

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 842420 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **842420**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07G

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **14.06.1984**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **14.06.1984**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **22.12.1984**

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

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

21.06.1983 US 506540

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • The Board of Regents the University of, 201 West 7th Street Austin, Texas, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Uhr, Jonathan William, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Vitetta, Ellen S., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Immunotoksiinikonjugaatteihin liittyviä parannuksia.

Immunotoxinkonjugater berörande förbättringar.

Immunotoksiinikonjugaatteihin liittyviä parannuksia

Tämä keksintö koskee immunotoksiinikonjugaatteja ja niiden käyttöä poistamaan valikoiden solukohderyhmä. Erikoisesti toksinin B-ketjuosa kytkettynä solun pintaan sitoutuvaan affiniteettisitoutujaan vahvistaa solumyrkkyvaikutusta, joka on solun pintaan sitoutuvaan affiniteettisitoutujaan kytketyllä toksinin A-ketjuosalla.

Risiini on yksi lukuisista kasviproteiineista, joka pieninä määrinä on huomattavan myrkyllinen eukaryoottisoluille. Risiini koostuu kahdesta glykoproteiini- ketjusta, jotka on yhdistetty toisiinsa kovalenttisesti yhdellä ainoalla disulfididisidoksella. Myrkyllisyys johtuu risiinin A-ketjusta, jonka näennäinen molekyylipaino on noin 30000, ja joka vaikuttaa entsymaattisesti ribosomien 60S-alayksiköihin aiheuttaen proteiinisynteesin palautumattoman estymisen [Olsnes et al., FEBS Lett 28 (1972), 48-50]. Risiinin B-ketju (näennäinen molekyylipaino 32000) toimii lektiininä, joka on spesifinen galaktoosille, ja sen tehtävänä on sitoa toksini solukettoon. [ks. esim. Baenziger et al., J. Biol. Chem. 254 (1979), 9795-9799].

Risiinin tai risiinin puhdistetun A-ketjun käyttö vasta-aineiden yhteydessä on ollut suuren kiinnostuksen kohteena mahdollisesti hyödyllisinä vaikuttaja-aineina syövän hoidossa. Vasta-ainerisiini- ja vasta-aine-A-ketjukonjugaatteja eli "immunotoksiineja" on käytetty useissa menetelmissä vaihtelevalla menestyksellä [ks. esim. Vitetta et al., Science 219 (1983), 644-650; Thorpe et al., Immunol. Rev. 62 (1982), 120-158; Neville et al., Immunol. Rev. 62 (1982), 75-91; ja Jansen et al., Immunol. Rev. 62 (1982), 185-216].

Menetelmät, joissa poistetaan valikoituja soluryhmiä risiinin A-ketju-vasta-ainekonjugaateilla, ovat hyvin tunnettuja. Valitut vasta-aineet reagoivat syöpäsolujen pinnalla tai normaalien imusolualaryhmien pinnalla olevien antigeenien kanssa. Poistamalla syöpäsoluja voidaan vä-

hentää esim. syöpäkuormitusta in vivo [Krolick et al., J. Exp. Med. 155 (1982), 1797-7] ja poistaa syöpäsoluja luuytimeistä autologista luuydinsiirtoa varten [Thorpe et al., Nature (London) 271 (1978), 752; ja Krolick et al., Nature (London) 295 (1982), 604].

Eliminoimalla normaaleja imusolualaryhmiä voidaan myös kyetä säätelemään immuunivastetta "ylöspäin" tai "alaspäin". Immunotoksiinien etu on, että ne ovat erittäin spesifisiä kohdesolulle ja että pienet annokset voivat eliminoida ei-toivottuja soluja. Risiinin A-ketju-vasta-ainekonjugaatteja on käytetty pääasiallisesti poistamaan normaaleja B-soluja ja kasvain-B-soluja, sekä in vivo että in vitro. Eräät laboratoriot ovat myös käyttäneet risiinin A-ketjun ja monoklonaalisen vasta-aineen konjugaatteja eliminoidaan T-solualkuperää olevia kasvain-soluja ja monia muita syöpäsoluja.

Risiinin A-ketju-vasta-ainekonjugaatit eivät kuitenkaan tehoa eräisiin määrättyihin syöpäsolutyyppeihin (esim. eräisiin T-solusyöpiin) [Neville et al., Immunol. Rev. 62 (1982), 75; ja Thorpe et al., Immunol. Rev. 62 (1982), 119].

Sensijaan immunotoksiinit, jotka on kytketty koko risiinitoksiiniin, ovat paljon tehokkaampia soluja tuhoavia aineita. Valitettavasti risiini B:n galaktoosin sitomiskohdan läsnäolo ehjässä risiinissä estää sen käytön in vivo, koska kohdesoluspesifisyys tällöin puuttuu. Yritykset päästä risiinin sisältävien immunotoksiinien epäspesifisyydestä sulkemalla galaktoosin sitomiskohta jatkuvat; niiden käyttöä in vivo ei kuitenkaan ole vielä kuvattu.

Toiset ovat kuvanneet tutkimuksia, joissa risiinin A-ketju-vasta-ainekonjugaatteja voidaan tehostaa lisäämällä vapaata B-ketjua soluviljelmiin (Neville et al., supra). Tutkijat ovat siksi oletaneet, että risiinin B-ketjulla on kaksi tehtävää: (1) helpottaa risiinin

pääsyä soluun galaktoosinsitomiskyvyn avulla, ja (2) mahdollistaa A-ketjun nopea pääsy solulimaan, ehkä muodostamalla aukko endosyyttirakkulan kalvoon.

