

(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám

199783 B

(22) Bejelentés napja: 1989. 01. 26. (21) (339/89)

Bejelentés elsőbbsége: (33) 1988. 01. 27.
(32) US
(31) 07/148 822

(41) (42) Közzététel napja: 1989. 07. 28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990. 03. 28.

(51)

NSZO₅
CO7K 15/00
CO7D 519/04
A61K 39/395
A61K 31/395

(72) (71) Feltaláló(k):
STARLING, James Jacob Carmel
LAGUZZA, Bennett Coleman
Indianapolis, Indiana, US

(73) (72) (71) Szabadalmaz:
Eli Lilly and Co.,
Indianapolis, Indiana, US

(74) Képviselő:
Budapesti Nemzetközi Ügyvédi Munkaközösség Budapest

(54) ELJÁRÁS VINBLASZTIN-ANTITEST KONJUGÁTUMOK ÉS EZEKET TARTALMAZÓ GYÓGYÁSZATI KÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

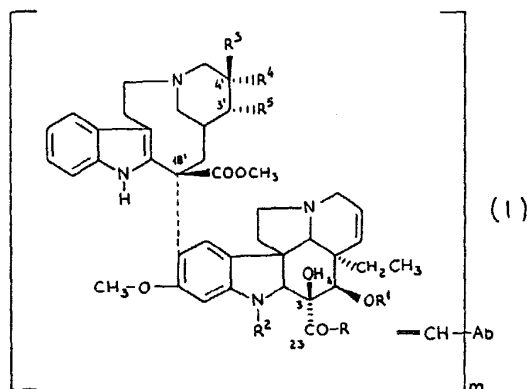
(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás a rákellenes hatású, új
(I) általános képletű konjugátum előállítására. A kép-
letben

R² jelentése metilcsoport,
R⁵ jelentése hidrogénatom,
R⁴ jelentése etilcsoport,
R³ jelentése hidroxilcsoport,
R jelentése -NHN= csoport,
R¹ jelentése hidrogénatom,
m egész szám 5-től 35-ig,

Ab valamely IgG osztályba tartozó antitest, amely
6-18% közti mennyiségben tartalmaz szénhidrátot.

A leírás terjedelme: 8 oldal, 3 ábra



HU 199783 B

A jelen találmány tárgya: eljárás vinblasztin (VLB) és antitestek új konjugátumai előállítására.

Az immunológusok és vegyészek az utóbbi időkben közös munkákat végeznek, hogy valamely immunglobulinból, amely egy meghatározott antigént céloz meg, és egy gyógyszerből, vagy más, aktív szerből összeállított konjugátumot fejlesszenek ki, amely gyógyszert vagy aktív szert az immunglobulin viszi el a kívánt helyre. Az irodalomban több ilyen konjugátumot írtak le. Így például a 2137202 és 2137210 számú brit szabadalmi bejelentések vinka alkaloidok, amelyek rákellenes szerek, konjugátumait írják le immunglobulinokkal, amelyek tumor antigéneket céloznak meg.

A tudományos erőfeszítések ellenére, amelyeket az ilyen konjugátumokra szántak, e területeken még korai fejlődési stádiumban vannak. A problémák közül, amelyet még nem értünk jól, nem megoldott az aktív szer nagy mennyiségének terhelése az immunglobulinra úgy, hogy ez ne hasson károsan az antigénhez való kötődési képességére. Ennek a problémának az egyik megoldását nyújtja a jelen találmány, amely lehetővé teszi olyan konjugátumok szintézisét, amelyben a hatóanyag aránya az immunglobulinhoz viszonyítva magas.

A jelen találmány olyan (I) általános képletű konjugátumokkal foglalkozik, ahol

- R² jelentése metilcsoport,
- R⁵ jelentése hidrogénatom,
- R⁴ jelentése etilcsoport, és
- R³ jelentése hidroxilcsoport;
- R jelentése -NH= csoport,
- R¹ jelentése hidrogénatom,
- m egész szám 5-től 35-ig,

Ab valamely IgG osztályba tartozó ismert antitest, amely 6–18% közötti mennyiségben tartalmaz szénhidrátot.

A találmány eljárás az (I) általános képletű konjugátumok előállítására, melynek során egy IgG osztályú, 6 és 18% közötti szénhidrát-tartalmú oxidált antitestet a (II) általános képletű vinka hidraziddal reagáltatunk, ahol a képletben

- R⁷ jelentése hidrazinocsoport,
- R⁸ jelentése hidrogénatom, és
- a többi szubsztituens a fent megadott.

Az (I) általános képletű konjugátumok rákellenes szerekként alkalmazhatók, és injektálható gyógyászati készítményeket állíthatunk elő belőlük, amelyek az (I) általános képletű konjugátumokat tartalmazzák valamely gyógyászatilag elfogadható hígítóval társulva.

