

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

211 917 A9

(21) A kérelem ügyszám: P/P 00141
(22) A bejelentés napja: 1995. 05. 24.
(30) Elsőbbségi adatok:
90/02479 1990. 07. 20. SE

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 39/00

A 61 K 39/395

A 61 K 47/48

Az alapul szolgáló szabadalom
száma: 91/5646 országkódja: ZA
Az alapul szolgáló külföldi szabadalomnak
az oltalmi idő számítása szempontjából
figyelembe veendő kezdő napja: 1991. 07. 18.
Az oltalom e naptól számított 20 évig tartható fenn.

A hazai oltalom kezdete: 1994. 07. 01.

(72) Feltalálók:

Kalland, Terje, Löddeköping (SE)
Hedlund, Gunnar, Lund (SE)
Lando, Peter, Malmö (SE)
Akerblom, Eva, Uppsala (SE)
Dohlstein, Mikael, Lund (SE)

(73) Szabadalmaz:

Pharmacia AB, Helsingborg (SE)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Antitest konjugátumok

Az átmeneti oltalom az 1–19. és 29. igénypontokra vonatkozik.

A találmány antitest konjugátumokra vonatkozik, amelyek a citotoxikus T-sejtek (CTL) aktiválására képesek. A konjugátumok olyan nemkívánt sejtek elroncsolására alkalmazhatók, amelyek többek között rák különböző formáival, autoimmun folyamatokkal, paraziták, baktériumok, vírusok és gombák által okozott fertőzésekkel kapcsolatosak.

A találmány háttere

Az utóbbi években lépéseket tettek annak érdekében, hogy antitesteket olyan ágensekkel kombinálva alkalmazzanak, amelyek közvetlen toxikus hatást fejtenek ki célsejtekre (citotoxikus szerek, citotoxinok), annak érdekében, hogy a célsejtekre gyakorolt szelektív hatást érjenek el, és megakadályozzák és minimalizálják a többi sejtre gyakorolt nonspecifikus hatást. A javasolt kombinációk a kovalensen kötött komplexektől, amelyek kötést biztosító molekulákat tartalmaznak, nem-kovalensen kötött komplexeken át az egyszerű keverékig terjednek [pl. Ghose et al., J. Natl. Cancer Inst. 61, 657-676 (1979); Carlsson et al., Biotechnology 7, 567-73 (1989)]. A javasolt citokinek többek között a diftéria toxin, ricin, ricin A alegysége, gelonin és *Pseudomonas aeruginosa* A exotoxinja (Takeda Chemical Ind. EP-A-336 406 számon közzétett európai szabadalmi bejelentése, Pastan et al. WO-A-88/00703 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentése).

A hibridomatechnika megjelenésével és így a monoklonális antitestek hozzáférhetőségével lehetővé vált, hogy az antitestek és citotoxikus ágensek közötti komplexek koncepciójának kihasználásával specifikusabban irányítsuk a citotoxikus ágenseket a célba vezető sejtpopulációhoz.

Tekintetbe véve a citotoxikus ágensek célsejtektől eltérő sejtekre gyakorolt károsító hatásának felismerését, javasolták, hogy a citotoxikus ágensek immunstimuláló anyagokkal legyenek helyettesítve, amelyek kiváltják a T-limfociták képződését és aktiválják a CTL-ket. Egyes javaslatok antitestek olyan konjugátumaira vonatkoznak, amelyekben az antitestek kapcsolva vannak

(i) olyan antitestekkel, amelyek T-sejt receptor ellen irányulnak vagy olyan vegyületekkel, amelyek képesek T-sejt receptorhoz kapcsolódni (Mass. Inst. Techn. EP-A1-180 171 számon közzétett szabadalmi bejelentése);

(ii) olyan vegyületekkel, például antigénekkal, mitogénekkal, más idegen proteinekkel és peptidekkel, amelyek aktiválják a citotoxikus T-sejteket (Neorex Corp. EP-A1-334 300 számon közzétett szabadalmi bejelentése);

(iii) MHC antigénekkal, (Behringwerke AG. EP-A1-352 761 számon közzétett szabadalmi bejelentése);

(iv) olyan antigénekkal, amelyek ellen a kezelendő személy immunitást mutat (Med. Res. Council. WO-A-90/11779 számon 1990. 10. 18-án közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentése);

(v) egy meg nem nevezett baktérium enterotoxinnal (Ochi and Wake, UCCA-SYMPOSIUM: Cellular Immunity and Immunotherapy of Cancaers, 1990. január 27. - február 3., Abstract CE 515, 109. oldal).

Az eddig javasolt immunstimulátorok azonban vagy túl specifikusak, vagy hatásukban túl általánosak. Így például a klasszikus antigének a 10^5 T-sejtből mindössze mintegy 1 T-sejtet aktiválnak, míg a mitogének a T-sejtek nagy részét képesek potenciálisan aktiválni.

Úgy találták, hogy bizonyos ágensek a T-sejtek kisebb részének aktiválását közvetítik, azaz a T-sejteket viszonylag nagy gyakorisággal, de messze nem 100%-ban aktiválják [Fleischer et al., Exp. Med. 167, 1697-1707 (1988); White et al., Cell 56, 27-35 (1989)]. Ezek az ágensek hatékonyabb aktivátorok, mint a klasszikus antigének, így ezeket szuperantigéneknek nevezik [áttekintő összefoglaló: Kapper és Marrack, Science 248, 705 (1990)]. Kimutatták továbbá [Dohlsten et al., Immunol. 71, 96-100 (1990); Hedlund et al., Cell. Immunol., 129 426-434 (1990)], hogy az eddig ismert szuperantigének képesek kötődni a célsejtek MHC II típusú molekuláihoz és aktiválni az olyan T-sejteket, amelyek megfelelő T-sejt receptor V-béta láncot hordoznak. A nyilvánosságra hozott adatok arra utalnak, hogy az MHC kötés a T-sejt kötés és aktiválás létrejöttének előfeltétele. Nem zárható ki, hogy a jövőben olyan szuperantigént találjanak, amelyek T-sejt receptor V-alfa láncra vagy más, a T-sejteknek csak egy szubpopulációjánál megtalálható felületi szerkezeten keresztül hatnak.

A Staphylococcus enterotoxin A (SEA) szuperantigén immunszabályozó hatását szintén ismertették [Platsoucas et al., Cell. Immunol. 97, 371-85 (1986)].

A legtöbb jelenleg ismert szuperantigént korábban toxinként ismerték és mindegyik mikrobiális eredetű. A Staphylococcus enterotoxinok például enterálisan toxikusak és aktiválják a T-sejteket, a két hatás megkülönböztethető egymástól [Fleischer et al., Cell. Immunol. 144, 4501-06 (1990); Infekt. Immun. 59, 2126-34 (1991)].

Korábban javasolták a szuperantigéneknek az MHC II típusú antigént hordozó sejtek CTL- közvetítette lízisének irányítására való alkalmazását (Pharmacia AB WO-A-91/04053 számon 1991. 04. 04-én közzétett szabadalmi bejelentése oltalmi körébe tartoznak, de konkrétan nem említik az olyan szuperantigént, amelyek kovalens immunkonjugátumok alkotórészei.

Az olyan sejtek azonban, amelyek nem vagy csak csekély mértékben fejeznek ki MHC II típusú proteineket, nem kötődnek kellő mértékben a szuperantigénekhez, hogy lízisüket a CTL-ken keresztül hatékonyan irányítsák. Így az MHC II típusú antigént hordozó sejtek általános bősége miatt, továbbá mivel a tumor sejteken az MHC II típusú antigének nincsenek bőségben, a szuperantigének az ilyen nemkívánt sejtek specifikus pusztítása szempontjából csekély értéket mutatnak.

Úgy találtuk azonban, hogy CTL-k által közvetített specifikus sejtpusztító hatás érhető el szuperantigénekkal, ha kovalensen kapcsolódnak olyan antitesthez, amely egy az elpusztítandó sejtre specifikus epitóp ellen irányul. Az immunrendszer aktiválása indukálhat olyan célsejteket, amelyek nem fejeznek ki MHC II típusú antigént, ami fokozhatja a kívánt lítikus hatást.

A találmány összefoglalása

A találmány tárgya új antitest konjugátumok

- (i) amelyek (1) egy célsejt elleni antitestet és (2) egy szuperantigént tartalmaznak, azaz olyan szerkezetet, amelyet a T-sejtek felismernek (kölsönhatásba lépnek vele vagy kapcsolódnak hozzá), és amely aktiválja a T-sejteket, különösen a CTL-eket;
- (ii) célsejtek elroncsolására szolgáló módszerek, különösen emlőskön végzett terápiás kezelések kapcsán, továbbá eljárás T-sejtek, mint pl. CTL-k specifikus aktiválására;
- (iii) eljárás konjugátumok szintézisére; és
- (iv) gyógyszerkészítmények, amelyek a konjugátumot tartalmazzák, és eljárás a gyógyszerkészítmények előállítására.

A célsejtek elroncsolására vonatkozó módszerek magában foglalják a rák, autoimmunitás, vírusos fertőzések, bakteriális fertőzések, gombás fertőzések és más betegségek terápiás kezelését, aminek lényege az, hogy bizonyos sejteket nagy pontossággal pusztítunk el. A találmány szerinti konjugátumok olyan gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazhatók, amelyek az említett betegségek esetén célsejtek elpusztítására alkalmazhatók. A kezelendő emlős állat, elsősorban azonban ember.

A találmány részletes ismertetése

A konjugátum szuperantigén része

Az új antitest-konjugátumokra olyan szerkezet jellemző, amelyet a szuperantigén T-sejtek felismernek. A konjugátumok általában fiziológiás pH-nál oldhatók és szérumban *in vitro* oldhatók.

Előnyös szuperantigének például a Staphylococcus enterotoxinok (SE), mint például a SEA, SEB, SEC, SED és SEE, toxoidok, azok aktív fragmensei vagy peptidjei, és más olyan anyagok, amelyek lényegében véve így hatva aktiválják a CTL-eket. Szuperantigének lehetnek más mikrobiális (bakteriális, valamint vírus eredetű) termékek is, mint például Staphylococcus törzsek termékei, pl. toxikus sokk szindróma toxinok (TSST-1), Streptococcusok termékei, pl. pirogén exotoxin A, és bakteriális exoproteinek és proteinek, amelyeket Mycoplasma arthridis termel, amelyek hasonlóan lépnek kölcsönhatásba a T-sejtekkel, mint a szuperantigének. A szuperantigének úgy állíthatók elő, hogy azok természetes termelőjét vagy genetikailag (rekombinációs technikával) manipulált sejteket tenyészünk, vagy potenciálisan úgy, hogy a peptidet szintetizáljuk. A találmány szerinti módszerben alkalmazott szuperantigének, ha a bemutatott kísérleti modellben alkalmazzuk, analóg hatást kell kifejtenie, mint amit a kísérleti részben bemutatunk.

Az előnyös szuperantigének potenciálisan képesek a polimorf T-sejtek CTL-k aktiválásával kapcsolatos felületi proteinek izomorf alakjainak mintegy 1–14%-ához, különösen a T-sejt receptor V-béta lánchoz kötődni.

A konjugátum antitest része

Az antitest előnyösen monoklonális antitest, bár poliklonális antitest is használható, ha kellően szűk specifitással rendelkezik. Az expressziós antitest kifejezésen

általánosságban antitesteket értünk, így ide tartoznak az antitestek aktív fragmensei és más olyan molekulák, amelyek egy antitest kötődőképességét utánozzák, feltételezve, hogy megfelelő specifitással, aviditással és affinitással rendelkeznek a kérdéses célsejtek irányában. Ide tartoznak a genetikailag manipulált (rekombinációs úton előállított) antitestek és antitestszármazékok vagy más hasonlóan kötődő szerkezetek. Egy megvalósítási mód esetén az antitest tumor sejtek antigén-determinánsra, például egy vastagbél-karcinómával kapcsolatos determinánsra (epitopra, szerkezetre) specifikus. Az is elképzelhető, hogy az antitest olyan antigén-determinánsokra specifikus, amelyek autoimmunitásért felelős sejteken, vírussal fertőzött sejteken, baktériumokon, parazitákon vagy gombákon vagy más nemkívánt sejteken fordulnak elő. A konjugátum hatékonyságától függően az antitest egy olyan antigén ellen irányulhat, amely belsőleg kapcsolódik az antitesthez a kötődés után, feltételezhető azonban, hogy az ilyen antitest-specifitás nem előnyös.