5 Tuoreessa julkaisemattomassa tutkimuksessa on todettu, että ruiskuttamalla hiiriin myrkytöntä risiinin A-ketjua ja ruiskuttamalla sen jälkeen 4-8 tuntia myöhemmin myrkytöntä risiinin B-ketjua, aiheutetaan risiinistä johtuva kuolema. Tämä tapahtuu luultavasti siten, että ehjä risiinimolekyylä muodostuu uudelleen seerumissa tai veren solujen pinnalla. Tästä syystä uskotaan, 10 että risiinin B-ketju tehostaa aktiivisesti risiinin A-ketjun myrkkövaikutusta.

Tämä keksintö käsittää valmisteita ja menetelmän, joiden avulla voidaan tehostaa solun pintaan sitoutuvan 15 aineen ja toksiinin muodostamien konjugaattien soluja tuhoavaa vaikutusta säilyttäen samalla kohdesoluspesifisyys. Tämän keksinnön mukaisesti saatavat valmisteet sisältävät selektiivisen sitoutujan kytkettynä toksiinin B-ketjuosaan.

Edelleen keksinnön mukaisesti saadaan valmiste, joka 20 sisältää yhdistelmänä ensimmäisen konjugaatin, jossa selektiivinen sitoutuja-aine on kytketty toksiinin B-ketjuosaan, ja toisen konjugaatin, jossa solun pintaan sitoutuva aine on kytketty toksiinin A-ketju-osaan. Ensimmäisen konjugaatin selektiivinen sitoutuja-aine voi olla joko solun pintaan sitoutuja tai sitoutuja, joka on spesifinen 25 toisen konjugaatin solun pintaan sitoutujalle.

Toisaalta keksinnön mukaisesti saadaan konjugaatti, jossa vasta-aine toimii risiinin B-ketjuosaan kytkettynä solun pintaan sitoutujana. Edelleen keksinnön mukaisesti 30 saadaan valmiste, joka sisältää yhdistelmänä ensimmäisen konjugaatin, jossa vasta-aine on kytketty risiinin B-ketju-osaan, yhdessä toisen konjugaatin kanssa, jossa vasta-aine on kytketty risiinin A-ketjuosaan.

Toisaalta keksintö käsittää menetelmän kohdesolujen 35 eliminoimiseksi tällaisia kohdesoluja sisältävästä solujoukosta saattamalla solujoukko kosketuksiin ensimmäisen kon-

jugaatin kanssa, joka käsittää affiniteettisitoutujan, joka on spesifinen tällaisten kohdesolujen pinnalla olevalle antigeenideterminantille, ja joka on kytketty toksiinin B-ketjuosaan, ja toisen konjugaatin kanssa, joka käsittää solun pintaan sitoutuvan affiniteettisitoutujan, joka on spesifinen saman kohdesolun pinnalla olevalle eri determinantille, ja joka on kytketty toksiinin A-ketjuosaan. Tällaisten konjugaattien seos vahvistaa selektiivistä solun tuhoavaa vaikutusta, joka on sellaisella konjugaatilla, joka muodostuu ainoastaan toksiinin A-ketjuosaan kytketystä solun pintaan sitoutuvasta affiniteettisitoutujasta.

Lisäksi keksintö käsittää toksiinin B-ketjukonjugaatin valmistusmenetelmän, jossa toksiinin B-ketjuosa kytketään kovalenttisesti vasta-aineeseen.

Tämän keksinnön paras sovellutusmuoto käsittää konjugaatin, jossa vasta-aine on kytketty toksiinin B-ketjuosaan. Edelleen tämä keksintö käsittää menetelmän kohdesolujen eliminoimiseksi käyttämällä yhdistevalmistetta, johon sisältyy risiinin B-ketjuosan sisältävä ensimmäinen konjugaatti ja risiinin A-ketjuosan sisältävä toinen konjugaatti.

Risiini on yksi monista toksiiniproteiineista, jolla on pieninä määrinä huomattava soluja tuhoava vaikutus. Risiinitoksiini muodostuu kahdesta eri glykoproteiini-
 25 ketjusta, jotka ovat kovalenttisesti liittyneet toisiinsa yhdellä ainoalla disulfididoksella. Myrkyllisyys johtuu risiinin A-ketjusta (näennäinen molekyylipaino 30000) ja perustuu proteiinisynteesin palautumattomaan estymiseen. Risiinin B-ketju (näennäinen molekyylipaino 32000)
 30 toimii lektiininä, joka sitoutuu solun pinnalla oleviin galaktoosia sisältäviin glykoproteiineihin tai glykolipideihin. Risiinin yleisrakenne ja toimintatapa on ominainen monille kasvien toksiiniproteiineille kuten esim.
 35 abriinille, modekkiinille, kermesmarjan mitogeeniteki-
 jälle ja viskumiinille, ja bakteerien toksiiniproteiineil-

le kuten esim. kolera-, lämpöherkälle E coli-,
pertussis-, tetanus-, botulinus-, pseudomonas-,
shigella- ja difteriatoksiinille.

