

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2003 - 2430**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.03.2002**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.03.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/10112825**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.11.2003**  
(Věstník č. 11/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP02/02928**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/080979**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**A 61 K 47/48**

(71) Přihlašovatel:

FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH, Bad  
Homburg v. d. H., DE;

(72) Původce:

Sommermeier Klaus, Rosbach v. d. H., DE;  
Eichner Wolfram, Butzbach, DE;  
Frie Sven, Friedberg, DE;  
Jungheinrich Cornelius, Bad Homburg, DE;  
Scharpf Roland, Ranstadt, DE;  
Lutterbeck Katharina, Friedberg, DE;

(74) Zástupce:

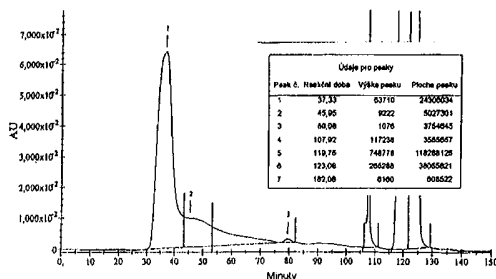
Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Konjugáty z hydroxyalkylškrobu a účinné látky**

(57) Anotace:

Řešení se týká sloučenin obsahujících konjugát hydroxyalkylškrobu (HAS) a účinné látky, přičemž hydroxyalkylškrob je vázán na aktivní látku buď přímo nebo prostřednictvím spojovníku. Řešení se dále týká způsobů výroby kovalentních konjugátů HAS s účinnou látkou, přičemž HAS a účinná látka spolu reagují v reakčním médiu, kde reakčním médiem je voda nebo směs vody a organického rozpouštědla obsahující alespoň 10 hmotn. % vody.



GPC chromatogram stučování III: ox-HES 130 kD s HSA

CZ 2003 - 2430 A3



## Konjugáty z hydroxyalkylškrobu a účinné látky

### Oblast techniky

Předložený vynález se týká sloučenin, které zahrnují konjugát z hydroxyalkylškrobu (HAS) a účinné látky, přičemž hydroxyalkylškrob je na účinnou látku kovalentně vázán buď bezprostředně nebo přes spojovník. Vynález se dále týká způsobu výroby kovalentního konjugátu HAS-účinná látka, při němž se v reakčním prostředí spolu zreagují HAS a účinná látka, vyznačujícího se tím, že reakčním prostředím je voda nebo směs vody s organickým rozpouštědlem, která obsahuje nejméně 10 hm. % vody. Vynález se také týká medicinského využívání konjugátů.

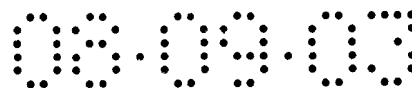
### Dosavadní stav techniky

Klinické nasazování mnohých farmaceuticky účinných látek je omezováno řadou problémů [viz Delgado a spol., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9 (3,4), 249-304 (1992)]. Na příklad parenterálně podávané proteiny podléhají vylučování retikuloendoteliálním systémem, játry, ledvinami a slezinou. Vylučování přitom probíhá v závislosti na náboji sacharidových řetězců, na přítomnosti buněčných receptorů pro protein a na tvaru a velikosti molekuly. Hranice vylučování glomerulární filtrace ledvin leží například při asi 67 kD.

Dále se jako následek proteolytické degradace pozoruje rychlá ztráta biologické aktivity.

Bakteriálně exprimované proteiny, jakož i jiné rekombinantní proteiny mohou vykazovat zvýšenou imunogenitu a provokovat život ohrožující reakce hypersenzitivity. Příslušné reakce pak přirozeně brání medicinskému používání těchto produktů.

Z tohoto důvodu byl ve stavu techniky již od konce sedmdesátých let prováděn systematický výzkum ke zlepšení vlastností exogenních proteinů chemickou modifikací, zejména polymerizací nebo navázáním na makromolekulární polymery. Mnohé práce se přitom koncentrovaly na přípravu konjugátů z proteinů nebo jiných účinných látek na straně jedné a polyethylenglykolu (PEG) na straně druhé (viz US patent 4 179 337). Výhody, kterých se při těchto slučovacích reakcích nadálo,



zahrnují zlepšený poločas rozpadu proteinů *in vivo*, zmenšenou toxicitu, zlepšenou stabilitu a zlepšenou rozpustnost účinných látek [Abuchowski a Davis, *Enzymes as Drugs*, editoři Holcenberg a Rubberts, str. 367-383, John Wiley & Sons, N. Y. (1991)].

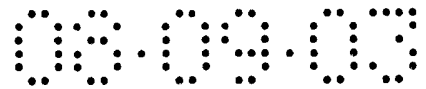
Způsob navazování účinných látek se však ukázal jako problematický, protože sloučením s PEG byla účinná skupina proteinu inaktivována anebo reakce neposkytovaly reakční produkt v použitelném výtěžku. Aby se dosáhlo specifické vazby, která neomezuje aktivitu účinné látky, byly do PEG nebo účinné látky zavedeny aktivní skupiny nebo byly sloučeniny na sebe navázány spojovníkem. K tomu se obvykle PEG opatří aktivní skupinou, která se potom kovalentně váže na skupinu proteinu schopnou pro sloučení.

Tak byla popsána na příklad ztráta vazebné aktivity protilátek a jejich fragmentů po jejich sloučení s PEG [Kitamura a spol., *Cancer Res.* **51**, 4310-4315 (1991) a Pedley a spol., *Br. J. Cancer* **79**, 1126-1130 (1994)]. Pro řešení tohoto problému navrhli Chapman a spol. [*Nature Biotech* **17**, 780-783 (1999)] vázat PEG na určitá vazebná místa protilátky.

Ztráta aktivity partnera při slučování je dále popsána ve WO 95/13090. K řešení se navrhuje aktivovat PEG reaktivní skupinou a PEG přes tuto reaktivní skupinu vázat na  $\alpha$ -interferon v přítomnosti tenzidu. Jako preferovaná reaktivní skupina se uvádí N-sukcinimid-karbonát, který má za daných podmínek s  $\epsilon$ -aminoskupinou lysinu vytvořit urethanovou vazbu.

Rovněž WO 96/41813 uveřejňuje způsob přípravy konjugátu polymer-peptid, u něhož je polymer (zejména PEG) na specifickém místě derivatizován a následně navázán na polypeptid. Přitom je do PEG vnesena zejména aminoxyacetylová skupina a tato sloučenina je potom navázána na polypeptid, obzvláště na IL-8, hG-CSF a IL-1.

V literatuře se tedy nalézají veliký počet příkladů pro příslušné konjugáty; viz konjugáty PEG-inzulín v US patentu 4,179,337, konjugáty PEG-hovězí hemoglobin v US patentu 4 412 989, konjugáty PEG-ribonukleasa a konjugáty PEG-superoxiddismutasa ve Veronese a spol., *Applied Biochem Biotech.* **11**, 141-152 (1995), Konjugáty PEG-IL-2 nebo PEG-IFN- $\beta$ -konjugáty v US patentu 4 766 106, konjugáty PEG-polymyxin ve WO 90/15628 a konjugáty PEG-IL-2 ve WO 90/07939. Některé konjugáty se zatím nalézají v klinickém používání. Například vlastnosti



enzymu asparaginasy mohly být zlepšeny vytvořením konjugátu s PEG a konjugát PEG-asparaginasa je obchodně dostupný pod známkou Oncaspar<sup>®</sup> pro terapii rakoviny. Nedávno byl od US Food and Drug Administration schválen na PEG navázaný G-CSF (Pegfilgastim). V rozličných fázích klinického vývoje se nalézají velké množství dalších "pegylovaných" produktů, mezi nimi například PEG-CDP980, PEG-Dronabinol atd. (viz PEG-Pipeline pod [www.enzon.com](http://www.enzon.com) nebo [www.inhale.com](http://www.inhale.com)).

Podle tohoto schematu byly na PEG a jiné polymery navazovány nejen proteiny, ale i jiné sloučeniny. WO 97/33552 a WO 97/38727 zveřejňují na příklad navázání Paclitaxelu na PEG a použití konjugátu na ošetřování tumorů. Firma Enzon zkoumá v klinické fázi I pro ošetřování tumorů používání konjugátu PEG-Camptothecin.

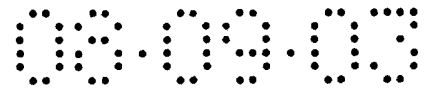
Na PEG se již také navazovala antibiotika. Dowling a Russell referují na příklad o farmakokinetice konjugátu oxytetracyklin-PEG [ *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **23**, 107-110 (2000)]. Pro získání nových funkcí byla v praxi antibiotika derivatizována i pomocí jiných postupů. Byl na příklad připraven depotní penicilin, který je derivátem prokain-penicilinu, tedy solí penicilinu s bazí prokainu. Tento derivát má prodlouženou dobu účinku a nasazuje se např. k terapii syfilis.

Popsány byly rovněž reakce sloučení více než dvou sloučenin. WO 93/23062 oznamuje na příklad přípravu produktu vzniklého sloučením protilátky zaměřené proti lymfomu B-buněk, aktivovaného PEG a toxinu.

Konjugáty PEG a účinné látky však nevykazují žádnou přírodní strukturu, pro kterou byly *in vivo* popsány cesty odbourávání. Mezi jiným se z tohoto důvodu vedle PEG konjugátů pro řešení shora jmenovaných problémů vyráběly i jiné konjugáty a polymerizáty proteinů. Tak existuje velký počet postupů pro zesíťování různých proteinů a vázání proteinů na makromolekuly [viz souborné popsání ve Wong S. S. "*Chemistry of protein conjugation and cross linking*", CRCS, Inc. (1993)].

Hydroxyethylškrob (HES) se jako derivát v přírodě se vyskytujícího amylopektinu odbourává v těle  $\alpha$ -amylasou. Rovněž příprava konjugátů HES-protein byla již v praxi popsána (viz konjugáty HES-hemoglobin v DE 26 16 086 nebo v DE 26 46 584).

Hemoglobin je protein, který by jako prostředek náhrady krve a transportu kyslíku (tzv. "Hämoglobin-Based-Oxygen Carrier", HBOC), mohl mít velký klinický význam. Avšak přestože potřeba produktu takového druhu byla již časně poznána



[viz Rabiner, *J. Exp. Med.* 126, 1127 (1967)], nedosáhl až dosud žádný ze známých HBOC-produktů status schváleného léčiva.

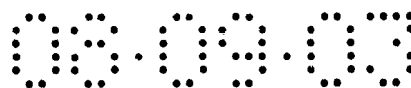
Přírodní hemoglobin sestává ze dvou  $\alpha$ - a  $\beta$ -peptidových řetězců, které mají jako prostetickou skupinu vázaný právě hem. Izolované molekuly hemoglobinu jsou však velmi nestabilní a rychle se rozpadají na stabilní  $\alpha$ , $\beta$ -dimery (Mol. hm. 32 kD). Biologický poločas rozpadu izolovaného hemoglobinu v krevním oběhu leží asi kolem 1 hodiny, protože dimery jsou vylučovány rychle přes ledviny. Dimery při tom vyvolávají nefrotoxické vedlejší účinky [viz. Bunn a Jandl, *J. Exp. Med.* 129, 925-934 (1967)]. Vývojové práce na derivatizovaných molekulách hemoglobinu byly proto v první řadě zaměřeny na intramolekulární zesíťování hemoglobinu, k vytváření polymerních HBOC-forem intermolekulárním spojováním a/nebo na navazování na polymery.

Známé konjugáty hemoglobinu jsou popisovány například od Xue a Wonga [*Meth. in Enzymol.* 231, 308-322 (1994)] a v DE 26 16 086 a v DE 26 46 854. Poslední patent zveřejňuje postup, pomocí něhož je hemoglobin vázán na HES, při čemž se HES nejdříve zreaguje s jodistanem sodným. Vznikají při tom dialdehydy, na které se hemoglobin váže. Naproti tomu DE 26 16 086 popisuje spojení hemoglobinu s HES podle postupu, při kterém se nejdříve na HES váže síťovací činidlo (např. bromkyan) a na meziproduct se potom váže hemoglobin.

HES je substituovaný derivát amylopektinu, sacharidového polymeru, který se z 95 % vyskytuje v kukuřičném škrobu. HES vykazuje výhodné reologické vlastnosti a v současnosti se klinicky nasazuje jako prostředek náhrady objemu a k hemodiluční terapii [Sommermeyer a spol., *Krankenhauspharmazie* 8 (8), 271-278 (1987) a Weidler a spol., *Arzneim.-Forschung / Drug Res.* 41, 494-498 (1991)].

Amylopektin je tvořen jednotkami glukosy, při čemž v hlavních řetězcích existují  $\alpha$ -1,4-glykosidické vazby, avšak na místech rozvětvení  $\alpha$ -1,6-glykosidické vazby. Fyzikálně chemické vlastnosti této molekuly jsou v podstatě určovány druhem glykosidických vazeb. Na základě zalomené  $\alpha$ -1,4-glykosidické vazby vznikají helikální struktury s asi 6 monomerními glukosovými jednotkami na závit.

Fyzikálně chemické, stejně jako biochemické vlastnosti polymeru mohou být změněny substitucí. Zavedení hydroxyethylskupiny lze dosáhnout alkalickou hydroxyethylací. Podle reakčních podmínek může být vzhledem k hydroxyethylaci



využívána rozdílná reaktivita příslušné hydroxyskupiny v nesubstituované glukosové monomerní jednotce a tak je možné ohraničené ovlivňování vzorku substituce.

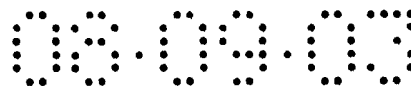
Proto se HES charakterizuje v podstatě distribucí molekulární hmotnosti a stupněm substituce. Stupeň substituce může být při tom popsán jako DS ("degree of substitution"), který se vztahuje na podíl substituovaných monomerních jednotek ze všech glukosových jednotek nebo jako MS ("molar substitution"), čímž se označuje počet hydroxyethylových skupin na glukosovou jednotku.

Roztoky HES se vyskytují jako polydisperzní soustavy, ve kterých se od sebe liší jednotlivé molekuly co se týká polymerizačního stupně, počtu a uspořádání míst rozvětvení, jakož i jejich typu substituce. Takto je HES směsí sloučenin s rozdílnou molekulární hmotností. Podle toho se daný roztok určuje průměrnou molekulární hmotností na základě statistických veličin. Při tom se  $M_n$  vypočítává jako jednoduchý aritmetický střed v závislosti na počtu molekul (střední číselná hodnota), zatímco  $M_w$ , průměrná hodnota hmotnosti, představuje měřenou veličinu závislou na hmotnosti.

Selektivní chemická vazba proteinů na HES byla však až dosud omezována tím, že aktivace HES neprobíhá selektivně. Tak v současné praxi vznikají konjugáty protein-HES z neselektivního sloučení bromkyanem aktivovaného HES s hemoglobinem (viz DE 26 16 086). Odpovídající postupy mohou vést k polydisperzním produktům s nejednotnými vlastnostmi a potenciálně toxickými vedlejšími účinky. Hashimotem [ Hashimoto a spol., *Kunststoffe, Kautschuk, Fasern* **9**, 1271-1279 (1992)] byl poprvé zveřejněn postup, při kterém mohla být selektivně oxidována redukující koncová aldehydická skupina sacharidu, při čemž byl získán reaktivní ester (lakton).

Na základě tohoto postupu uvádí WO 98/01158, že mohou být získány konjugáty hemoglobin-hydroxyethylškrob, v nichž jsou spolu sloučeny hemoglobin a HES pomocí amidových vazeb mezi volnými aminoskupinami hemoglobinu a v oxidované formě přítomnou, redukující koncovou skupinou HES. Stejně jako u postupu publikovaného Hashimotem a spol., tak také způsoby podle WO 98/01158 jsou však založeny na reakci mezi sacharidem (HES) a proteinem (hemoglobinem) v organickém rozpouštědle. V této publikaci byl použit konkrétně dimethylsulfoxid (DMSO).

Pro odborníka je však zřejmé, že v organickém rozpouštědle utrpí mnohé proteiny změnu struktury, která se ve vodných roztocích zpět nevytvoří. Spolu se změnou struktury přichází zpravidla také ztráta aktivity. V každém případě se



organické rozpouštědlo musí nákladně odstraňovat, protože pro plánované medicínské použití nemohou být reziduální podíly organických rozpouštědel přijatelné. S ohledem na plánované použití je třeba vyloučit ba i potenciální nebezpečí nečistot a strukturních změn.

### Podstata vynálezu

Úkolem předloženého vynálezu je tedy poskytnout zlepšené konjugáty hydroxyalkylškrobu a účinné látky a způsobu pro jejich výrobu, které vedou k biologicky aktivním konjugátům, které mohu být nasazovány v každodenní klinické praxi. Dalším úkolem předloženého vynálezu je dát k dispozici způsob výroby konjugátů hydroxyalkylškrobu s účinnou látkou, u nichž se netvoří vedlejší produkty v obsahu stojícím za zmínku, protože tyto vedlejší produkty v podstatné míře nepříznivě ovlivňují navazující vyčištění produktu.

Tento úkol byl nyní konečně překvapivě vyřešen sloučeninami, které zahrnují konjugát z hydroxyalkylškrobu a účinné látky, při čemž je hydroxyalkylškrob buď bezprostředně, nebo pomocí spojovníku kovalentně vázán na účinnou látku. Příslušné konjugáty HAS-účinná látka lze vyrobit na příklad způsoby, při nichž se spolu v reakčním prostředí zreagují HAS a účinná látka, při čemž reakčním médiem je voda nebo směs vody s organickým rozpouštědlem, které obsahuje nejméně 10 hm. % vody.