A találmány kidolgozása kapcsán vizsgált monoklonális antitestek: a C215 antitest, amely egy a GA-733 csoportba tartozó antigén ellen irányul [lásd például az EP-A-376 746 számú publikációt és az abban említett hivatkozásokat; Larsson et al., Int. J. Canc. 42, 877–82 (1988) cikket], a C242 antitest [Larsson et al., Int. J. Canc. 42, 877–82 (1988)], valamint a Thy-1.2 antitest [Mab C. Opitz et al., Immunobiol. 160, 483 (1982)]. Feltételezhetően olyan monoklonális antitestek is használhatók, amelyek más célsejt-felületi szerkezetekre specifikusak. Az olyan monoklonális antitestek előállítása, amelyek a kiválasztott célsejtekre nézve egyedi epitopok ellen irányulnak, jól ismert, lásd például a fenti publikációkat. A C242 epitop vagy C215 epitop ellen irányuló monoklonális antitest kifejezésen olyan antitesteket értünk, amelyek keresztreakáló epitopokkal reagálnak.

A három eddig vizsgált monoklonális antitest közül a C215-konjugátumok valószínűleg kevésbé fontosak, mivel ezek egy tumor antigénen levő olyan epitoppal reagálnak, amely túl gyakran fejeződik ki normál sejteken. Úgy tűnik, hogy a C242-konjugátumokra vonatkozóan több specifitási adat van, bár eredményeink azt mutatják, hogy ezeket magasabb dózisban kell alkalmazni. A Thy-1.2 ellen irányuló Mab C a humán ráksejtek célzására valószínűleg kevésbé értékes, mivel a Thy-1.2 antigén egy nem-humán emlős tumorsejtre specifikus.

A C242 monoklonális antitestet termelő hibridoma sejt vonal 1990. január 26-án ECACC 90012601 számon került letétbe helyezésre az European Collection of Animal Cell Culture (Porton Down, Salisbury, Wilt, Nagy-Britannia) intézetnél.

A szuperantigént az antitesthez kapcsoló szerkezet

A találmány szerinti előnyös konjugátumban a szuperantigén kovalensen van kapcsolva az antigénhez egy kovalens összekötőelemen (–B–) keresztül. Ha fontos, hogy a konjugátum az elpusztítandó sejthez adagolva, például egy állatnak adagolva ne bomoljon, a kötésnek az elérendő hatáshoz szükséges ideig metabolikusan stabilnak kell lennie. Előnyös továbbá, ha a kötés maga

nem okoz immunológiai reakciókat. Általában a kötésnek inerte kell lennie olyan értelemben, hogy emellett a konjugátum hatékony célsejt-kötő specificitással (antitumor, antivírus stb.) és a citotoxikus T-sejteket aktiváló hatékony kapacitással rendelkezzen.

A tudományos és szabadalmi szakirodalomban számos olyan funkciós csoportot javasoltak, amelyek immunkonjugátumok összekötőelemében alkalmazhatók. Ennek megfelelően a találmány szerinti új konjugátumokban levő -B- összekötőelem olyan szerkezeteket tartalmazhat, amelyek lehetnek

- (i) aminok és hidrazidok (amidok = $-\text{CONR}_1-$ vagy $-\text{NR}_1\text{CO}-$ képletű csoportot tartalmazó vegyületek, ahol a szabad vegyértékek telített szénatomhoz kapcsolódnak, és R_1 hidrogénatomot vagy alkilcsoportot, például rövidszénláncú (1-6 szénatomos) alkilcsoportot vagy egy a természetes alfa-aminosavakban, előnyösen hidrofíli aminosavakban előforduló alfa-N-helyettesítőt jelenthet; hidrazidok = $-\text{CONHNH}-$ vagy $-\text{NHNHOC}-$ képletű csoportot tartalmazó vegyületek, ahol a szabad vegyértékek telített szénatomhoz kapcsolódnak);
- (ii) tioéterek és diszulfidok ($-\text{S}_r-$ képletű csoportot tartalmazó vegyületek, ahol S jelentése kénatom, r értéke 1 vagy 2, és a szabad vegyértékek közvetlenül kapcsolódnak telített szénatomokhoz);
- (iii) egyenes, elágazó szénláncú vagy ciklusos telített szénhidrogénláncok, amelyek adott esetben egy vagy több hidroxilcsoporttal vagy aminocsoporttal lehetnek helyettesítve;
- (iv) éterek ($-\text{O}-$ képletű csoportot tartalmazó vegyületek, ahol a szabad vegyértékek közvetlenül kapcsolódnak telített szénatomokhoz);
- (v) primer aminok vagy diszubsztituált hidrazinok ($-\text{NH}-$ vagy $-\text{NH}-\text{NH}-$ képletű csoportot tartalmazó vegyületek, ahol a szabad vegyértékek közvetlenül kapcsolódnak telített szénatomokhoz).

Az összekötőcsoport hosszának a szakterületen szokásosnak kell lennie, azaz 180 atomnál rövidebbnek, például 100 atomnál kevesebbnek, de 3-6 atomnál hosszabbnak, előnyösen 16 atomnál hosszabbnak kell lennie.

Az előnyös összekötőcsoport hidrofíli és nem tartalmaz aromás gyűrűt. A -B- összekötőcsoport részét képező előnyös hidrofíli szerkezetek például: (i) természetben előforduló α -aminosavak polipeptidláncai (pl. aszparaginsav és amidja, glutaminsav és amidja, lizin, arginin, glicin, treonin, szerin és adott esetben hisztidin); (ii) oxalkilénláncok, például $[-\text{O}(\text{CH}_2)_n-]$ képletű csoportok, ahol n értéke 2-5 egész szám, előnyösen 2-3, n' értéke 1-20; (iii) -S- (tioéterek), -O- (éterek) és -CONH- csoportok (nem helyettesített aminok), amelyek rövid (1-4 szénatomos), előnyösen 1 vagy 2 szénatomos nem helyettesített szénhidrogénláncához kapcsolódnak.

Az $[\text{F}-(\text{Pro})_m]\text{F}$ típusú hidrofíli szerkezetben hidrofíli aminosavak lehetnek jelen. A képletben F aminosavszekvenciát, előnyösen 4-8 maradékból álló szekvenciát képvisel, és a jelenlevő aminosavak lehetnek szerin, glicin vagy treonin, m értéke 1-4, n értéke 4-8 (Cetus Corp. WO-A-85/03508 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentése).

A -B- összekötőcsoport a konjugátum antitest- vagy szuperantigén részének vagy egy bizonyos helyéhez, vagy véletlenszerűen kapcsolódhat. Potenciális kapcsolódási helyek az amino-terminális és karboxi-terminális vég és egy lizinmaradék (omega aminocsoport). Ha az antitest vagy szuperantigén tiocsoportot vagy diszulfidcsoportot tartalmaz (cisztin, illetve cisztein), ezek a csoportok szintén alkalmazhatók a kovalens kötés kialakítására, ha csak ezek nem eszenciálisak a konjugátum aktív részének aktivitása szempontjából. Ha vannak jelen szénhidrogén-szerkezetek, ezek oxidálhatók aldehidcsoportokká, amelyek azután alkalmazhatók a konjugátum más csoportjainak kapcsolásához (vö. Cetus Corp. EP-A-240 200 számú szabadalmi bejelentése).

A találmány szerinti konjugátumok nem tartalmazhatnak jelentősebb mennyiségben észterköteket és labilis amidköteket, különösen tirozin-, illetve hisztidin-maradékkal alkotottakat nem. Ha a szintézis során ilyen képződtek, ezek hidroxil-ammal eltávolíthatók [Endo et al., Cancer Res. 48, 3330-3335 (1988)].

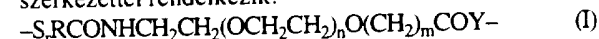
Az aktív antitestrészenként jelen levő szuperantigén csoportok száma normálisan 1-5, előnyösen 1 vagy 2.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a konjugátum az antestre számított szuperantigén és/vagy a szuperantigénben alkalmazott kötési helyek és/vagy a -B- összekötőcsoport stb. szempontjából lényegében véve homogén. Más szóval a konjugátumban az egyes konjugátum molekuláknak ezen változók szempontjából azonosnak kell lenniük.

A konjugátumnak nemkonjugált antitestekből és nemkonjugált szuperantigénektől lényegében véve mentesnek kell lennie.

A szuperantigén és antitest aránya, az összekötőelem stb. az optimális konjugátumban a választott monoklonális antitesttől (beleértve a típust, altípust, termelő klón, specificitást) és a választott szuperantigénektől függ. A leírásunkban adott kísérleti modellek alapján ki lehet választani az optimális paramétereket és más szuperantigéneket és más antitesteket.

A találmány szerinti megoldásnak a bejelentési napig legtöbbet tanulmányozott megvalósítási módja szerint a -B- összekötőcsoport a következő (I) képletű szerkezettel rendelkezik:



Az (I) képletben a szabad vegyértékek aktív részéhez kapcsolódnak. Ez vagy közvetlenül, vagy további kétértékű inert szerkezeteken keresztül történik, amelyek beleértendők a -B- összekötőcsoportba;

n értéke 0-nál nagyobb egész szám, például 1-20, előnyösen 2 vagy ennél nagyobb szám, a legtöbb esetben 10-nél kisebb egész szám;

m értéke 1 vagy 2;

S jelentése kénatom, amely mindkét vegyértékével közvetlenül kapcsolódik egy-egy telített szénatomhoz (-S_r- jelentése tioéter vagy diszulfidcsoport);

r értéke 1 vagy 2;

Y jelentése -NH-, -NHNH-, vagy -NHN=CH- képletű csoport, amely a baloldali végével egy az (I) képlet jobboldali végén látható CO csoporthoz, míg a jobboldali végével egy telített szénatomhoz vagy egy

karbonilcsoportoz (csak akkor, ha Y jelentése -NHNH- csoport) kapcsolódik;

R előnyösen egy (1–4 szénatomos, gyakran 1 vagy 2 szénatomos) alkilcsoportot képvisel, amely adott esetben helyettesítve lehet egy vagy több (1–3, előnyösen kettőnél kevesebb) hidroxilcsoporttal.

Az antitest-szuperantigén konjugátum előállítás

A találmány szerinti antitest konjugátumokat úgy állíthatjuk elő, hogy az ezeket termelő sejtek tenyésztéséből vagy más olyan közegből kinyerjük és tisztítjuk, amelyben ezeket szintetizáltuk.

A találmány szerinti új konjugátumokat a technika állása szerinti ismert konjugátum-szintetizáló módszerekkel szintetizálhatjuk, azaz géntechnikai módszerekkel (rekombináns technikákkal) vagy megfelelő antitest és szuperantigén felhasználásával megfelelő funkciós csoportokon keresztül, klasszikus kapcsolási reakciókkal. A proteinekben jelen levő és normál esetben alkalmazható funkciós csoportok lehetnek:

- (i) Szénhidrátszerkezetek. Ez a szerkezet aldehidcsoportokká oxidálható, amelyek azután H_2NNH- csoportot tartalmazó vegyülettel reagáltathatók a $-C=NH-NH-$ csoport kialakítására.
- (ii) Tiolcsoport (HS-). A tiolcsoportot olyan vegyülettel reagáltatjuk, amely tiolcsoporttal reaktív csoportot tartalmaz, a tioétercsoportok vagy a diszulfidcsoportok kialakítására. Proteinek szabad tiolcsoportjai cisztin-maradékban vannak jelen, és tiolzással vagy natív cisztin-maradékokban levő diszulfidhidak hasításával vihetők be proteinekbe.
- (iii) Szabad aminocsoportok (H_2N-) aminosavmaradékokban. Az aminocsoportok amidcsoportok kialakítására olyan vegyületekkel reagáltathatók, amelyek elektrofil csoportokat, például aktivált karboxilcsoportot tartalmaznak. A szabad aminocsoport előnyösen egy aminoterminális aminocsoport vagy a lizinmaradék omega aminocsoportja.
- (iv) Aminosav-maradékok szabad karboxilcsoportja. A karboxilcsoportok reaktív (aktivált) karboxilcsoportokká alakíthatók, majd aminocsoportot tartalmazó vegyületekkel reagáltathatók amidcsoport kialakítására. Ilyenkor azonban elővigyázatossági intézkedéseket kell tenni, hogy minimalizáljuk az olyan aminocsoportokkal képződő amidcsoportok kialakulását, amelyek a karboxilcsoportokkal együtt ugyanazon proteinen vannak jelen. A szabad karboxilcsoport előnyösen egy karboxiterminális karboxilcsoport vagy egy alfa-amino-dikarbonsav karboxi csoportja.

A H_2NNH- csoportot, tiol-reaktív csoportot, aktivált karboxilcsoportot vagy aminocsoportot tartalmazó vegyületek lehetnek bifunkcionális kapcsoló reagensek vagy lehet egy antitest vagy egy szuperantigén. A csoportok közvetlenül kapcsolódnak telített szénatomokhoz, kivéve a H_2NNH- csoportot, amely karbonil-szénatomhoz is kapcsolódhat. A csoportok lehetnek antitestbe vagy szuperantigénbe szokásos módszerekkel bevitt csoportok.

