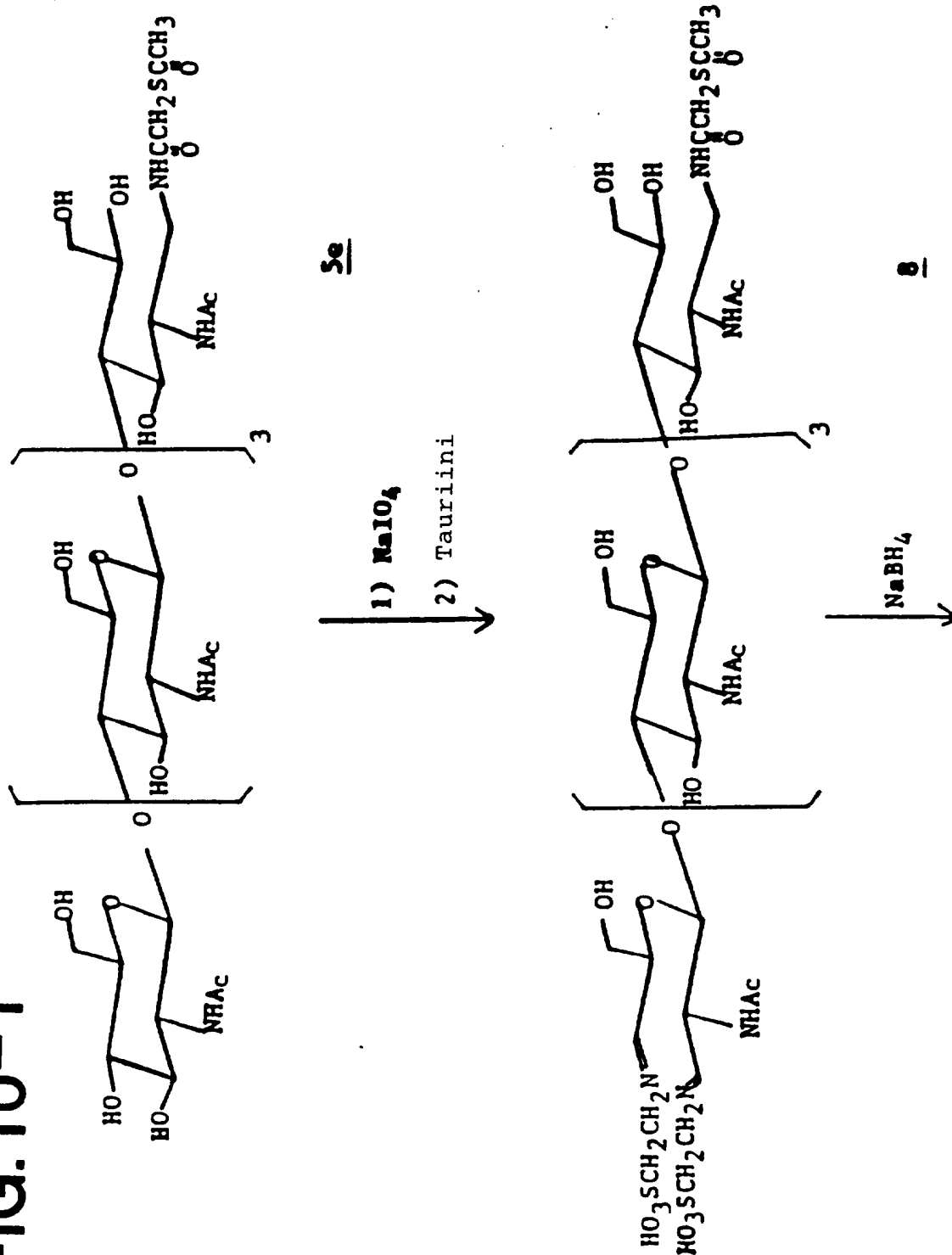


FIG.9

- a; $n=0$
 b; $n=1$
 c; $n=2$
 d; $n=3$
 e; $n=4$
 f; $n=5$