A találmány szerinti eljárásban a (II) általános képletű kiindulási anyag, ahol R², R³, R⁴, R⁵, R⁷ és R⁸ a fenti, a 4-dezacetil-VLB-3-karboxi- hidrazid, a 3,097,137 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismerteti.

A jelen találmány konjugátumainak képzésére alkalmas (II) általános képletű hidrazidot például a 4,203,898 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás eljárása szerint (12. oszlop, 65. sortól és 3. példa, 18. oszlop) készítjük el. Ebben az eljárásban vízmentes hidrazint reagáltatunk a (III) általános képlet szerinti vinka alkaloiddal etanolban, lezárt csőben mintegy 60 °C hőmérsékleten. Ennek a reakciónak a terméke 4- dezacetil-3-karboxi-hidrazid, mivel az

acetoxicsoport a C-4-nél bázikus reakciókörülmények között hidrolizál. A jelen konjugátumok másik komponense az IgG osztály valamely oxidált antitestje, előnyösen valamely oxidált monoklonális antitest (Mo-Ab), amely antitest 6–18% szénhidrátot tartalmaz. Így a jelen találmányban alkalmazott antitest egészen szokatlan, mivel a tipikus IgG immunglobulinok csak 2–5% szénhidrátot tartalmaznak. [A szakértők különböző számokat becsülnek az IgG szénhidráttartalmára. Így pl. Goding 2–3 %-ról számol be a Monoclonal Antibodies: Principles and Practice című könyvében (Academic Press, 1983, 9. oldal), míg Ghose és munkatársai 3 %-ról beszélnek a J. Immunol. Methods 59, 130 (1983) irodalmi helyen].

Az „antitest” fogalmát ebben a bejelentésben úgy alkalmazzuk, hogy magában foglalja a fentebb leírt osztály antitestjeinek Fab, Fab' és F(ab')₂ fragmentumait is.

Az antitest lehet olyan antitest, ahol a szénhidrát szokatlan mennyisége a könnyű láncokban helyezkedik el. A nehéz láncok is tartalmazhatnak azonban szokatlan mennyiségű szénhidrátot, vagy teljes egészében az antitest Fab része tartalmazhatja a szénhidrát szokatlan mennyiségét. Másrészt a szénhidrát szokatlan mennyiségét tartalmazhatja, vagy részben tartalmazhatja az antitest F_c része.

Miközben a jelen találmányban alkalmazott antitestek 6–18% szénhidrátot tartalmaznak, az antitestek előnyös osztályai különböző más tartományokon belül tartalmazznak szénhidrátot, az alábbiak szerint:

- 1.) 6–15 %
- 2.) 6–12 %
- 3.) 8–15 %
- 4.) 8–12 %
- 5.) 6–10 %
- 6.) 10–15 %

Az antitestek előállításának technikai immunizált állatok szérumából, vagy monoklonális termékeket kiválasztó hibridómák tenyészetéből jól ismertek. A hibridómákat lehet genetikai manipulációs technikákkal módosítani is úgy, hogy meghatározott tulajdonságokkal bíró antitesteket termeljenek, mint pl. az itt alkalmazott antitesteket szokatlan szénhidráttartalommal. A tisztított antitesteket lehet kémiai úton is módosítani, hogy növeljük szénhidráttartalmukat. A jelen tartományban alkalmazott reprezentatív antitestek közt találunk pl. mono- és poliklonális antitesteket

- (i) emberi vagy állati tumorral társult antigének ellen;
- (ii) emberi B- és T-sejt antigének ellen;
- (iii) emberi Ia antigének ellen;
- (iv) vírus, gomba és baktérium antigének ellen;
- és
- (v) emberi gyulladáshoz vagy allergiás reakcióban érintett sejtek ellen.

Az emberi és állati tumorral társult antigének elleni előnyös antitestek közül megemlíthetjük:

- (i) karcino-embriónális antigénnel immunizált kecskéből vagy birkákból származó IgG;
- (ii) IgG nyúl akut limfoblasztos leukémia elleni szérumából;
- (iii) IgG különböző főemlősök akut limfoblasztos leukémia, akut mieloblasztos leukémia, krónikus limfoblasztos leukémia és krónikus granulocitás leukémia ellen keletkezett antiszérumából;

(iv) tüdőkarcinóma sejtekkel vagy sejtfrakciókkal immunizált kecskékből vagy birkákból származó IgG;

(v) humán végbélkarcinóma elleni antitesteket kiválasztó egér hibridómákból származó monoklonális IgG;

(vi) humán melanóma elleni antitesteket kiválasztó egér hibridómákból származó monoklonális IgG;

(vii) olyan egér hibridómákból származó monoklonális IgG, amely hibridóma humán leukémia sejtekkel reagáló antitesteket választ ki;

(viii) emberi neuroblasztóma sejtekkel reagáló antitesteket kiválasztó egér hibridómákból származó monoklonális IgG;