A rekombináns technika megfelelő segédeszközt

biztosít az olyan konjugátumok előállítására, amelyekben a részek speciálisan kapcsolódnak a másik terminális aminocsoportjához. Egy az alkalmazott módszerhez illő összekötőcsoportot ezek közé lehet iktatni.

Az alkalmazott reageneket úgy választjuk meg, hogy azok biztosítsák a fent definiált -B- összekötőcsoport kialakítását. A szokásos bifunkcionális reagensek a Z-B'-Z' képlettel jellemezhetők, ahol Z és Z' jelentése olyan funkciós csoportok, amelyek kölcsönösen összeférhetők egymással, és a proteinekben jelen levő funkciós csoportokkal kovalens kötést tesznek lehetővé (lásd fent). B' jelentése olyan inert összekötőcsoport, amely ugyanazt a szerkezetet foglalja magában, mint a fent említett -B- összekötőcsoport. Közlebből Z és Z' lehet azonos vagy eltérő, és jelenthet tiolcsoportot, tiolcsoporttal reaktív csoportot, aktivált karboxilcsoportot, $-CONHNH_2$ stb. csoportot. E csoportok részletesebb ismertetését lásd az „Új reagensek” címszó alatt.

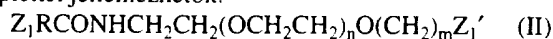
A találmány szerinti konjugátumok kialakítására a következő - a kísérleti részben részletesen ismertetett - módszert alkalmazzuk:

- (i) az antitestet vagy szuperantigént egy tiolcsoporttal reaktív csoportot, valamint aminocsoporttal reaktív csoportot tartalmazó szerves reagenssel reagáltatjuk olyan antitest vagy szuperantigén kialakítására, amely tiolcsoporttal reaktív csoportot hordoz, és
- (ii) az antitest, illetve szuperantigén maradék részét tiolcsoportot vagy védett tiolcsoportot és aminocsoporttal reaktív csoportot tartalmazó szerves reagenssel reagáltatjuk olyan antitest vagy szuperantigén kialakítására, amely tiolcsoportot vagy védett tiolcsoportot hordoz, majd
- (iii) az (i), illetve (ii) lépéssel kapott terméket egymással reagáltatjuk olyan konjugátum kialakítására, amelyben a szuperantigén az antitesthez diszulfid- vagy tioétercsoporton keresztül kapcsolódik.

Az egyes csoportok kapcsolásának körülményei a peptidkémiaiban alkalmazott módon önmagukban ismertek. A kapcsolás történhet lépésenként vagy egy lépésben, intermedier funkcionális csoportok kialakításával, amelyek inert térköztartó csoportokkal kapcsolhatók a kiindulási anyaghoz. A konjugátum szintézise és tisztítása/kinyerése az illető proteinre nézve mindig nem-denaturáló körülmények között történik. Ez rendszeren vizes közeget, 3 és 10 közötti pH-értéket, illetve 0 °C és 50 °C közötti hőmérsékletet jelent. A konkrét értékek a reagáltatandó csoportoktól és a kinyerendő konjugátumtól függenek. Lásd részletesebben az „Új reagensek” cím alatt.

Új reagensek (a találmány szerinti megoldással kapcsolatban kidolgozva)

A -B- összekötőcsoportot tartalmazó konjugátum kémiai szintéziséhez új heterobifunkcionális reagenst fejlesztettünk ki, amelyek a következő (II) általános képlettel jellemezhetők:



ahol m és n az (I) képletből megadottakkal megegyezik, Z_1 jelentése tiolcsoporttal reaktív elektrofil csoport, tiolcsoport ($-SH$) vagy védett tiolcsoport (pl.

AcS-), azzal a feltétellel, hogy tiolcsoport és hidroxil-csoport az R csoportban levő ugyanazon szénatomhoz nem kapcsolódhat. Tiolcsoporttal reaktív elektrofil csoportok lehetnek például

- (i) halogénatom, amely egy telített szénatomhoz kapcsolódik, előnyösen alfa-halogén-alkil-karbonil-származék formájában;
- (ii) aktivált tiolcsoport, előnyösen egy úgy nevezett reaktív diszulfidcsoport ($-SSR_1$), amely egy telített szénatomhoz kapcsolódik;
- (iii) 3,5-dioxo-1-azaciklopent-3-én-1-il-csoport.

A reaktív diszulfidszármazékok definícióját lásd EP-A-128 885 számon közzétett szabadalmi bejelentésben.

Z_1' jelentése aktivált karboxilcsoport, azaz egy elektrofil csoport. Ilyenek például a karbonsav-halogenidek ($-COCl$, $-COBr$ és $-COI$), a vegyes karbonsav anhidridek ($-CO-O-CO-R_1$), reaktív észterek, mint pl. N-szukcinimidoil-oxi-karbonil-észter, $-C(=NH)-OR_2$, 4-nitro-fenil-karboxilát ($-CO-OC_6H_4NO_2$) stb, ahol R_1 és R_2 rövidszénláncú alkilcsoport vagy R_2 lehet még benzilcsoport is.

A találmány szerinti új reagensek előnye, hogy egyenletes konjugátumokat eredményeznek, tekintettel az $(OCH_2CH_2)_n$ szerkezetben levő n egész számra, azaz n értéke az adott konjugátum minden egyes molekulájában azonos.

A Z_1' és Z_1 csoportokkal reagáló funkciós csoportok natív antitestként aktív molekulákon vagy natív szuperantigénen lehetnek jelen vagy ezekbe bevihetők. A Z_1' és Z_1 csoportok azután szelektíven reagáltathatók a megfelelő antitesttel vagy szuperantigénnel, a technika állása szerint, e csoportok esetére ismert módon.

Ismert módszer például a lánchosszabbítás módszere, akár a találmány szerinti új reagensekből, akár a konjugálandó vegyületből kiindulva.

A találmány szerinti reagensekből kiindulva végzett lánchosszabbítással olyan konjugátumokat kaphatunk, amelyekben B- jelentése

- (1) $-COR'-S_r-CONHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nO(CH_2)_m-COY-$, ahol CO NH-csoporthoz kapcsolódik,
- (2) $-COR'-S_r-CONHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nO(CH_2)_m-CONHNH-R''NHN=$, ahol N= rendszerint egy sp^2 -hibridizációs állapotban levő szénatomhoz kapcsolódik, amely egy antitestben vagy (glikozilezett) szuperantigénben levő oxidált szénhidrogén-szerkezetből származik,
- (3) $-CO(CH_2)_mO(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2NHCOR'-S_r-CONHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nO(CH_2)_mCOY-$, ahol CO egy NH-csoporthoz kapcsolódik,
- (4) $-CO(CH_2)_mO(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2NHCOR'-S_r-CONHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nO(CH_2)_mCONHNH-R''NHN=$, ahol N= a (2) pontban meghatározott módon kapcsolódik, ahol

R, R' és R'' jelentése az (I) általános képlet esetén R jelentéseként megadottakkal megegyezik, és r jelentése a fenti.

A (II) általános képletű reagensek a (III) általános képletű

$NH_2CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nO(CH_2)_mCOOH$ (III) vegyületekből állíthatók elő, ahol m értéke 1 vagy 2, n értéke 1–20, például 2–20 vagy 3–9.

- 5 Az olyan (III) általános képletű vegyületek szintézise, amelyekben m értéke 1 és 2, és n értéke 1–10, ismert [Julien et al., Tetrahedron Letters, 29, 3803–06 (1988); Houghton and Southby, Synth. Commun. 19(18), 3199–3209 (1989); EP-A-410 280 (publikálva 1991. 01. 20-án); Slama and Rando, Carbohydrate Research, 88, 213–221 (1981); Biochemistry 19, 4595–4600 (1980)].

- 10 A (II) általános képletű vegyületek úgy állíthatók elő, hogy egy (III) általános képletű vegyületet egy ismert, Z – B' – Z' általános képletű bifunkcionális vegyülettel reagáltatunk, ahol Z megegyezik Z_1 jelentésével, B' jelentése megegyezik R'' jelentésével, ahogyan korábban R és R' esetén meghatároztuk, és Z' egy aktivált karboxilcsoportot jelent. A reakció után a karboxilcsoportot aktivált karboxilcsoporttá, például $Z_1' =$ aktivált észtercsoporttá, például N-szukcinimidil-oxi-karbonil-csoporttá, 4-nitro-fenil-oxi-karbonil-csoporttá, 2,4-dinitro-fenil-oxi-karbonil-csoporttá stb. alakítjuk.

- 15 A (III) általános képletű új vegyületek és új származékaik a következő általános képlettel jellemezhetők:
 $XCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nOCH_2Y$ (IV)
25 ahol n értéke 2–20, előnyösen 3–20 vagy 3–9. X jelentése H_2N -csoport, beleértve a protonált formát is ($^+H_3N-$) vagy adott esetben helyettesített H_2N -csoport, amely H_2N - csoporttá alakítható, előnyösen hidrolízissel vagy redukcióval. X jelenthet például nem helyettesített aminocsoportot, nitrocsoporthoz, amidocsoportot (karbamidcsoportot), így például (rövidszénláncú acil)-amido-csoportot (formil-amido-, acetyl-amido-, ... hexanoil-amido-csoportot), az acilcsoport alfa-helyzetű szénatomján elektronvonzó csoporttal helyettesített acil-amido-csoportokat, különösen CF_3CONH- , CH_3COCH_2CONH- stb. csoportokat, ftálimidoilcsoportot, amely adott esetben a gyűrűn helyettesítve lehet, karbamátcsoportot [különösen $R_1'OCONH-$ és $(R_1'OCO)(R_2'OCO)N$ -csoportot, mint például N-(terc-butil-oxi-karbonil)-amino-csoportot (Boc), N-(benzil-oxi-karbonil)-amino és di{N-(benzil-oxi-karbonil)}-amino-csoportot (Z, illetve diZ), amelyek adott esetben a gyűrűben helyettesítve lehetnek], alkil-amino-csoportot, amelyben a nitrogénatomhoz kapcsolódó szénatom egy aromás rendszerhez képest alfa-helyzetű, mint például az N-monobenzil-amino- és dibenzil-amino-, tritil-amino-csoport (trifenil-metil-amino-csoport) stb., beleértve az olyan analóg csoportokat is, ahol a metil-szénatom (beleértve a benzil-csoport ilyen szénatomját is) helyett szilíciumatom van jelen, így például lehet N,N-di(terc-butil-szilil)-amino-csoport, továbbá 4-oxo-1,3,5-triazin-1-il-csoportot, amely adott esetben 3- és/vagy 5-helyzetben rövidszénláncú alkilcsoporttal lehet helyettesítve.

- 55 A fentiekben és a továbbiakban R_1' és R_2' jelentése rövidszénláncú alkilcsoport, különösen szekunder vagy terciér alkilcsoportok, továbbá 1–3 fenilcsoporttal helyettesített metilcsoport, ahol a fenilcsoportok adott esetben helyettesítve lehetnek. A rövidszénláncú alkil- és acilcsoportok 1–6 szénatomot tartalmaznak.

Y jelentése karboxilcsoport ($-\text{COOH}$, beleértve $-\text{COO}-$) vagy olyan csoport, amely átalakítható karboxilcsoporttá, előnyösen hidrolízissel vagy oxidációval. A legfontosabb csoportok olyan észtercsoportok, amelyek karbonil szénatomja vagy ortoészterekben az annak megfelelő atom az (I) általános képlet jobboldali terminálisan levő metilén-csoportához kapcsolódik. Ilyenek az alkilészter-csoportok ($-\text{COOR}_1'$); ortoésztercsoportok [$-\text{C}(\text{OR}_3')_3$] és a fent definiált reaktív észtercsoportok. R_3' jelentése megegyezik R_1' jelentésével.

Y jelenthet még $-\text{CHO}$, $-\text{CN}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONR}_1'\text{R}_2'$ csoportot, ahol R_1' és R_2' jelentése a fenti.

A (IV) általános képletű vegyületek ismert kiindulási vegyületekből ismert módszerekkel állíthatók elő. Alkalmassági utak:

- A) lánctalakítás,
- B) terminális funkcionális csoportok átalakítása,
- C) szimmetrikus poliéter átalakítása nemszimmetrikus éterré,
- D) biszimmetrikus lánc hasítása két azonos fragmenssé.

Az ismétlődő $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ csoportot tartalmazó, előnyösen alkalmazható kiindulási anyagok kereskedelemben kaphatók. Ilyenek például a 2–6 ismétlődő egységet tartalmazó oligoetilén-glikolok. Hasonló terminális csoportokat tartalmazó alkalmas vegyületek még a megfelelő dikarbonsavak és diamionok.

Eltérő terminális csoportokat tartalmazó alkalmas kiindulási anyagok az olyan omega-hidroxi-monokarbonsavak, amelyekben a terminális csoportok térben messzebb vannak a polietilén-oxi-hídtól. Ilyen, 1–5 ismétlődő egységet tartalmazó vegyületeket ismertek például Nakatsuji, Kawamura és Okahara; Synthesis (1981) 42. oldalán.

