

P 0 3 0 3 5 1 1

07 1 95 A2

HAS-HATÓANYAG-KONJUGÁTUMOK, ELJÁRÁS AZ ELŐÁLLÍTÁSUKRA
ÉS ALKALMAZÁSUK
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

K I V O N A T

A találmány hidroxialkil-keményítőt (HAS) és hatóanyagot tartalmazó konjugátumokra vonatkozik, amelyekben a hidroxialkil-keményítő közvetlenül vagy linkerén keresztül kovalensen kapcsolódik a hatóanyaghoz. A találmány továbbá kovalens HAS-hatóanyag-konjugátum előállítására alkalmas eljárásra vonatkozik, amelynek során hatóanyagot és hidroxialkil-keményítőt reakcióközegben reagáltatnak. Az eljárásra jellemző, hogy a reakcióközeg víz vagy vízből és szerves oldószerből álló, legalább 10 tömeg% vizet tartalmazó elegy. A találmány a konjugátumok gyógyászati alkalmazására is vonatkozik.

R

A találmány hidroxialkil-keményítőt (HAS) és hatóanyagot tartalmazó konjugátumokra vonatkozik, amelyekben a hidroxialkil-keményítő közvetlenül vagy linkerén keresztül kovalensen kapcsolódik a hatóanyaghoz. A találmány továbbá kovalens HAS-hatóanyag-konjugátum előállítására alkalmas eljárásra vonatkozik, amelynek során hatóanyagot és hidroxialkil-keményítőt reakcióközegben reagáltatunk. Az eljárásra jellemző, hogy a reakcióközeg víz vagy vízből és szerves oldószerből álló, legalább 10 tömeg% vizet tartalmazó elegy. A találmány a konjugátumok gyógyászati alkalmazására is vonatkozik.

Műszaki háttér

Számos farmakon klinikai alkalmazását problémák egész sora nehezíti (lásd Delgano és mtsai, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, Vol. 9 (3, 4), (1992), 249-304. old.). Parenterálisan beadott natív proteinek például a retikulo-endotéliás rendszeren, a májon, vesén és lépén keresztül kiválasztódnak. A kiválasztás a szénhidrát-láncok töltésétől, a proteint kötni képes sejtreceptorok jelenlététől és a molekula formájától és méretétől függ. A vese glomulár-szűrésének kizárási határa például kb. 67 kD.

A proteolitikus lebontás következményeként továbbá a biológiai aktivitás gyors csökkenése figyelhető meg.

Baktériumban exorimált proteinek, valamint más rekombináns proteinek fokozott immunigenitással rendelkezhetnek és életveszélyes túlérzékenységi reakciókat válthatnak ki. Az ilyen reakciók természetesen ezeknek a proteineknek a gyógyászati alkalmazását megakadályozzák.

A fenti okból már a hetvenes évek vége óta rendszeres kutatások folytak exogén proteinek tulajdonságainak kémiai módosítástól, főleg polimerizálástól vagy makromolekulás polimerhez történő kapcsolástól remélt javítása ügyében. Számos

munkalat proteinekből vagy egyéb hatóanyagból és polietilén-glikólból (PEG) álló konjugátumok előállítására összpontosított (vö: US 4 179 337). A kapcsolási reakciótól remélt előnyök: a proteinek javított in vivo felezési ideje, csökkentett toxicitás, javított stabilitás és a hatóanyagok jobb oldhatósága (Abuchowski és Davis, *Enzymes as drugs*, Holcenberg és Rubberts, kiadók, 367-383. old., John Wiley & Sons N.Y. 1981).

A hatóanyagok összekapcsolására szolgáló eljárás azonban problémásnak bizonyult, mert a protein aktív csoportja, mielőtt PEG-hez csatlakozott, elvesztette aktivitását, vagy a reakciók a terméket csekély hozammal szolgálták. A hatóanyag aktivitását nem csökkentő, fajlagos kötés kialakítása érdekében a PEG-be vagy a hatóanyagba aktív csoportokat építettek be, vagy linkerrel kötötték össze a két komponenst. A PEG-et általában aktív csoporttal látják el, amely kovalensen a protein kapcsolás kialakítására képes csoportjához kötődik.

Leírták, hogy antitestek és fragmenteik kötési aktivitása a PEG-kapcsolás után csökkent (Kitamura és mtsai, *Cancer Res.*, Vol. 51 (1991), 4310-4315. old.; Pedley és mtsai, *Br. J. Cancer*, Vol. 79 (1994), 1126-1130. old.). Ennek a problémának a megoldására Chapman és mtsai (*Nature Biotech.*, Vol. 17 (1999), 780-783. old.) azt javasolták, hogy a PEG-et az antitest meghatározott kötőhelyeihez kellene kötni.

A kapcsolási partner aktivitásvesztését a WO 95/13090 sz. közzétett nemzetközi bejelentésben is leírják. Megoldásként ott azt javasolják, hogy a PEG-et reakcióképes csoporttal aktiválni, majd ezen a reakcióképes csoporton keresztül tenzid jelenlétében α -interferonhoz kötni kell. Előnyös reakcióképes csoportként az N-szukcinimid-karbonátot nevezik meg, amely az említett körülmények között a lizin ϵ -aminocsoportjával uretán-kötést létesítene.

Polimer-polipeptid-konjugátum előállítására a WO 96/41813 is ismertet eljárást, amelynek során a polimer (különösen PEG) fajlagos helyen deriválják, majd

polipeptidhez kapcsolják. Előnyösen amino-oxi-acetil-csoportot visznek be a PEG-be, és az így kapott vegyületet utána polipeptidhez, különösen IL-8, hG-CSF és IL-1 polipeptidhez kapcsolják.

Az irodalomban tehát megfelelő konjugátumok egész sora található; vö. az US 4 179 337 szerinti PEG-inzulin-konjugátumok, az US 4 412 989 szerinti bovine PEG-hemoglobin-konjugátumok; PEG-ribonukleáz-konjugátumok és PEG-szuperoxid-dizmutáz-konjugátumok (Veronese és mtsai, *Applied Biochem. Biotech.*, Vol. 11, 141-152 (1995)), az US 4 766 106 szerinti PEG-IL-2-konjugátumok és PEG-IFN- β -konjugátumok, a WO 90/15628 szerinti PEG-polimixin-konjugátumok és a WO 90/07939 szerinti PEG-IL-2-konjugátumok. Néhány konjugátum ezóta klinikai alkalmazást nyert. Például az aszparagináz enzim tulajdonságait a PEG-gel történő konjugátumképzéssel lehetett javítani, és egy PEG-aszparagináz-konjugátum az Oncaspar[®] márkanéven rákterapeutikumként a kereskedelmi forgalomban kapható. Az US Food and Drug adminisztráció nemrég PEG-hez kapcsolt G-CSF-et engedélyezett (Pegfilgastim). Számos további PEGilezett termék a klinikai fejlesztés különböző fázisaiban van, például PEG-CDP870, PEG-dronabinol stb (vö.: PEG-pipeline a www.enzon.com vagy www.inhale.com címen).

Nemcsak proteineket, hanem más vegyületek is a fenti vázlat szerint PEG-hez és más polimerekhez kapcsoltak. WO 97/33552 és WO 97/38727 szerint például Paclitaxelt PEG-hez kapcsoltak, a kapott konjugátum tumorok kezelésére alkalmas. Egy PEG-Camptothecin-konjugátum tumorok kezelésére való alkalmazását az Enzon cég az I. klinikai fázisban vizsgálja.

Antibiotikumokat is kapcsoltak már PEG-hez. Így például Dowling és Russell egy ortotetraciklin-PEG-konjugátum farmakológiai kinetikájáról írnak (*J. Vet. Pharmacol. Ther.*, Vol. 23 (2000), 107-110). Újabb funkciók kialakítása céljából a technika állása szerint antibiotikumokat más módon is átalakítottak. Késleltetett ható-

anyag leadású penicillinként például prokain-penicillin-származékot, azaz a penicillin prokain-bázissal alkotott sóját állították elő. Ez a származék hosszabb hatásidővel rendelkezik és például a szifilisz kezelésére alkalmazzák.

Két vegyületnél több kapcsolási partnerrel végzett kapcsolási reakciókat szintén már leírtak. A WO 93/23062 sz. nemzetközi közzétételi iratban például olyan kapcsolási ztermék előállítását írják le, amely B-sejt-limfom elleni antitestből, aktivált GEG-ből és toxinból áll.

A PEG-hatóanyag-konjugátumok azonban nem rendelkeznek olyan természetes szerkezettel, amelyről az in vivo lebontás menete ismert volna. Egyebek között ez az oka annak, hogy a PEG-konjugátumok mellett a fent említett problémák megoldására más konjugátumokkal és protein-polimerizátumokkal is kísérleteztek. Így különböző proteinek térhálósítására, proteinek makromolekulákhoz történő kötésére számos eljárás létezik (összefoglaló áttekintést ad S.S. Wong, „Chemistry of protein conjugation and cross linking”, CRC, Inc. (1993)).

A hidroxietil-keményítőt (HES) egy természetesen előforduló amilopektin származékaként az α -amiláz a testben lebontja. A HES-protein-konjugátumok előállítását is leírták már a technika állásában (vö.: DE 26 16 086 vagy DE 26 46 854 szerinti HES-hemoglobin-konjugátumok).

A hemoglobin olyan protein, amelynek vérpótlóként és oxigén-transzportáló szerként (un. „Hämoglobin-Based-Oxygen Carrier”, HBOC) nagy klinikai jelentősége lehetne. Bár az ilyen termékek iránti keresletet már korán felismerték (vö.: Rabiner, J. Exp. Med. 126, (1967), 1127), mindezt az ismert HBOC-termékek egyike sem érte el az engedélyezett gyógyszer státuszát.

A természetes hemoglobin két α - és β -peptidláncból áll, amelyek prostetikus csoportként egy-egy hémot kötnek meg. Az izolált hemoglobin-molekulák azonban nagyon instabilak, gyorsan a stabilabb α, β -dimerré bomlanak (móltömeg 32 kDa).

Vérkeringésben az izolált hemoglobin felezési ideje kb. 1 óra, mert a dímerek a vesén keresztül gyorsan kiürülnek. Ennek során a dímerek toxikus mellékhatásokat fejtenek ki a vesére (vö.: Bunn & Jandl, J. Exp. Med. 129, (1967), 925-934). Ezért átalakított hemoglobin-molekulákkal foglalkozó kutatások elsősorban a hemoglobin intramolekuláris térhálósítására, polimer HBOC-formák létrehozására intramolekuláris és/vagy polimerekkel való összekapcsolására koncentráltak.

Az ismert hemoglobin-konjugátumokat például Xue és Wong (Meth. in Enzymol., 231 (1994), 308-322. old.) és DE 26 16 086, valamint DE 26 46 854 írja le. A DE 26 46 854 eljárást is ismertet, amellyel hemoglobin HES-hez kapcsolható. Ezzel szemben a DE 26 16 086 szerinti eljárásban először HES-hez térhálósítószer (például brómciánt), majd az így kapott közbenső termékhez a hemoglobint kapcsolják.

HES a kukoricakeményítő 95 %-át kitevő amilopektin szénhidrát-polimer szubsztituált származéka. HES előnyös reológiai tulajdonságokkal rendelkezik és jelenleg térfogatpótlóként és a hemodilúciós terápiában klinikailag alkalmazzák (Sommermeyer és mtsai, Krankenhauspharmazie, Vol. 8(8), (1987), 271-278. old.; Weidler és mtsai, Arzheim.-Forschung/Drug Res., 41, (1991) 494-498. old.).

Az amilopektin glükóz-egységekből áll, és a fő láncokban α -1,4-glikozid kötések vannak, míg az elágazási helyeken α -1,6-glikozid kötések vannak jelen. A molekula tulajdonságait lényegében a glikozidos kötések milyensége határozza meg. A lehajlott α -1,4-glikozidos kötés miatt spirál jellegű szerkezet jön létre, egy fordulatban kb. 6 glükóz-monomerrel.

A polimer fizikai-kémiai tulajdonságai, de a biokémiai tulajdonságai is szubsztituálással megváltoztatható. A hidroxietil-csoport lúgos hidroxietilezéssel érhető el. A reakciókörülményeken keresztül ki lehet használni, hogy a



szubsztituálatlan glükózmonomer hidroxilcsoportjainak a hidroxietilézéssel szembeni reaktivitása különböző, így korlátozottan lehet befolyásolni a szubsztituálási mintát.

A fentiek miatt HES jellemzésére lényegében a móltömegeloszlás és a szubsztitúciós fok szolgál. A szubsztitúciós fokot vagy DS-ként (degree of substitution”) határozzák meg, ez a szubsztituált glükózmonomerek részarányát adja meg az összes glükóz-egységre vonatkoztatva, vagy MS-ként (”molar substitution” definiálják, azzal az egy glükóz-egységben lévő hidroxietil-csoportok számát adják meg.

HES-oldatok polidiszperz rendszerek, amelyekben az egyes molekulák a polimerizációs fokban, az elágazási helyek számában és elhelyezkedésében, valamint a szubsztituálási mintában különböznek. HES tehát különböző móltömegű vegyületek elegye. Ennek megfelelően egy HES-oldatra jellemző egy átlagos móltömeg, statisztikai mennyiségek alapján. M_n az egyszerű számtani középérték a molekulák számának függvényében, míg M_w a súlyátlag a tömegtől függő mennyiség.

Proteinek és HES között eddig azért nem sikerült szelektív kémiai kötést kialakítani, mert a HES aktiválása nem szelektív lefolyású. Ezért a technika állásából ismert protein-HES-konjugátumok brómciánnal aktivált HES és hemoglobin nem-szelektív kapcsolásából jönnek létre (vö.: DE 26 16 086). Az ilyen eljárások egyenletlen tulajdonságú, polidiszperz termékekhez vezethetnek, amelyeknek potenciálisan toxikus mellékhatásai is lehetnek.

Hashimoto (Hashimoto és mtsai, *Kunststoffe, Kautschuk, Fasern*, Vol. 9 (1992), 1271-1279. old.) elsőnek írt le olyan eljárást, amellyel egy szacharid terminális, redukáló aldehid-csoportját szelektív módon oxidálni sikerült, reakcióképes észter (lakton) keletkezése közben.

Ennek az eljárásnak az alapján a WO 98/01158 kitanítása, hogy olyan hemoglobin-hidroxietil-keményítő-konjugátumok állíthatók elő, amelyekben a hemog-

lobin szabad aminocsoportjai és a HES oxidált formában jelen lévő terminális redukáló csoportja között kialakított amidkötésen keresztül hemoglobin és HES szelektív módon van összekapcsolva. Mind a Hashimoto és mtsai eljárása, mind a WO 98/01158 szerinti eljárás szacharid (HES) és protein (hemoglobin) szerves oldószerben végzett reagáltatásán alapul. Konkrétan dimetil-szulfoxid ot alkalmaztak.

Szakember azonban tudja, hogy számos protein szerves oldszerben szerkezetváltozást szenved, amely vizes oldatban nem áll helyre. Általában a szerkezetváltozás aktivitásvesztéssel is jár. Mindenképpen a szerves oldószer bonyolult módon el kell távolítani, mert a tervbe vett gyógyászati alkalmazás szempontjából lehet, hogy oldószeranyagok sem elfogadhatók. A tervbevetett alkalmazásra való tekintettel már a protein szennyeződésének és szerkezetváltozásának potenciális lehetőségét ki kell zárni.