Tämän keksinnön mukaisissa menetelmissä käy-
5 tetyt risiinin B-ketjukonjugaatti ja risiinin A-ketju-
konjugaatti sisältävät kumpikin kaksi aktiivista osaa:
solun pintaan sitoutuvan tai muun selektiivisen sitou-
tuja-aineen ja toksiinin A- tai B-ketjuosan kovalentti-
10 sesti liitettyinä, edullisesti kytkentäaineen avulla. Kus-
sakin rakenteessa toinen aktiivista osista on molekyyli,
jolla on sitoutumisaffiniteetti kohdesolun johonkin pin-
tarakenteeseen tai sitoutumisaffiniteetti toksiinin A-
ketjukonjugaatin solun pintaan sitoutujaan. Tällaiset mo-
lekyyliet voivat tyypillisesti olla esim. hormoneja, kas-
15 vutekijöitä, lektiinejä tai vasta-aineita. Valitut mole-
kyyliet ovat vasta-aineita tai näiden osia (erityisesti
Fab-osia), joilla on kyky sitoutua solun pintaan.

Monoklonaaliset vasta-aineet ovat edullisia, mutta
ne eivät ole välttämättömiä. Voidaan käyttää seerumin im-
20 munoglobuliinifraktioita, vaikkakin kohdespesifisyys on
tällöin astetta vähäisempi. Koska antiseerumin immunoglo-
buliinifraktio sisältää suuren määrän vasta-aineita, joi-
den kohteina on suuri joukko erilaisia antigeeneja, on
tämän keksinnön mukaisesti saatavien valmisteiden ja mää-
25 ritellyn kohdesolujen eliminointimenetelmän toimivuuden
kannalta välttämätöntä eristää haluttu kokoelma vasta-
aineita, joista kunkin kohteena on halutun kohdesolun
pinnalla esiintyvä antigeenideterminantti.

Tehokas kokoelma sellaisia vasta-aineita voidaan
30 saada antamalla immunoglobuliinifraktion kulkea pylvään
läpi, joka sisältää kysymyksessä olevaa antigeenia kemial-
lisesti kytkettynä matriisiin. Antigeenille spesifiset
vasta-aineet sitoutuvat pylvääseen, kun taas muut immunoglo-
buliinit kulkeutuvat pylvään läpi. Sitoutuneet vasta-aineet
35 voidaan sitten saada talteen eluoimalla ne pylväästä käyt-
tämien sopivia eluointiaineita kuten kaotrooppisten aineiden

happamia puskuriliuoksia. Tulisi huomata, ettei eristetty immunoglobuliini ole homogeenista, vaikka sen kohteena onkin yksi ainoa antigeeni. Se sisältää vasta-aineita, joiden kohteina on joukko antigeenimolekyylissä sijaitsevia antigeenideterminantteja. Tästä johtuen on mahdollista, että tapahtuu ristiinreagointia toisten läheisesti samanlaisten antigeenien kanssa.

Tästä syystä on erittäin suositeltavaa käyttää monoklonaalisia vasta-aineita valmistettaessa tämän keksinnön mukaisia valmisteita, sillä näiden vasta-aineiden kohteena on ainoastaan yksi mahdollisesti monista antigeenisä esiintyvistä antigeenideterminanteista. Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan saada tunnetuilla menetelmillä hybridoomista, jotka ovat peräisin pernassa tai muissa elimissä esiintyvistä imusoluista.

Lisäksi monoklonaalisten vasta-aineiden käyttö tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävissä valmisteissa lisää selektiivisyyttä, mikä on erittäin toivottavaa. Tästä syystä on erittäin suositeltavaa, että sekä risiinin B-ketjukonjugaatti että risiinin A-ketjukonjugaatti sisältää monoklonaalisen vasta-aineen. Tämä takaa erittäin suuren kohdesoluspesifisyyden.

Yllä on viitattu tämän keksinnön yhteen puoleen, saman solun pintaan sitoutuvan affiniteettisitoutujan käyttöön valmistettaessa sekä risiinin A-ketjukonjugaattia että risiinin B-ketjukonjugaattia. Kuitenkin on mahdollista päästä suurempaan spesifisyyteen. Koska normaalin tai kasvainsolun pinnalla on useita pintamarkkereita, voidaan risiinin A- ja risiinin B-ketjut kohdistaa sellaisiin soluihin kytkemällä niistä kumpikin vasta-aineeseen, joiden kohteena on eri determinantti saman solun pinnalla. Esimerkiksi kasvain B-solun tapauksessa, jonka pinnalla on sekä pinta-Ia (sIa) että pinta-Ig (sIg), voidaan valmistaa immunotoksiineja sIa- ja sIg-idiotyyppiä vastaan käyttäen vastaavasti risiinin B-ketjua ja risiinin A-ketjua. Mitä tulee T-solusyöpiin, on olemassa joukko monoklonaalisia vasta-aineita, jotka reagoivat ihmisen T-solualala-

ryhmien kanssa. Käyttämällä valikoituja vasta-aineyhdistelmiä voidaan kohdistaa risiinin A- ja risiinin B-ketjut tällaisten solujen määrättyihin alaryhmiin. Suositeltavinta olisi, että toinen vasta-aine (kytkettynä risiinin A-ketjuun) määräisi alaryhmän, ja toisen (kytkettynä risiinin B-ketjuun) kohteena olisi yleisempi markkeri, joka olisi yhteinen monille solujen alaryhmille. B-ketjuimmunotoksiini, jonka kohteena olisi tavallisempi markkeri, sitoutuisi myös normaaleihin soluihin; nämä eivät kuitenkaan eliminoituisi. Sen sijaan A-ketju-immunotoksiini kohdistuisi ainostaan syöpäsoluun ja sen vaikutusta tehostaisi B-ketjun sisältävä immunotoksiini.

