(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

221 606 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 01975
(22) A bejelentés napja: 1994. 03. 30.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
9307491.2 1993. 04. 08. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 94/01006
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/24304

(40) A közzététel napja: 1996. 05. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2002. 11. 28.

(51) Int. Cl.[7]

C 12 P 21/08
A 61 K 47/48
G 01 N 33/577
A 61 K 39/385
C 12 N 5/16

(72) Feltalálók:
Quesniaux, Valérie, Allschwil (CH)
Sedrani, Richard, Bázel (CH)

(73) Szabadalmas:
NOVARTIS AG, Bázel (CH)

(74) Képviselő:
S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) Rapamicin (származékok) felismerésére képes monoklonális antitestek, ilyen antitesteket magukban foglaló immunvizsgáló készletek, ilyen antitesteket termelő hibridóma sejtvonalak és rapamicin-, valamint fehérje-molekularészből álló konjugátumok

KIVONAT

A találmány rapamicin és rapamicinszármazékok monoklonális antitestjeire vonatkozik, amelyeket fel lehet használni például a vér hatóanyag-koncentrációjának az ellenőrzésére alkalmas vizsgálókészletek előállításához. A találmány tárgyát képezik maguk a kifejezetten a rapamicin vagy a rapamicinszármazékok felismerésére képes monoklonális antitestek, az egy rapamicin- és egy fehérje-molekularészből összetevődő immunizáló konjugátumok, az említett monoklonális antitestek létrehozására képes hibridóma sejtvonalak, valamint a létrehozott monoklonális antitesteket magukban foglaló immunvizsgáló készletek.

A találmány szerinti monoklonális antitesteket úgy állítják elő, hogy

a) immunizáló konjugátumot készítenek olyan módon, hogy aktivált kapcsolócsoporttal rendelkező rapamicint vagy rapamicinszármazékot immunizáló fehérjével reagáltatnak;

b) az a) pont szerint előállított immunizáló konjugátumot bejuttatják egy megfelelő állatfajhoz tartozó egyed szervezetébe immunizáló hatás kiváltása céljából, majd kinyerik az adott konjugátumra érzékenyített, antitesteket termelő sejteket;

c) az adott, antitesteket termelő sejteket immortalizálják; és

d) az egyik így előállított, kiválasztott immortalizált sejtvonalból kinyerik az antitesteket.

HU 221 606 B1

A találmány rapamicin és rapamicinszármazékok monoklonális antitestjeire vonatkozik, amelyeket fel lehet használni például a hatóanyag vérkoncentrációjának ellenőrzésére alkalmas vizsgálókészletek előállításához. A találmány tárgyát képezik maguk a kifejezetten a rapamicin felismerésére képes monoklonális antitestek, az egy rapamicinrészből és egy fehérjerészből álló immunizáló konjugátumok, az említett monoklonális antitestek létrehozására képes hibridóma sejtvonalak és a létrehozott monoklonális antitesteket magukban foglaló immunvizsgáló készletek.

A rapamicin egy, a Streptomyces hygroscopicus által előállított makrolid antibiotikum, amelynek már számos farmakológiai alkalmazása ismeretes. A rapamicint mindenekelőtt az immunreakciók gátlására használják, például az átültetett szervek szervezetből való kilökődésének megakadályozására, valamint az autoimmun betegségek megelőzésére és gyógykezelésére. Ezzel kapcsolatban azonban meg kell említeni, hogy a nagyobb dózisokban alkalmazott rapamicinnek mellékhatásai vannak, és bizonyos mértékig változik a rapamicin biológiai hasznosíthatósága is. Így nagyon jó lenne, ha a rapamicinnel kezelt betegek vérében figyelemmel lehetne kísérni a rapamicinkoncentráció alakulását, mert ebben az esetben volna arra lehetőség, hogy a rapamicinadagolást úgy szabályozzák, hogy fennmaradjon az elegendő mértékű farmakológiai hatás kifejtéséhez szükséges minimális rapamicinkoncentráció, de ugyanakkor ne kelljen túl nagy veszéllyel számolni a mellékhatások miatt. A rapamicin gyógyszerré való kifejlesztésének mindeddig az volt a nagy akadálya, hogy nem állt rendelkezésre olyan érzékeny és megbízható elemzés, amelyet klinikai körülmények között gyorsan és könnyen el lehetett volna végezni.

A rapamicinkoncentráció klinikai ellenőrzését lehetővé tevő vizsgálókészletek kifejlesztésére irányuló eddigi erőfeszítések nem voltak különösebben sikeresek. A 41 795 számú európai szabadalmi leírásban például egy olyan mikrobiológiai vizsgálatot ismertetnek, amellyel a rapamicinkoncentrációt a gombaellenes hatás függvényeként lehet mérni. A WO 92/02946. számú közzétett PCT-bejelentésben ismertetett vizsgálati módszer szerint a rapamicinkoncentrációt közvetetten mérik a makrofilinhez való versengő kötődés alapján. Mindkét vizsgálati módszer nehézkes és különösebben nem is érzékeny. Ráadásul ezeknél a vizsgálati módszereknél jelentős eredménybeli eltéréseket lehet tapasztalni már abban az esetben is, ha a vizsgálati körülmények kismértékben különböznek egymástól, ezért a különböző kórházakból származó vizsgálati eredmények összehasonlítása nehéz.

A szakirodalomban eddig nem számoltak be olyan monoklonális antitestekről, amelyek felismerik a rapamicint. A rapamicin tulajdonságai miatt nehéz előállítani ezeket az antitesteket, mert a rapamicin nem immunizál, hanem rendkívül erősen elnyomja az immunreakciókat. Fokozza a nehézségeket, hogy a szakirodalomban mindeddig nem azonosították a rapamicin anyagcseretermékeit, így nem könnyű felismerni azokat a monoklonális antitesteket, amelyek képesek különbséget tenni a rapamicin és annak anyagcseretermékei között.

A találmány olyan monoklonális antitestekre vonatkozik, amelyek nagymértékben érzékenyek rapamicinre. A találmány szerinti antitestek egy új immunizáló konjugátummal való beoltás hatására keletkeznek. Az oltóanyagként alkalmazott konjugátum új, immunizáló fehérjéhez kapcsolt rapamicinszármazékot tartalmaz. Az ezeket az antitesteket alkalmazó vizsgálókészletek jól felhasználhatók klinikai körülmények között, és összehasonlíthatatlanul pontosabb, valamint reprodukálhatóbb eredményeket szolgáltatnak, mint az eddig ismert megoldások. Az antitesteket fel lehet használni a rapamicin tisztítására és elválasztására is.

Hasonló nehézségeket kell legyőzni ahhoz, hogy vizsgálókészleteket dolgozzunk ki olyan rapamicinszármazékokhoz, amelyek gátolják az immunreakciókat. Ezek közül a származékok közül különleges jelentőségük van a 40-O-származékoknak, vagyis azoknak a vegyületeknek, amelyek rapamicinből a ciklohexilgyűrű hidroxilcsoportjának – vagyis a 40-es helyzetben levő hidroxilcsoportnak – O-helyettesítésével jönnek létre. Ilyen – O-aril- és O-alkil- – rapamicinszármazékokat ismertetnek az 5 258 389. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban és a WO 93/02604. számú PCT/EP szabadalmi bejelentésben. Ezeket a szabadalmi dokumentumokat a találmány leírását kiegészítő referenciaanyagnak tekintjük. Jelentőségüket tekintve ezek közül a rapamicinszármazékok közül is kiemelkednek a 40-O-alkilezett rapamicinszármazékok, amelyek 40-O-szubsztituense alkilcsoport vagy helyettesített alkilcsoport, például hidroxi-alkil-csoport, hidroxi-alkoxi-alkil-csoport, acil-amino-alkil-csoport vagy amino-alkil-csoport. Az „alk-" vagy az „alkil-" kifejezés 1–6 szénatomos, egyenes vagy elágazó szénláncú alkilcsoportokra – előnyösen 1–3 szénatomos alkilcsoportokra – vonatkozik, amelyek szénláncát adott esetben megszakíthatja egy éterkötésű oxigén (–O–). Mindenekelőtt a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicinről, a 40-O-(3-hidroxi-propil)-rapamicinről, a 40-O-[2-(2-hidroxi)-etoxi]-etil-rapamicinről és a 40-O-[2-(acetamino)-etil]-rapamicinről van szó. A találmány kidolgozásakor így azt is célul tűztük ki, hogy monoklonális antitesteket biztosítsunk ezekhez a 40-O-származékokhoz. Ilyen antitesteket nemcsak a diagnosztikai vizsgálatokhoz, hanem az említett származékok tisztításához és előállításához is fel lehet használni.

A találmány szerinti új, immunizáló konjugátumok előállításához olyan új, aktivált rapamicinszármazékokat használunk fel, amelyekben a rapamicin-molekularész az egyik hidroxilcsoportjánál – célszerűen a rapamicinmolekula ciklohexilcsoportján, a 40-es helyzetben levő hidroxilcsoportjánál vagy a 28-as helyzetben levő hidroxilcsoportnál – hozzákötődik egy aktivált kapcsolócsoporthoz, vagyis egy olyan csoporthoz, amely fehérjékkel közvetlenül képes reagálni kovalens kötés létrehozásával, tehát nincs szükség kapcsolóanyagok – például karbodiimidszármazékok – alkalmazására ahhoz, hogy lehetségessé tegyük, lejátszathassuk vagy elősegítsük a rapamicinszármazékok és a fehér-

jék közötti reakciót. Az aktivált kapcsolócsoportnak van egy aktivált észter vagy karboxilcsoportja, azaz –CO–O–X általános képletű csoportja, ahol X jelentése karboxilcsoportot aktiváló csoport, például o-nitrofenil-csoport, p-nitro-fenil-csoport, 1-benztriazolilcsoport, pentafluor-fenil-csoport vagy – mindenekelőtt – N-szukcinimido-csoport. Vannak más kapcsolócsoportok is, például

i) az aktivált ditiocsoportok – így az –S–S–Z általános képletű csoportok, amelyek képletében Z jelentése valamilyen ditioaktiváló csoport, például 2-piridilcsoport –, amelyek képesek hozzákapcsolódni a rapamicinhez; és

ii) epoxicsoportok, például az epoxi-metil-csoport.

Az aktivált kapcsolócsoport észter-, éter-, amid-, tio- vagy valamilyen más kötéssel, előnyösen azonban észterkötéssel kötődhet a rapamicinmolekulához. Az aktivált kapcsolócsoport legelőnyösebb esetben tartalmaz valamilyen biszésztermolekula-részt – például szukcinilcsoportot –, amely észterkötéssel kapcsolódik egyik végén a rapamicinmolekulához, másik végén pedig az aktivált észtercsoporthoz vagy az aktivált karboxicsoporthoz.

A találmány megvalósításához előnyösen használhatók fel a (III) általános képletű rapamicinszármazékok, amelyek az I. reakciósorozat szerint állíthatók elő. A (I) képletű vegyület a rapamicin, amelyet

a) valamilyen acilezőszerrel – például valamilyen ciklusos anhidriddel vagy valamilyen, adott esetben az egyik funkciós csoportján O-védett formájú dikarbonsavval – reagáltatunk megfelelő körülmények között, majd a keletkezett vegyületet szükség esetén mentesítjük a védőcsoporttól; és ezután

b) az a) művelet során előállított rapamicinszármazékot, amelynek (II) általános képletében Y jelentése valamilyen köztes molekularész – célszerűen rövid szénlánca, például 2–6 szénatomos alkiléncsoport, legcélszerűbben etiléncsoport –, aktiváljuk olyan módon, hogy reagáltatjuk valamilyen, a karboxilcsoport aktiválására képes csoporttal, például olyan csoporttal, amelynek HO–X általános képletében, X jelentése a már megadott, és így megkapjuk a (III) általános képletű aktivált rapamicinszármazékot.

Az egyik előnyösen alkalmazható, aktivált rapamicinszármazékot, a (III') képletű szukcinimido-rapamicint például a II. reakciósorozat szerint lehet előállítani. A (I) képletű rapamicint

a) DMAP és piridin jelenlétében borostyánkősavanhidriddel O-acilezve (II') képletig 40-O-(3-karboxi)-propanoil-rapamicint állítunk elő, amelyet azután

b) EDC, trietil-amin és metilén-klorid jelenlétében N-hidroxi-szukcinimiddel aktiválva megkapjuk a (III') képletű 40-O-szukcinimido-oxi-szukcinil-rapamicint, például olyan módon, ahogy majd az 1. példában részletesebben ismertetjük. A haptének (vagyis a nem teljes antigének) – így a 40-es helyzetben kapcsolódó haptének – alkalmazásával előállított monoklonális antitestek rendszerint reakcióképesek lesznek mind a rapamicinnel, mind annak 40-O-származékával szemben, amint már említettük. Ilyen monoklonális antitesteket ki lehet válogatni a továbbiakban ismertetésre kerülő módon olyan vegyületekhez, amelyek felismerik a rapamicin vagy a 40-O-rapamicin-származék valamelyik jellegzetes régióját, például a kötődoménban vagy az effektordoménban, amint ezt a későbbiekben ugyancsak ismertetjük.

Bizonyos esetekben olyan monoklonális antitestekre van szükség, amelyek nagyon érzékenyek a ciklohexilrégióban bekövetkezett módosulásokra, például különbséget tudnak tenni a rapamicin és annak 40-O-származékai között, illetve azonosítani tudják a ciklohexilrégióban az anyagcseretermékeket. Ilyen esetekben előnyösebb, ha a heptén a 28-O-helyzetben és nem a 40-O-helyzetben kapcsolódik. Így például R helyén O-védő csoportot vagy valamelyik, már megadott szubsztituenst – például hidroxi-alkil-csoportot, hidroxi-alkoxi-alkil-csoportot, acil-amino-alkil-csoportot vagy amino-alkil-csoportot – adott esetben védett formában tartalmazó, (A) általános képletű rapamicinszármazékokat az I. reakciósorozat szerint reagáltatunk, majd a keletkezett vegyületet adott esetben mentesítjük a védőcsoporttól. Így megkapjuk az analóg 28-O-aktivált hapténeket, például a (B) általános képletű vegyületeket.