A találmány feladata tehát javított hidroxialkil-keményítő-hatóanyag-konjugátumok és előállításukra szolgáló eljárás kifejlesztése, amely eljárás biológiailag aktív konjugátumokhoz vezet, amelyek a klinikai hétköznapi alkalmazhatók. A találmány egy további feladata a hidroxialkil-keményítő-hatóanyag-konjugátumok előállítására alkalmas olyan eljárás kifejlesztése volt, amelynek során melléktermékek csak lényegtelen mértékben keletkeznek, mert a melléktermékek a termék tisztítását tetemesen nehezítik.

A fenti feladatot meglepő módon olyan vegyületekkel oldottuk meg, amelyek hidroxialkil-keményítőtől és hatóanyagból álló konjugátumot tartalmaznak, és a hidroxialkil-keményítő vagy közvetlenül, vagy linkerén keresztül kovalensen kapcsolódik a hatóanyaghoz. Az ilyen HAS-hatóanyag-konjugátumokat például úgy állíthatjuk elő, hogy HAS-t és hatóanyagot reakcióközegben reagáltatunk egymással, és a reakcióközeg víz vagy víz és szerves oldószer legalább 10 tömeg% vizet tartalmazó elegye.



A találmány továbbá kovalens HAS-hatóanyag-konjugátum előállítására alkalmas eljárásra vonatkozik, amelynek során HAS-t és legalább egy hatóanyagot vizes reakcióközegben egymással reagáltatunk. Az eljárásra jellemző, hogy a reakcióközeg víz vagy víz és szerves oldószer legalább 10 tömeg% vizet tartalmazó elegye.

Előnyösen a HAS-t a hatóanyaghoz való kapcsolása előtt oxidáljuk; ezen belül a redukáló terminális csoportok fajlagos oxidálása különösen előnyös. Alternatív módon a kapcsolat HAS és aminocsoportot hordozó hatóanyag között Schiff-bázist mint közbenső terméket alakítva is lehetséges. Ezt a közbenső terméket utána metilénaminocsoport képződése mellett redukáljuk.

Az ábrák rövid ismertetése

1. ábra az ox-HES 130 kD és HSA közötti, az A.III eljárás szerinti kapcsolási reakciójának GPC-kromatogramja;
2. ábra az ox-HES 130 kD és HSA közötti, az A.IV eljárás szerinti kapcsolási reakciójának GPC-kromatogramja;
3. ábra az ox-HES 130 kD és HSA közötti, az A.V eljárás szerinti, 2 óra reakcióidejű kapcsolási reakciójának GPC-kromatogramja;
4. ábra az ox-HES 130 kD és HSA közötti, az A.V eljárás szerinti, egy éjszaka reakcióidejű kapcsolási reakciójának GPC-kromatogramja;
5. ábra az ox-HES 10 kD és HSA közötti, az A.V eljárás szerinti, 2 óra (5a. ábra), ill. egy éjszaka (5b. ábra) reakcióidejű kapcsolási reakciójának GPC-kromatogramja;
6. ábra az ox-HES 130 kD és HSA közötti, az A.VII eljárás szerinti, 24 óra reakcióidejű kapcsolási reakciójának GPC-kromatogramja;
7. ábra az ox-HES 130 kD és HSA közötti, a B. V eljárás szerinti kapcsolási reakciójának GPC-kromatogramja;

8. ábra HES és HSA közötti különböző kapcsolási reakciók SDS-PAGE-dzse és Western Blot-ja
9. ábra HES és HSA közötti különböző kapcsolási reakciók SDS-PAGE-dzse és Western Blot-ja
10. ábra HES-DNS-konjugátum előállításának reakcióvázlata;
11. ábra gél felvétele, amelyen HES-DNS-konjugátumok láthatók restrikciós enzimmal végzett emésztés előtt és után.

A jelen találmány első ízben olyan vegyületeket állít rendelkezésre, amelyek hidroxialkil-keményítőből és hatóanyagból álló konjugátumot tartalmaznak, és a hidroxialkil-keményítő vagy közvetlenül, vagy linkerén keresztül kovalensen kapcsolódik a hatóanyaghoz. A találmány továbbá olyan HAS-hatóanyag-konjugátumokat állít rendelkezésre, amelyek előállítása során HAS-t és legalább egy hatóanyagot vizes reakcióközegben reagáltatunk egymással. Az eljárásokra jellemző, hogy a reakcióközeg víz vagy víz és szerves oldószer legalább 10 tömeg% vizet tartalmazó elegye.

A jelen találmány keretében kémiai vegyületet hatóanyagnak nevezünk, ha a vegyület alkalmas arra, hogy terápiás vagy diagnosztikai célú tetszőleges készítmény aktív alkotórésze legyen. Előnyösen a hatóanyag egy gyógyászati készítmény aktív alkotórésze, azaz a gyógyászati készítményben az a vegyület, amely beadás után az alanyban fiziológiai hatást fejt ki.

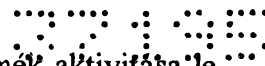
Az engedélyezett gyógyászati készítmények és hatóanyagaik vonatkozásában áttekintést nyújt a Vörös lista. A Vörös listában szereplő hatóanyagok a találmány szerinti eljárás szerint előállított HAS-hatóanyag-konjugátumokban alkalmazhatók. A találmány értelmében a hatóanyag fogalom azonban mindazokat a vegyületeket is foglalja magában, amelyek diagnosztikai vagy terápiás alkalmazásra való alkalmasságát ismert ugyan, de a fent vázolt problémák miatt eddig a jelzett célra nem nyertek

alkalmazást. A hatóanyag előnyösen vitamin, oltóanyag, toxin, antibiotikum (vagy antiinfektívum), antiaritmikum, étvágycsökkentő, érzéstelenítő, fájdalomcsillapító, reuma elleni hatóanyag, allergia ellen hatásos anyag, asztma elleni hatóanyag, depresszió, cukorbetegség elleni hatóanyag, antihisztaminikum, vérnyomáscsökkentő vagy antineoplasztikum. Szerkezetileg a hatóanyag lehet például hormon, szteroid, lipid, protein, oligo- vagy polipeptid, nukleinsav, különösen D- vagy L-nukleinsav, így például D-DNS, L-DNS, D-RNS vagy L-RNS. Proteinek, peptidek, D- vagy L-nukleinsav HAS-kapcsolási partnerkénti alkalmazása különösen előnyös.

A jelen találmány szerint előállított vegyületek a hatóanyag aktivitását és a HAS előnyös tulajdonságait megőrzik. További előnyként a találmány szerinti konjugátumok esetén a hatóanyagok in vivo felezési ideje jobb, toxicitásuk kisebb, stabilitásuk és/vagy a hatóanyag oldhatósága jobb.

Beadás után a plazmában a HAS-láncot α -amiláz rövidíti. A kapcsolási termék aktivitása tehát a natív kapcsolási termék aktivitásaként, azaz közvetlenül a kapcsolat után, vagy pedig a metabolizált kapcsolási termék aktivitásaként, azaz a kapcsolási termék in vivo metabolizálása után határozható meg. Az in vivo metabolizálás in vitro bontással szimulálható.

A hatóanyag aktivitása a technika állásából erre a hatóanyagra ismert eljárásokkal határozható meg. Egy antineoplasztikum esetén az aktivitást például gátló koncentrációként (IC), antiinfektív szer esetén minimális gátló koncentrációként (MHK) határozzák meg. A meghatározás előnyösen in vitro alkalmas célsejteken történik (vö. Chow és mtsai, Haematologica, Vol. 86 (2001), 485-493. old.). Az in vitro hatások továbbá releváns állatmodellel erősíthetők meg (például a vesesejt-karcinom egérmodelje, amelyet Changnon és mtsai írtak le, vö. BJU Int., Vol. 88 (2001), 418-424. old.).



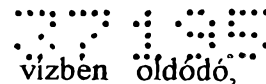
A kapcsolatlan anyaghoz viszonyítva a natív kapcsolási termék aktivitása lehet fokozott vagy csökkent. Az aktivitás csökkenése azonban előnyösen egy ötötnél kisebb, különösen előnyösen egyharmadnál vagy a felénél nem nagyobb. A metabolizált termék aktivitása előnyösen a kapcsolatlan anyagéhoz hasonló, azaz a metabolizált konjugátum aktivitása előnyösen a kapcsolat előtti hatóanyag aktivitásának legalább 50 %-a, előnyösen legalább 75 %-a; az aktivitás legalább 95 %-ának a megtartása különösen előnyös.

A találmány keretében a „hidroxialkil-keményítő” fogalommal olyan keményítő-származékokat jellemezzük, amelyek 1-3 szénatomos hidroxialkilcsoporttal szubsztituáltak. A „hidroxialkil-keményítő”-nek nevezett anyagcsoport tehát hidroximetil-keményítőt, hidroxietil-keményítőt és hidroxipropil-keményítőt foglal magában. A hidroxietil-keményítő (HES) kapcsolási partnerkénti alkalmazása a találmány minden megvalósítási alakjában különösen előnyös.

A találmány szerint előnyös, ha a hidroxietil-keményítő átlagos móltömege 1-300 kDa, a 5 kDa és 200 kDa közötti átlagos móltömeg különösen előnyös. A hidroxietil-keményítő mólos szubsztitúciós foka továbbá 0,1-0,8, a C₂:C₆ szubsztitúció aránya 2-20 lehet, a hidroxietil-csoportokra vonatkoztatva.

A hatóanyag és a HAS kapcsolása során első lépésként szükséges lehet egy aktív csoport bevezetése a hatóanyagba és/vagy a hidroxialkil-keményítőbe. Alkalmas aktív csoportok lehetnek például tiol- vagy aminocsoportok (lásd kiviteli példák).

A hatóanyag és HAS továbbá linker alkalmazásával is egymáshoz kapcsolható. Linkerként tetszőleges térhálósítószer alkalmazhatunk. Számos térhálósítószer, például SMCC [szukcinimidil-4-(N-maleimido-metil)-ciklohexán-1-karboxilát; lásd 7. példa] a kereskedelmi forgalomban kapható és szakember számára ismert (vö.: a „Cross-linking Reagents” alfabetikus listáját a Perbio cég termékkatalogusban és www.piercenet.com).



A jelen találmány egyik megvalósítási alakja szerint vízben oldódó, aminocukort tartalmazó antibiotikum-származékokra, különösen HAS-daunorubicin- és HAS-doxorubicin-konjugátumokra, valamint előállításukra - amennyiben a DE 101 29 369 említi azokat - a találmány nem terjed ki.

Egy előnyös kiviteli alak szerint a jelen találmány HAS-ból és antineoplasztikumból álló konjugátumot tartalmazó vegyületekre és tumorok kezelésére való alkalmazásukra vonatkozik.

A tumorsejtek a rendes testsejtektől egyebek között abban különböznek, hogy a fiziológiai növekedési ellenőrzés a tumorsejtekre nem hat, így sejtosztásuk szaporább. Ezen a különbségen alapul az antineoplasztikumok alkalmazása a tumorok kezelésében, tekintettel arra, hogy az antineoplasztikumok toxikus hatása első sorban proliferáló sejtek ellen irányul. Antineoplasztikumnak vagy citostatikumnak egy vegyületet akkor neveznek, ha proliferáló sejtek ellen toxikus aktivitást fejt ki (az onkológia alapjait és jelenkori terápiás módszereit például az Internistische Onkologie, Schmoll és mtsai (kiadók), Springer 1996, publikáció foglalja össze).

Kémiaailag az antineoplasztikus hatóanyagok igen heterogén csoportot képeznek. A proliferáció gátlása mellett az elmúlt évek az apoptóz indukálása, a programozott sejthalál került előtérbe. Az antineoplasztikus hatóanyagok rendszerezése például a kritikus célmolekulákon keresztül történhet (Schmoll és mtsai, a fent megadott helyen):

- (1) Vegyületek, amelyek a DNS-bioszintézist gátolják, például anti-anyagcseretermékekkel, így MTX, 5-FU, Ara-C vagy hidroxikarbamid;
- (2) vegyületek, amelyek a DNS-re hatnak, például szálszakadás indukálásával, interkalációval, a szálak közötti kapcsolatok megváltoztatásával, topoizomeráz-mérgek, így alkilezőszerek, platina-komplexek, antraciklinek, bleomicin, aktinomicin D vagy epipodofillotoxinok;

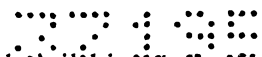


- (3) vegyületek, amelyek az RNS-ra hatnak, például az mRNS-szintézis interkalációval vagy RNS-be való beépüléssel okozott blokkolása, ilyenek antraciklinek, bleomicin, aktinomycin D vagy anti-anyagcseretermékek;
- (4) vegyületek, amelyek proteinekre hatnak, például receptorhoz kötés szintjén (például hormonok vagy antagonisták), a tubulin-polimerizáció gátlásával (például vinka-alkaloidokkal), protein térhálósításával (például alkilezőszerrel) vagy foszforilezéssel (például proteinkináz-C-inhibitorokkal).

Az antineoplasztikus aktivitás alapján az összes ilyen hatóanyag lényeges mellékhatásokat fejt ki, amelyek elsődlegesen gyorsan proliferáló szövetek gátlásában nyilvánul meg. Így különösen az eritro-, leuko- és trombopoiesis, valamint a nyálkahártya epitéliumok növekedése gátolt. Annak következményeként a gyomor-bélcsatorna zavarai, vagy a spermatogenezis irreverzibilis csökkenése, ill. az ovuláció megszűnése léphet fel. A bőr és a bőrfüggelékek is rendszerint károsodnak, például sok betegnek hullik a haja, bár később újra kinő.

Súlyos esetekben a mellékhatások egyenesen akut veseelégtelenséghez, valamint a szív, tüdő, máj és idegrendszer toxikus szervi károsodásához vezethetnek. Végül az immunszuppresszív hatás következményeként fertőzések halmozódó számával kell számolni.

Ezért antineoplasztikus hatóanyagot tartalmazó konjugátumok előállításának és kutatásának a hatóanyag elviselhetőségének javítása volt a célja. Erre a célra különböző antineoplasztikus hatóanyagot makromolekulákhoz, például dextránhoz csaptak (vö. Kojima és mtsai, *J. Pharm. Pharmacol.*, Vol. 32 (1980), 30-34. old.; Nakane és mtsai, *J. Pharm. Pharmacol.*, Vol. 40 (1988), 1-6. old.; Nomura és mtsai, *J. Controlled Release*, Vol. 52 (1998), 239-252. old.; Sato és mtsai, *J. Pharm. Sci.*, Vol. 78 (1989), 11-16. old.). Néhány esetben a konjugátumok jobb antitumorhatását figyelték.



Alternatív módon hatóanyagot, így mitomicin C-t N-szukcinil-kitozánhoz (Song és mtsai, J. Controlled Release, Vol. 42 (1996), 93-100. old.), karboximetilkitinhez (Song és mtsai, Arch. Pract. Pharm. Vol. 53 (1993), 141-147. old.) és oligopeptidekhez kapcsoltak (Soyez és mtsai, J. Controlled Release, Vol. 47 (1997), 71-80. old.). Az elemzések többsége kimutatta, hogy a konjugátum tumor elleni hatása jobb, mint az egyes neoplasztikus hatóanyagoké.

A találmány szerint most meglepő módon azt állapítottuk meg, hogy anti-neoplasztikus hatóanyagot tartalmazó HAS-hatóanyag-konjugátumok tumorsejtekkel szemben jobb toxikus hatással és/vagy egyéb sejtekkel szemben csökkent toxicitással rendelkeznek. A konjugátumok így nagyobb terápiás szélességet biztosítanak.