Eräs toinen tähän keksintöön sisältyvä mahdollisuus on kohdistaa ensin syöpäsolun kanssa reagoiva vasta-ainerisiinin A-ketjukonjugaatti syöpäsoluihin in vivo. Vasta-aine on mieluummin univalentti, esim. $F(ab')_1-A$, eikä siten kykene aiheuttamaan cap-ilmiötä eikä modulaatiota. Sen jälkeen kun vasta-aine-risiini-A-konjugaatti on ruiskutettu syöpää sairastavaan potilaaseen ja ylimäärä on poistunut vastaanottajasta joko erittymällä tai hajoitumalla, ruiskutetaan risiinin B-ketjun sisältävää immunotoksiinia, jonka kohteena on risiini-A-konjugaatin vasta-aine. Ainoastaan ne solut, jotka olisivat sitoneet ensimmäisen immunotoksiinin, sitoisivat toisen immunotoksiinin ensimmäiseen. Siten tällaiset solut eliminoituisivat selektiivisesti. Toinen immunotoksiini on mieluummin divalentti vasta-aineen vasta-aine kuten esim. $F(ab')_2-B$, joka ei sitoutuisi makrofageihin, monosyytteihin eikä muihin soluihin, joiden pinnalla on Fc-reseptoreita. Lisäksi koska B-ketjun sisältävä immunotoksiini olisi vaaraton sitoutuneena epäspesifisesti soluun, joka ei olisi aikaisemmin sitonut ensimmäistä immunotoksiinia, ei esiintyisi toisen immunotoksiinin aiheuttamia sivuvaikutuksia. Sen sijaan solut, jotka sitoisivat kummatkin immunotoksiinit, tuhoutuisivat.

Kuten on todettu, tämän keksinnön mukainen risiinin B-ketjun sisältävä valmiste ja tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetty risiinin A-ketjun sisältävä valmiste kumpikin sisältävät vähintään kaksi erilaista aktiivista osaa, joista toiselle on ominaista sitoutumiskyky (BA) ja toinen on risiinin osa (RS), joko risiini A (RA) tai risiini B (RB). Nämä on liitetty toisiinsa kytkentäaineiden avulla, jolloin valmiilta yhdisteeltä vaaditaan a) vähintään yhden kumpaankin luokkaan kuuluvan komponentin mukanaolo, ja b) vähintään yhden kumpaankin luokkaan kuuluvan komponentin alkuperäisen aktiivisuuden säilyminen.

Muita toksiiniproteiineja voidaan vastaavasti kytkeä sitoutujakomponenttiin ja käyttää tämän keksinnön mukaisesti. Rakenteen ja vaikutustavan samankaltaisuuden takia voidaan käyttää sellaisia kasvi- ja bakteeritoksiiniproteiineja kuten abriini-, modekkiini-, kermes-marjamitogeenitekijä, viskumiini- ja kolera-, lämpöherkkä E. coli.-, pertussis-, tetanus-, botulinus-, pseudomonas-, shigella- ja difteriatoksiinia. Lisäksi voi olla edullista kytkeä esimerkiksi abriinin A-ketju solun pintaan sitoutuvaan komponenttiin keksinnön mukaiseksi ensimmäiseksi konjugaatiksi ja esimerkiksi viskumiinin B-ketju selektiiviseen sitojakomponenttiin toiseksi konjugaatiksi. Voi olla edullista käyttää sellaista kasviproteiinitoksiinia kuten geloniinia, joka muodostuu ainoastaan A-ketjusta, A-ketjuuna, joka kytketään solun pintaan sitoutuvaan komponenttiin muodostettaessa ensimmäistä konjugaattia. Tätä ensimmäistä konjugaattia voidaan sitten käyttää konjugaatin kanssa, joka sisältää selektiivisen sitojakomponentin kytkettynä B-ketjuun, joka on valittu mistä tahansa seuraavista toksiineista: risiini, viskumiini, modekkiini tai abriini.

Nämä rajoitukset huomioon ottaen tämän keksinnön mukaiset ja tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävät valmisteet voivat olla dimeerejä (BA-RS), so. voivat sisältää yhden kumppakin luokkaa olevan komponentin; trimerejä $\lfloor (BA_2-RS) \text{ tai } (BA-RS_2) \rfloor$, so. voivat sisältää

kaksi toista luokkaa olevaa komponenttia ja yhden toista luokkaa olevan; tetrameereja $\left[(BA_3-RS), (BA_2-RS_2), \text{ tai } (BA-RS_3) \right]$; ja vastaavia.

Kuten on todettu, soveltuvat tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä erityisen hyvin käytettäviksi sellaiset valmisteet, joissa sitoutujakomponentti on vastaaine tai antigeeniin sitoutuva vasta-aineen osa ja mieluummin monoklonaalinen vasta-aine tai sellaisen antigeeniin sitoutuva osa. Tyypillisiä valmisteita voivat olla Ab-RB, Ab₂-RB, Ab-RB₂, Ab₃-RB, Ab₂-RB₂, Ab-RB₃, Ab-RA, Ab₂-RA, Ab-RA₂, Ab₃-RA, Ab₂-RA₂ tai Ab-RA₃.