 g; $n=6$

FIG. 10-1



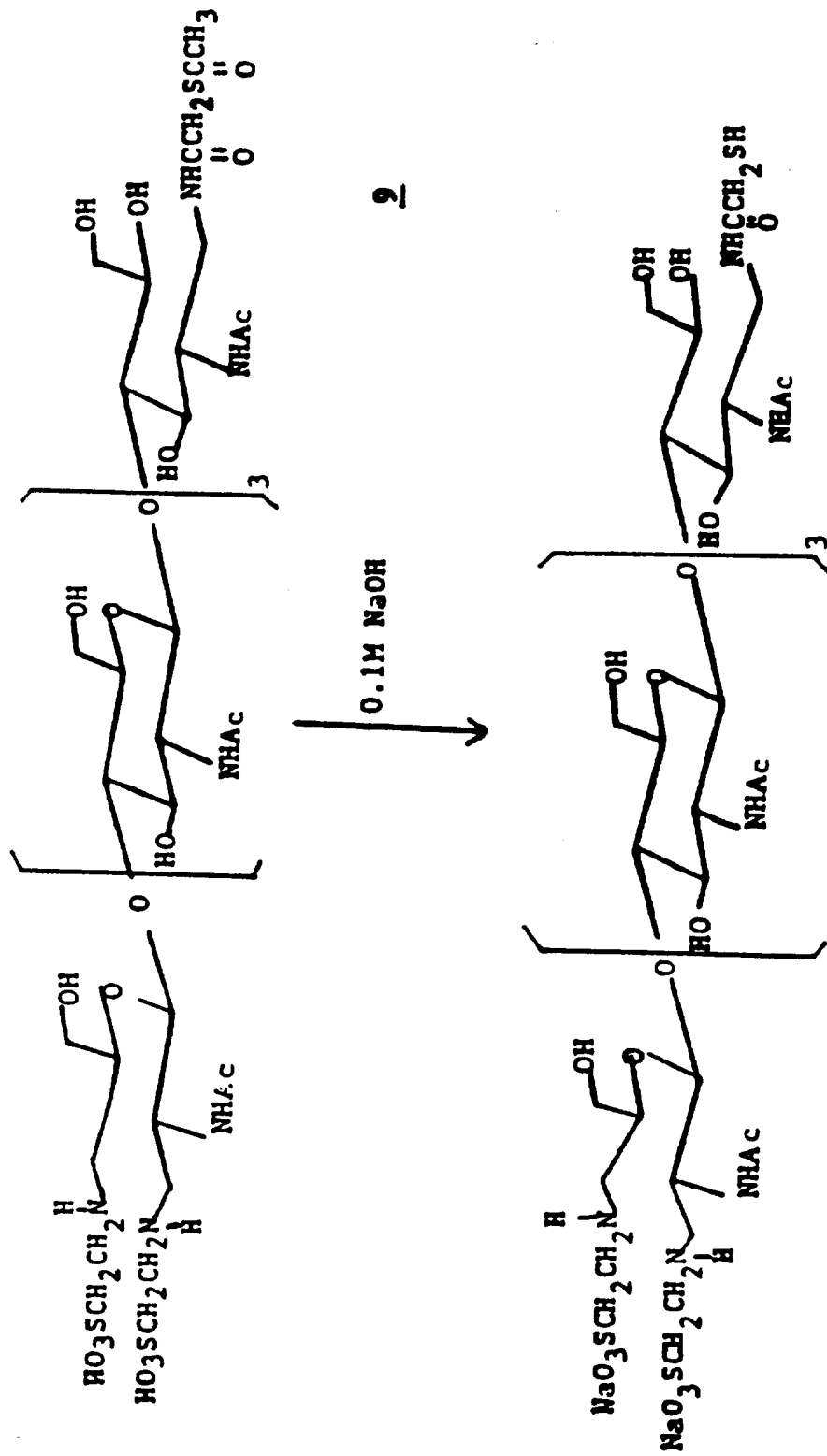
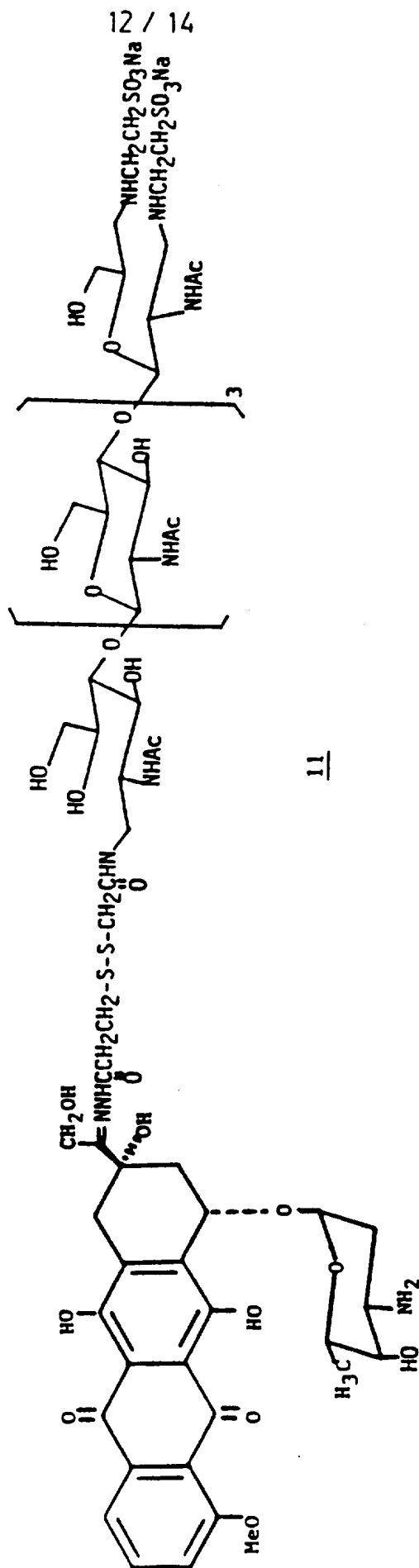