Gyógyszerkészítmények és előállításuk

A találmány szerinti gyógyszerkészítmények önmagukban ismert formulázási alakokat foglalnak magukban, azonban ezek az új, találmány szerinti konjugátumokat tartalmazták. Így a készítmények lehetnek liofilizált szemcsés anyagok, steril vagy aszeptikusan készített oldatok, tabletták, ampullák stb. Tartalmazhatnak vivőanyagokat, például vizet (előnyösen fiziológiásan elfogadható pH-ra pufferolt formában, például PBS-t) vagy más inert folyékony vagy szilárd anyagokat. Általánosságban szólva a készítményeket úgy állítjuk elő, hogy a konjugátumot egy vagy több vizes vagy nemvizes vivőanyaggal keverjük, kívánt esetben más alkalmas adalékanyagokkal együtt. Feltétlenül szükséges, hogy a vivőanyagok és az alkalmazott körülmények ne befolyásolják károsan a konjugátum aktivitását. A vizet önmagában a vivőanyagok közé értjük.

Adagolás és a használat módja

A konjugátumokat normál esetben feloldjuk és előre elkészített adagolási formában adagoljuk, ahol minden egyes adag tartalmazza a konjugátum hatékony mennyiségét, ami a mellékelt eredmények alapján feltételezhetően 10 μg és 50 μg közötti. A konkrétan

adagolandó mennyiség esetenként változó, és függ a kezelendő személy testtömegétől és korától, az adagolás módjától, a betegség típusától, az antitesttől, a szuperantigéntől, a $-\text{B}-$ összekötőcsoporttól stb.

Az adagolás a technika állása szerint ismert módon történhet, azaz a találmány szerinti konjugátumot egy a célsejt lízisével előidézhető mennyiségben vagy terápiásan hatékony mennyiségben érintkezésbe hozzuk a célsejtekkel. A fentiekben említett indikációk esetén leggyakrabban parenterálisan, így például injekciós vagy infúziós (szubkután, intravénás, intraartériás, intramuszkuláris) úton adagoljuk emlősejteknek, például embernek. A konjugátumot a kezelendő egyednek adagolhatjuk lokálisan vagy szisztematikusan is.

A „célsejt lízisével előidézhető mennyiség” kifejezésen olyan mennyiséget értünk, amely elegendő ahhoz, hogy a CTL-ket a célsejt elroncsolásra aktiválja.

A találmány szerinti megoldást a csatolt igénypontokban határoztuk meg. A találmány szerinti megoldást a következő példákkal mutatjuk be közelebbről a korlátozás szándéka nélkül. A kísérleti rész I. részében bemutatjuk a konjugátum kémiai szintézisét, a II. részben pedig a 4. példa szerinti módon készített konjugátum hatását a T-sejteknek a célsejtek lízisére történő aktiválására.

1. KÍSÉRLETI RÉSZ

Omega-amino-PEG-karbonsav előállítása

1. Izopropil-8-hidroxi-3,6-dioxa-oktanoát

500 ml dietilén-glikolhoz nitrogénatmoszférában részletekben hozzáadunk 23 g (1,0 mol) feldarabolt nátriumot. Amikor a nátrium teljesen elreagált, az elegyet szobahőmérsékletre lehűtjük, és keverés közben hozzáadunk 76 g (0,5 mol) bróm-ecetsavat. Az elegyet 18 óra hosszat 100 °C-on keverjük, majd a dietilén-glikol fölöslegét 530 Pa nyomáson ledesztilláljuk. Ezután 400 ml izopropil-alkoholt és részletekben 51 g (0,65 mol) acetil-kloridot. Az elegyet 65 °C-on 18 óra hosszat keverjük, majd szobahőmérsékletre lehűtjük, és 3,5 g (0,15 mol) nátrium-acetáttal semlegesítjük. Az elegyet leszűrjük és majdnem szárazra pároljuk, majd 200 ml vízben feloldjuk. A vizes fázist 3-szor 50 ml 1,1,1-triklór-etánnal extraháljuk. Az összegyűjtött szerves fázist 20 ml vízzel mossuk. A terméket az összegyűjtött vizes fázisból 50 ml diklór-metánnal extraháljuk, amelyből bepárlással 55 g olajos terméket kapunk.

2. Izopropil-11-hidroxi-3,6,9-trioxa-undekanoát

700 ml trietilén-glikolhoz nitrogénatmoszférában részletekben hozzáadunk 23 g (1,0 mol) feldarabolt nátriumot. Amikor a nátrium teljesen elreagált, az elegyet szobahőmérsékletre lehűtjük, és keverés közben hozzáadunk 76 g (0,5 mol) bróm-ecetsavat. Az elegyet 18 óra hosszat 100 °C-on keverjük, majd a trietilén-glikol fölöslegét 530 Pa nyomáson ledesztilláljuk. Ezután hozzáadunk 400 ml izopropil-alkoholt és részletekben 51 g (0,65 mol) acetil-kloridot. Az elegyet 65 °C-on 18 óra hosszat keverjük, majd szobahőmérsékletre lehűtjük, és 3,5 g (0,15 mol) nátrium-acetáttal semlegesítjük. Az elegyet leszűrjük és majdnem szárazra pároljuk, majd 200 ml vízben feloldjuk. A vizes fázist 3-szor 50 ml 1,1,1-triklór-etánnal extraháljuk. Az összegyűjtött

tölt szerves fázist 20 ml vízzel mossuk. A terméket az összegyűjtött vizes fázisból 50 ml diklór-metánnal extraháljuk, amelyből bepárlással olajos terméket kapunk. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,26 (d, 6H); 3,07 (s, 2H); 3,6–3,8 (m, 12H); 4,11 (s, 2H); 5,09 (m, 1H).

3. 8-(*N*-Ftalimidoil)-3,6-dioxaoktanol

400 ml dimetil-formamidban feloldunk 365 g (2,2 mol); trietilén-glikolból és SOCl_2 -ből készített) 8-klór-3,6-dioxaoktanolt, és keverés közben hozzáadunk 370 g (2,0 mol) kálium-ftalimidet. Az elegyet 18 óra hosszat 110 °C-on keverjük, majd a dimetil-formamidot csökkentett nyomáson ledesztilláljuk. A kapott maradékot 40–50 °C-on 1,5 l toluolban szuszpendáljuk, és a kálium-kloridot leszűrjük. A terméket –10 °C-ra történő hűtéssel kristályosítjuk. Az anyalúgból koncentrációval és újabb kristályosítással egy második frakciót nyerhetünk.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2,90 (s, 1H); 3,51–3,58 (m, 2H); 3,60–3,68 (m, 2H); 3,73–3,78 (t, 2H); 3,89–3,94 (t, 2H); 7,70–7,78 (m, 4H).

4. Izopropil-17-(*N*-ftalimidoil)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoát

2,8 ml (35 mmol) piridin 30 ml diklór-metánnal készült oldatához keverés közben –5 °C-on hozzáadjuk 8,5 g (36 mmol) 8-(*N*-ftalimidoil)-3,6-dioxaoktanol és 10,2 g (36 mmol) trifluor-metánszulfonsav-anhidrid diklór-metánnal készült oldatát. Körülbelül 30 perc múlva a szerves fázist 0,5 mol/l-es sósavval és vízzel mossuk. Szárítás (Na_2SO_4) és szűrés után hozzáadunk 12 g (48 mmol) 1. pont szerinti izopropil-8-hidroxi-3,6-dioxaoktanoátot és 6,5 g (46 mmol) Na_3PO_4 -t, és az elegyet szobahőmérsékleten 20 óra hosszat élénken keverjük. Ezután a reakcióelegyet leszűrjük, és a szűrletet bepároljuk. A maradékot 1,1,1-triklór-étán és víz között megosztjuk. A szerves fázis bepárlásával 13 g olajos terméket kapunk.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,26 (d, 6H); 3,58–3,76 (m, 18H); 3,90 (t, 2H); 4,11 (s, 2H); 5,09 (m, 1H); 7,70–7,89 (m, 4H).

5. 17-(*N*-ftalimidoil)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánsav

13 g 4. pont szerinti izopropil-17-(*N*-ftalimidoil)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoátot feloldunk 50 ml tetrahidrofuran és 50 ml koncentrált sósav elegyében. Az oldatot 16 óra hosszat szobahőmérsékleten tartjuk, majd 200 ml vízzel hígítjuk, és a tetrahidrofuránt csökkentett nyomáson eltávolítjuk. A vizes fázist egyszer toluollal mossuk és kétszer diklór-metánnal extraháljuk. A szerves fázist szárításával (Na_2SO_4) és bepárlásával 8,5 g olajos terméket kapunk.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 3,57–3,76 m, 18H); 3,91 (t, 2H); 4,11 (s, 2H); 4,8 (br, 2H); 7,65–7,90 (m, 4H).

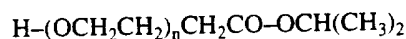
6. Izopropil-17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoát

8,5 g 5. pont szerinti 17-(*N*-ftalimidoil)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánsavat feloldunk 150 ml etanol és

3 ml hidrazin-hidráttal elegyében. Az oldatot szobahőmérsékleten 16 óra hosszat keverjük, majd hozzáadunk 100 ml 3 mol/l-es sósavat, és az elegyet 3 óra hosszat vízszafolyató hűtő alatt forraljuk. Szobahőmérsékletre történő hűtés és leszűrés után a pH-t nátrium-hidroxiddal 9 értékre állítjuk, majd majdnem szárazra pároljuk. Ezután vizet adunk hozzá és újra majdnem szárazra pároljuk, az oldat pH-ját sósavval 4 értékre állítjuk, és az elegyet szárazra pároljuk. A terméket 100 ml izopropillal és 2 ml acetilkloriddal szobahőmérsékleten egy éjszakán át kezeljük, majd bepároljuk. A maradékot vízben összegyűjtjük és alkálikus pH-nál (7–11) diklór-metánba extraháljuk. Bepárlással 3,3 g terméket kapunk.

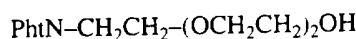
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1,26 (d, 6H); 3,17 (t, 2H); 3,65–3,80 (m, 18H); 4,16 (s, 2H); 5,07 (m, 1H).

A szintetizált amino-PEG-karbonsavak képletei



1. vegyület: $n = 1$

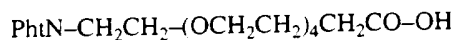
2. vegyület: $n = 1$



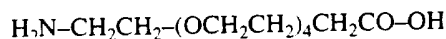
3. vegyület, PhI-N: *N*-ftalimidoil



4. vegyület, PhI-N: *N*-ftalimidoil



5. vegyület



6. vegyület

BIFUNKCIÓS REAGENSEK ÉS KAPCSOLÁSI TERMÉKEK KÉSZÍTÉSE

A szerkezeti képleteket külön lapon adjuk meg.

1. példa

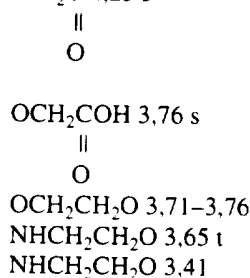
17-Jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánsav-*N*-hidroxi-szukcinimid-észter előállítás

A. 17-Jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánsav előállítása [(A) termék]

1,1 g (3,2 mmol) izopropil-17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoátot (lásd kísérleti rész I. részt) feloldunk 3 ml 1 mol/l-es nátrium-hidroxid oldatban, és 30 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk. Hozzáadunk 1,5 ml 6 mol/l-es sósavat, és az elegyet szárazra pároljuk. A maradékot diklór-metánnal felvesszük és leszűrjük, az oldószer ledesztillálása után 545 mg 17-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoátot kapunk. 460 mg (1,39 mmol) kapott vegyületet feloldunk 10 ml borát-pufferben (pH = 8,4). Az oldatból a levegőt nitrogéngázzal kihajtjuk. 1 perc alatt cseppenként hozzáadjuk 432 mg (1,52 mmol) *N*-szukcinimidil-2-jód-acetát 5 ml dioxánnal készült oldatát, miközben a pH-t 5 mol/l-es nátrium-hidroxid adagolásával 8,4 értékre tartjuk. A reakcióelegyet nitrogéngáz bevezetése közben 15 percig keverjük. Vékonyréteg-kromatográfiás

elemzés szerint (eluálószer: diklór-metán/metanol 60:35) a reakció néhány perc alatt lejártszódik. 15 perc múlva a reakcióelegy pH-ját 3 értékre állítjuk, és az oldatot fagyaszttjuk és liofilizáljuk. A reakcióelegyet PEP-RPC HR 30/26 jelű reverz fázisú oszlopon (Pharmacia Biosystem AB) 0–13% gradiensű acetonnitrilt tartalmazó 0,1% trifluorecetsavval megosztjuk, majd 13% acetonnitrilt tartalmazó 0,1% trifluor-ecetsavval izokratikusan elválasztjuk. A kívánt csúcsból a frakciókat összegyűjtjük és liofilizáljuk, így 351 mg 17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánosavat [(A) terméket] kapunk, kitermelés 76%.