Valmistettaessa tämän keksinnön mukaisia valmisteita liitetään BA- ja RS-komponentit sopivalla kytkentäaineella. Suuri määrä kytkentäaineita on esitelty artikkelissa: Ghose T. ja Blair, A.H., J. Natl. Cancer Inst. 61, 657-676 (1980). Nämä tekijät esittävät karbodiimidien samoin kuin muiden bifunktionaalisten reagenssien kuten esim. glutaraldehydin, p-bentsokinonin, p,p'-difluori-m,m'-dinitrodifenyyli-sulfonin tai dimetyyliadipimidaatin käytön vasta-aineen kytkemisessä soluja tuhoaviin aineisiin. Koska on erittäin toivottavaa estää homopolymeerien, esim. (BA)_n tai (RS)_n, muodostuminen, on suositeltavaa käyttää heterobifunktionaalista reagenssia varmistuen näin sellaisten valmisteiden muodostuminen, joissa on vähintään yksi kumpaakin luokkaa oleva komponentti. Esimerkkejä sellaisista heterobifunktionaalisista reagensseista voivat olla N-sukkiini-imidyyli-3-(2-pyridyyli-ditio)propionaatti (SPDP), m-maleimidobentsoyyli-N-hydroksi-sukkiini-imidyyliesteri, bromiasetyyli-p-aminobentsoyyli-N-hydroksi-sukkiini-imidyyliesteri tai jodiasetyyli-N-hydroksi-sukkiini-imidyyliesteri.

Esimerkiksi käytettäessä SPDP:tä kytkentäaineena tämän keksinnön mukaisen valmisteen valmistusmenetelmässä a) modifioidaan erikseen sekä Ab että RS antamalla niiden reagoida SPDP:n kanssa, b) pelkistetään Ab-osan sisältävä

tuote, c) aiheutetaan valmisteen muodostuminen sekoittamalla Ab-osan ja RS-osan sisältävät tuotteet ja d) erotetaan reagoimattomat monomeerit geelisuodatuksen avulla.

5 Käytettäessä tämän keksinnön mukaisia risiini B:n sisältäviä konjugaatteja yhdessä risiini A-konjugaattien kanssa ne soveltuvat yleisesti sellaisen solutyypin spesifiseen ja selektiiviseen tuhoamiseen, jolle ovat tunnusomaisia erityiset antigeenimarkkerit. Valitsemalla sopiva antigeenimarkkeri voidaan solun pintaan sitoutuja kohdistaa joko normaaliin solujen määrättyyn ryhmään tai kasvainsolujen alaryhmään, jossa solujen pinnalla on erottava determinantti. Täten ne soveltuvat esimerkiksi syövän immunoterapiaan, parasiitti-infektioiden hoitoon ja lukuisten autoimmuunisairauksien hoitoon. Lisäksi valmisteet soveltuvat monenlaiseen in vitro-käyttöön, esimerkiksi leukemiasolujen eliminointiin luuytimeistä ennen autologista luuydinsiirtoa; T-solujen eliminointiin luuytimeistä ennen allogeenista luuydinsiirtoa; ja alkuperäisyyppien tuhoamiseen valittaessa mutantteja.

20 Tämän keksinnön mukaisia valmisteita voidaan käyttää monenlaisissa farmaseuttisissa valmisteissa ja ne voidaan antaa monilla tavanomaisilla menetelmillä kuten esimerkiksi lihakseen, suoneen, ihon alle ja vatsaontelon sisään. Käytettävä termi "farmaseuttiseen käyttöön soveltuva" tarkoittaa aineita, jotka soveltuvat käytettäväksi lämmänveristen eläinten kemiallisessa hoidossa.

30 Annettaessa konjugaattivalmisteita ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti tai vatsaontelon sisään voivat farmaseuttiseen käyttöön soveltuvat ruiskemuodot olla steriilejä vesiliuoksia tai dispersioita ja steriilejä jauheita, joista tehdään steriilejä ruiskutettavia liuoksia tai dispersioita. Kantajana voi olla liuotin tai dispergoiva väliaine, joka sisältää esim. vettä, etanolia, polyolia, (esim. glyserolia, propeeniglykolia tai neste-

35 mäistä polyeteeniglykolia), näiden sopivia seoksia ja kasviöljyjä. Sopiva juoksevuus voidaan saavuttaa esimerkiksi käyttämällä päällystettä kuten lesitiiniä, pitämäl-

lä hiukkaskoko vaaditun suuruisena dispersioiden ollessa kysymyksessä ja käyttämällä pinta-aktiivisia aineita. Voidaan myös käyttää erilaisia bakteerienvastaisia ja sientenvastaisia aineita, esim. parabeeneja, klooributanolia, fenolia, sorbiinihappoa, ja vastaavia. Monissa tapauksissa on suositeltavaa käyttää isotoonisia aineita, esim. sokereita, natriumkloridia, ja vastaavia. Ruiskutettavan farmaseuttisen valmisteen pitkittynyt imeytyminen voidaan aikaansaada käyttämällä imeytymistä hidastavia aineita, esim. alumiinimonostearaattia ja gelatiinia.

Steriilejä ruiskutettavia liuoksia voidaan valmistaa yhdistämällä aikaisemmin määritelty konjugaattivalmiste vaadittavassa määrässä sopivaa liuotinta minkä tahansa muun halutun aineosan kanssa.

Tehokkaamman leviämisen aikaansaamiseksi valmisteet voidaan haluttaessa sisällyttää hitaasti vapauttaviin valmisteisiin kuten polymeerimatriiseihin, liposomeihin ja mikropallosiin. Lisäksi valmisteet voidaan antaa joko yksin tai seoksessa, joka sisältää useita aktiivisia aineosia.

