

3462 / sc

15893

A

63.182/SZE

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

K I V O N A T

77529

Pegilező reagensek, és az azokkal képzett vegyületek

Amgen Boulder Inc., BOULDER, Colorado, US

Shearwater Polymers Inc., HUNTSVILLE, Alabama, US

A bejelentés napja: 1995. 06. 14.

Elsőbbsége: 1994. 06. 14. (08/259,413) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US95/07555

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/34326

A találmány tárgya biológiailag aktív konjugátum, melyet az jellemez, hogy egy biológiailag aktív molekulát tartalmaz, amely lehet IL-1 inhibitor, tumor necrosis faktor (TNF) inhibitor, CR1, PDGF receptor, IL-2 vagy PDGF 6 exon peptid, ahol a biológiailag aktív molekula reaktív tiolcsoportot tartalmaz, és valamely nem peptid polimer, amely aktív szulfoncsoportot tartalmaz, amely a fenti tiolcsoporttal kapcsolást hoz létre, és a nem peptid polimer kívánt esetben az aktív szulfoncsoporton kívül reaktív NHS-észter-csoportot is tartalmaz.

Jel. szám: —

1013 13



3442/j6

15893

A

63.182/SZE

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

Pegilező reagensek, és az azokkal képzett vegyületek

Amgen Boulder Inc., BOULDER, Colorado, US

Shearwater Polymers Inc., HUNTSVILLE, Alabama, US

Feltalálók: Tadahiko KOHNO, LOUISVILLE, Colorado, US

Dave KACHENSKY, BOULDER, Colorado, US

Milton HARRIS, HUNTSVILLE, Alabama, US

A bejelentés napja: 1995. 06. 14.

Elsőbbsége: 1994. 06. 14. (08/259,413) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US95/07555

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/34326

A találmány tárgya polietilén-glikol és hasonló hidrofil polimerek aktív származékai, valamint ezek előállítási eljárása, továbbá alkalmazása felületek és molekulák jellemzőinek megváltoztatására. A találmány tárgya továbbá polipepti-

dek, amelyek a fenti aktív származékokhoz kovalens kötéssel kötöttek, továbbá eljárás ilyen vegyületek előállítására.

A polietilén-glikolt ("PEG") vizsgálták gyógyszerekben történő felhasználás céljából, amely gyógyszerkészítmény lehet mesterséges beültetett (implant) készítmény vagy egyéb alkalmazás, ahol a biokompatibilitás igen jelentős szerepet játszik. Különböféle PEG-származékokat írtak le a szakirodalomban, amelyek olyan aktív helyekkel rendelkeznek, ami lehetővé teszi a PEG molekula kötését különböző gyógyszerekészítményekhez illetve implantumokhoz, továbbá molekulákhoz és általában felületekhez. Például leírtak PEG-származékokat, amelyek segítségével a PEG felületekhez köthető és így a nedvesítést, a statikus felépülést illetve a felülethez való más típusú vegyületek kötését, amely vegyületek lehetnek proteinek vagy protein maradékok, biztosítja.

A PEG-származékokról továbbá leírták, hogy egy affinitás megosztást biztosít például egy sejttömegből enzimek kinyerése esetében. Az affinitás megosztás esetében a PEG-származék olyan funkciós csoportot tartalmaz, amely a sejttömeg belsejében található enzimmel reverzibilis kötést képez. Ezt követően a PEG és az enzim konjugátumot a sejttömegből elválasztják, majd az enzimet a PEG-származéktól, amennyiben ez kívánatos elválasztják.

További példa, amikor PEG-származékokat kötnek valamely molekulához ("PEGilezés") és így valamely biológiailag aktív molekula klinikai alkalmazásával szembeni kifogásokat illetve problémákat kiküszöbölik. A WO 92/16221 számú közzétett PCT szabadalmi leírásban például leírták, hogy számos terápiásan hatásos protein a vér szérumban, igen rövid felezési időtartammal rendelkezik. A legtöbb esetben a proteinek a szérumból a veséken keresztül ürülnek ki. Ameny-

nyiben rendszeresen viszonylag nagy mennyiségű proteint, különösen a humán testre illetve szervezet számára idegen proteineket adagolnak a betegnek, ez más problémák mellett immunogén reakciókat okozhat, mivel a protein kiürülése a szervezetből immun komplexek révén történik. Egyéb proteinek esetében oldhatósági és aggregációs problémák jelentkeztek, amelyek megakadályozták a protein optimális adagolását.

A PEGilezés segítségével a véráramból történő kiürülés csökken, mivel ez a reakció megnöveli a molekula látszólagos molekulatömegét. Egy bizonyos méretig a proteinek glomeruláris szűrési sebessége fordítottan arányos a protein méretével. A PEGilezés segítségével történő kiürülés csökkenésének mértéke ebből eredően általában nem függ attól, hogy hány PEG csoportot kapcsoltak a fehérjéhez, hanem a megváltoztatott protein molekula teljes molekulatömegének függvénye. A csökkentett kiürülési sebesség a PEGilezett termék hatásosságának növekedéséhez vezet. Lásd például a Conforti és munkatársai, Pharm. Research Commun. vol. 19, pg. 287 (1987) és Katre és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. vol. 84, pg. 1487 (1987) közleményeket.

Ezen túlmenően a PEGilezés csökkentheti a protein aggregációt (Suzuki és munkatársai, Biochem. Biophys. Acta vol. 788, pg. 248 (1984)), megváltoztathatja a protein immunogenecitását (Abuchowski és munkatársai, J. Biol. Chem. vol. 252 pg. 3582 (1977)), továbbá növelheti a protein oldhatóságát, amint ezt a WO 92/16221 számú PCT közzétett szabadalmi bejelentésben leírták.

A proteinek PEGilezése néhány olyan problémát old meg, amelyek kiküszöbölhetők úgy, hogy PEG molekulát kapcsolnak felületekhez vagy molekulákhoz. A legtöbb PEGilező reagens a polipeptid elsőrendű szabad aminocsoport-

jaival reagál. A fenti szabad aminok legtöbbje epsilon-amino-csoport a lizin aminosav maradékban. A proteinek általában igen nagyszámú lizint tartalmaznak. Ebből eredően véletlenszerű kötődés jön létre több PEG molekulával és így a protein aktivitása állhat elő.

Ezen túlmenően amennyiben a PEGilezett proteint terápiás célra kívánják felhasználni a többszörös egyed keverék, amely abból ered, hogy nem specifikus PEGilezés történik, nehezzé teszi a termék reprodukálható előállítását illetve jellemzőinek megadását. Az ilyen nem specifikus PEGilezés esetében nehéz értékelni a terápiás hatást és a hatásosságot illetve nehéz megadni a dózisértéket. Az ilyen proteinek helyzet szelektív PEGilezése reprodukálhatóan módosított anyagokhoz vezethet és így a PEGilezés kívánt előnyeit alkalmazhatják anélkül, hogy az aktivitás csökkenése megtörténne.

Igény van arra is, hogy reprodukálhatóan állítsunk elő két vagy több kapcsolt bioaktív molekula komplexet vagy vegyületet. Bizonyos esetekben a multimer komplexek adagolása, amely komplexek egynél több biológiailag aktív polipeptidet vagy hatóanyagot tartalmaznak szinergetikusan előnyös hatáshoz vezethet. Például a két vagy több azonos kötött polipeptidet tartalmazó komplex az adott ligandummal vagy az aktív hellyel szemben jelentősen nagyobb aktivitást mutathat, mint a monomer polipeptid aktivitása. Más esetben a komplex, amely (1) bioaktív proteinnel jellemezhető, amely egy testben található adott receptoron fejti ki hatását és (2) egy molekulával jellemezhető, amely a komplexet ehhez a receptorhoz vezeti, igen előnyös tulajdonságokkal rendelkezhet.

Ugyancsak igény mutatkozott hidrolitikusan stabil aktivált polimerek iránt, amelyek olyan kötéseket képeznek, amely kötések hidrolitikusan stabilak, azaz

bizonyos esetekben a reaktív csoportot inaktívvá alakíthatják mielőtt a kívánt reakció megtörténik, amely reakció vizes közegben, mint például vérben vagy plazmában, igen rövid idő alatt megy végbe.

Például Zalipsky az 5,122,614 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben leírta, hogy az oxi-karbonil-N-dikarboximid funkciós csoporttal aktivált PEG molekulák vizes közegben bázikus körülmények alkalmazása mellett a polipeptid amin csoportjával uretán kötést képeznek. Az aktivált PEG-N-szukcinimid karbonátról leírták, hogy stabil hidrolízissel szemben ellenálló karbamid kötést képez aminocsoportokkal. Az aminocsoport bázikus pH értékek mellett, amely lehet körülbelül 8,0 - 9,5 közötti érték, reaktívabbnak mutatkozik és ez a reaktivitás élesen csökken az alacsonyabb pH értékek alkalmazásakor. A nem kapcsolt PEG-származék hidrolízise azonban ugyancsak igen nagymértékben megnövekszik a pH 8,0 - 9,5 érték mellett. Zalipsky úgy küszöbölte ki azt a problémát, hogy a nem kapcsolt PEG-származék reakció sebessége a vízzel nem növekedett, hogy a proteinhez történő kötésben felesleg mennyiségű PEG-származékot alkalmazott. Amennyiben felesleg mennyiségű PEG-származékot alkalmazott elegendő mennyiségű reaktív aminocsoport kapcsolása történt meg a PEG molekulához és ez mielőtt a PEG-származék hidrolizálódott volna és reaktivitását elvesztette volna már módosította a proteint.

A Zalipsky módszer alkalmas arra, hogy egy protein lizin frakciójának nem specifikus kötése a PEG-származékhoz megtörténhessen a PEG molekulán található aktív helyzetben. Amennyiben a PEG-származék hidrolízis sebessége jelentős, ez problémát okoz, mert nem teszi lehetővé, hogy a PEG molekula egynél

több aktív helyén megtörténjen a kötés mivel az egyszerű felesleg alkalmazása nem csökkenti a hidrolízis sebességét.

Például egy lineáris PEG alkalmazása esetében, amely mindkét végen aktív helyzetet tartalmaz, az egyik vég proteinnel kapcsolódhat, de a másik végen található reaktív helyzet vagy csoport vízzel reagálhat és így egy viszonylag nem nagy reaktivitású hidroxilcsoport képződik ahelyett, hogy a PEG molekula két protein csoporthoz kötődne. Hasonló probléma történhet amennyiben olyan reakciót kívánnal végrehajtani, amelynek során egy felülethez egy molekulát kötnek úgy, hogy PEG kötést alkalmaznak. Ebben az esetben megtörténhet, hogy a PEG először a felülethez kötődik vagy a molekulához kötődik, majd a PEG-származék ellenkező vége már nem aktív holott ennek a következő reakció számára aktívnek kell maradnia. Amennyiben a hidrolízis megtörténik az ellenkező molekulavég általában inaktiválódik.

A Zalipsky 5,122,614 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben, továbbá leírt számos más PEG-származékot, amelyek korábbi szabadalmi bejelentésekből származtak. Leírták, hogy a PEG-szukcinoil-N-hidroxil-szukcinimid észter észterkötéseket képez, azonban ezek a kötések vizes közegben nem túl stabilak. A PEG-cianuril-kloridról leírták, hogy toxikus és az adott funkciós csoportokkal a fehérjén nem specifikus reakciót okoz, amely a protein inaktiválásához vezethet. A PEG-fenil-karbonátról leírták, hogy toxikus hidrofób fenol-maradékokat eredményez, amely maradékok a proteinekhez affinitást mutatnak. A karbonil-diimidazollal aktivált PEG molekuláról leírták, hogy a protein funkciós csoportjaival túl lassan reagál és hosszú reakcióidőt igényel ahhoz, hogy a protein megfelelő módosítását elérjék.

Egyéb PEG-származékokat is leírtak, amelyek nem a lizin epsilon-amino-csoportjához kötődik. A maleimidről például leírták, hogy a cisztein szulfhidril-csoportjával specifikus reakcióba lép, azonban a maleimid funkciós csoport hidrolízist szenved.

A fentiek alapján igény merül fel olyan reagensek és eljárások iránt, amelyekkel reprodukálható módon komplexeket képezhetünk, amely komplex részek nem antigén, nagyban oldható, biológiailag inert molekulákhoz kötöttek. A találmány tárgya ezt az igényt elégíti ki és a találmány tárgya ilyen komplexek, amelyek a fenti előnyökkel rendelkeznek. A találmány tárgya továbbá a hidrolitikusan stabil reagensek, amelyek ezt az igényt kielégítik és amelyek hidrolitikusan stabil konjugátumokat képeznek.

A találmány tárgya biológiailag aktív konjugátumok, amelyek valamely biológiailag aktív molekulát tartalmaznak, amely molekula tiolcsoporttal rendelkezik, valamint egy nem peptid típusú polimert tartalmaznak, amely aktív szulfoncsoportot tartalmaz és ez a csoport a reaktív tiolcsoporttal kötést képez. A biológiailag aktív molekula lehet szintetikus, természetesen előforduló vagy módosított természetesen előforduló molekula. A kívánt biológiai aktivitással rendelkező molekulát módosíthatjuk úgy, hogy reaktív tiolcsoportot tartalmazzon.

Különösen előnyösen alkalmazható biológiailag aktív molekulák például a tumor necrosis faktor ("TNF") inhibitorok, az Interleukin-1 receptor antagonisták ("IL-1ra"), a CR1, a PDGF exon 6-peptid és az Interleukin-2 ("IL-2") inhibitorok, valamint receptorok ("IL-2r").

A jelen találmány szerinti polimer legalább egy aktív szulfoncsoportot tartalmaz, amelynek képlete $P-SO_2-C-C^*$, ahol P jelentése polimer és C^* jelentése

az a reaktív helyzet, amely a tiolcsoportokkal kötést képezhet. A tiolcsoport és az aktivált szulfon közötti kötés a $P-SO_2-C-C^*S-R$ általános képlettel jellemezhető, amelyben a kötés a C^* atomon képződött és, ahol R jelentése a biológiailag aktív molekula. Alkalmas aktivált szulfoncsoportok például lehetnek a vinil-szulfon- és a klór-etil-szulfon-csoport. Különböző polimereket aktiválhatunk és alkalmazhatunk a találmány szerinti eljárásban, amelyek lehetnek például vízzoldható polimerek, mint például polietilén-glikol ("PEG") és hasonló hidrofil polimerek.

A találmány tárgya továbbá eljárás a fenti szulfon-aktivált polimerek alkalmazására biológiailag aktív konjugátumok (amelyek a fent megadottak) előállítására. Az előállítási eljárás az alábbi lépéseket tartalmazza:

(a) a biológiailag aktív molekulát, amely egy reaktív tiolcsoportot tartalmaz valamely nem peptid típusú polimerrel reagáltatjuk, amely polimer egy aktív szulfoncsoportot tartalmaz és így konjugátumot képezünk; és

(b) a konjugátumot izoláljuk.

A konjugátumokat tartalmazó gyógyszerkészítményeket ugyancsak beleértjük a találmány tárgykörébe.

A találmány tárgya továbbá szulfon-aktivált polimerek, amelyek különböző molekulákhoz, vegyületekhez és felületekhez kapcsolhatók. Az aktivált szulfon-csoport a fent megadott lehet. Különösen előnyösen alkalmazható aktivált polimerek a kétfunkciós PEG-származékok, amelyek a PEG molekulában egy helyen aktivált szulfoncsoportot és egy másik helyen a molekulában NHS-észter vagy maleimid-funkciós csoportot tartalmaznak.

A találmány tárgya továbbá tisztított biológiailag aktív vegyületek, amelyek R_1-X-R_2 általános képletűek, amelyeket "dumbbell" (kettős molekula) névvel jelöl-

lünk és amelyekben az R_1 vagy R_2 csoport legalább egyike biológiailag aktív molekula, amely megtartja biológia aktivitását akkor is, amikor a találmány szerinti vegyület része. A biológiailag aktív molekula reaktív tiolcsoportot tartalmaz, amely a Michael reakcióban akceptor csoporttal a nem peptid típusú polimerben kötést képez. A találmány szerinti eljárásban alkalmazható biológiailag aktív vegyületek lehetnek a fent megadott vegyületek. Az alkalmazható Michael akceptor csoportok lehetnek például vinil-szulfon- és maleimidcsoportok. A Michael akceptor funkciós csoporttal aktivált polimerek lehetnek a fent megadott vízdoldható polimerek.

Az R_1 és R_2 csoportok azonos vagy eltérő csoportok lehetnek. Amennyiben az R csoportok megegyezők, akkor a vegyület egy homo-dumbbell; amennyiben az R csoportok eltérők, akkor a vegyület hetero-dumbbell. Különösen előnyösen alkalmazható homo-dumbbell, például a PEG-kötött, TNF inhibitorok és a PEG-kötött IL-1ra vegyületek. Alkalmas hetero-dumbbell, például az IL-2 α és a IL-2 β hetero-dumbbell-ből képzett vegyületek, amelyek a kiegészítő rendszer klaszikus működését inhibiálják, illetve lehetnek IL-1ra és PDGF exon 6-ból képzett hetero-dumbbell.

A dumbbell vegyületek előállítási eljárása ugyancsak a találmány tárgyát képezi. Az R_1 -X- R_2 általános képletű dumbbell (kettős molekula) vegyületek előállítási eljárása az alábbi lépéseket tartalmazza.

- (a) Az X vegyületet R_1 és R_2 vegyületekkel reagáltatjuk, így R_1 -X- R_2 általános képletű vegyületet képezünk; és
- (b) az R_1 -X- R_2 általános képletű vegyületet tisztítjuk.

Az (a) reakciólépés a fenti eljárásban a dumbbell előállítás során, továbbá az alábbi lépéseket tartalmazhatja:

az X vegyületen egy reaktív csoportot védőcsoporttal látunk el és így védőcsoporttal ellátott X vegyületet képezünk;

a védőcsoportot tartalmazó X vegyületet R_1 általános képletű vegyülettel reagáltatjuk és így R_1-X általános képletű vegyületet képezünk;

az X vegyületről a védőcsoportot eltávolítjuk; és az

R_1-X általános képletű vegyületet R_2 általános képletű vegyülettel reagáltatjuk és így R_1-X-R_2 általános képletű vegyületet képezünk.

Más eljárás során az (a) reakciólépés továbbá az alábbi lépéseket tartalmazhatja:

felesleg X vegyületet R_1 vegyülettel reagáltatunk és így R_1-X általános képletű vegyületet képezünk; és

R_1-X általános képletű vegyületet R_2 vegyülettel reagáltatjuk és így R_1-X-R_2 általános képletű vegyületet képezünk.

A lényegében tiszta R_1-X-R_2 általános képletű vegyületeket tartalmazó gyógyszerkészítmények ugyancsak a találmány tárgykörét képezik.

A találmány részletes leírása

A találmány tárgya biológiailag aktív konjugátumok, amelyek (1) egy biológiailag aktív molekulát tartalmaznak, amely reaktív tiolcsoportot tartalmaz és (2) egy nem peptid típusú polimert tartalmaznak, amely aktív szulfoncsoportot tartalmaz, amely csoport a biológiailag aktív molekula tiolcsoportjával kötést képez.

A "konjugát" elnevezés alatt egy olyan komplexet értünk, amely úgy képződik, hogy valamely biológiailag aktív vegyületet, amely aktív tiolcsoporttal rendelkezik, valamely nem peptid típusú polimerrel, amely aktív szulfoncsoporttal rendelkezik, kapcsolunk úgy, hogy kötést képezünk a tiolcsoport és a szulfoncsoport között. Mint korábban leírtuk a jelen találmány szerinti konjugátumok biológiailag aktív anyagok.

A "biológiailag aktív" elnevezés alatt azt értjük, hogy a molekula in vitro vagy in vivo körülmények között biológiai hatást képest kifejteni. A biológiailag aktív molekula nem limitáltan bármely olyan molekula lehet, amely biológiai hatást fejt ki, amennyiben egy természetes biológiai molekulával vagy biológiai rendszerrel, mint például sejttel vagy szervvel kölcsönhatásba lép. A biológiai aktivitás kimutatása például in vitro biológiai tesztvizsgálat lehet, amelyek a szakirodalomban jól ismertek. Például a molekula biológiai aktivitását tumor necrosis faktor ("TNF") inhibitorok esetében úgy mutathatjuk ki, hogy meghatározzuk, hogy az inhibitorok TNF-hez kötődnek-e vagy az inhibitorok blokkolják-e a bizonyos sejtekben TNF mediált lízis folyamatot. Az utóbbi biológiai tesztvizsgálatokat leírták a 90113673.9 számú közzétett európai szabadalmi bejelentésben, amelyet referenciaként adunk meg.