A (B) általános képletben

- R1 jelentése hidrogénatom vagy valamelyik, már megadott O-szubsztituens, például hidroxi-alkil-csoport, hidroxi-alkoxi-alkil-csoport, acil-amino-alkil-csoport vagy amino-alkil-csoport;
- Y jelentése a már definiált kapcsoló molekularész; és
- X jelentése a korábban már meghatározott, karboxilcsoportok aktiválására képes csoportok valamelyike.

Abban az esetben, ha R valamilyen O-védő csoport vagy valamilyen, oxigénatomon védett szubsztituens, ennek a hapténnek az előállításához acilezőszerként adott esetben fel lehet például használni valamilyen, egyik funkciós csoportján O-védett (vagyis hemi-O-védett formájú) dikarbonsavat, majd az acilezést követően egy művelet keretében el lehet távolítani mindkét O-védő csoportot, még mielőtt a karboxilcsoportot aktiváló csoportot bejuttatnánk. Így például a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin felismerésére képes monoklonális antitestek létrehozásához elő lehet állítani hapténeket olyan módon, hogy a primer hidroxilcsoportot megvédjük, a 28-as helyzetben levő hidroxilcsoportot valamilyen hemi-O-védett formájú dikarbonsavval acilezzük, majd a karboxilcsoportot aktiváljuk, például a III. reakciósorozat szerint.

A rapamicint magát a 28-as helyzetben levő oxigénatomon jobban lehet aktiválni, mint a 40-es helyzetben levő oxigénatomon. Úgy járunk el, hogy a 28-as helyzetben levő hidroxilcsoportot valamilyen hemi-O-védett formájú dikarbonsavval acilezzük, majd a védőcsoport eltávolítása után aktiváljuk a karboxilcsoportot, például a IV. reakciósorozat szerint.

Az aktivált rapamicint vagy rapamicinszármazékot ezután hozzákapcsoljuk egy megfelelő immunizáló fehérjéhez, például marhaszérum-albuminhoz (BSA), to-

jásfehérje-albuminhoz (OVA) vagy egy kúp alakú tengeri tapadócsiga („keyhole limpet") hemocianinjához (KHL), hogy immunizáló konjugátumot képezzünk. A monoklonális antitesteket szokásos módszerek alkalmazásával, például a következő módon állítjuk elő: az új immunizáló konjugátumot bejuttatjuk egy megfelelő fajhoz tartozó állat szervezetébe, hogy immunreakciót váltsunk ki, az említett konjugátumra érzékenyített, antitestet termelő sejteket kinyerjük, majd megfelelő csontvelődaganattal való fúzió útján immortalizáljuk, és az így létrehozott, kiválasztott immortalizált sejtvonalból kinyerjük a monoklonális antitestet.

A találmány szerinti antitesteket fel lehet használni megfelelő vizsgálatokhoz. Néhány felhasználási lehetőség bizonyára nyilvánvaló az ezen a területen dolgozó szakemberek számára. Az egyik ilyen lehetőség az antitest és valamilyen rapamicin nyomjelző felhasználásával végrehajtott kompetitív vizsgálat, amelyet például úgy valósíthatunk meg, hogy mikromérőhelyes lemezeket antitesttel vonunk be, majd a feltételezés szerint rapamicint vagy rapamicinszármazékot tartalmazó tesztfolyadék – például a betegtől vett vérplazma vagy teljes vér – jelenlétében és távollétében kitesszük egy versengő vegyület, mégpedig például fluorral vagy radioaktív izotóppal jelzett – mindenekelőtt biotinilezett – rapamicin hatásának. A lemezeket leöblítjük, majd mérjük az antitesthez kötődött, jelzett versengő vegyület mennyiségét, amely fordított arányban van a tesztfolyadékban levő rapamicin mennyiségével. A másik lehetőség az antitest, rapamicin/fehérje konjugátum és megjelölt (például enzimmel megjelölt) nyomjelző antitestet felismerő patkány- vagy egér-IgG felhasználásával végzett ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), amelyet például úgy hajtunk végre, hogy mikromérőhelyes lemezeket bevonunk valamilyen rapamicin/fehérje konjugátummal (például a már ismertetett, rapamicinhez vagy 40-O-alkilezett rapamicinhez kapcsolt fehérjét tartalmazó immunizáló konjugátummal), a lemezeket ezután tesztfolyadék jelenlétében és távollétében antitest hatásának tesszük ki, majd öblítést követően meghatározzuk a rapamicint tartalmazó konjugátumhoz kötődő antitestet olyan módon, hogy a nyomjelző antitestet a rapamicint tartalmazó konjugátumhoz kötődő antitesthez kapcsoljuk. A megkötődő antitest mennyisége ebben az esetben is fordítottan arányos a tesztmintában levő rapamicin mennyiségével. A vizsgálatot mindegyik esetben hitelesítjük olyan tesztoldatokkal, amelyek ismert koncentrációban tartalmaznak rapamicint. Ehhez olyan vizsgálókészletről gondoskodunk, amely a következőket tartalmazza:

(i) a találmány szerinti monoklonális antitestet, célszerűen liofilizált formában vagy mikromérőhelyes lemezre felvitt bevonat alakjában; valamint adott esetben

(ii) rapamicin/fehérje konjugátumot – adott esetben lemezre felvitt bevonat formájában – és/vagy valamilyen megjelölt rapamicinszármazékot; továbbá adott esetben

(iii) rapamicinoldatot a hitelesítéshez és a használati utasításhoz.

Ilyen készlettel meg lehet határozni a rapamicint 10 ng/ml alatti koncentrációkban, például 1 ng/ml alatti koncentrációkban, így a 0,25–0,5 ng/ml koncentrációtartományban.

A találmány szerinti antitesteket lehet továbbá jellemezni azzal, hogy milyen a viszonylagos kötődési affinitásuk egy immungátló aszkomicinhez, például az FK-506-hoz. Az FK-506 olyan immungátló makrolid, amely bizonyos szerkezeti hasonlóságot mutat a rapamicinhez a kötődoménben. A rapamicinek (például a rapamicin és annak immungátló származékai) – csakúgy, mint az FK-506 – hozzákötődnek a makrofilinekhez (FKBP-khez). A feltételezések szerint a makrofilinhez való kötődés mindkét vegyület esetében szükséges, de nem elégséges feltétele az immungátló hatásnak. Ezzel kapcsolatban azonban meg kell említeni, hogy a rapamicin effektorrégiója teljesen más, mint az FK-506-é, és ennek a két vegyületnek a hatásmechanizmusa valójában teljesen különböző. (Így például valószínűnek látszik, hogy az FK-506 immungátló hatása elsősorban az IL–2 átíródásának (transzkripciójának) akadályozásán alapul, míg a rapamicin nem gyakorol említésre méltó hatást a transzkripcióra.) A rapamicineket tehát azzal lehet jellemezni, hogy rendelkeznek egy FKBP-t megkötő doménnel és egy effektordoménnel, és meg lehet különböztetni az FKBP-t megkötő doménben módosított rapamicin-anyagcseretermékeket az effektordoménben módosítottaktól. A megkülönböztetéshez fel lehet használni a találmány szerinti monoklonális antitesteket olyan módon, hogy például kompetitív ELISA keretében FK-506-tal mérjük a találmány szerinti antitestek relatív kereszt-reakcióképességét. A nagy – például 50%-ot meghaladó – kereszt-reakcióképességgel rendelkező monoklonális antitestek felismerik a rapamicinnek az FK-506-hoz hasonló, FKBP-t megkötő doménjében levő epitópokat, a kis – például 20%, optimális esetben 10% alatti – kereszt-reakcióképességgel rendelkező monoklonális antitestek pedig felismerik a csak a rapamicinre jellemző effektorrégióban levő epitópokat.

A találmány szerinti antitesteket annak alapján is lehet osztályozni és jellemezni, hogy milyen mértékben képesek különbséget tenni a rapamicin és annak – például a már megadott – 40-O-származékai között. Abban az esetben, ha olyan antitestekre van szükség, amelyek nem tesznek különbséget a rapamicin és annak 40-O-származékai között, olyan antitesteket választunk, amelyek kereszt-reakcióképessége a rapamicin és a 40-O-rapamicin-származékok vonatkozásában legalább 70%, célszerűen több mint 90%. Ilyen esetben a monoklonális antitest előállításához felhasznált haptén előnyösen valamilyen 40-O-aktivált rapamicin, például a I. reakciósorozat szerinti (III) általános képletű vegyületek valamelyike. Abban az esetben, ha arra van szükség, hogy különbséget tegyünk a rapamicin és annak 40-O-származékai vagy anyagcseretermékе között, olyan antitesteket választunk, amelyek kereszt-reakcióképessége az említett vegyületek vonatkozásában 30%-nál, előnyösen 10%-nál kisebb. Ebben az esetben az antitest előállításához felhasznált haptén célszerűen valamilyen 28-O-

aktivált rapamicin vagy rapamicinszármazék, például a (B) általános képletű vegyületek valamelyike.

1. példa

40-O-aktivált rapamicin előállítása

a) A rapamicin 40-O-hemiszukcinát származékának előállítása

12 ml piridinben feloldunk 1,5 g (1,64 mmol) rapamicint és 0,577 g (5,77 mmol) borostyánkősavanhidridet, majd az így keletkezett oldathoz kevertetés közben hozzáadunk 195 mg (1,64 mmol) DMAP-t. Az így kapott elegyet a környezet hőmérsékletén 19 óra hosszat kevertetjük, majd csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot etil-acetátban feloldjuk, majd a kapott oldatot vízzel háromszor mossuk. A szerves oldatot ezután vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük, majd csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot szilikagélen oszlopkromatográfiás eljárással tisztítjuk. Eluálószerként metilén-klorid és metanol 9:1 térfogatarányú elegyét használjuk. A kívánt terméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük és – ismét oszlopkromatográfiás módszerrel – szilikagélen tisztítjuk. Eluálószerként metilén-klorid és metanol 19:1 térfogatarányú elegyét használjuk. Az oldószer csökkentett nyomáson végzett ledesztillálását követően fehér színű hab formájában kapjuk meg a 40-O-(3-karboxi-propanoil)-rapamicint [a (II') képletű rapamicin-hemiszukcinátot], amelynek a jellemző spektroszkópiai adatai a következők:

^{1}H–NMR ($CDCl_3$)δ 2,68 (7H, m, H33, H25 és $O_2CCH_2CH_2CO_2H$), 3,14 (3H, s és m, OCH_3 és H39), 3,34 (3H, s, OCH_3), 3,38 (3H, s, OCH_3), 4,68 (1H, m, H40), 4,68 (1H, m, H40), 4,72 (1H, széles s, 10-OH); MS (FAB) m/z 1036 ([M+Na]$^+$), 982 ([M-CH_3O]$^+$), 964 ([M-(CH_3O+H_2O)]$^+$), 946 ([M-(CH_3O+2H_2O)]$^+$).

b) 40-O-(szukcinimido-oxi-szukcinil)-rapamicin előállítása

8 ml metilén-kloridban feloldunk az a) pont szerint előállított rapamicin-hemiszukcinátból 120 mg-ot (0,118 mmolt), továbbá 16,5 µl (0,118 mmol) trietilamint és 22,7 mg (0,118 mmol) EDC-t, majd az így keletkezett oldathoz kevertetés közben hozzáadunk 13,6 mg (0,118 mmol) N-hidroxi-szukcinimidet. A keletkezett elegyet a környezet hőmérsékletén 18 óra hosszat kevertetjük, etil-acetáttal felhígítjuk, majd vízzel kétszer mossuk. A szerves oldatot vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük és csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot oszlopkromatográfiás módszerrel szilikagélen tisztítjuk. Eluálószerként etil-acetátot használunk. Ilyen módon fehér színű, habszerű anyag formájában kapjuk meg a II. reakciósorozat szerinti (III') képletű 40-O-(szukcinimido-oxi-szukcinil)-rapamicint, amelynek a jellemző spektroszkópiai adatai a következők:

^{1}H–NMR (DMSO) δ 2,67 (2H, t, $O_2CCH_2CH_2CO_2$), 2,81 (7H, s, CH_3O és a szukcinimid CH_2 csoportja), 2,92 (2H, t, $O_2CCH_2CH_2CO_2$), 455 (1H, m, H40), 5,26 (1H, d, 28-OH), 6,43 (1H, s, 10-OH); MS (FAB) m/z 1133 ([M+Na)$^+$), 1111 ([M+H]$^+$), 1092 ([M-H_2O]$^+$), 1079 ([M-CH_3O]$^+$), 1061 ([M-(CH_3O+H_2O)]$^+$), 1043 ([M-(CH_3O+2H_2O)]$^+$).

2. példa

A rapamicin 28-O-aktivált 40-O-származékának előállítása

a) A 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin 28-O-hemiszukcinátjának előállítása

Metilén-klorid és piridin 10:1 térfogatarányú elegyének 2,2 ml-ében feloldunk 958 mg (1,00 mmol) 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicint, a keletkezett oldatot 0 °C-ra hűtjük, és kevertetés közben hozzáadunk 0,160 ml (1,50 mmol) klór-hangyasav-allil-észtert. A kapott elegyet 0 °C-on tovább kevertetjük, majd 3, illetve 4 óra elteltével két-két részletben beadagolunk 0,080 ml (1,00 mmol) piridint és 0,053 ml (0,50 mmol) klór-hangyasav-allil-észtert. Az említett vegyületek második részletének beadagolása után a kevertetést még egy órán keresztül folytatjuk, majd a reakciót 1 M vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldat adagolásával befagyasztjuk. Az így keletkezett elegyet etil-acetáttal háromszor extraháljuk. A szerves oldatot először 1 N vizes sósavoldattal, majd 1 N vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, végül vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal megszárítjuk, szűrjük, majd csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot szilikagélen oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk. Eluálószerként hexán és etil-acetát 1:1 térfogatarányú elegyét használjuk. Ilyen módon fehér színű, habszerű anyag formájában kapjuk meg védett formában az allil-oxi-karbonil-vegyületet, amely a III. reakciósorozat (2) képletű vegyülete.