(ix) emberi mellrák antigénnel reagáló antitesteket kiválasztó egér hibridómákból származó monoklonális IgG;

(x) emberi petefészek sejtekkel reagáló antitesteket kiválasztó egér hibridómákból származó monoklonális IgG;

(xi) emberi csont-szarkóma sejtekkel, emberi hasnyálmirigy karcinóma sejtekkel, emberi prosztata karcinóma sejtekkel, stb. reagáló antitesteket kiválasztó egér hibridómákból származó monoklonális IgG;

(xii) adenokarcinómák (ideértve a tüdő-, vese-, mell-, és hasnyálmirigy karcinómákat) elleni antitesteket kiválasztó egér hibridómákból származó monoklonális IgG;

(xiii) emberi pikkelyes karcinóma sejtekkel reagáló antitesteket kiválasztó egér hibridómákból származó monoklonális IgG;

(xiv) emberi hibridómákból származó monoklonális IgG (ezek olyan hibridómák, amelyek emberi tumorról társult antigén elleni antitesteket választanak ki, beleértve a fentebb említett monoklonális antitesteket, de nemcsak azokra korlátozva).

Az előnyös konjugátumok azok, amelyeket monoklonális antitestekből állítunk elő, előnyösen azokból, amelyek emberi ráksejteket ismernek fel, ilyenek pl. az adenokarcinóma, pikkelyes sejt karcinóma, átmeneti sejt karcinóma, melanóma, neuroblasztóma, kissejtes karcinóma, leukémia, limfóma, és szarkóma.

Az antitestet a vinka hidraziddal való reakcióhoz úgy készítjük elő, hogy perjodáttal vagy más megfelelő oxidálószerrel oxidáljuk úgy, hogy a felületi szénhidrátokban levő vicinális diolok közti kötések felhasadnak, és ezáltal az eredeti kötés mindkét oldalán aldehidcsoportok alakulnak ki. A vegyészek jól tudják, hogy az aldehidcsoport, amikor oldatban van más működőképes reagensek jelenlétében, valójában lehet acetál, hemiacetál, aminál, hemiaminál, stb. formájában. Az aldehid képződés kialakulását az 1. folyamatábra vázolja fel.

Az oxidálódó szénhidrát egységek aránya és a termelt aldehid egységek száma az alábbi tényezők eredménye, amelyet ismernek azok, akik a szakterületen jártasak: az alkalmazott perjodát mennyisége, az oxidálás általános reakciókörülményei (pl. az idő, hőmérséklet, oldószer, koncentráció, stb.), az antitest jelen levő vicinális diol szénhidrát egységek száma, és hozzáférhetőségük az oxidáló reagens számára.

Egy másik módszer szerint, vagy a fenti perjodátos oxidációval kombinálva, lehet alkalmazni enzimes oxidálást is, például galaktóz oxidázzal. Ez szelektivebb és korlátozottabb reagens, amely a galaktóz

gyök 6-CH₂OH helyének átalakítását katalizálja a szénhidrát egységen aldehid funkciókká. Ennek a 6-CH₂OH csoportnak helyettesíthetetlennek kell lenni, hogy a sikeres oxidáció lehetségessé váljék, és egy blokkolt csoport, pl. olyan csoport, ahová szílsav gyök van kötve, gátlás-mentesítését a neuramidináz enzimmel lehet elvégezni. Akárcsak fentebb, az így létrejött aldehid-maradékok száma sokféle változó függvénye.

10 Az oxidált antitestet azután valamely (I) általános képletű vinka hidraziddal konjugáljuk nukleofil reakcióban, ahol a magányos elektronpár a hidrazid csoport terminális nitrogénjén megkeresi az oxidált antitest aldehid csoportját.

15 Általában minden mól antitest egy bizonyos számú mól vinka hidraziddal konjugálódik. A jelen találmány előnyeinek egyike a gyógyszernek az a nagy száma, amelyet az egyes antitest molekulákra rá lehet terhelni. A „konjugációs arány” kifejezést a vinka hidrazidok móljainak átlagos számára alkalmazzuk egy mól antitestre. A konjugációs arány a jelen találmányban általában 5 és 35 között van, és az 5 és 25 közötti tartományban levő konjugációs arányok az előnyösek.

20 További előnyös konjugációs arány tartományok a 10 és 20, a 15 és 25, és az 5 és 15 közöttiek.

25 A vinka hidrazidok konjugálását oxidált antitestekkel a szakterületen ismert standard módszerekkel végezhetjük el. Általában valamely (II) általános képletű vinka vízzel elegyedő oldószerezrel, pl. dimetil-formamiddal képzett oldatát az oxidált antitest lehűtött, puffertolt vizes oldatához adjuk. A vinkát lehet alkalmazni szulfát-sóként, amely esetben szerves oldószerezre nincs szükség. Előnyösek a 0-8 °C közti hőmérsékletek, és általában 0,1 n nátrium-acetát puffert alkalmazunk. A reakciót sötétben és inert atmoszférában a legjobb elvégezni. A reakció általában mintegy 10-24 óra alatt válik teljessé, és az így létrejött konjugátumot standard módszerekkel, pl. Sephadexen végzett kromatográfiával lehet tisztítani.