Vynález se dále týká způsobu výroby kovalentního konjugátu HAS-účinná látka, při kterém se HAS a nejméně jedna účinná látka spolu zreagují ve vodném prostředí a je vyznačen tím, že reakční prostředí je voda nebo směs vody s organickým rozpouštědlem, které obsahuje nejméně 10 hm. % vody.

Před vazbou na účinnou látku se HAS přednostně oxiduje, při čemž je preferována zejména specifická oxidace redukcí koncových skupin. Alternativně k tomu může sloučení proběhnout přes tvorbu Schiffovy base mezi HAS a aminoskupiny nesoucí účinnou látkou jako meziproduktem. Tento meziprodukt se potom redukuje za vytvoření methylenaminoskupiny.

Předložený vynález poprvé poskytuje sloučeniny, které zahrnují konjugát z hydroxyalkylškrobu a účinné látky, při čemž je hydroxyalkylškrob buď bezprostředně, nebo pomocí spojovníku kovalentně vázán na účinnou látku. Předložený vynález dále poskytuje konjugáty HAS-účinná látka, které lze vyrobit způsoby, při nichž se ve



vodném prostředí nechají spolu reagovat HAS a nejméně jedna účinná látka. Způsoby jsou dále vyznačeny tím, že reakčním prostředím je voda nebo směs vody s organickým rozpouštědlem, které obsahuje nejméně 10 hm. % vody.

V rámci předloženého vynálezu je chemická sloučenina označována jako účinná látka, když je sloučeninou vhodnou k tomu, aby byla aktivní součástí libovolného prostředku pro terapeutické nebo diagnostické účely. U účinné látky se jedná především o jednu aktivní součást léčiva, tedy sloučeninu uvnitř formulace léčiva, kterou se po podávání subjektu dociluje fyziologický účinek.

Přehled o schválených léčivech a jejich účinných látkách se nalézá v "Rote Liste". V "Rote Liste" vyjmenované účinné látky mohou být použity pro výrobu konjugátů HAS-účinná látka způsobem podle vynálezu. Podle předloženého vynálezu zahrnuje pojem účinná látka ale také všechny sloučeniny, jejichž vhodnost pro diagnostické nebo terapeutické použití je sice známa, které však na základě svrchu uvedených problémů nemohly být pro tento účel až dosud nasazovány. U účinné látky se jedná zejména o vitamin, očkovací látku, toxin, antibiotikum (nebo antiinfektivum), antiarytmikum, omezovač chuti, anestetikum, analgetikum, antireumatikum, antialergikum, antiastmatikum, antidepressivum, antidiabetikum, antihistaminikum, antihypertonikum nebo antineoplastický prostředek. Strukturně se může jednat například o hormon, steroid, lipid, protein, oligopeptid nebo polypeptid, nukleovou kyselinu, zvláště D- nebo L-nukleovou kyselinu jako na příklad D-DNA, L-DNA, nebo D-RNA nebo L-RNA. Používání proteinů, peptidů, D- nebo L-nukleových kyselin je zvláště preferováno.

Podle předloženého vynálezu připravené sloučeniny zachovávají aktivitu účinné látky a výhodné vlastnosti HAS. Jako další výhody vykazují konjugáty podle vynálezu rozsáhlejší výhody, mezi nimi zlepšený poločas rozpadu účinné látky *in vivo*, zmenšenou toxicitu, zlepšenou stabilitu a/nebo zlepšenou rozpustnost účinné látky.

Řetězec HAS je po podání v plazmě zkracován  $\alpha$ -amylasou. Aktivita sloučeného produktu může být tedy stanovena jako aktivita nativního sloučeného produktu bezprostředně po sloučení, nebo jako aktivita metabolizovaného produktu sloučení, tedy po metabolizování sloučeného produktu *in vivo*. Metabolizace *in vivo* může být simulována odbouráváním *in vitro*.

Aktivita účinné látky může být stanovována podle postupů pro danou látku v praxi známých. U antineoplastického prostředku může být aktivita určena například



jako inhibiční koncentrace (IC) nebo u antiinfektivního prostředku jako minimální koncentrace potlačení (MHK). Stanovení probíhá zejména *in vitro* na vhodných cílových buňkách [viz Chow a spol., *Haematologica* **86**, 485-493 (2001)]. Efekty *in vitro* mohou být dále potvrzeny na relevantním zvířecím modelu [viz například myší model karcinomu ledvinových buněk, který popsal Changnon a spol., viz *BJU Int.* **88**, 418-424 (2001)].

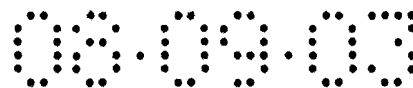
Ve srovnání s nesloučenou substancí může nativní sloučený produkt vykazovat zvýšenou nebo sníženou aktivitu. Avšak aktivita není zvlášť snížena ne více než pětkrát, preferováno je zejména ne více než třikrát nebo dvakrát. Metabolizovaný produkt vykazuje aktivitu srovnatelnou zvláště s nesloučenou substancí, tj. metabolizovaný konjugát vykazuje nejméně 50 %, zejména pak nejméně 75 % aktivity účinné látky před sloučením, přičemž obzvláště se dává přednost obsahu nejméně 95 % aktivity.

V rámci předloženého vynálezu je pojem "hydroxyalkylškrob" používán k tomu, aby se označily deriváty škrobu, které byly substituovány hydroxyalkylovou skupinou s jedním až třemi uhlíkovými atomy. Skupina označovaná jako "hydroxyalkylškrob" zahrnuje tedy hydroxymethylškrob, hydroxyethylškrob a hydroxypropylškrob. Používání hydroxyethylškrobu (HES) jako partnera pro slučování je dávana přednost u všech forem provedení vynálezu obzvláště.

Podle vynálezu se preferuje, aby střední molekulová hmotnost (průměrná hmotnost) byla od 1 do 300 kD, přičemž střední molekulové hmotnosti od 5 do 200 kD je zvlášť dávana přednost. Hydroxyethylškrob může vykazovat dále molární stupeň substituce od 0,1 do 0,8 a poměr substituce  $C_2 : C_6$  v rozsahu od 2 až 20 vztaženo vždy na hydroxyethylskupiny.

Pro navázání účinné látky na HAS může být v prvním kroku nezbytné zavést do účinné látky a/nebo do HAS reaktivní skupinu. Odpovídajícími reaktivními skupinami mohou být například thiolové skupiny nebo aminoskupiny (viz příklady provedení vynálezu).

Účinná látka a HAS mohou být dále navzájem svázány pomocí spojovníku. Jako spojovník může být použit libovolný síťovací prostředek. Početné síťovací prostředky, jako například SMCC [sukcinimidyl-4-(N-maleinimidomethyl)cyklohexan-1-karboxylát, viz příklad 7], jsou komerčně dostupné a pro odborníka běžné (viz abecední seznam "Cross-linking Reagents" v katalogu produktů firmy Perbio a [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com)).



Podle jedné formy provedení předkládaného vynálezu, ve vodě rozpustné, aminocukr vykazující deriváty antibiotik, zvláště konjugáty HAS-Daunorubicin a HAS-Doxorubicin, jakož i způsob jejich výroby, pokud jsou publikovány v DE 101 29 369 nejsou do předkládaného vynálezu zahrnovány.

Podle jedné preferované formy provedení se předložený vynález týká sloučenin, které zahrnují konjugát z HAS a antineoplastické účinné látky a jejich využití k ošetřování tumorů.

Buňky tumoru se od normálních tělesných buněk mezi jiným liší tím, že se buňky tumoru vymykají fyziologické kontrole růstu, a proto vykazují zvýšenou rychlost buněčného dělení. Terapeutické využití antineoplasticky účinných látek při terapii tumoru se na tomto rozdílu zakládá, protože se toxická aktivita antineoplasticky účinných látek zaměřuje primárně na bujně se množící buňky. Proto jsou sloučeniny označovány jako antineoplasticky účinné látky nebo cytostatika, když vykazují toxickou aktivitu vůči proliferujícím buňkám (základy onkologie a současné terapeutické aplikace jsou shrnuty v *Internistische Onkologie*, vydavatelé Schmoll a spol., Springer, 1996).

Antineoplasticky účinné látky mohou být chemicky přiřazeny k velice heterogenní skupině. V diskuzi posledních let vedle potlačení proliferace nabývá na významu indukce apoptosy, programovaného usmrcování buněk. Klasifikace antineoplasticky účinných látek se může provádět na příklad pomocí kritických cílových molekul (Schmoll a spol., viz shora):

(1) Sloučeniny, které potlačují biosyntezu DNA například pomocí antimetabolitů jako MTX, 5-FU, Ara-C nebo hydroxymocovina.

(2) Sloučeniny, které působí na DNA například indukci rozštěpení řetězců, interkalací, změnou síťování mezi řetězci, jedy topoisomerasy jako alkylační činidla, platinové komplexy, anthracykliny, bleomycin, aktinomycin D nebo epipodofylotoxiny.

(3) Sloučeniny, které působí na RNA například blokádu syntézy mRNA interkalací nebo vestavbou do RNA, mezi nimi anthracykliny, bleomycin, aktinomycin D nebo antimetabolity.

(4) Sloučeniny, které působí na proteiny například na úrovni receptorové vazby (např. hormony nebo antagonisté), inhibicí polymerizace tubulinu (např. pomocí vinka-alkaloidů), síťováním bílkovin (např. pomocí alkylantů) nebo fosforylací (např. pomocí inhibitorů proteinkinasy-C).



Na základě antineoplasické aktivity vykazují všechny účinné látky podstatné vedlejší účinky, které se primárně stávají pozorovatelné jako potlačení rychle proliferující tkáně. Takto je poškozována zejména erythropoéza, leukopoéza a trombopoéza, stejně jako růst epitelu sliznic. Jako následek mohou nastoupit gastrointestinální poruchy nebo ireversibilní poškození spermatogeneze resp. anovulace. Pravidelně jsou postiženy kůže a kůži pokrývající útvary, mnozí pacienti například trpí reverzibilním vypadáváním vlasů.

V těžkých případech mohou vedlejší účinky vést až k akutnímu selhání ledvin a toxicky podmíněným poškozením orgánu na srdci, plicích, játrech a nervovém systému. Konečně se jako následek imunosupresivního účinku musí počítat s hromadnějším počtem infekcí.

Příprava a výzkum konjugátů, které obsahují neoplasticky účinnou látku, byly proto zacíleny na zlepšení snášenlivosti účinné látky. Za tímto účelem se navazovaly různé antineoplasticky účinné látky na makromolekuly, například na dextran [viz Kojima a spol., *J. Pharm. Pharmacol.* **32**, 30-40 (1988); Nakane a spol., *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 1-6 (1980); Nomura a spol., *J. Controlled Release* **52**, 239-252 (1998); Sato a spol., *J. Pharm. Sci.* **78**, 11-16 (1989)]. V některých případech byl zaznamenán zlepšený antitumorový účinek konjugátů.

K tomu alternativně byly účinné látky jako mitomycin C navázány na N-sukcinylochitosan [Song a spol., *J. Controlled Release* **42**, 93-100 (1996)], na karboxymethylchitin [Song a spol., *Arch. Pract. Pharm.* **53**, 141-147 (1993)] a na oligopeptidy [Soyez a spol., *J. Controlled Release* **47**, 71-80 (1997)]. Ve většině analýz byla ve srovnání s jednotlivou antineoplasticky účinnou látkou opět pozorována zlepšená antitumorová aktivita konjugátů.

Podle vynálezu bylo nyní navíc překvapujícím způsobem zjištěno, že konjugáty HAS-účinná látka, které obsahují antineoplasticky účinnou látku, vykazují vůči buňkám tumorů zlepšený toxický účinek a/nebo zmenšenou toxicitu vůči jiným buňkám. Tímto umožňují konjugáty větší terapeutickou šíři.

Poločas rozpadu konjugátů v plasmě se výrazně prodlužuje. To delší expozicí umožňuje porušení mechanismů opravy v buňkách tumoru. Současně umožňuje předložený vynález pomalejší zaplavování, zejména do zdravé tkáně, čímž se dosahuje menší vrcholné koncentrace a zlepšené snášenlivosti pro pacienta.



Pro výrobu konjugátů podle vynálezu může být použita libovolná antineoplasticky účinná látka. Antineoplasticky účinné látky mohou být voleny ze skupin, které tvoří alkylační činidla, antimetabolity, antibiotika nebo přírodní látky.

Podle jedné preferované formy provedení se u neoplasticky účinné látky jedná o mitomycin C, cyklofosfamid, bleomycin, chlorambucil, cis-platinu, Ara-C, fludarabin, doxorubicin, etoposid, 5-FU, MTX, vinblastin, vincristin, vindesin, hydroxymočovinu, 6-MP nebo CCNU.

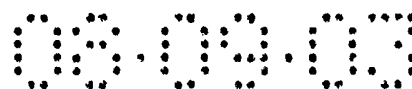
Jako účinná látka se preferuje zejména mitomycin C. Mitomycin C náleží ke skupině antibiotik a obsahuje aziridinovou, jakož i chinonovou skupinu a mitosanový cyklus. Účinná látka je nasazována při ošetřování karcinomů ledvin, tumorech měchýře a při jiných urologických onemocněních. Sloučenina nabývá své aktivity teprve po metabolizování v hypoxických (tedy přednostně tumorových) buňkách intracelulární enzymatickou nebo spontánní chemickou redukcí chinonu a ztrátou methoxyskupiny. Na tuto methoxyskupinu se může přednostně přes spojovník navázat HAS. Po odštěpení substituentů existuje v buňce intracelulárně stejná účinná látka, která ovlivňuje alkylační zesíťování DNA a tím rozvíjí toxický účinek. K tomu alternativně by HAS mohl být také navázán na jednu z obou  $\text{NH}_2$  skupin. Mitomycin C vykazuje typickou tkáňovou specifitu. Podle vynálezu se preferuje, že se tato specifita - zejména pro exkreční orgány - zvyšuje sloučením s HAS.

Antineoplasticky účinná látka může být podle vynálezu navázána na HAS libovolným způsobem. Specifickému napojení na redukující koncové skupiny HAS je však dáována přednost, protože se tímto postupem vytvoří definovaný konjugát.

Podle jedné formy provedení vynálezu se hydroxyethylškrob navazuje na methoxyskupinu mitomycinu C. Navázání na methoxyskupinu mitomycinu C se přitom může stát přes spojovník.

Podle další formy provedení se předložený vynález týká způsobu výroby sloučeniny, která zahrnuje konjugát z HAS a antineoplasticky účinné látky. Způsob obsahuje kroky, při nichž se HAS buď bezprostředně nebo přes spojovník kovalentně naváže na antineoplasticky účinnou látku a konjugát se izoluje.

Vynález se dále týká farmaceutických kompozic, které obsahují sloučeniny, které vykazují konjugát z HAS a antineoplasticky účinné látky. Farmaceutická kompozice může obsahovat dále farmaceuticky přijatelný nosič a/nebo cytokin. Cytokinem je přednostně IL-2,  $\alpha$ -interferon,  $\gamma$ -interferon.

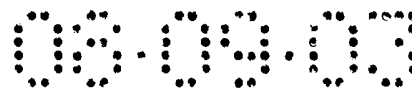


Farmaceutická kompozice může být v libovolné aplikační formě, v současné praxi známé. Podle okolností může být kompozice formulována například pro orální nebo parenterální podávání. Formulace kompozice probíhá podle v současné praxi běžných postupů. Vedle účinné látky obsahuje kompozice obvykle farmaceuticky přijatelný nosič a jednu nebo více pomocných látek, jako případně konzervační prostředek, ztekucující prostředek atd.

Konečně se předložený vynález týká použití sloučeniny, která zahrnuje konjugát z HAS a antineoplasticky účinné látky, k výrobě léčiva pro ošetřování tumorů a/nebo jejich metastáz, zejména pro ošetřování urologických tumorů a/nebo metastáz urologických tumorů, pro ošetřování metastáz ledvinového karcinomu nebo pro ošetřování onemocnění lymfatického systému jako je například CLL, Hodgkinův lymfom, NHL, mnohonásobný myelom, Morbus Waldenström. Také podle této formy provedení může léčivo obsahovat dále cytokin, například IL-2,  $\alpha$ -interferon,  $\gamma$ -interferon.

Použití sloučeniny podle vynálezu k výrobě léčiva pro ošetřování urologických tumorů a/nebo metastáz urologických tumorů, například pro ošetřování metastáz ledvinového karcinomu je zvláště preferováno. Kurativní terapie ledvinového karcinomu nelze toho času dosáhnout ani kombinovanou chemoterapií ani samotným mitomycinem C. Může to spočívat na nepříznivé farmakokinetice sloučeniny, protože podíl renální eliminace leží pouze při cca 18 %. Protože HAS je vylučován ledvinami téměř úplně, vykazuje konjugát ve srovnání s nekonjugovanou substancí vyšší procento renální eliminace. Tato forma provedení předloženého vynálezu využívá intracelulární krátkodobé ukládání HAS. Obzvláště vysoce substituované druhy HAS (HAS 200 / 0,62) vykazují zesílené intracelulární ukládání, v extrémním případě dokonce přetížení. Tento fenomén byl pozorován také v oblasti proximálního tubulu [Peron a spol., *Clinical Nephrology* 55, 408-411 (2001)].

Podle této formy provedení tak předložený vynález poskytuje obohacení antineoplasticky účinné látky v určitých cílových buňkách nebo tkáních. Zlepšená farmakokinetika konjugátů tím při nižších systemických koncentracích umožňuje dosáhnout podstatně vyšší koncentrace v buňkách cílového orgánu. Tato medicínská aplikace je přednostně nasazována při ledvinovém karcinomu ze světlých buněk a chromofilním karcinomu ledvin, které dohromady činí asi 90 % všech histologických typů.