A biológiailag aktív molekulák nem limitáltan lehetnek például gyógyszerek, vitaminok, tápanyagok, nukleinsavak, aminosavak, polipeptidek, enzim kofaktorok, szteroidok, szénhidrátok, szerves molekulák, mint például heparin, széntartalmú szerek, receptor agonisták, receptor antagonisták, kötő fehérjék, receptorok vagy receptor részletek, extracelluláris mátrix fehérjék, sejtfelületi molekulák, antigének, haptének, célmolekula csoportok és kelátképző szerek. A receptorok el-

nevezés alatt azt értjük, hogy a receptor bármely formája jelen lehet, amennyiben a receptor nem egyetlen formában létezik.

A "polipeptid" és a "protein" elnevezést a leírásban szinonimaként alkalmazzuk és ez alatt bármely olyan vegyületet értünk, amely protein szerű természettel rendelkezik. A polipeptid csoport ezzel szemben bizonyos, nem peptid típusú részt is tartalmazhat. Például ebbe az elnevezésbe beleértjük a glikozilezett polipeptideket vagy a szintetikusan módosított proteineket is. A "célcsoportok" elnevezés alatt olyan csoportokat értünk, amelyek valamely vegyületet a biológia rendszer egy bizonyos pontjához irányítanak. A kötési proteineket illetve receptorokat, azzal jellemezhetjük, hogy ezek bizonyos ligandumhoz milyen affinitást mutatnak.

Számos jelen találmányban alkalmazható polipeptidet leírtak a WO 92/16221 számú PCT közzétett szabadalmi bejelentésben, amelyet referenciaként adunk meg. Ezek a proteinek a szakirodalomban jól ismertek. Különösen előnyösen alkalmazható polipeptidek a TNF kötődő proteinek, amelyek TNF inhibitoroknak is neveznek. A "TNF kötődő protein" elnevezés alatt olyan proteint értünk a leírásban, amely TNF-hez kötődik.

Egy ilyen TNF kötődő protein ("TNFbp") a p55 TNF receptor vagy a TNF receptor I extracelluláris része. In vivo körülmények között a receptor extracelluláris része a vérárammal körforgásban mozog, mint egy 30kDa glikozilezett-protein, amely a TNF-hez kötődik. Ezt a kötődő proteint TNFbp-I vagy 30kDa TNFbp névvel is jelölik. A fenti TNF kötődő protein nukleinsav szekvenciáinak és aminosavainak tisztítási eljárását leírták a 90 113 673,9 számú közzétett európai szabadalmi bejelentésben, amelyet referenciaként adunk meg.

A fenti közzétett szabadalmi bejelentésben leírták továbbá a TNF inhibitor rekombináns előállítási eljárását, amelyben glükózilezett és deglükózilezett formájú TNF inhibitor is előállítanak. Ugyancsak leírták a fenti inhibitor deglükózilezett formájának látszólagos molekulatömegét, amely körülbelül 18kDa. A "30kDa TNF inhibitor" elnevezésbe beleértjük a glükózilezett és a deglükózilezett formákat is.

A "természetesen előforduló", "természetes" és "vad típusú" elnevezéseket szinonim elnevezésként alkalmazzuk a leírásban.

A referenciaként megadott 90 113 673.9 számú európai szabadalmi bejelentésben továbbá leírták a másik TNF inhibitor, amelyet 40kDa TNF inhibitornak neveznek, tisztítási eljárását, valamint aminosav és nukleinsav szekvenciáját. Ezt az inhibitor TNFbp-II inhibitornak is nevezik természetesen előforduló formájában és ez a p75 vagy p85 TNF receptor extracelluláris részének glükózilezett formája. A 90 112 673.9 számú európai szabadalmi bejelentésben továbbá leírták a fenti "40kDa" inhibitor glükózilezett és deglükózilezett rekombináns előállítási eljárását is. A fenti közzétett referenciában továbbá leírták a természetes 40kDa inhibitor aminosav szekvenciáját és nukleinsav szekvenciáját is. A deglükózilezett forma molekulatömege ugyan nem 40kDa, azonban mind a deglükózilezett és a glükózilezett TNF formát is ezzel a "40kDa TNF inhibitor" elnevezéssel jelöljük.

A referenciaként megadott 90 112 673.9 számú európai szabadalmi bejelentésben továbbá leírták a két TNF inhibitor rekombinációs előállítási eljárását, amely TNF inhibitorok a teljes hosszú "40kDa" kötődő protein részét képezik. Ez a két rész a "Δ51" és a "Δ53" nevű TNF inhibitor. A Δ51 és a Δ53 inhibitorok aminosav és nukleinsav szekvenciái ugyancsak leírták a fenti referenciaként megadott közleményben.

További különösen előnyös polipeptidek például az 5,075,222 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben, amelyet referenciaként adunk meg, leírt interleukin-1 receptor antagonisták ("IL-1ra"), az inzulin típusú növekedési faktor kötődő proteinek ("IGFbps"), a CTLA4, és a vérlemezből származó növekedési faktor exon-6 része ("PDGF"), a gliális neutrofil faktor ("GDNF"), a ciliáris neutrofil faktor ("CNTF"), az interleukin-4 receptor ("IL-4r") és inhibitorai, továbbá az interleukin-1 receptor ("IL-2r"). A természetesen előforduló IL-1ra-t kódoló nukleinsavat illetve a protein E.Coli-ban történő expresszálasát Hannum és munkatársai leírták az 5,075,222 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben.

Az IL-2 receptorokat, továbbá a CR1-t, jellemzőit, valamint az ezeket kódoló nukleinsavakat, valamint az előállítási eljárásokat leírták a WO 92/16221 számú közzétett PCT szabadalmi bejelentésben, amelyet referenciaként adunk meg.

A találmány szerinti konjugátumokban polimerhez kötött biológiailag aktív molekulák a kötés kialakítása előtt reaktív tiolcsoportot alkalmaznak. A "reaktív tiolcsoport" olyan -SH csoportot jelent, amely képes a fent leírtak szerint az aktivált polimerekkel reakcióba lépni.

Ilyen reaktív tiolcsoport például a cisztein aminosav -SH csoportja. Számos fehérje nem tartalmaz szabad cisztein egységeket (olyan cisztein egységeket, amelyek nem diszulfid kötésben kötöttek) vagy bármely más reaktív tiolcsoportot. Ezen túlmenően a cisztein csoportja esetenként nem alkalmas a polimerhez való kötődésre, mivel a tiolcsoport a biológiai aktivitás kifejtéséhez szükséges. Ezen túlmenően a fehérjék bizonyos módon térbeli elrendezéssel kell rendelkezzenek ahhoz, hogy olyan konformációjuk legyen, amely az aktivitást is magával hordoz-

za. Az aktív konformáció formában a cisztein sok esetben nem képes a szulfon vegyülettel reagálni, mivel ez a fehérje belsejébe befoglalt. Ezen túlmenően az is előfordulhat, hogy egy rendelkezésre álló cisztein tiolcsoport, amely nem szükséges az aktivitás kifejtéséhez, nem megfelelő helyen található a molekulában, ahhoz hogy a polimerrel kötést létesítsen. Azokat az aminosavakat, amelyek az aktivitás kifejtéséhez nem szükségesek "nem esszenciális" aminosavaknak nevezzük. A nem esszenciális ciszteinek sok esetben nem alkalmas konjugáció helyek, mivel az aktív helyzethez való elhelyezkedésük a polipeptidben azt eredményezi, hogy a polipeptid a polimerhez történő konjugáció után inaktívvá válik. A proteinekhez hasonlóan számos más biológiailag aktív molekula olyan reaktív tiolcsoportot tartalmaz, hogy ezek a fentihez hasonló okok miatt nem alkalmasak a polimerhez történő konjugációra vagy egyáltalán nem tartalmaznak reaktív tiolcsoportokat.

A találmány szerinti eljárás során ennek megfelelően amennyiben ez szükséges vagy kívánatos a biológiailag aktív molekulába reaktív tiolcsoportokat vezetünk be. A tiolcsoportok bevezethetők inaktív molekulába is, abból a célból, hogy ezzel egy biológiailag aktív molekulát képezzünk, ugyanakkor a tiol-szulfon- kötés nem szünteti meg a kívánt aktivitást.

A reaktív tiolcsoportok a szakirodalomban ismert kémiai eljárásokkal vezethetők be a molekulákba. A polipeptid vagy nem peptid típusú molekulák esetében kémiai módosítást végezhetünk, amelynek során magát a tiolcsoportot vezetjük be a molekulába vagy ezt a csoportot egy nagyobb csoport részeként építjük a molekulába, amely nagyobb csoport például lehet egy cisztein savmaradék. A tiolcsoport kémiai bevezetésének példáját írták le a Jue, R. és munkatár-

sai, Biochemistry, 17, pp. 5399-5406 (1978) közleményben. Más esetben egy polipeptidbe szabad cisztein egységet is előállíthatunk úgy, hogy a cisztint kémiai módon redukáljuk, például DTT segítségével.

Az olyan polipeptideket, ahol olyan módosítást hajtottunk végre, hogy egy adott helyzetbe valamely aminosav maradék kerüljön, amely a természetes proteinben a módosítás előtt nem volt jelen, úgynevezett "mutáns-nak" nevezzük. Ahhoz, hogy cisztein mutánsokat állítsunk elő valamely nem esszenciális aminosavat ciszteinnel helyettesíthetünk vagy a polipeptidhez egy cisztein savmaradékot kapcsolhatunk. A nem természetes cisztein bevezetési helye lehet például a glükozilezési hely, illetve a polipeptid N vagy C terminális helyzete. Valamely lizin savmaradék mutációja ciszteinné ugyancsak alkalmazható, mivel ez a lizin savmaradékok gyakran valamely protein felületén találhatók, amely protein egyébként aktív konformációjú. Ezen túlmenően a szakember bármely ismeretét felhasználhatja a polipeptid kötődési vagy aktív helyeiről ahhoz, hogy a megfelelő mutációs helyet kiválassza.

A szakember továbbá alkalmazhat cisztein mutánsok előállítására ismert rekombinációs DNS technológiát is alkalmazhatunk. Megváltoztathatjuk a természetes polipeptidet kódoló nukleinsav sorrendet vagy nukleinsavakat és egy standard helyzetirányított mutagenézist hozhatunk létre és így a mutánst kódolhatjuk. A standard mutagenézis technológiákat leírták a Kunkel, T.A., Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 82, pp 488-492 (1985) és Kunkel, T.A. és munkatársai, Methods Enzymol., Vol. 154, pp. 367-382 (1987) közleményekben, amelyeket egyaránt referenciaként adunk meg. Más eljárás szerint kémiaiilag előállíthatjuk a nukleinsavat, amely a mutánst kódolja a szakirodalomban jól ismert eljárások alkalmazá-

sával. DNS szintetizáló berendezéseket alkalmazhatunk, amely például lehet az Applied Biosystems (Foster City, CA terméke). A kívánt mutánst kódoló nukleinsavat különféle expresszási rendszerekkel, mint például állati, inszekt és bakteriális rendszerekkel expresszáhatjuk.

Amennyiben a mutánst bakteriális expresszálo rendszerben rekombinációs eljárással állítjuk elő az alábbi lépéseket hajtjuk végre:

- 1) A kívánt mutánst kódoló nukleinsavat helyirányított mutagenézissel állítjuk elő a természetes polipeptidet kódoló nukleinsav alkalmazásával;
- 2) A kívánt mutánst kódoló nukleinsavat baktérium expresszálo rendszerben expresszáljuk;
- 3) A mutánst a baktériumból izoláljuk és tisztítjuk;
- 4) Amennyiben nem megfelelő térbeli elrendeződésű a mutánst megfelelő tér elrendezésbe hozzuk cisztein vagy más szulfhidril tartalmú vegyület jelenlétében;
- 5) Az újra megfelelő térbeni elrendezésbe hozott mutánst izoláljuk és tisztítjuk;
- 6) A tisztított és újra megfelelő konformációba hozott mutánst enyhe redukálószerrel reagáltatjuk;
- 7) A reakcióelegyet oxigén jelenléte nélkül dializáljuk.

Amint az alábbiakban leírjuk a mutánst a reakcióelegyből izolálhatjuk a polimerrel történő konjugálás előtt, azonban ez nem szükséges. A 6) lépésben különösen előnyösen alkalmazható redukálószer a dithiotreitol ("DTT") vagy a Tris-(karboxi-etil-foszfín) ("TCEP"). A TCEP előnyösen alkalmazható, mivel ezt a konjugálás előtt, amelyet a tiol-specifikus PEG reagenssel végzünk, nem szüksé-

ges eltávolítani. Lásd a Bruns, J.A. és munkatársai, J. Org. Chem., Vol. 56, No. 8, pp. 2648-2650 (1991) közleményt.

Miután a kívánt mutánst előállítottuk a szakember könnyen biológiai tesztvizsgálatnak vetheti alá és aktivitását összehasonlíthatja a természetes polipeptid aktivitásával. Mint a későbbiekben részletesen leírjuk még abban az esetben is, ha a mutáns relatív aktivitása csökkent, a mutánsból készült konjugátum különösen előnyös lehet, például a konjugát megnövelt oldhatósággal, csökkentett antigenecitással vagy immunogenecitással vagy a biológiai rendszerből való lassabb kiürüléssel rendelkezhet a nem konjugát molekulával összehasonlítva. A biológiailag aktív molekula farmakokinetikai fenti jellemzőinek javítása a különféle terápiás alkalmazásokban a vegyületet értékesebbé teheti. A megnövelt oldhatóság ezen túlmenően a molekula alkalmazhatóságát növeli az in vitro diagnosztikai eljárásokban is.

Az 1. táblázatban bemutatjuk az előállított IL-1ra mutánsokat. Az IL-1ra mutánsok előállítását és tisztítását leírták a WO 92/16221 számú közzétett PCT szabadalmi bejelentésben, amelyet referenciaként adunk meg. A maradék számozás a fenti közzétett szabadalmi bejelentésben leírt szekvencián alapul és az "0" jel az aminosav bevezetését az N-terminális helyzetbe, jelenti; a "c" jelzés ciszteint jelent és a "s" jelzés szerint jelent. Például az "cOs116" elnevezés alatt azt értjük, hogy a ciszteint az N-terminális helyzetbe és a szerint a 116 helyzetbe vezettük be. A természetes IL-1ra szabad cisztein maradékot tartalmaz a 66, 69, 116 és 122 helyzetekben.

1. táblázat
IL-1ra mutánsok

cOs116	cO
c84s116	c6
c8s116	c8
c9s116	c9
c141s116	c141

A 2. táblázatban bemutatjuk a 30kDa TNF inhibitor mutánsait, amelyeket ugyancsak előállítottunk. Az IL-1ra vegyülettel szemben a természetes 30kDa TNF inhibitor nem tartalmaz egyetlen cisztein maradékot sem. A mutánsokat ugyanolyan eljárással állítottuk elő mint a fent megadott közzétett PCT szabadalmi bejelentés (WO 92/16221 számú) eljárása, amely bejelentés referenciaként adtunk meg. A számozást az ott leírt aminosav szekvencia alapján végeztük.

2. táblázat
30kDa TNF inhibitor mutánsai

c105 30kDa TNF inhibitor
c1 30 kDa TNF inhibitor
c14 30kDa TNF inhibitor
c111 30kDa TNF inhibitor
c161 30kDa TNF inhibitor

A mutánsok és az egyéb találmány szerinti polipeptidek lehetnek olyan anyagok, amelyekben a protein szekvenciában allelic variációk lehetnek és ez-

zel együtt lényegében ekvivalens proteinek. A "lényegében ekvivalens" elnevezés alatt azt értjük, hogy igen nagyszámú aminosav maradék homologját tartalmaznak (Lásd általában a M. Dayhoff, Atlas of Protein sequence and Structure, vol. 5, p. 124 (1972) National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C. közleményt, amelyet referenciaként adunk meg), valamint ezek a vegyületek összehasonlítható biológiai aktivitásuak. A találmány tárgykörébe ezen túlmenően a természetes polipeptid vagy mutáns szubsztanciális formáit is, amely azt jelenti, hogy a mutáns illetve a természetes polipeptid lényegében megtartja biológiai aktivitását.

A találmány szerinti konjugátumok a biológiailag aktív molekulákon kívül, amely reaktív tiolcsoportokat tartalmaznak, nem peptid polimer-származékot, amely aktív szulfoncsoportokat tartalmaz, is tartalmaznak. A "nem peptid típusú" elnevezés alatt olyan vegyületeket értünk, amelyek 50 tömeg%-nál kisebb mennyiségű α -aminosav maradékot tartalmaznak.

A polimer-származék polimer része lehet például polietilén-glikol ("PEG"), polipropilén-glikol ("PPG"), polioxi-etilezett-glicerol ("POG") és egyéb polioxi-etilezett poliolkok, polivinil-alkohol ("PVA") és egyéb polialkilén-oxidok, polioxi-etilezett vagy polioxi-etilezett-glükóz. A polimer lehet homopolimer, véletlenszerű vagy blokk kopolimer, terpolimer, amely a fenti monomerekből áll, egyenes láncú vagy elágazó láncú, szubsztituált vagy nem szubsztituált, ugyanakkor ez a polimer legalább egy aktív szulfoncsoportot tartalmaz. A polimer rész bármilyen hosszúságú vagy molekulatömegű lehet, azonban ezek a jellemzők a biológiai jellemzőket befolyásolhatják. A különösen előnyösen alkalmazható átlagos molekulatömegű polimerek, amelyek elősegítik a gyógyszerészeti alkalmazásban a ható-

anyag kiürülésének lassítását 2,000-35,000 dalton közöttiek. Ezen túlmenően amennyiben két csoport kötött a polimerhez egy-egy a polimerlánc két végén, a polimer hossza befolyásolhatja a hatásos távolságot és egyéb térbeli viszonyokat a két csoport között. A szakember változtathatja a polimer hosszát abból a célból, hogy a kívánt biológia aktivitást optimálja vagy előállítsa. Amennyiben a polimer valamely egyenes láncú PEG, a polimer különösen előnyös hossza (ahol a polimer (Z_n) általános képletű, ahol Z jelentése a polimer monomer egysége) olyan hossz, ahol n jelentése 50-500 közötti. A találmány szerinti egyes megvalósítás esetében n nagyobb mint 6 és előnyösen nagyobb mint 10 érték.

A monometoxi-polietilén-glikolt a leírásban mPEG névvel jelöljük. A "PEG" elnevezés alatt az etilén-glikol számos lehetséges kondenzációs polimerjét értjük. A PEG, mint polioxi-etilén, polietilén-oxid, poliglikol és poliéter-glikol néven is szerepel. A PEG előállítható etilén-oxid és számos más monomer kopolimerjeként. Számos biológiai vagy biotechnológiai alkalmazás esetében lényegében lineáris egyenes szénláncú vinil-szulfonnal aktivált PEG-t alkalmazunk, amely nem szubsztituált, kivéve a vinil-szulfon-szubsztituenst.

A PEG számos célra alkalmazható biológiai alkalmazási területeken. A PEG általában átlátszó, színtelen, szagtalan, vízben oldható, hőstabil, számos kémiai reagenssel szemben inert, nem hidrolizál és nem toxikus anyag. A PEGilezés megjavíthatja valamely molekula farmakokinetikai jellemzőit, mivel a molekula látszólagos molekulatömegét megnöveli. A megnövelt látszólagos molekulatömeg csökkenti a vegyület testből való kiürülési sebességét, amennyiben a hatóanyagot szubkután vagy szisztémás úton adagoljuk. Számos esetben a

PEGilezés csökkenti az antigenecitást és az immunogenecitást. Ezen túlmenően a PEGilezés a biológiailag aktív molekula oldhatóságát is megnövelheti.

A találmány szerinti polimer származékok aktív szulfon-egységet tartalmaznak. Az "aktív szulfoncsoport" elnevezés alatt olyan szulfoncsoportot értünk, amelyhez két szénatom tartalmú csoport kapcsolódik, amelyben egy reaktív hely található a tiol-specifikus kapcsolás számára és ez a reaktív hely a szulfoncsoporttól számított második szénatom, valamint a reakciót 8 pH vagy ennél kisebb pH értéken hajtjuk végre. Aktív szulfoncsoportok lehetnek nem limitálnak a vinil-szulfon- és az aktivált etil-szulfon-csoport. Aktív etil-szulfon-csoport például a $-\text{SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Z}$ általános képletű csoport, ahol Z jelentése halogénatom, vagy más hasadócsoporthoz, amely képes arra, hogy a tiolcsoport szubsztituálja és így szulfon-tiol kötés jöjjön létre, amely a $-\text{SO}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R}$ általános képletű kötés, ahol R jelentése a biológiailag aktív molekula. A szulfon-aktivált polimer ezen túlmenően további szubsztituenseket is tartalmazhat mindaddig, amíg a második szénatomon a tiol-specifikus reaktivitás körülbelül 9 vagy kisebb pH érték mellett fennmarad.

A találmány szerinti szulfon-aktivált polimereket legalább néglépéses reakcióval állíthatjuk elő. Az első lépésben általában a polimerben valamely helyzet reaktivitását megnöveljük, amely helyzet jellemzően egy végcsoport és ezt az aktiválást aktiválási reakcióval vagy szubsztitúcióval végezzük. A második lépésben a kénatomot kapcsoljuk közvetlenül a polimer valamely szénatomjához olyan formában, amely formák ezután etil-szulfon-csoporttá vagy etil-szulfon-származék csoporttá alakíthatjuk, amely hasonló reaktív jellemzőkkel rendelkezik. A harma-

dik lépésben a kénatomot szulforcsoporttá oxidáljuk. A negyedik lépésben a szulforcsoporttól második helyzetű szénatomot aktiváljuk.