40 Az alábbi példákban alkalmazott MoAb (monoklonális antitest) a ZCE-025, IgG₁ alosztályú rágszáló antitest, amely karcinómaembriális antigénnel reagál. Ezt a Hybritech Incorporated fejlesztette ki [Abdel-Nahi és munkatársai: Radiology, 164, 617-21 (1987)]. Ezt az antitestet bizonyos ideje már tanulmányozzák Mach J. P. és munkatársai elsősorban rákdiagnosztikai szerként, 35. monoklonális antitest néven [lásd még: Delaloye és munkatársai: J. Clin. Invest. 77, 301-11 (1986); Haskell és munkatársai: Cancer Res. 43, 3857-64 (1983); Sutherland és munkatársai: Cancer Res. 47, 1627-33 (1987)].

50 A ZCE-025-ről úgy találták, hogy szokatlanul nagy a molekulatömege (28000), SDS-PAGE vizsgálattal (gélelektroforézis) végzett elemzéssel redukáló körülmények között. Ezt a vizsgálati módszert Laemmli írja le [Nature (London) 227, 680-85 (1970)]. A ZCE-025 kezelése endoglikozidáz F-fel [Elder és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 4540-44 (1982)] azt idézi elő, hogy a könnyű lánc nagy része az SDS-PAGE-on azonos területen vándorol, mint a kontroll, azt jelezve, hogy a könnyű lánc nagy molekulatömegét szénhidrát okozza.

1. példa

65 10 mg ZCE-025-öt feloldunk 1 ml 0,1 mól/literes

nátrium-acetát pufferban (pH 5,6) (29,3 g nátrium-acetát, 2,44 ml ecetsav, és annyi sterilizett víz, hogy 4 liter puffer keletkezzék.). Az így készített oldathoz 0–2 °C hőmérsékleten 2,1 mg nátrium-perjodátot adunk élénk keverés mellett.

A keveréket 10 percen át keverjük 0–2 °C hőmérsékleten sötétben, majd a reakciót leállítjuk etilén-glikol 12,5 mól/literes steril vizes oldata 0,004 ml-ének hozzáadásával. Az új keveréket 0–2 °C hőmérsékleten 5 percen át keverjük sötétben, majd centrifugáljuk, hogy tiszta felülúszót és fehér üledéket kapjunk. A felülúszót Sephadex G25 gél oszlopra (közepes szemcseméret) terheljük, és a terméket azonos nátrium-acetát pufferrel eluáljuk. Az eluátumot UV fénnel (280 nm) követjük. Az oxidált termék koncentrációját minden eluátum frakcióban felbecsüljük 280 nm-en.

Az oxidált termék fenti eluátum oldatának végső fehérje koncentrációja 2,5 mg/ml és teljes térfogata 3,1 ml. Az oldatot mintegy 4 °C hőmérsékletre lehűtjük.

4-dezacetil VLB 3-karboxi-hidrazid-szulfát 13,4 mg-os adagját hozzáadjuk a lehűtött, pufferolt MoAb oldathoz. A reakcióedényt nitrogéngázzal átöblítjük, majd lezárjuk. A reakciókeveréket hidegben és sötétben keverjük 16 órán át. A reakcióedényt ezután kinyitjuk, és a tiszta, halványsárga reakciókeveréket kromatografáljuk Sephadex G25 gélen, amelyet előzőleg foszfáttal pufferolt fizio-lógiás sóoldattal egyensúlyoztunk ki (pH 7,4; 0,01 mól/l foszfát, 0,15 mól/l NaCl); ugyanilyen oldatot használunk eluáló szerként is. A konjugátum elsőnek eluálódik, ezt követi az el nem reagált 4-dezacetil VLB 3-karboxi-hidrazid. A kapott konjugátum kitermelése 5,7 mg, 4,8 ml-ben. A konjugációs arány mintegy 5,2 mól 4-dezacetil-VLB-3-karboxi-hidrazid egy mól ZCE-025-re (a továbbiakban: MoAb) számítva, amint ezt kettős hullámhosszú UV spektroszkópiás méréssel (280 és 270 nm-nél) meghatározzuk.