A konjugátumok plazmában való felezési ideje szignifikánsan meghosszabbodott. Ez lehetővé teszi a tumorsejt javítási mechanizmusainak áttörését a hosszabb hehatási idő alapján. A találmány ugyanakkor lehetővé teszi a koncentráció lassabb emelését, főleg az egészséges szövetekben, így a csúcsertékek kisebbek és a beteg jobban viseli el a kezelést.

A találmány szerinti konjugátum előállítására tetszőleges neoplasztikus hatóanyagok alkalmazhatók. A hatóanyagok például az alkilánsok, anti-anyag-cseretermékek, antibiotikumok vagy természetes anyagok csoportjából választhatók ki.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint az antineoplasztikus hatóanyag mitomicin C, ciklofoszfamid, bleomicin, klórambucil, ciszplatin, ara-C, fludarabin, doxorubicin, etopozid, 5-Fu, MTX, vinblasztin, vinkrisztin, vindezin, hidroxikarbamid, 6-MP vagy CCNU.

A mitomicin C hatóanyagkénti alkalmazása különösen előnyös. Mitotoxin az antibiotikumok csoportjához tartozik, aziridin- és kinon-csoportot, valamint mitozángyűrűt tartalmaz. Ezt a hatóanyagot a vesesejt-karcinóma, húgyhólyagtumorok és más urológiai megbetegedések kezelésére alkalmazzák. A vegyület csak hipoxiás (tehát



előnyösen tumor-) sejtekben történő metabolizálása után nyeri aktivitását a kinon sejten belüli enzimes vagy spontán kémiai redukálása és a metoxi-csoport elvesztése után. Ehhez a metoxicsoporthoz HAS előnyösen linkerén keresztül kapcsolható. Miután a szubsztituens a sejtben lehasad, sejten belül ugyanaz a hatóanyag van jelen, amely a DNS alkilező térhálósítást idézi elő és ezzel toxikus hatást fejt ki. Alternatív módon HAS a két aminocsoport egyikéhez is kapcsolható. A mitomicin C típusú szövetfajlagosságot mutat. A találmány szerint előnyös, ha ezt a fajlagosságot - különösen kiválasztó szervekre - HAS-kapcsolással fokozzuk.

Az antineoplasztikus hatóanyag a találmány szerint tetszőleges eljárással HAS-hoz kapcsolható. A HAS redukáló terminális csoportjaihoz történő fajlagos kapcsolást azonban előnyben részesítjük, mert így definiált konjugátum jön létre.

A találmány egyik megvalósítási alakja szerint hidroxietil-keményítőt a mitomicin C metoxi-csoportjához kapcsolunk. A mitomicin C metoxi-csoportjához való kapcsolás linkerén keresztül történhet.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány HAS-ból és antineoplasztikus hatóanyagból álló konjugátumot tartalmazó vegyület előállítására alkalmas eljárásra vonatkozik. Az eljárás olyan lépésekből áll, amelyekben HAS-t vagy közvetlenül vagy linkerén keresztül kovalensen antineoplasztikus hatóanyaghoz kapcsoljuk, majd a konjugátumot elkülönítjük.

A találmány továbbá gyógyászati készítményekre vonatkozik, amelyek HAS-t és antineoplasztikus hatóanyagot tartalmazó vegyületet tartalmaznak. A gyógyászati készítmény továbbá fiziológiailag elfogadható hordozót és/vagy citokint tartalmazhat. A citokin előnyösen IL-2, α -interferon, γ -interferon.

A gyógyászati készítmény tetszőleges, a technika állásából ismert kiszerezési formában lehet jelen. Így a készítmény lehet például orális vagy parenterális adagolásra alkalmas. A készítmény előállítása a technika állása szerint szokásos eljárások-

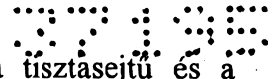


kal történik. A hatóanyag mellett a készítmény általában gyógyászatiilag elfogadható hordozót, valamint egy vagy több segédanyagot tartalmaz, továbbá esetleg tartosítót, oldódást elősegítő anyagot stb.

Végül a jelen találmány tárgyát HAS-t és antineoplasztikumot tartalmazó konjugátumot tartalmazó vegyület alkalmazása is képezi olyan gyógyászati készítmény előállítására, amely tumorok és/vagy áttételeik, különösen urológiai tumorok és/vagy áttételeik, vesesejtkarcinom áttételei, a nyirokrendszer megbetegedéseinek, így CLL, Hodgkin-limfóm, NHL, mieloma multiplex, Waldenström-kór kezelésére alkalmazható. A találmány e megvalósítási formája szerint is citokint, például IL-2-t, α -interferont, γ -interferont tartalmazhat a készítmény.

A találmány szerinti vegyületek urológiai tumorok és/vagy áttételeik, például a vesesejtkarcinom áttételeinek kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására történő alkalmazása különösen előnyös. A vesesejtkarcinom gyógyító kezelése jelenleg sem kombinált kemoterápiával, sem mitomicin C-vel nem lehetséges. Ennek oka a vegyület kedvezőtlen farmakokinetikája lehet, mert a vesén keresztül a hatóanyag csak 18 %-a távozik. Tekintettel arra, hogy HAS majdnem teljesen a vesén keresztül ürül ki, a konjugátum vesén keresztül kiválasztott része nagyobb, mint a nem konjugált hatóanyag esetén. Ez a kiviteli alak azt használja ki, hogy HAS a sejtben belül átmenetileg tárolódik. Különösen az erősen szubsztituált HAS-fajták (HAS 200/0,62) fokozottan dúsulnak a sejtekben, egyenesen a túlkonzentrálódásig. Ezt a jelenséget a proximális tubulus tartományában is figyelték (Person és mtsai, Clinical Nephrology, Vol. 55 (2001), 408-411. old.)

A fenti kiviteli mód szerint a találmány révén tehát bizonyos célsejtekben vagy –szövetekben antineoplasztikus hatóanyag feldúsulása következik be. A konjugátum javított farmakokinetikája tehát lehetővé teszi, hogy a szervezetben a koncentráció kisebb legyen, ugyanakkor a célba vett szerv sejtjeiben a koncentráció



lényegesen nagyobb. Ez a gyógyászati alkalmazás különösen a tisztásejtű és a kromofil vesekarcinom esetén alkalmazható; e kettő az összes hisztológiai típus mintegy 90 %-át teszi ki.

Egy alternatív kiviteli alak szerint a találmány a találmány szerinti vegyületek olyan gyógyászati készítmény előállítására történő alkalmazására vonatkozik, amellyel a nyirokrendszer megbetegedései, így CLL, Hodgkin-limfóm, NHL, mieloma multiplex Waldenström-kor kezelésére alkalmazható. Azzal, hogy HAS a találmány szerint antineoplasztikus hatóanyaghoz kapcsol, a hatóanyag a sejtbé való bejutása - a lánchossz és a szubsztitúciós fok függvényében - lelassul. Radioaktív kinetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy HAS bizonyos szervekben, ezen belül nyirokszervekben is, hosszabb időn át tárolódik, mint az összetestben (vö.: Bepperling és mtsai, Crit. Care, Vol. 3, Suppl. 1 (1999), 153. old.). Ez azt jelenti, hogy a konjugátum a célsejtekben feldúsul, a farmakokinetika javul csökkentett szisztémás koncentráció mellett.

A nyirokrendszer megbetegedéseinek kezelésére hatóanyagként előnyösen fludarabint alkalmazunk. Fludarabin halogénezett adenin-analóg, amely dezaminálással szemben rezisztens.

A találmány továbbá a találmány szerinti vegyületek olyan gyógyászati készítmény előállítására történő alkalmazására is vonatkozik, amellyel bőrfelületű/helyi elsődleges malignomák vagy áttételeik kezelésére alkalmazható. Ennek során két tényező hasznosul: az említett szövet fokozottan veszi fel a HAS-konjugátumot, ugyanakkor a konjugátum transzportja a szövetből késleltetve megy végbe. Mindkét tényező a konjugátumnak a célsejtekben történő feldúsulása irányába hat.

A találmány továbbá a találmány szerinti vegyületek olyan gyógyászati készítmény előállítására történő alkalmazására vonatkozik, amellyel a hematológiai rendszer betegségeinek vagy onkológiai betegségek, például nem-kissejtű és kissejtű

hőrgőkarcinom, mellrák, özofágus lemezeptélium-karcinom, vesesejtkarcinom, he-
rerák, rosszindulatú melanom, ALL vagy CML kezelésére alkalmazható. A találmány
szerinti konjugátumok vesesejtkarcinom elleni alkalmazása különösen előnyös, mert
a konjugátum inkább hidrofil jellege miatt az érintett szövetben a vegyület erősen
feldúsul és fokozottan a vesén keresztül választódik ki. Ebben a kiviteli alakban ható-
anyagként különösen előnyösen vindezint alkalmazunk.

A találmány továbbá a találmány szerinti vegyületek olyan gyógyászati ké-
szítmény előállítására történő alkalmazására vonatkozik, amelyben a vegyület kombi-
nációs terápiaként egy vagy több további antineoplasztikus vagy citokin hatóanyaggal
együtt kerül alkalmazásra. A kombinációs terápia olyan készítmény adagolásával
történhet, amelyben az összes hatóanyag jelen van, de több egyhatóanyagos készít-
mény együttes beadásával is.

A találmány tárgyát továbbá citokint és találmány szerinti vegyületet tartalma-
zó, új kombinációs terápiához alkalmas gyógyászati készítmény előállítására alkal-
mas eljárás is képezi. Az ilyen készítmények különösen az előrehaladott vesesejt-
karcinom kezelésére alkalmazhatók.

A találmány egy további különösen előnyös kiviteli alakja szerint HAS-ból és
antiarritmiás hatóanyagból álló konjugátumot állítunk elő. A konjugátum szívritmu-
szavarok kezelésére alkalmazható.

A szív munka időbeli sorrendjétől és szabályosságától, a normális szívfrekven-
ciától való eltéréseket szívritmuszavaroknak nevezik. Az eltérések az esetek többsé-
gében az ingerképzés vagy ingervezetés zavaraira vezethetők vissza. Antiarritmiás
hatóanyagoknak vagy antiarritmikumoknak olyan anyagot neveznek, amely szívritmusza-
var, különösen pitvari szívritmuszavarok kezelésére alkalmazható.

Az antiarritmiás hatóanyagok között - hatásmechanizmusuk alapján - nátri-
umcsatorna-blokkolókat (kinidin, prokainamid, dizopiramid stb.), beta-receptor-

blokkolókat (atenolol, propranolol stb.), szelektív depolarizáció-hosszabbítókat (amiodaron, sotalol), kalcium-antagonistákat (verapamil, gallopamil stb.) és helyi érzéstelenítőket különböztetünk.

A technika állásából ismert szokásos antiarritmiás hatóanyagok hatásideje azonban részben rövid. Az adenzin például antiarritmiás hatóanyag igen rövid felezési idővel. Ez az anyag hatásideje csak néhány perc. Sok esetben szükséges volna a felezési idő és a hatástartam meghosszabítására.

Ezen túlmenően néhány antiarritmiás hatóanyagok pro-arritmogén mellékhatásai vannak, amelyek akár halált is okozhatnak.

A találmány egyebek között javított hatású antiarritmiás hatóanyagokat állít rendelkezésre, például hosszabb hatástartamúakat. A találmány szerint meglepő módon megállapítottuk, hogy a HAS-antiarritmikum-konjugátumoknak plazmában *in vivo* szignifikánsan hosszabb a felezési ideje, ugyanakkor a hatóanyagok aktivitása a HAS-hoz való kapcsolástól nem csökken lényegesen.

A jelen találmány keretében a konjugátumok előállítására tetszőleges antiarritmiás hatóanyagokat alkalmazhatunk. A hatóanyag lehet nátriumcsatorna-blokkoló, beta-receptor-blokkoló, szelektív repolarizáció-hosszabbító, kalcium-antagonistavagy helyi érzéstelenítő. A hatóanyag előnyösen adenzin, kinidin, prokainamid, dizopiramid, lidokain, fenitoin, mexiletin, ajmalin, parjamalin, propafenon, atenolol, propranolol, amiodaron, sotalol, verapamil, gallopamil vagy diltiazem, különösen előnyösen adenzin.

A jelentése találmány egy kiviteli alakja szerint az antiarritmiás hatóanyagot a HAS redukáló terminális csoportjain keresztül kötjük össze HAS-sal.

Ha hatóanyagként adenzint alkalmazunk, ezt a hatóanyagot például az aminocsoporton keresztül kapcsolhatjuk össze HAS-sal; ebben az összefüggésben az adenzin aminocsoportja és HAS redukáló terminális csoportja közötti kötés különö-

sen előnyös. Előnyös az olyan kapcsolási vátozat, amely esetén a metabolizálás (a hidroxialkil-keményítő lebontása) után natív adenzin van jelen.

Alternatív megoldás, ha a hatóanyagot un. linkerén keresztül a HAS-hoz kapcsoljuk.

A jelen találmány továbbá gyógyászati készítményekre vonatkozik, amelyek egy találmány szerinti vegyületet tartalmaznak. A gyógyászati készítmények továbbá általában gyógyászatilag elfogadható hordozót tartalmaz, és például intravenás alkalmazásra lehet kiserelve.

Végül a találmány a találmány szerinti vegyületek szívritmuszavarok, különösen pitvari aritmiaák kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására történő alkalmazására vonatkozik.

Egy alternatív kiviteli alak szerint a találmány a találmány szerinti vegyületek apoptózis például tumorszövetekben vagy gyulladt szövetekben történő indukálására alkalmas gyógyászati készítmény előállítására történő alkalmazására vonatkozik.

A találmány olyan vegyületekre vonatkozik, amelyekben HAS-ból és antiinfektív hatóanyagból, ill. antibiotikumból előállított konjugátum van. A találmány ezen vegyületek fertőző betegségek kezelésére történő alkalmazására is vonatkozik.

Mikroorganizmusok (vírusok, baktériumok, gombák, protozoák) makroorganizmusba (növény, állat, ember) való behatolását és ottani szaporodását fertőzésnek nevezzük. A fertőző betegség kialakulása és lefolyása lényegében a mikroorganizmus patogenitásától és a makroorganizmus immunitásától függ.

A fertőző betegségek leküzdésére évtizedek óta antiinfektív hatóanyagokat alkalmaznak kemoterápiára.

A penicillint A. Fleming 1928-ban fedezte fel annak alapján, hogy a hatóanyag baktériumtenyészetben Staphylococcus-mentes zónát képzett. A penicillin volt

az első antibiotikum, amelyet ipari mértékben állítottak elő. A klinikai gyakorlatban nagy jelentőségre tett szert.

Penicillineknek ma a β -laktám-antibiotikumok csoportját nevezik; ezeket a hatóanyagokat *Penicillium* fajtájú gombák (például *P. chrysogenum* és *P. notatum*) termelik. A baktériumölő hatás a baktériumsejtfal szintézisének gátlásán alapul. A penicillin inaktiválja a baktérium transzpeptidáz enzimjét, ami a sejtfal mureinjének poliszacharidláncai közötti keresztkötéseket megakadályozza.

A penicillin felfedezése óta számtalan olyan hatóanyagot izoláltak és szintetizáltak, amelyek a mikroorganizmusok növekedését gátolják vagy a mikroorganizmusokat előlik. A legtöbb antibiotikum talajból izolált *Streptomyces*-fajokból származik (ca. 65 %). Feltételezik, hogy a mikroorganizmus ezeket az anyagokat a talajban élő konkurrens elnyomására használja.