Podle alternativní formy provedení se vynález týká použití sloučenin podle vynálezu k výrobě léčiva pro ošetřování lymfatických systémových onemocnění jako je například CLL, Hodgkinův lymfom, NHL, mnohonásobný myelom, Morbus Waldenström. Sloučením HAS s antineoplasticky účinnou látkou podle vynálezu se zpomaluje intracelulární přijímání účinných látek v závislosti na délce řetězce a stupni substituce. Radioaktivní kinetická zkoumání ukázala dále, že HAS v určitých orgánech, mezi nimi v lymfatických orgánech, je ukládán déle než v celém těle [Bepperling a spol., *Crit. Care* 3, Suppl. 1, 153 (1999)]. Dochází tak k obohacení konjugátu v cílových buňkách, což má za následek zlepšenou farmakokinetiku při zmenšené systemické toxicitě.

Při ošetřování lymfatických systémových onemocněních se jako účinná látka preferuje fludarabin. Fludarabin je halogenovaný analog adeninu, který je rezistentní vůči deaminaci.

Dále se vynález týká použití sloučenin podle vynálezu k výrobě léčiva pro ošetřování kutánních / lokálních primárních malignomů nebo jejich metastáz. Přitom jsou využívány dva efekty, cílené, zvýšené přijímání jmenovanou tkání a protrahované odtransportování HAS konjugátu z tkáně. Obojí vede k obohacení konjugátu v cílových buňkách.

Vynález se dále týká použití sloučenin podle vynálezu k výrobě léčiva pro ošetřování hematologických systémových onemocnění nebo onkologických onemocnění, například nemalobuněčných a malobuněčných bronchiálních karcinomů, mammakarcinomů, karcinomů epitelu lamel ezofagu, karcinomů ledvinových buněk, karcinomů varlat, maligních melanomů, ALL nebo CML. Zejména při použití konjugátů pro ošetřování karcinomu ledvinových buněk plynou výhody na základě silného obohacování sloučeniny v postižené tkáni vzhledem k větší hydrofilítě konjugátu a z toho vyplývající silnější renální eliminaci. Při této formě provedení se jako účinné látce dává přednost aplikaci vindesinu.

Dále se vynález týká použití sloučenin podle vynálezu k výrobě léčiva, přičemž je sloučenina nasazována jako kombinační terapie s jedním nebo více dalšími antineoplasticky účinnými látkami nebo cytokiny. Kombinační terapie může probíhat při podávání přípravku, ve kterém jsou účinné látky všechny, nebo podáváním dvou nebo více různých přípravků, v nichž byla formulována právě jen jedna účinná látka.

Předložený vynález poskytuje dále způsob výroby léčiva, které obsahuje cytokin a sloučeninu podle vynálezu, a které se hodí pro nové kombinační terapie.



Příslušný prostředek je obzvláště vhodný pro ošetřování pokročilého karcinomu ledvinových buněk.

Podle další, zvláště preferované formy provedení vynálezu jsou dávány k dispozici konjugáty z HAS a antiarytmicky účinné látky, právě tak jako jejich použití pro ošetřování poruch srdečního rytmu.

Odchytky v časovém sledu a pravidelnosti srdeční činnosti (arytmie) od normální srdeční frekvence se označují jako poruchy srdečního rytmu. Odchytky jsou ve většině případů podmíněny poruchami srdce při vzniku rozčilení nebo v průběhu rozčilení. Jako antiarytmicky účinné látky čili antiarytmika se označují látky, které jsou vhodné pro ošetřování poruch srdečního rytmu, zejména při ventrikulárních poruchách srdečního rytmu.

Podle způsobu působení antiarytmicky účinných látek se rozlišuje mezi blokátory sodíkových kanálků (chinidin, prokainamid, disopyramid atd.), blokátory  $\beta$ -receptorů (atenolol, propranolol atd.), selektivními prodlužovači repolarizace (amiodaron, sotalol atd.), antagonisty vápníku (verapamil, galopamil atd.) a lokálními anestetiky.

V současné praxi běžné antiarytmicky účinné látky však z části vykazují krátkou dobu účinku. Například adenosin je antiarytmicky účinnou látkou s velmi krátkým poločasem rozpadu. Doba účinku této látky obnáší pouze málo minut. Prodloužení poločasu rozpadu a doby účinku je v mnoha případech nezbytné.

Některé antiarytmicky účinné látky vykazují mimoto vedlejší pro-arytmogenní účinky, z části dokonce zvýšenou mortalitu.

Předložený vynález dává mezi jiným k dispozici antiarytmicky působící látky, které vykazují například prodlouženou dobu účinku. Podle vynálezu bylo překvapivě zjištěno, že konjugáty HAS s antiarytmiky vykazují výrazně delší poločas rozpadu v plazmě *in vivo* a aktivita účinných látek není sloučením s HAS podstatně ovlivněna.

V rámci předloženého vynálezu mohou být k vytvoření konjugátů použity libovolné antiarytmicky účinné látky. Účinná látka může být vybírána ze skupiny, kterou tvoří blokátory sodíkového kanálu, blokátory  $\beta$ -receptorů, selektivní prodlužovači repolarizace, antagonisté vápníku a lokální anestetika. U účinné látky se přednostně jedná o adenosin, chinidin, prokainamid, disopyramid, lidokain, phenytoin, mexiletin, ajmalin, parjmalium, propafenon, atenolol, propranolol, amiodaron, sotalol, verapamil, gallopamil nebo diltiazem, přičemž je dávána přednost zejména adenosinu.



Podle jedné formy provedení předloženého vynálezu se vazba mezi antiarytmicky účinnou látkou a HAS uskutečňuje přes redukující koncové skupiny HAS.

Při použití adenosinu může být tato účinná látka na HAS vázána například přes aminoskupinu, přičemž vytvoření vazby mezi aminoskupinou adenosinu a redukující koncovou skupinou HAS je obzvláště preferováno. Preferuje se varianta sloučení, u které po metabolizování (odštěpení HAS) vzniká nativní adenosin.

K tomu alternativně může být účinná látka navázána na HAS pomocí tak zvaného spojovníku.

Předložený vynález se týká dále farmaceutických kompozic, které obsahují jednu ze sloučenin podle vynálezu. Farmaceutická kompozice obsahuje obvykle dále farmaceuticky přijatelný nosič a může být formulována například pro intravenózní aplikaci.

Konečně se vynález týká využití sloučenin podle vynálezu k výrobě léčiva pro ošetřování poruch srdečního rytmu, zejména pro ošetřování ventrikulárních poruch srdečního rytmu.

Podle jedné alternativní formy provedení se vynález týká použití sloučeniny podle vynálezu k výrobě léčiva pro indukci apoptosy, například ve tkáních tumorů nebo v zánětlivých tkáních.

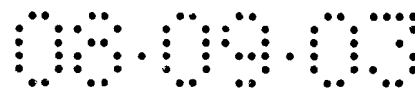
Předkládaný vynález se týká sloučenin, které obsahují konjugát z HAS a antiinfekčně účinné látky případně antibiotika, jakož i jejich použití pro ošetřování infekčních onemocnění.

Jako infekce se označuje vniknutí mikroorganismů (virů, bakterií, hub, protozoí) do makroorganismu (rostliny, zvíře, člověk) a v něm pak rozmnožení. Vznik a průběh infekční nemoci závisí v podstatě na patogenitě mikroorganismu a na imunitě makroorganismu.

Pro potírání infekčních nemocí se po desetiletí nasazují antiinfekčně účinné látky jako chemoterapeutika.

Penicilin byl již roku 1928 A. Flemingem identifikován na základě vlastnosti účinné látky vytvářet v kultivačních miskách zóny prosté stafylokoků. Penicilin byl také první antibiotikum, které mohlo být získáváno v průmyslovém měřítku a v klinické praxi dosáhl velikého významu.

Jako peniciliny se dnes označují účinné látky ze skupiny  $\beta$ -laktamových antibiotik, které jsou tvořeny houbou druhu *Penicillium* (např. *P. chrysogenum* a *P.*



notatum). Baktericidní účinek spočívá na blokování syntézy buněčné stěny bakterií. Penicilin inaktivuje bakteriální enzym transpeptidasu, čímž je zabráněno příčnému zesíťování polysacharidových řetězců murexinu buněčné stěny.

Po objevu byly izolovány a syntetizovány nesčetné účinné látky, které brzdí růst mikroorganismů, nebo je zabíjejí. Většina antibiotik pochází z druhů *Streptomyces* (cca 65 %), které byly izolovány z půdy. Má se za to, že látky z mikroorganismu jsou využívány k potlačení konkurentů v půdě.

Počet izolovaných antibiotik se odhaduje na asi 8 000 a z nich je asi 100 v medicíně použitelných. Rozdělení účinných látek do různých látkových tříd probíhalo podle různých hledisek, například podle chemické struktury nebo mechanismu účinku.

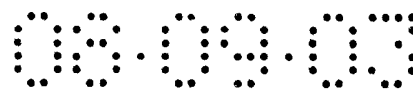
Mezitím byla antibiotika připuštěna nejen pro potírání infekčních chorob, nýbrž také jako imunodepresiva, cytostatika v antitumorové terapii, prostředky na ochranu rostlin, konzervační prostředky pro potraviny, pomocné prostředky výkrmu při krmení zvířat atd.

V posledních letech se vyskytly četné kmeny antibiotik vůči antibiotikům rezistentní. Při tom byly nalezeny vedle jednoduše rezistentních, také častěji několikanásobně rezistentní kmeny, které potírání určitých nemocí zvláště znesnadňují.

Při výzkumu aktivity různých antibiotik proti určitým původcům bylo zjištěno, že některé z účinných látek (například amoxycillin nebo ampicillin) působí téměř výhradně extracelulárně [Scaglione a spol., *Chemotherapie* **39**, 416-423 (1993), Balland a spol., *J. Antimicrob. Chemother.* **37**, 105-115 (1996)]. Tyto účinné látky se takto nedají nasazovat proti organismům, které primárně existují intracelulárně. Ke zlepšení intracelulární aktivity byly zhotoveny nanočástice ampicillinu (viz výše Balland a spol.).

Při infekcích jako tuberkulóze nebo jiných mykobakteriozách by bylo žádoucí rozšíření spektra možností ošetřování kvůli stále vyžadované kombinované terapii. U jiných intracelulárních infekcí, jako infekci chlamydiemi, která byla teprve krátce rozpoznána ve své možné důležitosti pro patogenezi arteriosklerosy [Stille a Dittman, *Herz* **23**, 185-192 (1998)], mohou intracelulární, depotním účinkem opatřená antibiotika, znamenat podstatný pokrok v terapii a profylaxi.

Podle vynálezu bylo nyní překvapujícím způsobem zjištěno, že navázání antiinfekčně účinných látek na HAS vede ke zlepšení farmakokinetických vlastností



účinné látky, zejména k prodlouženému poločasu rozpadu *in vivo*, zlepšenému intracelulárnímu přijímání a/nebo účinnosti aktivní látky.

Podle vynálezu může být používána libovolná antiinfekčně působící látka resp. libovolné antibiotikum. Účinná látka je volena především ze skupiny sestávající z aminopenicilinů, cefalosporinů a aminocefalosporinů,  $\beta$ -laktamových antibiotik, karbapenemů, aminoglykosidů, tetracyklinů, makrolidových antibiotik, inhibitorů gyrasy, glykopeptidových antibiotik, lincomycinů, streptograminů, everninomicinů, oxazolidinonů, nitroimidazolů, sulfonamidů, Co-trimoxazolu, lokálních antibiotik, virostatik, antimykotik, tuberkulostatik.

Přitom se může jednat například o ampicillin, amoxicillin, cefotaxim, ceftazidim, vancomycin, clindamycin, metronidazol, isoniazid, rifampicin, rifabutin, rifapentin, ethambutol, pyracinamid, streptomycin, prothioamid nebo dapson, přičemž použití aminopenicilinu jako ampicillinu, amoxycillinu, makrolidu nebo streptomycinu je preferováno zvláště.

Podle jedné formy provedení předloženého vynálezu je jako účinná látka nasazován aminopenicilin, který je kovalentně vázán přímo přes aminoskupinu aminopenicilinu na hydroxyethylškrob.

Podle jedné další formy provedení je nasazován místo aminopenicilinu aminocefalosporin, čímž se dosahuje snížení alergenity. Jako další formy provedení přicházejí v úvahu sloučení makrolid-HAS, při čemž se jedná o erytromycin nebo jeho derivát, zejména erytromycylamin. K tomu jako alternativa může být jako účinná látka použit streptomycin.

Podle jedné zvlášť preferované formy provedení předloženého vynálezu probíhá vznik vazby mezi antiinfekčně účinnou látkou a hydroxyethylškrobem přes redukující koncové skupiny hydroxyethylškrobu.

Podle jedné další formy provedení předloženého vynálezu je antiinfekčně účinná látka navazována na hydroxyethylškrob přes spojovník.

Předložený vynález zahrnuje dále farmaceutické kompozice, které vykazují sloučeninu podle vynálezu. Obvykle farmaceutické kompozice obsahují dále farmaceuticky přijatelný nosič.

Konečně se předložený vynález týká využívání sloučenin podle vynálezu k výrobě léčiva pro ošetřování infekční choroby. Farmaceutická kompozice je ve zvláštní míře vhodná pro ošetřování infekčních onemocnění, která mohou být mimo jiné způsobena intracelulárními původci. Přitom se může jednat o celkové spektrum



patogenních a fakultativně patogenních původců, např. o bakteriální, virové nebo parazitární původce, mykoplazmy, mykobakterie, chlamydie, rickettsie atd.

Z dalšího hlediska předloženého vynálezu jsou poskytovány konjugáty HAS a nukleových kyselin. V této době jsou ve velkém rozsahu knihovny nukleových kyselin prozkoumávány na nukleové kyseliny, které vykazují určitou aktivitu. Aktivitou může na příklad být schopnost nukleové kyseliny vázat se na určité jiné nukleové kyseliny, receptory nebo virové proteiny. Vazbou může být stimulován nebo inhibován biologický signál. Za tímto účelem se vedle v přírodě se vyskytujících molekul D-DNA a D-RNA nasazují také L-DNA a L-RNA, které se od v přírodě se vyskytujících molekul liší v tom, že jako součásti nukleových kyselin vykazují L-ribosu a L-desoxyribosu namísto odpovídající D-formy (viz WO 98 / 08856). V rámci předloženého vynálezu mohlo být ukázáno, že mohly být připraveny konjugáty HAS a nukleových kyselin, které zachovávají přirozenou funkcionalitu (viz Příklad 7).

Předložený vynález dává dále k dispozici způsob výroby kovalentních konjugátů HAS a účinné látky. Způsoby mohou být prováděny ve vodném nebo organickém reakčním prostředí, při čemž provedení sloučení ve vodné fázi je dávana přednost.

Podle toho jsou k dispozici dávány způsoby výroby kovalentních konjugátů HAS a účinné látky, při kterých v reakčním prostředí spolu zreagují HAS a nejméně jedna účinná látka. Reakční prostředí se vyznačuje tím, že je to voda nebo směs vody s organickým rozpouštědlem, které obsahuje alespoň 10 hm. % vody.

Reakční prostředí při způsobu podle vynálezu obsahuje nejméně 10 hm. %, přednostně nejméně 50 hm. %, zvláště pak nejméně 80 hm. %, jako příkladně 90 hm. % nebo dokonce až k 100 hm. % vody a tomu odpovídaje nejvýše 90 hm. %, přednostně nejvýše 50 hm. %, zvláště pak nejvýše 80 hm. %, jako příkladně 10 hm. % nebo dokonce až k 0 hm. % organického rozpouštědla. Reakce se provádí také ve vodné fázi. Voda je preferované reakční prostředí.

Způsob podle vynálezu je výhodný už proto, že se nutně nemusí nasazovat toxikologicky povážlivé rozpouštědlo a následkem toho u produktu vyrobeného podle vynálezu odpadá odstraňování i malých množství toxikologicky povážlivého rozpouštědla, jak je vždy naléhavé podle známých způsobů proto, aby se vyhnulo nežádoucímu znečištění rozpouštědlem. Dále se pak nemusí konat podle dosavadních způsobů nezbytná dodatečná kvalitativní kontrola na zbytky toxikologicky povážlivého rozpouštědla, protože způsob podle vynálezu přednostně



používá rozpouštědla, která toxikologicky povážlivá nejsou. Podle vynálezu preferovaná rozpouštědla jsou na příklad toxikologicky nezávadná protická rozpouštědla jako ethanol nebo propylenglykol.

Výhodou způsobu podle vynálezu dále je, že se zásadně vyhýbá organickými rozpouštědly indukovaným, ireverzibilním nebo reverzibilním strukturním změnám proteinů nebo peptidů, které při způsobu v organických rozpouštědlech nemohou být systematicky vyloučeny. Polypeptidy získané způsobem podle vynálezu mohou být proto odlišné od těch, které byly vyrobeny v DMSO.

Podle vynálezu bylo dále překvapivě zjištěno, že ve vodném roztoku může být uskutečněno navázání HAS na účinné látky, aniž by se při tom zaznamenaly vedlejší reakce v rozsahu hodném zmínění. Způsob podle vynálezu vede takto bezprostředně ke zlepšeným produktům ve vysoké čistotě. Způsob podle vynálezu umožňuje takto poprvé jednoduchou výrobu konjugátů HAS s účinnou látkou, ve kterých účinná látka existuje v aktivní formě a výhodné vlastnosti HAS zůstávají zachovány. Pro izolaci konjugátů HAS s účinnou látkou nejsou vyžadovány žádné zvláštní postupy, protože reakce probíhá ve vodné fázi a nemusí být tedy čistěním odstraňována organická rozpouštědla.