2. példa

10 mg mintát ugyanabból a MoAb-ból 1 ml acetát pufferben oxidálunk 21 percen át 0 °C hőmérsékleten 34 mg nátrium-perjodáttal. A reakciót azután leállítjuk 0,064 ml 12,5 mól/literes etilén-glikollal, és a terméket ugyanúgy tisztítjuk, mint az 1. példában; így 9,7 mg oxidált MoAb-ot kapunk 4 ml oldatban. Ehhez az oldathoz 0 °C hőmérsékleten hozzáadjuk 17 mg 4-dezacetil-VLB-3-karboxi-hidrazid-szulfátot, és a keveréket 4 °C hőmérsékleten sötétben állni hagyjuk 16 órán át. A reakciókeveréket azután 20 percen át centrifugáljuk, és a felülúszót feldolgozzuk olyan módon, ahogyan az 1. példában leírtuk; így 0,6 mg terméket kapunk, amelynek konjugációs aránya 27,2.

3. példa

Az 1. példa eljárásához hasonló eljárást végzünk. A nátrium-metaperjodát mennyisége 2,1 mg, és az oxidáció 21 percig tart. Oxidált MoAb-ból 8,8 mg-os kitermelést kapunk, és ezt reagáltatjuk 19 mg 4-dezacetil-VLB-3-karboxi-hidraziddal, és úgy dolgozzuk fel, ahogyan ezt a 2. példában leírtuk. Ilyen módon 6,9 mg konjugátumot kapunk 8,6 konjugációs aránnyal.

4. példa

A 3. példa eljárását ismételjük meg, azzal a kivétellel, hogy a nátrium-perjodát mennyisége 8,6 mg és az etilén-glikol mennyisége 0,016 ml. Az oxidált MoAb kitermelése 8,6 mg, amelyet 18 mg 4-dezacetil-VLB-3-karboxi-hidraziddal reagáltatunk. 5 mg kívánt konjugátumot kapunk, amelynek konjugációs aránya 13,8.

5. példa

A 3. példa eljárását ismételjük meg újból, azzal a kivétellel, hogy a nátrium-perjodát mennyisége 8,6 mg és az etilén-glikol mennyisége 0,016 ml, és az oxidációs idő 10 perc. Az oxidált MoAb-ból 8,1 mg kitermelést kapunk. Ennek reagáltatása 19 mg 4-dezacetil-VLB-3-hidroxi-hidraziddal 6,5 mg konjugátumot termel, amelynek konjugációs aránya 10,3.

A fenti példákban készített konjugátumoknál radioimmunassay-val és immunfluoreszcenciával határozzuk meg, hogy legalább olyan jól kötődnek az antigén-pozitív LS174T humán végbél adenokarcinóma sejtekhez, mint a nem konjugált ZCE-025 sejtek.

Az immunfluoreszcenciával végzett elemzés megmutatja, hogy a konjugátumok nem kötődnek az antigén-negatív M14 humán melanóma sejtekhez.

6. példa

ZCE-025 antitest 374 mg-os adagját dializáljuk 28,8 ml nátrium-acetát pufferrel (pH 5,6) szemben, majd ezt 0,53 ml vizes nátrium-perjodát oldattal (150 mg/ml) egyesítjük. A keveréket 10 percen át sötétben keverjük, majd a reakciót leállítjuk etilén-glikol hozzáadásával. A reakciókeveréket azután centrifugáljuk, és a felülúszót kromatografáljuk Sephadex G25-ön, és nátrium-acetát pufferrel eluálunk. Az antitest-tartalmú frakciókat egyesítjük, és UV spektroszkópiával elemezzük 280 nm-nél, amely azt mutatja, hogy 355 mg oxidált antitestet nyertünk ki. Ezt 2,8 mg/ml koncentrációra hígítjuk nátrium-acetát pufferban, és ehhez hozzáadjuk 554 mg 4-dezacetil-VLB-3-karboxi-hidrazidot. A reakciókeveréket egy éjszakán át állni hagyjuk 4 °C hőmérsékleten, és a keveréket Sephadex G25-ön végzett kromatográfiával tisztítjuk úgy, hogy pufferolt fizio-lógiás sóoldattal (pH 7,4) eluálunk. A terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük, és 0,2 µ-os membránon átszűrjük. Összesen 304 mg konjugátumot kapunk, 13,5 mg/ml koncentrációban, a VLB 5,0 mól konjugációs arányával egy mól antitesthez viszonyítva.

7. példa

Lényegében a 6. példát ismételjük meg azzal a módosítással, hogy nagyobb konjugációs arányú terméket állítunk elő. A nátrium-perjodát oldat mennyisége 6,4 ml 150 mg/ml koncentrációnál, és az oxidációs reakciót 21 percig hagyjuk végbemenni. Ugyanolyan mennyiségű 4-dezacetil-VLB-3-karboxi-hidrazidot alkalmazunk, és a termék 187 mg konjugátumot tesz ki 8,9 mg/ml koncentrációnál 9,7 mól VLB/mól fehérje konjugációs aránnyal.