Az előző bekezdés szerint előállított vegyületből 208 mg-ot (0,200 mmolt) feloldunk 2 ml metilén-kloridban, a keletkezett oldatot 0 °C-ra hűtjük, majd hozzáadunk először 2,4 mg (0,020 mmol) DMAP-t és 82 mg (0,400 mmol) DCC-t, azután – 0,5 ml metilén-kloridban feloldva – 63 mg (0,400 mmol) monoallil-szukcinátot. A reakcióelegyet 0 °C-on 14 óra hosszat kevertetjük, majd a keletkezett szuszpenziót átszűrjük zsugorított üvegtölcséren. A szerves oldatot csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot szilikagélen oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk. Eluálószerként hexán és etil-acetát 30:70 térfogatarányú elegyét használjuk. Ilyen módon fehér színű, habszerű anyag formájában kapjuk meg a III. reakciósorozat (3) képletű vegyületét.

Az előző bekezdés szerint előállított vegyületből 177 mg-ot (0,150 mmolt) feloldunk 5 ml metilén-kloridban. A kapott oldathoz kevertetés közben hozzáadunk 17,3 mg (0,015 mmol) tetrakisz(trifenil-foszfin)-palládiumot és 0,080 ml (0,3 mmol) tributil-ón-hidridet. Az így kapott sárga színű oldatot a környezet hőmérsékletén 2 órán át kevertetjük, etil-acetáttal hígítjuk, hideg 2 N vizes citromsavoldattal egyszer, telített vizes nátrium-klorid-oldattal pedig háromszor mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük és csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot szilikagélen oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk. Eluálószerként etil-acetát és metanol 85:15 térfogatarányú elegyét használjuk. Ilyen módon halványsár-

ga színű, olajszerű anyag formájában megkapjuk a III. reakciósorozat (4) képletű hemiszukcinátját.

b) 28-O-(szukcinimido-oxi-szukcinil)-40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin előállítása

2,5 ml metilén-kloridban feloldunk 53 mg (0,050 mmol) a) pont szerinti hemiszukcinátot, majd az így keletkezett oldathoz hozzáadunk 2 mg DMAP-t, 24 mg (0,125 mmol) EDC-t és 14 mg (0,125 mmol) N-hidroxi-szukcinimidet. Az így kapott elegyet 2 óra hosszat kevertetjük a környezet hőmérsékletén, majd a reakciót befagyasztjuk 1 N vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal. A keletkezett elegyet etil-acetáttal háromszor extraháljuk. A szerves fázist vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal és vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük, majd bepároljuk. Ilyen módon megkapjuk a III. reakciósorozat (5) képletének megfelelő aktivált haptént, amelyet további tisztítás nélkül használunk fel a fehérje/haptén konjugátum előállításához. Ennek az aktivált hapténnek a jellemző spektroszkópiai adatai a következők:

^{1}H–NMR ($CDCl_3$)δ 2,43 (1H, dd, H33a), 2,50–2,98 (10H, m, H25, H33b, a szukcinát hidrogénatomjai, a szukcinimid hidrogénatomjai), 3,58 (2H, m, H6b, a hidroxi-etil-csoport egyik hidrogénatomja), 3,68 (3H, m, H16, a hidroxi-etil-csoport két hidrogénatomja), 3,81 (2H, m, H14, a hidroxi-etil-csoport egyik hidrogénatomja), 3,93 (1H, d, H27), 5,28 (2H, m, H2, H30), 5,34 (1H, d, H28); MS (FAB) 1161 ([M+Li]$^+$).

3. példa

28-O-aktivált rapamicin előállítása

a) A rapamicin 28-O-hemiszukcinátjának előállítása

Metilén-klorid és piridin 10:1 térfogatarányú elegyében feloldunk 914 mg (1,00 mmol) rapamicint, majd a keletkezett oldatot 0 °C-ra hűtjük, és kevertetés közben beadagolunk 0,212 ml (2,00 mmol) klórhangyasav-allil-észtert. Három óra elteltével beadagolunk további 0,080 ml (1,000 mmol) mennyiségű piridint és 0,053 ml (0,50 mmol) mennyiségű klórhangyasav-allil-észtert. A kevertetést még egy óra hosszat folytatjuk, majd a reakciót 1 M vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldat beadagolásával befagyasztjuk. A keletkezett elegyet metil-tercier-butil-éterrel háromszor extraháljuk. A szerves oldatot először hideg 1 N vizes sósavoldattal, majd 1 N vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, végül telített vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk és vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk. A szűrés és csökkentett nyomáson végzett bepárlás után kapott maradékot szilikagélen oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk. Eluálószerként hexán és etil-acetát 70:30 térfogatarányú elegyét használjuk. Ilyen módon fehér színű, habszerű anyag formájában kapjuk meg védett formában a IV. reakciósorozat (2) képletének megfelelő allil-oxi-karbonil-vegyületet.

Az előző bekezdés szerint előállított vegyületből 400 mg-ot (0,400 mmolt) feloldunk 5 ml metilén-kloridban, majd a keletkezett oldatot 0 °C-ra hűtjük. A hűtött oldathoz hozzáadunk kevertetés közben először 4,8 mg (0,040 mmol) DMAP-ot és 164 mg (0,800 mmol) DCC-t, majd – 1 ml metilén-kloridban feloldva – 127 mg (0,800 mmol) monoallil-szukcinátot. A reakcióelegyet –15 °C-on kevertetjük 14 óra hosszat, majd a keletkezett szuszpenziót átszűrjük zsugorított üvegszűrővel ellátott tölcséren. A szerves oldatot csökkentett nyomáson bepároljuk, és a bepárlási maradékot szilikagélen oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk. Eluálószerként hexán és metil-tercier-butil-éter elegyét használjuk. Ilyen módon fehér színű, habszerű anyag formájában kapjuk meg a IV. reakciósorozat (3) képletének megfelelő vegyületet.

Az előző bekezdés szerint előállított vegyületből 285 mg-ot (0,250 mmolt) feloldunk 5 ml metilén-kloridban, majd az így keletkezett oldathoz kevertetés közben hozzáadunk 28,8 mg (0,025 mmol) tetrakisz(trifenil-foszfin)-palládiumot és 0,133 ml (0,5 mmol) tributil-ón-hidridet. Az így kapott sárga színű oldatot 1 óra hosszat kevertetjük a környezet hőmérsékletén, majd metil-tercier-butil-éterrel hígítjuk, hideg 2 N vizes citromsavoldattal kétszer, telített vizes nátrium-klorid-oldattal pedig háromszor mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük és csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot szilikagélen oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítjuk. Eluálószerként metil-tercier-butil-éter és metanol (90:10)–(60:40) térfogatarányú elegyeit használjuk. Ilyen módon halványsárga színű, olajszerű anyag formájában kapjuk meg a IV. reakciósorozat (4) képletű vegyületének megfelelő 28-O-rapamicin-hemiszukcinátot.

b) 28-O-(szukcinimido-oxo-szukcinil)-rapamicin előállítása

Az a) pont szerint előállított termékből 51 mg-ot (0,050 mmolt) feloldunk 2 ml metilén-kloridban, majd az így keletkezett oldathoz hozzáadunk 2 mg DMAP-t, 24 mg (0,125 mmol) EDC-t és 14 mg (0,125 mmol) N-hidroxi-szukcinimidet. A kapott elegyet 4 óra hosszat kevertetjük a környezet hőmérsékletén, majd a reakciót 1 N vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldat beadagolásával befagyasztjuk. Az így keletkezett elegyet metil-tercier-butil-éterrel háromszor extraháljuk. A szerves oldatot vizes nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal és vizes nátrium-klorid-oldattal mossuk, vízmentes nátrium-hidrogén-karbonáttal szárítjuk, szűrjük és bepároljuk. Ilyen módon kapjuk meg aktivált formában a cím szerinti vegyületet, amelyet további tisztítás nélkül használunk fel a fehérje/haptén konjugátum előállítására. A cím szerinti vegyület jellemző spektroszkópiai adatai a következők:

^{1}H–NMR ($CDCl_3$)δ 2,43 (1H, dd, H33a), 2,55–3,02 (11H, m, H25, H33b, H39, szukcinát-hidrogének, szukcinimid-hidrogének), 3,56 (1H, m, H6b), 3,68 (1H, dd, H16), 383 (1H, m, H14), 3,93 (1H, d, H27), 5,28 (2H, m, H2, H30), 5,34 (1H, d, H28); MS (FAB) 1117 ([M+Li]$^+$).

4. példa

Immunizáló konjugátumok előállítása

a) 40-O-kapcsolódású rapamicinkonjugátumok előállítása

Az 1. példa szerinti, 40-O-helyzetben aktivált rapamicinből 17,4 mg-ot feloldunk 400 μl dimetil-forma-

midban vagy dimetil-szulfoxidban. Az így keletkezett oldatból 120 µl – vagyis 5,22 mg aktivált rapamicint tartalmazó – mennyiséget erőteljes kevertetés közben cseppenként hozzáadunk egy olyan oldathoz, amely 2 ml 0,1 M nátrium-hidrogén-karbonát-pufferoldatban (pH=7,7) 8 mg KLH-t tartalmaz. A reakcióelegyet 2 órán át a környezet hőmérsékletén kevertetjük, majd a keletkezett rapamicin/KLH konjugátumot 4 °C-on 48 órán át végzett dialízissel (5 l PBS, 3X) tisztítjuk. A kapott konjugátumot adott esetben tovább tisztítjuk mikromennyiségek töményítésére alkalmas csövek felhasználásával végzett centrifugálással. Ugyanilyen módon állítjuk elő a KLH BSA-val vagy OVA-val való helyettesítésével a rapamicin/BSA, illetve a rapamicin/OVA konjugátumokat.

b) 28-O-kapcsolódású (40-O-helyzetben adott esetben alkilezett) rapamicinkonjugátumok előállítása

A 2. példa szerinti, 28-O-helyzetben aktivált vegyületből 5 mg-ot feloldunk 2 ml dimetil-szulfoxidban, majd az így kapott oldatot erőteljes keverés közben cseppenként hozzáadjuk egy olyan oldathoz, amely 1 ml 50 mM foszfátos pufferoldatban (pH=7,3) feloldva 5 mg KLH-t tartalmaz. A reakcióelegyet a környezet hőmérsékletén 2 órán át kevertetjük, majd a keletkezett konjugátumot 4 °C-on 48 órán át végzett dialízissel (21 PBS, 3X) tisztítjuk. Ugyanilyen módon állítjuk elő BSA-val és OVA-val is a konjugátumokat. A 3. példa szerinti, 28-O-helyzetben aktivált vegyület felhasználásával ugyanezzel az eljárással lehet rapamicint a 28-as helyzetben KLH-hoz, BSA-hoz és OVA-hoz kapcsolni.

5. példa

Monoklonális antitest előállítása

a) Monoklonális antitest előállítása rapamicinhez

Monoklonális antitestet állítunk elő hagyományos módon, lényegében a Köhler és Milstein által ismertetett eljárással [Nature, *256.* 49.]. 20–25 g-os nőstény Balb/C egerekbe négy helyen bőr alá fecskendezünk 10 vagy 50 µg mennyiségű, 4a) példa szerinti, 40-O-kapcsolódású, immunizáló rapamicin/KLH konjugátumot 0,2 ml teljes Freund-adjuvánsban. Két hét múlva – ugyancsak bőr alá – emlékeztető injekciót fecskendezünk be, amely 0,2 ml nem teljes Freund-adjuvánsban ugyanolyan mennyiségű immunizáló konjugátumot tartalmaz, mint az első injekció. Az állatok vérszérumában levő antigénnel szemben reakcióképes antitestek jelenlétéről a 6. példában ismertetésre kerülő közvetlen ELISA-val győződünk meg. Az egereket adott esetben szétválogatjuk aszerint, hogy antitestjük az effektorrégióval vagy az FKBP-t megkötő régióval szemben rendelkezik-e affinitással. (Az előbbi esetben kismértékű, az utóbbi esetben pedig nagymértékű a kereszt-reakcióképesség az FK-506-ra vonatkoztatva.) Az 1. ábrán például koncentrációgörbék láthatók egy olyan egér esetében (M1), amelyben nagy a rapamicin kötődoménjéhez affinitással rendelkező antitest koncentrációja, valamint egy olyan egér esetében (M7), amelyben viszonylag nagy a rapamicin effektordoménjéhez affinitással rendelkező antitest koncentrációja. Azok az egerek, amelyeknek vérszérumában maximális a megfelelő jellemzőkkel rendelkező antitest koncentrációja, 10 µg antigént tartalmazó emlékeztető injekciókat kapnak a –3. napon (a megadott mennyiség felét intraperitoneálisan, másik felét pedig intravénásan fecskendezzük be), valamint intraperitoneálisan a –2. és a –1. napon. A 0. napon az egereket megöljük, és elkülönített lépsejtjeiket PAI-O sejtekkel vagy más megfelelő csontvelődaganat-sejtvonallal egyesítjük. Az így kapott hibridómákat tenyésztés után az ELISA alkalmazásával osztályozzuk, hogy olyan antitest jusson érvényre, amelynek nagy az affinitása a rapamicinhez.

b) Monoklonális antitest előállítása 40-(hidroxi-etil)-rapamicinhez

Nőstény Balb/C egerekbe négy helyen bőr alá fecskendezünk 0,2 ml teljes Freund-adjuvánsban 10 vagy 50 µg mennyiségű, 4b) példa szerinti immunizáló 40-(hidroxi-etil)-rapamicin/KLH konjugátumot. Két hét múlva – ugyancsak bőr alá – emlékeztető injekciót fecskendezünk be, amely 0,2 ml nem teljes Freund-adjuvánsban emulgeálva ugyanolyan mennyiségű immunizáló konjugátumot tartalmaz, mint az első injekció. Az állatok vérszérumában levő antigénnel szemben reakcióképes antitestek jelenlétét a már ismertetett módon (közvetlen ELISA) vizsgáljuk. Ezenkívül az egereket a továbbiakban szétválogatjuk aszerint, hogy antitestjük a 40-O-régióban BSA/rapamicin konjugátum vagy BSA/40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin konjugátum hozzákapcsolásával módosított rapamicinmolekulával szemben rendelkezik-e nagyobb affinitással. Így kapunk mind olyan antitesteket, amelyek hozzákapcsolódnak a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin-konjugátumhoz, de nem kapcsolódnak hozzá a konjugált rapamicinhez, mind olyan antitesteket, amelyek hozzákapcsolódnak úgy a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin-konjugátumhoz, mint a rapamicinkonjugátumhoz. Azok az egerek, amelyek vérszérumában maximális a megfelelő jellemzőkkel rendelkező antitest koncentrációja, 10 µg antigént tartalmazó emlékeztető injekciókat kapnak a –3. napon (a megadott mennyiség felét intraperitoneálisan, a másik felét pedig intravénásan fecskendezzük be), valamint intraperitoneálisan a –2. és a –1. napon. A 0. napon az egereket megöljük, és elkülönített lépsejtjeiket PAI-0 sejtekkel egyesítjük. Az így kapott hibridómákat tenyésztés után ELISA alkalmazásával osztályozzuk, hogy olyan antitest jusson érvényre, amelynek nagy az affinitása a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicinhez.