Az izolált antibiotikumok számát kb. 8000-re teszik, e közül kb. 100 a gyógyászatban alkalmazható. A hatóanyagok különböző anyagosztályokba sorolása különböző szempontok szerint, például kémiai szerkezet vagy hatásmechanizmus alapján történt.

Időközben az antibiotikumokat nemcsak fertőző betegségek leküzdésére, hanem immundepresszívumként, az antitumortherápiában citostatikumként, növényvédőszerként, élelmiszer-konzerválásra, az állattartásban takarmánykiegészítőként engedélyezték.

Az utolsó években számos, antibiotikummal rezisztens mikroorganizmus törzs bukkant fel. Egy antibiotikummal szemben rezisztens törzsek mellett több antibiotikummal szemben rezisztens törzsek is találtak, ezek bizonyos betegségek leküzdését különösen nehezítik.

Különböző antibiotikumok bizonyos kórokozókkal szembeni aktivitását vizsgálva azt találták, hogy néhány hatóanyag (például amoxicillin vagy ampicillin)



majdnem kizárólag sejten kívül hat (Scaglione és mtsai, *Chemotherapie*, Vol. 39 (1993), 416-423; Balland és mtsai, *J. Antimicrob. Chemother.*, Vol. 37 (1996), 105-115). Ezek a hatóanyagok tehát főleg sejten belül lévő mikroorganizmusok ellen nem alkalmazhatók. A sejten belüli aktivitás javítására ampicillin-nanorészecskéket állítottak elő (Balland és mtsai a fent megadott helyen).

Olyan fertőzések, mint például tuberkulózis és egyéb mikobaktériumos fertőzések esetén a kezelési lehetőségek spektrumának bővítése kívánatos volna mindig szükséges kombinációs terápia miatt. Más sejten belüli fertőzések, így például a *Chlamydia*-fertőzés esetén (amelynek lehetséges jelentőségét az arterioszklerózis patogenezise szempontjából csak nemrég ismerték fel; Stille und Dittmann, Herz, Vol. 23 (1998), 185-192) intracelluláris, késleltetett hatású antibiotikumok lényeges haladást jelenthetnek kezelésben és megelőzésben.

A találmány szerint most meglepő módon megállapítottuk, hogy antiinfektív hatóanyagok HAS-hoz történő kapcsolása a hatóanyagok tulajdonságainak, főleg az *in vivo* felezési idejének, a sejtbe való felvételének és/vagy hatásának javítását eredményezi.

A találmány szerint tetszőleges antiinfektív hatóanyagot, ill. tetszőleges antibiotikumot alkalmazhatunk. Hatóanyagként előnyösen aminopenicillint, cefalosporint vagy aminocefalosporint, beta.laktám-antibiotikumot, karbapenemek, aminoglikozidot, tetraciklint, makrolid-antibiotikumot, giráz-gátlót ciklopeptid-antibiotikumot, linkomicint, streptogramint, everninomicint, oxazolidinont, mitroimidazolt, szulfonamidot, Co-trimoxazolt, helyileg alkalmazható antibiotikumot, vírusölőt, gombaölőt, tuberkulostatikumot alkalmazunk.

A fenti anyagcsoportokból például az alábbi hatóanyagokról lehet szó: ampicillin, amoxicillin, cefotaxim, ceftazidim, vankomicin, klindamicin, metronidazol, izoniazid, rifimpicin, rifabutin, rifapentin, etambutol, pircinamid,



sztreptomycin, protioamid vagy dapson; az aminopenicillinek, így ampicillin, amoxicillin, továbbá a makrolidok és streptomycin alkalmazása különösen előnyös.

A találmány egy kiviteli alakja szerint hatóanyag aminopenicillint alkalmazunk, amelyet aminocsoportjával közvetlenül a hidroxietil-keményítőhöz kapcsolunk.

Egy másik kiviteli alak szerint aminopenicillin helyett aminocefalosporint alkalmazunk, ami az allergiát kiváltó hatást csökkenti. További kiviteli alakként a HAS-makrolid-kapcsolás, hatóanyagként előnyösen eritromicint vagy származékát, különösen eritromicil-amint alkalmazunk. Alternatív módon a streptomycin hatóanyagkénti alkalmazása is lehetséges.

A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja szerint az antiinfektív hatóanyag és a hidroxietil-keményítő közötti kapcsolása a hidroxietil-keményítő redukáló terminális csoportjain keresztül történik.

A találmány egy további megvalósítási formája szerint az antiinfektív hatóanyag linkerén keresztül kapcsolódik a hidroxietil-keményítőhöz.

A jelen találmány továbbá gyógyászati készítményekre is vonatkozik, amelyek egy találmány szerinti vegyületet tartalmaznak. A gyógyászati készítmény általában gyógyászatilag elfogadható hordozót is tartalmaz.

Végül a találmány a találmány szerinti vegyületek fertőző betegségek kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására történő alkalmazására is vonatkozik. A gyógyászati készítmény különösen olyan fertőző betegségek kezelésére alkalmas, amelyeket sejten belüli kórokozók idéznek elő. Ezek a kórokozók tartozhatnak a patogén vagy fakultatív patogén kórokozók teljes spektrumához, lehetnek például baktériumok, vírusok vagy paraziták, mikoplazmák, mikobaktériumok, klamidiák, rickettsziák stb.

A találmány egy további aspektusa szerint HAS-nukleinsav-konjugátumokat állítunk elő. Jelenleg nagy terjedelemben kutatnak nukleinsav-adatbázisokat olyan



nukleinsavak megtalálása céljából, amelyek bizonyos aktivitással rendelkeznek. Ilyen keresett aktivitás lehet például egy nukleinsav azon tulajdonsága, hogy képes más nukleinsavhoz, receptorokhoz vagy vírusos proteinhez kötődni. Egy ilyen kötés biológiai szignált serkenthet vagy gátolhat. Ilyen célra a természetben előforduló D-DNS- és D-RNS-molekulák mellett L-DNS- és L-RNS-molekulákat is alkalmaznak, amelyek a természetben előforduló molekuláktól abban különböznek, hogy a nukleinsavak alkotórészeként a megfelelő D-forma helyett L-ribózt, ill. L-dezoxiribózt tartalmaznak (vö.: WO 98/08856). A jelen találmány keretében sikerült kimutatni, hogy olyan HAS-nukleinsav-konjugátumok állíthatók elő, amelyeknek a természetes funkcionálitása megmarad (lásd 7. példa).

A találmány továbbá kovalens HAS-hatóanyag-konjugátumok előállítására alkalmas eljárásra is vonatkozik. Az eljárás vizes vagy szerves reakcióközegben valósítható meg, a vizes fázisban végzett kapcsolást azonban előnyben részesítjük.

A kovalens HAS-hatóanyag-konjugátumok előállítására alkalmas eljárás keretében hidroxialkil-keményítőt és legalább egy hatóanyagot reakcióközegben reagáltatunk egymással. A reakcióközegre jellemző, hogy víz vagy víz és szerves oldószer legalább 10 tömeg% vizet tartalmazó elegye.

A találmány szerinti eljárás reakcióközege legalább 10 tömeg%, előnyösen legalább 50 tömeg%, különösen előnyösen legalább 80 tömeg%, így például 90 tömeg% vagy akár 100 tömeg% vizet, és ennek megfelelően legfeljebb 90 tömeg%, előnyösen legfeljebb 50 tömeg%, különösen előnyösen legfeljebb 20 tömeg%, például 10 tömeg% vagy akár 0 tömeg% szerves oldószert tartalmaz. A reakció tehát vizes fázisban megy végbe. Előnyösen a reakcióközeg víz.

A találmány szerinti eljárás már azért is előnyös, mert nem szükségszerűen kell toxikológiailag aggályos oldószert alkalmazni, és így az előállított termékből nem kell toxikológiailag aggályos oldószert vagy annak nyomait eltávolítani. Ez a



lépés az eddig ismert eljárások esetén mindig szükséges a nemkívánatos oldószer-nyomok eltávolítására. Továbbá az eddig ismert eljárások esetén kötelező járulékos, esetleges toxikus oldószermaradékok kimutatására szolgáló minőségi ellenőrzést el lehet hagyni, mert a találmány szerinti eljárásban a toxikológiailag aggálytalan oldószerek alkalmazását előnyben részesítjük. A találmány szerint előnyös oldószerek például toxikológiailag aggálytalan protonos oldószerek, így etanol vagy propilénlikol.

A találmány szerinti eljárás további előnye, hogy proteinek vagy peptidek szerves oldószer okozta irreverzibilis vagy reverzibilis szerkezeti változásai kizártak, míg szerves oldószerben megvalósított eljárások esetén az ilyen változások nem mindig zárhatók ki. A találmány szerinti eljárással előállított polipeptidek tehát a dimetil-szulfoxid ban előállítottaktól különbözhetnek.

A találmány szerint továbbá meglepő módon azt állapítottuk meg, hogy HAS és hatóanyag vizes oldatban végzett kapcsolása anélkül valósítható meg, hogy számottevő mellékreakciók lennének megfigyelhetők. A találmány szerinti eljárás tehát közvetlenül javított, nagy tisztaságú termékekhez vezet. A találmány szerinti eljárás első ízben lehetővé teszi olyan HAS-hatóanyag-konjugátumok egyszerű előállítását, amelyekben a hatóanyag aktív formában van jelen és a hidroxialkil-keményítő előnyös tulajdonságai megmaradtak. A HAS-hatóanyag-konjugátumnak a reakcióelegyből történő elkülönítésére nem szükségeltetnek különös eljárások, mert a reakció vizes fázisban megy végbe, tehát nem szükségszerűen kell szerves oldószert eltávolítani.

A találmány értelmében előnyös, ha a hidroxialkil-keményítő közvetlenül a hatóanyag ϵ -NH₂-, α -NH₂-, SH-, COOH- vagy -C(NH₂)₂-csoportjához kapcsolódik. Alternatív megoldásként további reakcióképes csoportot vihetünk be HAS-ba, vagy a HAS és hatóanyag közötti kötést linkerrel keresztül valósíthatjuk meg. Hatóanyag és



PEG közötti kapcsolás kialakítására alkalmazható linkerek a technika állásából ismertek. Aminosavak, különösen glicin, alanin, leucin, izoleucin és fenilalanin linkerkénti alkalmazását (WO 97/38727 és EP 605 963) előnyben részesítjük.

A találmány szerinti eljárás egy kiviteli alakja szerint a hatóanyaggal történő összekapcsolás előtt a hidroxialkil-keményítőt oxidáljuk. Az oxidálás a technika állásából ismert eljárások valamelyike szerint történhet; a HAS redukáló terminális csoportjainak szelektív oxidálása előnyös. Ez az intézkedés olyan eljárást tesz lehetővé, amelynek során a HAS oxidált redukáló terminális csoportja a hatóanyag egyik aminocsoportjával amid keletkezése közben reagál. Ennek a kiviteli alaknak az a különös előnye, hogy HAS és a hatóanyag között fajlagos kötés jön létre, ami különösen homogén termékhez vezet.

Az oxidált redukáló terminális csoportokat tartalmazó HAS és a hatóanyag reagáltatása során a reakcióidő előnyösen legalább 12, különösen előnyösen legalább 24 óra. Kívánatos lehet továbbá tetszőleges aktivátor, például etildimetil-aminopropil-karbodiimid (EDC) adagolása. A HAS és hatóanyag közötti molarány tetszőlegesen választható, általában az arány HAS : hatóanyag 20:1 és 1:20 közötti tartományban van; a 6:1 és 1:6 közötti arány különösen előnyös. A legjobb eredményeket a HAS : hatóanyag kb. 2:1 aránnyal érték el.

A hatóanyag aminocsoportja és HAS közötti másféle kapcsolási reakciót a találmány természetesen szintén magában foglal, például olyan eljárást, amelynél HAS és a hatóanyag közvetlenül reagálnak egymással, aminek során HAS és hatóanyag között közbenső termékként Schiff-bázis jön létre. A Schiff-bázis $-CH=N-$ azometilcsoportja ezt követően $<2H>$ formális addicionáltatásával $-CH_2-NH-$ metilénamin-csoporttá redukálható. Erre a redukálásra szakember a technika állásából ismert redukálószerrel valamelyikét választhatja, a bórhidriddel végzett redukálás különösen előnyös.



A hidroxialkil-keményítőt a hatóanyag tetszőleges csoportjához kapcsolhatjuk. A kapcsolás előnyösen úgy történik, hogy a metabolizált konjugátum a hatóanyag kapcsolás előtti aktivitásának legalább 50 %-át, előnyösen legalább 75 %-át megőrizze. Az aktivitás legalább 95 %-ának megőrzése különösen előnyös. A kapcsolási reakció természetesen úgy is szabályozható, hogy a hidroxialkil-keményítő kizárólag a hatóanyag egy vagy több meghatározott csoportjához köt, például egy peptid lizin- vagy cisztein-maradékához. Különös előnyök adódnak, ha a hidroxialkil-keményítőt az oxidált redukáló csoportokon keresztül a hatóanyag egy vagy több meghatározott csoportjához kötjük, mert így homogén HAS-hatóanyag-konjugátumok keletkeznek.

A találmány egy előnyös kiviteli alakja szerint a reakció kiindulási anyagaként HAS-t és proteint vagy peptidet alkalmazunk. Ennek során tetszőleges, természetes eredetű vagy rekombináns terápiás vagy diagnosztikai proteineket alkalmazhatunk. A jelenleg a kereskedelmi forgalomban kapható rekombináns proteinek listája a Pharma Business 2000 július/augusztusi számában a 45-60. oldalon található. A találmány olyan HAS-hatóanyag-konjugátumok előállítását foglalja magában, amelyek az említett publikálásban szereplő hatóanyagok bármelyikét tartalmazzak.

Különösen előnyös, ha a konjugátum előállításában citokint is alkalmazunk. Citokinként az alábbiak jöhetnek számításba: interferonok, interleucinek, növekedési faktorok, enzimek, enzim-gátlók, receptorok, receptor-fragmensek, inzulin, faktor VIII, faktor IX, antibiotikumok (vagy antiinfektivumok), peptid-antibiotikumok, vírusbura-proteinek, hemoglobin, eritropoietin, albuminok, hTPA, antitestek, antitest-fragmensek, egyszálú antitestek, DNS, RNS vagy származékaik. Különös előnyök rekombináns proteinek vagy peptidek alkalmazásával adódnak. Ahogy azt már elmondtuk, megfelelő proteinek gyakran nem lehet hatóanyagként alkalmazni, mert az emberre nézve antigén tulajdonságaik vannak. A találmány szerinti eljárásban HAS-



hoz kapcsolt rekombináns proteinek immunogenitása azonban csökkent, ami lehetővé teszi alkalmazásukat a humán gyógyászatban.

Különleges előnyök továbbá HAS és rövid láncú proteinek és kisebb peptidek összekapcsolása esetén adódnak. Jelenleg számos peptidbankot létesítenek, például fág-kijelző-bankok, amelyeknél rövid oligopeptideket (például a mono 3-20-szorosa) fágok felületén exprimálnak. Továbbá egyetlenegy polipeptidláncból álló antitesteket (un. „single chain antibodies”, egyszálú antitestek) baktériumokban vagy fágok felületén exprimálnak. Ezeket a bankokat bizonyos hatóanyag- vagy kötési-aktivitás szempontjából kutatják. A megfelelő peptid-hatóanyagok vagy antitestek terápiás vagy diagnosztikai alkalmazása mindezekig azért hiúsult meg, mert ezeket az anyagokat - kis méretük miatt – rövid időn belül kiválasztja (vö.: Chapman és mtsai, 1999, a fent megadott helyen). A találmány szerinti eljárással ezek a peptidek előnyösen HAS-hoz kapcsolható, az így elért in vivo felezési idejük a hatóanyagkénti alkalmazásukat lehetővé teszi.