Podle vynálezu se dává přednost, aby se HAS bezprostředně vázal na  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-skupinu,  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-skupinu, SH-skupinu, COOH-skupinu nebo -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-skupinu. K tomu alternativně může být do HAS zavedena další reaktivní skupina nebo může dojít k vazbě mezi HAS a účinnou látkou přes spojovník. Používání odpovídajících spojovníků k vazbě účinných látek na PEG je v současné praxi známo. Jako spojovníků je preferováno užívání aminokyselin, zejména glycinu, alaninu, leucinu, isoleucinu a fenylalaninu, stejně jako hydrazinových derivátů a oxylamino-derivátů, jak je to publikováno ve WO 97 / 38727 a EP 605 963.

Podle jedné formy provedení způsobu podle předloženého vynálezu se HAS před vazbou na účinnou látku oxiduje. Oxidace se může provádět podle některého v praxi běžného postupu, při čemž přednost má selektivní oxidace redukujících koncových skupin HAS. Tento postup umožňuje způsob, při kterém oxidovaná redukující koncová skupina HAS reaguje s aminoskupinou účinné látky za tvorby amidu. Tato forma provedení má zvláštní výhodu v tom, že se dosáhne specifické vazby mezi HAS a účinnými látkami a tím i zvláště homogenního produktu.

Při tom se spolu nechá reagovat HAS s oxidovanými redukujícími koncovými skupinami a účinná látka nejlépe nejméně 12 hodin a přednostně zejména nejméně



24 hodin. Dále může být žádoucí přidávat libovolný aktivátor, například ethyldimethylaminopropyl-karbodiimid (EDC). Molární poměr mezi HAS a účinnou látkou během reakce může být volen libovolně, obvykle leží v rozsahu HAS : účinná látka 20 : 1 až 1 : 20, přičemž přednost je dáována zejména poměru 6 : 1 až 1 : 6. Nejlepší výsledky byly docíleny při molárním poměru HAS : účinná látka asi 2 : 1.

Jiné reakce pro spojování mezi aminoskupinou účinné látky a HAS jsou samozřejmě v rozsahu vynálezu obsaženy rovněž. Je to na příklad postup, při němž spolu bezprostředně reagují HAS a účinná látka, při čemž mezi HAS a účinnou látkou vzniká Schiffova base jako meziproduct. Azomethinová skupina  $-CH=N-$  v Schiffově basi může být potom za formální adice  $<2H>$  redukována na methylenaminovou skupinu  $-CH_2-NH-$ . Pro tuto redukci může odborník využít veliký počet v současné praxi používaných redukčních prostředků, přičemž se přednost dává zvláště redukci pomocí  $BH_4$ .

Vazba HAS se může uskutečnit na libovolnou skupinu účinné látky. Sloučení se nejlépe uskuteční tak, že metabolizovaný konjugát před sloučením vykazuje nejméně 50 %, nejlépe 75 % aktivity účinné látky, při čemž zvláště se preferuje zachování nejméně 95 % aktivity. Reakce ke sloučení může být přirozeně řízena také tak, že se vazba HAS uskuteční výhradně na jednu nebo více určitých skupin účinné látky, příkladně na lysinové nebo cysteinové zbytky peptidu. Zvláštní výhody se naskýtají, když se HAS váže přes oxidované redukující koncové skupiny na jednu nebo více určitých skupin účinné látky, protože při příslušném postupu mohou být získány homogenní konjugáty HAS a účinné látky.

Podle jedné preferované formy provedení způsobu předloženého vynálezu se jako výchozí látky pro reakci používají HAS a protein nebo peptid. Použity při tom mohou být libovolné terapeutické nebo diagnostické proteiny přírodního původu nebo rekombinantní proteiny. Seznam v současné době na trhu se nalézajících účinných látek rekombinantně připravených se nalezne v *Pharma Business*, July/August 2000, str. 45 až 60. Předložený vynález zahrnuje výrobu konjugátů HAS a účinné látky, které obsahují nějakou z účinných látek jmenovaných v této publikaci .

Přednost má zejména výroba konjugátů za použití cytokinů, například interferonů, interleukinů, růstových faktorů, enzymů, inhibitorů enzymů, receptorů, fragmentů receptorů, inzulínu, Faktoru VIII, Faktoru IX, antibiotik (nebo antiinfektiv), peptidových antibiotik, virových obalových proteinů, hemoglobinu, erythropoetinu,



albuminů, hTPA, protilátek, fragmentů protilátek, jednotlivých řetězců protilátek, DNA, RNA nebo jejich derivátů. Zvláštní výhody plynou při aplikaci rekombinantních peptidů při způsobu podle vynálezu. Jak už bylo zevrubně uvedeno, nemohou být jako účinné látky nasazovány určité proteiny často na základě jejich, pro lidi antigenních vlastností. Po sloučení s HAS způsobem podle vynálezu se však imunogenita rekombinantních proteinů snižuje, což pro lidi umožňuje medicínskou aplikaci.

Zvláštní výhody plynou dále při navázání HAS na proteiny s krátkými řetězci a na menší peptidy. V této době se zřizuje velký počet peptidových bank, například banky displeje fágů, u kterých jsou na povrchu fágů exprimovány krátké oligopeptidy (např. trimery až eikosamery). Dále jsou exprimovány protilátky z jediného polypeptidového řetězce (tak zvané "single chain antibodies", jednořetězové protilátky) v bakteriích nebo na povrchu fágů. Tyto banky jsou prozkoumávány na určitou aktivitu účinné látky nebo vazebnou aktivitu. Terapeutické a diagnostické využití příslušných peptidových účinných látek nebo protilátek ztroskotává dlouhodobě na tom, že tyto látky jsou vzhledem ke své malé velikosti v organizmu velmi rychle vylučovány (viz shora Chapman a spol., 1999). Způsobem podle vynálezu mohou být tyto peptidy výhodně navázány na HAS a *in vivo* vykazují poločas rozpadu, který umožňuje použití jako účinné látky.

Ke shora uvedeným formám provedení může být jako účinná látka alternativně použit hormon, steroidní hormon, od aminokyselin odvozený hormon nebo od mastných kyselin odvozený hormon. V jednotlivém případě by mohlo být nutné zavést do hormonu před vazbou na HAS aktivní skupinu například pomocí spojovníku.

Podle vynálezu může být jako výchozí materiál používán libovolný, fyziologicky přijatelný HES. HES se střední molekulovou hmotností (průměrnou hmotností) od 1 až 300 kD, zvláště 1 až 150 kD se preferuje. Obzvláště je preferován HES se střední molekulovou hmotností od 2 do 40 kD. HES vykazuje zejména molární stupeň substituce od 0,1 až 0,8 a poměr substituce  $C_2 : C_6$  v rozsahu 2 až 20, vztaženo vždy na hydroxyethylskupiny.

Vynález se dále týká konjugátů HAS s účinnou látkou získatelných podle nahoře uvedených způsobů. Tyto konjugáty vykazují výhodné vlastnosti, totiž vysokou aktivitu účinné látky, malou imunogenitu, dlouhou prodlevu v těle a vynikající reologické vlastnosti, které stupňují medicínský užitek konjugátů.

Podle toho předložený vynález zahrnuje právě tak způsoby výroby léčiva a diagnostického prostředku, při kterých se podle některého ze shora uvedených způsobů připraví konjugát HAS s účinnou látkou a smísí se v současné praxi známým, farmaceuticky přijatelným nosičem, adjuvantem nebo pomocnou látkou, jakož i podle tohoto způsobu získatelné léčivo nebo diagnostický prostředek.

Medicinské využití odpovídajícího léčiva závisí na druhu účinné látky. Jestliže se na příklad použije jako účinná látka hemoglobin, může být konjugát aplikován jako prostředek transportu kyslíku. Pokud se na druhé straně pro výrobu jako účinná látka použije cytokin, může být konjugát aplikován na příklad při terapii tumorů. Koncentrace právě aplikovaného konjugátu v léčivu může být každým průměrným odborníkem beze všeho zjištěna testem účinnosti dávky.

Diagnostické prostředky mohou být k diagnose onemocnění nebo poruch používány *in vivo* nebo *in vitro*. Je-li jako účinná látka využívána protilátka nebo fragment protilátky, hodí se konjugát na příklad k provádění v praxi obvyklého důkazu postupem ELISA.

#### Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1: GPC chromatogram reakce sloučení ox-HES 130 kD s HSA podle postupu A. III.

Obr. 2: GPC chromatogram reakce sloučení ox-HES 130 kD s HSA podle postupu A. IV.

Obr. 3: GPC chromatogram reakce sloučení ox-HES 130 kD s HSA podle postupu A. V a reakční době 2 hodin.

Obr. 4: GPC chromatogram reakce sloučení ox-HES 130 kD s HSA podle postupu A. V a reakční době přes noc.

Obr. 5: GPC chromatogram reakce sloučení ox-HES 130 kD s HSA podle postupu A. V po 2 hodinách (Obr. 5a) a přes noc (5b).

Obr. 6: GPC chromatogram reakce sloučení ox-HES 130 kD s HSA podle postupu A. VII a reakční době po 24 hodinách.

Obr. 7: GPC chromatogram reakce sloučení ox-HES 130 kD s HSA podle postupu B. V.

Obr. 8: SDS-PAGE a westernový přenos různých reakcí slučování mezi HES a HSA.

Obr. 9: SDS-PAGE a westernový přenos různých reakcí slučování mezi HES a HSA.

Obr. 10: Reakční schema vytvoření konjugátu mezi HES a DNA.

Obr. 11: Snímek gelu, který ukazuje konjugáty mezi HES a DNA před a po natrávení restriktivním enzymem.

### Příklady provedení vynálezu

V příkladech byly používány následovně popisované materiály:

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Albumin lidského séra (HSA):  | Sigma-Aldrich A3782  |
| HES 130 kD:                   | Typ 130 / 05, připraven z T91SEP (Fresenius Kabi)                      |
| Data:                         | $M_w$ : 130 000 $\pm$ 20 000 kD  |
| $M_n$ :                       | 42 600 D   |
| HES 10 kD:                    | Typ HHH 4 - 2, (Fresenius Kabi)  |
| Data:                         | $M_w$ : 9 800 kD   |
| $M_n$ :                       | 3 695 D  |
| EDC:                          | Sigma-Aldrich Nr. 16.146-2<br>(ethyl-dimethyl-aminopropyl-karbodiimid) |
| HOBt:                         | Sigma-Aldrich Nr. 15.726-0<br>1-hydroxybenzotriazol hydrát             |
| DIG-souprava detekce glykanů: | Roche -Boehringer Nr. 1142 372   |

Následující příklady 1 až 6 popisují sloučení HSA a diaminobutanu na HES s oxidovanými redukovacími koncovými skupinami nebo přímé sloučení HSA s HES. HSA a diaminobutan jsou pouze příklady pro shora definované účinné látky. Příklad 7 popisuje sloučení oligonukleotidu s HES.

## Příklad 1

**Selektivní oxidace redukujících koncových skupin hydroxyethylškrobu**

Pro selektivní oxidaci redukujících koncových skupin hydroxyethylškrobu (130 kD a 10 kD) byl tento rozpuštěn v minimálním množství vody a smísen s různým množstvím roztoku jodu a roztoku KOH.

Směs byla míchána dokud nezmizela barva poukazující na I<sub>2</sub>. Tento postup byl vícekrát opakován, aby se dosáhlo přídatku většího množství roztoku jodu a roztoku KOH. Roztok byl potom vyčištěn přes Na<sup>+</sup> kationtoměnič Amberlite IR 120, po 20 hodin dialyzován proti destilované vodě (dialyzační trubičky s hranicí odřezávání 4 - 6 kD) a lyofilizován.

Stupeň oxidace byl potom zjišťován pomocí způsobu, který je publikován v Somogyi N., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 1, 384-386 (1962). Protokoly oxidační reakce jsou uvedeny v Tabulce 1.

## Tabulka 1:

**Oxidace redukujících koncových skupin HES (130 kD a 10 kD) za různých podmínek**

V této tabulce sebrané protokoly jsou v následujícím detailně reprodukovány pro oxidaci (6), HES 10 kD:

6,4 g HES 10 kD (1,7 mmol) bylo v reakční nádobě rozpuštěno v málu vody za stálého míchání. K tomu bylo přidáno 50 ml 0,1 N roztoku jodu a 150 ml 0,1 N roztoku KOH (15 mmol). Tato směs byla ponechána stát přes noc při 25°C. Směs byla čišťena přes Amberlite IR 120 (Na<sup>+</sup>- forma) a dialyzována proti vodě (dialyzační trubice acetát celulosy, cut-off 4 - 6 kD). Dialyzovaný produkt byl lyofilizován (Heraeus-Christ Alpha, sušení v baňce přes noc).

Jak se dá zjistit z Tabulky 1, bylo docíleno úplné oxidace redukujících koncových skupin HES 130 kD (odpovídá výtěžku 100 %) potom, až bylo množství jodu zvýšeno z  $3,0 \times 10^{-5}$  mol na  $1,0 \times 10^{-3}$  mol.

Pro úplnou oxidaci redukujících koncových skupin HES 10 kD bylo zapotřebí další zvýšení množství jodu na koncentraci více než  $2,1 \times 10^{-3}$  mol.

| Postup                 | HES ( $M_n$ )                     | Roztok $I_2$ ,<br>0,1N              | Roztok<br>KOH, 0,1N                  | Rozpou-<br>štědlo | Reakční<br>doba  | Výtěžek |
|------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|------------------|---------|
| Oxidace (1)<br>HES 130 | 1 g<br>$2,4 \times 10^{-5}$ mol   | 0,3 ml<br>$3,0 \times 10^{-5}$ mol  | 0,5 ml<br>$5,0 \times 10^{-5}$ mol   | voda<br>4,0 ml    | 4 h<br>25°C      | 30,1 %  |
| Oxidace (2)<br>HES 130 | 4 g<br>$9,4 \times 10^{-5}$ mol   | 1,0 ml<br>$1,0 \times 10^{-4}$ mol  | 1,5 ml<br>$1,5 \times 10^{-4}$ mol   | voda<br>6,0 ml    | přes noc<br>25°C | 24,8 %  |
| Oxidace (3)<br>HES 130 | 5 g<br>$1,2 \times 10^{-4}$ mol   | 1,2 ml<br>$1,2 \times 10^{-4}$ mol  | 1,5 ml<br>$1,5 \times 10^{-4}$ mol   | voda<br>7,5 ml    | přes noc<br>25°C | 24,3 %  |
| Oxidace (4)<br>HES 130 | 5 g<br>$1,2 \times 10^{-4}$ mol   | 3,0 ml<br>$3,0 \times 10^{-4}$ mol  | 4,5 ml<br>$4,5 \times 10^{-4}$ mol   | voda<br>7,5 ml    | přes noc<br>25°C | 60,8 %  |
| Oxidace (5)<br>HES 130 | 5 g<br>$1,2 \times 10^{-4}$ mol   | 4,0 ml<br>$4,0 \times 10^{-4}$ mol  | 5 ml<br>$5,0 \times 10^{-4}$ mol     | voda<br>7,5 ml    | přes noc<br>25°C | 80,0 %  |
| Oxidace (6)<br>HES 130 | 8 g<br>$1,9 \times 10^{-4}$ mol   | 7,0 ml<br>$7,0 \times 10^{-4}$ mol  | 11,5 ml<br>$1,2 \times 10^{-3}$ mol  | voda<br>7,5 ml    | přes noc<br>25°C | 88,4 %  |
| Oxidace (7)<br>HES 130 | 10 g<br>$2,4 \times 10^{-4}$ mol  | 10 ml<br>$1,0 \times 10^{-3}$ mol   | 20 ml<br>$2,0 \times 10^{-3}$ mol    | voda<br>7,5 ml    | přes noc<br>25°C | 100 %   |
| Oxidace (1)<br>HES 10  | 5 g<br>$1,4 \times 10^{-3}$ mol   | 2,0 ml<br>$2,0 \times 10^{-4}$ mol  | 2,0 ml<br>$2,0 \times 10^{-4}$ mol   | voda<br>10,0 ml   | 20 h<br>25°C     | 3,0 %   |
| Oxidace (2)<br>HES 10  | 5 g<br>$1,4 \times 10^{-3}$ mol   | 3,5 ml<br>$3,5 \times 10^{-4}$ mol  | 4,5 ml<br>$4,5 \times 10^{-4}$ mol   | voda<br>10,0 ml   | přes noc<br>25°C | 5,3 %   |
| Oxidace (3)<br>HES 10  | 15 g<br>$4,1 \times 10^{-3}$ mol  | 21,0 ml<br>$2,1 \times 10^{-3}$ mol | 31,0 ml<br>$3,1 \times 10^{-3}$ mol  | voda              | přes noc<br>25°C | 10,5 %  |
| Oxidace (4)<br>HES 10  | 8 g<br>$2,2 \times 10^{-3}$ mol   | 83,0 ml<br>$8,3 \times 10^{-3}$ mol | 180,0 ml<br>$1,8 \times 10^{-2}$ mol | voda              | přes noc<br>25°C | 80,0 %  |
| Oxidace (5)<br>HES 10  | 7 g<br>$1,9 \times 10^{-3}$ mol   | 95,0 ml<br>$9,5 \times 10^{-3}$ mol | 210,0 ml<br>$2,1 \times 10^{-2}$ mol | voda              | přes noc<br>25°C | 100,0 % |
| Oxidace (6)<br>HES 10  | 6,4 g<br>$1,7 \times 10^{-3}$ mol | 50 ml<br>$5,0 \times 10^{-3}$ mol   | 150 ml<br>$1,5 \times 10^{-2}$ mol   | voda              | přes noc<br>25°C | 100,0 % |

## Příklad 2

**Vazba HES s oxidovanými redukujícími koncovými skupinami na HSA ve vodné fázi**

Pro vznik vazby byly hydroxyethylškrob s oxidovanými redukujícími koncovými skupinami (ox-HES) a HSA úplně rozpuštěny ve vodě. Když byl roztok čirý, byl přidán ethyldimethyl-aminopropyl-karbodiimid (EDC) rozpuštěný ve vodě. Po aktivaci pomocí EDC byla za přiměřeného míchání přidána další množství EDC. Reakce byla po případě aktivována pomocí HOBt a ponechána stát přes noc. Produkt byl 15 hodin čistěn dialýzou proti destilované vodě a potom lyofilizován (v následujícím označeno jako postup A).