A 6. és 7. példa konjugátumait nöstény Charles River meztelen egereken növekvő LS174T tumor xenograftjai ellen vizsgáljuk. Az LS174T emberi végbél tumor, amely karcinóembrionális antigént termel. A vizsgálat úgy kezdődik, hogy az egerekbe szubkután

10⁷ tumorsejtet ültetünk be. A beültetés utáni 7., 10., 14., és 17. napokon egyes egerekbe olyan adag konjugátumot injektálunk, hogy a vinka gyógyszerből 3 mg/kg-ot szolgáltatassunk. A beültetéssel indukált tumorok méretét különböző időpontokban mérjük, egészen a beültetés utáni 42. napig. Az egyes kezelt csoportok 5 egerből állnak, kivéve a kezeletlen kontroll csoportot, amely 10 egerből áll. Egy olyan csoport is szerepel a vizsgálatban, amely nem konjugált 4-dezacetil-VLB-3-karboxi- hidrazidot kap.

42 nap után a kontroll egereknek nagyon nagy tumorja van, átlagosan 23,5 g tömegű. Az összes egér, amely a 6. példa konjugátumát kapja, elpusztul. Egy állat pusztul el azok közül, amelyek a 7. példa konjugátumát kapták, a többi négy átlagos tumormérete 4,5 g. A nem konjugált gyógyszert kapott egerekből három pusztul el, a további kettő átlagos tumor-mérete 4,5 g.

Egy másik vizsgálatban, amelyet azonos módon hajtunk végre, a tumor sokkal lassabban nő. A beültetés után 34 nappal a kontroll egerek tumorja 3,7 g átlagos méretű. Az összes olyan egér, amely nem konjugált gyógyszert kapott, elpusztul. Azoknak az egereknek, amelyek a 6. és 7. példák konjugátumait kapták, átlagosan csak 0,1 g tömegű tumorjuk van, ám a 6. példa konjugátumát kapott egerek közül négy elpusztul, viszont a 7. példa konjugátumát kapott egerek közül egyik sem pusztul el.

Hasonló vizsgálatban a konjugátumokat olyan arányban adjuk be, hogy csak 2 mg/kg vinka gyógyszert adunk. Itt a kontroll egerek tumorjainak átlagos mérete 23,5 g, akárcsak az első vizsgálatban. A szabad vinka gyógyszert vagy a 7. példa konjugátumát kapott egerek egyike sem pusztul el a 42. napi mérési pontig; a 6. példa konjugátumát kapott egerek közül is csak egy pusztul el. A szabad vinka gyógyszert kapott állatok tumorjainak átlagos mérete 8 g a 42. napon, a 6. és 7. példa konjugátumait kapott állatok tumorjainak átlagos mérete egyaránt 5 g.

Úgy találjuk, hogy a jelen találmány konjugátumai teljesen biztonságosak, és egyáltalán nem várt módon, azok a konjugátumok, amelyeknek a konjugációs aránya magas, még biztonságosabbak, mint azok, amelyeknek vinka gyógyszer tartalmuk kisebb. Következésképpen ezek a konjugátumok nyújtják a legelőnyösebb utat a neoplazma-ellenes vinka gyógyszerek viszonylag nagy adagjának bevezetéséhez, meglepően nagy biztonsággal a beteg szempontjából.

A jelen találmány szerinti új konjugátumok használhatók a rák kezelésében és mint ilyeneket, előnyösen injekcióhoz alkalmas kiszerezések formájában állítjuk elő. Így a jelen találmány magában foglal egy gyógyászati kiszerezést is, pl. egy olyan injek-