Valmisteannoksia annetaan vastaanottajalle niin kauan kuin toivotaan hoitavaa vaikutusta. Vastaanottajan paino ja antamistapa määräävät annoskoon, joka tarvitaan aiheuttamaan haluttu vaikutus.

Erityisen edullista on formuloida konjugaattivalmisteet yksikköannosmuotoon antamisen helpottamiseksi ja annostuksen yhdenmukaistamiseksi. Yksikköannosmuodolla tarkoitetaan fysikaalisesti erillistä yksikköä, joka soveltuu jakamattomiksi annoksiksi hoidettavalle henkilölle. Jokainen yksikkö sisältää valmistetta ennalta määrätyn määrän, joka on laskettu tuottamaan haluttu hoitovaikutus, yhdessä farmaseuttiseen käyttöön soveltuvan kantajan kanssa. Määrättyyn yksikköannosmuotoon vaikuttavat a) kysymyksessä olevan valmisteen erityisominaisuudet ja b) hoitovaikutus, johon kulloinkin pyritään.

Seuraavat esimerkit on tarkoitettu kuvaamaan keksintöä, mutta ei rajoittamaan sitä.

I. Immunotoksiinien valmistus

A. Risiinin A- ja B-ketju

5 Risiinin A- ja B-ketjuosat hankittiin yhtymältä Xoma Corporation, San Francisco, California. Ennen käyttöä A- ja B-ketjuja dialysoitiin perusteellisesti 4°C:ssa fosfaatilla puskuroitua fysiologista suolaliuosta (PBS), pH 7,2, vastaan. A- ja B-ketjun takaisinsaanto oli 50 %
10 ja 80 %, vastaavasti.

B. Vasta-aine

Tämän sovellutuksen selektiivinen ja solun pintaan sitoutuva sitoutujakomponentti on affiniteettipuhdistettu kaniinin antihumaani-immunoglobuliini (R_hHIg), joka on valmistettu kirjallisuudessa kuvatulla menetelmällä [kts.
15 esim. Muirhead et al., Blood, 42, 327 (1983); Vitetta et al., Science, 219, 644 (1983)].

C. Konjugointi

Lisättiin 10 µl 60 mM ditiotreitolia (DTT) PBS-liuoksessa mg:a kohti dialysoitua A- tai B-ketjua. Seoksia inkuboitettiin 25°C:ssa 60 minuutin ajan ja pelkistetyt ketjut erotettiin DTT:stä geelisuodatuksen avulla 25°C:ssa käyttäen Sephadex G-25-pylvästä (18 x 1,5 cm) PBS-liuoksessa, jonka pH oli 7,2. Vasta-aineet kytkettiin kuten on kuvattu julkaisuissa: Vitetta et al., Immunol. Rev. 62, 159-183 (1982),
25 ja Carlsson et al., Biochem. J., 173, 723 (1978), jotka liitetään mukaan viitteinä. Tarkemmin kuvattuna, PBS-liuoksessa olevaa vasta-ainetta käsitellään SPDP:llä, N-sukkiiniimidyyli-3-(2-pyridyyli)ditiopropionaatilla pH:ssa noin
30 7,0 - 7,5 lämpötilassa noin 20°C - noin 25°C. Vasta-ainejohdannaista käsitellään sitten ditiotreitolilla puskuriliuoksessa. Tioloitu vasta-aine voidaan haluttaessa puhdistaa geelisuodatuksen avulla. Aktivoidut kytketyt vasta-aineet sekoitettiin juuri pelkistettyjen A- tai B-ketjujen kanssa
35 vasta-aine: A-ketju- tai vasta-aine:B-ketju-moolisuhteessa 5:1. Seosta inkuboitettiin 15 minuutin ajan 4°C:ssa ravistellen

varovasti ja dialysoitiin sitten yön yli PBS-liuosta vastaan 4°C:ssa. Immunotoksiinit konsentroidiin pitoisuuteen 1 mg/ml höyrystämällä välikalvon läpi, dialysoitiin 2-16 tunnin ajan 4°C:ssa PBS-liuosta vastaan ja

5 sentrifugoitiin liukenemattoman aineen poistamiseksi. Immunotoksiinin erottaminen suurimmasta osasta vapaita A-ketjuja, B-ketjuja ja vasta-aineita tapahtui geelisuodatuksen avulla 25°C:ssa käyttäen Sephacryl S-200-pylvästä, joka oli tasapainoitettu PBS-liuoksella, jonka

10 pH oli 7,2. Materiaali, jonka näennäinen molekyylipaino oli suurempi kuin 200000,, yhdistettiin. Lisättiin pelkistettyä ja alkyloitua naudan alfaglobuliinia, fraktiosta 4 (Sigma), yhdistettyihin näytteisiin siten, että lopullinen konsentraatio oli 1 mg/ml. Näytteitä säilytettiin 16-20 tuntia 4°C:ssa ennen affiniteettipuhdistusta.

R₁HIg-A-ketju- (R₁HIg-A-) ja R₁HIg-B-ketju- (R₁HIg-B-) immunotoksiinit puhdistettiin affiniteettikromatografian avulla käyttäen Sepharose-HIg-pylväitä.