6. példa

Enzimhez kötődő immunszorbens vizsgálat (ELISA)

a) ELISA rapamicinhez

Mikromérőhelyes lemezeket bevonunk olyan oldattal, amely PBS-milliliterenként 1-2 µg rapamicin/BSA konjugátumot tartalmaz. A bevont lemezeket 2 óra hosszat 37 °C-on tartjuk, majd a bevonatot PBS felhasználásával készült 2 m%-os BSA-oldattal 37 °C-on 1 órán keresztül telítjük. A lemezeket ezt követően 0,05 m%-os Tween-PBS-eleggyel háromszor mossuk. Az osztályozni kívánt hibridóma-felülúszókat felhígít-

juk PBS felhasználásával készült 1 m%-ps BSA-oldattal, majd az így keletkezett elegyet a környezet hőmérsékletén egy éjszakán át (vagy 4 °C-on 18 óra hosszat vagy 37 °C-on 2 óra hosszat) inkubáljuk. A megkötött antitest koncentrációját úgy mérjük, hogy szubsztrátumként p-nitro-fenil-foszfáttal alkalikus foszfatázhoz kapcsolt antiegér IgG kecskeglobulint használunk. Két órán át 37 °C-on inkubálunk, majd az enzimes szubsztrátumot a környezet hőmérsékletén 1 órán keresztül hidrolizáljuk. Ezután 405 nm-en mérjük az abszorpcióképességet. A nagy affinitású monoklonális antitestek előállításához ezután kiválogatjuk a hibridómákat.

Rapamicint ismert koncentrációkban tartalmazó oldatok (például vérszérum-milliliterenként 1–140 ng rapamicint tartalmazó oldatok) felhasználásával standard görbéket veszünk fel, hogy meghatározzuk egy kiválasztott antitest affinitását a rapamicinhez. A 2. ábra például – amelyen egy standard görbe látható a mi M7-91-es monoklonális antitestünkhöz – szemlélteti, hogy a rapamicinnel szemben mutatott nagymértékű specifikussága alapján kiválasztott monoklonális antitest a rapamicint még igen alacsony koncentráció – 0,25 ng/ml – esetén is képes kimutatni.

Az antitesteket jellemezni lehet továbbá a rapamicin effektordoménjéhez vagy FKBP-t megkötő doménjéhez való kötődésükkel is, amelyet úgy mérünk, hogy a rapamicin/BSA konjugátumhoz hasonló módon előállítható FK-506/BSA konjugátummal bevont mikromérőhelyes lemezek felhasználásával analóg közvetlen ELISA-t végzünk. A 3. ábrán például összehasonlítjuk 17 kiválasztott antitestnek a rapamicin/BSA konjugátum és az FK-506 felhasználásával végzett vizsgálatai során mért kötődési szintjeit, a 4. ábrán pedig a kereszt-reakcióképességet szemléltetjük százalékban kifejezve. A rapamicin/BSA konjugátumhoz, valamint az FK-506/BSA konjugátumhoz való kötődések összehasonlításával igen kis affinitású monoklonális antitesteket mutatunk ki.

Az előbb ismertetett közvetlen ELISA-t át lehet alakítani kompetitív ELISA-vá olyan módon, hogy valamilyen versengő vegyületet adagolunk a monoklonális antitestet tartalmazó oldathoz, és a versengő vegyület jelenlétében, valamint távollétében mérjük a konjugátumhoz kötődő monoklonális antitest mennyiségét. Abban az esetben, ha a versengő vegyület FK-506 vagy rapamicin, illetve rapamicinszármazék, a versengő vegyületet – például 1 mg/ml koncentrációjú – etanolos oldat formájában közvetlenül adjuk hozzá a monoklonális antitestoldathoz (például 2 µl/200 µl mennyiségben mérőhelyenként), majd a mikromérőhelyes lemezen végezzük el a hígítást. Az 5. ábrán például inhibíciós görbe látható, amelyet úgy vettünk fel, hogy különböző koncentrációkban jelen levő szabad rapamicin mellett mértük az M7-91-es antitest (M7.91.13) kötődését a BSA/rapamicin konjugátumhoz. Ha ilyen kompetitív ELISA-k keretében hasonlítjuk össze a monoklonális antitestek kötődését a szabad FK-506-hoz, illetve a szabad rapamicinhez, a rapamicin és az FK-506 közötti kereszt-reakcióképesség láthatóan kisebb, mint a közvetlen ELISA-nál. A monoklonális antitestek kiválasztásához előnyös ilyen kompetitív vizsgálatot végezni, mert a feltételezések szerint van néhány olyan monoklonális antitest, amelynek túl kicsi lehet az affinitása ahhoz, hogy az oldatban szabad formában jelen levő antigénje kötődjék. Ezek a monoklonális antitestek azonban bivalensen vagy polivalensen kötődhetnek olyan multimer antigénhez, amely egy terjedelmes fehérjemolekulához kötődve sok haptént tartalmaz szorosan egymás mellett. A kompetitív vizsgálatok kizárják az ilyen, kis affinitással rendelkező antitesteket. Ilyen kompetitív vizsgálat eredményeit mutatjuk be a 6. ábrán, amelyen összehasonlítható a viszonylag kis kereszt-reakcióképességű M7-91-es antitest (M7.91.13) a viszonylag nagy kereszt-reakcióképességű M1-303-as antitesttel (M1.303.3).

b) ELISA 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicinhez

Ezt az ELISA-t az a) pontban ismertetett eljárással analóg módon hajtjuk végre. Mikromérőhelyes lemezeket bevonunk 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin/BSA konjugátummal, a bevonatot BSA-val telítjük, majd mossuk. Az osztályozni kívánt hibridóma-felülúszókat 4 °C-on 18 óra hosszat vagy 37 °C-on 2 óra hosszat inkubáljuk. A megkötődött antitest mennyiségét olyan módon mérjük, hogy szubsztrátumként p-nitro-fenil-foszfáttal alkalikus foszfatázhoz kapcsolt antiegér IgG kecskeglobulint alkalmazunk. Párhuzamos ELISA-t végzünk megkötött rapamicin/BSA konjugátum felhasználásával, hogy kiválogathassunk olyan monoklonális antitesteket, amelyek képesek megkülönböztetni a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicint a rapamicintől. A 7. ábrán például a következő hibridómák felülúszóinak abszorpcióképességét szemléltetjük:

- az ábrán mint BSA-28-RAD szereplő B3-203-as hibridóma, amely szelektíven kötődik a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin/BSA konjugátumhoz [7A. ábra];
- B3-113-as hibridóma, amely felismeri mind a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin/BSA konjugátumot, mind a BSA-hoz a 28-as helyzetben kapcsolódó rapamicint [7B. ábra]; és
- B3-164-es hibridóma, amely az előbbieken kívül felismeri azt a rapamicint is, amely a 40-es helyzetben kapcsolódik a BSA-hoz [7C. ábra].

A továbbiakban mérjük az antitesteknek a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicinnel szemben mutatott relatív affinitását a rapamicinhez való affinitásra vonatkoztatva. A mérést úgy végezzük el, hogy „versenyeztetjük" a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin/BSA konjugátumot oldatban szabadon jelen levő 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicinnel vagy rapamicinnel abban, hogy mennyi antitestet tudnak megkötni. A 8. ábrából például kitűnik, hogy a B3-203-as hibridóma által termelt antitestek kis rapamicinnel szembeni kereszt-reakcióképességet mutatva élénken reagálnak a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicinnel [8A) ábra], ugyanakkor a B3-113-as és a B3-164-es hibridóma által termelt antitestek ugyanolyan jól kötődnek a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicinhez, mint a rapamicinhez [8B. és 8C. ábra]. A B3-22-es, a B3-127-es és a B3-156-os hibridóma is azok közé a hibridómák közé tartozik, amelyek olyan antitesteket

termelnek, amelyek 10–100-szor nagyobb mennyiségben kötődnek a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicinhez, mint a rapamicinhez. Vannak olyan hibridómák is – például a B3-29-es, a B3-265-ös és a B3-539-es –, amelyek olyan antitesteket termelnek, amelyek ugyanolyan jól kötődnek a rapamicinhez, mint a 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicinhez.

Ha már a kívánt antitestet kiválasztottuk, ugyanezt az ELISA-t alkalmazzuk arra, hogy a betegek vérében meghatározzuk a rapamicinkoncentrációkat. Egy ennek a példának megfelelő vizsgálókészletben lenne például liofilizált formában egy vagy több kiválasztott antitest, egy rapamicinkonjugátummal – például rapamicin/BSA konjugátummal vagy 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin/BSA konjugátummal – bevont mikromérőhelyes lemez, egy rapamicin-standard, valamint egy használati utasítás. A kit adott esetben tartalmazhatna továbbá egy izotóppal jelölt rapamicinszármazékot is a kompetitív vizsgálatokhoz. Kiegészítésképpen lehet még a készletben olyan antiegér IgG/enzim konjugátum és szubsztrátum, amelyet a korábbiakban már ismertettünk. A készletet megvásárló személy a találmány szerinti monoklonális antitestet felhasználhatja a saját maga által kidolgozott ELISA keretében vagy más vizsgálati módszerek keretében is.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Monoklonális antitestek, *azzal jellemezve,* hogy rapamicint vagy 40-O-alkilezett származékát specifikusan felismerni képesek.

2. Az 1. igénypont szerinti monoklonális antitestek, *azzal jellemezve,* hogy rapamicin vagy 40-O-alkilezett származékának FKBP-kötő részén levő epitópot felismerni képesek.

3. Az 1. igénypont szerinti monoklonális antitestek, *azzal jellemezve,* hogy rapamicin vagy 40-O-alkilezett származékának effektor részén levő epitópot felismerni képesek.

4. Eljárás az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális antitestek előállítására, *azzal jellemezve,* hogy:

a) aktivált kapcsolócsoportot tartalmazó rapamicint vagy 40-O-alkilezett származékát reagáltatjuk egy immunogén proteinnel

b) az így nyert immunogén konjugátumot egy megfelelő állatfajhoz tartozó egyed szervezetébe juttatjuk az immunogén hatás kiváltása céljából, majd a konjugátumra érzékenyített, antitestet termelő sejteket kinyerjük,

c) a monoklonális antitestet termelő sejteket immortalizáljuk, és

d) az így kapott, kiválasztott immortalizált sejtvonalból a monoklonális antitestet kinyerjük.

5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti monoklonális antitest, *azzal jellemezve,* hogy a 40-O-alkilezett rapamicinben jelen levő 40-O-alkil-szubsztituens hidroxi-aklil-, hidroxi-alkoxi-alkil-, acil-amino-alkil- vagy amino-alkil-csoport lehet.

6. Az 5. igénypont szerinti monoklonális antitestek, *azzal jellemezve,* hogy a 40-O-alkilezett rapamicin

i) 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin;

ii) 40-O-(3-hidroxi-propil)-rapamicin;

iii) 40-O-[2-(hidroxi)-etoxi]-etil-rapamicin; és

iv) 40-O-(2-acetamino-etil)-rapamicin.

7. Az előző igénypontok bármelyike szerinti monoklonális antitest, *azzal jellemezve,* hogy képes megkülönböztetni a rapamicint és az 5. és 6. igénypontban leírtak szerinti 40-O-alkilezett rapamicint.

8. Immunogén konjugátum, *azzal jellemezve,* hogy egy rapamicinrészből és egy proteinrészből áll.

9. Eljárás a 8. igénypont szerinti immunogén konjugátum előállítására, *azzal jellemezve,* hogy egy proteint egy aktivált kapcsolócsoportot tartalmazó rapamicinszármazékkal reagáltatunk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás immunogén konjugátum előállítására, *azzal jellemezve,* hogy a rapamicinszármazékként

i) 40-O-szukcinimid-oxi-szukcinil-rapamicint,

ii) 28-O-szukcinimido-oxi-szukcinil-rapamicint, vagy

iii) 28-O-(szukcinimido-oxi-szukcinil)-40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicint alkalmazunk.

11. Aktivált kapcsolócsoportot tartalmazó rapamicinszármazék, *azzal jellemezve,* hogy

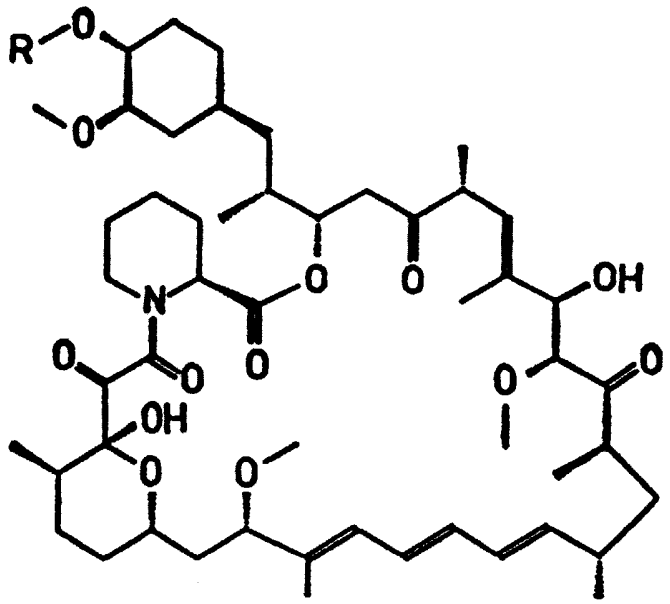
i) 40-O-szukcinimid-oxi-szukcinil-rapamicin,

ii) 28-O-szukcinimido-oxi-szukcinil-rapamicin, vagy

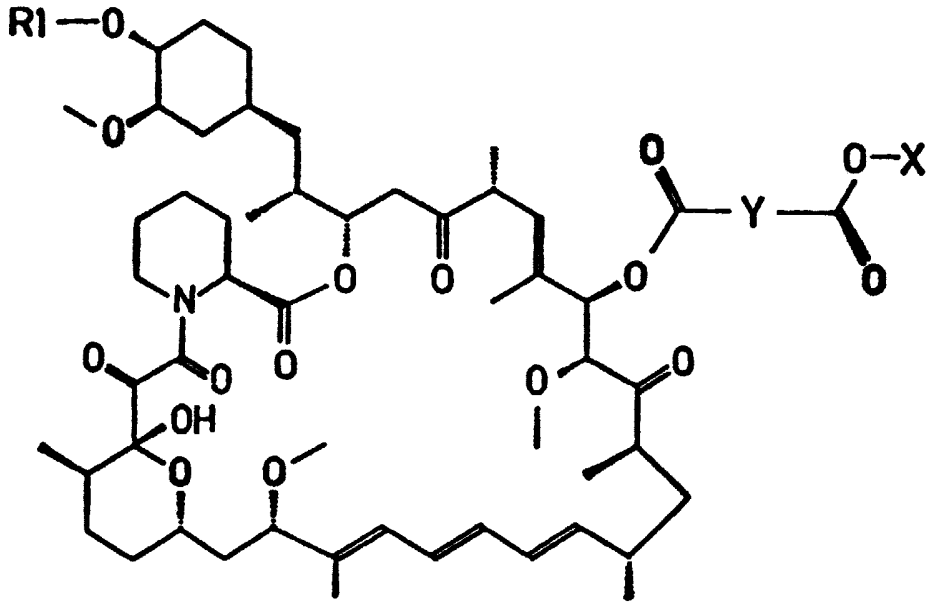
iii) 28-O-(szukcinimido-oxi-szukcinil)-40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicin.