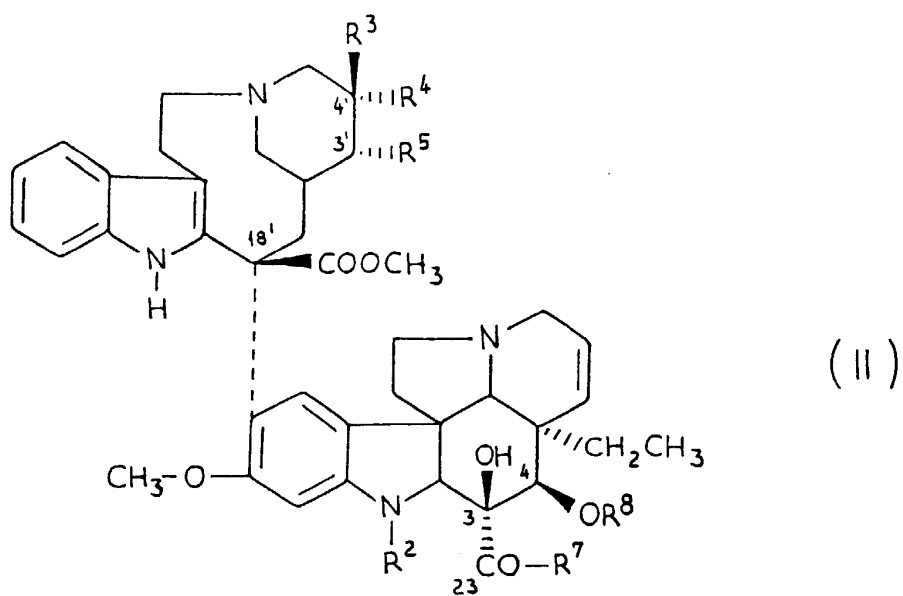
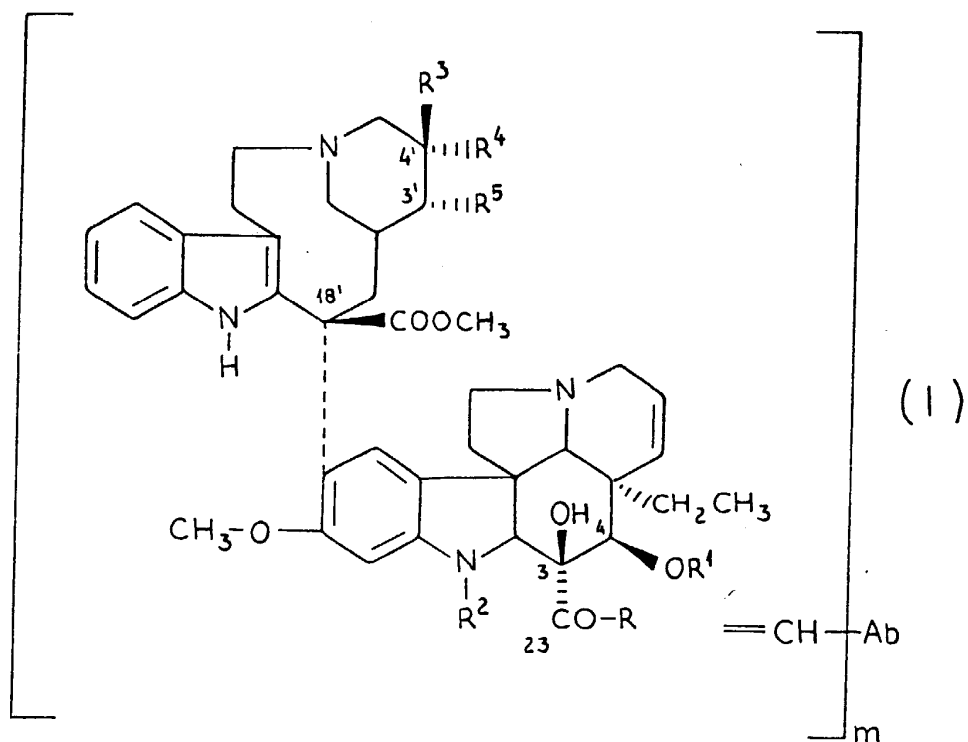
tálható készítmény előállítását, amely a jelen találmány szerinti konjugátumot egy gyógyászati el-fogadható hordozóval, vagy hígítóval együtt tartalmazza, az ilyen segédanyagok a szakterületen jól ismertek. A kiszerezés egységnyi adagok formájában előnyös, ahol egy-egy adag pl. 0,01–10 mg aktív alkotórészt tartalmaz (az aktív alkotórészen a vinka gyógyszer részt értve).

Az új konjugátumok széles adagolási tartományon belül, és heti összdózison belül hatékonyak, így pl. rákban szenvedő felnőtt ember kezeléséhez ez a tartomány 0,01–10 mg/kg tartományban van (a vinka gyógyszer részre számítva), általában inkább a 0,03–9 mg/kg tartományban. Meg lehet érteni azonban, hogy a ténylegesen beadott konjugátum mennyiségét csak az orvos határozhatja meg az adott körülmények figyelembevételével, ide értve a kezelendő beteg állapotát és a beadás kiválasztott útját.