20 A-ketjun sisältävien immunotoksiinien puhdistusta varten pylväät tasapainoitettiin ja pestiin PBS-liuoksella, jonka pH oli 7,2, ja B-ketjun sisältävien immunotoksiinien puhdistusta varten pylväät tasapainoitettiin ja pestiin PBS-liuoksella, jonka pH oli 7,6, ja joka sisälsi 0,1 M galaktoosia.

25 Näytteet lisättiin pylväisiin ja läpi mennyt neste heitettiin pois. Pylväitä pestiin perusteellisesti PBS-liuoksella (tai PBS-0,1M gal-liuoksella) ja sen jälkeen 0,85 % NaCl:lla. Immunotoksiinit eluoitiin ryhmänä 37°C:ssa

30 käyttäen 2-3 pylvään tilavuutta 3,5 M MgCl₂-liuosta MgCl₂ poistettiin dialysoimalla ja näytteet konsentroidiin höyrystämällä välikalvon läpi suurin piirtein pitoisuuteen 200 - 300 µg/ml. Pelkistettyä ja alkyloitua naudan alfaglobuliinia lisättiin siten, että lopullinen konsentraatio oli 1 mg/ml. Näytteet steriloidtiin suodattamalla (käyttäen suodatinta, joka oli kostutettu 2 % sikiö-

35

vasikan seerumia (FCS) sisältävällä PBS-liuoksella) ja ne jaettiin sitten steriileihin astioihin ja säilytettiin -20°C :ssa. Tällä tavoin säilytetyt näytteet säilyivät muuttumattomina 4-6 kuukauden ajan.

5 Immunotoksiinin saanto affiniteettipuhdistuksen jälkeen oli 26-45 % ja jokainen immunotoksiini sisälsi yksi tai kaksi A- (tai B-) ketjukomponenttia yhä vastaainemolekyyliä kohti. Analysoitaessa immunotoksiineja SDS-PAGE-geelilevyillä käyttäen herkkää hopeavärjäystek-
10 niikkaa, ei havaittu vapaata A- eikä B-ketjua missään immunotoksiinissa.

II. Risiin B-ketjun sisältävien konjugaattien ja risiinin A-ketjukonjugaattien käyttö neoplastisten ihmisen B-solujen tuhoamiseen

15 A. Kasvainsoluviljelmä

Ihmisen Burkittin lymfooman solukantaa, Daudi, jollainen on kuvattu julkaisussa: Houston, L.L., Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 319-326 (1980), ylläpidettiin suspensioviljelmänä RPMI-1640:ssä, joka sisälsi lisäksi
20 10 % (v/v) sikiövasikan seerumia (FCS), 20 mM tuoretta glutamiinia ja antibiootteja. Viljelmiä säilytettiin 37°C :ssa kosteassa inkubaattorissa 95 % O_2 /5 % CO_2 -ilmakehässä. Kaikki viljelmät käytettiin kaksi päivää siirrostamisen jälkeen.

25 B. Daudi-solujen käsittely

Kaksi päivää siirrostamisen jälkeen Daudi-solut koottiin ja pestiin puskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella (BSS). Mikrotitrausastioihin siirrettiin kuhunkin 10^5 solua BSS-liuoksessa.

30 Kummankin immunotoksiinin, R α HIg-A:n ja R α HIg-B:n, tai näiden yhdistelmän laimennoksia lisättiin kulloinkin kolmeen rinnakkaiseen soluastiaan ja seisotettiin 15 minuuttia 4°C :ssa. Solut sentrifugoitiin ja pestiin kolme kertaa BSS-liuoksella. Kuhunkin soluastiaan lisättiin
35 200 μl RPMI:tä, josta puuttui leusiini, ja joka sisälsi

10 % FCS:ä, ja solut suspendoitiin uudelleen ravistelemalla kevyesti. Solususpensioita inkuboitiin 22 tunnin ajan 37°C:ssa 5 % CO₂-inkubaattorissa. Solujen annettiin sitten olla 6 tuntia 37°C:ssa 5 % CO₂:ssa kosketuksissa ³H-leusiinin kanssa (New England Nuclear), jota lisättiin 5 µCi astiaa kohden. Solut koottiin pyöreille lasikuitulevyille ja laskettiin nestetuikespektrometrissä. Soluja oli käsitelty erikseen kummallakin immuntoksiinilla sekä seuraavilla immuntoksiiniyhdistelmillä:

1. Soluille vaaraton määrä R_αHlg-A:ta (0,3 µg/mg) ja eri määriä R Hlg-B:tä tai
2. Soluille vaaraton määrä R_αHlg-B:tä (0,5 µg/ml) ja eri määriä R_αHlg-A:ta.

15 Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Käsittelyn jälkeen jäljellä oleva solumäärä prosentteina kontrollin solumäärästä

20	<u>Käytetyt konjugaatit</u>	<u>Konsentraatio (µg/ml)</u>					
		<u>0,03</u>	<u>0,05</u>	<u>0,3</u>	<u>0,5</u>	<u>1,3</u>	<u>2,6</u>
	ITB*	83	90	100	100	90	82
	ITA**	100	90	82	-	22	18
	ITA + ITB (0,5 µg/ml)	75	40	12	-	6	5
25	ITB + ITA (0,3 µg/ml)	95	64	50	-	20	10

* ITB = immuntoksiini-B-konjugaatti (R_αHlg-B)