12. Hibridóma sejtvonal, *azzal jellemezve,* hogy az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális antitest előállítására képes.

13. Immunoassay kit rapamicin vagy 40-O-alkilezett rapamicinszármazék vérszintjének mérésére, *azzal jellemezve,* hogy az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti monoklonális antitestet tartalmaz.

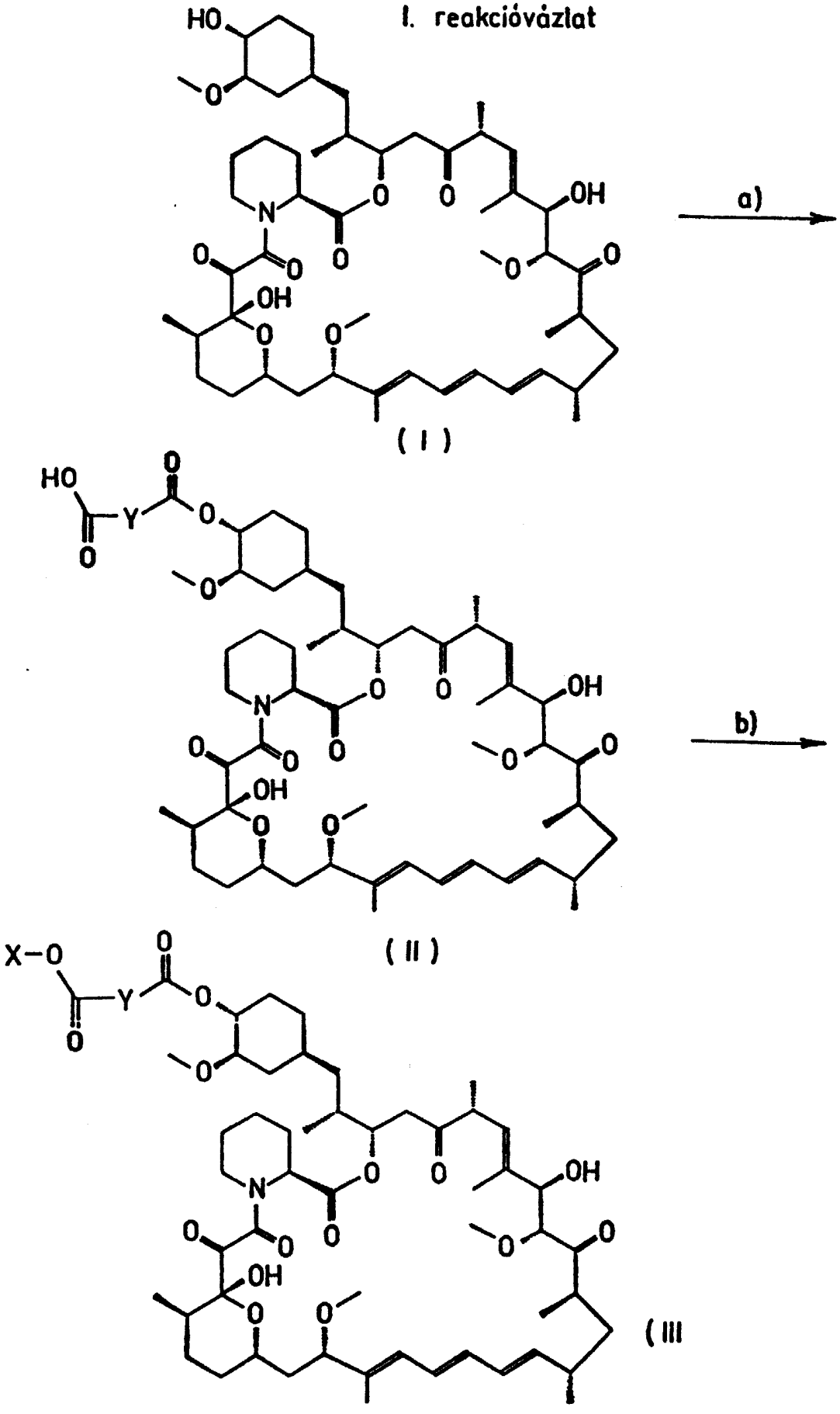


(A)

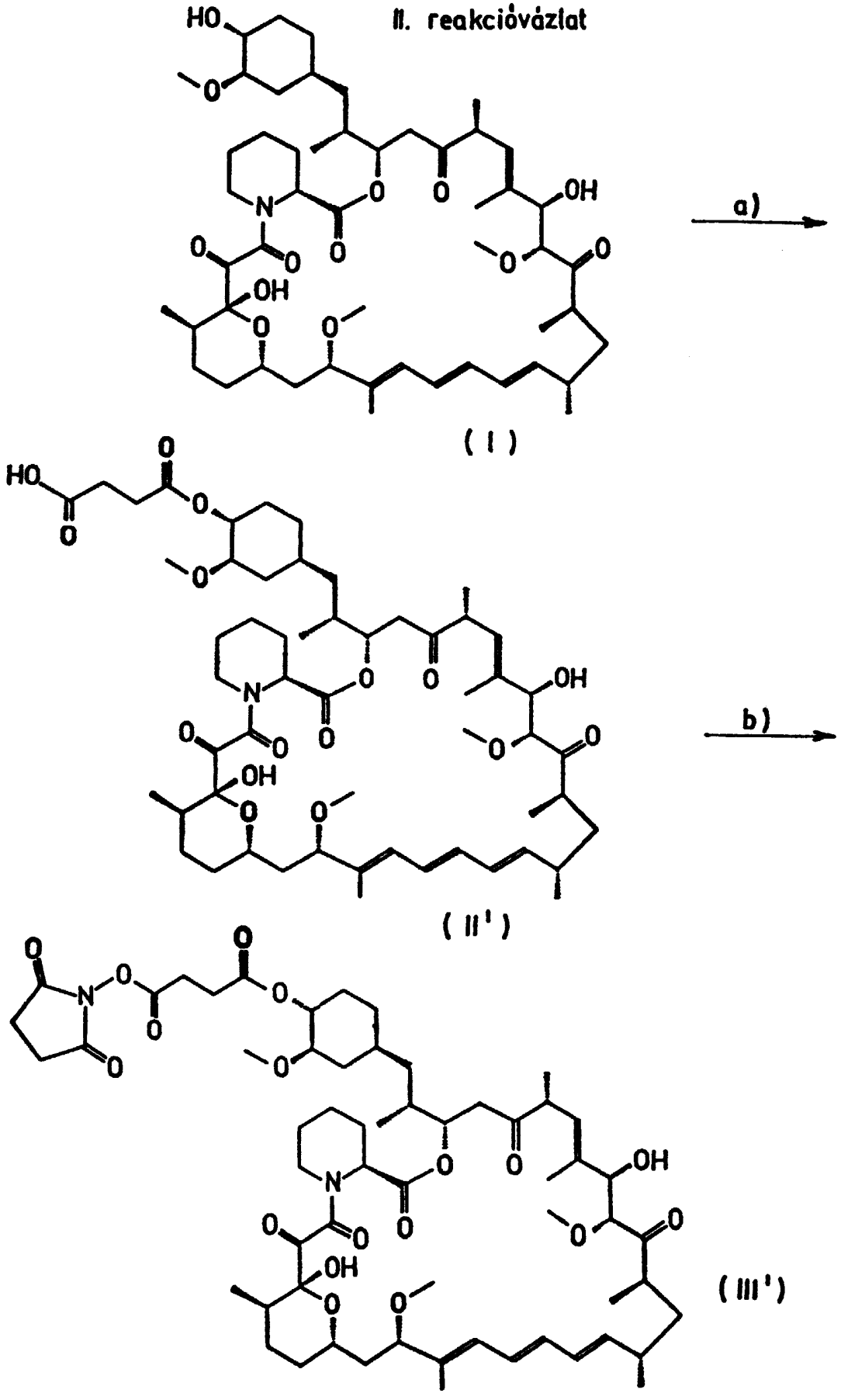


(B)