A fent vázolt alkalmazási lehetőségek helyett alternatív módon a hatóanyag lehet hormon, szteroidhormon, aminosavról vagy zsírsavról levezetett hormon. Egyes esetekben szükséges lehet, hogy a HAS-sal való kapcsolás előtt például linker segítségével aktív csoportot vigyünk be a hormonba.

A találmány értelmében a kiindulási anyag tetszőleges, fiziológiailag elviselhető hidroxietil-keményítő lehet. Előnyös, ha a HES átlagos móltömege 1-300 kDa, különösen 1-150 kDa, különösen előnyösen 2-40 kDa. A HES moláris szubsztitúciós foka előnyösen 0,1-0,8, a C₂ : C₆ szubsztituálás aránya 2 és 20 közötti tartományban van, a hidroxietil-csoportokra vonatkoztatva.

A találmány a fenti eljárással előállított HAS-hatóanyag-konjugátumokra is vonatkozik. Ezek a konjugátumok előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek, mégpedig: a hatóanyag nagy aktivitása, alacsony immunogenitás, hosszú tartózkodási idő a test-



ben és kiváló reológiai tulajdonságok, amelyek a konjugátumok hasznosságát fokozzák.

A találmány tehát gyógyászati vagy diagnosztikai készítmény előállítására alkalmas eljárásra is vonatkozik, amelynek során a feni eljárások valamelyike szerint HAS-hatóanyag-konjugátumot állítunk elő, majd a kapott konjugátumot egy, a technika állásából ismert, gyógyászatilag elfogadható hordozóval, adjuvánssal vagy segédanyaggal összekeverjük. A találmány az ezzel az eljárással előállítható gyógyászati vagy diagnosztikai készítményre is kiterjed.

A fenti gyógyászati készítmény gyógyászati alkalmazása a hatóanyag milyenségétől függ. Ha a hatóanyag például hemoglobin, a konjugátum oxigén-transzportáló készítményként alkalmazható. Ha az előállítás során hatóanyagként citokint alkalmazunk, a konjugátum a tumorterápiában alkalmazható. A mindenkori konjugátumnak a gyógyászati készítményben jelenlévő koncentrációját minden átlagos szakember minden további nélkül dózis-hatás-tesztekből megállapíthatja.

A diagnosztikai készítmények in vivo vagy in vitro betegségek vagy zavarok diagnosztizálására alkalmazhatók. Ha a hatóanyag antitest vagy antitest-fragmens, a konjugátum például a technika állásában szokásos ELISA kimutatási eljárások megvalósítására alkalmas.

A példákban az alábbiakban leírt anyagokat alkalmaztuk.

humán szérumalbumin	Sigma-Aldrich A3782
HES 130 kD:	130/0,5 típusú, T91SEP-ből előállítva (Fresenius Kabi)
adatok:	M_w : 130 000 \pm 20 000 D
M_n :	3 695 D
EDC	Sigma-Aldrich 16.146-2
(etildimetil-amino-propil-karbodiimid)	

HOBt

Sigma-Aldrich 15.726-0

1-hidroxi-1H-benzotriazol-hidrát)

DIG-glikán kimutató kit:

Roche-Boehringer, 1142 372.

Az alábbi példák HSA és diaminobután oxidált redukáló terminális csoportokkal rendelkező HES-hez való, ill. HSA HES-hez való közvetlen kapcsolását mutatják. Ebben HSA és diaminobután csak példák a fent említett hatóanyagokra. A 7. példa oligonukleotidok és HES kapcsolását mutatja.

1. példa

A hidroxietil-keményítő redukáló terminális csoportjainak szelektív oxidálása

A hidroxietil-keményítő (130 kD és 10 kD) redukáló terminális csoportjainak oxidálása céljából a keményítőt minimális mennyiségű vízben feloldottuk és az oldathoz különböző mennyiségű jód-oldatot és KOH-oldatot adtunk.

Az elegyet kevertük, míg az I_2 -re utaló szín el nem tűnt. Ezt többszörösen megismételtük, hogy nagyobb mennyiségű jód-oldat és KOH-oldat adagolását elérjük. Ezt követően az oldatot Amberlite IR 120 Na^+ kationcserélő gyantán tisztítottuk, 20 órán keresztül desztillált vízzel szemben dializáltuk (a dialíziscsövek kizárási hatása 4-6 kD volt), majd liofilizáltuk.

Az oxidálás fokát Somogyi, N. (Method in Carbohydride Chemistry, 1. köt. (1962), 384-386. old.) módszerével határoztuk meg. Az oxidációs reakció jegyzőkönyvét az 1. táblázatban közöljük.

1. táblázat: A hidroxietil-keményítő (130 kD és 10 kD) redukáló terminális csoportjainak különböző körülmények között végzett oxidálása

Eljárás	HES (Mn)	Jód-oldat 0.1N	KOH-oldat 0.1N	Oldószer	Reakcióidő	Hozam
OXIDÁLÁS (1) HES 130	1 g 2.4×10^{-3} mol	0.3 ml 3.0×10^{-3} mol	0.5 ml 5.0×10^{-3} mol	Víz 4.0 ml	4 óra 25°C	30,1%
OXIDÁLÁS (2) HES 130	4 g 9.4×10^{-3} mol	1.0 ml 1.0×10^{-4} mol	1.5 ml 1.5×10^{-4} mol	Víz 6.0 ml	éjszakán át 25°C	24,8%
OXIDÁLÁS (3) HES 130	5 g 1.2×10^{-4} mol	1.2 ml 1.2×10^{-4} mol	1.5 ml 1.5×10^{-4} mol	Víz 7.5 ml	éjszakán át 25°C	24,3%
OXIDÁLÁS (4) HES 130	5 g 1.2×10^{-4} mol	3.0 ml 3.0×10^{-4} mol	4.5 ml 4.5×10^{-4} mol	Víz 7.5 ml	éjszakán át 25°C	60,8%
OXIDÁLÁS (5) HES 130	5 g 1.2×10^{-4} mol	4.0 ml 4.0×10^{-4} mol	5 ml 5.0×10^{-4} mol	Víz 7.5 ml	éjszakán át 25°C	80,0%
OXIDÁLÁS (6) HES 130	8 g 1.9×10^{-4} mol	7.0 ml 7.0×10^{-4} mol	11.5 ml 1.2×10^{-3} mol	Víz 7.5 ml	éjszakán át 25°C	88,4%
OXIDÁLÁS (7) HES 130	10 g 2.4×10^{-4} mol	10 ml 1.0×10^{-3} mol	20 ml 2.0×10^{-3} mol	Víz 7.5 ml	éjszakán át 25°C	100%
OXIDÁLÁS (1) HES 10	5 g 1.4×10^{-3} mol	2.0 ml 2.0×10^{-4} mol	2.0 ml 2.0×10^{-4} mol	Víz 10.0 ml	20 óra 25°C	3,0%
OXIDÁLÁS (2) HES 10	5 g 1.4×10^{-3} mol	3.5 ml 3.5×10^{-4} mol	4.5 ml 4.5×10^{-4} mol	Víz 10.0 ml	éjszakán át 25°C	5,3%
OXIDÁLÁS (3) HES 10	15 g 4.1×10^{-3} mol	21.0 ml 2.1×10^{-3} mol	31.0 ml 3.1×10^{-3} mol	Víz	éjszakán át 25°C	10,5%
OXIDÁLÁS (4) HES 10	8 g 2.2×10^{-3} mol	83.0 ml 8.3×10^{-3} mol	180.0 ml 1.8×10^{-2} mol	Víz	éjszakán át 25°C	80,0%
OXIDÁLÁS (5) HES 10	7 g 1.9×10^{-3} mol	95.0 ml 9.5×10^{-3} mol	210.0 ml 2.1×10^{-2} mol	Víz	éjszakán át 25°C	100,0%
OXIDÁLÁS (6) HES 10	6,4 g $1,7 \times 10^{-3}$ mol	50 ml $5,0 \times 10^{-3}$	150 ml $1,5 \times 10^{-2}$	Víz	éjszakán át 25°C	100,0%

A táblázatban összefoglalt jegyzőkönyvek példájaként az alábbiakban a (6) oxidálást (HES 10 kD) részletesen leírjuk. 6,4 g (1,7 mmól) hidroxietil-keményítőt (10 kD) reakcióedényben állandó keverés mellett kevés vízben feloldottunk. Az oldathoz 50 ml (5,0 mmól) 0,1 N jódoldatot és 150 ml (15 mmól) 0,1 N KOH-oldatot adtunk. Az elegyet egy éjszakán át 25 °C-on állni hagytuk, utána Amberlite IR 120 (Na⁺-forma) ioncserélőgyantán tisztítottuk és vízzel szemben dializáltuk (dialízistömlő: cellulóz-acetát, kizásári határ 4-6 kD) A dializált terméket liofilizáltuk (Heraeus-Christ Alpha, lombikszárítás egy éjszakán át).

Az 1. táblázatból kivehető módon HES 130 kD esetén a redukáló terminális csoportok teljes oxidálását (100 %-os hozamot) értük el, miután a jód mennyiségét $3,0 \times 10^{-5}$ mólról $1,0 \times 10^{-3}$ mólra emeltük.

A HES 10 kD redukáló terminális csoportjainak teljes oxidálásához a jód mennyiségének további emelésére volt szükség, a $2,1 \times 10^{-3}$ mólt meghaladó értékre.

2. példa

Oxidált redukáló terminális csoportokkal rendelkező HES és HSA vizes fázisban végzett összekapcsolása

Az oxidált redukáló terminális csoportokkal rendelkező hidroxietil-keményítőt (ox-HES) és HSA-t vízben teljesen feloldottuk. Miután az oldat kitisztult, etil-dimetil-amino-propil-karbodiimid (EDC) vizes oldatát adagoltuk. A kémelő keverés közben folytatott EDC-s aktiválás után további EDC-t adagoltunk. Az elegyet szükség esetén HOBt-tel aktiváltuk és egy éjszakán át állni hagytuk. A terméket vízzel szemben 15 órán át dializálva tisztítottuk, majd liofilizáltuk (az alábbiakban: A-eljárás). A kapcsolási reakció jegyzőkönyveit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: oxidált redukáló terminális csoportokkal rendelkező HES (130 kD és 10 kD) és HSA különböző körülmények között végzett kapcsolása (A-eljárás; az ox-HES oszlopban megadott számok az 1. táblázat szerinti oxidációs eljárás számát adják meg.

A-eljárás	HSA	ox-HES (Mn)	EDC	HOBt	Oldószer	Akti válás	Reakcióidő
Kapcsolás I ox-HES 130	300 mg 4.4×10^{-6} mol	100 mg (1) 2.4×10^{-6} mol	25 mg 1.6×10^{-4} mol	100 mg 7.7×10^{-4} mol	H ₂ O/dioxán 13 ml/2 ml	1.5 óra 3-4°C	4 óra 25°C
Kapcsolás II ox-HES 130	100 mg 1.5×10^{-6} mol	300 mg (2) 7.0×10^{-6} mol	15 mg 9.7×10^{-5} mol	100 mg 7.7×10^{-4} mol	H ₂ O/dioxán 10 ml/3 ml	1.5 óra 3-4°C	éjszakán át 25°C
Kapcsolás III ox-HES 130	200 mg 3.0×10^{-6} mol	3.8 g (5) 8.9×10^{-3} mol	46.5 mg 3.0×10^{-3} mol	20 mg 1.5×10^{-4} mol	H ₂ O/dioxán 10 ml/3 ml	0 óra	24 óra 25°C
Kapcsolás IV ox-HES 130	100 mg 1.5×10^{-6} mol	1.9 g (5) 4.5×10^{-3} mol	25 mg 1.6×10^{-4} mol	20 mg 1.5×10^{-4} mol	Víz	1.5 óra 3-4°C	éjszakán át 25°C
Kapcsolás V ox-HES 130	200 mg 3.0×10^{-6} mol	4.3 g (5) 1.0×10^{-4} mol	100 mg 6.0×10^{-4} mol	0 mg	Víz	0 óra	éjszakán át 25°C
Kapcsolás VI ox-HES 130	100 mg 1.5×10^{-6} mol	130 mg (7) 3.0×10^{-6} mol	50 mg 3.0×10^{-4} mol	0 mg	Víz* 5ml + 10ml	0 óra	5 óra 25°C
Kapcsolás VII ox-HES 10	100 mg 1.5×10^{-6} mol	130 mg (7) 3.0×10^{-6} mol	200 mg 3.0×10^{-4} mol	0 mg	Víz* 5ml + 2x 10ml	0 óra	24 óra 25°C
Kapcsolás I ox-HES 10	100 mg 1.5×10^{-6} mol	300 mg (1) 8.1×10^{-6} mol	5 mg 3.0×10^{-4} mol	100 mg 7.7×10^{-4} mol	H ₂ O/dioxán 13 ml/2 ml	1.5 óra 3-4°C	éjszakán át 25°C
Kapcsolás II ox-HES 10	70 mg 1.0×10^{-6} mol	1.0 g (2) 2.7×10^{-4} mol	15.5 mg 1.0×10^{-4} mol	0 mg	Víz	10 ml 0 óra	éjszakán át 25°C
Kapcsolás III ox-HES 10	200 mg 3.0×10^{-6} mol	3.0 g (3) 8.1×10^{-4} mol	77.5 mg 5.0×10^{-4} mol	20 mg 1.5×10^{-4} mol	Víz	0 óra	6 óra 25°C
Kapcsolás IV ox-HES 10	50 mg 7.4×10^{-7} mol	7.4 g (4) 2.0×10^{-3} mol	282 mg 1.5×10^{-3} mol	0 mg	Víz	0 óra	éjszakán át 25°C
Kapcsolás V ox-HES 10	100 mg 1.5×10^{-6} mol	103 g (6) 2.8×10^{-3} mol	93 mg 5.6×10^{-4} mol	0 mg	Víz* 4 ml	0 óra	20 óra 25°C
Kapcsolás VI ox-HES 10	100 mg 1.5×10^{-6} mol	103 g (6) 2.8×10^{-3} mol	200 mg 1.2×10^{-3} mol	0 mg	Víz* 3x5 ml	0 óra	30 óra 25°C

Az ox-HES 130 kD és HSA közötti VII. kapcsolási reakciót az alábbiakban részletesen ismertetjük. Gömblombokban 130 mg ox-HES 130 kD-t (oxidációs fok kb. 100 %) és 100 mg HSA-t keverés közben kb. 5 ml vízben szobahőmérsékleten oldottunk. Miután az oldat kitisztult, három adagban összesen 200 mg EDC 15-30 ml vízzel készített oldatát csepegtettük az oldathoz egy óra alatt. Két adagolás közben az elegyet kb. 4 órán át szobahőmérsékleten kevertük. Húszonnégy órás reakcióidő után az elegyet vízzel szemben dializáltuk (dialízistömlő: cellulóz-acetát, kizsárló határ 4-6 kD) A dializált terméket liofilizáltuk.

3. példa

HSA közvetlen kapcsolása HES-hez vizes fázisban



E reakció elve azon alapul, hogy HES és a protein aminocsoportjai között Schiff-bázis jön létre, a reakciót a Schiff-bázis NaBH_4 hidriddel végzett, a megfelelő amint eredményező redukálásán keresztül szabályozhatjuk (az alábbiakban B-eljárás).