Protokoly reakce vzniku vazby jsou uvedeny v Tabulce 2.

## Tabulka 2:

**Reakce vzniku vazby mezi HES (130 kD a 10 kD) s oxidovanými redukujícími koncovými skupinami a HSA za různých podmínek**

(Postup A; číslo v závorce ve sloupci HES udává oxidační postup podle Tabulky 1)

Reakce slučování VII mezi ox-Hes 130 kD a HSA se detailně uvádí následovně:

v kulaté baňce bylo v circa 5 ml vody při teplotě místnosti za míchání rozpuštěno 130 mg ox-HES 130 kD (oxidační stupeň cca 100 %) a 100 mg HSA. Jakmile se roztok vyčeřil, bylo po dobu jedné hodiny přikapáváno 200 mg EDC rozpuštěného v 5 - 10 ml vody ve třech dávkách. Po každém přidavku se ponechalo asi 4 hodiny při teplotě místnosti míchat. Po reakční době 24 h byla směs dialyzována proti vodě (dialyzační trubice acetát celulosy, cut -off 4 - 6 kD). Potom byl produkt lyofilizován.

| Postup A                    | HSA                                | ox-HES<br>(M <sub>n</sub> )            | EDC                                 | HOBt                               | Rozpou-<br>štědlo                     | Akti-<br>vace  | Reakce           |
|-----------------------------|------------------------------------|--|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------|------------------|
| Slučování I<br>ox-HES 130   | 300 mg<br>4,4x10 <sup>-6</sup> mol | 100 mg (1)<br>2,4x10 <sup>-6</sup> mol | 25 mg<br>1,6x10 <sup>-4</sup> mol   | 100 g<br>7,7x10 <sup>-4</sup> mol  | H <sub>2</sub> O/dioxan<br>13 ml/2 ml | 1,5 h<br>3-4°C | 4 h<br>25°C      |
| Slučování II<br>ox-HES 130  | 100 mg<br>1,5x10 <sup>-6</sup> mol | 300 mg (2)<br>7,0x10 <sup>-6</sup> mol | 15 mg<br>9,7x10 <sup>-5</sup> mol   | 100 g<br>7,7x10 <sup>-4</sup> mol  | H <sub>2</sub> O/dioxan<br>10 ml/3 ml | 1,5 h<br>3-4°C | přes noc<br>25°C |
| Slučování III<br>ox-HES 130 | 200 mg<br>3,0x10 <sup>-6</sup> mol | 3,8 g (5)<br>8,9x10 <sup>-5</sup> mol  | 46,5 mg<br>3,0x10 <sup>-4</sup> mol | 20 mg<br>1,5x10 <sup>-4</sup> mol  | H <sub>2</sub> O/dioxan<br>10 ml/3 ml | 0 h            | 24 h<br>25°C     |
| Slučování IV<br>ox-HES 130  | 100 mg<br>1,5x10 <sup>-6</sup> mol | 1,9 g (5)<br>4,5x10 <sup>-5</sup> mol  | 25 mg<br>1,6x10 <sup>-4</sup> mol   | 20 mg<br>1,5x10 <sup>-4</sup> mol  | voda                                  | 1,5 h<br>3-4°C | přes noc<br>25°C |
| Slučování V<br>ox-HES 130   | 200 mg<br>3,0x10 <sup>-6</sup> mol | 4,3 g (5)<br>1,0x10 <sup>-4</sup> mol  | 100 mg<br>6,0x10 <sup>-4</sup> mol  | 0 mg                               | voda                                  | 0 h            | přes noc<br>25°C |
| Slučování VI<br>ox-HES 130  | 100 mg<br>1,5x10 <sup>-6</sup> mol | 130 mg (7)<br>3,0x10 <sup>-6</sup> mol | 50 mg<br>3,0x10 <sup>-4</sup> mol   | 0 mg                               | voda<br>5 ml+10ml                     | 0 h            | 5 h<br>25°C      |
| Slučování VII<br>ox-HES 130 | 100 mg<br>1,5x10 <sup>-6</sup> mol | 130 mg (7)<br>3,0x10 <sup>-6</sup> mol | 200 mg<br>1,2x10 <sup>-3</sup> mol  | 0 mg                               | voda 5 ml +<br>2x 10ml                | 0 h            | 24 h<br>25°C     |
| Slučování I<br>ox-HES 10    | 100 mg<br>1,5x10 <sup>-6</sup> mol | 300 mg (1)<br>8,1x10 <sup>-5</sup> mol | 5 mg<br>3,0x10 <sup>-5</sup> mol    | 100 mg<br>7,7x10 <sup>-4</sup> mol | H <sub>2</sub> O/dioxan<br>13 ml/2 ml | 1,5 h<br>3-4°C | přes noc<br>25°C |
| Slučování II<br>ox-HES 10   | 70 mg<br>1,0x10 <sup>-6</sup> mol  | 1,0 g (2)<br>2,7x10 <sup>-4</sup> mol  | 15,5 mg<br>1,0x10 <sup>-4</sup> mol | 0 mg                               | voda                                  | 10 ml<br>0 h   | přes noc<br>25°C |
| Slučování III<br>ox-HES 10  | 200 mg<br>3,0x10 <sup>-6</sup> mol | 3,0 g (3)<br>8,1x10 <sup>-4</sup> mol  | 77,5 mg<br>5,0x10 <sup>-4</sup> mol | 20 mg<br>1,5x10 <sup>-4</sup> mol  | voda                                  | 0 h            | 6 h<br>25°C      |
| Slučování IV<br>ox-HES 10   | 50 mg<br>7,4x10 <sup>-7</sup> mol  | 7,4 g (4)<br>2,0x10 <sup>-3</sup> mol  | 282 mg<br>1,5x10 <sup>-3</sup> mol  | 0 mg                               | voda                                  | 0 h            | přes noc<br>25°C |
| Slučování V<br>ox-HES 10    | 100 mg<br>1,5x10 <sup>-6</sup> mol | 103 g (6)<br>2,8x10 <sup>-5</sup> mol  | 93 mg<br>5,6x10 <sup>-4</sup> mol   | 0 mg                               | voda<br>4 ml                          | 0 h            | 20 h<br>25°C     |
| Slučování VI<br>ox-HES 10   | 100 mg<br>1,5x10 <sup>-6</sup> mol | 103 g (6)<br>2,8x10 <sup>-5</sup> mol  | 200 mg<br>1,2x10 <sup>-3</sup> mol  | 0 mg                               | voda<br>3x5 ml                        | 0 h            | 30 h<br>25°C     |

\* = Přidání roztoku EDC kapací nálevkou během 60 min.

## Příklad 3

**Přímá vazba HES na HSA ve vodné fázi**

Princip této reakce spočívá na tvorbě Schiffovy base mezi HES a aminoskupinami proteinu, při čemž tato reakce je vedena přes reakci Schiffovy base na odpovídající amin pomocí  $\text{NaBH}_4$  (v dalším označováno jako postup B).

Proto byl HES úplně rozpuštěn v málo vody. K tomu byl přidán HSA rozpuštěný v borátovém pufru, pH 9,0. K tomuto roztoku byl přidán  $\text{NaBH}_4$  a byl za míchání ponechán při teplotě místnosti. Byl přidán další alikvot HES 130 kD následovaný dalším  $\text{NaBH}_4$ . Po skončení reakce bylo jak popsáno dialyzováno a lyofilizováno.

Protokoly jednotlivých pokusů jsou uvedeny v Tabulce 3.

## Tabulka 3

**Přímé vytvoření vazby mezi HES (130 kD a 10 kD) a HSA za různých podmínek.  
(Postup B)**

Pro vytvoření vazby s HES 130 kD bylo jednotlivě 2,0 g této sloučeniny úplně rozpuštěno ve vodě (cca 5 ml). K tomu bylo přidáno 50 mg HSA rozpuštěného v 1 ml 0,1 M borátového pufru, pH 9,0. K tomuto roztoku bylo přidáno 30 mg  $\text{NaBH}_4$  a za míchání ponecháno při teplotě místnosti. Po 18 hodinách byl přidán další alikvot 2,0 g HES 130 kD následovaný dalšími 30 mg  $\text{NaBH}_4$ . Po reakční době celkem 100 h bylo dialyzováno a lyofilizováno (Sloučení V, HES 130 kD).

Pro vytvoření vazby s HES 10 kD bylo ve vodě (cca 5 ml) úplně rozpuštěno 1,4 g této sloučeniny. K tomu bylo přidáno 50 mg HSA rozpuštěného v 1 ml 0,1 M borátového pufru, pH 9,0. K tomuto roztoku bylo přidáno 14 mg  $\text{NaBH}_4$  a za míchání ponecháno při teplotě místnosti. Po 18 hodinách byl přidán další alikvot 1,4 g HES 10 kD následovaný dalšími 14 mg  $\text{NaBH}_4$ . Po reakční době celkem 80 h bylo dialyzováno a lyofilizováno (Slučování I, HES 10 kD).

| Postup B                 | HSA                                | HES<br>(M <sub>n</sub> )           | NaBH <sub>4</sub>                  | Pufr<br>pH                                     | Reakční<br>doba |
|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|-----------------|
| Slučování I<br>HES 130   | 50 mg<br>7,5x10 <sup>-7</sup> mol  | 500 mg<br>1,2x10 <sup>-6</sup> mol | 500 mg<br>1,3x10 <sup>-2</sup> mol | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0 ml<br>7,4 | 48 h<br>25°C    |
| Slučování II<br>HES 130  | 100 mg<br>7,5x10 <sup>-7</sup> mol | 1 g<br>1,2x10 <sup>-5</sup> mol    | 60 mg<br>1,6x10 <sup>-3</sup> mol  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 ml<br>7,4 | 20 h<br>25°C    |
| Slučování III<br>HES 130 | 50 mg<br>7,5x10 <sup>-7</sup> mol  | 9,8 g<br>2,3x10 <sup>-4</sup> mol  | 285 mg<br>7,5x10 <sup>-3</sup> mol | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 ml<br>7,4 | 36 h<br>25°C    |
| Slučování IV<br>HES 130  | 50 mg<br>7,5x10 <sup>-7</sup> mol  | 2,0 g<br>4,4x10 <sup>-5</sup> mol  | 180 mg<br>4,7x10 <sup>-3</sup> mol | Borát 0,1 M<br>9,0                             | 30 h<br>25°C    |
| Slučování V<br>HES 130   | 50 mg<br>7,5x10 <sup>-7</sup> mol  | 4,0 g<br>9,4x10 <sup>-5</sup> mol  | 60 mg<br>1,6x10 <sup>-3</sup> mol  | Borát 0,1 M<br>9,0                             | 100 h<br>25°C   |
| Slučování I<br>HES 10    | 50 mg<br>7,5x10 <sup>-7</sup> mol  | 2,8 g<br>9,4x10 <sup>-5</sup> mol  | 28 mg<br>1,6x10 <sup>-3</sup> mol  | Borát 0,1 M<br>9,0                             | 80 h<br>25°C    |

## Příklad 4

## Analýza sloučených produktů pomocí GPC

Reakční produkty byly nejdříve analyzovány za použití gelové permeační chromatografie (GPC).

## 4.1

Pro GPC byl použit FPLC přístroj (Pharmacia), který byl spojen s HPLC UV monitorem (Hitachi). Dále byly použity následující podmínky:

Sloupec: Superose 12 HR 10 / 30 (1 x 30 cm) (Pharmacia)  
 UV monitor: 280 nm  
 Pumpa: 0,2 ml / min  
 Pufr: 50 mM fosfát / 150 mM NaCl, pH 7,2.

Za těchto podmínek byl peak HSA nalezen obvykle po 63 min, při čemž dodatečně mohl být naměřen při asi 57 min menší peak, který je způsoben dimery HSA. Chromatogramy získané pomocí GPC lze analyzovat následovně:

#### 4.2

Obr. 1 je chromatogram, který ukazuje distribuci množství produktů po sloučení ox-HES 130 kD s HSA (Slučování III). Při tomto způsobu sloučení byly dosaženy velmi dobré výsledky bez aktivace pomocí HOBt. Zřetelný ojedinělý široký peak byl naměřen při 37 min a další menší peaky při 45 min, což poukazuje na sloučený produkt s vyšší molekulovou hmotností než má HSA. Současně byly nalezeny stopy nemodifikovaného HSA.

Obr. 2 ukazuje distribuci množství produktů po sloučení ox-HES 130 kD s HSA (Slučování IV). Reakce byla aktivována pomocí HOBt. Ukazuje se, že tato aktivace snižuje výtěžek pravděpodobné podporováním vedlejších reakcí.

Obr. 3 a 4 ukazují distribuci množství reakčních produktů během a po reakci slučování ox-HES 130 kD s HSA (Slučování V). Po reakční době 2 hodin byl jako produkt s nejvyšší koncentrací nalezen nemodifikovaný HSA, ale vedle toho také první produkty sloučení s vyšší molekulovou hmotností. Po proběhnutí reakce byl nalezen homogenní produkt sloučení s retenční dobou cca 35 min ve vysoké koncentraci. Nemodifikovaný HSA a jiné produkty sloučení jsou tu v relativně malé koncentraci

Obr. 5 ukazuje příslušnou distribuci množství reakčních produktů během a po reakci slučování ox-HES 10 kD s HSA (Slučování V). I zde se ukazuje, že koncentrace produktů sloučení s molekulovou hmotností, která leží nad hmotností HSA, v průběhu reakce přibývá.

Reakce slučování, při které téměř všechny molekuly HSA mohly být přeměněny na homogenní produkt sloučení je nakonec ukázána na obr. 6 (reakční produkty slučování VII).

Příklad pro chromatogramy, které byly získány při analýze přímého slučování HES s HSA, je ukazován na obr. 7 (postup B, HES 130 kD, spojení V). Dá se rozeznat zřetelný peak při cca 65 min (HSA). Nad to pak byl ale také prokázán produkt sloučení (peak při cca 42 min).

## Příklad 5

**Analyza produktů sloučení pomocí SDS-PAGE a westernový přenos**

## 5.1

PAGE byla prováděna v přítomnosti natrium-dodecylsulfátu (SDS) při použití Miniprotean II přístroje firmy Biorad a 7,5 % akrylamidového gelu. Provedení elektroforézy probíhalo podle předpisu výrobce. Aby se proteiny staly viditelné, byly gely vybarvovány stříbrem podle metody Bluma [*Electrophoresis* 8, 93-99 (1997)].

Přítomnost glykanů v produktech sloučení byla dokazována westernovým přenosem a pomocí soupravy pro detekci glykanů od firmy Roche-Boehringer. Po rozdělení produktů pomocí SDS-PAGE, tyto byly za použití "blotting" aparátu elektroforézni jednotky Miniprotean II převedeny na nitrocelulosovou membránu. Následně byla membrána oxidována jodistanem za podmínek, při kterých se oxidují pouze vicinální OH skupiny. Ty byly potom zreagovány s amino-funcionalizovaným digoxygeninem. Vázaný digoxygenin byl dokazován pomocí specifických monoklonálních protilátek, které byly vázány na alkalickou fosfatasy. Proto byl přidán substrát fosfatasy (4-nitrotetrazolium-chlorid / 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát), který vytváří těžko rozpustný modro-fialový produkt. Tento produkt se na membráně usazuje a umožní tím, že se pásy stanou viditelné. Jako negativní kontroly se aplikovaly nemodifikovaný HSA a keratinasa, zatímco transferrin fungoval jako pozitivní kontrola.

Přesné kroky při postupu jsou popisovány v doprovodném letáku u této soupravy (Roche-Boehringer).

## 5.2

Obr. 8 a 9 ukazují právě snímek stříbrem vybarveného SDS-PAGE gelu (nahore) a snímek odpovídajících produktů po přenesení na membránu a důkaz glykanu (dole). Jak se dá z těchto obrázků usoudit, vzniká při reakci slučování jako reakční produkt relativně homogenní glykan, zatímco koncentrace nemodifikovaného HSA ubývá.

## Příklad 6

## Objasnění možných vedlejších reakcí

Pro vysvětlení zda vedlejší reakce probíhají ve formě autokondenzace HES s oxidovanými redukcujícími koncovými skupinami, byly uskutečněny následující násady do reakce:

Tabulka 4

Násady do reakce k objasnění vedlejších reakcí

|            | ox-HES                             | EDC                                | HOBt            | Voda   | Reakční doba |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|--------|--------------|
| HES 130 kD | 500 mg<br>$1,2 \times 10^{-5}$ mol | 15 mg<br>$7,8 \times 10^{-5}$ mol  | --              | 5,0 ml | 30 h<br>25°C |
| HES 130 kD | 500 mg<br>$1,2 \times 10^{-5}$ mol | 15 mg<br>$7,8 \times 10^{-5}$ mol  | nasycený roztok | 5,0 ml | 30 h<br>25°C |
| HES 130 kD | 100 mg<br>$2,7 \times 10^{-5}$ mol | 3,4 mg<br>$1,8 \times 10^{-5}$ mol | --              | 5,0 ml | 30 h<br>25°C |
| HES 130 kD | 100 mg<br>$2,7 \times 10^{-5}$ mol | 3,4 mg<br>$1,8 \times 10^{-5}$ mol | nasycený roztok | 5,0 ml | 30 h<br>25°C |
| HES 130 kD | 700 mg<br>$1,6 \times 10^{-5}$ mol | 31 mg<br>$1,6 \times 10^{-4}$ mol  | --              | 5,0 ml | 30 h<br>25°C |
| HES 130 kD | 700 mg<br>$1,6 \times 10^{-5}$ mol | 31 mg<br>$1,6 \times 10^{-4}$ mol  | nasycený roztok | 5,0 ml | 30 h<br>25°C |

Cílem experimentů bylo dokázat nakolik dochází k možné autokondenzaci HES v přítomnosti nebo nepřítomnosti HOBt. Vzorky byly lyofilizovány a analyzovány.