A szulfon-aktivált polimer előállítási eljárását részletesebben az alábbiakban ismertetjük mégpedig egy olyan példán, amelyben szulfon-aktivált PEG-származékot állítunk elő. Az első lépésben a PEG molekulában egy hidroxilcsoportot aktiválunk. A "hidroxilcsoport aktiválás" alatt azt értjük, hogy valamilyen átlagos szubsztitúciót vagy észterezést végzünk vagy más hidroxilcsoport aktiválási eljárást hajtunk végre. Jellemzően a hidroxilcsoport aktiválásban valamely savat vagy sav-származékot, mint például sav-kloridot, reagáltatunk a PEG molekulával és így a PEG molekulában reaktív észter-csoportot hozunk létre és a sav-csoport ennek során észterkötéssel kötődik a molekulához. A sav-csoport általában reaktívabb, mint a hidroxilcsoport. Jellemzően készíthető észterek a szulfonát, a karboxilát és a foszfát észterek.

A szulfonsav-halogenidek, amelyek alkalmasak a találmány szerinti molekulában történő felhasználásra például lehetnek metánszulfonil-klorid (amely más néven mezilklorid) és p-toluolszulfonil-klorid (amely más néven tozilklorid). A metán-szulfonát-észtereket időnként mezilát néven jelöljük. A toluolszulfonát-észtereket esetenként tozilát néven jelöljük.

A szubsztitúciós típusú hidroxilcsoport aktiválási reakcióban a PEG molekula teljes hidroxilcsoportját szubsztituáljuk egy reaktívabb csoporttal jellemzően valamely halogeniddel. Például tionil-kloridot reagáltathatunk a PEG molekulával és így egy reaktívabb klóratommal szubsztituált PEG molekulát nyerhetünk.

Ebből eredően amennyiben PEG a kiindulási anyag az első reakciólépésben nyert jellemző termék vagy észter vagy halogenid-szubsztituált PEG molekula.

A második lépésben az észtercsoportot vagy halogenid atomot valamely alkohollal szubsztituáljuk, amely reaktív tiolcsoportot tartalmaz, amely tiolcsoport egy etilcsoportozhoz kapcsolódik. Például a reagens lehet tiol-etanol-csoport. A tiol-etanol például alkalmas szubsztituens alkohol. Ebben a lépésben a tiolcsoport kénatomja közvetlenül a polimer egyik szénatomjához kötődik.

Ezt követően a harmadik reakciólépésben a kénatomot szulfoncsoporttá oxidáljuk. Alkalmazható oxidálószerrek például a hidrogén-peroxid, a nátrium-perborát vagy peroxisavak.

A negyedik lépésben a második lépésben alkalmazott alkohol hidroxilcsoportját aktiváljuk. Ez a lépés hasonló a reakciósorozat első lépéséhez. A szubsztituciót jellemzően halogeniddel végezzük és így egy halo-etil-szulfont vagy ennek származékát nyerjük, amely a második szénatomon a szulfoncsoportozhoz számítva aktív helyzettel rendelkezik. Általában az etilcsoportban a második szénatomot klór vagy bróm segítségével aktiváljuk. A hidroxilcsoport aktiválás egy hasonló reaktivitású csoportot vagy helyzetet eredményez, mint amilyent a szulfonát-észter is eredményezett. Alkalmazható reaktánsok például a savak, a sav-halogenidek és egyéb korábban az első reakciólépésben ismertetett reaktánsok. Különösen előnyösen alkalmazható a tionil-klorid, a hidroxilcsoport helyettesítésére, amely reakció során a hidroxilcsoportot klóratommal helyettesítjük.

A kapott polimer aktivált etil-szulfon stabil, izolálható és alkalmas a tiol-szelektív kapcsolási reakcióban történő felhasználásra. A PEG klór-etil-szulfon vízben stabil, körülbelül 7 vagy kisebb pH érték mellett, de ennek ellenére is előnyösen alkalmazható tiol-szelektív kapcsolási reakciókban, amennyiben a pH értéke bázikus, és körülbelül 9 érték. A 9 pH érték feletti pH értékeknél a tiol szelektivitás csökken és a szulfoncsoport reaktívra válik aminocsoportokkal szemben. A reakcióban a tiollal képződött kötés hidrolitikusan ugyancsak stabil.

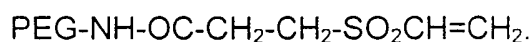
Egy ötödik lépést is alkalmazhatunk a szintézisben, amelynek során az aktivált etil-szulfont valamely bázissal reagáltatjuk és így PEG vinil-szulfont vagy valamely aktív származékát állítjuk elő, amely alkalmas a tiol-szelektív kapcsolási reakcióban történő alkalmazásra. Alkalmazható bázisok például a nátrium-hidroxid vagy a trietilamin. Mint az aktivált etil-szulfonok, a vinil-szulfon is hidrolitikusan stabil, izolálható, tiol-szelektív és hidrolitikusan stabil kötést képez, amennyiben tiollal reagáltatjuk.

A leírásban a "hidrolitikusan stabil" elnevezés alatt olyan kötést értünk, amely a polimer és a szulfon-egység között alakul ki, valamint a szulfon-tiol kötés a konjugációs reakció után, és ezek kisebb, mint körülbelül 11 pH érték mellett vízzel, legalább 3 napon át nem lépnek reakcióba. A hidrolitikus stabilitás kívánatos jellemző, mivel amennyiben a hidrolízis sebessége jelentős a polimer dezaktiválódhat, mielőtt a polimer és a biológiailag aktív molekula tiolcsoportja közötti kapcsolási reakció megtörténik.

Mint korábban leírtuk valamely lineáris PEG vegyület aktív helyzetekkel, amelyek mindkét végén találhatók, a proteinhez egyik végen kapcsolódik, azonban amennyiben a hidrolízis sebessége jelentős, a másik végen vízzel lép reak-

cióba és így kötötté válik, viszonylag nem reaktív hidroxilcsoport alakul ki és nem az úgynevezett "dumbbell" molekulaszervezet, amely kapcsolt proteinek vagy más kívánt csoportot tartalmaz mindkét végén. Hasonló probléma lép fel, amennyiben valamely molekulát kívánunk egy felülethez kapcsolni egy PEG reagenst alkalmazásával, mivel a PEG először a felülethez kapcsolódik vagy a molekulához kapcsolódik, majd az ellenkező PEG származék vég olyan aktív formájú kell maradjon, hogy a következő reakció is végrehajtható legyen. Amennyiben hidrolízis lép fel az ellenkező vég általában inaktiválódik.

Más eljárás szerint a szulfon aktivált származékokat úgy állíthatjuk elő, hogy valamely kötő ágenst, amely szulfoncsoportot tartalmaz, egy PEG (vagy más polimer) aktivált helyzetéhez kapcsolunk, amely aktiválás különböző funkcionális csoportokkal történhet. Például egy aminocsoporttal aktivált PEG reagáltatható előnyös körülmények között, amely körülbelül 9 vagy kisebb pH érték, valamely kis molekulával, amely szukcinimidil-aktív-észter-csoportot tartalmaz egyik végén és vinil-szulfon-csoportot a másik végén. Az aminocsoporttal-aktivált PEG stabil kötést képez a szukcinimidil-észterrel. A kapott PEG a vinil-szulfon-csoport által a végcsoport aktivált és hidrolitikusan stabil:



Hasonló aktivált PEG állítható elő úgy, hogy egy amin-reaktív PEG molekulát, mint például PEG szukcinimidil-aktív-észter, PEG-CO₂-NHS reagáltatunk egy kis molekulával, amely egyik végén aminocsoportot tartalmaz, a másik végén pedig vinil-szulfon-csoport található.

A PEG-klór-etil-szulfon és a PEG-vinil-szulfon előállítási eljárását az 1. példában mutatjuk be. A PEG-vinil-szulfon és PEG-klór-etil-szulfon tiol-szelektív re-

aktivitását a 2. példában mutatjuk be. A két vegyület polimer-szulfon kötésének hidrolitikus stabilitását a 3. példában mutatjuk be. A tiolcsoport és a szulfon közötti kötés hidrolitikus stabilitását a 16. példában mutatjuk be.

Amennyiben a polimer nem rendelkezik hidroxilcsoporttal egy hidroxil- csoportot először kémiai eljárásokkal vezethetünk be a molekulába, amely eljárások a szakirodalomban jól ismertek, majd ezt követően hajtjuk végre a fent leírt reakciólépéseket. A találmány szerinti aktivált polimer-származékok egynél több reaktív csoportot is tartalmazhatnak. A származékok lehetnek monofunkcionális, bifunkcionális vagy multifunkcionális vegyületek. A reaktív csoportok lehetnek azonosak (homofunkcionális) vagy eltérőek (heterofunkcionális), azonban legalább egy ezek közül aktív-szulfon-csoport legyen.

Két különösen előnyös homobifunkcionális-származék a PEG-bisz-klór-szulfon és a PEG-bisz-vinil-szulfon. A szakember könnyen előállíthatja ezeket a vegyületeket olyan PEG alkalmazásával, amely mindkét végén hidroxilcsoportot tartalmaz és ezt a kiindulási anyagot általános fent leírt módszerekkel átalakíthatja.

A heterobifunkcionális-származékok ugyancsak előállíthatók. Két különösen előnyös heterobifunkcionális-származék például a lineáris PEG, amely vagy egy vinil-szulfon vagy egy maleimid-csoportot tartalmaz az egyik végén és egy N-hidroxi-szukcinimid-észter-csoportot ("NHS-észter") tartalmaz a másik végén. Az NHS-észter-csoport amin specifikus. Az egyik végén NHS-észter-csoportot és a másik végén aktivált-szulfon-csoportot tartalmazó PEG mind a lizinhez, mind a ciszteinhez kapcsolható. Stabil amin-kötés állítható elő miközben a hidrolitikusan stabil nem reagált szulfon-csoport a következő tiollal végzett reakció számára

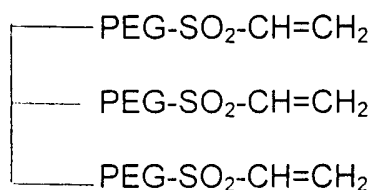
rendelkezésre áll. A fenti két heterobifunkcionális PEG-származékot az 5. és 6. példában leírt eljárások szerint állíthatjuk elő. Amennyiben a maleimid-NHS-észter heterobifunkcionális reakciót alkalmazni elő egyenes láncú PEG alkalmazásával, amely $(Z)_n$ általános képletű vegyület, Z jelentése monomer egység és n jelentése nagyobb mint 6, előnyösen nagyobb mint 10.

A heterofunkcionális szulfon-aktivált PEG vegyületek előállítására alkalmazott más aktív-csoportok számos típusú vegyületből választhatók. A biológia és biotechnológia alkalmazás céljára előállított vegyületek esetében a szubsztitueneket tipikusan olyan reaktív-csoportokból választjuk, amelyeket a PEG kémiában általában alkalmaznak a PEG alkalmazására és ezek lehetnek például aldehidek, trifluor-etil-szulfonát (esetenként trezilát néven említik), n-hidroxi-szukcinimid-észter, cianurinsav-klorid, cianurinsav-fluorid, acil-azid, szukcinát, a p-diazo-benzil-csoport, a 3-(p-diazo-feniloxi)-2-hidroxi-propiloxi-csoport és más csoportok.

Szulfontól eltérő aktív csoportokat írtak le Davis és munkatársai a 4,179,337 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben; Lee és munkatársai a 4,296,097 és a 4,430,260 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben; Iwasaki és munkatársai a 4,670,417 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben; Katre és munkatársai a 4,766,106 számú, a 4,917,888 számú és a 4,931,544 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben; Nadagawa és munkatársai a 4,791,192 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben; Nitecki és munkatársai a 4,902,502 számú és az 5,089,261 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésekben; Saifer az 5,080,891 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben; Zalipsky az 5,122,614 számú amerikai egye-

sült államokbeli szabadalmi bejelentésben; Shadle és munkatársai az 5,153,265 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben; Rhee és munkatársai az 5,162,430 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben; a 0 247 860 számú európai szabadalmi bejelentésben; továbbá az US86/01252 számú, a GB89/01261 számú, a GB89/01262 számú, a GB89/01263 számú, az US90/03252 számú, az US90/06843 számú, az US91/06103 számú, az US92/00432 számú és az US92/02047 számú PCT nemzetközi szabadalmi bejelentésekben, amely fenti közleményeket referenciaként adunk meg.

Például egy trifunkcionális származék egy glicerol háttér molekulát tartalmaz, amelyhez három vinil-szulfon PEG molekula kapcsolódik. Ezt a molekulát az alábbi képlettel jellemezhetjük:



A vegyületet a 12. példa szerinti eljárással állítjuk elő.

A multifunkcionális-származékok másik példája az úgynevezett "csillag" molekula. A csillag molekulát általában leírta Merrill a 5,171,264 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben, amelyet referenciaként adunk meg. A csillag molekulák egy mag molekulát tartalmaznak, amelyhez több PEG lánc vagy "kar" kapcsolódik. A szulfoncsoportokat alkalmazhatjuk arra a célra, hogy a magból kinyúló PEG lánc túlsó végén aktív funkciós csoportot alakítsunk ki vagy kötőcsoportot alakítsunk ki, amely a csillag molekula karjaihoz kötő vegyületként kapcsolódik, amely csoport a mag molekula funkciós csoportjához vagy egyéb csoportjához kötődik.

A szakember felismeri, hogy a fent leírt aktivált polimerek alkalmazhatók arra, hogy különféle szubsztituenseket illetve szubsztituens kombinációkat hordozzanak.

Mint korábban leírtuk a találmány szerinti konjugátumokat úgy állítjuk elő, hogy egy tiol-tartalmú biológiailag aktív vegyületet kapcsolunk a szulfon-aktivált polimerekkel. A tiolcsoport illetve a szulfon-aktivált polimer közötti kötés kovalens kötés.

A találmány szerinti konjugátumok előállítására alkalmazott általános eljárásban az alábbi lépéseket végezzük:

(1) Kiválasztjuk a kívánt biológiailag aktív molekulát és a szakirodalomban jól ismert eljárásokkal meghatározzuk, hogy a molekula szabad tiolcsoportot tartalmaz. Lásd például az Allen, G., "Sequencing of Proteins and peptides," pp. 153-54, in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Work, T.S., és Burdon, R.H., eds. (1972) közleményt, amelyet referenciaként adunk meg. Amennyiben a molekula szabad tiolcsoportot tartalmaz a következőként a 3. lépést végezzük. Amennyiben a molekula nem tartalmaz szabad tiolcsoportot a 2. lépést végezzük el.

(2) Amennyiben a molekulában nem található szabad tiolcsoport a fent leírt eljárások alkalmazásával a molekulába tiolcsoportot vezetünk be. Miután a molekulába a tiolcsoportot bevezettük biológiai tesztvizsgálatot végzünk abból a célból, hogy meghatározzuk vajon a molekula kívánt biológiai aktivitása vagy ezen biológiai aktivitás egy része továbbra is megmaradt.

(3) Előállítjuk a kívánt szulfon-aktivált polimert amint a fentiekben ezt leírtuk.

(4) Az aktivált polimert reagáltatjuk a szabad tiolcsoportot tartalmazó molekulával.

(5) A reakcióterméket izoláljuk, amely izolálásra a szakirodalomban jól ismert kromatográfiás eljárást alkalmazhatjuk. Például ilyet leírtak protein konjugátok esetében a Scopes, R., Protein Purification, Cantor, C.R. ed., Springer-Verlag, New York (1982) közleményben. A nem protein molekulák esetében ilyen eljárást leírtak például a Still, W.C. és munkatársai, J. Org. Chem., 43, pp. 2923-2925 (1978) közleményben. Amennyiben nem konjugátum képződik a biológiailag aktív molekula helyzetébe tiolcsoportot vezetünk, majd megismételjük a (4) és az (5) lépéseket.

(6) A képződött konjugátum biológiai aktivitását meghatározzuk megfelelő biológiai tesztvizsgálatok segítségével.

A szakember bizonyos lépéseket elhagyhat vagy bizonyos lépéseket a szekvenciához hozzáadhat. Például a szakember lehet hogy a (2) lépésben nem végez biológiai tesztvizsgálatot vagy például korábbi vizsgálatok alapján feltételezi a biológiai aktivitást a PEGilezés után, mivel korábbi kísérleteket végzett. A szakember továbbá további lépéseket is végezhet megváltoztatva a kötő molekula méretét, hosszát vagy molekulatömegét abból a célból, hogy optimálissá tegye vagy biztosítsa a biológiai aktivitást.

Számos konjugátumot előállítottunk. A 30kDa TNFbp c105 mutánst, amelyet a fentiekben leírtunk, kapcsoltuk a PEG-vinil-szulfonnal a 10. példa szerinti eljárásnak megfelelően. A 8. példában bemutatjuk, hogy a természetes IL-1ra, amely négy szabad ciszteint tartalmaz, hasonló körülmények között reagáltatható. A c84 IL-1ra mutáns ugyancsak jó reakciót mutatott. A 13. példában bemutatjuk

három 30kDa TNF inhibitor mutáns kapcsolását három PEG lánchoz, amely három lánc egy glicerol-molekulához kötött.

A találmány szerinti konjugát molekulák számos célra alkalmazhatók, amelyek lehetnek nem limitáltak például in vitro diagnosztikai tesztvizsgálatok illetve gyógyszerészeti készítmények előállítására. Számos találmány szerinti konjugátum legalább egy alábbi jellemzővel rendelkezik a nem konjugátum molekulával összehasonlítva:

- (1) megnövelt oldhatóság vizes oldatban;
- (2) csökkentett antigenecitás vagy immunogenitás;
- (3) a szubkután vagy szisztémás adagolás után a szervezetből történő kiürülés csökkentett sebessége, amely a megnövelt látszólagos molekulatömeg miatt következik be.

Az IL-1ra tartalmú konjugátumokból készült gyógyszerkészítmények különösen előnyösek. Az IL-1ra önmagában vagy 30kDa TNF-kötő proteinnel kombinációban alkalmazható arthritis, gyulladásos bélbetegség, septicus sokk, ischémiás sérülés, reperfúziós sérülés, osteoporosis, asthma, inzulin-diabetes, myelógén és más leukémia, psoriasis, felnőtt légzőrendszeri disztressz szindróma, cachexia/anorexia és pulmonáris fibrosis kezelésében.

A TNF-kötő proteinek tartalmazó ("TNFbp") konjugátok ugyancsak különösen előnyösen alkalmazhatók. Az ilyen konjugátokat alkalmazhatjuk TNF-mediált betegségek kezelésében, amelyek lehetnek például felnőtt légzőrendszeri distressz szindróma, pulmonáris fibrosis, ízületi gyulladás, septicus sokk, gyulladásos bél betegség, multiple sclerosis, beültetett szerv kivetés és hemorrhagiás trauma.

A találmány szerinti biológiailag aktív konjugátumok ezen túlmenően tartalmazhatnak biológiailag nem aktív molekulákat.

A találmány tárgya továbbá az R_1 -X- R_2 általános képletű lényegében tisztított vegyületek, ahol az általános képletben R_1 és R_2 legalább egyikének jelentése biológiailag aktív molekula, amely reaktív tiolcsoportot tartalmaz, amely tiolcsoport és kovalens kötést képez a X molekulával, amely X molekula jelentése egy Michael akceptor-aktivált polimer. A jelen találmány szerint az R_1 -X- R_2 általános képletű vegyület biológiai aktivitása az R_1 vagy R_2 általános képletű vegyület biológiai aktivitását megőrzi. Az R_1 -X- R_2 általános képletű vegyületeket a leírásban "dumbbell" (kettős molekula) molekuláknak nevezzük.

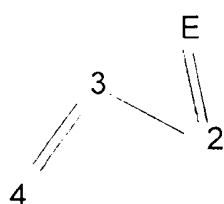
Mint fent leírtuk a találmány szerinti vegyületek lényegében tisztítottak. A "lényegében tisztított" elnevezés alatt azt értjük, hogy egy "homogén készítményről" van szó. A homogén készítmény az R_1 -X- R_2 általános képletű molekulákat tartalmazza és lényegében mentes minden olyan vegyülettől, amely (1) megváltoztatja az R_1 vagy R_2 összetételét vagy (2) több mint egy aktivált polimert egymáshoz kapcsol. A homogén készítmény tartalmazhat olyan R_1 -X- R_2 általános képletű vegyületeket, amelyekben X molekularész hossza eltérő. Az egyenes láncú polimerek esetében, amelyek a $(Z)_n$ általános képletű anyagok, ahol Z jelentése a monomer egység, n jelentése nagyobb mint 6, és előnyösen nagyobb mint 10 érték. A homogén készítmény nyerése esetében R_1 és R_2 nem feltétlenül kapcsolódik X-hez ugyanazon helyzetben az X molekulában vagy nem ugyanolyan esetenként egyik R csoport helyzete sem.