A hidroxietil-keményítőt kevés vízben teljesen feloldottuk. Az oldathoz 9,0 pH-jú borátpufferrel készített HSA-oldatot adtunk. Az oldathoz nátrium-bór-hidrátot adtunk és az elegyet szobahőmérsékleten kevertük. További HES 130 kD oldatot, majd további nátrium-bór-hidridet adagoltunk. A reakció befejeztével a fent már leírtak szerint a terméket dializáltuk, majd liofilizáltuk. Az egyes kísérletek jegyzőkönyveit a 3. táblázatban állítottuk össze.

3. táblázat: HES (130 kD és 10 kD) és HSA közötti közvetlen kapcsolás különböző körülmények között

B-Eljárás	HSA	HES (Mn)	NaBH_4	Puffer pH	Reakcióidő
Kapcsolás I HES 130	50 mg 7.5×10^{-7} mól	500 mg 1.2×10^{-3} mól	500 mg 1.3×10^{-2} mól	Na_2HPO_4 , 0 ml 7,4	48 óra 25°C
Kapcsolás II HES 130	100 mg 1.5×10^{-6} mól	1,0 g 2.4×10^{-3} mól	60 mg 1.6×10^{-3} mól	Na_2HPO_4 , 1 ml 7,4	20 óra 25°C
Kapcsolás III HES 130	50 mg 7.5×10^{-7} mól	9,8 g 2.3×10^{-4} mól	285 mg 7.5×10^{-3} mól	Na_2HPO_4 , 1 ml 7,4	36 óra 25°C
Kapcsolás IV HES 130	50 mg 7.5×10^{-7} mól	2,0 g 4.7×10^{-3} mól	180 mg 4.7×10^{-3} mól	Borát 0,1M 9,0	30 óra 25°C
Kapcsolás V HES 130	50 mg 7.5×10^{-7} mól	4,0 g 9.4×10^{-3} mól	60 mg 1.6×10^{-3} mól	Borát 0,1M 9,0	100 óra 25°C
Kapcsolás I HES 10	50 mg 7.5×10^{-7} mól	2,8 g 9.4×10^{-3} mól	28 mg 1.6×10^{-3} mól	Borát 0,1M 9,0	80 óra 25°C

A 130 kDa-os HES kapcsolásához 2,0 g HES-t kb. 5 ml vízben teljesen feloldottuk. Az oldathoz 50 mg HSA 1 ml 9,0 pH-jú, 0,1 M borátpufferrel készített oldatát adtuk. Ehhez az oldathoz 30 mg nátrium-bór-hidridet adtunk és az elegyet szobahőmérsékleten kevertük. Tízennyolc óra elteltével további 2,0 g HES 130 kD oldatát, majd további 30 mg nátrium-bór-hidridet adagoltuk. Összesen 100 óra reakcióidő után az oldatot dializáltuk, majd fagyasztva szárítottuk. (V. kapcsolás, HES 130 kD).



A HES 10 kD kapcsolásához e vegyület 1,4 g-ját kb. 5 ml vízben teljesen feloldottuk. Az oldathoz 50 mg HSA 1 ml 9,0 pH-jú 0,1 M borátpufferrel készített oldatát, majd 14 mg nátrium-bór-hidridet adtunk és az elegyet szobahőmérsékleten kevertük. Tízennyolc óra elteltével további 1,4 g HES 10 kD oldatát, majd további 14 mg nátrium-bór-hidridet adagoltuk. Összesen 80 óra reakcióidő után az oldatot dializáltuk, majd fagyasztva szárítottuk. (I. kapcsolás, HES 10 kD).

4. példa

A kapcsolási termékek gélpermeációs kromatográfias módszerrel (GPC) végzett elemzése

A reakciótermékeket gélpermeációs kromatográfias (GPC) módszer segítségével elemeztük.

4.1 FPLC-készüléket (Pharmacia) alkalmaztunk, amely HPLC UV monitorral (Hitachi) állt kapcsolatban. A körülmények az alábbiak voltak:

Oszlop: Superose 12 HR 10/30 (1x30 cm) (Pharmacia)

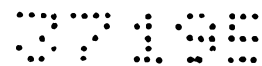
UV-monitor: 280 nm

szivattyú: 0,2 ml/perc

puffer: 50 mM foszfát/150 mM NaCl, pH 7,2.

A fenti körülmények között a HSA-csúcs általában 63 perc elteltével jelenik meg, 57 percnél kisebb csúcs mérhető, amely a HSA-dimerekre vezethető vissza. A GPC segítségével kapott kromatogramok az alábbiak szerint értelmezhetők.

4.2 Az 1. ábra szerinti kromatogram az ox-HES 130 kD és HSA kapcsolása (III. kapcsolás) utáni termékek méreteloszlását mutatja. Ennek a kapcsolási eljárásnak HOBt-aktiválás nélkül nagyon jó eredményei voltak. Egyetlen nagy széles csúcs volt 37 percnél, egy kisebbik sáv 45 percnél, ez utóbbi a HSA móltömegét meghaladó



móltömegű kapcsolási termékre enged következtetni. Nem módosított HSA nyomait is találtuk.

A 2. ábra az ox-HES 130 kD és HSA kapcsolása (IV. kapcsolás) utáni termékek méreteloszlását mutatja. A reakciót HOBt-vel aktiváltuk. Látszik, hogy ez az aktiválás a hozamot csökkenti, lehetséges, hogy mellékreakciók elősegítése miatt.

A 3. és 4. ábra az ox-HES 130 kD és HSA kapcsolása (V. kapcsolás) közbeni és utáni termékek méreteloszlását mutatja. Két óra reakcióidő után a legnagyobb koncentrációjú terméként nem-módosított HSA-t találtunk, mellette azonban első, nagyobb móltömegű kapcsolási termékeket is. A reakció befejeztével nagy koncentrációban kb. 35 percnél homogén kapcsolási terméket találtunk. Nem-módosított HSA és egyéb kapcsolási termékek viszonylag csekély koncentrációban voltak jelen.

Az 5. ábra a reakciótermékek méreteloszlását mutatja ox-HES 10 kD és HSA kapcsolása (V. kapcsolás) alatt és után. Itt is látszik, hogy a HSA móltömegét meghaladó móltömegű kapcsolási termékek koncentrációja a reakció előrehaladásával nő.

Olyan kapcsolási reakciót, amelynek során majdnem az összes HSA-molekula homogén kapcsolási terméké alakult, a 6. ábra mutatja (a VII. kapcsolás reakciótermékei).

4.3 A HES és HSA közvetlen kapcsolásának elemzése során kapott kromatogramok egyik példáját a 7. ábra mutatja (B-eljárás, HES 130 kD, V. kapcsolás). Határozott csúcs mutatkozik kb. 65 percnél (HSA). Emellett kapcsolási terméket is mutattunk ki (csúcs kb. 42 percnél).

5. példa

A kapcsolási termékek SDS-PAGE és Western Blot segítségével végzett elemzése

5.1 A PAGE-dzset nátrium-dodecil-szulfát (SDS) jelenlétében Miniprotean II készülék (Biorad cég) és 7,5 %-os akrilamid-gél alkalmazásával végeztük. Az



elektroforézis a gyártó előírása szerint történt. A gélt Blum (Elektrophoresis, Vol. 8, (1997), 93-99. old.) eljárása szerint ezüsttel festettük, a proteinek láthatóvá tétele érdekében.

A kapcsolási termékekben glikánok jelenlétét Western Blot és glikán-kimutató kit (Roche-Boehringer cég) alkalmazásával mutattuk ki. Miután a termékeket SDS-PAGE segítségével szétválasztottuk, a Miniprotean II elektroforézis-egység blotting-készülékének segítségével nitrocellulóz-membránra vittük át azokat. A membránt ezt követően perjódáttal olyan körülmények között oxidáltuk, amelyknél csupán a vicinális OH-csoportok oxidálódnak. Ezeket utána amino-funkcionálizált digoxigeninnel reagáltattuk. Megkötött digoxigenint alkálikus foszfatazhoz kötött fajlagos monoklonális antitestek segítségével mutattunk ki. E célból a foszfataz egyik szubszt-rátuma (4-nitro-tetrazólium-klorid/5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát) adagoltunk, amely nehezen oldódó kék-bíborszínű terméket ad. Ez a termék a membránon lecsapódik és láthatóvá teszi a sávokat. Nem módosított HSA-t és kreatinázt negatív kontrollként alkalmaztunk, míg transferrin pozitív kontrollként szerepelt.

Az eljárás pontos lépései a kit használati utasításából (Roche-Boehringer) vehetők ki.

5.2 A 8. és 9. ábra az ezüsttel befestett SDS-PAGE-gél felvételét (fent), ill. a membránra átvitt termékeket és a glikán-kimutatást (lent) mutatják. Az ábrákból ki-vehetően a kapcsolási reakció során viszonylag homogén glikán keletkezik reakció-termékként, míg egyidejűleg a nem módosított HSA koncentrációja csökken.

6. példa

Lehetséges melléreakciók vizsgálata

Annak vizsgálata céljából, hogy HES oxidált reduláló terminális csoportjainak önkondenzálódása formájában melléreakciók következhetnek be, a 4. táblázatban összefoglalt reakcióelegyet készítettük.



4. táblázat: mellékreakciók vizsgálatára szolgáló reakciók

	ox-HES	EDC	HOBt	Viz	Reakcióidő
HES 130 kD	500 mg 1.2×10^{-3} mól	15 mg 7.8×10^{-5} mól	-	5.0 ml	30 óra 25 °C
HES 130 kD	500 mg 1.2×10^{-3} mól	15 mg 7.8×10^{-5} mól	telített oldat	5.0 ml	30 óra 25 °C
HES 10 kD	100 mg 2.7×10^{-5} mól	3.4 mg 1.8×10^{-5} mól	-	5.0 ml	30 óra 25 °C
HES 10 kD	100 mg 2.7×10^{-5} mól	3.4 mg 1.8×10^{-5} mól	telített oldat	5.0 ml	30 óra 25 °C
HES 130 kD	700 mg 1.6×10^{-3} mól	31 mg 1.6×10^{-4} mól	-	5.0 ml	30 óra 25 °C
HES 130 kD	700 mg 1.6×10^{-3} mól	31 mg 1.6×10^{-4} mól	telített oldat	5.0 ml	30 óra 25 °C

A kísérlet célja annak kimutatása volt, hogy HES lehetséges önkondenzálódása történik-e HOBt jelenlétében vagy távollétében avagy sem. A mintákat liofilizáltuk és elemeztük.

GPC és szórtfény mérés segítségével a néhány százalékot kitevő kimutatási határon belül nem kaptunk móltömeg növekedésre utaló eredményt.

7. példa

Oxidált HES és DNS kapcsolása és a kapcsolási termék reakcióképességének elemzése

A reakció elve

A reakciót vázlatosan a 10. ábra szemlélteti. Az első lépésben a (3) amin-HES 12 kD aminocsoportja reagál a (4) SMCC N-hidroxi-szukcinimid-csoportjával (5) konjugátummá. A centrifuga dialízisbetétjén keresztüli centrifugálással az el nem reagált (4) SMCC-t elválasztjuk. Az (5) konjugátum maleimid-csoportja reagál az (1) tio-DNS tiol-csoportjával a kívánt (6) terméké. A (6) képletben félkövéren jelzett tartomány csak spacer, tetszőleges alakja lehet.

A (6) konjugátum biológiai aktivitását az EcoR1 restrikciós enzimmel végzett bontással vizsgáltuk. A restrikciós enzimek csak kétszálú, ép felismerési szekvenciával rendelkező DNS-t vágnak.

DNS:

Kétszálú DNS-t alkalmaztunk, amelyet az MWG Biotech AG (Ebersberg, DE) szintetizált. Az egyes szálak szekvenciái:

SEQ ID NO. 1: 5'- GTAGAGACAGGAGGCAGCATTGAATTCGCAGGGT-
GAGTAGCAGTAGAGC-3';

SEQ ID NO. 2: 5'- GCTCTACTGCTACTCACCCCTGCGAATT-
CAACTGCTGCCTCCTGTCTCTAC-3';

MWG által módosított 5'-tiollal C6 S-S-es (lásd 10. ábra).

A két DNS szált külön-külön kétszer desztillált vízben oldottuk 2 µg/µl koncentrációban és 1:1 arányban 96 °C-on az (1) kétszálú tio-DNS-sé hibridizáltuk, koncentrációja 2 µg/µl volt.

A termékek elemzése

Az elemzés gélelektroforetikusan történt 4 %-os agaróz-gélben TBE-pufferrel (45 mM trisz-borát, 1 mM EDTA, pH 8,0), 1 µg DNS/100 ml gél, 50 µg etidiumbromid jelenlétében. A fényképeket CCD-rendszerű modulárral (INTAS Imaging Instruments, Göttingen, DE) és UVT-20 S/M/L-típusú UV-transzilluminátorral (Herolab GmbH, Wiesloch, DE) készítettünk 312 nm hullámhosszon.

A reakcióelegyből 1 µl (1 µg DNS) mintát vettünk és 1 µl (20 egység) EcoRI restrikciós enzimmel (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus, DE) vágunk 37 °C-on 3 órán át 1 µl reakciópuffer (50 mM NaCl, 100 mM trisz-HCl, 10 mM magnézium-klorid, 0,025 % Triton X-100, pH 7,5; New England Biolabs) és 7 µl kétszer desztillált víz elegyében.

HES módosítása



A HES 12 kD (Fresenius, Charge 2540SR2.5P, átlagos móltömege 12 000 g/mól) jód-oldattal (2) oxo-HES 12 kD-t eredményező oxidálása a DE 19628705 szabadalmi leírásban részletezett eljárás szerint történt.

1,4-Diaminobután és (2) oxo-HES 12 kD reagáltatása

1,44 g (0,12 mmól) (2) oxo-HES 12 kD-t ml vízmentes dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottunk és az oldatot nitrogén légkör alatt 1,5 ml (1,50 mmól) 1,4-diaminobután oldatával csepegtettük. A reakcióelegyet 40 °C-on 19 órán át kevertük, utána 80 ml etanol és 80 ml qaceton elegyében öntöttük. A kivált csapadékot centrifugáltuk és 40 ml vízben oldottuk. Az oldatot vízzel szemben 4 napon át dializáltuk (SnakeSkin dialízistömlő, kizárási határ 3,5 kD, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, DE), majd fagyasztva szárítottuk. A hozam 80 % (1,06 g) (3) amino-HES 12 kD volt.

(3) Amino-HES 12 kD és (1) tio-DNS kapcsolása

10 mg/ml (3) amino-HES 12 kD-t tartalmazó, pufferrel (10 mM nátrium-foszfát és 150 mM NaCl, pH 7,44) készített oldat 400 µl-jéhez 1 mg (4) SMCC 50 µl dimetil-szulfoxiddal készített oldatát adtuk és az elegyet 80 percen át szobahőmérsékleten, majd 10 percen át 46 °C-on tartottuk. Utána az elegyet centrifugáltuk, a felülúszót elválasztottuk a csapadéktól és újból centrifugáltuk. A felülúszóból 200 µl-t vettünk és MICROCON YM-3 centrifuga-dialízis-betéttel (Amicon, Millipore GmbH, Eschborn, DE) 45 percen át 14000g mellett centrifugáltuk; 400 µl puffer (10 mM nátrium-foszfát és 150 mM NaCl, pH 7,44) adagolása után 45 perces centrifugálás, további 400 µl puffer adagolása után még 60 perces centrifugálás következett. A dialízisbetétben megmaradt mennyiségű konjugátumoldatot 50 µl-re kiegészítettük, és az így kapott oldat 10 µl-jét 10 µl (1) tio-DNS-oldathoz adtuk. Az elegyet szoba-



hőmérsékleten 14 órán át reagálni hagyjuk. Elemzésre 1 μ l mintát vettünk. Az eredményeket a 11. ábra mutatja (2. és 3. sáv).