Pomocí GPC a měření rozptýleným světlem nemohly být v rozsahu detekčních hranic několika procent nalezeny žádné důkazy pro zvětšování molekulové hmotnosti.

## Příklad 7

**Slučování oxidovaného HES s DNA a analýza funkcionality produktů sloučení**

## Princip reakce:

Schematické zobrazení reakce je uvedeno na obr. 10. V prvním kroku reaguje aminoskupina amino-HES12KD 3 s N-hydroxysukcinimidovou skupinou SMCC 4 na konjugát 5. Odstředěním za použití centrifugační dialýzy se oddělí nezreagovaný SMCC 4. Maleinimidová skupina konjugátu 5 reaguje potom s thiolovou skupinou thio-DNA 1 na požadovaný produkt 6. Tučně označená oblast ve vzorci 6 je pouze spojovníkem a může mít jakoukoliv podobu.

Přezkoumání biologické aktivity konjugátu 6 probíhalo pomocí štěpení restrikním enzymem EcoR1. Restrikní enzym štěpí pouze dvouřetězcovou DNA s intaktní poznávací sekvencí.

## DNA:

Použita byla dvouřetězcová DNA syntetizovaná u MWG Biotech AG, Ebersberg. Sekvence jednotlivých sekvencí znějí:

SEQ ID NO 1:

5'-GTAGAGACAGGAGGCAGCAGTTGAATTCGCAGGGTGAGTAGCAGTAGAGC-3';

SEQ ID NO 2:

5'-GCTCTACTGCTACTCACCTGCGAATTCAACTGCTGCCTCCTGTCTCTAC-3';

modifikovaná s 5'-thiol C6 S-S pomocí MWG (viz obr. 10).

Oba jednotlivé řetězce DNA byly rozpuštěny ve dvakrát destilované vodě v koncentraci po 2  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  a v poměru 1 : 1 byly při 96°C hybridizovány k dvouřetězcové thio-DNA 1 s koncentrací 2  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .

## Analýza produktů:

Analýza byla prováděna gelovou elektroforézou ve 4 %-ním agarosovém gelu s elektrolytem TBE pufru ze 45 mM Tris-borátu, 1 mM EDTA, pH 8,0 po 1  $\mu\text{g}$  DNA v přítomnosti 50  $\mu\text{g}$  ethidinium-bromidu na 100 ml gelu. Fotografie byly snímány při



312 nm pomocí CCD-System Modular (INTAS Imaging Instruments, Göttingen, DBR) a UV-Transluminator UVT-20 S / M / L (Herolab GmbH, Wiesloch, DBR).

Z reakční směsi byly odebírány 1  $\mu$ l (1  $\mu$ g DNA) a po 3 h při 37°C štěpeny s 1  $\mu$ l (20 U) restrikčního enzymu EcoR1 (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus, DBR), 1  $\mu$ l reakčního ústojného roztoku (50 mM chloridu sodného, 100 Tris-HCl, 10 mM chloridu hořečnatého, 0,025 % Tritobu X-100, pH 7,5 od New England Biolabs) a 7  $\mu$ l dvakrát destilované vody.

#### Modifikace HES:

Oxidace HES12KD (Fresenius, Šarže 2540SR2.5P) se střední molekulovou hmotností 12 000 g / mol na oxo-HES12KD 2 byla provedena roztokem jodu podle postupu publikovaného v DE 19628705.

#### Reakce 1,4-diaminobutanu s oxo-HES12KD 2:

1,44 g (0,12 mmol) oxo-HES12KD 2 bylo rozpuštěno v bezvodém dimethylsulfoxidu (DMSO), pod dusíkem přikapáno k roztoku z 1,5 ml (1,50 mmol) 1,4-diaminobutanu a při 40°C 19 h mícháno. Reakční směs byla přidána ke směsi z 80 ml ethanolu a 80 ml acetonu. Vytvořená sraženina byla odcentrifugována a vzata do 40 ml vody. Roztok byl 4 dny dialyzován proti vodě (dialyzační trubice SnakeSkin, cut-off 3,5 kD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, BDR) a následně lyofilizován. Výtěžek činil 80 % (1,06 g) amino-HES12KD 3.

#### Sloučení amino-HES12KD 3 s thio-DNA 1

Ke 400  $\mu$ l 10 mg / ml roztoku amino-HES12KD 3 v pufru z 10 mM fosforečnanu sodného a 150 mM chloridu sodného, pH 7,44 bylo přidáno 1 mg SMCC 4 rozpuštěného v 50  $\mu$ l bezvodého DMSO a směs byla zpracována 80 min při teplotě místnosti a 10 min při 46°C. Potom byla směs odcentrifugována. Supernatant byl oddělen od sraženiny a znovu centrifugován. Ze supernatantu bylo odebráno 200  $\mu$ l a centrifugováno 45 min při 14 000 g s MICROCON YM-3 (Amicon, Milipore GmbH, Eschborn, DBR) dialyzační vložkou centrifugy. Po přidání 400  $\mu$ l pufru z 10 mM fosforečnanu sodného a 150 mM chloridu sodného pH 7,44 bylo znovu 45 min centrifugováno, dalších 400  $\mu$ l pufru přidáno a centrifugováno 60 min. V dialyzační vložce zbylé množství roztoku konjugátu bylo doplněno na 50  $\mu$ l. Z tohoto roztoku



bylo 10  $\mu$ l přidáno k 10  $\mu$ l roztoku thio-DNA 1 a ponecháno 14 h reagovat při teplotě místnosti. K analýze byl odebírán 1  $\mu$ l. Výsledky ukazuje obr. 11 v pásu 2 a 3.

Reakční podmínky pro popsaný pokus a pro pokusy se změněnými reakčními podmínkami jsou shrnuty v Tabulce 1 a výsledky jsou zobrazeny na obr. 11.

Souhrn výsledků:

Byly zkoumány následující podmínky:

1. Množství SMCC:

1 mg (pásy 2, 6, 10, 14), respektive 5,6 mg (pásy 4, 8, 12, 16);

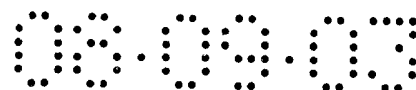
2. Teplota pro reakci s thio-DNA 1:

teplota místnosti (pásy 2, 4, 6, 8), respektive 37°C (pásy 10, 12, 14, 16);

3. Podmínky pufování:

10 mM fosfátu, 150 mM NaCl bez EDTA, pH 7,44 (pásy 2, 4, 10, 12), respektive 100 mM fosfátu, 150 mM NaCl + 50 mM EDTA, pH 7,23 (pásy 6, 8, 14, 16).

Na obrázku 11 zobrazované pásy 2 - 18 jsou výsledky pokusů slučování amino-HES12KD 3 s thio-DNA 1 pomocí SMCC. Při tom jsou vedle sebe uváděny výsledky přímo z reakce respektive po reakci a následujícím zkrácování DNA. V pásu 1 je nanesena směs různých referenčních DNA pro značkování délky a pásy 18 a 19 ukazují thio-DNA 1 respektive zkrácenou thio-DNA 1. Všechny pokusy ukazují k ještě nezreagované thio-DNA 1 navíc produkty slučování o vyšších hmotnostech (pásy 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16). Protože HES12KD je směsí nestejně velikých molekul, vykazují distribuci molekulových hmotností i produkty slučování. Všechny produkty slučování obsahují intaktní DNA, protože mohou pomocí EcoR1 být úplně stráveny. To se projevuje v téměř úplném zmizení odpovídajících difuzních pásů po zkrácování (pásy 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17).



Tabulka 1:

Reakční podmínky slučování amino-HES12KD 3 s thio-DNA 1

| Pás | Pokus          | Teplota [°C] | SMCC [mg] | DNA      | HES12KD       | Pufer       |         |
|-----|----------------|--------------|-----------|----------|---------------|-------------|---------|
| 1   | Znač-<br>kovač |              |           |          |               |             |         |
| 2   | 19A1           | RT*          | 1         | Thio-DNA | Amino-HES12KD | 7,44, 10mM  |         |
| 3   |                |              |           |          |               |             | kráceno |
| 4   | 19B1           | RT*          | 5,6       | Thio-DNA | Amino-HES12KD | 7,44, 10mM  |         |
| 5   |                |              |           |          |               |             | kráceno |
| 6   | 19C1           | RT*          | 1         | Thio-DNA | Amino-HES12KD | 7,23, 100mM |         |
| 7   |                |              |           |          |               |             | kráceno |
| 8   | 19D1           | RT*          | 5,6       | Thio-DNA | Amino-HES12KD | 7,23, 100mM |         |
| 9   |                |              |           |          |               |             | kráceno |
| 10  | 19A2           | 37°C         | 1         | Thio-DNA | Amino-HES12KD | 7,44, 10mM  |         |
| 11  |                |              |           |          |               |             | kráceno |
| 12  | 19B2           | 37°C         | 5,6       | Thio-DNA | Amino-HES12KD | 7,44, 10mM  |         |
| 13  |                |              |           |          |               |             | kráceno |
| 14  | 19C2           | 37°C         | 1         | Thio-DNA | Amino-HES12KD | 7,23, 100mM |         |
| 15  |                |              |           |          |               |             | kráceno |
| 16  | 19D2           | 37°C         | 5,6       | Thio-DNA | Amino-HES12KD | 7,23, 100mM |         |
| 17  |                |              |           |          |               |             | kráceno |
| 18  |                |              |           | Thio-DNA |               |             |         |
| 19  |                |              |           |          |               |             | kráceno |

RT\* = teplota místnosti

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby kovalentního konjugátu HAS s účinnou látkou, při kterém se v reakčním mediu spolu zreagují HAS a účinná látka, **vyznačující se tím, že**
  - (a) se před vazbou na účinnou látku selektivně oxiduje redukující koncová skupina HAS;
  - (b) reakčním prostředím je voda nebo směs vody s organickým rozpouštědlem, které obsahuje alespoň 10 hmotn. % vody a
  - (c) účinnou látkou je protein, oligopeptid nebo polypeptid.
  
2. Způsob podle nároku 1 **vyznačující se tím, že** účinnou látkou je očkovací látka, toxin, antibiotikum (antiinfektivum), antiarytmikum, omezovač chuti, anestetikum, analgetikum, antireumatikum, antialergikum, antiastmatikum, antidepressivum, antidiabetikum, antihistaminikum, antihypertonikum nebo antineoplastický prostředek.
  
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2 **vyznačující se tím, že** účinnou látkou je enzym, inhibitor enzymů, receptor, fragment receptorů, inzulin, Faktor VIII, Faktor IX, cytokin, interferon, interleukin, růstový faktor, peptidové antibiotikum, virový obalový protein, hemoglobin, erythropoetin, albumin, hTPA, protilátka, fragment protilátky nebo jednořetězcová protilátka.
  
4. Způsob podle některého z předchozích nároků **vyznačující se tím, že** HAS se váže na  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-skupinu, na  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-skupinu, na SH-skupinu na COOH-skupinu nebo na -C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-skupinu účinné látky.
  
5. Způsob podle některého z předchozích nároků **vyznačující se tím, že** zoxidovaná redukující koncová skupina HAS reaguje s aminoskupinou účinné látky za vzniku amidu.
  
6. Způsob podle některého z předchozích nároků **vyznačující se tím, že** se před vytvořením konjugátu účinná látka nebo HAS naváže na spojovník.

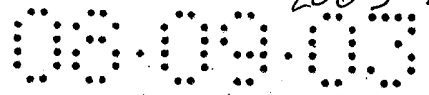


7. Způsob podle některého z předchozích nároků **vyznačující se tím, že** se použije hydroxyethylškrob se střední molekulovou hmotností (hmotnostní průměr) od 1 do 300 kDa.

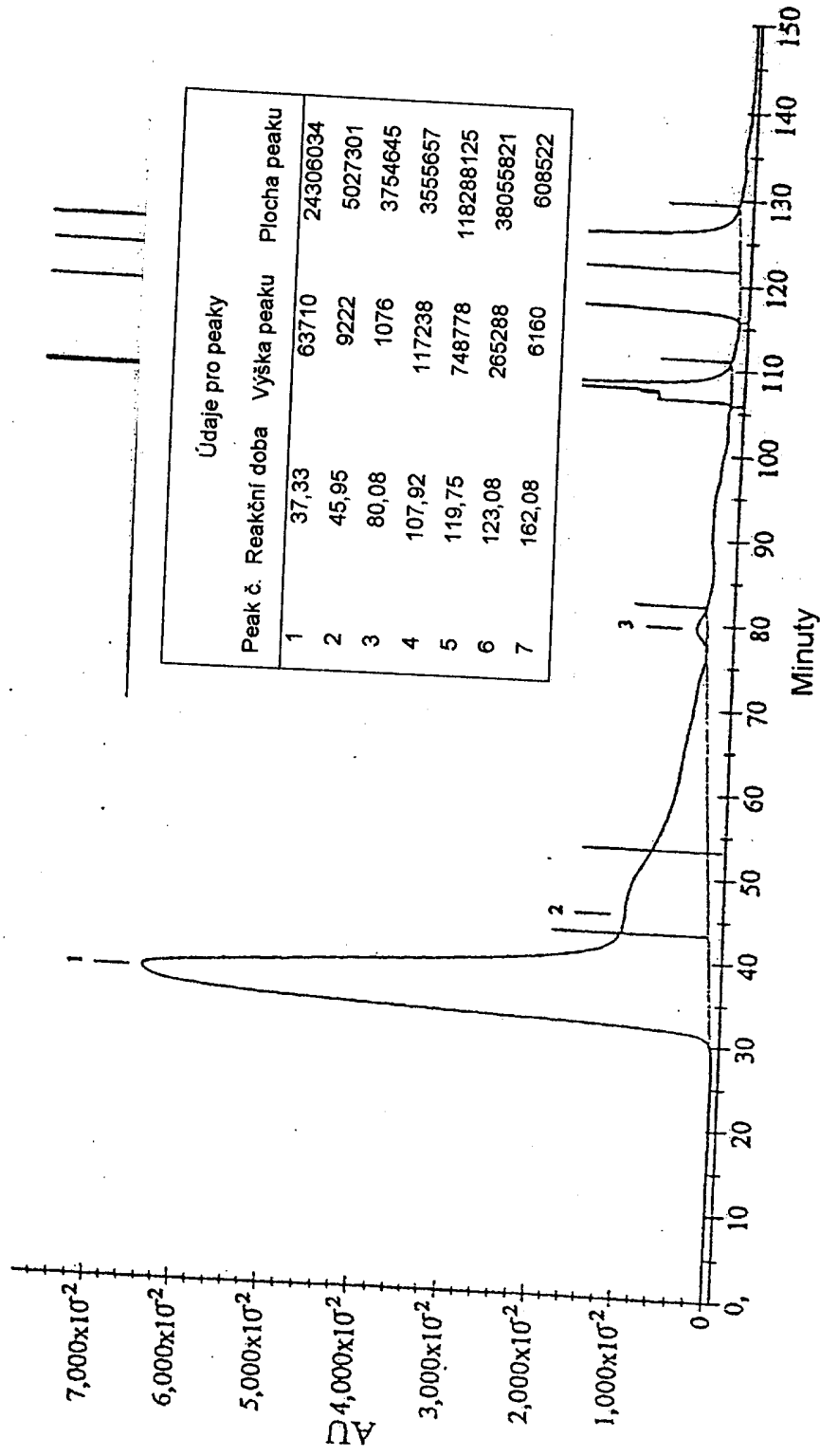
8. Způsob podle některého z předchozích nároků **vyznačující se tím, že** se použije hydroxyethylškrob se střední molekulovou hmotností od 2 do 40 kDa.

9. Způsob podle některého z předchozích nároků **vyznačující se tím, že** se použije hydroxyethylškrob se středním molárním stupněm substituce od 0,1 do 0,8 a poměrem substituce  $C_2 : C_6$  v rozsahu od 2 do 20, vztaženo vždy na hydroxyethylskupiny.

10. Způsob výroby léčiva nebo diagnostického prostředku **vyznačující se tím, že** zahrnuje kroky, při nichž se vyrobí konjugát podle některého z nároků 1 až 9 a smísí se s farmaceuticky přijatelným nosičem, adjuvantem nebo pomocnou látkou.