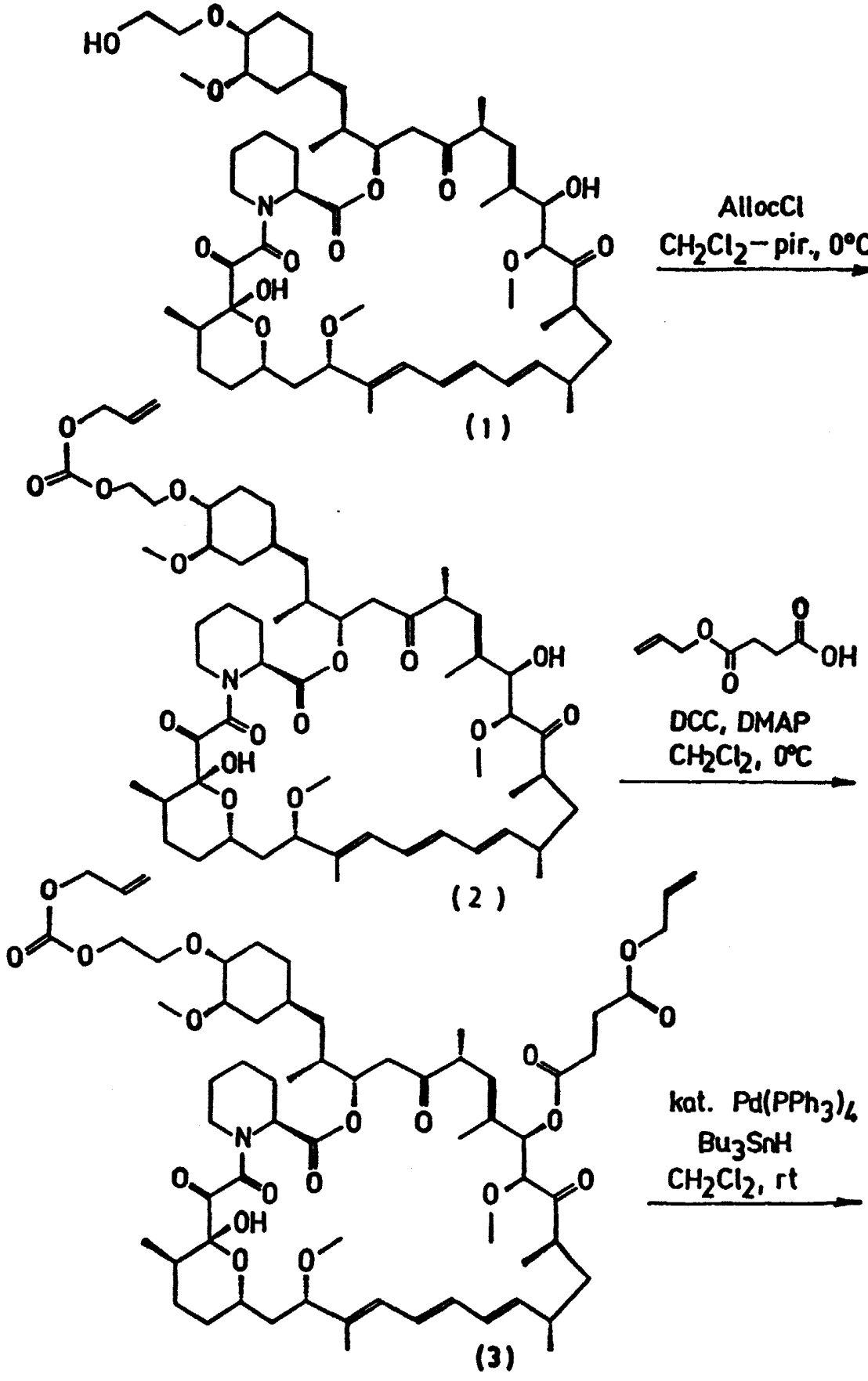
I. reakcióvázlat



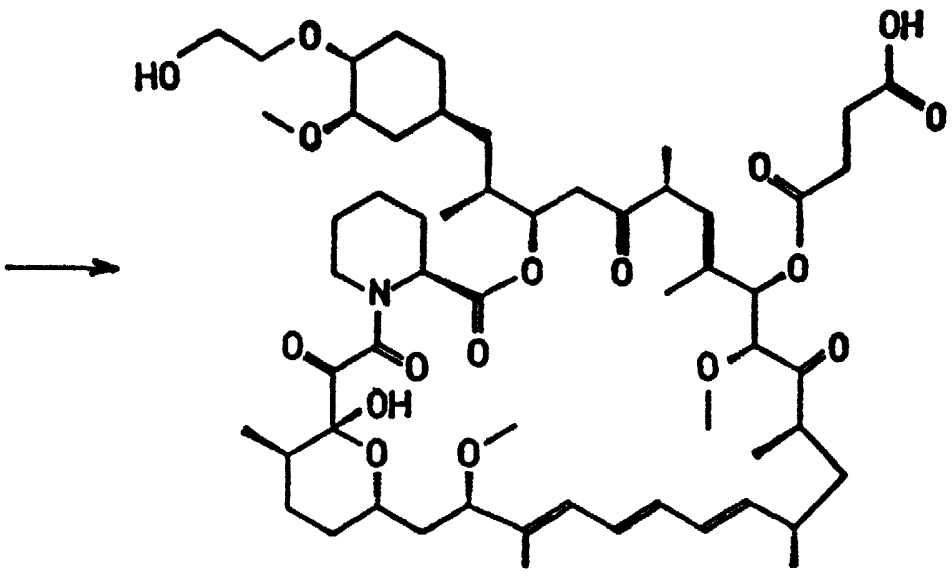
II. reakcióvázlat



III. reakcióvázlat

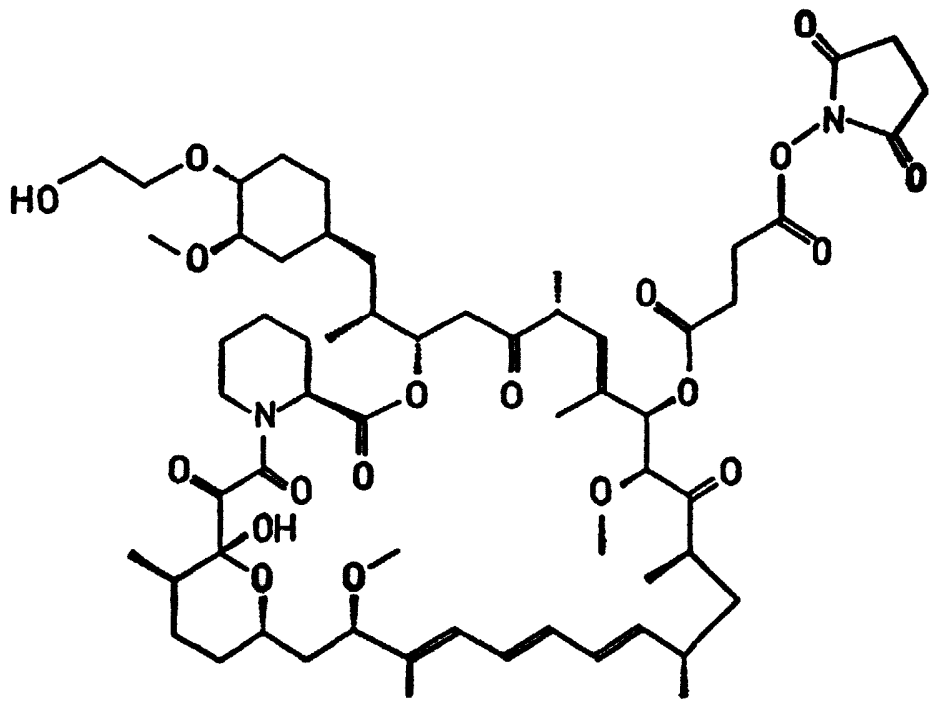


III. reakcióvázlat folytatása



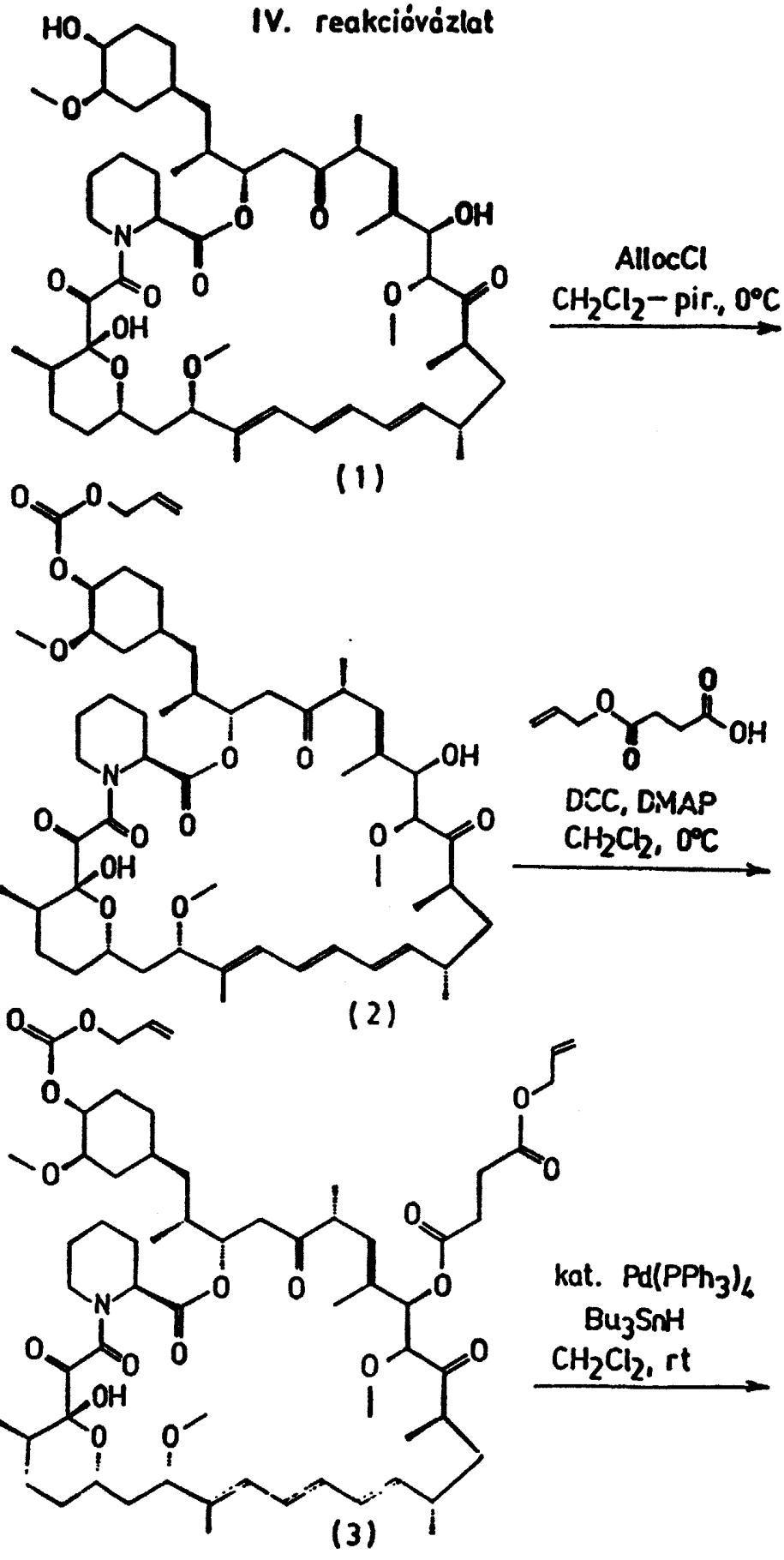
(4)

N-hidroxi-szukcinimid
EDC, kat. DMAP
CH_2Cl_2, rt

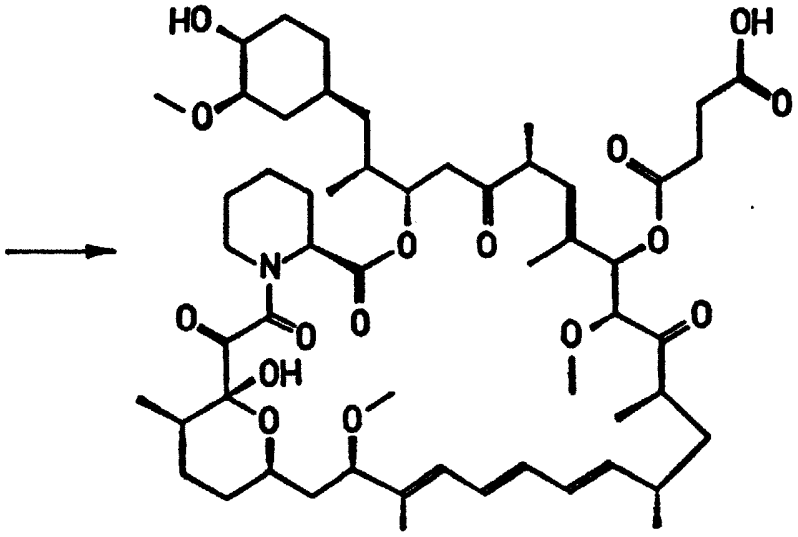


(5)

IV. reakcióvázlat

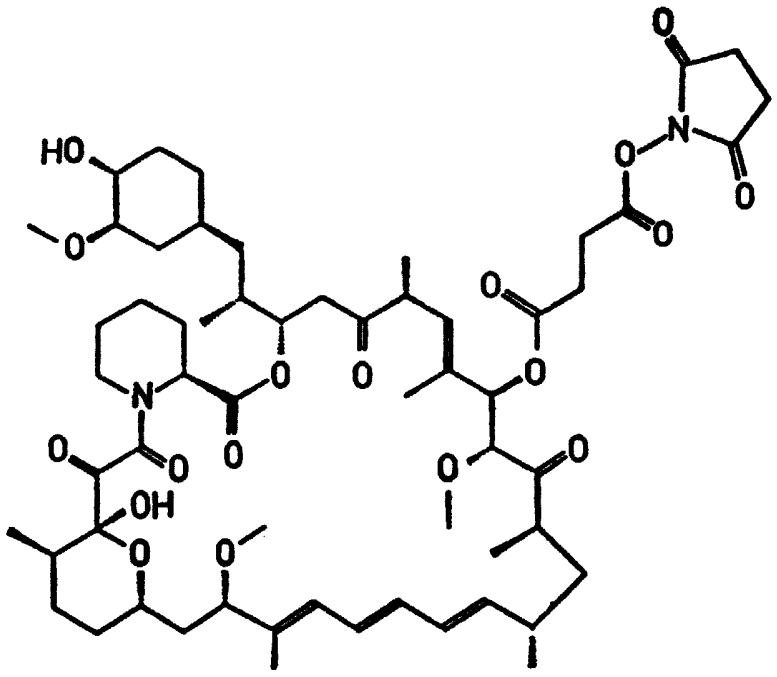


IV. reakcióvázlat folytatása

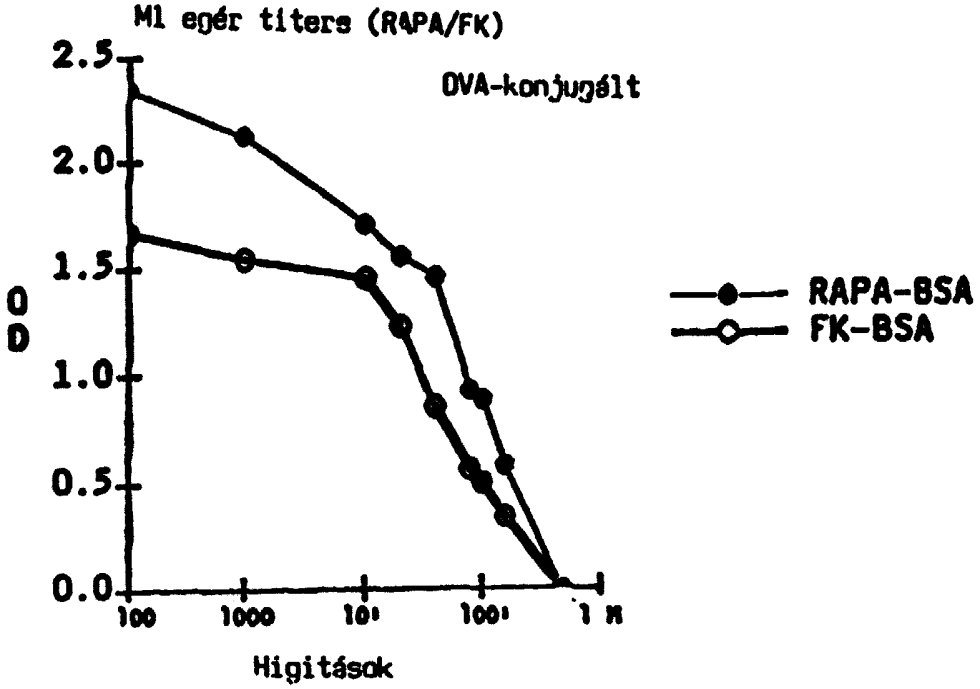


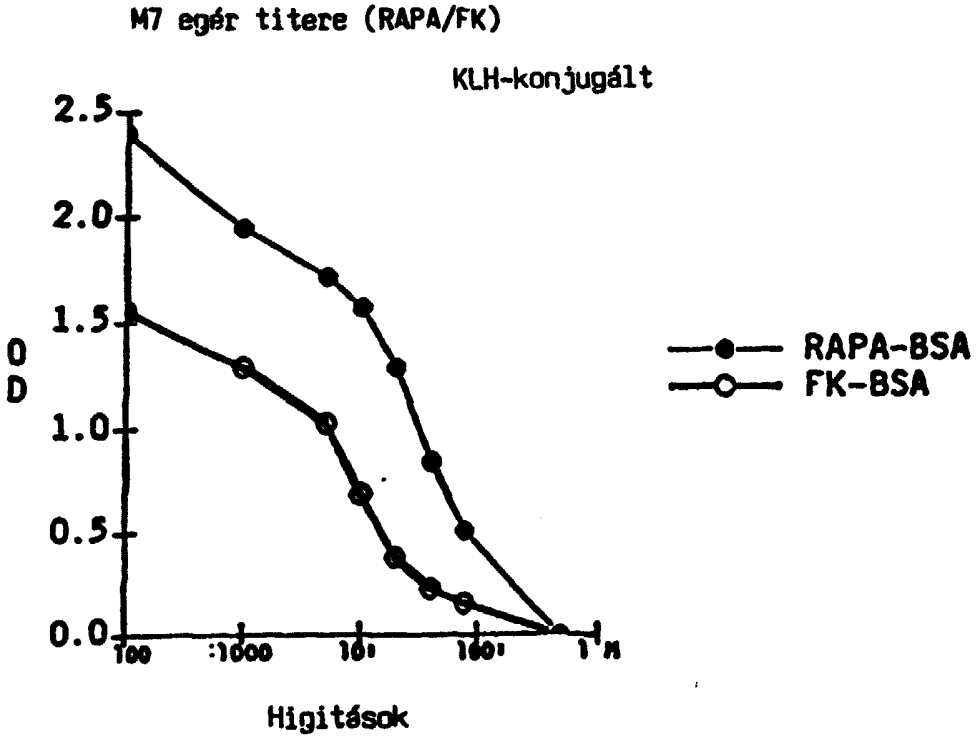
(4)