Az X jelentése egy nem peptid típusú polimer, amely egy első reaktív csoportot és egy második reaktív csoportot tartalmaz. A "reaktív csoport" elnevezés

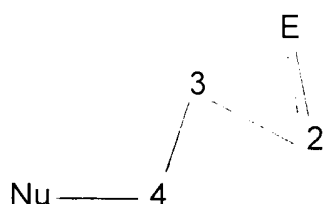
alatt olyan csoportot értünk, amely az R vegyülettel reakcióba lép. Az X molekulán legalább egy reaktív csoport Michael-típusú akceptor csoport. A "reaktív csoport" és a "funkciós csoport" elnevezéseket szinonimaként alkalmazzuk a leírásban. A "Michael-akceptor" és a "Michael-típusú akceptor" elnevezéseket ugyancsak szinonimaként alkalmazzuk a leírásban. A jelen találmány szerinti eljárásban alkalmazható polimereket, amelyet a korábbiakban leírtunk lehetnek például PEG, POG és PVA.

A "Michael akceptorok" olyan funkciós csoportok, amelyek Michael addíciós reakcióban reagálnak. A "Michael addíciós reakció" magában foglalja egy nukleofil reaktáns reakcióját valamely elektrofil központra, amely egy pi-rendszerhez kapcsolódik és amely rendszer elektronegatív atomot tartalmaz. Az elektronegatív atomot tartalmazó pi-rendszerek lehetnek például szulfoxidok, szulfonil-vegyületek, karbonil-vegyületek és heterociklusos-aromás vegyületek. A nukleofil az elektrofil központra addicionálódik.

Michael akceptor vegyületek például az (I) általános képletű vegyületek,



ahol E jelentése elektronegatív atom és az addíció a 4 helyzetben történik, így a (II) általános képletű vegyületek keletkeznek,



ahol Nu jelentése a nukleofil, amely a 4 helyzetű atomhoz kapcsolódott. A Michael akceptor funkciós csoportok nem limitáltan lehetnek maleimid és vinil-szulfon. Az aktív polimer, amelyből a dumbbell molekula képződik tartalmazhat (azonban ez nem feltétel) vinil-szulfon-csoportokat, amelyek Michael akceptor típusú csoportok.

A találmány szerinti aktivált polimerek lehetnek például két vagy több Michael csoportot tartalmazó PEG molekula, amely lehet például PEG-bisz-vinil-szulfon és PEG-bisz-maleimid. A PEG-bisz-vinil-szulfon vegyületet a 7. példában leírt eljárással állíthatjuk elő. A PEG-bisz-maleimid vegyületet a WO 92/16221 számú PCT szabadalmi bejelentésben leírt eljárás szerint állíthatjuk elő, amely bejelentést referenciaként adunk meg.

Az X vegyülethez vagy X-R általános képletű vegyülethez kapcsolódó R_1 és R_2 vegyületek legalább egyike biológiailag aktív még a kapcsolás előtt. A "biológiailag aktív" elnevezés alatt a korábban megadott értelmezést értjük. Mint korábban megadtuk a biológiailag aktív molekulák lehetnek nem limitáltan kötődő proteinek és cél vegyületek. Az R_1 és R_2 molekulák mindegyike lehet biológiailag aktív, azonban ez nem feltétlenül szükséges. Bizonyos esetekben, amennyiben R_1 és R_2 ugyanazon ligandumhoz mutat affinitást a dumbbell vegyület nagyobb affinitást mutathat az adott ligandumhoz, mint külön-külön R_1 és R_2 önmagában. A WO 92/16221 számú közzétett PCT szabadalmi bejelentésben leírták, hogy a 30kDa TNFbp molekulákat (2 db molekulát) tartalmazó homo-dumbbell vegyület, amely molekulák egy PEG-polimerhez kötöttek, jobb hatást mutat in vitro tesztvizsgálatokban a TNF vegyületek citotoxicitásának inhibíálásában, mint önmagában a 30kDa molekula. Bizonyos esetekben az R_1 lehet olyan molekula, amely az

R_1-X-R_2 általános képletű vegyületet a biológiai rendszer bizonyos helyére irányítja és R_2 lehet olyan molekula, amely ezen a helyzeten található valamely ligandumhoz affinitást mutat. Más esetben csak R_1 és R_2 egyike biológiailag aktív az R_1-X-R_2 általános képletű molekulában. A biológiailag nem aktív vegyület lehet valamely felület vagy bármely más biológiailag inert molekula vagy vegyület.

A találmányban a biológiailag aktív R csoport reaktív tiolcsoportot tartalmaz. A biológiailag aktív R csoport vagy vegyület lehet szintetikusan előállított molekula. A "szintetikusan előállított molekula" elnevezés alatt azt értjük, hogy egy molekulához valamely reaktív tiolcsoportot kapcsoltunk. A szintetikus molekulák lehetnek például mutánsok, amelyek nem természetes ciszteint tartalmaznak. A tiolcsoport Michael-típusú akceptorral reagál, amely akceptor a polimerben található és így kovalens kötést képez.

A fenti kovalens kötés kialakulása után a biológiailag aktív molekula megtartja biológiai aktivitását. Az R csoport vagy molekula "megtartja biológiai aktivitását" elnevezés alatt a leírásban azt értjük, hogy az aktivált polimerrel történő reakció után a korábban mutatott, a reakció előtti, biológiai aktivitásának legalább egy tizedét megtartja, előnyösen 40%-át és legelőnyösebben legalább 60%-át megtartja.

A dumbbell vegyületek általános előállítási eljárása az alábbi:

(1) Kiválasztjuk az R vegyületet, amely a kívánt biológiai aktivitással rendelkezik, amely lehet például valamely protein, mint például tumor necrosis faktorhoz kötődő protein (TNFbp).

(2) Megmérjük a vegyület aktivitását megfelelő biológiai tesztvizsgálat segítségével.

(3) Meghatározzuk a vegyületben található szabad szulfhidrilcsoportok számát, például az olyan cisztein maradékokat, amelyek nem képezik részét diszulfid-kötésnek. A meghatározást általános szakirodalomban leírt eljárásokkal végezzük, mint például az Allen, G., "Sequencing of proteins and peptides," pp. 153-54, in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Work, T.S., és Burdon, R.H., eds. (1972) közleményben leírt eljárás. Amennyiben a molekula nem tartalmaz szabad ciszteint a 4(a) lépést végezzük el. Amennyiben van egy szabad cisztein a molekulában vagy csak egy olyan szabad csoport van, amely PEGilezési reagens által elérhető, akkor a 4(c) reakciólépést végezzük el. Amennyiben a molekula vagy protein egynél több szabad ciszteint tartalmaz az (5) reakciólépést végezzük.

(4) Amennyiben az R jelentése polipeptid és nem tartalmaz szabad ciszteint akkor az alábbi lépéseket végezzük.

(a) Mutánst alakítunk ki úgy, hogy valamely cisztein egységet vezetünk a molekulába vagy egy nem cisztein maradékot ciszteinnel helyettesítünk. Szokásos mutációs helyzetek az N vagy C terminális végek a proteinben, a glikozilezési helyzetek vagy a lizin maradékok. A mutánsokat, mint ahogy ezt korábban leírtuk, szokásos eljárással képezhetjük, amely lehet kémiai szintézis vagy rekombinációs technológia. Más eljárás esetében tiolcsoportot vezetünk be kémiai úton a molekulába.

(b) Megmérjük a molekula aktivitását és összehasonlítjuk az (2) lépésben mért aktivitás mértékkel.

(c) Amennyiben a mutáns megtartja a (2) lépésben mért aktivitást, a mutánst egy polimerrel reagáltatjuk, amely lehet például egyetlen szulfhidril-reak-

tív csoportot tartalmazó PEG molekula. Amennyiben a mutáns a mono-reaktív PEG molekulához kötődött (és így PEGilezetté válik) megmérjük az aktivitását és összehasonlítjuk a (2) lépésben mért aktivitással. Amennyiben a PEGilezett mutáns megtartja a (2) lépésben mért aktivitását a PEGilezett mutánst egy olyan PEG molekulával reagáltatjuk, amely két tiol-specifikus Michael akceptor csoportot tartalmaz, mint például bisz-maleimidet tartalmaz, és így dumbbell molekulát állítunk elő. A biológiai tesztvizsgálatot megismételjük, hogy bebizonyítsuk, hogy a dumbbell vegyületek megtartják biológiai aktivitásukat.

Amennyiben a szakember azt kívánja, hogy R_1 és R_2 molekulák eltérőek legyenek a bisz-reaktív polimert sorozatban illetve sorrendben R_1 és azután R_2 molekulával reagáltathatjuk. Mielőtt a polimert R_1 molekulával reagáltatnánk, a polimer két funkciós csoportja közül egyik funkciós csoportot védőcsoporttal látjuk el, amely bármely szakirodalomban ismert védőcsoport lehet, és így egy X vegyületen védett vegyületet állítunk elő. Lásd például Greene, T.W. és munkatársai, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Inc. (1991) közleményt, amelyet referenciaként adunk meg. Ebben az esetben a "védőcsoporttal ellátott" elnevezés alatt azt értjük, hogy a funkciós csoport nem tud reakcióba lépni. Amennyiben a funkciós csoportot tartalmazó X molekulát reagáltattuk R_1 molekulával R_1 -X általános képletű molekula és nem R_1 -X- R_1 általános képletű molekula keletkezik. Miután az R_1 -X általános képletű molekulát előállítjuk a blokkoló vagy védőcsoportot eltávolítjuk, mielőtt az R_2 molekulával végrehajtanánk a reakciót. A "védőcsoport nélküli" elnevezés alatt azt értjük, hogy a védőcsoportot eltávolítjuk vagy a funkciós csoportot más a reakció számára rendelkezésre állóvá alakítjuk.

Más eljárás szerint hetero-dumbbell molekulákat állíthatunk elő úgy, hogy az R_1 molekulát felesleg disz-aktivált polimerrel reagáltatjuk és így R_1-X általános képletű molekula képződését segítjük elő. Miután a reakció befejeződött az R_1-X-R_2 általános képletű molekulát a reakcióelegyből kromatográfiás eljárásokkal, amelyek a szakirodalomban jól ismertek, elválasztjuk, amely kromatográfiás eljárás lehet (például ioncserélő kromatográfia). Ezt követően az R_1-X általános képletű molekulát R_2 molekulával reagáltatjuk és így R_1-X-R_2 általános képletű molekulát állítjuk elő.

(d) Amennyiben a 4(a) lépésben vagy a 4(c) lépésben PEGilezett mutáns nem tartja meg biológiai aktivitását, akkor a reakciót újra kezdjük és a természetes proteinből kiindulva egy eltérő mutánst képezünk, majd megismételjük a 4(b) és a 4(c) lépéseket. Ezt követően még megtehetjük, hogy a polimer X molekulatömegét megváltoztatjuk és így a biológiai aktivitást biztosítjuk és optimaljuk.

(5) Az egynél több szabad ciszteint tartalmazó proteinek esetében mono-PEGilát képzést végzünk, majd biológiai tesztvizsgálatot hajtunk végre és ezután reagáltatjuk a bifunkcionális PEGilezési reagenssel. Amennyiben nagyobb fokú vagy rendű szerkezetek képződnek, például több mint két protein válik PEG-kapcsoltá, a dumbbell vegyületeket kromatográfiás eljárásokkal egymástól elválasztjuk, amely eljárások a szakirodalomban jól ismertek. Amennyiben az elválasztási eljárás bármely okból nem kívánatos az egyik szabad ciszteint elhagyjuk vagy helyettesítjük egy más aminosavval és a 4(b) reakciólépést hajtjuk végre.

(6) A nem protein típusú biológiai aktív R vegyületek esetében alakítsunk ki szabad szulfhidrilcsoportokat, amelyek alkalmasak a X polimerhez történő kap-

csolásra. A molekulába, amennyiben kívánatos, szabad szulfhidrilcsoportokat vezetünk be.

A szakember megválaszthatja, módosíthatja, kiegészítheti vagy elhagyhatja a fenti lépéseket. Például a szakember választhatja, hogy az aktív fehérjét bifunkcionális-PEG molekulával reagáltatja és a mono-PEGilezési lépést elhagyja.

Számos találmány szerinti dumbbell molekulát előállítottunk illetve előállítottak. A WO 92/16221 számú közzétett PCT szabadalmi bejelentésben, amelyet referenciaként adunk meg, leírták az alábbi dumbbell vegyületek előállítását bis-maleimido-PEG alkalmazásával: 30kDa TNF inhibitor homo-dumbbell IL-2 inhibitor hetero-dumbbell, a klasszikus úton komplementer rendszert inhibáló homo-dumbbell, és IL-1ra, valamint PDGF hetero-dumbbell.

Számos találmány szerinti konjugátumot vagy vegyületet (általában "konjugátok") tartalmazó gyógyszerkészítményt állíthatunk elő. Ezek a konjugátumok gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyagba foglalhatók és így találmány szerinti gyógyszerkészítmény állítható elő. A "gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyag" elnevezés alatt, nem toxikus, általában inert, az aktív hatóanyaggal kölcsönhatásba nem lépő hordozóanyagokat értünk, amelyek az egyes hatóanyagot illetve a beteget ellentétes befolyással nem károsítják. Alkalmas hordozóanyagokat vagy kisserelőanyagokat a szokásos gyógyszerészeti közleményekben leírtak, mint például a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980) közleményben, amelyet referenciaként adunk meg. Az ilyen hordozóanyagok például lehetnek vizes oldatok, mint például hidrogén-karbonát pufferek, foszfát pufferek, Ringer oldatok és fiziológiai sóoldat.

Ezen túlmenően a hordozóanyag egyéb gyógyszerészetileg elfogadható segédanyagokat is tartalmazhat, abból a célból, hogy a pH értékét, az ozmózis jellemzőket, a viszkózitást, az áttetszőséget, a színt, a sterilitást, a stabilitást, az oldódás sebességét vagy a készítmény szagát megváltoztassuk.

A gyógyszerkészítményeket a szakirodalomban ismert eljárásokkal állíthatjuk elő, mint például az egyes reagensek egyszerű keverésével. A szakember meg tudja választani a gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyagot illetve a készítmény előállítási eljárást, attól függően, hogy milyen módon vagy úton kívánja a készítményt alkalmazni.

Az egyik megvalósítás szerint a hordozóanyagot és a konjugátumot úgy elegyítjük, hogy egy fiziológiailag kompatibilis lassú hatóanyag kibocsátású készítményt nyerjünk. Az ilyen hordozóanyagban az elsődleges oldószer lehet vizes vagy nem vizes típusú. Ezen túlmenően a hordozóanyag tartalmazhat egyéb, farmakológiailag elfogadható módosító segédanyagokat, amelyek fenntartják a pH-t, az ozmózis jellemzőket, a viszkózitást, az áttetszőséget, a színt, a sterilitást, a stabilitást, az oldódási sebességet vagy szagértéket vagy ezt módosítják a készítményben. Hasonlóan a hordozóanyag még egyéb gyógyszerészetileg elfogadható módosító segédanyagokat tartalmazhat, amelyek módosítják vagy fenntartják a konjugátum stabilitását, oldódási sebességét, kibocsátási sebességét vagy abszorpcióját. Ilyen segédanyagok olyan anyagok lehetnek, amelyeket széleskörűen kereskedelmileg alkalmaznak a parenterális adagolás céljára alkalmazott dózis formákban, amely lehet egységdózis vagy több dózisos forma.

Amikor a gyógyszerkészítmény előállítottuk ezt steril ampullákban oldat formában, szuszpenzió formában, gél formában, emulzió formában, szilárd for-

mában vagy dehidratált vagy liofilizált por formában tárolhatjuk. Az ilyen készítményeket tárolhatjuk egy könnyű alkalmazási formában vagy egy közvetlen adagolás előtt rekonstitúciót igénylő formában. Előnyös tárolási forma az ilyen készítmények esetében a legalább 4 °C, előnyösen -70 °C hőmérséklet értéken történő tárolás. Továbbá előnyös, hogy a konjugátumot tartalmazó készítményeket fiziológiai pH érték mellett vagy eközeli értéken tároljuk és adagoljuk. A kísérletek alapján feltételezzük, hogy a magas pH értékek melletti adagolás (azaz nagyobb mint 8 pH) vagy az alacsony pH érték mellett (azaz kisebb mint 5 pH) nem kívánatos.

A konjugátumokat tartalmazó készítmények adagolási útja szisztémás esetben lehet szubkután, intramuszkuláris, intravénás, orális, intranazális, vaginális vagy rektális kúp adagolás. Előnyösen a konjugátumot tartalmazó készítmények adagolási formája lokális kibocsátás céljára izületbe történő, légcsőbe történő adagolás vagy a légzőrendszerbe végzett beültetés vagy inhalálás. Ezen túlmenően kívánatos lehet, hogy a konjugátumokat a táplálkozási bélrendszer adott helyzetébe adagoljuk vagy orális adagolás segítségével, amelyben a megfelelő készítményben foglalt konjugátumot adagoljuk vagy valamely eszköz segítségével.

Például az osteoporosis és egyéb csontvesztéssel járó betegségek kezelésében alkalmasan először egy intravénás bólus TNF inhibitor konjugátumot adagolunk, majd IL-1 inhibitor konjugátumot adagolunk és ezt egy folyamatos intravénás infúzióban adagolt TNF inhibitor konjugát adagolása és IL-1 inhibitor konjugátum adagolása követ. Az orális adagolás céljára a konjugátot kapszulába foglalkuk. A kapszulába foglalt konjugátot kereskedelembe kapható szilárd dózis-

formákban alkalmazott gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyagokkal együtt vagy enélkül alkalmazhatjuk. Előnyösen a kapszulát úgy alakítjuk ki, hogy a készítmény aktív része a gasztrointesztinális traktusban, azon a helyen kerüljön kibocsátásra, ahol a biológia felszívódása maximális és a preszisztémás lebomlás minimális. Más segédanyagokat is alkalmazhatunk, amely elősegítik a konjugátum abszorpcióját. Ezen túlmenően hígítóanyagokat, ízesítőanyagokat, alacsony olvadáspontú viaszokat, növényi olajokat, kenőanyagokat, szuszpendálószerkeket, tablettá dezintegrálószerkeket és kötőanyagokat is alkalmazhatunk.

Az adagolás útjától függetlenül az adott dózist a kezelt beteg körülbelüli testtömege alapján számítják. A megfelelő dózis kialakításában szerepet játszó más faktorok a betegség vagy rendellenesség típusa, amelyet kezelni vagy megelőzni kívánunk, az adagolás útja, a beteg kora, neme illetve egészségi állapota. Bizonyos megvalósítás során az adagolást úgy tervezzük, hogy a beteg vérérmájában egy előre megválasztott konjugátum koncentrációt biztosítsunk. Például feltételezhető, hogy amennyiben a TNF inhibitor és az IL-1 inhibitor keringési rendszerben való fenntartott koncentrációja kisebb mint 0,1, ng/ml plazma nem hatásos a készítmény, míg amennyiben a meghosszabbított időtartamon át fenntartott keringési rendszerbeni koncentráció 10 µg/ml érték ez nem kívánatos hatásokat is okozhat. A megfelelő dózis kialakításának módszere minden egyes fenti készítmény esetében szokásosan ismert a szakember számára és ezt rutinszerűen elvégezhetik különösebb, előzetes vizsgálatok nélkül, és felhasználhatják erre az itt közölt dózis információkat és tesztvizsgálatokat. A dózis értékeket jól beállíthatják annak felhasználásával, amit a továbbiakban a példákban leírunk

illetve a tesztvizsgálatok alapján, amelyeket az alkalmazott dózisok esetében elvégeztünk és a megadott dózis - válaszfüggvény adatok alapján.

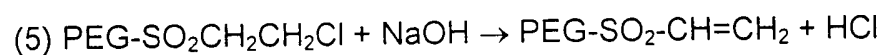
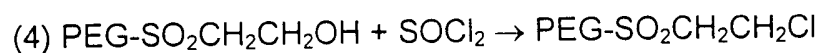
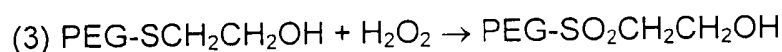
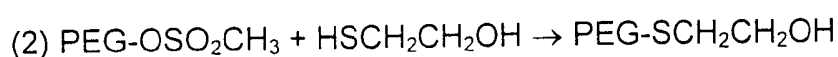
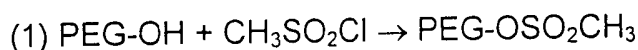
Megjegyezendő, hogy a konjugát készítményeket, amelyeket a fentiekben leírtunk, állatgyógyászati továbbá humán alkalmazásra is felhasználhatjuk és így a "beteg" elnevezés alatt nem limitált kört értünk. Amennyiben állatgyógyászati felhasználásra alkalmazzuk a találmány szerinti vegyületeket a dózis határértékek a korábban leírtak lehetnek.