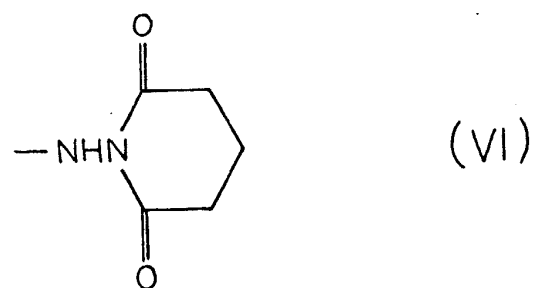
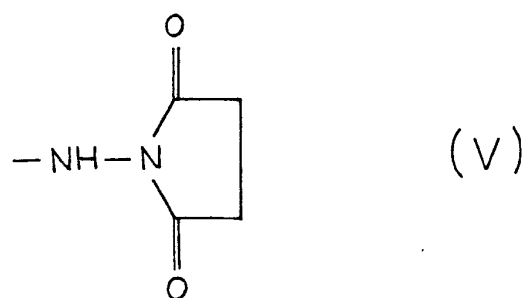
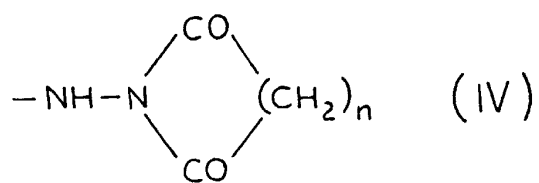
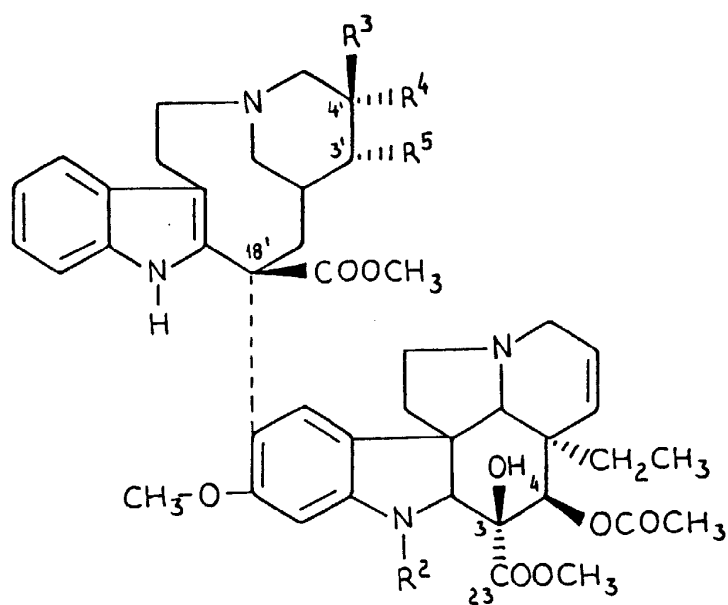
20 SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás (I) általános képletű konjugátum előállítására, ahol
 R^2 jelentése metilcsoport,
 R^5 jelentése hidrogénatom,
 R^4 jelentése etilcsoport,
 R^3 jelentése hidroxilcsoport,
 R jelentése -NHN= csoport,
 R^1 jelentése hidrogénatom,
m egész szám 5-től 35-ig.
- 30 Ab valamely IgG osztályba tartozó ismert antitest, amely 6–18 % közti mennyiségben tartalmaz szénhidrátot,
azzal jellemezve, hogy egy IgG osztályba tartozó, peroxidálattal vagy enzimatikusan oxidált antitestet,
- 35 amely 6–18 % szénhidrátot tartalmaz, egy (II) általános képletű vinka hidraziddal reagáltatunk, ahol
 R^7 jelentése hidrazinocsoport,
 R^8 jelentése hidrogénatom, és
 R^2 , R^3 , R^4 és R^5 a fenti.
- 40 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a reakciót hűtött vizes, pufferolt oldatban végezzük 0 °C – 8 °C közti hőmérsékleten.
- 45 3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy IgG antitestként monoklonális antitestet alkalmazunk.
- 50 4. Eljárás injektálható gyógyászati készítmények előállítására, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított (I) általános képletű konjugátumot – a képletben R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , m és Ab az 1. igénypontban megadott – egy vagy több, gyógyászati el-fogadható hordozóval vagy hígítóval összekeverünk, és injektálható gyógyászati készítménnyé alakítunk.

3/1

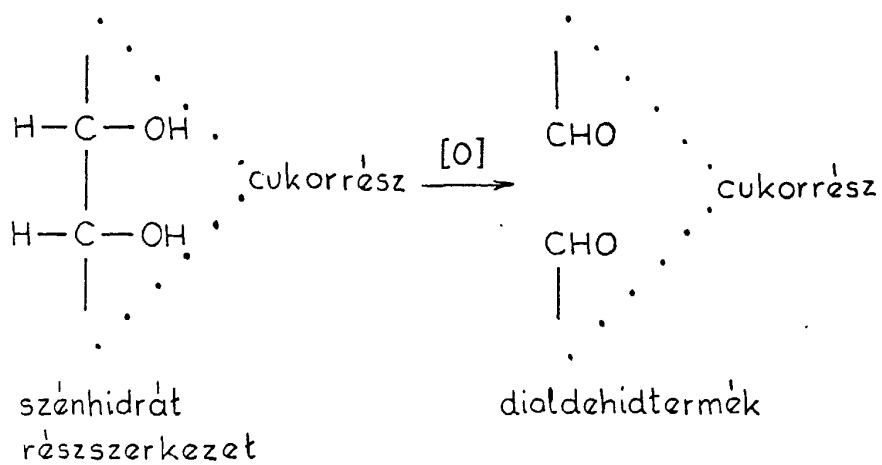


3/2



1. folyamatábra

3/3



Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest
 A kiadásért felel: Dr. Szvoboda Gabriella osztályvezető
 SZÜV LASER GYŐR
 Felelős vezető: a Számítóközpont igazgatója