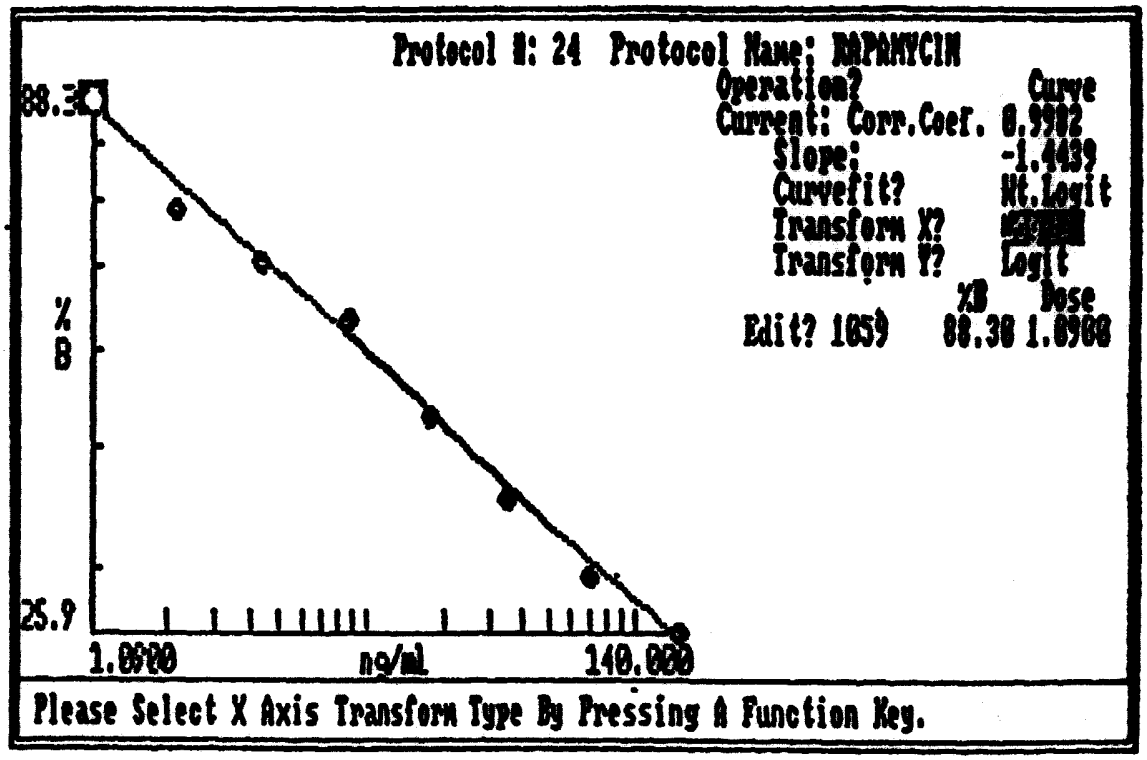


(5)


M1 egér titere (RAPA/FK)
OVA-konjugált
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD
100
1000
10¹
100¹
1 M
Higitások
RAPA-BSA
FK-BSA

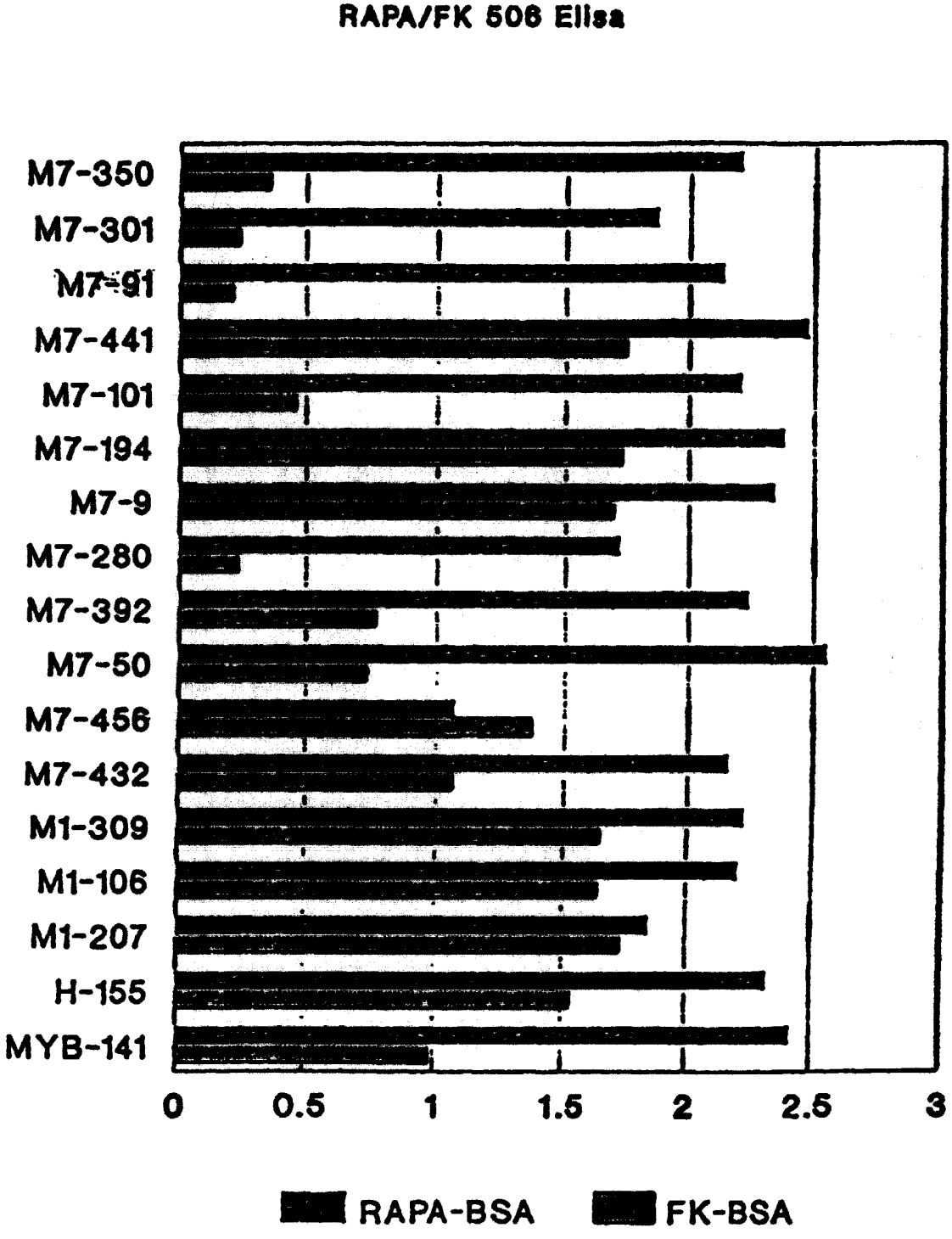

M7 egér titere (RAPA/FK)
KLH-konjugált
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD
100
:1000
10¹
100¹
1 M
Higitások
RAPA-BSA
FK-BSA

1. ábra

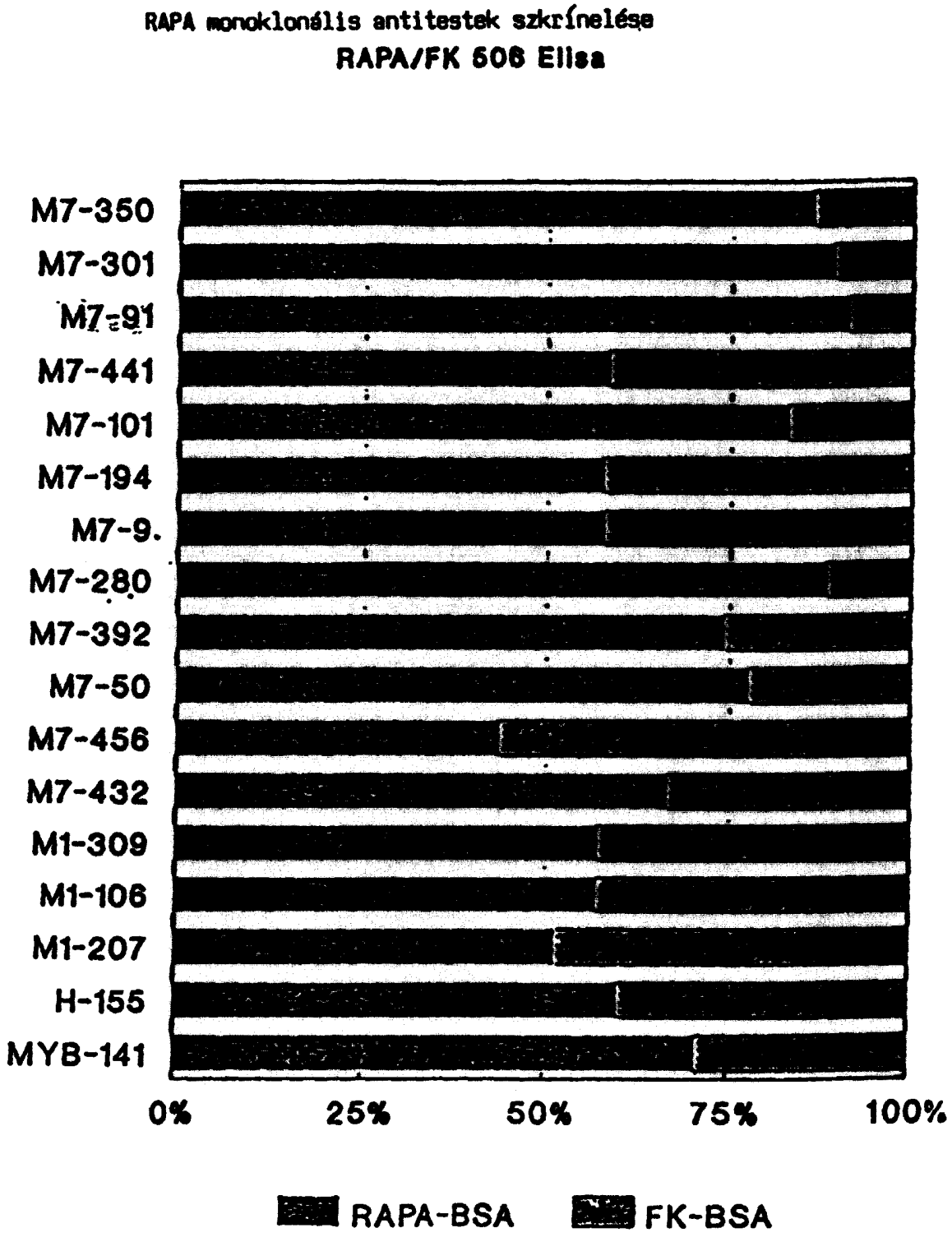

Protocol #: 24 Protocol Name: RAPAMYCIN
Operation? Curve
Current: Corr.Coef. 0.9982
Slope: -1.4439
Curvefit? Mt.Logit
Transform X?
Transform Y? Logit
%B Dose
Edit? 1059 88.30 1.0900
88.3
%
B
25.9
1.0900
ng/mL
140.000
Please Select X Axis Transform Type By Pressing A Function Key.

2. ábra

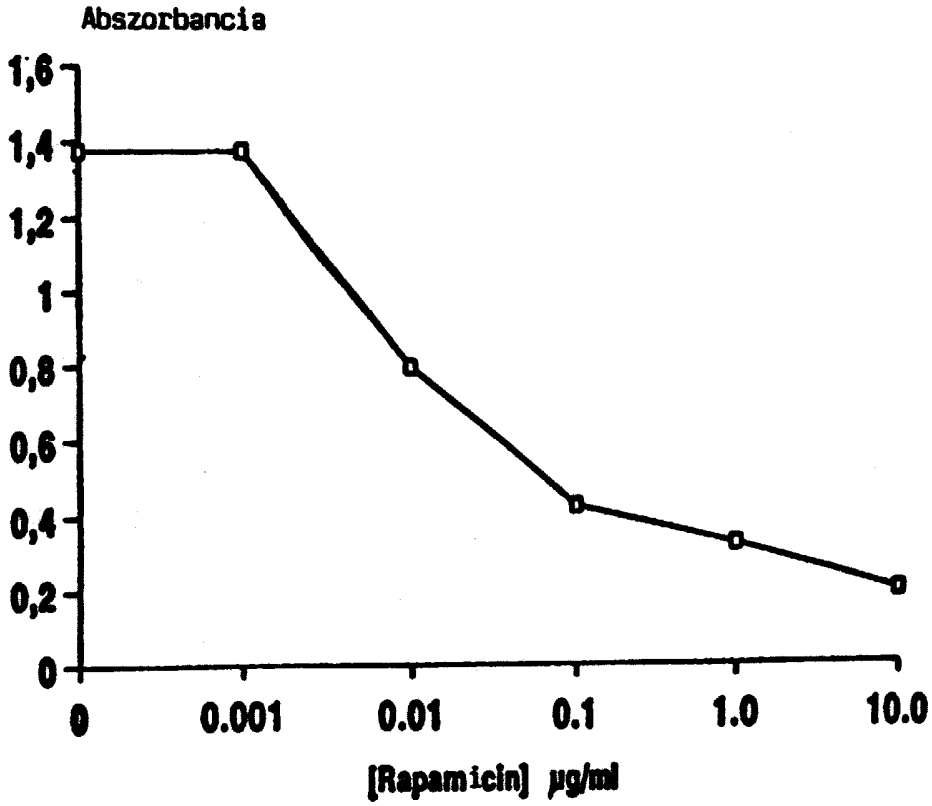
RAPA monoklonális antitestek szkrínelése