** ITA = immuntoksiini-A-konjugaatti (R_αHlg-A)

Kuten taulukosta näkyy, havaittiin vähän tuhoavaa vaikutusta, kun Daudi-soluja käsiteltiin 0,3 µg:lla R Hlg-A-ketjua/10⁵ solua. Mikään konsentraatio R Hlg-B:tä ei ollut myrkyllinen. Kuitenkin kun 0,3 µg R Hlg-A:ta sekoitettiin eri määrien kanssa R_αHlg-B:tä, oli soluja tuhoava vaikutus huomattava. Huomattakoon, että tämä Daudi-solujen käsittely immuntoksiinien seoksella suoritettiin BSS-liuoksessa, josta puuttui galaktoosi. Kuten taulukosta 1 näkyy, ei havaittu tuhoavaa vaikutusta, kun Daudi-soluja kä-

5 siteltiin 0,5 μ g:lla R χ Hlg-B:tä. Sitä vastoin R χ Hlg-A tappoi Daudi-soluja suhteessa annoksen suuruuteen. Kuitenkin solujen käsittely 0,5 μ g:lla R χ Hlg-B:tä, johon oli sekoitettu R χ Hlg-A:ta, tuhosi soluja niissäkin konsentraatioissa, joissa R χ Hlg-A itse ei vaikuttanut tuhoavasti.

Vaikkakin konjugaattivalmisteista ja menetelmistä on kuvattu suositeltavimmat muodot, alan ansiantuntijat käsittävät, että voidaan tehdä erilaisia muutoksia poikkeamatta keksinnön piiristä.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä toksiinin B-ketjkonjugaatin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että vasta-aine
5 kytketään kovalenttisesti toksiinin B-ketjuosaan.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä konjugaatin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että vasta-aine on spesifinen solun pinta-antigeenille.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä
10 konjugaatin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että vasta-aineen kohteena on syöpäsolun pinta-antigeeni.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä konjugaatin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että vasta-aineen kohteena on toinen vasta-aine.
- 15 5. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen menetelmä konjugaatin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että toksiinin B-ketju on joko risiinin B-ketju, modekkii-
nin B-ketju, abriinin B-ketju, kermesmarjan mitogeeniteki-
jän B-ketju, viskumiinin B-ketju, koleratoksiinin B-ketju,
20 E. colin lämpöherkän toksiinin B-ketju, pertussistoksiinin B-ketju, botulinustoksiinin B-ketju, Pseudomonas-toksiinin B-ketju, shigellatoksiinin B-ketju tai difteriatoksiinin B-ketju.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä konjugaatin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että toksiinin B-ketju on risiinin B-ketju.
7. Menetelmä soluja tuhoavan valmisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukainen ensimmäinen konjugaatti yhdistetään toiseen konjugaattiin, joka sisältää vasta-aineen, joka on kovalenttisesti kytketty toksiinin A-ketjuosaan.
- 30 8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä soluja tuhoavan valmisteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että jälkimmäisen konjugaatin vasta-aineen
35 kohteena on solun pinnan antigeenideterminantti.

9. Patenttivaatimuksen 7 tai 8 mukainen menetelmä, soluja tuhoavan valmisteiden valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että kumpikin vasta-aine on spesifinen syöpäsolun antigeenideterminantille.

5 10. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä solu-
ja tuhoavan valmisteiden valmistamiseksi, t u n n e t t u
siitä, että jälkimmäinen konjugaatti sisältää vasta-ai-
neen, joka on spesifinen solun pinnan antigeenideterminan-
tille, ja ensimmäinen konjugaatti sisältää vasta-aineen,
10 joka on spesifinen jälkimmäisen konjugaatin vasta-aineelle.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av ett kedjekonjugat av toxin B, k ä n n e t e c k n a t därav, att
5 en antikropp kovalent binds vid en kedjedel av toxin B.

2. Förfarande för framställning av ett konjugat enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att antikroppen är specifik för en cellyt antigen.

3. Förfarande för framställning av ett konjugat
10 enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att antikroppen är riktad mot en cellyt antigen av en tumörcell.

4. Förfarande för framställning av ett konjugat enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav,
15 att antikroppen är riktad mot en andra antikropp.

5. Förfarande för framställning av ett konjugat enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att kedjan av toxin B valts bland kedjor av ricin B, modeccin B, abrin B, phytolacca-mitogenfaktor B, viscumin B, koleratoxin B, värmelabilt E. coli-
20 toxin B, pertussistoxin B, botulinumtoxin B, Pseudomonastoxin B, shigellatoxin B, eller diphteriatoxin B.

6. Förfarande för framställning av ett konjugat enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav,
25 att kedjan av toxin B är kedja av ricin B.

7. Förfarande för framställning av en cytotoxisk komposition, k ä n n e t e c k n a t därav, att man med ett första konjugat enligt något av patentkraven 1-6 förenar ett andra konjugat, vilket omfattar en antikropp
30 som kovalent kopplats till en kedjedel av toxin A.

8. Förfarande för framställning av en cytotoxisk komposition enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att den andra konjugatantikroppen är riktad mot en cellyta-antigen-determinant.

9. Förfarande för framställning av en cytotoxisk komposition enligt patentkravet 7 eller 8, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att vardera antikroppen är speci-

fik för en tumörcell-antigendeterminant.

5 10. Förfarande för framställning av en cytotoxisk komposition enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k-
n a t därav, att det andra konjugatet omfattar en antikropp, vilken är specifik en cellyta-antigendeterminant och att det första konjugatet omfattar en antikropp, vilken är specifik för det andra konjugatets antikropp.

10