A találmány szerinti vegyületeket és előállítási eljárásokat az alábbi példákban részletesen bemutatjuk. A példák nem jelentik a találmány tárgykörének korlátozását.

1. példa

Előállítási eljárás

A reakciólépéseket az alábbi egyenletekkel jellemezzük:



A fenti reakciókat az alábbiakban egyenként részletesen ismertetjük.

1. reakció: Az 1. reakciólépésben bemutatjuk a polietilén-glikol metán-szulfonil-észterének előállítását, amelyet másnéven polietilén-glikol-metán-szulfonát vagy polietilén-glikol-mezilát névvel jelölünk. Az úgynevezett tozilát-

-származékok, valamint a halogenid-származékok hasonló eljárással állíthatók elő, amelyek a szakember számára ismertek.

A mezilát előállítás céljára 25 g PEG vegyületet állítunk elő, amelynek molekulatömege 3400 és amelyet azeotróp desztilláció segítségével 150 ml toluol alkalmazásával szárítunk. Körülbelül a toluol felét kell ledesztillálnunk ahhoz, hogy a PEG vegyületet megszársítsuk. Ezt követően az elegyhez 40 ml diklórmétánt adagolunk és így egy kevert PEG toluol-diklórmétános oldatot nyerünk. Az oldatot ezután jeges hűtőfürdővel lehűtjük, majd a lehűtött oldathoz 1,23 ml desztillált metán-szulfonil-kloridot adunk, amely tömeg számításban 1,6 ekvivalens mennyiségű a PEG hidroxilcsoportokra vonatkoztatva. Ezt követően az elegyhez 2,66 ml száraz trietilamint adunk, amely tömeg vonatkozásában 1,3 ekvivalens a PEG-hidroxilcsoportokra. Az "ekvivalens tömeg" elnevezés alatt azt értjük, hogy ez az "elegyített tömeg" és a vegyület azon tömege, amely 1 ekvivalens tömegű PEG-hidroxilcsoporttal reagál.

A reakcióelegyet éjszakán át kevertük, amely időtartam alatt szobahőmérsékletre melegszik. A trietil-ammónium-hidroklorid az elegyből csapadékként kiválik és a csapadékot szűrővel eltávolítjuk. Ezt követően a szűrlet térfogatát rotációs bepárlón 20 ml térfogatra csökkentjük. A mezilát terméket 100 ml hideg száraz etil-éter adagolásával csapadékként leválasztjuk. A magmágneses rezonancia spektrum (NMR) azt mutatja, hogy a hidroxilcsoportok 100%-os konverziója történt mezilát-csoportokká.

2. reakció: A 2. reakciólépésben bemutatjuk a polietilén-glikol-merkaptó-
-etanol előállítási eljárását, amelynek során a mezilát vegyületet merkaptó-etanolal reagáltatjuk. A reakció során a metánszulfonát-csoport a PEG molekulában

szubsztitúciós reakciót szenved. A merkaptó-etanol-csoportban található kénatom közvetlenül a PEG molekula szén-szén kötéséhez tartozó szénatomhoz kapcsolódik.

Az 1. reakciólépéséből származó mezilát 20 g-ját 150 ml desztillált vízben oldjuk. A vizes mezilát oldatot jeges fürdőbe történő merítéssel lehűtjük. A lehűtött oldathoz 2,37 ml merkaptó-etanolt adunk, amely tömegarányban 3 ekvivalens mennyiségű a PEG-hidroxilcsoportokra vonatkoztatva. Ezen túlmenően az elegyhez 16,86 ml 2n NaOH bázist adagolunk. A reakcióelegyet 3 órán át visszafolyatás melletti forrás hőmérsékletre melegítjük.

Ezt követően a polietilén-glikol-merkaptó-etanol terméket háromszor diklórmetánnal extraháljuk körülbelül 25 ml diklórmetánt alkalmazva minden egyes alkalommal. A szerves frakciókat egyesítjük, majd vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk. A kapott elegy térfogatát 20 ml térfogatra csökkentjük, majd a terméket 150 ml hideg száraz éter alkalmazásával csapadékként leválasztjuk.

NMR spektrum [d_6 -DMSO (dimetil-szulfoxid)]: PEG-SCH₂CH₂OH: 2.57 ppm, triplet, -CH₂S-; 2.65 ppm, triplet, -S-CH₂-; 3.5 ppm, hátsó kötés; és 4.76 ppm, triplet, -OH. Az -S-CH₂-csoport csúcsának integrált értéke 100% szubsztitúciót mutat.

3. reakció: A 3. reakciólépésben bemutatjuk a polietilén-glikol-merkaptó-etanol termék peroxiddal végzett oxidációs eljárását, amelyben a kénatomot (S) szulfoncsoporttá (SO₂) alakítjuk és így PEG-β-hidroxi-szulfon vegyületet állítunk elő.

20 g PEG-SCH₂CH₂OH vegyületet oldunk 30 ml 0,123m volframsav oldatban, majd a keveréket jeges fürdővel lehűtjük. A Wolframsav oldatot úgy készít-

jük, hogy a savat nátrium-hidroxid oldatban oldjuk pH = 11,5 érték mellett, majd a pH értéket jégecet segítségével 5,6 értékre állítjuk be. Ezt követően az elegyhez 20 ml desztillált vizet és 2,88 ml 30%-os hidrogén-peroxid oldatot adunk, amely 2,5 tömeg ekvivalens a hidroxilcsoportokra vonatkoztatva. A Wolframsav oldathoz ezzel együtt polietilén-glikol-merkaptó-etanolt adagolunk, majd a reakcióelegyet hagyjuk éjszakán át szobahőmérsékletre melegedni.

Az oxidált terméket 3 x 25 ml diklórmetán segítségével extraháljuk. Az egyesített frakciókat híg vizes nátrium-hidrogénkarbonát oldattal mossuk, majd vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk. Ezután az elegy térfogatát 20 ml értékre csökkentjük. A PEG- β -hidroxi-szulfon terméket hideg száraz etil-éter adagolásával csapadékként leválasztjuk.

NMR spektrum (d_6 -DMSO): PEG-SCH₂CH₂OH: 3.25 ppm, triplet, -CH₂-SO₂-; 3,37 ppm, triplet, -SO₂-CH₂-; 3.50 ppm, hátsó kötés; 3,77 ppm, triplet, -CH₂OH; 5,04 ppm, triplet, -OH. Az 5,04 ppm értéknél jelentkező hidroxilcsoportra vonatkozó csúcs 85%-os szubsztitúciót jelent, azonban a 3,37 ppm értékénél az -SO₂-CH₂- csoportra vonatkozó csúcs 100%-os szubsztitúciót mutat és ez valószínűleg megbízhatóbb.

4. reakció: A 4. reakciólépésben bemutatjuk a szintézis utolsó lépését, az izolálást és a polietilén-glikol-klór-etil-szulfon jellemzését.

A termék előállítása céljára 20 g PEG-SO₂CH₂CH₂OH vegyületet, azaz PEG- β -hidroxi-szulfont oldunk 100 ml frissen desztillált tionil-kloridban, majd az oldatot éjszakán át visszafolyatás melletti forrás hőmérsékleten forraljuk. A tionil-kloridot kinolinról desztillált formában alkalmazzuk. Ezt követően a tionil-kloridot desztilláció segítségével eltávolítjuk. A kapott maradékhoz 50 ml toluolt és 50 ml

diklórmetánt adagolunk, majd ezeket az oldószereket desztilláció segítségével eltávolítjuk.

A PEG-klór-etil-szulfon termék izolálása céljából az elegyet 20 ml diklórmetánban oldjuk, majd 100 ml hideg száraz etil-éter adagolásával a terméket csapadékként leválasztjuk. A csapadékot 50 ml etilacetát oldószerből átkristályosítjuk és így a terméket izoláljuk.

NMR spektrum: PEG-SO₂CH₂CH₂Cl (d₆-DMSO): 3,50 ppm, hátsó kötés; 3,64 ppm, triplet, -CH₂SO₂-; 3,80 ppm, triplet, -SO₂-CH₂-. A 3,94 ppm értéknél kis mennyiségű hidroxilcsoportra jellemző szennyezés triplet jelenik meg. A szubsztitúció számítása ezen az alapon igen nehéz, mivel a jelentős csúcsok igen közel találhatóak ehhez a csúcshoz, amelyek a hátsó kötésre jellemzőek.

5. reakció: Az 5. reakciólépésben bemutatjuk a 4. reakciólépésből származó polietilén-glikol-klór-etil-szulfon átalakítását polietilén-glikol-vinil-szulfonná, valamint a termék izolálását és a vinil-szulfon-termék jellemzését.

A PEG-vinil-szulfont könnyen előállíthatjuk úgy, hogy a szilárd PEG-klór-etil-szulfont diklórmetán oldószerben oldjuk, majd az oldathoz 2 ekvivalens NaOH bázist adagolunk. Az oldatot ezután leszűrjük, hogy a bázist eltávolítsuk, majd az oldószert elpárologtatjuk és így a végterméket nyerjük, amely PEG-SO₂-CH=CH₂ képletű vegyület, azaz PEG-vinil-szulfon.

A PEG-vinil-szulfont NMR spektrum segítségével analizáljuk (d₆-DMSO, dimetil-szulfoxid oldószer): 3,50 ppm, hátsó kötés; 3,73 ppm, triplet, -CH₂-SO₂; 6,21 ppm, triplet, =CH₂; 6,97 ppm, dublett, -SO₂-CH-. A 6,97 ppm értéknél jelentkező -SO₂-CH- csúcs 84%-os szubsztitúciót jelez. A 6,21 ppm értéknél jelentkező csúcs a =CH₂ csoportra vonatkozóan 94%-os szubsztitúciót jelent. A mer-

kapto-etanollal és 2,2'-ditio-dipiridinnel végzett titrálás 95%-os szubsztitúciót mutat.

2. példa

Tiol-szelektív reaktivitás

A 2. példa szerinti eljárás bemutatja, hogy a PEG-vinil-szulfon és ennek prekuzora a PEG-klór-etil-szulfon jóval nagyobb reaktivitást mutat a tiolcsoportokkal (-SH) szemben mint az aminocsoportokkal (-NH₂-) szemben vagy az iminocsoportokkal (-NH-) szemben. A tiolcsoportot tartalmazó vegyületek olyan szerves anyagok, amelyek az alkoholokhoz hasonlóak, amely alkoholok hidroxilcsoportot -OH tartalmaznak, azzal az eltéréssel, hogy a tiolcsoportok oxigén helyett kénatomot tartalmaznak a csoportban. A tiolcsoportokat esetenként, mint ahogy korábban is tettük, szulfhidril-csoportoknak vagy merkapto-csoportoknak nevezzük. A PEG-vinil-szulfon egy -SO₂-CH=CH₂ vinil-szulfon-csoportot tartalmaz. A PEG-klór-etil-szulfon egy -SO₂CH₂CH₂Cl-klór-etil-szulfon-csoportot tartalmaz.

A polimerek szelektivitása jelentős, mivel ez azt jelenti, hogy a cisztein-egységekkel (amelyek -SH csoportot tartalmaznak) reagálnak és ezeket előnyben részesítik a lizin-maradékokkal szemben (amelyek -NH₂ csoportokat tartalmaznak) valamint a hisztidin-egységekkel szemben (amelyek -NH- csoportokat tartalmaznak). A PEG-vinil-szulfon tiolokkal szembeni szelektivitása azt jelenti, hogy az ilyen PEG szelektíven kapcsolódik a cisztein-egységekhez és így megőrzi az adott proteinek aktivitását, illetve ezzel szabályozni lehet a proteinhez kapcsolódó PEG-molekulák számát.

A PEG-vinil-szulfonok relatív reaktivitását a tiolcsoportokkal, illetve az aminocsoportokkal szemben úgy határoztuk meg, hogy mértük a reakció sebességét, amelyben a PEG-vinil-szulfon N- α -acetil-lizin-metilészterrel, illetve merkaptó-etanollal reagál. Az N- α -acetil-lizin-metilészter egy lizin modell vegyület, amely aminocsoportot tartalmaz és ez a Lys-NH₂ képlettel jellemezhető. A merkaptó-etanol cisztein-modellként szerepel, amely tiolcsoportot tartalmaz és ezt a Cys-SH jelöléssel jelöljük. A PEG-klór-etil-szulfon relatív reaktivitását hasonló módon határozzuk meg. Ez a molekula mint úgynevezett "védett" molekula szerepelhet a vinil-szulfonnal szemben, mivel ez stabil savas körülmények között, azonban bázis adagolásával PEG-vinil-szulfonná alakul át.

A PEG-vinil-szulfon és a PEG-klór-etil-szulfon prekursor aktivitását, illetve reaktivitását pH 8,0; pH 9,0 és pH 9,5 értékek mellett vizsgáljuk. A pH értéket szabályozó pufferek 0,1M foszfát volt pH 8,0 értékénél és 0,1M borát volt a pH 9,0 valamint a pH 9,5 értéknél. A merkaptó-etanol-reaktivitás mérése céljából a két pufferhez 5 mmol etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) adagoltunk, abból a célból, hogy a tiol diszulfiddá történő átalakulását késleltessük.

A találmány szerinti PEG-származékok Lys-NH₂ molekulával történő reakciója során 3 mmol PEG-származék oldatot adagoltunk keverés közben 0,3 mmol Lys-NH₂ oldathoz, amely megfelelő pufferben készült és így biztosította a fenti három bázikus pH értéket. A reakció előrehaladását a reakcióelegybe adagolt fluoreszkamin segítségével vizsgáltuk, amely a maradó aminocsoportokkal egy fluoreszcens származékot képezett. A reakció előrehaladását úgy végeztük, hogy 50 μ l reakcióelegyet adagoltunk 1,95 ml foszfát pufferelt pH 8,0 értékű elegyhez, majd az elegyhez 1,0 ml fluoreszkamin oldatot adagoltunk erős keverés közben.

A fluoreszkamin oldat 1 ml acetonra vonatkoztatva 0,3 mg fluoreszkamint tartalmazott.

A fluoreszcenciát 10 percen át történő keverés után mértük. A mérést 390 nm besugárzás érték mellett hajtottuk végre. Enyhe emisszió tapasztalható 475 nm érték mellett. Nem figyelhető meg reakció 24 órán belül sem a PEG-vinil-szulfon, sem a PEG-klór-etil-szulfon esetében pH 8,0 érték mellett. A pH 9,5 érték mellett a reakció lassú, azonban több napon át végzett reakció során az összes aminocsoport elreagál.

A PEG-vinil-szulfon, valamint a PEG-klór-etil-szulfon prekursor Cys-SH vegyülettel történő reakciója érdekében 2 mmol PEG-származék oldatot adagolunk 0,2 mmol Cys-SH megfelelő pufferben készült oldatához, amely puffer mindhárom fenti pH bázikus értéket biztosítja. A reakciót 4-ditio-piridin adagolásával, amelyet a reakcióelegyhez végzünk, követjük. A 4-ditio-piridin a Cys-SH molekulával reakcióba lép, és így 4-tio-piridon keletkezik, amely UV sugárzást abszorbeál.

A reakció előrehaladását követő tesztvizsgálatot úgy hajtjuk végre, hogy 0,95 ml 0,1M foszfát puffer (pH 8,0), amely 5 mmol EDTA tartalmú elegyéhez 50 µl reakcióelegyet adagolunk, majd ezután az elegyhez 1 ml hasonló pufferben készült 2 mmol 4-ditio-piridint adagolunk.

A 4-tio-piridon abszorpcióját 324 nm hullámhossz mellett mérjük. A PEG-vinil-szulfon és a PEG-klór-etil-szulfon reaktivitása a Cys-SH vegyülettel szemben nyilvánvaló, azonban a PEG-vinil-szulfon nagyobb reaktivitást mutat. 9,0 pH érték mellett a reakció 2 percen belül befejeződik, amennyiben vinil-szulfont alkalmazunk és 15 percen belül befejeződik, amennyiben klór-etil-szulfont alkalmazunk.

zunk. Azonban ezek a reakciók túl gyorsan zajlanak le ahhoz, hogy a megfelelő sebességi állandókat meghatározhassuk. 8,0 pH érték mellett a reakciók lassabban zajlanak le, de ebben az esetben is a vinil-szulfon esetében 1 órán belül befejeződnek és a klór-etil-szulfon esetében 3 órán belül befejeződnek. A klór-etil-szulfon vinil-szulfonná történő átalakulása jelentősen lassabb, mint a vinil-szulfon Cys-SH vegyülettel történő reakciója. A klór-etil-szulfon reakciója a Cys-SH csoporttal függ a klór-etil-szulfon vinil-szulfonná történő átalakulásának sebességétől. Ennek ellenére ezek a reakciósebesség értékek sokkal nagyobbak mint az a sebesség, amelyet Lys-NH₂ csoportokkal elérhetünk.

A fenti kinetikai vizsgálatok azt mutatják, hogy az alábbi történik. A PEG-vinil-szulfon sokkal reaktívabb tiolcsoportokkal szemben, mint aminocsoportokkal szemben. Ez azt jelzi, hogy egy cisztein és lizin tartalmú protein esetében a PEG-vinil-szulfon kapcsolódása elsősorban a cisztein-egységekkel történik. Mivel a reaktivitás az aminocsoportokkal szemben hasonló az iminocsoportokkal szembeni reaktivitással, a hisztidin-csoportok reaktivitása ugyancsak sokkal alacsonyabb mint a cisztein-csoportok reaktivitása. Ezen túlmenően a tiolcsoportokkal szemben szelektivitás alacsonyabb pH értékek esetében a PEG-klór-etil-szulfon, valamint a PEG-vinil-szulfon estében is megnövekszik, habár a PEG-klór-etil-szulfon reakciója bizonyos mértékben lassabb.

A PEG-szárazékok közül számos származék alkalmazhatósága limitált, mivel ezek vízzel gyorsan reagálnak, és így vizes körülmények között nem képesek a molekulák, illetve felületek megfelelő származékaival reagálni. Az alábbi 3. példában bemutatjuk, hogy a PEG-vinil-szulfon, valamint a PEG-klór-etil-szulfon vízben stabilis.

3. példa

Hidrolitikus stabilitás

PEG-vinil-szulfon oldunk nehézvízben (D_2O , deutérium-oxidban), majd az oldódást NMR spektrum segítségével követjük. Nem történik reakció. PEG-klór-etil-szulfon oldatot, amely PEG-vinil-szulfon képez nehézvízben, borát pufferrel pufferelünk pH 9,0 értékre. Az NMR spektrum segítségével mért érték azt mutatja, hogy amennyiben a PEG-vinil-szulfon kialakul, ez nehézvízben 3 napon át stabil.

A PEG-klór-etil-szulfon vízben stabil mindaddig amíg az oldat bázikussá nem válik, majd ebben az esetben vinil-szulfonná alakul át. A vinil-szulfonra történő átalakulást úgy mérhetjük, hogy a PEG-klór-etil-szulfon pH 7 értéknél vízben oldjuk, majd borát puffer segítségével az oldatot pH 9 értékre lúgosítjuk. A PEG-származékot diklórmétánnal extraháljuk. A diklórmétánt elpárologtatjuk, majd a terméket NMR spektrum segítségével analizáljuk, amely azt mutatja, hogy a PEG-klór-etil-szulfon pH 7,0 semleges érték mellett stabil, bázissal azonban reagál és így PEG-vinil-szulfon keletkezik.

A vinil-szulfon több napon át vízben stabil még bázikus pH értékek mellett is. A PEG-vinil-szulfon nagymértékű hidrolitikus stabilitása és tiol-specifikus reaktivitása azt jelzi, hogy a PEG-vinil-szulfon és ennek prekursorai alkalmasak molekulák és felületek módosítására vizes körülmények között, amelyet a 4. példa szerinti eljárásban bemutatunk.

4. példa

BSA vegyülethez történő konjugálás

A protein módosítást úgy mutathatjuk be, hogy a PEG-származékot marhaszérum albumin (BSA)-hoz kapcsoljuk különféle eljárások segítségével. Két eljárást alkalmazhatunk. A BSA (marhaszérum albumin) egy fehérje vegyület. A természetes nem módosított BSA cisztin-csoportokat tartalmaz, amelyek nem tartalmaznak tiolcsoportokat. A cisztin-egységek diszulfid-kötésekben S-S vesznek részt.

Az első eljárás szerint 5000 molekulatömegű m-PEG (monometoxi-PEG)-vinil-szulfont reagáltatunk nem módosított BSA vegyülettel. A reakciót 24 órán át 0,1M borát-pufferben 9,5 pH érték mellett szobahőmérsékleten végezzük. Az oldat továbbá 1 mg DSA és 1 mg m-PEG-vinil-szulfon (amelynek molekulatömege 5000) tartalmú 1 ml oldatra vonatkoztatva. A 2. példa szerinti eljárások szerinti modell vegyületek azt mutatják, hogy a lizin-csoportok (és talán a hisztidin-maradékok is) ilyen viszonylagosan bázikus körülmények között módosulnak és a szabad tiolcsoportok jelenléte nélkül reakcióra alkalmassá válnak.