A termék szerkezetét NMR-spektrummal igazoljuk. ^1H -NMR (D_2O) δ : ICH_2C 4,23 s



B. 17-Jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánosav-N-hidroxi-szukcinimid-észter [(B) termék]

4,5 mg (39 μmol) hidroxi-szukcinimidet bemérünk egy lombikba. 18,3 mg (39 μmol) 17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánosavat [(A) terméket] feloldunk 0,55 ml vízmentes dioxánban, és a lombikba adagoljuk. A lombikból a levegőt nitrogéngázzal kihajtjuk, és cseppenként bemérjük 8,0 mg (39 μmol) diciklohexil-karbodiimid 0,15 ml vízmentes dioxánnal készült oldatát. A lombikot nitrogéngázzal töltjük, lezárjuk és sötétbe helyezzük. A reakcióelegyet 3,5 óra hosszat keverjük. A képződött csapadékot leszűrjük. A szűrletben a (B) termék mennyisége NMR analízis alapján 89%.

2. példa (17-Jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino-immunglobulin előállítása [(C) termék])

A. Mab C215 jelű monoklonális antitest

34 mg (0,218 μmol) IgG2A immunglobulin-osztályba tartozó monoklonális antitestet (Mab C215) feloldunk 17,7 ml 0,1 mol/l-es, 0,9% nátrium-kloridot tartalmazó borát-pufferben ($\text{pH} = 8,1$), és egy lombikba bemérjük. 3,6 mg (6,4 μmol) 17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánosav-N-hidroxi-szukcinimid-észtert [(B) termék] tartalmazó 146 μmol dioxánoldatot injektálunk a pufferoldatba, és a reakciót 25 percig szobahőmérsékleten folytatjuk. Eközben a lombikot a fényhatás kizárására fóliával burkoljuk. A B reagens főlegét Sephadex G 25 K 26/40 oszlopon végzett 0,1 mol/l-es, 0,9% nátrium-kloridot tartalmazó foszfát-pufferrel ($\text{pH} = 7,5$) történő eluálással frakcionáljuk. A kívánt C terméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük. A 22 ml oldatot Amicon cellában YM 30 szűrőn 8 ml-re koncentrálnak. A koncentrációt és a

szubsztitúció fokát aminosavelemzéssel határozzuk meg, eredmény: 4,7 mg/ml; Mab C215 molekulánként 18 térköz-csoport.

5 B. Mab C242 jelű monoklonális antitest

IgG1 immunglobulin-osztályba tartozó monoklonális antitestet (Mab C242) 15-, 20- és 22-szeres moláris főlegben 17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánosav-N-hidroxi-szukcinimid-észterrel [(B) termék] reagáltatunk a 2. A példa szerinti módon, így nona-, dodeka- és tetradeka(17-jód-acetil-amino)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino-(Mab C242)-t [(C) termék] kapunk.

15 C. Mab C jelű monoklonális antitest

IgG2a immunglobulin-osztályba tartozó monoklonális antitestet (Mab C) 14- és 18-szoros moláris főlegben 17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánosav-N-hidroxi-szukcinimid-észterrel [(B) termék] reagáltatunk a 2. A példa szerinti módon, így tetra- és hepta (17-jód-acetil-amino)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino-(Mab C)-t [(C) termék] kapunk.

25 3. példa

2-Merkapto-propionil-amino-Eu³⁺-mal jelzett

staphylococcus enterotoxin A (SEA) előállítása

A. Eu³⁺-mal jelzett SEA előállítása [(D) termék]

2 mg (71 nmol) SEA-t (Toxin Technology Inc. fagyaszttva szárított terméke) 722 μl milli-Q vízben feloldunk, és bemérjük egy 15 ml-es polipropilén kémcsőbe. Hozzáadunk 100 μl 0,1 mol/l-es borát-puffert ($\text{pH} = 8,6$), majd 2160 nmol Eu^{3+} -kelát reagenst (Pharmacia Wallac Oy) 178 μl milli-Q vízben oldva. A reakciót szobahőmérsékleten egy éjszaka alatt hajtjuk végre. A reagens főlegét Sephadex G 25 PD 10 oszlopon (Pharmacia Biosystem AB) 0,1 mol/l-es foszfát-pufferrel ($\text{pH} = 8,0$) mint eluálószerrel végzett frakcionálással távolítjuk el. A kívánt D terméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük. A 3 ml oldatot Amicon cellában YM5 szűrőn 0,8 ml-re koncentrálnak. A koncentrációt aminosavelemzéssel határozzuk meg, ami 1,7 mg/ml-nek adódik. A szubsztitúció foka EuCl_3 standarddal való összehasonlítás alapján SEA molekulánként 0,8 Eu^{3+} .

50 B1. 3-(2-Piridinil-tio)-propionil-amino-Eu³⁺-mal jelzett SEA [(E) termék] és 3-merkaptopropionil-amino-Eu³⁺-mal jelzett SEA előállítása [(F) termék.]

1,24 mg (44,8 nmol) Eu^{3+} -SEA-t 0,75 ml 0,1 mol/l-es foszfát-pufferben ($\text{pH} = 8,0$) bemérünk egy 15 ml-es polipropilén kémcsőbe. Hozzáadjuk 1,6 mg N-szukcinimidil-3-(2-piridinil-tio)-propionát 1 ml etanollal készült oldatának 35 μl -ét (180 nmol), és a reakcióelegyet 30 percig szobahőmérsékleten keverjük. A kapott E terméket izolálás nélkül F terméké redukáljuk.

A fenti reakcióelegyhez 20 μl 0,2 mol/l-es Eu^{3+} -citrat oldatot adunk, és a pH-t 50 μl 2 mol/l-es ecetsavval 5 értékre állítjuk. Ezután hozzáadjuk 3,1 mg ditiotreitolt (Merck) 0,1 ml 0,9%-os nátrium-kloriddal készült oldatát, és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten 20 per-

cig keverjük. Ezután a térfogatot 50 µl 0,9%-os nátrium-kloriddal 1 ml-re kiegészítjük. Az 1 ml reakcióelegyet Sephadex G 25 NAP-10 oszlopra (Pharmacia Biosystem AB) visszük, és a kívánt F terméket 1,5 ml 0,1 mol/l-es 0,9% nátrium-kloridot tartalmazó foszfát-pufferrel eluáljuk. Az eluált F terméket 15 ml-es polipropilén kémcsőben összegyűjtjük, és azonnal, a diszulfid származékká való újraoxidálás megakadályozása mellett felhasználjuk a G termék szintéziséhez.

B2. 2-Merkapto-propionil-amino-sztafhylococcus enterotoxin A (SEA) előállítás (F2) termék]

Natív Sea-t (Toxin Technology Inc. fagyaszta szárított terméke) vagy rekombináns SEA-t (rSEA) 2-szeres mólfölöslegben vett N-szukcinimidil-3-(2-piridil-tio)-propionáttal reagáltatunk a 3B1 példa szerinti módon.

A szubsztitúció fokát Carlsson et al. módszerével [Biochem. J. 173, 723-737 (1978)] UV-elemzéssel határozzuk meg, ami SEA molekulánként 1,9 merkaptopropionil-csoportnak adódik.

4. példa

SEA-monoklonális antitest konjugátumok előállítása [(G1) és (G2) termék]

A. Eu³⁺-SEA és Mab C215 konjugátumai [(G1) termék]

A 3B példa szerinti 4-merkaptopropionil-amino-Eu³⁺-mal jelzett Sea oldatához hozzáadjuk 4 mg oktadeka(17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino)-(Mab C215) 0,1 mol/l-es, 0,9% nátrium-kloridot tartalmazó foszfát-pufferrel (pH = 7,5) készült 1,2 ml oldatát. A reakció egy éjszaka alatt szobahőmérsékleten lejátszódik. Az el nem reagált jód-alkil-csoportokat 20 µl merkaptop-etanollal 1 ml vízzel készült oldatának 5 µl-ével (1,2 µmol) blokkoljuk. A reakcióelegyet 4 óra hosszat állni hagyjuk, majd leszűrjük. A szűrletet Superose 12HR 16/50 oszlopon (Pharmacia Biosystems AB) 0,002 mol/l-es, 0,9% nátrium-kloridot tartalmazó foszfát-pufferrel (pH = 7,5) eluálva frakcionáljuk. A kívánt G terméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük és elemezzük. A proteintartalom aminosavelemzéssel meghatározva 0,22 mg/ml. A szubsztitúció foka az Eu³⁺-meghatározással IgG molekulánként egy SEA. A terméket immunstimuláló tulajdonságokra és antitestkötő-képességekre nézve is vizsgáljuk.

Az (F) termék (C) termékre vonatkoztatott mennyiségének emelésével nagyobb fokú szubsztitúciót érünk el.

B. rSEA és Mab C215 konjugátumai [(G2) termék]

Oktadeka (17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino)-(Mab C215)-t (C) 1,8-szeres mólfölöslegben 2-merkaptopropionil-amino-rSEA-val (F2) reagáltatunk a 4A példa szerinti módon. A konjugátum összetételét nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) Phast-Gelen 4-15 gradienssel határozzuk meg, és a kötéseket Phast Image-vel (Pharmacia Biosystems AB) észleljük. A kapott konjugátum 6% Mab C215-t három SEA-val,

15%-ot két SEA-val, 28%-ot egy SEA-val és 51% szubsztituálatlan Mab C215-t tartalmaz.

Egy másik kísérletben, 2,7-szeres mólfölöslegben vett F2-vel olyan konjugátumot kapunk, amely 15% Mab C215-t három SEA-val, 25%-ot két SEA-val, 34%-ot egy SEA-val, és 26% szubsztituálatlan Mab C215-t tartalmaz.

C. rSEA és Mab C242 konjugátumai

C1. Tetradeka(17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino)-(Mab C242)-t (C) 3,2-szeres mólfölöslegben 2-merkaptopropionil-amino-rSEA-val (F2) reagáltatunk a 4A példa szerinti módon. A konjugátum összetételét a 4B példa szerinti módon határozzuk meg: 4% Mab C242 négy SEA-val, 12% három SEA-val, 28% két SEA-val, 36% egy SEA-val és 20% szubsztituálatlan Mab C242.

A fenti módon járunk el, azonban a reakcióterméket 4 óra hosszat 0,2 mol/l-es hidroxil-amminnal reagáltatjuk mielőtt a Mab C242 és térfogat, valamint a SEA és a merkaptopropionil-csoport közötti instabil kötések eltávolítására oszlopfractionálást végzünk. A képződött konjugátum összetétele: 1% Mab C242 négy SEA-val, 12% három SEA-val, 27% két SEA-val, 36% egy SEA-val és 24% szubsztituálatlan Mab.

C2. Dodeka(17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino)-(Mab C242)-t (C) 3-szeres mólfölöslegben 2-merkaptopropionil-amino-rSEA-val (F2) reagáltatunk a 4A példa szerinti módon. A kapott konjugátum összetétele: 6% Mab C242 három SEA-val, 26% két SEA-val, 36% egy SEA-val és 31% szubsztituálatlan Mab C242.

C3. Nona(17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino)-(Mab C242)-t (C) 3-szeres mólfölöslegben 2-merkaptopropionil-amino-rSEA-val (F2) reagáltatunk a 4A példa szerinti módon. A kapott konjugátum összetétele: 13% Mab C242 két SEA-val, 39% egy SEA-val és 46% szubsztituálatlan Mab C242.

D. rSEA és Mab C konjugátumai

D1. Hepta(17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino)-(Mab C)-t 5,4-szeres mólfölöslegben 2-merkaptopropionil-amino-rSEA-val (F2) reagáltatunk a 4B példa szerinti módon. A kapott konjugátum összetétele a 4B példa szerinti módon elemelve: 15% négy SEA-val, 24% három SEA-val, 29% két SEA-val, 19% egy SEA-val, 3% szubsztituálatlan Mab C és 10% dimer formában.

Ugyanezt a reakciót folytatjuk le 0,2 mol/l-es hidroxil-amin jelenlétében a Mab C és a térfogat, valamint a SEA és a merkaptopropionil-csoport közötti instabil kötések eltávolítására. A kapott konjugátum összetétele: 11% Mab C három SEA-val, 24% két SEA-val, 30% egy SEA-val, 18% szubsztituálatlan Mab C és 17% dimer formában.

D2. Tetra(17-jód-acetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino)-(Mab C)-t 5,7-szeres mólfölöslegben 2-merkaptopropionil-amino-rSEA-val (F2) reagáltatunk a 4B példa szerinti módon. A kapott konjugátum összetétele: 8% négy SEA-val, 18% három

SEA-val, 30% két SEA-val, 26% egy SEA-val, 5% szubsztituátlan Mab C és 12% dimer formában.