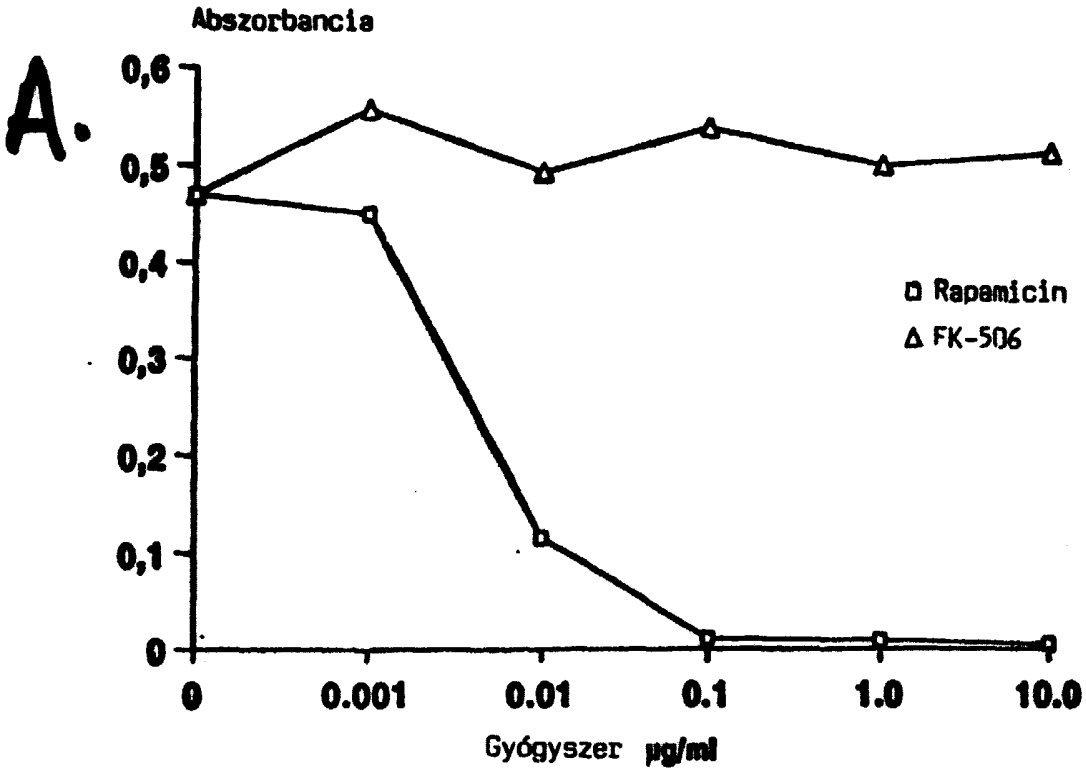
3. ábra


RAPA monoklonális antitestek szkrínelése
RAPA/FK 506 Elisa
M7-350
M7-301
M7-91
M7-441
M7-101
M7-194
M7-9.
M7-280
M7-392
M7-50
M7-456
M7-432
M1-309
M1-106
M1-207
H-155
MYB-141
0%
25%
50%
75%
100%
RAPA-BSA
FK-BSA

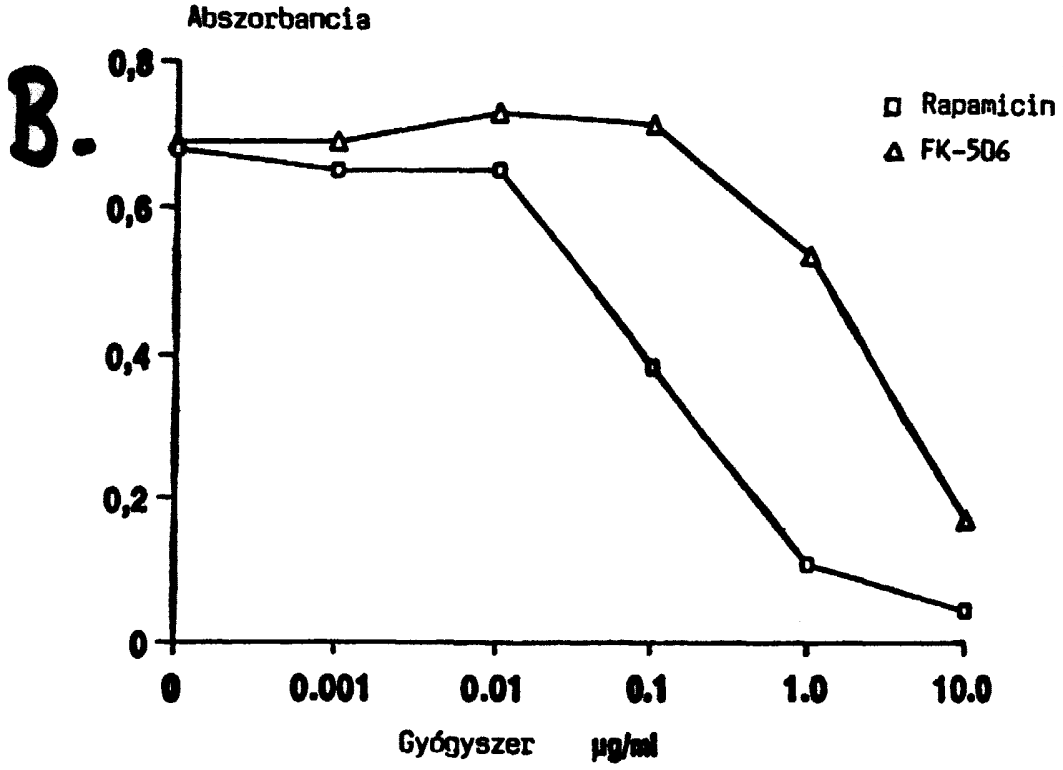
4. ábra


Abszorbancia
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
0.001
0.01
0.1
1.0
10.0
[Rapamicin] µg/ml

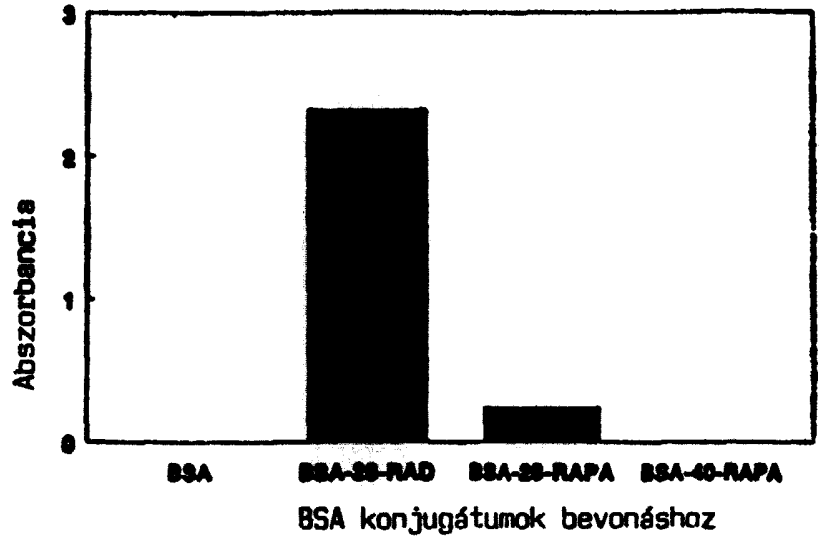
5. ábra



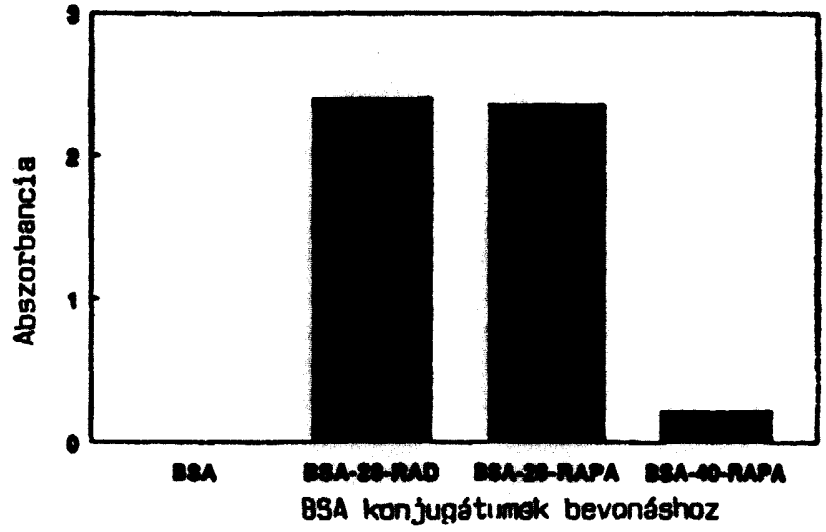
MAb M1.303.3



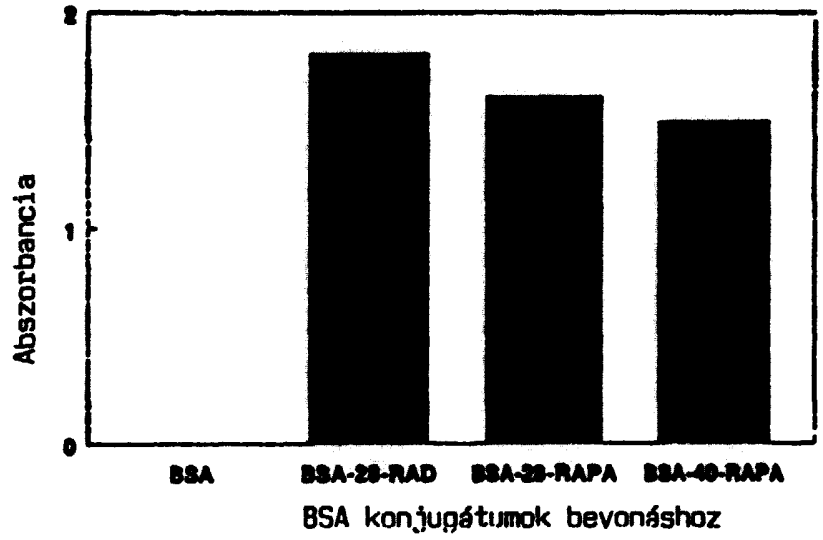
6. ábra


Abszorbancia
0
1
2
BSA
BSA-28-RAD
BSA-28-RAPA
BSA-40-RAPA
BSA konjugátumok bevonáshoz

A

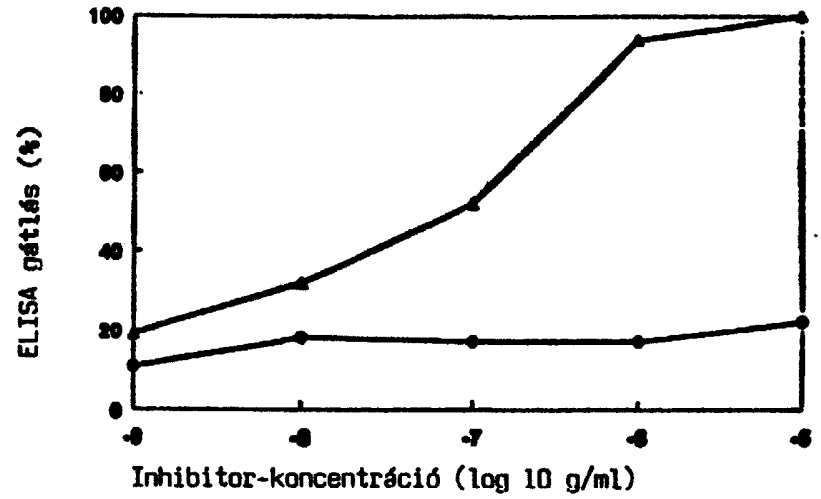

Abszorbancia
0
1
2
BSA
BSA-28-RAD
BSA-28-RAPA
BSA-40-RAPA
BSA konjugátumok bevonáshoz

B

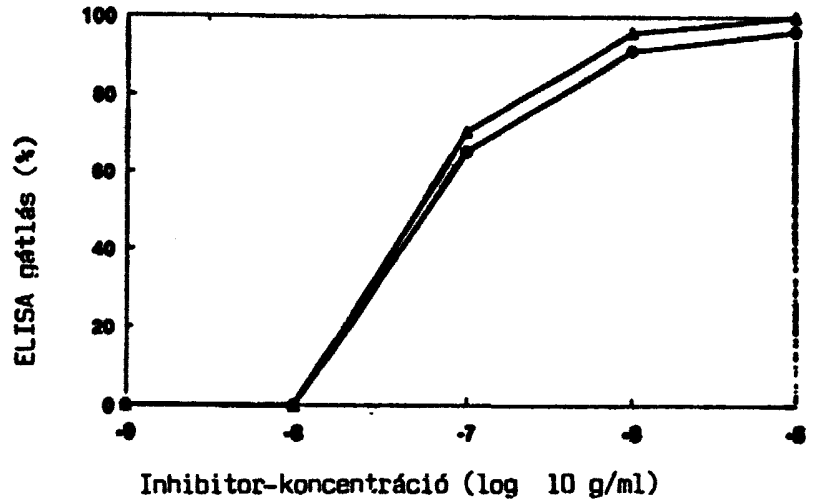

Abszorbancia
0
1
2
BSA
BSA-28-RAD
BSA-28-RAPA
BSA-40-RAPA
BSA konjugátumok bevonáshoz

C

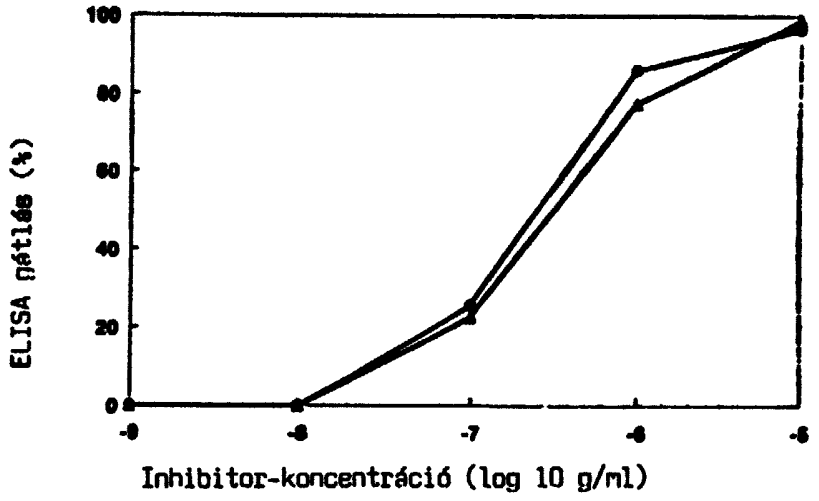
7. ábra



A



B



C

8. ábra

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Törőcsik Zsuzsanna főosztályvezető-helyettes
Windor Bt., Budapest