A lizin-csoportokhoz való kapcsolódást két módon mutatjuk ki. Az első módszer szerint méretmeghatározó kromatográfiát végzünk, amely a protein molekulatömegét mutatja, ami körülbelül 50%-kal megnövekedett és ez azt jelenti, hogy körülbelül 10 PEG molekula kapcsolódott a proteinhez. A második vizsgálat, amely fluoreszkamin analízis, azt mutatja, hogy a BSA molekulában a lizin-csoportok körülbelül 10 mértékben redukálódtak.

A második eljárás szerint a BSA molekulát tributil-foszfínnal reagáltatjuk, és így az S-S diszulfid-csoportokat tiolcsoportokká (-SH) alakítjuk, amelyek a reakci-

óban reaktánsokként szerepelhetnek. Ezt követően a módosított BSA molekulát PEG-klór-etil-szulfonnal pH 8,0 értéken reagáltatjuk 0,1m foszfát-pufferben szobahőmérsékleten. A reakciót 1 órán át végezzük és a kapott oldat 1 mg módosított BSA molekulát tartalmazott, továbbá 1 mg m-PEG-klór-etil-szulfont (molekulatömege 5000) tartalmazott milliliterenként. Az eredmény azt mutatja, hogy a lizin-csoportok ilyen körülmények között nem reaktívak, ugyanakkor a jelenlevő tiolcsoportok reaktívnak mutatkoztak.

A PEG molekula kapcsolódását a fehérjéhez (protein) úgy mutathatjuk ki, hogy méretkizáró kromatográfiát alkalmazunk. Ez az eljárás azt mutatja, hogy a protein molekulatömege körülbelül 25%-kal megnövekedett. A fluoreszkamin analízis nem jelzett változást a lizin-csoportok számában a proteinben és ez azt jelenti, hogy a PEG kapcsolódás nem a lizin-csoportokon történt. A tiolcsoportokon történő szubsztitúció ezzel bizonyított.

5. példa

Vinil-szulfon-NH-észter hetero-bifunkcionális PEG (3,400) reagens

előállítása

A PEG-(3,400)- ω -vinil-szulfon- α -propionsav szukcinimidil-észtert több lépésben állítjuk elő. Az 1. lépésben a PEG-(3,400)- ω -hidroxi- α -propionsavat állítjuk elő. A 2. lépésben az etilésztert ω -metilát-származékká alakítjuk. A 3. lépésben a metzilát-származékot alkalmazzuk az ω -tio-etanol-származék előállítására. A 4. lépésben a tio-etanol-származékot a megfelelő ω -hidroxi-szulfonná alakítjuk. Az 5. lépésben a hidroxi-szulfon-vegyületet az ω -vinil-szulfonná alakítjuk. Ez utóbbi

α -etil-észtert a megfelelő α -propionsavvá alakítjuk a 6. reakciólépésben, végül a propionsav-csoportot szukcinimidil-észter csoporttá alakítjuk. A részletes szintetikus eljárást az alábbiakban bemutatjuk.

1. reakciólépés: 15,0 g PEG-(3,400)- ω -vinil-szulfon- α -propionsav, 75 ml vízmentes etilalkohol és 3 ml kénsav elegyét 1 órán át visszafolyatás melletti forrás hőmérsékletre melegítjük. Ezt követően az elegyet szobahőmérsékletre hűtjük, majd az elegyhez 50 ml vizet adagolunk és ezután az elegy pH értékét nátrium-hidrogénkarbonát segítségével 7 értékre állítjuk be. Az elegyből ezt követően vákuumban rotációs bepárlón 55°C hőmérsékleten fél óra időtartam alatt az etil-alkoholt ledesztilláljuk. A reakcióterméket ezután 60, 50 és 40 ml diklórmétánnal extraháljuk. A kapott extraktumot vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk, majd 50 ml térfogatra bepároljuk. Ezután a maradékot 400 ml hideg dietil-éterhez adagoljuk. A kivált terméket leszűrjük, majd vákuumban megszáritjuk. Így 13,1 g etil-észtert nyerünk. Az NMR spektrum analízis azt mutatja, hogy a termék 49% propionsav-etilészter-csoportot és 51% PEG-OH-csoportot tartalmaz.

2. reakciólépés: 13,0 g (0,0038 mol) 1. reakciólépésben nyert etilészter-származék 100 ml toluolban készült oldatához 2,0 g BHT vegyületet adagolunk és ezután visszafolyatás melletti forrás hőmérsékletre melegítve ezt azeotróp módon megszáritjuk. Ezt követően a kapott anyaghoz 15 ml száraz diklórmétánt, 0,60 ml (0,0043 mol, 1,15-szörös felesleg) trietilamint és 0,31 ml (0,0040 mmol, 1,07-szeres felesleg) mezil-kloridot adagolunk. Az adagolást 5°C hőmérsékleten véghezvük, majd az elegyet szobahőmérsékleten nitrogén atmoszférában északán át keverjük. Ezután az elegyhez 2 ml vízmentes etanolt adagolunk, majd az elegyet 15 percen át keverjük. A keveréket ezután leszűrjük, majd a szűrletből vákuum-

desztilláció segítségével körülbelül 70 ml oldószert elpárologtatunk. Így a PEG- ω -mezilát- α -propionsav-etilészter toluolos oldatát nyerjük.

3. reakciólépés: A reakciólépésben körülbelül 40 ml (0,00375 mol) 2. reakciólépésben nyert PEG- ω -mezilát- α -propionsav-etilészter oldathoz adagolunk 150 ml vízmentes etil-alkoholt 1,79 ml (0,0139 mol, 3,69-szeres felesleg) merkaptó-etanolt és 0,45 g (0,0011 mol, 3,0-szeres felesleg) nátrium-hidroxidot, amely 20 ml vízmentes etilalkoholban oldott. A kapott reakcióelegyet 3 órán át nitrogén atmoszférában 58-62°C hőmérsékletre melegítjük. Ezt követően az elegyet szobahőmérsékletre hűtjük, majd ecetsav segítségével pH értékét körülbelül 6,5 értékre állítjuk be. Ezután az elegyből 140 ml etilalkoholt vákuumban rotációs bepárló segítségével 55°C hőmérsékleten 40 perc időtartam alatt ledesztillálunk. A desztilláció után a maradékhoz 50 ml diklórmétánt adagolunk. A kapott oldatot desztillált vízzel mossuk, majd vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk. Ezután az oldatot 30 ml térfogatra bepároljuk, majd a maradékhoz 350 ml hideg dietil-étert adagolunk. A csapadékként kivált terméket leszűrjük, majd vákuumban megszáritjuk. A tio-etanol-származék termelése 11,5 g. Az NMR spektrum azt mutatja, hogy 52% tio-etanol-csoportot 35% propionsav-etilészter-csoportot és 13% PEG-OH-vegyületet tartalmaz.

4. reakciólépés: Ezután 11,5 g PEG- ω -tio-etanol- α -propionsav-etilészter 12 ml desztillált vízben készült oldatát képezzük. Ugyanakkor előállítjuk a Wolframsav oldatot az alábbiak szerint: 0,14 g Wolframsav, 12,0 ml desztillált víz és 0,05 g nátrium-hidroxid keverékét 6,0 ml vízben oldjuk, majd az oldatot keverjük és így egy 11,5 pH értékű keveréket nyerünk. A kapott Wolframsav oldathoz 10%-os NaH_2PO_4 oldatot adagolunk, amíg pH értékét 6,6 értékre állítjuk be. Ezt

követően 12 ml etilészter oldatot adagolunk a 6,6 pH értékű Wolframsav oldathoz úgy, hogy a pH értéket ismét 6,6 értékre állítjuk be 0,1m NaOH oldat segítségével. Ezt követően a reakckóelegyhez 1,1 ml 30%-os hidrogén-peroxidot adagolunk, majd az elegyet 19 órán át keverjük. A keverés végén a reakcióelegy pH értéke 6,7. Ezután az elegyhez annyi 1m NaOH oldatot adagolunk, hogy pH értéke 7,2 értéket vegyen fel. Az elegyet 1 órán át keverjük, majd 45 ml desztillált vízben feloldott 5 g nátrium-kloridot adagolunk a reakcióelegyhez. A reakció termékét 3 x 50 ml diklórmétán segítségével extraháljuk. Az extraktumot magnézium-szulfáton megszáritjuk az alábbiak szerint: 10 g porított magnézium-szulfátot adunk az extraktumhoz, majd a magnézium-szulfátot 2 óra elteltével leszűrjük. A magnézium-szulfáttal száritott extraktumot 40 ml térfogatra bepároljuk, majd a kapott maradékhoz 350 ml hideg dietil-étert adagolunk. A kivált terméket leszűrjük, majd vákuumban száritjuk. A termelés 9,7 g, amely az NMR spektrum alapján 50% hidrox-szulfon-csoportot, 39% propionsav etilészter-csoportot és 11% PEG-OH-csoportot tartalmaz.

5. reakciólépés: 9,6 g (0,00271 mol) PEG- ω -hidrox-szulfon- α -propionsav etilészter, amelyet a 4. reakciólépésben állítottunk elő, 50 ml diklórmétánban készült oldata, valamint 0,01 g (0,1 tömeg% a PEG mennyiségére vonatkoztatva) BHT elegyét szobahőmérsékleten nitrogén atmoszférában keverjük. Ezt követően az elegyhez 3,00 ml (0,0215 mol, 3,97-szeres felesleg) trietilamint és 0,80 ml (0,010 mol, 3,81-szeres felesleg) mezil-kloridot adagolunk. A reakcióelegyet 15 percen át keverjük, majd leszűrjük és a szűrletet 150 ml diklórmétánnal hígítjuk. A kapott elegyet ezután 25 ml 1m sósavval, 25 ml 10%-os nátrium-klorid oldattal és 25 ml vízzel mossuk. Az elegyhez kis mennyiségű Na_2HPO_4 reagenst adagolunk

abból a célból, hogy a vizes fázis pH értékét 7 értékre állítsuk be. Ezt követően a reakcióelegyet magnézium-szulfáton megszáritjuk, majd 40 ml térfogat értékig bepároljuk. A kapott oldathoz 400 ml hideg dietil-étert adagolunk. A csapadékként kivált terméket leszűrjük, majd vákuumban szárítjuk, és így 9,1 g terméket nyerünk. Az NMR spektrum alapján az alábbi jellemzőket mérhetjük: 43% vinil-szulfon, 16% mezilát és 35% propionsav, etilészter.

6. reakciólépés: 9,0 g PEG- ω -vinil-szulfon- α -propionsav etilészter származék 50 ml desztillált vízben készült oldatához 1,0m nátrium-hidroxidot (NaOH) adagolunk, hogy az elegy pH értékét 12,0 értékre állítsuk be. Ezt követően az elegyet 1,5 órán át keverjük úgy, hogy a pH értékét 11,9-12,1 értéken tartjuk időszakos 1,0 m nátrium-hidroxid (NaOH) oldat adagolásával. Ezután az elegy pH értékét oxálsav segítségével 3,0 értékre módosítjuk. Az elegyhez 5 g NaCl sót adagolunk, majd a reakció termékét 3 x 50 ml diklórmétán alkalmazásával extraháljuk. Az extraktumot vízmentes magnézium-szulfáton megszáritjuk, majd az oldatot 30 ml térfogatra bepároljuk és az oldathoz ezt követően 350 ml hideg dietil-étert adagolunk. A kivált csapadékot leszűrjük, majd vákuumban megszáritjuk. A termelés 6,8 g. A funkciós csoportok eloszlása NMR spektrum alapján az alábbi: vinil-szulfon 40%, propionsav 29%, propionsav etilészter 4% és mezilát 17%. A csapadékot ioncserélő kromatográfia segítségével DEAE Sepharose FF oszlopon tisztítjuk. A tisztítás után a termelés 3,2 g és az NMR spektrum azt mutatja, hogy a termék 50% propionsav-csoportot, 38% vinil-szulfon-csoportot és 8% mezilát-csoportot tartalmaz.

7. reakciólépés: 3,0 g PEG- ω -vinil-szulfon- α -propionsav, 0,12 g N-hidroxiszukcinimid, 0,21 g DCC (diciklohexil-karbodiimid) 20 ml diklórmétánban készült

elegyét éjszakán át nitrogén atmoszférában szobahőmérsékleten keverjük. Ezt követően az elegyet leszűrjük, majd a szűrlethez 250 ml hideg dietil-étert adagolunk. A kivált csapadékot leszűrjük, majd vákuumban bepároljuk és így 2,90 g terméket nyerünk. Az NMR spektrum alapján az alábbiakat tapasztaljuk: szukcinimid 50%, vinil-szulfon 38%, mezilát 10% és hidroxí-szulfon 2%.

6. példa

NHS-észter hetero-bifunkcionális PEG (3.400)-maleimid reagens

előállítás

Az NHS-észter-PEG-maleimid reagenst két lépéses reakcióban állítjuk elő. Az első lépésben a maleimido-PEG-OH vegyületet állítjuk elő. Részletesebben, 0,130 g maleimido-szukcinimidil-propionátot oldunk 5 ml száraz diklórmétánban, majd az oldatot 5°C hőmérsékletre hűtjük. Ezt követően az alábbiakban leírt 0,5 g PEG-monoamint adagoljuk az elegyhez és ezután az elegyhez 2 csepp trietil-amint adunk. Az elegyet 2 órán át keverjük szobahőmérsékleten, majd vékonyrétegekromatográfia segítségével megállapítjuk, hogy a reakció befejeződött. A vékonyrétegekromatográfiás analízist n-butanol-ecetsav-víz 4:1:1 eluens alkalmazásával végezzük. Ezután a reakcióelegyet szárazra pároljuk, majd a maradékot 15 ml desztillált vízben oldjuk. Az oldat pH értékét 3 értékre állítjuk be 15 ml 0,5m HCl oldat segítségével. A kapott elegyet 10 ml diklórmétánnal extraháljuk. A szerves fázist magnézium-szulfáton megszáritjuk, leszűrjük, majd 15 ml térfogatra bepároljuk és ezután 75 ml hideg éterbe öntjük. A kivált csapadékot leszűrjük, majd vákuumban szárítjuk. 0,300 g kívánt terméket nyerünk, amely az NMR spektrum szerint 77% maleimid-csoport és 100% PEG-OH tartalmú.

A második reakciólépésben a maleimido-PEG-OH vegyületet maleimid-PEG-NHS-észterre alakítjuk. 2 ml diklórmétán, 0,05 ml piridin (1 ekvivalens), 1 ml acetonitril és 0,266 g maleimido-PEG-OH elegyét szobahőmérsékleten nitrogén atmoszférában keverjük. Az elegyhez 0,070 g (2,5 ekvivalens) N,N-di-szukcinimidil-karbonátot adagolunk, majd a reakcióelegyet éjszakán át állni hagyjuk. Ezután a reakcióelegyet körülbelül 50 ml hideg éterbe öntjük, majd a kivált csapadékot leszűrjük és vákuumban szárítjuk. Az NMR spektrum szerinti vizsgálat azt mutatja, hogy a szennyezéseket, illetve a terméket másodszor is leválaszthatjuk, és így a teljes termelés 0,230 g.

Az első lépésben a fentiekben alkalmazott PEG-monoamidot három lépéses eljárásban az alábbiak szerint állíthatjuk elő. Első lépésben a PEG-mezilát származékot állítjuk elő. A mezilát-származékból ezután amin-származékot alakítunk ki, végül a monoamint elválasztjuk a nem-származékká alakított PEG vegyülettől, valamint a diamin vegyülettől.

1. reakciólépés: PEG-3,400 (120 g, 0,07164 ekvivalens az OH csoportra vonatkoztatva) oldunk 580 ml toluolban, amelyet ezután desztilláció segítségével szárítunk. Ezt követően az elegyhez 90 ml diklórmétánt, 1,80 ml trietilamint (0,01291 mol) és 0,83 ml mezil-kloridot (0,01072 mol) adagolunk. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten éjszakán át keverjük, hogy az elegyből 90 ml oldószert ledesztillálunk vákuum alkalmazásával. A kapott keveréket leszűrjük, majd 500 ml-t desztillálunk le a keverékből vákuum alkalmazásával. A maradékot ezután 800 ml hideg dietil-éterhez adagoljuk. A kivált csapadékszerű terméket leszűrjük, majd vákuumban megszáritjuk. A termelés 118 g, a szubsztitúció foka 15%.

2. reakciólépés: Az 1. reakciólépésben nyert 118 g mezilátot és 80 g ammónium-kloridot 1600 ml tömény vizes NH_4OH oldatban oldunk. Az oldatot ezután 44 órán át szobahőmérsékleten keverjük. A reakció termékét 600, 400, majd 200 ml diklórmétán alkalmazásával extraháljuk. Az extraktumot ezt követően 170 ml 2%-os KOH oldattal, majd 170 ml vízzel mossuk. Ezután a szerves oldatot magnézium-szulfáton megszáritjuk, majd 200 ml térfogatra bepároljuk. A kapott bepárolt oldatot 800 ml hideg dietil-éterbe öntjük. A csapadékként kivált terméket le-szűrjük, majd vákuumban szárítjuk. 106 g terméket nyerünk, ahol a szubsztitúció foka 15,6%.

3. reakciólépés: 45 g 2. reakciólépésben nyert amint oldunk 9 liter vízben, majd az elegyet SP-Sepharose FF (300 ml 1000 ml citromsav-nátrium citrát pufferral (amely 0,04%-os, pH 3,0 értékű), majd vízzel mosott) oszlopra visszük. Az SP-Sepharose oszlop rendelkezésre áll a Pharmacia, Uppsala, Sweden cég részéről. A PEG nem származékká alakított formát az oszlopról vízzel mossuk le. Ezt követően a PEG-monoamin-származékot eluáljuk 800 ml 20 mmol NaCl eluens alkalmazásával. Az eluátum pH értékét 1M NaOH segítségével 11 értékre állítjuk be, majd a PEG-monoamin-származékot diklórmétánnal extraháljuk. Az extraktumot magnézium-szulfáton megszáritjuk, majd az oldószert elpárologtatjuk. 9 g terméket nyerünk.

7. példa

PEG- α,ω -bisz-vinil-szulfon előállítása

A 3,400 és 20,000kDa PEG-bisz-vinil-szulfon előállítását PEG-diol alkalmazásával, valamint fent leírt általános eljárással végezzük. A PEG-diol vegyület a

Fluka Chemical Corporation (Ronkonkoma, New York) terméke. Ugyanez beszerezhető a Nippon Oil and Fat (Tokyo, Japan) cégtől is.

8. példa

IL-1ra pegilezése PEG-20,000- α,ω -bisz-vinil-szulfon alkalmazásával

Az IL-1ra c84 mutánszt a WO 92/16221 számú közzétett PCT szabadalmi bejelentés, amelyet referenciaként adunk meg, eljárása szerint állítjuk elő. A c84 mutáns vagy a természetes (vad-típusú) IL-1ra konjugálását PEG- α,ω -bisz-vinil-szulfon (3,400 vagy 20,000 kDa) alkalmazásával 25°C hőmérsékleten pH 6,75-7,5 értékű citrát pufferben 1 ml csövekben végezzük. A PEG és a protein koncentrációt változtatjuk. 30 mg/ml protein koncentráció mellett jó konverziót érhetünk el 18 órán belül a dumbell molekula előállításában. 0,91 mg/ml protein koncentráció esetében (zömében 100 mg/ml protein koncentráció mellett) a dumbell vegyületeket előnyösen előállíthatjuk 0,03 ekvivalens PEG alkalmazásával. Ezt követően a dumbell vegyületet kromatográfiás eljárásokkal tisztíthatjuk, amelyeket leírtak a WO 92/16221 számú közzétett PCT szabadalmi bejelentésben, amelyet referenciaként adunk meg.

Más eljárások során 0,1M Tris-HCl puffert, pH 8,5, amely 30 mg/ml természetes-típusú IL-1ra tartalmú, kezelünk 0,53 molekvivalens 20 kDa PEG-bisz-vinil-szulfonnal 18 órán át 25°C hőmérsékleten. Az SDS PAGE analízis a dumbell és a monoaddukt átalakulását bizonyítja 0,1 mg/ml protein koncentráció esetében. Amennyiben 1 molekvivalens PEG reagenst alkalmazunk, csak a monoaddukt keletkezését figyeljük meg.

Általában a c84 mutáns könnyebben reagál a PEG reagenssel, mint a természetes-típusú molekula.

9. példa

IL-1ra dumbbell bioaktivitása

A fent előállított c84 dumbbell vegyületet receptor kötődési affinitás szempontjából analizáltuk a PEGilezett rekombinációs IL-1ra vegyülettel vagy egér EL-4 sejtekkel összehasonlítva a WO 92/16221 számú közzétett PCT szabadalmi bejelentésben leírt eljárásoknak megfelelően, amely bejelentést referenciaként adunk meg. Az eredmények hasonló eredményt szolgáltatnak mint a két molekula kötődése.