5. példa

[17-(3-Merkapto-propionil-amino)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino]-rSEA előállítás [I] termék]

A. 17-[3-(2-piridil-tio)-propionil-amino]-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino-rSEA előállítás [H] termék]

0,53 mg (896 nmol) 17-[3-(2-piridil-tio)-propionil-amino]-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekánsav-N-hidrox-i-szukcinimid-észter (K) 43 µl dioxánnal készült oldatát hozzáadjuk 3,67 mg (128 nmol) rSEA 0,1 mol/l-es, 0,9% nátrium-kloridot tartalmazó foszfát-pufferrel (pH=7,5) készült oldatához. A reakciót szobahőmérsékleten 30 perc alatt folytatjuk le. 100 µl mintát kivesszünk, és elemezzük a szubsztitúció mértékét. A maradékot fagyasztva tároljuk I termékévé váló redukálásig.

A szubsztitúció mértékét úgy határozzuk meg, hogy 100 µl reakcióelegyet Sephadex G 50 NICK oszlopon (Pharmacia Biosystem AB) sómentesítünk, és az eluátumot UV-spektroszkópiával Carlsson és munkatársai módszerével [Biochem. J. 173, 723–737 (1978)] elemezzük. Az rSEA-hoz kapcsolva 2,7 térközcsoport található.

B. [17-(3-Merkapto-propionil-amino)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino]-rSEA előállítás [I] termék]

0,9 ml a H terméket tartalmazó reakcióelegy pH-ját 2 n sósavval 4,4 értékre állítjuk, és hozzáadunk 2,9 mg di-tio-treitol 75 µl 0,9%-os nátrium-klorid-oldatban oldva. A redukciót 30 perc alatt folytatjuk le. A reakcióelegyet Sephadex G25 NAP 10 oszlopra (Pharmacia Biosystem AB) visszük, és 1,5 ml 0,1 mol/l-es, 0,9% nátrium-kloridot tartalmazó foszfát-pufferrel (pH = 7,5) eluáljuk, és azonnal felhasználjuk a J termék szintézisére.

6. példa

SEA-monoklonális antitest konjugátum kettős térközcsoporttal előállítás [J] termék]

4,2 mg (27 nmol) dodeka(17-jód-acetil-amino)-3,6,9,12,15-pentaoxadekanoil-amino)-(Mab C242)-t (C) 1,0 ml 0,1 mol/l-es, 0,9% nátrium-kloridot tartalmazó foszfát-pufferben 43 óra hosszat reagáltatunk 1,17 mg (42 nmol), 1 ml fenti pufferben oldott [17-(3-Merkapto-propionil-amino)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadekanoil-amino]-rSEA-val (I) 1 ml fenti pufferben, sötétben, nitrogénatmoszférában. Ezután hozzáadunk 1,14 µmol merkaptó-etanol. További 1 óra reagáltatás után a reakcióelegyet Superdex 200 mmol/l-es, 0,9% nátrium-kloridot tartalmazó foszfát-pufferrel (pH = 7,5) eluáljuk. A kívánt J terméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, és a 4B példa szerinti módon elemezzük. A konjugátum összetétele: 9% Mab C242 két SEA-val, 25% egy SEA-val és 66% szubsztituátlan Mab C242.

II. KÍSÉRLETI RÉSZ

Szuperantigén-antitest konjugátumok hatása sejtekre

A következő kísérletekben baktérium toxiként

Staphylococcus enterotoxin A-t (SEA) alkalmazunk, amely a Toxin Technologies (WI;USA) intézettől szerezhető be, vagy E. coliban rekombináns fehérjeként termelhető.

5 Antitestként C215, C242 és Thy-1.2 monoklonális antitestet használunk. A C215 egy IgG2a osztályba tartozó monoklonális antitest, amely humán vastagbél-karcinoma sejtvonal ellen képződik, és különböző humán vastagbél-karcinoma sejtvonalak 37 kD-s protein antigénjeivel reagál. Az előbbieken ezekre a monoklonális antitestekre hivatkozunk. A konjugátumot az előzőekben ismertetett módon állítjuk elő.

Az elsőbbségi év előtt csak az Eu³⁺-mal jelzett SEA-C215 monoklonális antitest-konjugátumot vizsgáltuk. Az elsőbbségi év folyamán az eredményeket nem jelzett SEA-215, SEA-242, SEA-Thy-1.2 monoklonális ellenanyag konjugátumokkal igazoltuk. Az itt közölt eredmények nem jelzett konjugátumokra vonatkoznak.

20 A SEA-C215 Mab konjugátum és a nemkonjugált SEA és C215 Mab által közvetített, MHC II hiányos vagy kevés és észlelhetetlen mennyiségű MHC II-t termelő vastagbél-karcinoma sejtek elleni citotoxicitás meghatározására különböző humán, SEA-val kiterjesztett T-sejtvonalakat alkalmazunk effektor sejtekként, és vastagbél-karcinoma sejteket és MHC II⁺ Raji sejteket célsejtekként. A Colo205, SW620 és WiDr vastagbél-karcinoma sejtvonalak nem fejeznek ki MHC II csoportot, amint az a HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ és FACS elleni Mab-k festésével megállapítható. A SEA-val kiegészített sejtvonalakat perifériás vérből alakítottuk ki, a SEA-val előre bevont, mitocin C-vel kezelt MHC II⁺ BSM limfoma sejtekkel, rekombináns IL-2 (20 egység/ml) jelenlétében enyhén stimulálva. Ezek a T-sejtvonalak erősen toxikusak SEA-val bevont Raji vagy BSM sejtekre nézve, de a be nem vont vagy staphylococcus enterotoxin B-vel (SEB) bevont sejtekre nézve nem. Ez a SEA-val indukált sejtpusztítás a SEA és a célsejteken levő MHC II közötti kölcsönhatás függvénye, amint azt a HLADR antitestek blokkolásával, MHC II⁺ Raji mutáns sejtek és HLA-DR-rel átfertőzött L-sejtek [Dohlsten et al., Immunology 71, 96–100 (1990)] alkalmazásával megállapítottuk. Ezek a T-sejtvonalak aktiválhatók a C215⁺ MHC II⁺ vastagbél-karcinoma sejtek elleni T-sejt pusztítást képes indukálni. A staphylococcus enterotoxin antitest-konjugátumból függő, sejtek által közvetített citotoxicitás a SEA-C215 Mab konjugátum C215⁺ tumorsejtekhez való kötődésétől függ. E kötődés specifikitását igazolja, hogy a nem konjugált C215 Mab – de nem az irreleváns C242 és w6/32 Mab-k – gátolja a vastagbél-karcinoma sejtek lízisét. A CD⁺ és CD8⁺ T-sejtek a SEA-C215-tel kezelt C215⁺ vastagbél-karcinoma sejtek pusztítását mutatják, de nem lizálják a SEA-val kezelt sejteket. Úgy látszik, hogy a T-sejtek, valamint az MHC II⁺ tumorsejtekhez kötött SEA-C215 Mab konjugátum közötti kölcsönhatás magában foglalja a specifikus V-β TCR-szekvenciákkal való kölcsönhatást, a korábban az MHC II⁺ sejtek SEA-val indukált pusztítására vonatkozóan bemutatottakhoz hasonlóan.

Ezt egy a SEA-ra specifikus, de SEB-re nem autológ módon specifikus T-sejtvonal és a C215-SEA konjugátum közötti kölcsönhatás igazolta. A C242 Mab és Thy-1.2 Mab konjugátum a C215 Mab konjugátumhoz hasonló aktivitást mutat.

Krómmal való jelölés és a célsejtek inkubálása SEA-val

0,7×10⁶ célsejtet és 150 µCi ⁵¹Cr-t (Amersham Corp., Arlington Heights, Nagy-Britannia) 45 percig 37 °C hőmérsékleten 100 µl-ben inkubálunk. A sejteket a következő komplett tápközegben tartjuk: 2,8 térf.% következő komponensekkel kiegészített RPMI-1640 (Gibco, Paisley, GBR): 7,5% NaHCO₃, 1% nátrium-piruvát, 2% 200 mmol/l-es L-glutamin, 1% 1 mol/l-es Hepes, 1% 10 mg/ml-es gentamicin és 10% borjúembrió-szérum (FCS, Gibco, Paisley, GBR). A sejteket inkubálás után egyszer mossuk komplett, FCS-t nem tartalmazó komplett tápközeggel, és 60 percig 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk, majd 10% FCS-t tartalmazó komplett tápközeggel mossuk, és újra szuszpendáljuk ilyen tápközegben. 5×10³ célsejtet adagolunk egy U-fenekű, 96 nyílásos mikrotitráló lemez (Costar, Cambridge, USA) minden nyílásába.

Citotoxicitási vizsgálat

Az effektorsejteket különböző effektor/célsejt arányban adagoljuk a nyílásokba. A nyílásokban a végső térfogat 200 µl. Minden tesztet háromszoros ismétléssel végezzük. A lemezeket 4 óra hosszat 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk, majd a leadott krómot összegyűjtjük. Az ⁵¹Cr mennyiségét egy gammaszámlálóval (Cobra Autó-gamma, Packard) mérjük. A citotoxicitás százalékos arányát a következő képlettel számoljuk:

$$\text{citotoxicitás \%} = (X-M)/(T-M) \times 100.$$

ahol X a krómleadás cpm-ben a tesztminta esetén, M a tápközeggel inkubált célsejtek spontán krómleadása, és T az 1% nátrium-dodecil-szulfáttal inkubált célsejtek teljes krómleadása.

Eredmények

SEA-C242, SEA-C215 és SEA-anti-Thy-1.2 Mab konjugátumok kötődnek az olyan sejtekhez, amelyek kifejezik a Mab-k megfelelő epitopjait, illetve az MHC II⁺ sejtekhez. A nem konjugált SEA viszont csak az MHC⁺ sejtekhez kötődik. A nem konjugált C215, C242 és Thy-1.2 Mab a megfelelő sejtekhez kötődik, de Raji sejtekhez nem (1. 1. táblázat).

Humán T-sejtvonalak SEA-C215 Mab konjugátum jelenlétében lizálják, de nem konjugált SEA és C215 Mab jelenlétében nem lizálják az MHC II⁺ SW620, Colo205 és WiDr sejteket (1. ábra). A vastagbél-karcinoma sejtek lízise 10–100 ng/ml SEA-C215 Mab konjugátumnál látható. A lízis magas foka észlelhető különböző effektor/célsejt arányoknál SEA-C215 Mab konjugátumokkal SW620 ellen (1. ábra). Ezzel szemben a nem konjugált SEA vagy C215 Mab nem közvetít citotoxicitást SW620 sejtek ellen a vizsgált effektor/célsejt arányoknál. Ez arra utal, hogy az MHC II⁺

Colo205 sejtek lízise a konjugátumokra korlátozódik, és a nem konjugált SEA és C215 Mab nem indukálja a lízist. A SEA és SEA-C215 Mab konjugátum közvetíti az MHC II⁺ Raji sejtek és az interferonnal kezelt MHC II⁺ Colo205 sejtek T-sejtek által történő pusztítását, míg a C215 Mab nem (1. ábra).

Annak igazolására, hogy a SEA-C215 Mab konjugátummal közvetített lízis a konjugátum célsejteken levő C215 Mab molekulákhoz való specifikus kötődését foglalja magában, vizsgálatokat végeztünk, amelyekben főlegesen vett nem konjugált C215 Mab-t és C242 Mab-t alkalmaztunk, amelyek (a C215 Mab-hoz való kötődés szempontjából) irreleváns antigénhez kötődnek a vastagbél-karcinoma sejteken. A C215 Mab adagolása erősen blokkolta a citotoxicitást, míg a C242 Mab nem fejtett ki ilyen hatást (2. ábra). Hasonlóképpen a SEA-C242 Mab konjugátum által történő lízist specifikusan blokkolta a nem konjugált C242 Mab fölöslege, míg a C215 Mab nem.

A SEA-C215 Mab konjugátum MHC II SW620 vastagbél-karcinoma sejteket T-sejttől függő lizáló képessége mind CD4⁺, mind CD8⁺ T-sejtpopuláción látható volt (2. táblázat).

SEA-C215 Mab konjugátum indukálta az SW620 és Raji sejtek SEA-val kiegészített T-sejtvonal által történő lízisét, míg SEB-bel kiegészített T-sejtvonal által történőt nem (3. ábra). A SEA és SEB vonalak specifikására utal a SEA-ra, illetve SEB-re adott szelektív válaszuk, ha Raji sejteknek vannak kitéve (4. ábra). Ez azt jelzi, hogy a SEA-C215 Mab konjugátum megtartja a nem konjugált SEA-hoz hasonló V-béta TCR specifikitását.