A leírt kísérlet reakciókörülményei, valamint megváltoztatott reakciókörülményekkel végzett kísérletek reakciókörülményei az 5. táblázatban szerepelnek, az eredményeket a 11. ábra mutatja.

Az eredmények összefoglalása

Az alábbi körülményeket vizsgáltuk,

1. SMCC-mennyiség: 1 mg (2., 6., 10. és 14. sor), ill. 5,6 mg (4., 8., 12. és 16. sor);
2. Az (1) tio-DNA reakciójának hőmérséklete:
szobahőmérséklet (sz.h.) (2., 4., 6. és 8. sor), ill. 37 °C (10., 12., 14. és 16. sor);
3. Puffer
10 mM foszfát, 150 mM NaCl EDTA nélkül, pH 7,44 (2., 4., 10. és 12. sor),
ill. 100 mM foszfát, 150 mM NaCl + 50 mM EDTA, pH 7,23 (6., 8., 14. és 16. sor).

A 11. ábra 2-18 sávjában az (1) tio-DNS és a (3) amino-HES 12 kD kapcsolásának 8 kísérletét mutatja. Az eredményeket közvetlenül a reakció alatt, majd a reakció után és végül a DNS-vágás után egymás mellett szerepeltettük a rajzon. Az 1. sávban különböző referencia-DNS-eket vittünk fel hosszúságú markerként, míg a 18. és 19. sáv (1) tio-DNS-t illetve vágott (1) tio-DNS-t mutat. Mindegyik kísérletben a még el nem reagált (1) tio-DNS mellett nagyobb móltömegű kapcsolási termékek is jelennek meg (2., 4., 6., 8., 10., 12., 14. és 16. sáv). Tekintettel arra, hogy HES 12 kD különböző méretű molekulák elegye, a kapcsolási termékeknek is móltömegeloszlása van. Mindegyik kapcsolási termék ép DNS-t tartalmaz, ugyanis EcoR1 mindegyiket

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás kovalens HAS-hatóanyag-konjugátum előállítására, amelynek során HAS-t és hatóanyagot reakcióközegben reagáltatunk, *azzal jellemezve*, hogy

- (a) a hatóanyaggal való összekapcsolás előtt HAS redukáló terminális csoportjait szelektív módon oxidáljuk;
- (b) a reakcióközeg víz vagy víz és szerves oldószer legalább 10 tömeg% vizet tartalmazó elegye;
- (c) a hatóanyag protein, oligo- vagy polipeptid.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hatóanyag oltóanyag, toxin, antibiotikum (antiinfektívum), antiaritmikum, étvágycsökkentő, , érzéstelenítő, fájdalomcsillapító, reuma elleni szer, allergia, asztma, depresszió vagy cukorbeteg elleni szer, antihisztaminikum, vérnyomáscsökkentő vagy antineoplastikus szer.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hatóanyag enzim, enzimgátló, receptor, receptor-fragmens, inzulin, faktor VIII, faktor IX, citokin, interferon, interleucin, növekedési faktor, peptid-antibiotikum, vírusos buraprotein, hemoglobin, eritropoietin, albumin, hTPA, antitest, antitest-fragmens vagy egyszálú antitest.

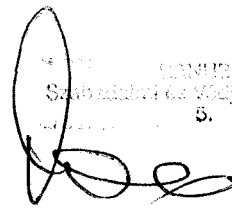
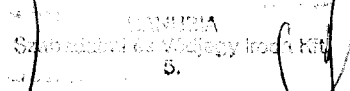
4. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hidroxialkil-keményítőt a hatóanyag ϵ -NH₂-csoportjához, α -NH₂-csoportjához, SH-csoportjához, -COOH csoportjához vagy -C(NH₂)₂ csoportjához kapcsoljuk.

5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy HAS oxidált redukáló terminális csoportját a hatóanyag aminocsoportjával reagáltatjuk amid keletkezése közben.

6. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a konjugátum előállítása előtt HAS-t vagy a hatóanyagot linkerrel kapcsoljuk össze.

7. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 1-300 kDa átlagos móltömegű hidroxietil-keményítőt alkalmazunk.
8. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 2-40 kDa átlagos móltömegű hidroxietil-keményítőt alkalmazunk.
9. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan hidroxietil-keményítőt alkalmazunk, amelynek moláris szubsztitúciós foka 0,1-0,8 és $C_2 : C_6$ szubsztitúciós aránya 2-20, a hidroxietil-csoportokra vonatkoztatva.
10. Eljárás gyógyászati vagy diagnosztikai készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1-9. igénypontok bármelyike szerint HAS-hatóanyag-konjugátumot állítunk elő, majd a konjugátumot gyógyászatilag elfogadható hordozóval, adjuvánssal vagy segédanyaggal összekeverjük.

A meghatalmazott:

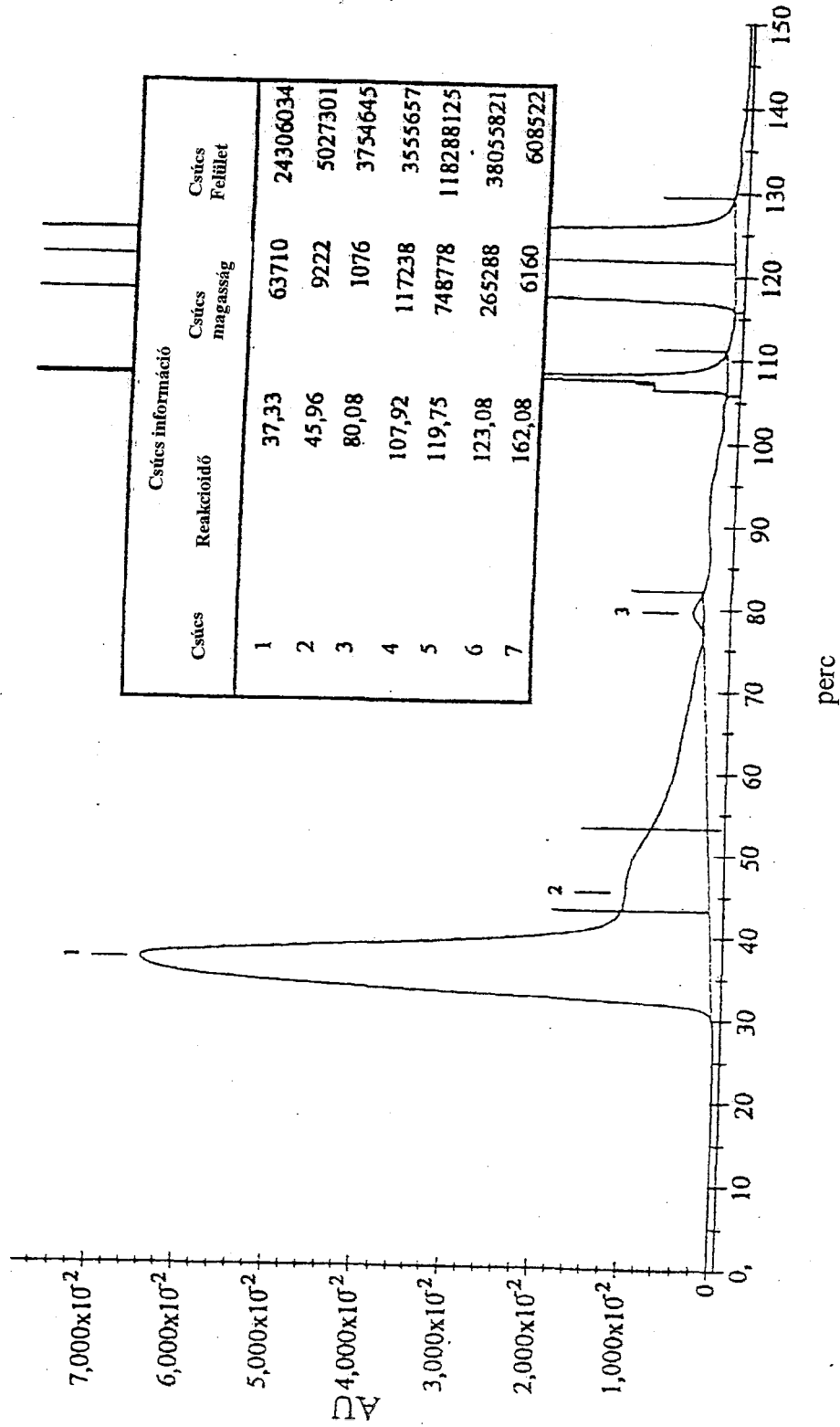



 HUNGÁRIA
 Szociális és Vésztudományi Minisztérium
 S.