FIG.10-2

FIG. 11



11

FIG.12

Doksorubisiini A2780 vastaan

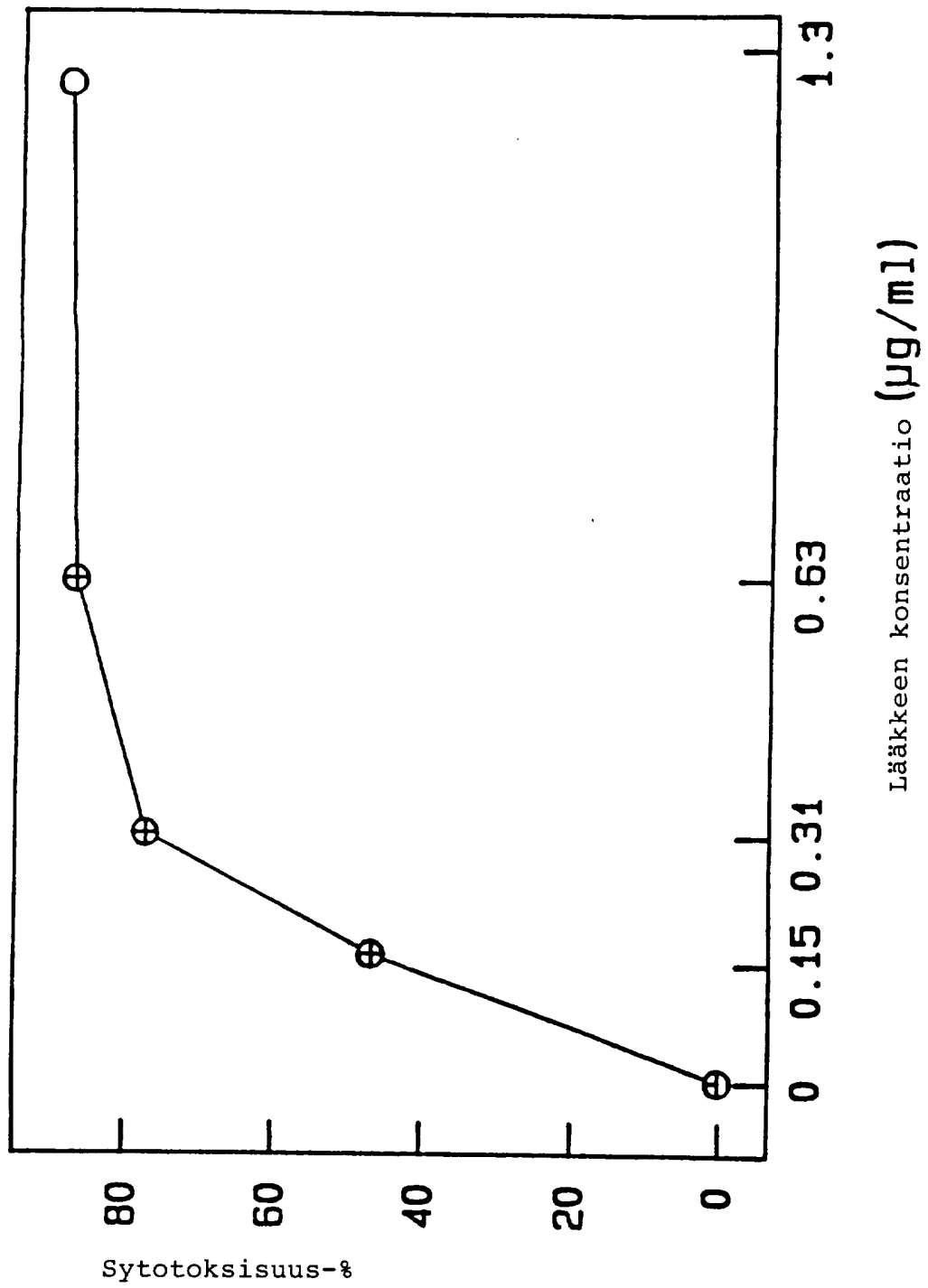


FIG.13 Esilääke A2780 vastaan