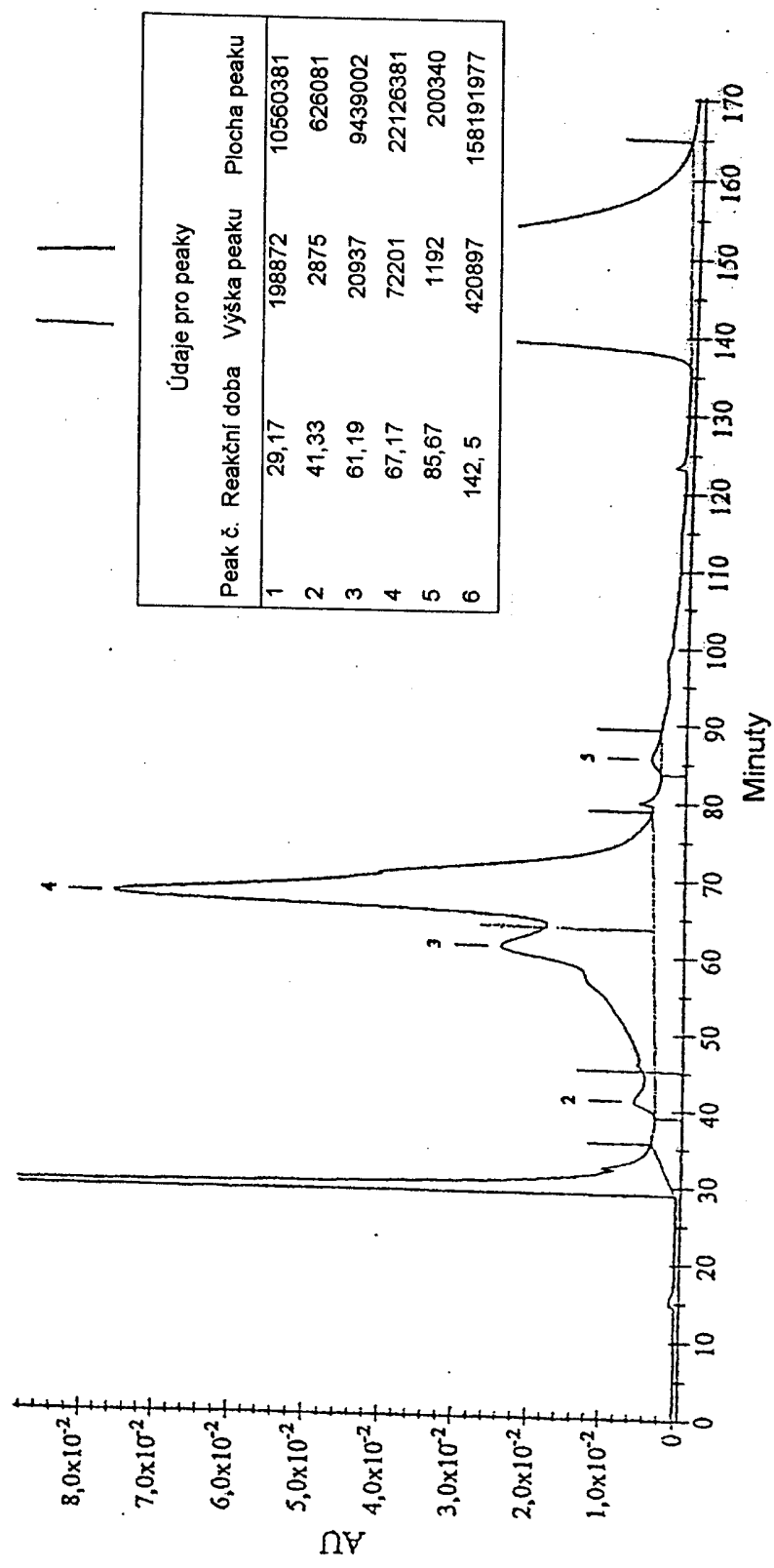


1/12



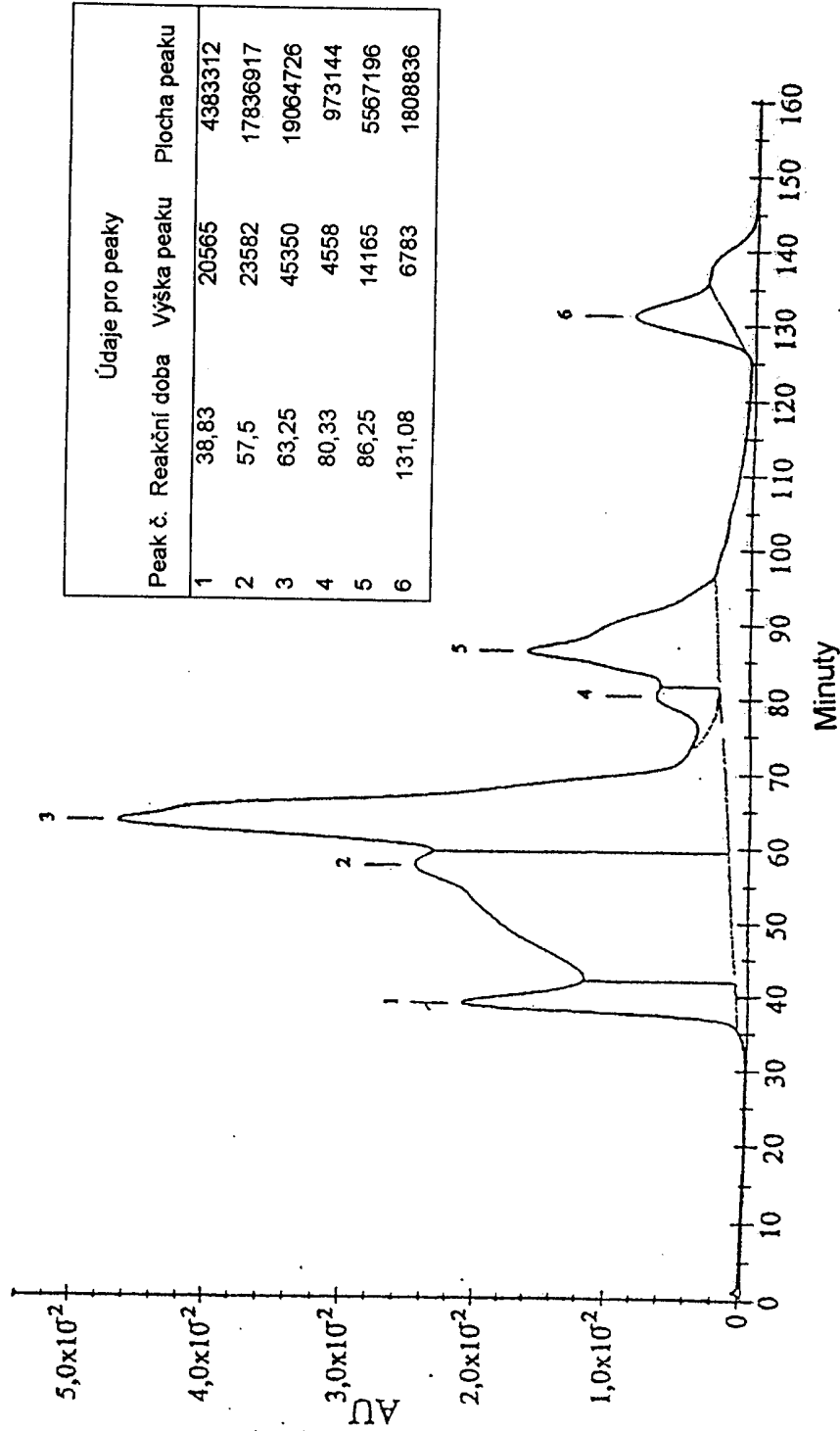
Obr. 1 : GPC chromatogram slučování III: ox-HES 130 kD s HSA

2/12



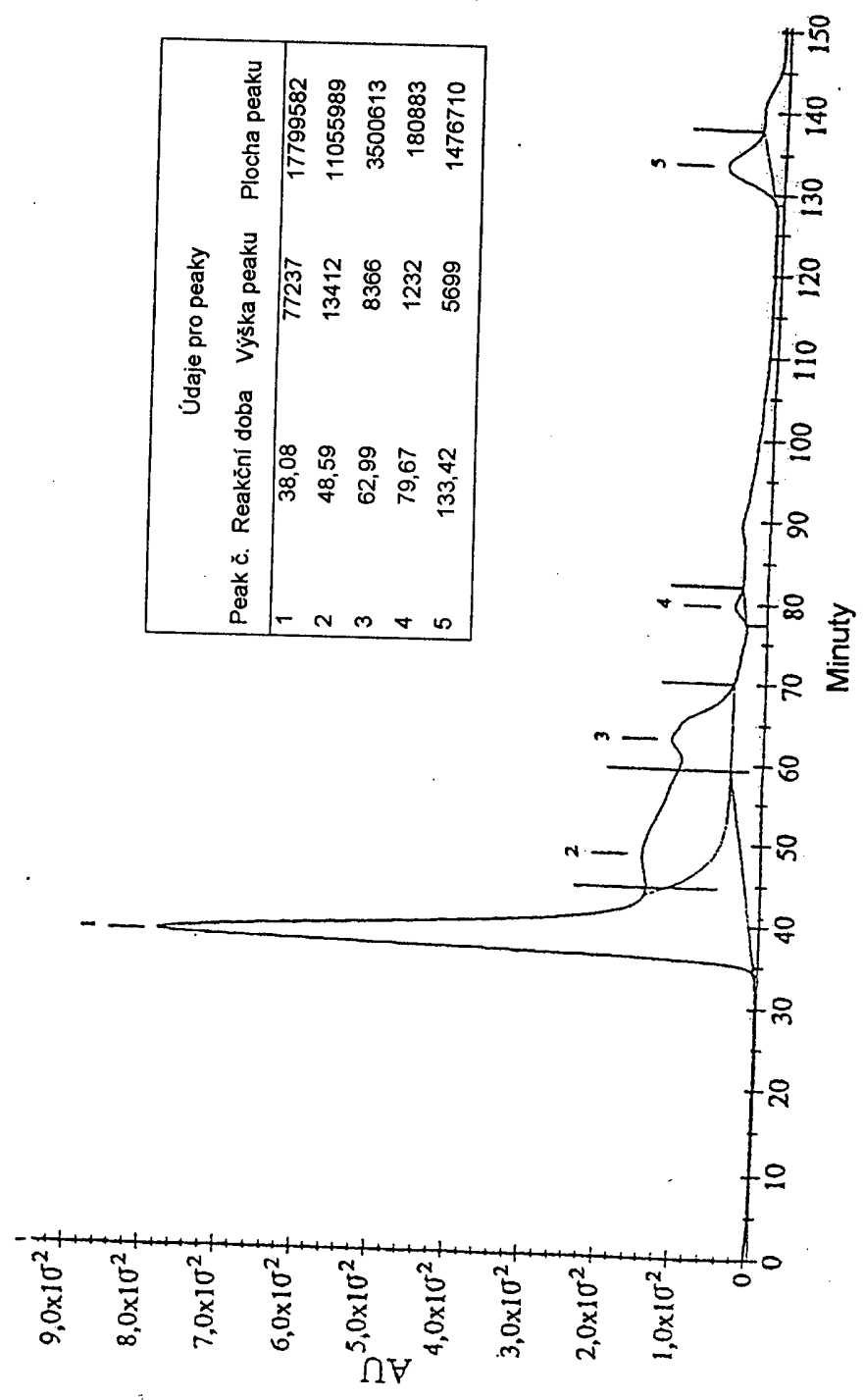
Obr. 2 : GPC chromatogram slučování IV: ox-HES 130 kD s HSA

3/12



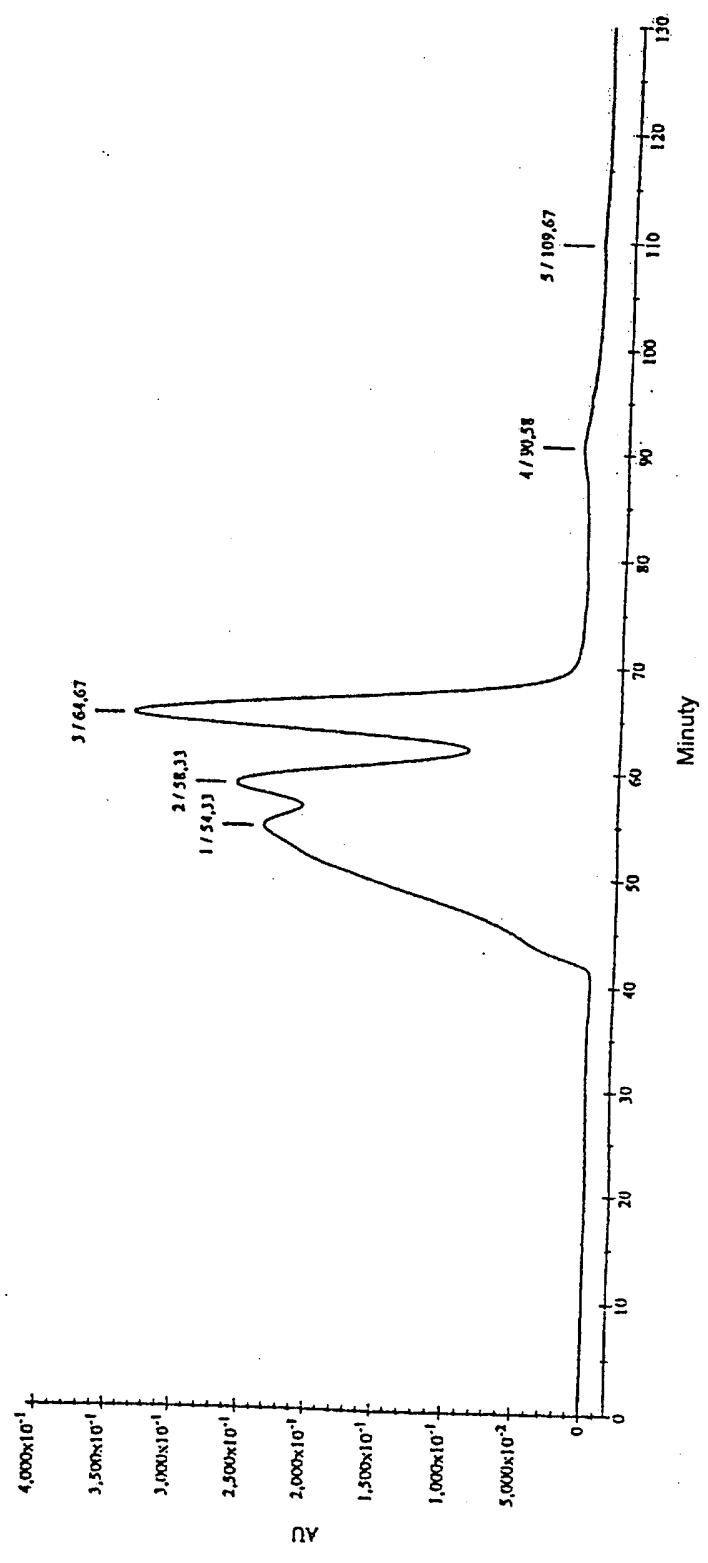
Obr. 3 : GPC chromatogram slučování V: ox-HES 130 kD s HSA  
(reakční doba 2 h)

4/12



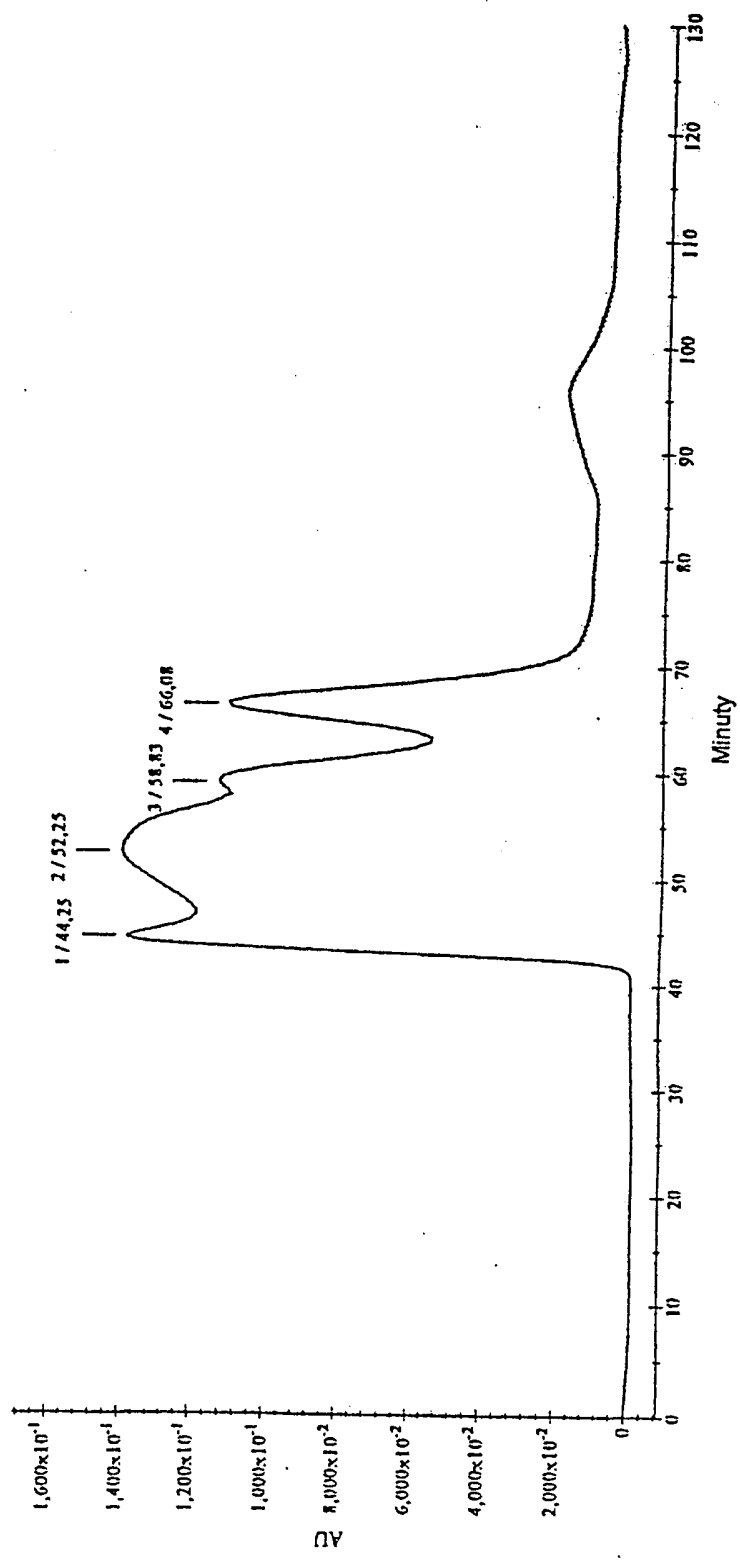
Obr. 4 : GPC chromatogram slučování V: ox-HES 130 kD s HSA  
(po úplném zreagování)