10. példa

TNFbp c105 mutáns PEGilezése PEG-20,000- α,ω -bisz-vinil-szulfon

segítségével

A TNFbp c105 mutánst a WO 92/16221 számú közzétett PCT szabadalmi bejelentésnek megfelelően állítjuk elő, amely bejelentést referenciaként adunk meg. Más eljárás szerint a c105 mutánst az alábbiak szerint állíthatjuk elő.

A c105 mutánst expresszázó E. Coli sejteket centrifugálással kinyerjük. A sejt iszapot ezután körülbelül a szilárd anyag tömegére vonatkoztatva 40% nedvességtartalmú formává alakítjuk tisztított víz adagolásával. Ezt követően az elegyhez egyenlő mennyiségű reakciómegszakító puffert (50 mmol Tromethamine, 4 mmol EDTA, pH 7,2) adagolunk. Így egy körülbelül 20% nedvességű tömegre vonatkoztatott szilárd anyagot nyerünk. A sejt iszapot ötször nagynyomású

homogenizálón vezetjük keresztül, amely homogenizáló körülbelül 8000 psi ($55,200 \times 10^3$ Pa) nyomáson működik. Így egy sejt homogenátumot nyerünk, amelyet 10°C hőmérséklet alá vagy ezen hőmérsékletre hűtünk, mielőtt az egyes homogenizáló lépéseket végrehajtjuk. Végül a homogenátumot centrifugáljuk, majd a szilárd frakciót kinyerjük, amely szilárd frakció a c105 anyagot tartalmazza. A szilárd anyagot higítjuk, majd ismét centrifugáljuk, és így mosott befoglalt testeket nyerünk.

A mosott befoglalt testeket ezt követően 8m karbamid adagolásával mossuk, továbbá 150 mmol cisztein 50 mmol TRIS oldatával mossuk. A pH értéke 9,5. A keveréket 2 órán át szobahőmérsékleten elegyítjük, mielőtt ezeknek az újra kialakuló konformációját visszaalakítanánk. Ilyen körülmények között a c105 mutáns denaturálódik és redukálódik.

A redukált és denaturált c105 mutánst úgy alakítjuk vissza az eredeti konformációba, hogy az elegyet 1,1m karbamid 50 mmol Tris eleggyel higítjuk, ahol a végső eredeti konformációt visszaalakító oldat 200 $\mu\text{g/ml}$ c105 mutáns, 1,5m karbamid, 7,5 mmol cisztein, 50 mmol Tris tartalmú és pH értéke 9,7. Az eredeti konformációvá visszaalakított keveréket ezt követően 2 napon át $6-10^\circ\text{C}$ közötti hőmérsékleten tartjuk. Az eredeti konformáció visszaalakulását reverz fázisú nagynyomású kromatográfia (HPLC) segítségével, valamint kationcserélő HPLC segítségével igazoljuk.

Az újra megfelelő konformációba hozott elegyet ecetsav és sósav segítségével 5,0 pH értékre savanyítjuk. Ezt követően az elegyet kationcserélő oszlopra (S-Sepharose nagy ágyú gyanta) visszük, amely oszlopot előzetesen 25 mmol nátrium-acetát, 65 mmol nátrium-klorid, pH 5 értékű eleggyel 4°C hőmérsékleten

kiegyenlítünk. Az oszlopot ezt követően ugyanezzel a kiegyenlítő pufferrel mossuk. Az oszlopot végül gradiens eluenssel eluáljuk, amely 65-350 mmol nátrium-klorid 25 mmol nátrium-acetátban készült oldata és pH értéke 5. A c105 mutáns körülbelül 200 mmol nátrium-klorid koncentráció melletti eluens esetében eluálódik és ezt egy frakcióba szedjük.

A c105 mutáns tartalmú frakciót 1,5-szeres térfogatú 5m nátrium-klorid, 40 mmol nátrium-foszfát, pH 6 értékre beállított, eleggyel hígítjuk, majd egy hidrofób interakciós oszlopra visszük (Toyo Buyl 650 M oszlop). Az oszlopot előzetesen 3m nátrium-klorid, 20 mmol nátrium-foszfát, pH 6 eleggyel kiegyenlítjük. Az oszlopra vitelt követően az oszlopot a kiegyenlítő pufferrel mossuk. Ezután a c105 mutánst lineáris 8-szoros oszlop térfogatú csökkenő gradiens eluenssel eluáljuk, amely eluens 3m-1m nátrium-klorid, 20 mmol nátrium-foszfátban készült, pH 6 értékű oldata. A c105 mutánst egy részben gyűjtjük. A frakciót körülbelül 3 g/liter c105 mutáns koncentráció eléréséig bepároljuk, majd 20 mmol nátrium-foszfát, pH 6,0 értékű oldattal szemben diafilizáljuk, amíg a végső vezető képesség kisebb mint 4 mmho értéket ér el (körülbelül 6-szoros térfogat szükséges).

A diafilizált frakciót ezt követően SP-Sepharose nagyteljesítményű oszlopra visszük, amelyet előzetesen 20 mmol nátrium-foszfát, pH 6,0 oldattal kiegyenlítettünk. Az oszlopra vitel után az anyagot további kiegyenlítő pufferrel mossuk, majd ezt követően pH/sógradiens eluenssel eluáljuk, amely 20 mmol nátrium-foszfát, 50 mmol nátrium-klorid, pH 6,0 oldattól 20 mmol nátrium-foszfát, 50 mmol nátrium-klorid, pH 6,5 oldatig halad. A c105 mutánst a gradiens elúció második felében gyűjtjük körülbelül 35 mmol nátrium-klorid koncentráció alkalmazásakor. A c105 mutánst ezt követően fagyasztva tárolhatjuk.

A c105 mutánst PEGilező reagenssel reagáltatjuk úgy, hogy a PEG reagens molaránya a fehérjére vonatkoztatva 1:1, 2:1, 4:1, 1:1, illetve 0:1 (kontroll). A reakciót 20 mmol foszfát/20 mmol acetát pufferben, pH 7,5 értéknél 15 órán át 22°C hőmérsékleten végezzük. A reakciókat ugyancsak elvégezzük 50 mmol foszfát pufferben, pH 7,5 vagy 8,5 érték mellett.

A dumbbell molekulává történő konverzió értékét kationcserélő HPLC (nagynyomású folyadékkromatográfia) segítségével MA7S oszlop alkalmazásával határozzuk meg. A konverzió százaléka körülbelül 40-60% közötti. A dumbbell molekulává történő konverziót optimáljuk úgy, hogy körülbelül 50 mg/ml PEG reagens oldatot adagolunk a proteinhez 0,50-0,65 PEG reagen 1,0 TNFbp mutáns molarányban és a pH értéket 7,5 értéken tartjuk, valamint a reakciót 15 órán át 22°C hőmérsékleten végezzük. Amennyiben a PEG aránya a proteinre vonatkoztatva növekszik, a monoaddukt képződése előtérbe kerül. A monoaddukt képződést optimáljuk 5:1 PEG reagens:protein molarány alkalmazásával.

A konjugátum molekulákat S-Sepharose HP oszlop alkalmazásával kromatográfia segítségével tisztítjuk. A reakcióelegy pH értékét 3,0-4,2 értékre állítjuk be, majd az oszlopra visszük, amely oszlopot előzetesen ugyanilyen pH értékűre állítunk be. Az oszlopot a kiegyenlítő pufferrel mossuk, majd a dumbbell molekulát lineáris nátrium-klorid gradiens eluens alkalmazásával 1,2-1,5 cm/perc áramlási sebességgel eluáljuk. A következő molekulákat eluáljuk az oszlopról az alábbi sorrendben: 1) monoszubsztituált, 2) dumbbell, 3) nem PEGilezett TNFbp mutáns és 4) aggregált mutáns.

11. példaTNFbp c105 mutáns dumbbell bioaktivitása

A c105 mutáns dumbbell vegyületek, akár ha ezt a WO 92/16221 PCT szabadalmi bejelentésben leírtak szerint PEG-bisz-maleimiddel állítjuk elő vagy a fenti eljárást alkalmazzuk 50-100-szoros aktivitást mutattak, mint a nem PEGilezett 30kDa TNF inhibitor. Amennyiben ezt az L929 citotoxicitás tesztvizsgálattal mérjük a WO 92/16221 számú szabadalmi bejelentésben leírt eljárással vizsgáljuk, amely bejelentést referenciaként adunk meg.

12. példaGliceril-PEG-trisz-vinil-szulfon előállítása

Gliceril-PEG- α,β,γ -triol-t (10.000 kDa és 20.000 kDa) alakítunk át vinil-szulfon-származékká a fent leírt általános eljárás alkalmazásával. A gliceril-PEG- α,β,γ -triol beszerezhető az Union Carbide, Terrytown, New York cégtől. A gliceril-PEG- α,β,γ -triol előállítható szintetikus módon is úgy, hogy glicerolt bázisban etilén-oxiddal polimerizálunk.

13. példaTNFbp c105 trumbbell előállítása gliceril-PEG-trisz-vinil-szulfon alkalmazásával

TNFbp c105 mutánsokat konjugáltunk PEG-trisz-vinil-szulfonnal és így egy úgynevezett "trumbbell" molekulát nyertünk. A kísérleteket a PEG:protein széles határon belül mozgó arányait alkalmazva elvégeztük és ez a kísérletsorozat azt mutatja, hogy a trumbbell molekula kialakításához előnyös molarány a 0,25-0,35

PEG:1 protein arány. Egy jellemző kísérletben a c105 mutánst 20 mmol foszfát, 20 mmol acetát pufferben, pH 7,5, oldottuk, majd ezt 0,03 molekvivalens gliceril-PEG-10.000- α , β , γ -triollal 25 °C hőmérsékleten, 18 órán át reagáltattuk. A reakcióelegy analízisét kationcserélő HPLC (Bio Rad MA7S oszlop, eluens gradiens nátrium-klorid oldat) végeztük és azt jelezte, hogy a trumbbell molekulává történő konverzió 49% és a bi-szubsztitúció 34,9% érték.

14. példa

IL-1ra trumbbell előállítása gliceril-PEG-trisz-vinil-szulfon alkalmazásával

PEG-10.000- α , β , γ -trisz-vinil-szulfon oldatát reagáltatjuk 20 mg/ml koncentrációjú, vad típusú IL-1ra, 0,1 m foszfát pufferben készült oldatával különféle PEG/protein molarányok alkalmazásával, amelyek az alábbiak: 0,10:1; 0,25:1; 0,35:1; 0,45:1; 0,55:1; 0,65:1. A reakcióelegyeket 72 órán át 25 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Az SDS PAGE analízis azt mutatja, hogy a konverzióban mono-, di- és tri-addukt keletkezik. A triaddukt optimális konverziója a PEG/protein molarány 0,10:1 érték mellett történik. A reakcióelegyet S Sepharose nagyteljesítményű oszlopon választjuk el, gradiens nátrium-klorid oldatot alkalmazunk.

15. példa

c105 TNFbp-PEG-IL-1ra heterodumbbell előállítása

Vad típusú IL-1ra, 0,1 m foszfát pufferben, pH 8,5, készült oldatát 8 mg/ml PEG-20.000-bisz-vinil-szulfon-mono-c105TNFbp addukt oldattal reagáltatjuk az alábbi IL-1ra molarány és koncentráció alkalmazásával: 55:1 (12,5 mg/ml); 85:1 (18,75 mg/ml); 100:1 (25,0 mg/ml) és 150: (31,75 mg/ml). A reakciót 72 órán át

végeztük és ekkor SDS PAGE analízis szerint heterodumbbell molekula képződött. Az optimális konverziót 1:100 monoaddukt IL-1ra molarány mellett tapasztaltuk. A heterodumbbell vegyületet S Sepharose nagy teljesítményű oszlop segítségével tisztítottuk, amelyet gradiens nátrium-klorid eluenssel eluáltunk.

16. példa

PEG-vinil-szulfon-poliipeptid-adduktok stabilitása

A c105 TNFbp mutáns és a PEG-bisz-vinil-szulfon között létrejövő kötés stabilitását vizsgáljuk. Ismert mennyiségű c105 dumbbell molekulát PBS, pH 7,4 oldatban inkubálunk 37 °C hőmérsékleten, egészen egy hét időtartamig. Ez alatt az időtartam alatt mintákat veszünk és ezeket SDS PAGE analízisnek vetjük alá. A c105 dumbbell molekula bomlását nem tapasztaljuk. Amennyiben a vizsgálatot pH 10 érték mellett egy héten 37 °C hőmérsékleten végezzük a konjugátum csak 5-10%-os bomlását tapasztaljuk.

17. példa

A TNFbp c105 dumbbell inhibálja az aktívan-indukált kísérleti allergiás agy-gerincvelő gyulladást ("EAE")

A c105 dumbbell, amely PEG-bisz-vinil-szulfon alkalmazásával készült in vivo aktivitását mutatjuk be. Az EAE egy egér modell és autoimmun gyulladásos velőképződést csökkentő betegség a központi idegrendszerben, amelyet gyakran alkalmaznak humán MS modellként. Amint az alábbiakban leírtuk a c105 dumbbell inhibálta patkányokban az EAE betegséget.

150-200 g nőstény Lewis patkányokat szereztünk be a Charles River (Raleigh, NC) cégtől, majd ezeket legalább egy hétig tartottuk, mielőtt a kísérletet elkezdtük. Az állatok ad libitum kaptak élelmet és vizet és megfelelően szabályozott hőmérsékletű és megvilágítású (12 óra/nap) helységben tartottuk őket. Az egyes kísérletek során az állatokat kor szerint illesztettük.

EAE aktív indukálás: Patkányokat (általában csoportonként 6 állat) érzéstenítettünk 2% izoflurán + O₂ segítségével, majd immunizáltunk a 0. napon a bal hátsó láb talpán 0,1 ml emulzió alkalmazásával, amely emulzió myelin bázisú protein ("MBP") tartalmú és ezt az alábbi dózisokban alkalmaztuk: 0, 1, 3, 10 vagy 30 µg (68-84 fragmens, Bachem Bioscience, PA). Az MBP anyagot foszfát puffertartalmú fiziológiai sóoldatban (PBS) oldottuk, majd egyenlő mennyiségű teljes Freund segédanyaggal (CFA) emulzifikáltuk. Ezt utóbbi 5 mg/ml Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Difco Lab, MI) tartalmú volt. A kontroll patkányokat 0,1 ml PBS/CFA emulzióval kezeltük, amelyek nem tartalmaztak MBP vegyületet, a kezelést itt is ugyanúgy a bal hátsó láb talpába végeztük.

EAE klinikai súlyosság vizsgálat illetve értékelés: A klinikai betegség súlyosságának értékelését naponta végeztük és standard 0-5 jelzőszámokat alkalmaztunk. A jelzőszámok értéke az alábbi volt 0-normál, 0,5-részleges farok tónusvesztés, 1-teljes farok tónusvesztés, 2-az egyik hátsó láb húzása, 3-mindkét hátsó láb paralizise, 4-morbid, 5-elhullás. Ezen túlmenően az egyes patkányok esetében a napi tömeget is mértük és a tömegvesztést illetve tömegnövekedést a kezdeti testtömegre vonatkoztatva megadtuk.

MBP immunizálás hatása: A kezdeti vizsgálatokkal kimutattuk az MBP (0,1-30 µg/0,1 ml) dózisainak emulzióban adott hatását, amely különféle dózisok a korábban leírtak. A 0,1 és 0,3 µg MBP dózisok nem okoztak látható, klinikai elváltozást. A 30 µg MBP dózis okozta a legsúlyosabb klinikai elváltozást az 1 µg dózissal összehasonlítva. Ez a hatás igen szignifikáns volt ($p < 0,001$, Mann-Whitney U-teszt). Általában amennyiben a dózist növeltük (1-30 µg) az MBP a klinikai elváltozást korábban okozta például az 1 µg MBP adagolásakor a $\pm$ S.E.M. beállítása $14,88 \pm 0,42$ ($n=9$), míg a 30 µg MBP alkalmazásakor $12,35 \pm 0,16$ ($n=34$; $p < 0,01$) nap érték. Ezen túlmenően az MBP (1-30 µg) dózisfüggő hatást fejt ki a testtömeg veszteségre. Az állatok 5-7 napon belül spontán meggyógyultak a klinikai elváltozásból az elváltozás kezdetétől számítva. A CFA önmagában történő adagolása nem okozott klinikai elváltozást, azonban kezdeti, átmeneti, testtömeg veszteség történt a nem kezelt kontroll állatokkal összehasonlítva.

A fenti kísérletek során az MBP dózisok egyikének esetében sem tapasztaltunk jelentős eltérést a nem droggal kezelt (csak MBP immunizált) állatok illetve a hordozóanyaggal kezelt állatok (MBP immunizált és PBS dózissal kezelt állatok) között. Ebből eredően megállapíthatjuk, hogy a hordozóanyag nem fejt ki hatást a betegség súlyosságára (lásd a 3. és 4. táblázatokat). A drog hatóanyaggal nem kezelt illetve a hordozóanyaggal kezelt csoportok eredményeit az alábbiakban írjuk le.

EAE kezelése: Különféle TNF inhibitor dumbbell (0,1-3 mg/kg) hordozóanyag (PBS) dózisokat adagoltunk különböző időközönként szubkután injekció formájában. A kezelési idő vagy közvetlenül a fertőzést követően vagy az immunizációt követően 9 nappal kezdődött az MBP alkalmazásával és az immunizá-

ciót követően 21 napon át tartott. Mindenegybes kísérletben a PBS segítségével kezelt kontroll állatok ugyanolyan számú injekciót kaptak, mint a kezelt csoport, abból a célból, hogy a stresszből eredő másodlagos hatásokat csökkentsük. Az EAE indukálás után injekciót nem kapott állatok, azaz a nem hatóanyag kontroll állatok viselkedését is megfigyeltük.

A kezelés hatásai: **Minden napos dózis adagolás.** Az EAE befolyásolását vizsgáltuk minden napos TNF inhibitor dumbbell adagolással, dózis adagolással az immunizálás napjától kezdve, összesen 21 napon át. Az adagolt dumbbell koncentrációk 0,1, 0,3, 1 vagy 3 mg/kg nem mutattak a klinikai elváltozások súlyosságának csökkentésében jelentős hatást az 1 µg és a 30 µg MBP sem, azonban jelentős klinikai betegség javulás tapasztalható a 3 µg MBP dózis alkalmazásával valamennyi dumbbell dózis esetében.

Másnaponkénti dózis adagolás. Minden második napon adagolt 0,1, 0,3 1 és 3 mg/kg dózis hatását vizsgáltuk az immunizálás utáni 9. naptól kezdődően. Amint a 3. és 4. táblázatokban bemutatjuk a 0,3 ($p < 0,008$), az 1,0 ($p < 0,001$) és a 3,0 mg/kg ($p < 0,002$, Mann Whitney tesztvizsgálat, $n=6$) dózisok adagolása esetében jelentős klinikai elváltozás csökkentő hatás mutatkozott összehasonlítva a kontroll állatokkal, amelyekben a legnagyobb MBP dózist (30 µg/0,1 ml) adagoltuk. A hordozóanyag és a nem kezelt kontroll csoport között nem tapasztaltunk jelentős eltérést. A TNF inhibitor dumbbell legkisebb dózisa nem fejtett ki jelentős hatást a klinikai elváltozásokra.

Az 1,0 ($p < 0,1$) és 3 mg/kg ($p < 0,05$, Mann Whitney tesztvizsgálat) dózisok jelentősen csökkentették a klinikai elváltozásokat, amelyeket 10 µg MBP idézett elő. A 0,3 és 0,1 mg/kg dumbbell adagolása is csökkentette a klinikai elváltozások-

kat, azonban ez nem volt jelentős. A 0,1-3 mg/kg dumbbell dózisok nem jelentősen inhibálták a klinikai elváltozásokat, amelyeket kisebb dózisú MBP (1 vagy 3 µg) segítségével idéztünk elő.

Az EAE kialakulásának igen fontos jele a testtömeg veszteség. A 3, 10 és 30 µ MBP alkalmazásával immunizált patkányok, amelyek c105 dumbbell kezelésben részesültek (1 vagy 3 mg/kg) kisebb testtömeg veszteséget szenvedtek, mint a hordozóanyaggal kezelt csoportba tartozó állatok.