Az ábrák magyarázata

A mellékelt 1. ábra a SEA-C215 Mab konjugátum MHC II⁺ vastagbél-karcinoma sejtek elleni CTL-k irányítását mutatja. A bal felső panel mutatja a SEA-ra válaszoló SW620 sejtek elleni CTL-k hatását különböző effektor- és célsejt arányoknál 1 µg/ml SEA-C215 Mab konjugátum, SEA, C215, valamint C215 és SEA keveréke (C215+SEA) jelenlétében vagy anélkül (-). A többi panel a SEA-C215 Mab konjugátumnak és SEB-nak a SEA-ra válaszoló CTL-k irányító kapacitását mutatja SW620 C215+MHC II⁺ vastagbél-karcinoma sejtvonal, Colo205 és WiDr, MHC II⁺ C215⁺ interferonnal kezelt Colo205 sejtek és C215⁺ MHC II⁺ Raji sejtek ellen. Az effektor/cél arány 30:1. Nem konjugált C215 Mab adagolása különböző koncentrációknál nem indukált CTL-irányítást ezen sejtvonalak ellen. SW620 sejteken, Colo205 és WiDr sejteken HLA-DR, -DP, -DQ elleni antitestek alkalmazásával végzett FACS elemzés nem mutatott ki felületi MHC II expressziót, míg a HLA-DR, -DP és -DQ jelentős expressziója nem volt észlelhető Raji sejteken és HLA-DR, -DP interferonnal kezelt Colo205 sejteken. A Colo205 sejteket a CTL vizsgálatban való felhasználás előtt 48 óra hosszat 1000 egység/ml rekombináns gamma-interferonnal kezeltük.

A 2. ábrán látható, hogy a SEA-C215 Mab konju-

gátum és SEA-C242 Mab konjugátum által indukált CTL irányítás a vastagbél-karcinoma sejtek ellen a Mab antigén-szelektivitásától függ. A Colo205 sejtek SEA-ra válaszoló CTL vonal által SEA-C215 Mab és SEA 242 Mab konjugátum (3 µg/ml) jelenlétében okozott lízise nem konjugált C215, illetve C242 Mab adagolásával (30 µg/ml) blokkolható. A konjugátumok adagolása előtt 10 perccel nem konjugált Mab-kat, illetve kontroll közeget (-) adagoltunk.

A 3. ábrán látható, hogy a SEA-C215 Mab konjugátummal bevont vastagbél-karcinoma sejtek lízisét SEA közvetíti, míg SEA-ra válaszoló CTL-k nem. Autológ SEA és SEB szelektív T-sejtvonalakat használtunk 10:1 effektor-/célsejt arányban SW620 és Raji célsejtek ellen SEA-C215 Mab konjugátum, nem konjugált C215 Mab és SEA keveréke (C215+SEA), valamint nem konjugált C215 Mab és SEB keveréke (C215+SEB) jelenlétében (1 µg/ml), illetve anélkül (kontroll).

A 4. ábrán a SEA-C242 konjugátum és a SEA-anti-Thy-1.2 Mab konjugátum által indukált, célsejtjeik (Colo205 tumorsejtek, illetve EL-4 tumorsejtek) elleni citotoxocitást ábrázoltuk.

1. táblázat

C215+ vastagbél-karcinoma sejtekhez és MHC II+ Raji sejtekhez kötött SEA-C215 Mab konjugátum

Reagens	Sejt	FACS elemzés
SEA-C215 Mab	Colo205	pozitív
	Raji	pozitív
C215 Mab	Colo205	pozitív
	Raji	negatív
SEA-C242 Mab	Colo205	pozitív
	Raji	pozitív
C242 Mab	Colo205	pozitív
	Raji	negatív
SEA-anti-Thy-1.2 Mab	EL-4	pozitív
anti-Thy-1.2 Mab	EL-4	pozitív
SEA	Colo205	negatív
	Raji	pozitív
kontroll	Colo205	negatív
	Raji	negatív
	EL-4	negatív

A sejteket 30 percig különböző hozzáadott szabályozó anyagokkal (PBS-BSA) jégen inkubáltuk, mostuk és a következőkben ismertetett módon feldolgoztuk. A Colo205 sejtekhez kötött C215 Mab és C242 Mab, valamint az EL-4 sejtekhez kötött anti-Thy-1.2 festésének detektálását FITC-vel jelzett nyúl anti-egér Ig-vel végeztük. A Raji sejtekhez kötött SEA festésének detektálását nyúl anti-SEA szérumszám segítségével, majd FITC-sértés anti-nyúl Ig segítségével végeztük. A Colo205 és Raji sejtekhez kötött SEA-C215 Mab konjugátum festésének detektálását a C215 és SEA esetén ismertetett módon végeztük. A FACS elemzést FACS star plus (Becton és Dickinson) segítségével végeztük. A második és harmadik lépésben végzett festést a háttér meghatározására végeztük.

2. táblázat

CD4+ és CD8+ CTL-k lizálják a C215-SEA konjugátumot mutató vastagbél-karcinoma sejteket

Effektor ^A	Cél	Citotoxicitás %		
		Kontroll	SEA	C215-SEA
CD4+	SW620	2	5	50
CD4+	Raji	0	41	43
CD8+	SW620	0	1	23
CD8+	Raji	2	72	68

A: A CTL-ket (SEA-3) 30:1 effektor-/célsejt arányban alkalmaztuk 1 µg/ml SEA, illetve C215-SEA jelenlétében vagy anélkül.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Oldható antitest konjugátum, amely egy antitestből és egy szuperantigénből áll.

2. Az 1. igénypont szerinti oldható antitest konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy

(i) az alkalmazott antitest specifikus egy betegséggel kapcsolatos célsejten levő sejtfelületi szerkezetre, és

(ii) az alkalmazott szuperantigén T-sejtek által felismerhető, és képes aktiválni a citotoxikus T-sejteket (CTL).

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a szuperantigén képes kölcsönhatásba lépni a T-sejt receptor-komplex részével.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a célsejt egy betegséggel, célszerűen rákkal, autoimmunitással, parazitás és mikrobális fertőzéssel kapcsolatos, és az antitest specifikusan egy az említett célsejteken levő antigén determináns ellen irányul.

5. A 2-4. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a betegség rák, és az antitest egy tumorsejten, előnyösen vastagbél-karcinómával kapcsolatos sejten levő antiogén determináns (epitop) ellen irányul.

6. Az 5. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az antitest specifikusan a C242 epitop ellen irányul.

7. Az 5. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az antitest specifikusan egy a GA-733 csoportba tartozó proteinen levő epitop ellen, különösen a C215 epitop ellen irányul.

8. A 7. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az epitop a C215 epitop.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy antitestcsoportonként 1-5 szuperantigén-csoportot tartalmaz.

10. A 9. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy antitestcsoportonként 1-3 szuperantigén-csoportot tartalmaz.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy monoklonális antitestet tartalmaz.

12. AZ 1–11. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy bakteriális eredetű szuperantigént tartalmaz.

13. A 12. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy valamely staphylococcus enterotoxin szuperantigént tartalmaz.

14. Az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy SEA szuperantigént tartalmaz.

15. Az 1–14. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy az antitestet és a szuperantigént egy –B– kovalens szerves összekötőcsoport köti össze.

16. A 15. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a –B– kovalens összekötőcsoport legalább egy amidszerkezetet tartalmaz.

17. A 15. vagy 16. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy a –B– kovalens szerves összekötőcsoport hidrofíl és legalább 6 szénatomból álló láncot tartalmaz.

18. A 15. igénypont szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy –B– összekötőcsoportként egy $-SrOCONHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)nO(CH_2)_mCOY-$ (I)

képletű csoportot tartalmaz, ahol

r értéke 1 vagy 2,

R jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport,

n értéke 1–20,

m értéke 1 vagy 2, és

Y jelentése –NH–, –NHNH– vagy –NHN=CH– képletű csoport.

19. Az 1–18. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, *azzal jellemezve*, hogy olyan célsejtek lízisére szolgál, amelyek egy olyan sejtfelületi antigént hordoznak, amely ellen a konjugátum antitestcsoportja irányul.

20. Eljárás célsejtek lizálására, *azzal jellemezve*, hogy a célsejteket egy olyan oldható antitest konjugátum sejtlyázó mennyiségével hozzuk érintkezésbe, amely egy antitesthez kapcsolt szuperantigént tartalmaz, ahol az antitest a célsejtre specifikus, és a szuperantigén T-sejtek által felismerhető, és képes aktiválni a citotoxikus T-sejteket (CTL).

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szuperantigénként, antitestként és az antitestet és szuperantigént összekötő csoportként az 1–19. igénypontok bármelyike szerint definiált csoportokat használunk.

22. Eljárás konjugátum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(i) egy antitestet és/vagy szuperantigént tartalmazó konjugátumot szintetizálunk ismert módon, a szuperantigén legalább egy a következő szerkezetek valamelyikén keresztül az antitesthez történő kapcsolásával: (a) szénhidrogén-szerkezet, (b) funkciós csoportok: tiol-, diszulfid-, karboxil- és aminocsoport, és

(ii) a kapott konjugátumot a szintetizáló közegből kinyerjük.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kapcsolást egy a szuperantigénen és/vagy antitesten jelen levő aminocsoporton keresztül végezzük.

24. A 23. igénypont szerinti eljárás olyan konjugátum előállítására, amelyben a szuperantigén diszulfid- vagy tioétercsoportokon keresztül kapcsolódik az antitesthez, *azzal jellemezve*, hogy

(i) az antitestet vagy a szuperantigént egy, tiolcsoporttal reaktív és amonicssoporttal reaktív csoportokat tartalmazó szerves reagenssel reagáltatva tiolcsoporttal reaktív csoportot tartalmazó antitestet vagy szuperantigént alakítunk ki,

(ii) az antitest vagy szuperantigén többi részét egy, tiolcsoportot vagy védett tiolcsoportot és egy aminocsoporttal reaktív csoportot tartalmazó szerves reagenssel reagáltatva tiolcsoportot vagy védett tiolcsoportot tartalmazó antitestet vagy szuperantigént alakítunk ki, majd

(iii) az (i) és (ii) lépésben kapott termékeket egymással reagáltatva olyan konjugátumot alakítunk ki, amelyben a szuperantigén egy diszulfid vagy tioétercsoporton keresztül kapcsolódik.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy tiolcsoportokkal reaktív csoportot tartalmazó aminocsoporttal reaktív reagensként alfa-halogén-acetaldehidet, és tiolcsoportot vagy védett tiolcsoportot tartalmazó reagensként egy $Z_1RCONHCH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nO(CH_2)_mZ_1'$ (II) általános képletű bifunkcionális kapcsoló reagenst alkalmazunk, ahol

m értéke 1 vagy 2,

n értéke 1–20,

Z_1 jelentése tiolcsoporttal reaktív elektrofil csoport, tiolcsoport vagy védett tiolcsoport, azzal a feltétellel, hogy ugyanahhoz a szénatomhoz tiolcsoport és hidroxilcsoport nem kapcsolódik,

R és Z_1' jelentése aktivált karboxilcsoport.

26. A 22–25. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szuperantigénként és antitestként valamely a 2–14. igénypontok bármelyike szerinti anyagot alkalmazunk.