5/12

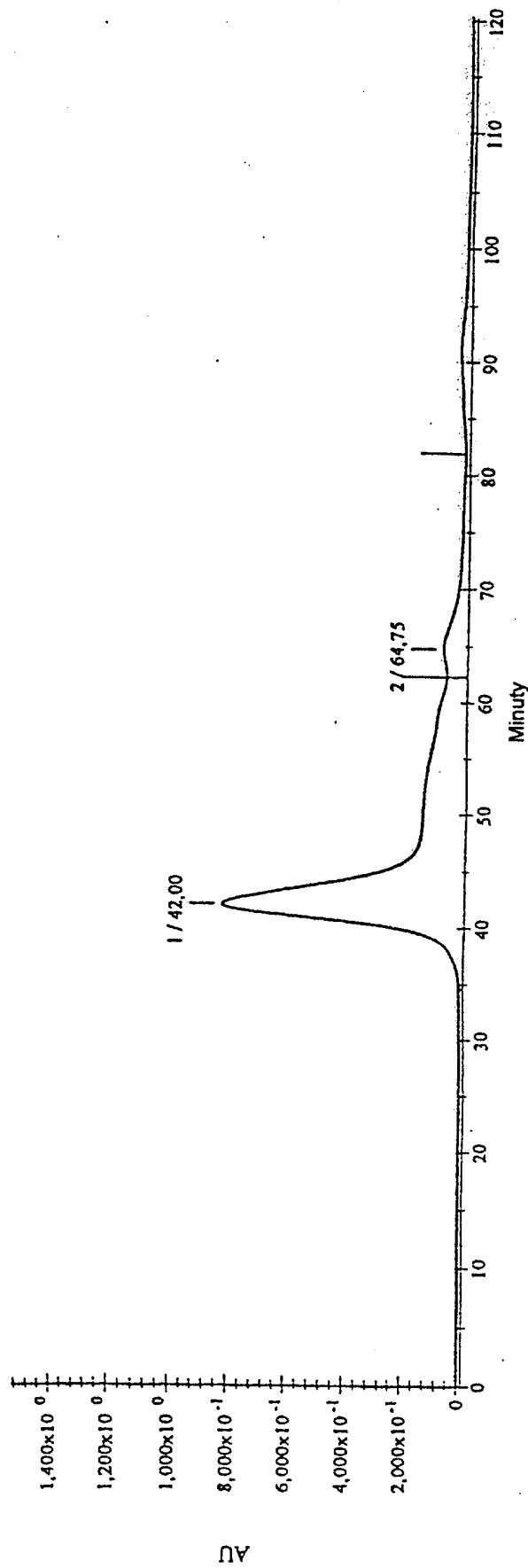


Obr. 5a : GPC analýza reakční kinetiky slučování V:  
ox-HES 10 kD s HSA po 2 h

6/12



Obr. 5b : GPC analýza reakční kinetiky slučování V:  
ox-HES 10 kD s HSA po 16 h



Obr. 6 : GPC analýza reakční směsi VII. slučování po 24 h inkubace:  
ox-HES 130 kD s HSA

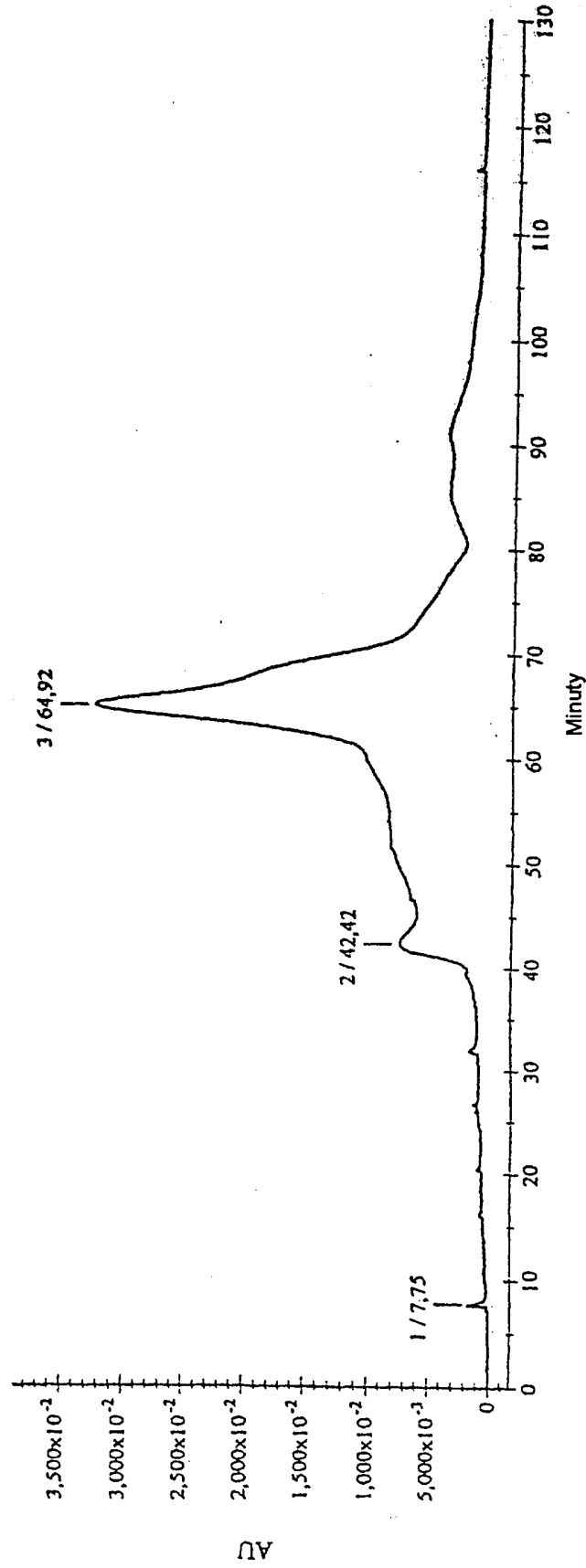
7/12

08.09.03

2003-2430

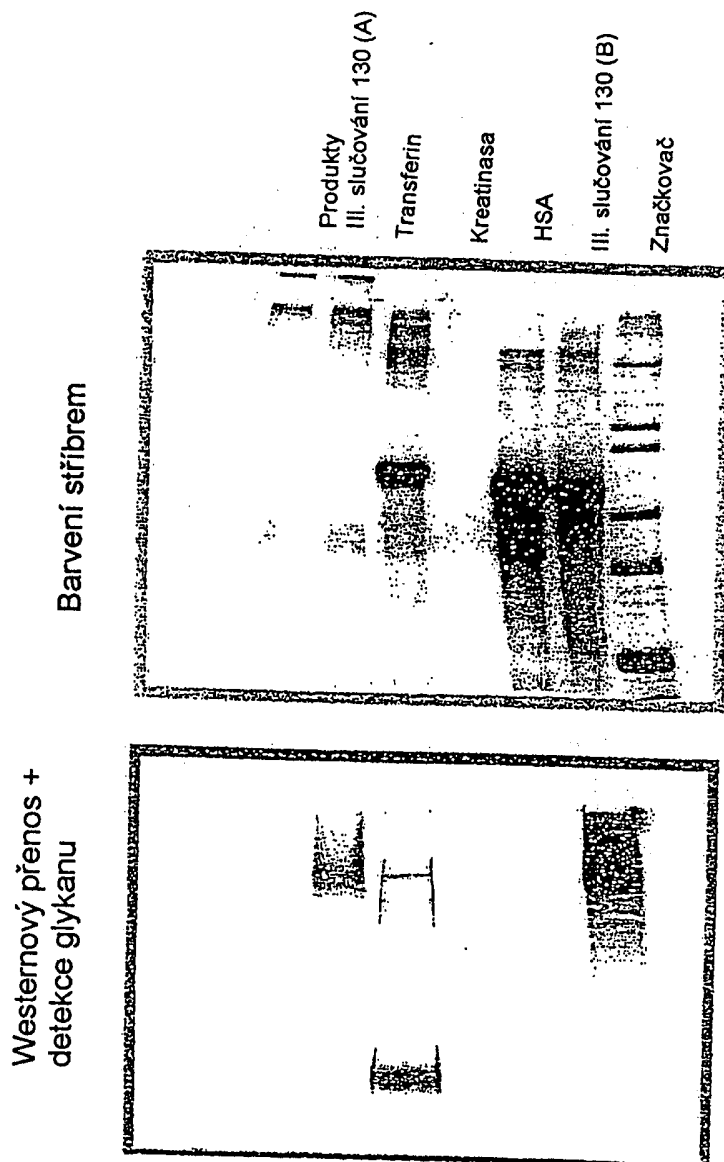
08.09.03

8/12



Obr. 7 : GPC chromatogram V. slučování ox-HES 130 kD s HSA a redukcce borohydridem

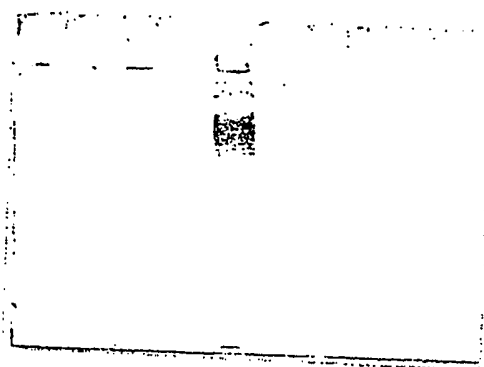
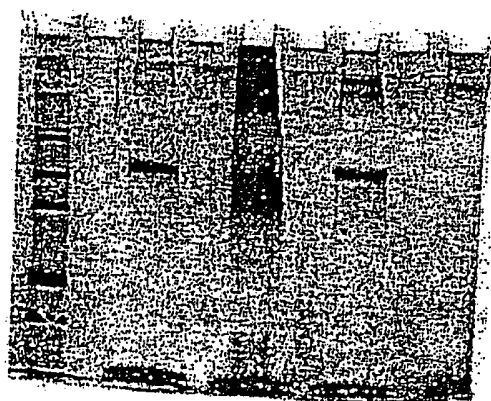
9/12



**Obr. 8:** Horní snímek:  
SDS-PAGE slučovací reakce III (postup A a B) mezi HSA a ox-  
HES 130 kD, respektive HES 130 kD při vybarvení stříbrem (pás 1, slučování  
III, postup A); pás 2: transferin; pás 3: kreatinasa; pás 4: nemodifikovaný HSA;  
pás 5: slučování III (postup B); pás 6: značkovač.  
Dolní snímek:  
westernový přenos s důkazem glykanů těchto vzorků, při čemž  
transferin (pás 2) funguje jako pozitivní kontrola a kreatinasa (pás 3), jakož i  
HSA (pás 4) funguje jako negativní kontrola.

08.09.03

10/12



Obr. 9:

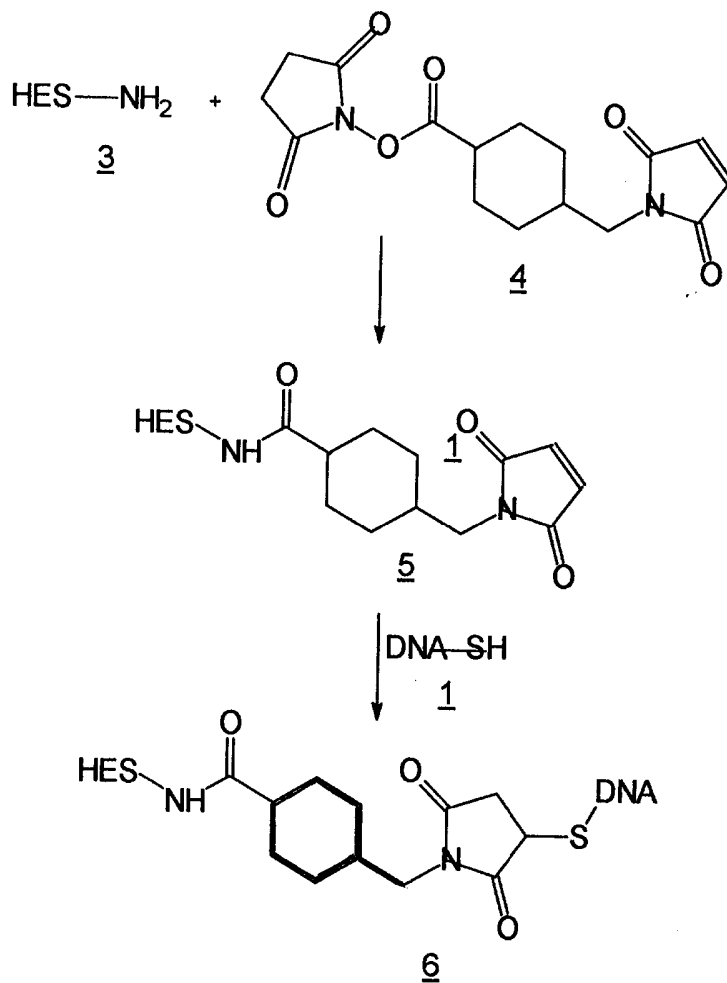
SDS-PAGE, barveno stříbrem, 12 % PAA (nahore) a westernový přenos / glykan (dole) reakční směsi z V. slučování ox-HES 10 kD s HSA

11/12

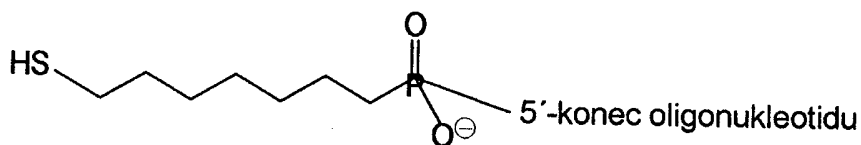
08.09.03

2003-2430

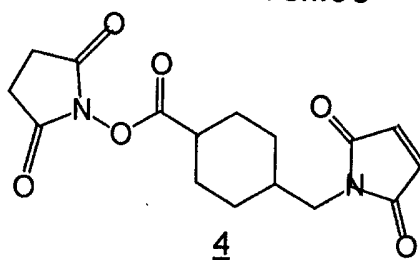
### Schematické znázornění slučovací reakce mezi amin-HES, SMCC a thio-DNA



Struktura thiomodifikace DNA



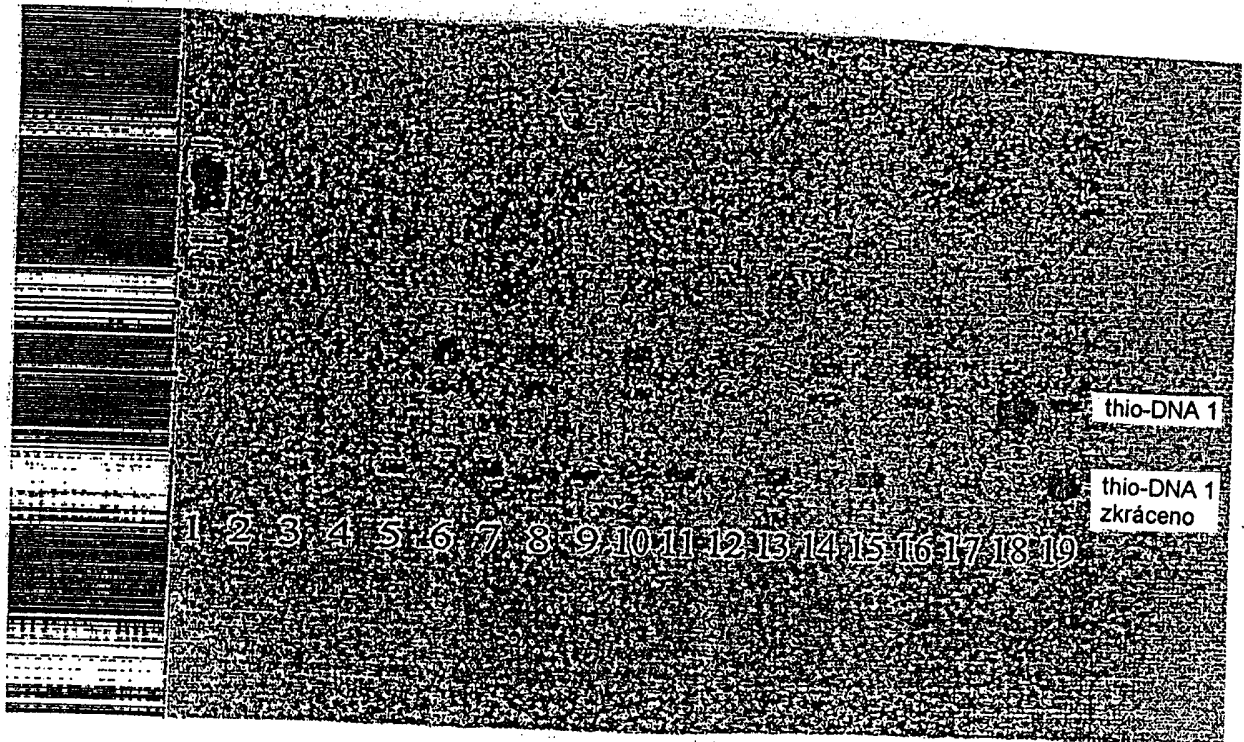
Struktura SMCC



Obr. 10

08.09.03

12/12



Obr. 11