3. táblázat

Aktívan-indukált EAE megelőzése TNF inhibitor dumbbell segítségével

3A-3F. táblázatok

Dumbbell hatásai napi átlagos klinikai alkalmazással - 30 µg MBP esetében

3A. táblázat

Kezelés	Nincs hatóanyag						
Átlag	0,25	1,00	1,92	2,67	1,83	0,83	0,166
klinikai	±	±	±	±	±	±	±
értékek	0,18	0,50	0,52	0,44	0,53	0,44	0,10
Napok	11	12	13	14	15	16	17

3B. táblázat

Kezelés	Hordozóanyag						
Átlag	0,17	0,75	1,83	2,50	2,08	1,00	0,25
klinikai	±	±	±	±	±	±	±
értékek	0,17	0,31	0,40	0,34	0,45	0,41	0,11
Napok	11	12	13	14	15	16	17

3C. táblázat

Kezelés	0,1 mg/kg dumbbell						
Átlag	0,08	0,92	1,33	2,67	2,17	1,17	0,25
klinikai	±	±	±	±	±	±	±
értékek	0,08	0,35	0,21	0,21	0,30	0,28	0,11
Napok	11	12	13	14	15	16	17

3D. táblázat

Kezelés	0,3 mg/kg dumbbell					
Átlag klinikai	0,25	0,92	1,50	1,17	0,58	0,375
értékek	±	±	±	±	±	±
	0,17	0,27	0,42	0,40	0,15	0,14
Napok	12	13	14	15	16	17

3E. táblázat

Kezelés	1 mg/kg dumbbell					
Átlag kli-	0,17	0,58	0,67	0,42	0,33	0,083
nikai	±	±	±	±	±	±
értékek	0,17	0,20	0,17	0,20	0,17	0,083
Napok	12	13	14	15	16	17

3F. táblázat

Kezelés	3 mg/kg dumbbell					
Átlag klinikai értékek	0,25 ± 0,17	0,42 ± 0,20	0,83 ± 0,25	0,42 ± 0,32	0,08 ± 0,08	0,08 ± 0,08
Napok	12	13	14	15	16	17

A táblázat jelölései: A napi átlagos súlyossági jelzőszám a 30 µg MBP segítségével immunizált patkányokban illetve TNF inhibitor dumbbell-lel minden másnap kezelt patkányokban amely kezelés az MBP-immunizálást követő 9. napon kezdődött. A hordozóanyaggal kezelt csoport PBS kezelést kapott, a hatóanyaggal nem kezelt csoport nem kapott injekciót az EAE indukálást követően.

4. táblázat

TNF inhibitor dumbbell inhibitor hatása, amely a görbe alatti területtel kifejezett

Kezelés	Nincs hatóanyag	Hordozóanyag	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg
Klinikai súlyosság (terület)	8,07±1,40	7,83±0,88	7,88±0,83	4,3±1,02	1,63±0,60	1,53±1,01

Táblázat jelzései: A c105 dumbbell inhibáló hatását a klinikai elváltozás súlyosságára, görbe alatti területtel (az egységek önkényesek) fejeztük ki. Átlagos ± S.E.M. (n=6) értékeket határoztunk meg minden egyes csoportra és ezeket a hordozóanyaggal kezelt csoporttal szemben statisztikusan összehasonlítottuk (Mann-Whitney tesztvizsgálat). Nem tapasztalható a hordozóanyaggal illetve a hatóanyaggal nem kezelt kontroll csoport között jelentős különbség a c105

dumbbell 0,3, 1,0 és 3,0 mg/kg (dózis esetében, amely a fenti dózis) jelentősen csökkentette (sorrendben $**p<0,008$, 0,001 és 0,002) a klinikai elváltozás jeleit.

Amint az 5. táblázatban bemutatjuk a minden második napon adagolt dózis továbbá csökkentette a betegség időtartamát, amelyet azzal mérhetünk amennyi napon át a klinikai elváltozás jelei az állatokon mutatkoztak. Az egyes mérések esetében az adott patkány csoportban átlag értéket számítottunk.

5. táblázat

A minden második napon történő kezelés esetében a betegség időtartama

MBP μ g	TNF inhibitor dumbbell mg/kg				
	0	0,1	0,3	1	3
30	5,33 $\pm$ 0,21	5,50 $\pm$ 0,34	4,50 $\pm$ 0,92	2,83 $\pm$ 0,79*	2,16 $\pm$ 0,60**
10	4,33 $\pm$ 0,80	3,66 $\pm$ 0,80	4,00 $\pm$ 0,51	3,33 $\pm$ 0,49	1,83 $\pm$ 0,70*
3	2,50 $\pm$ 1,02	1,83 $\pm$ 0,83	2,00 $\pm$ 0,81	3,16 $\pm$ 0,74	0,83 $\pm$ 0,54
1	1,83 $\pm$ 0,79	0,66 $\pm$ 0,66	1,66 $\pm$ 0,61	1,33 $\pm$ 0,49	0,66 $\pm$ 0,42

* $p<0,05$ ** $p<0,01$

Egyetlen dózis. Egyetlen dózist, amely 0,3 vagy 3 mg/kg dumbbell adagoltunk az immunizálás után 9. napon és ez a dózis a hordozóanyaggal kezelt állatokkal összehasonlítva nem fejtett ki az MBP (1-30 μ g) indukált klinikai elváltozások csökkentésében jelentős hatást

TNF inhibitor dumbbell minden harmadik napon történő adagolása. 0,1-3 mg/kg dumbbell vegyületet vagy hordozóanyagot adagoltunk az MBP-immunizálást követő 9, 12, 15 és 18. napon. Amint a 6. táblázatban bemutatjuk az MBP (30 μ g) indukált klinikai elváltozások jelentős csökkenése figyelhető meg a

0,3 ($p<0,05$), 1,0 ($p<0,01$) és 3 mg/kg ($p<0,001$ Mann-Whitney t-tesztvizsgálat) dózisok adagolása esetében. A 0,1 mg/kg c105 dumbbell dózis a hordozóanyaggal kezelt kontroll csoporttal összehasonlítva nem fejtett ki hatást.

Az MBP (10 μ g) indukált klinikai elváltozásokat csökkentették a 0,3, 1,0 és 3,0 mg/kg c105 dumbbell dózisok. Azonban jelentős klinikai elváltozást csökkentő hatást ($p<0,05$ és 0,03 sorrendben) csak a magasabb c105 dumbbell dózisok adagolása esetében figyeltünk meg. A c105 dumbbell (0,3-3 mg/kg) dózisa ugyan a 3 μ g MBP indukált klinikai elváltozásokat körülbelül 20-60% mértékben csökkentette, ezek a hatások nem voltak jelentősen eltérőek, mint amit a hordozóanyaggal kezelt kontroll csoportban tapasztaltunk.

A betegség időtartama általában a c105 dumbbell alkalmazásával csökkent. Például az 1 és 3 mg/kg dózisban adagolt c105 jelentősen csökkentette az MBP (30 μ g) mediált klinikai elváltozásokat. Ez a csökkentés sorrendben 37,3% illetve 68,7% volt (lásd a 10. táblázatot). Hasonló trendet figyelhettünk meg a közbenső MBP (10 μ g) dózis által indukált betegség esetében, azonban nem figyelhettünk meg ilyen hatást a legalsó MBP dózis adagolása esetében (7. táblázat).

A 10 és 30 μ g MBP csoportokban kialakult betegség jelentősen késleltethető ($p<0,047$; $p<0,013$; Mann Whitney U-tesztvizsgálat) olyan állatokban, amelyeket 3 mg/kg c105 dumbbell segítségével kezeltünk.

Az EAE kialakulásával kapcsolatos testtömeg veszteség az 1 és 3 mg/kg dózisú c105 dumbbell adagolása esetében részben inhibiált. A testtömeg veszteség csökkenése dózisfüggő volt. A c105 dumbbell ezen hatása hasonló volt függetlenül attól, hogy milyen MBP dózist alkalmaztunk.

6. táblázat

Átlagos klinikai elváltozás súlyossága, amelyet a minden
3. napon történő dózis alapján mértünk

Kezelés	Hordozóanyag	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg	1,0 mg/kg	3,0 mg/kg
Átlagos klinikai súlyosság (terület)	9,21±0,64	8,25±0,92	6,23±1,37	3,66±0,61	0,33±0,17

7. táblázat

A betegség elhúzódási ideje a 13. napon történő adagolás
illetve kezelés esetében

MBP μ g	TNF inhibitor dumbbell mg/kg				
	0	0,1	0,3	1	3
30	5,83±0,44	4,83±0,30	4,16±0,70	3,66±0,61*	1,83±0,70**
10	4,66±0,42	5,16±0,40	4,00±0,77	3,00±0,96	2,50±0,67*
3	4,00±0,67	3,50±0,62	3,00±1,35	3,00±1,35	3,33±0,66

*p<0,05 **P<0,01

18. példa

Központi idegrendszeri (CNS) patológia

A c105 dumbbell, amelyet PEG-bisz-vinil-szulfon segítségével állítottunk elő, hatását vizsgáltuk MBP (0, 10 vagy 30 μ g) indukált immunizációs CNS pathológiára. Az MBP-immunizálást (EAE indukálás) a fentieknek megfelelően végeztük. A c105 dumbbell hatóanyagot 0,3, 3 mg/kg dózisban vagy a hordozó-

anyagot minden második napon adagoltuk az MBP adagolása utáni 9. naptól kezdődően. Az állatokat széndioxid alkalmazásával az MBP injektálás utáni 9., 14. vagy 20. napon elpusztítottuk. Az agy és gerincvelőt minden állatból eltávolítottuk és 10%-os semlegesre pufferelt formalinba helyeztük. A fixálást legalább 72 órán át végeztük, majd az agyból metszeteket vettünk a látó chiasm caudalis területen illetve a hypoplysis-hez vezető területen, továbbá a ponsok haránt rostjaiból. A gerincvelőt metszettük 4-6 metszetet készítve a nyaki, mellkasi és ágyéki területekről. A keresztcsonti szegmens, amely a kaudális idegekhez kapcsolódik hosszanti módon beágyazott volt. A szöveteket paraffinba ágyasztuk, majd hematoxilinnal és eozinnal festettük.

A hisztológiai értékelést anélkül végeztük, hogy ismertük volna az egyes csoportokra alkalmazott kezelést. Mindenegyed metszetet számjeggyel jeleztünk, amely 1-4 közötti lehetett és a gyulladás mértékét illetve a velősítés csökkenését jelezte. A jelzőszám adás az alábbiak szerint történt: 1=minimum, 1-2 véredény perivascularis hajlítást mutat a gyulladásos sejtekben, 2=közepes, 3 vagy több véredény kis perivascularis hajlítást mutat a gyulladásos sejtekben a gyulladás kismértékű vagy egyáltalán nem mutatott kiterjedésével a parenchyma irányába, 3=közepes, 3 vagy több véredényt perivascularis hajlítást mutat a gyulladásos sejtekben és közepes kiterjedést mutat a gyulladásban a körülvevő parenchyma irányába, 4= jelentős értékű, a véredények legnagyobb része perivascularis hajlítást mutat a gyulladásos sejtekben és igen nagymértékben kiterjed a neurofil rész a gyulladásos folyamatban.

Az egyes állatcsoportok esetében a teljes gyulladásra vonatkozó jelzőszámokat meghatároztuk mindenegyed CNS (központi idegrendszer) területen. Átlag

$\pm$ SEM (standard deviáció átlaga) értékeket adtunk meg a CNS (központi idegrendszer) részére minden egyes időpontban és ezeket összehasonlítottuk a hordozóanyaggal kezelt állatok esetében tapasztaltakkal.

Az átlagos gyulladást jelző jelzőszámot meghatároztuk minden egyes állatcsoport esetében, minden egyes CNS (központi idegrendszer) területre, majd statisztikusan összehasonlítottuk a hordozóanyaggal kezelt kontroll csoport értékeivel (students t-teszt). Ezeket a jelzőszámokat a 8. és 9. táblázatokban adjuk meg.

Az MBP injektálás után 9. napon megölt állatokban nem tapasztaltunk a CNS területen jelentős hisztológiai elváltozásokat. A 14. napon a sérülések minimálistól illetve jelentős értékű elváltozásokig (mononukleáris + néhány neutrofil) tapasztalhatók, amely általában perivascularis gyulladással sejt beszűrődés. Az agyban a gyulladás általában az agyhártya területére, a periventricularis területekre és a cerebellar fehér traktusokra korlátozódott, és az agy törzs és a cerebellaris fehér traktusok voltak a legnagyobb mértékben károsodottak. Ezeken a területeken a gyulladás gyakran a perivascularis területekről kiterjedt a környező parenchyma területekre és a velőképződés illetve velőcsökkenés bizonyított mértékben megtörtént. A gerincagyban az ágyék és a keresztcsonti területek a legnagyobb mértékben támadottak. A szürke és a fehér állomány is támadott és a legnagyobb sérülés perivascularis. A gyulladás fennmaradt a 20. napig, azonban neutrophil megjelenést igen ritkán tapasztaltunk ebben az időpontban. A gyulladás változott intenzitásában az egyes csoportok állatai között valamennyi csoporton belül.

A 8. és 9. táblázatokban bemutatjuk, hogy a c105 dumbbell vegyület a CNS (központi idegrendszer) vizsgált különféle területeinek legnagyobb részében a gyulladást csökkentette. A gyulladás legnagyobb mértékű csökkentését a gerinc-agyban, különösen az ágyéki és a keresztcsont területeken tapasztaltuk. A c105 dumbbell kisebb hatást fejtett ki a CNS (központi idegrendszer) felsőbb területein a cerebrum és a cerebellum területeken.

8. táblázat

30 µg MBP által immunizált és inhibitor TNF dumbbell-el kezelt
állatok gyulladásos jelzőszámai

Agy régió	3 mg/kg	0,3 mg/kg	Hordozóanyag
Cerebrum	1,00±0,378	0,714±0,360	0,714±0,474
Cerebellum	2,57±0,429	2,714±0,360	3,280±0,286
Nyaki gerincvelő	1,71±0,360	1,428±0,298*	2,420±0,202
Mellkasi gerincvelő	1,71±0,421	1,000±0,218*	2,280±0,421
Ágyéki gerincvelő	1,85±0,404	1,42±0,369	2,42±0,298
Keresztcsonti gerincvelő	1,28±0,360	1,42±0,298	2,714±0,522

*<0,05 (students t-teszt)

Hisztológiai elváltozás (30 µg MBP dózis)

9. táblázat

10 µg MBP által immunizált és TNF inhibitor dumbbell vegyülettel
kezelt állatok gyulladásos jelzőszámai

Agyi régió	3 mg/kg	0,3 mg/kg	Hordozóanyag
Cerebrum	0,28±0,18	0,42±0,20	0,42±0,29
Cerebellum	1,42±0,29	2,28±0,42	2,28±0,35
Nyaki gerincvelő	0,85±0,34	1,42±0,42	1,42±0,20
Mellkasi gerincvelő	0,85±0,14	1,57±0,36	1,0±0,30
Ágyéki gerincvelő	0,71±0,28	1,57±0,48	2,28±0,28
Keresztcsonti gerincvelő	0,57±0,20	1,57±0,48	2,28±0,42

*<0,01 Hisztológiai elváltozás (10 µg MBP dózis)

19. példa

A c105 TNFbp dumbbell védési hatása az endotoxin által okozott
elhalálózással szemben

A PEG-bisz-vinil-szulfon alkalmazásával előállított c105 dumbbell védelmi hatását vizsgáltuk a Balb/c egér esetében az endotoxin letális dózisa adagolása-kor. Az egereket 30 mg/kg endotoxinnal kezeltük intraperitoneális injekció segítségével és intravénásan egyetlen dózis 0,1 mg PBS vagy 1 mg/kg dumbbell 0,1 ml PBS oldata injekcióját alkalmaztuk. Az utóbbiak injektálását az endotoxin adagolása után 1 órával vagy 2 órával végeztük. Az endotoxin injektálás után 1 órával alkalmazott intravénás 1 mg/kg dumbbell vegyület dózis injektálása teljes védelmet nyújtott a letalitással szemben. Az endotoxin adagolása után 2 órával végzett dumbbell adagolás nem mutatott védelmet az endotoxin letális hatásával szemben.

A c105 dumbbell vegyület ugyancsak védelmet mutatott Lewis patkányokban az endotoxin letális dóziséval szemben. A patkányokat 12,5 mg/kg endotoxinnal kezeltük intravénás injekció formájában. Ezt követően a patkányokat szimultán módon endotoxinnal illetve fiziológiás sóoldattal vagy a c105 dumbbell 0,1, 0,5, 3,5 vagy 4,5 mg/kg dóziséval kezeltük. A letális sérülés elleni védelem összehasonlítását végeztük el mindenegyes dumbbell vegyület dózis esetében.

Amennyiben 10 mg/kg dózis endotoxin adagolásával egyidőben 1,5 mg/kg c105 dumbbell egyetlen dózist alkalmaztunk a patkányok védelemben részesültek a máj és metabolikus rendellenességekkel szemben. A máj és metabolikus paramétereket az endotoxin adagolása után 24 órával mértük, amelyet a 10. táblázatban mutatunk be.

10. táblázat

c105 dumbbell (1,5 mg/kg) hatása az endotoxin indukált biokémiai paraméter rendellenességekre

Paraméter	Kontroll+hordozó- anyag	Endotoxin+hordozó anyag	Endotoxin+ c105 dumbbell
Glükóz (mg/dl)	143±2	52±8	81±5*
SGPT [†] (mμ/ml)	47±6	679±118	141±25*
Vér karbamid- -nitrogén (mg/dl)	19±1	88±2	39±3*
Kortikoszteron (ng/ml)	164±62	750±49	489±43*
[†] Szérum glutamin-piruvín-transzamináz Értékek átlag ± standard hiba 4-8 patkány/csoport esetében. * Jelentős eltér az endotoxin-kezelt csoporttól p<0,05 (páros t-teszt)			

A találmány szerinti adott rendszer vagy PEGilezési reagens hatása illetve alkalmazása a szakember számára világos és a leírtak alapján érthető. A szakember felismeri, hogy a különféle készítményben illetve reagensben, eljárásban végzett módosítások ugyancsak beleértendők a találmány tárgykörébe.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Biológiaiilag aktív konjugátum, azzal jellemezve, hogy
egy biológiaiilag aktív molekulát tartalmaz, amely lehet IL-1 inhibitor, tumor necrosis faktor (TNF) inhibitor, CR1, PDGF receptor, IL-2 vagy PDGF 6 exon peptid, ahol a biológiaiilag aktív molekula reaktív tiolcsoportot tartalmaz, és
valamely nem peptid polimer, amely aktív szulfoncsoportot tartalmaz, amely a fenti tiolcsoporttal kapcsolást hoz létre, és a nem peptid polimer kívánt esetben az aktív szulfoncsoporton kívül reaktív NHS-észter-csoportot is tartalmaz.
2. Az 1. igénypont szerinti biológiaiilag aktív konjugátum, ahol az aktív szulfoncsoport egy vinil-szulfon-csoport vagy klór-etil-szulfon-csoport.
3. Az 1. igénypont szerinti biológiaiilag aktív konjugátum, ahol a biológiaiilag aktív molekula TNF inhibitor, amely lehet egy 30kDa TNF inhibitor, vagy 40kDa TNF inhibitor, vagy Δ 51 TNF inhibitor illetve Δ 53 TNF inhibitor, vagy a biológiaiilag aktív molekula valamely interleukin-1 (IL-1) inhibitor előnyösen interleukin-1 receptor antagonista (IL-1).
4. R_1 -X- R_2 általános képletű tisztított vegyület, ahol
X jelentése nem peptid polimer, amely egy első és egy második reaktív csoportot tartalmaz, ahol az első reaktív csoport, valamely Michael akceptor csoport;
 R_1 jelentése valamely biológiaiilag aktív molekula, amely lehet IL-1 inhibitor, tumor necrosis faktor (TNF) inhibitor, CR1, PDGF receptor, IL-2, PDGF 6 exon peptid és amely reaktív tiolcsoportot tartalmaz, amely tiolcsoport a nem peptid polimerhez kovalens kötéssel kötött úgy, hogy a tiolcsoport

a Michael akceptor csoporttal reagál és a biológiailag aktív molekula a reakció után megőrzi biológiai aktivitását; és

R₂ jelentése biológiailag aktív molekula vagy biológiailag nem aktív molekula, amely a nem peptid típusú fenti polimerhez a második reaktív csoporton keresztül kötött.

5. A 4. igénypont szerinti tisztított vegyület, amelyben a Michael akceptor csoport vinil-klorid vagy maleimid.

6. Az 5. igénypont szerinti lényegében tiszta vegyület, ahol a Michael akceptor csoport maleimid, vinil-szulfon vagy ezek közül egyik vinil-szulfon és a másik maleimid egység.

7. A 4. igénypont szerinti tisztított vegyület, ahol a biológiailag aktív molekula lehet valamely TNF inhibitor, előnyösen 30kDa TNF inhibitor, valamely 40kDa TNF inhibitor, valamely $\Delta 51$ TNF inhibitor, vagy valamely $\Delta 53$ TNF inhibitor, vagy interleukin-1 (IL-1) inhibitor, előnyösen interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra).

8. Vízoldható polimer, mely reaktív NHS-észterrel és maleimiddel rendelkezik, és a polimer polialkilénoxid, polioxietilezett poliol vagy poliolefines alkohol.

9. Gyógyászati készítmény, mely legalább egy 1-7. igénypontok bármelyike szerinti konjugátumot és legalább egy gyógyászatilag elfogadható hordozóanyagot tartalmaz.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323

Ádám Szentpéteri
1007-92 13.