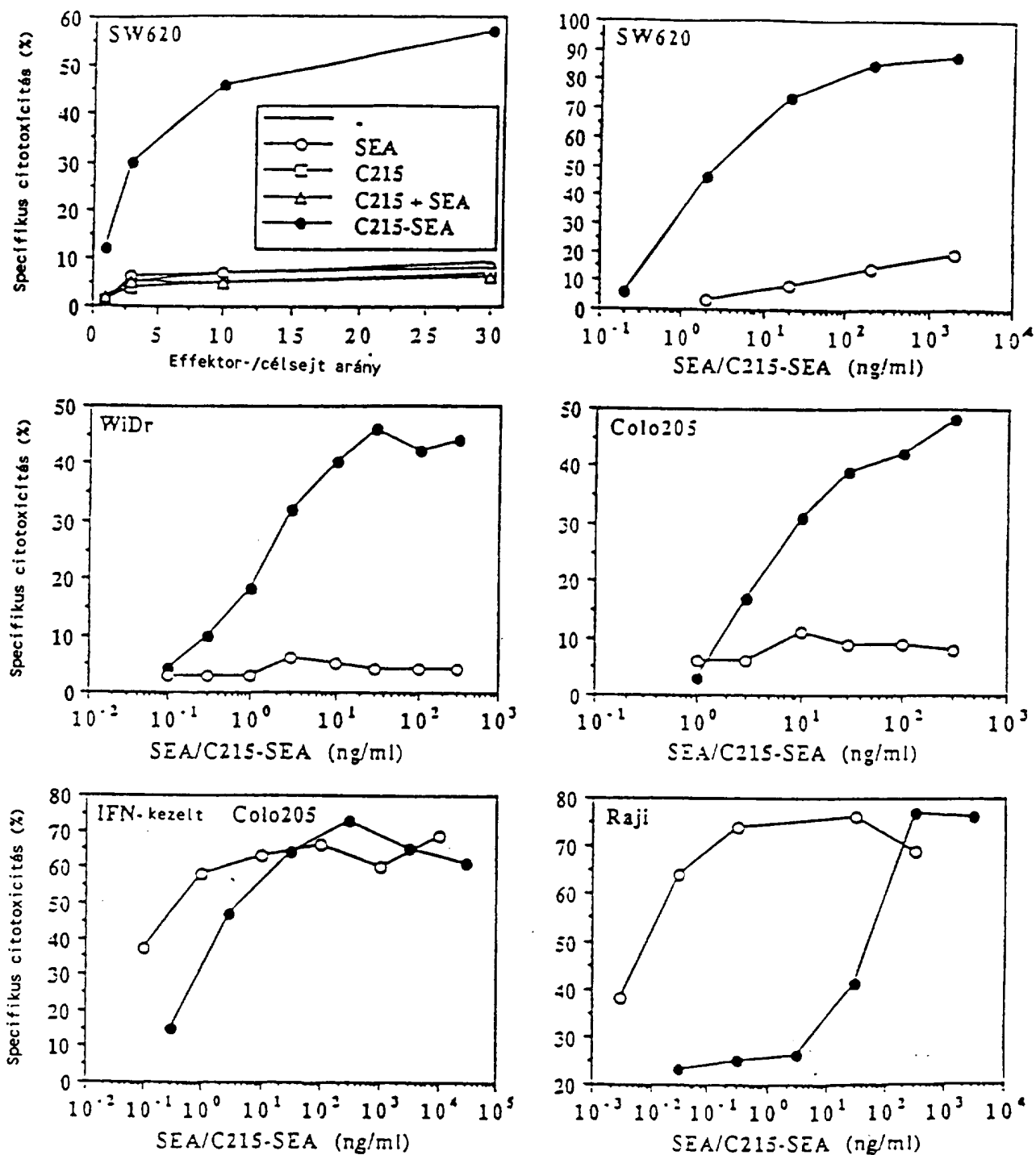
27. Az 1–18. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum alkalmazása rákban, autoimmun betegségben, vírus, baktérium vagy gomba által okozott fertőzésben vagy parazita által okozott fertőzésben szenvedő emlősök, beleértve az embert is, kezelésre.

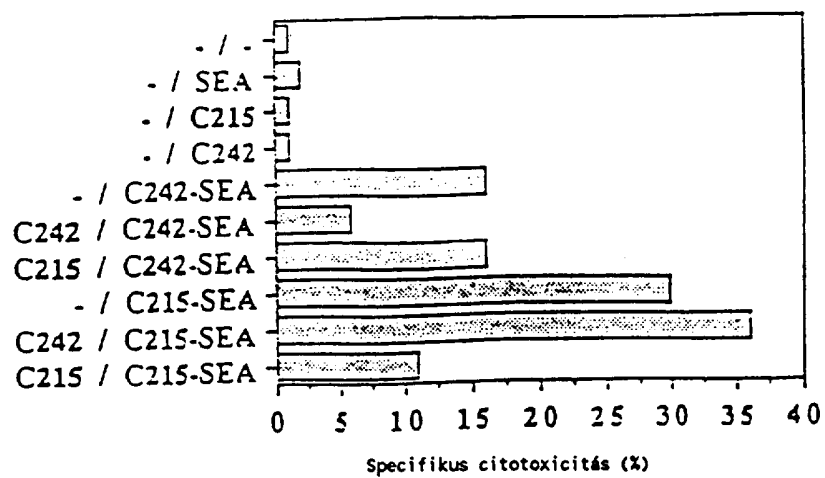
28. Az 1–18. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum alkalmazása rák, autoimmun betegség, vírus, baktérium vagy gomba vagy parazita által okozott fertőzés kezelésére szánt gyógyszerkészítmény előállítására.

29. Az 1–18. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, lényegében véve az itt ismertetetteknek megfelelően, hivatkozással a kiviteli példákra.

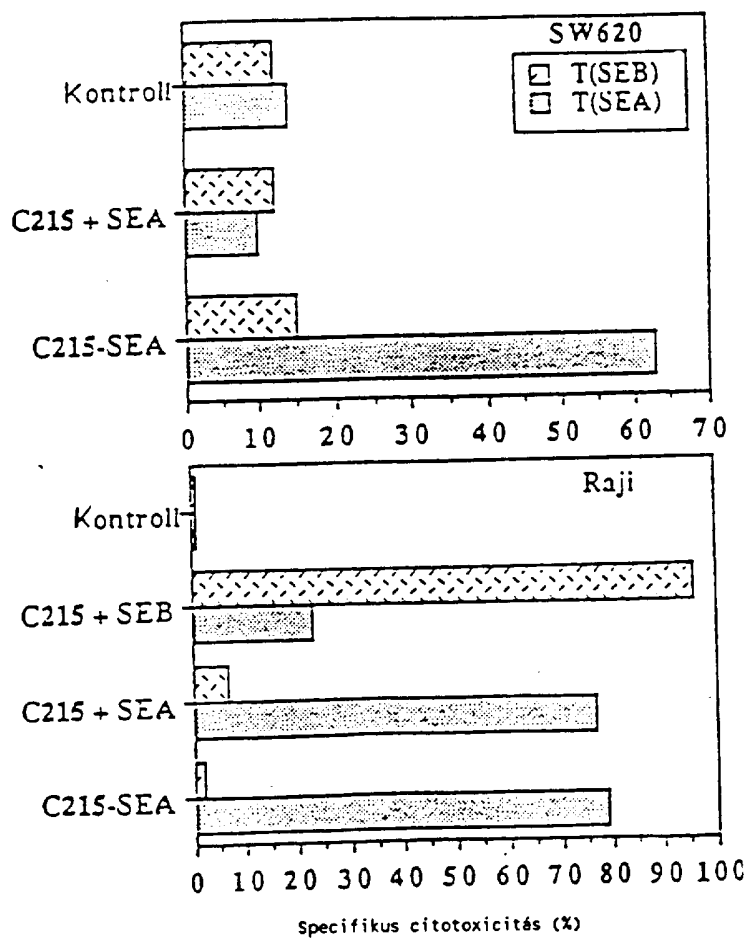
30. A 22. igénypont szerinti eljárás, lényegében véve az itt ismertetetteknek megfelelően, hivatkozással a kiviteli példákra.

1. ÁBRA



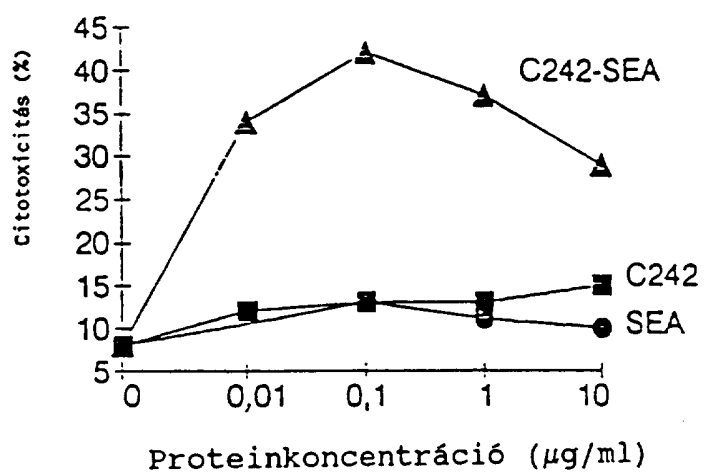


2. ÁBRA

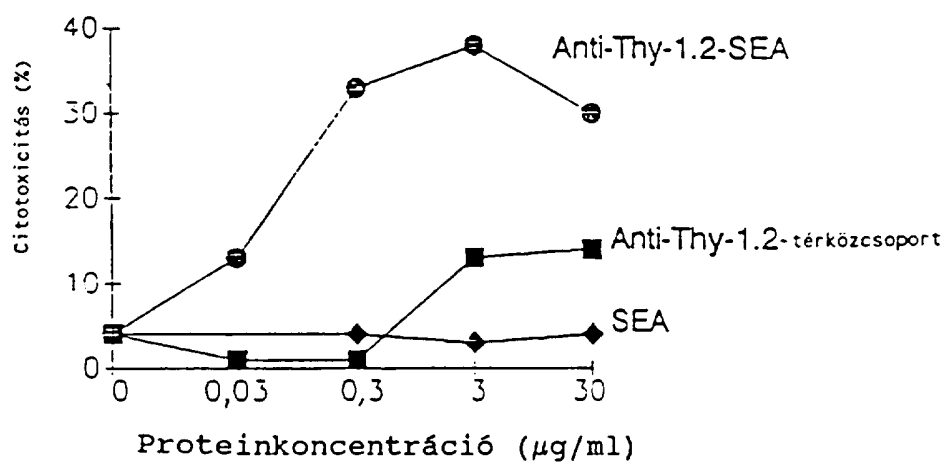


3. ÁBRA

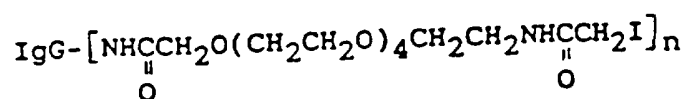
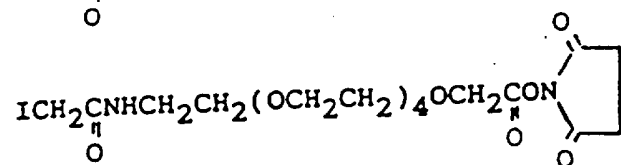
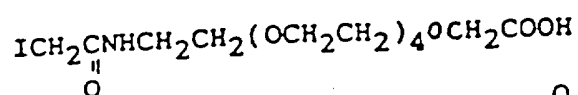
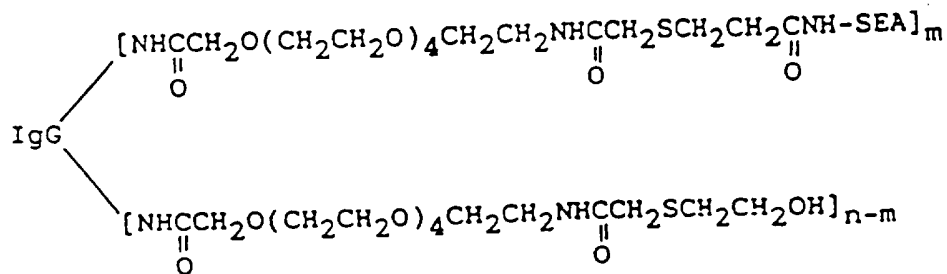
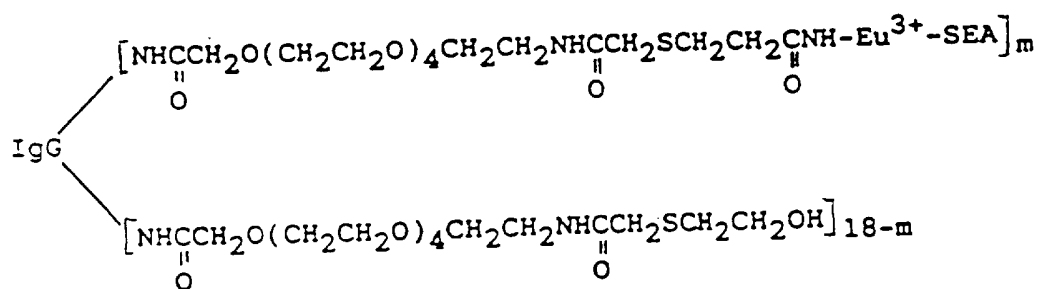
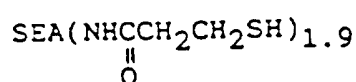
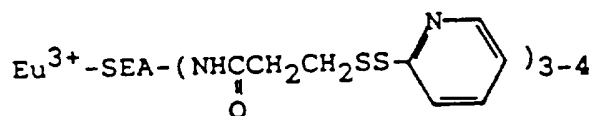
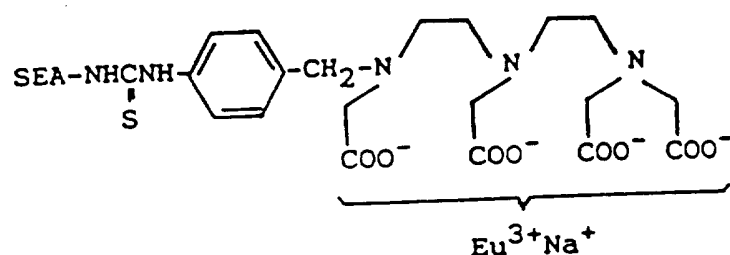
C242-SEA konjugátum és Colo205 tumorsejtek



Anti-Thy-1.2-SEA konjugátum és EL-4 tumorsejtek



4. ÁBRA


$$n = 4, 7, 9, 12, 14, 18$$


c