Az előző pontokkal

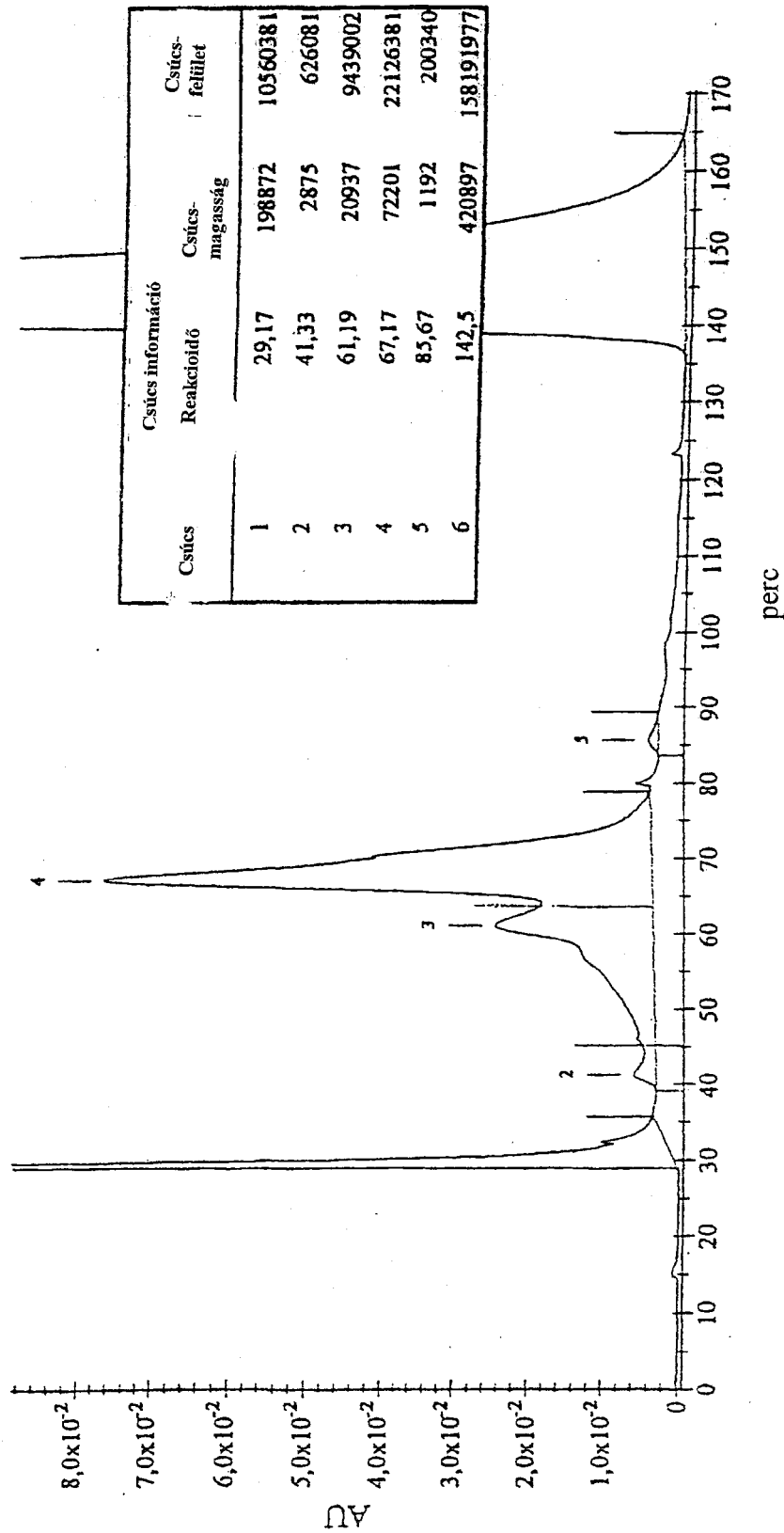
2008. 11. 12. RL

A2

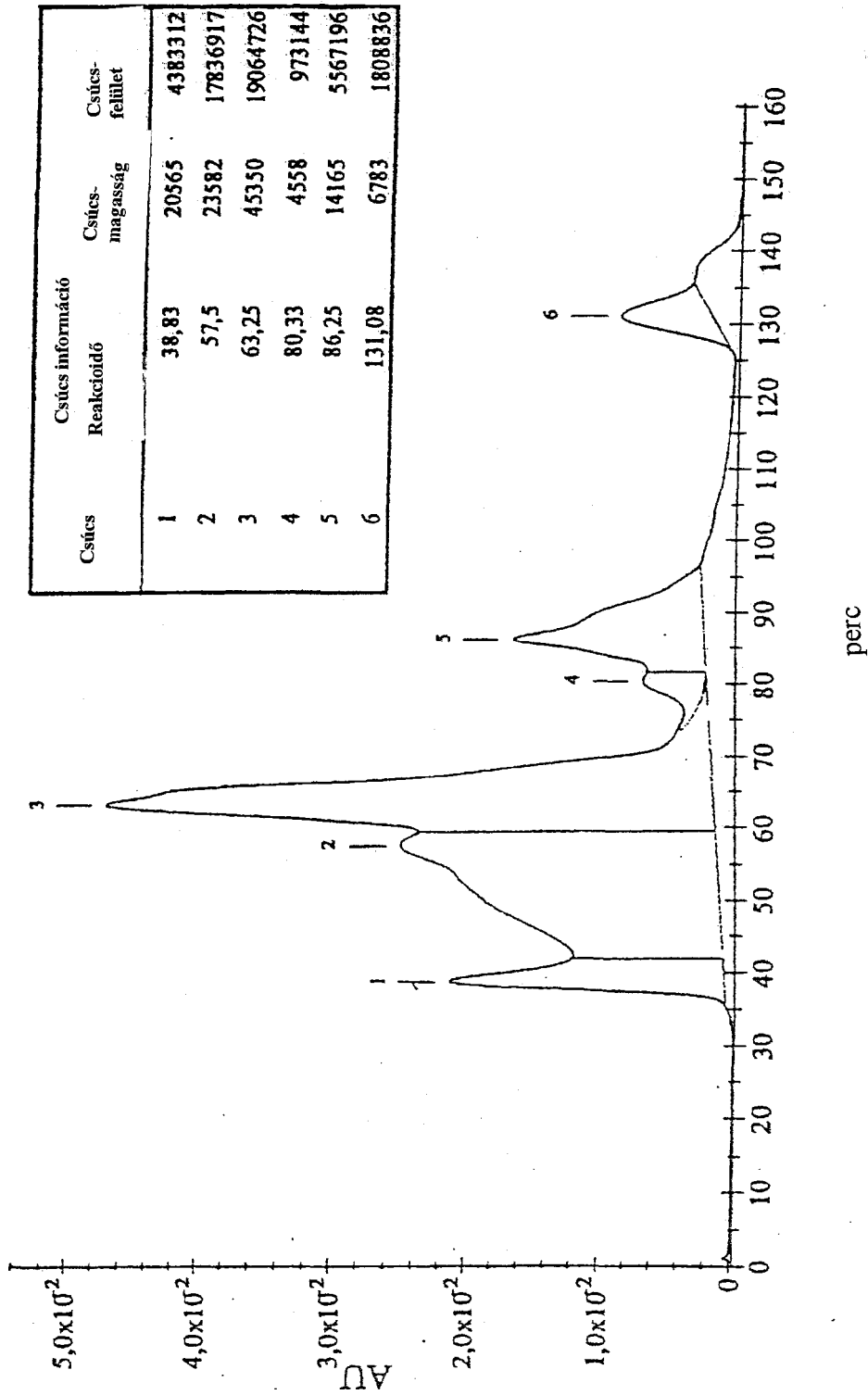


1. ábra

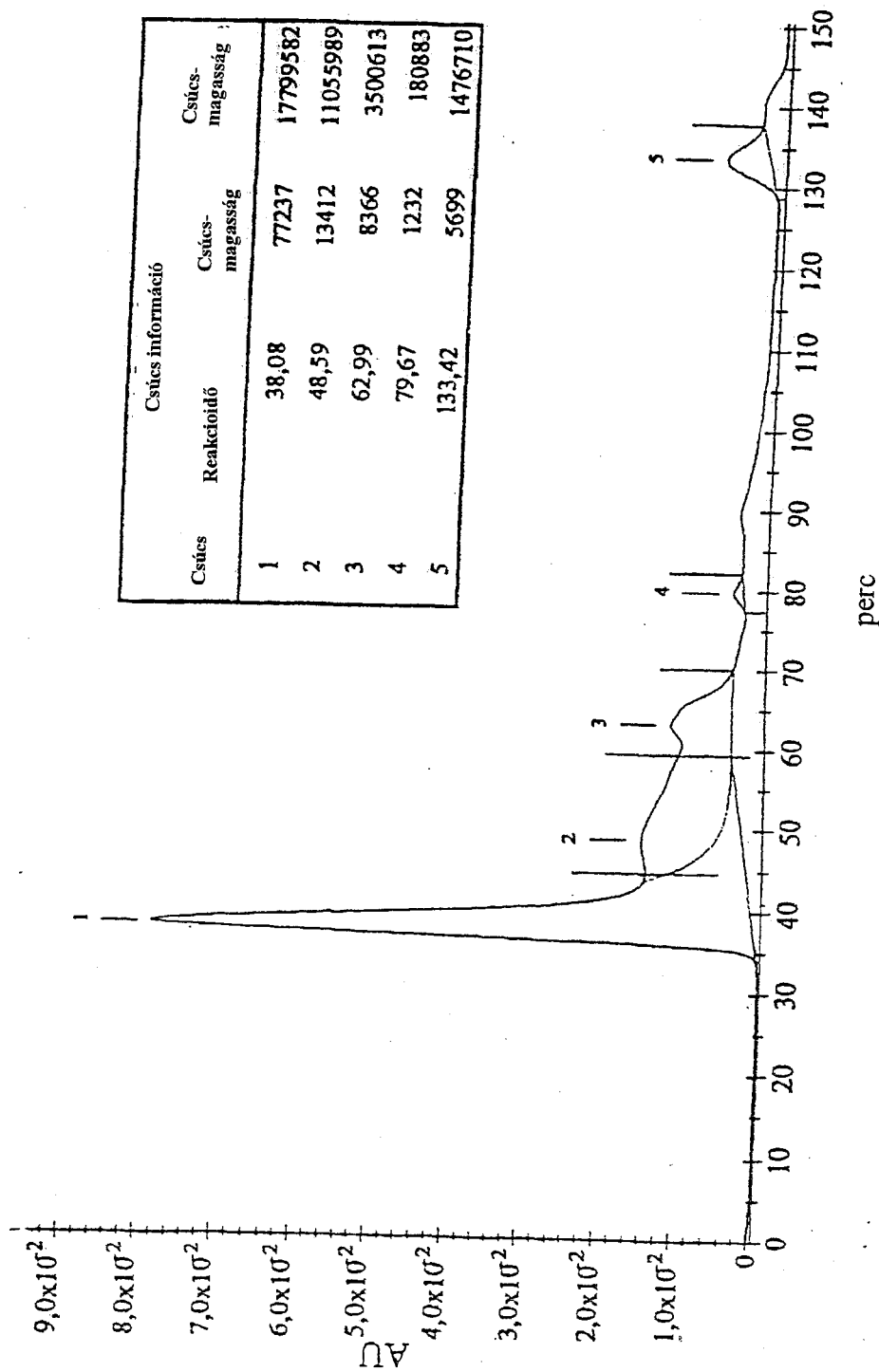
KÖZZÉTÉTELI PÉLDANY



2. ábra

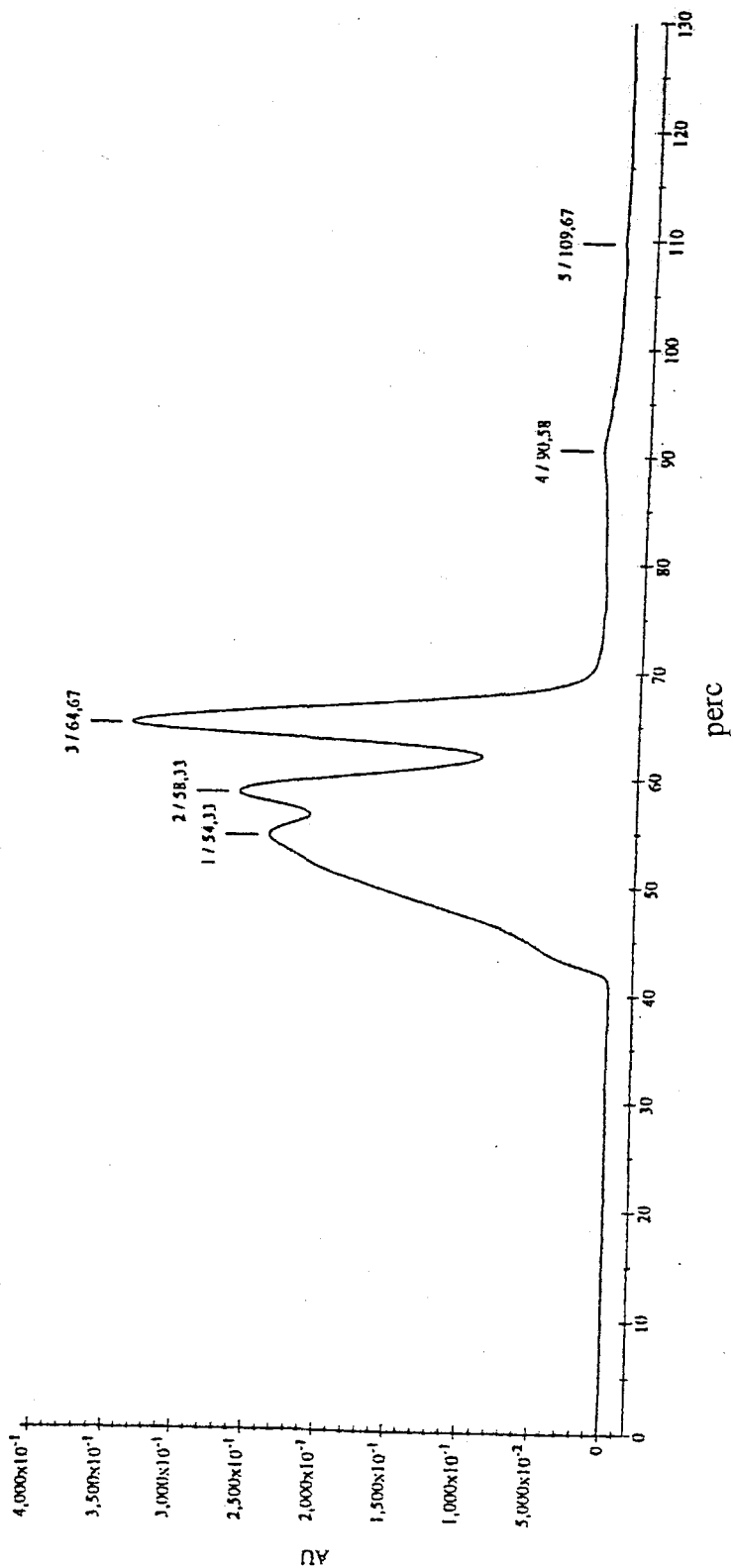


3. ábra



4. ábra

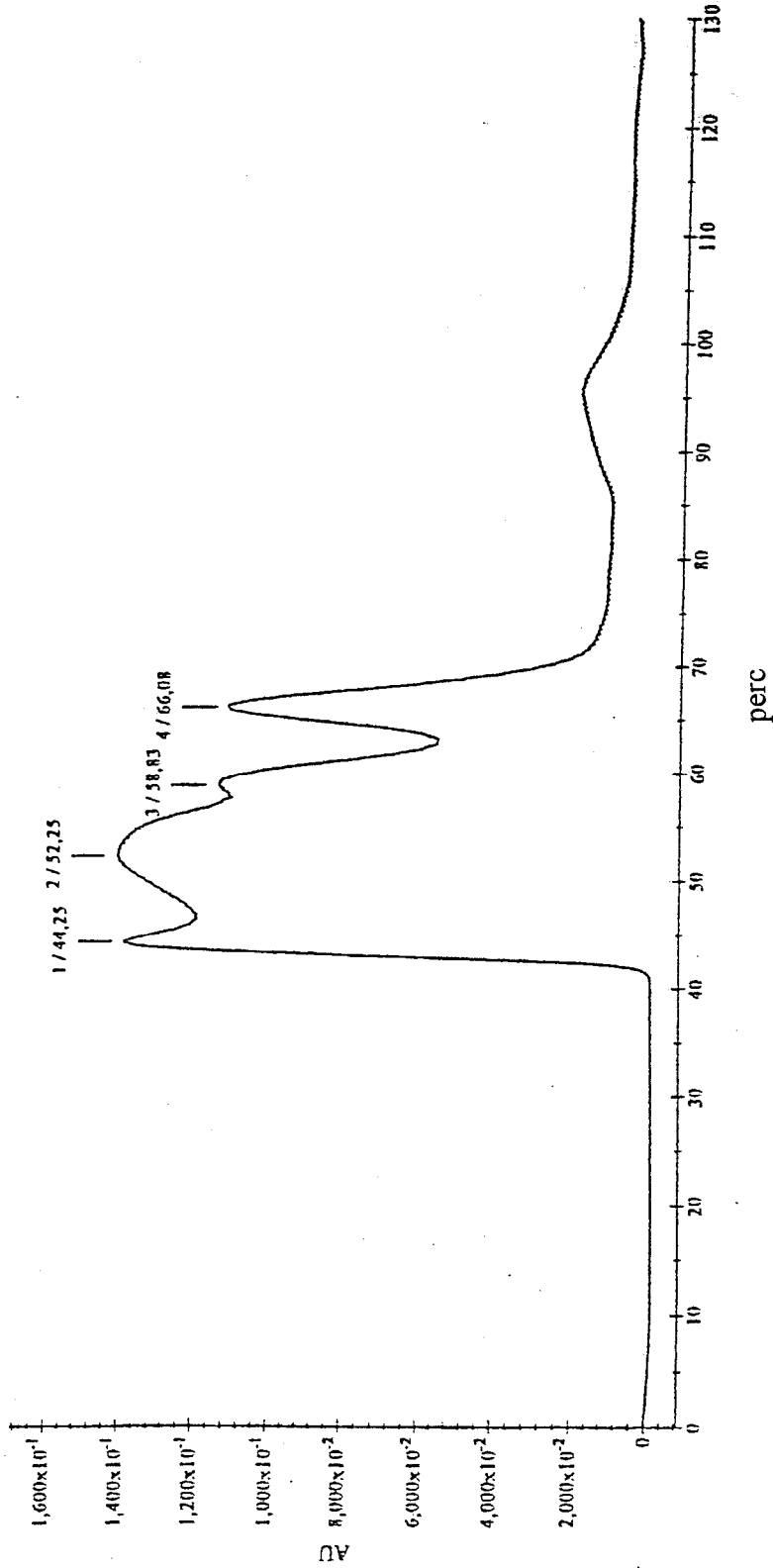
KÖZZÉTETELI PÉLDÁNY



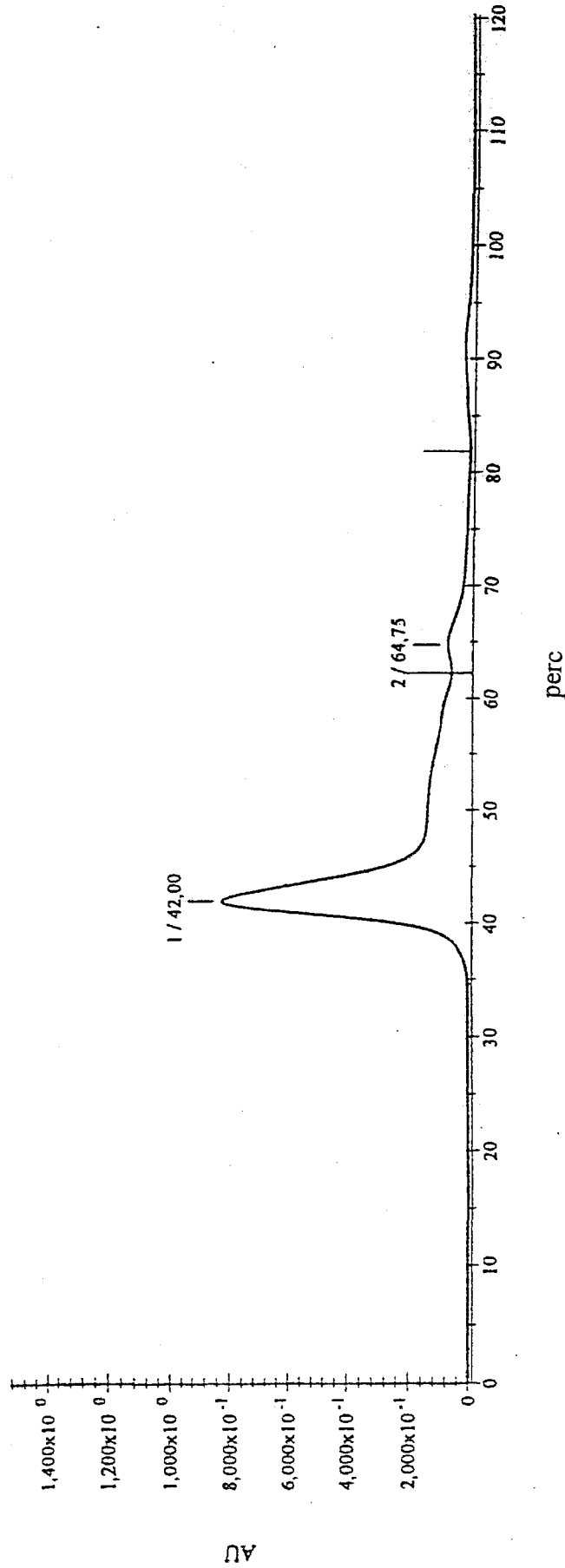
Sa. ábra

P03 03511

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



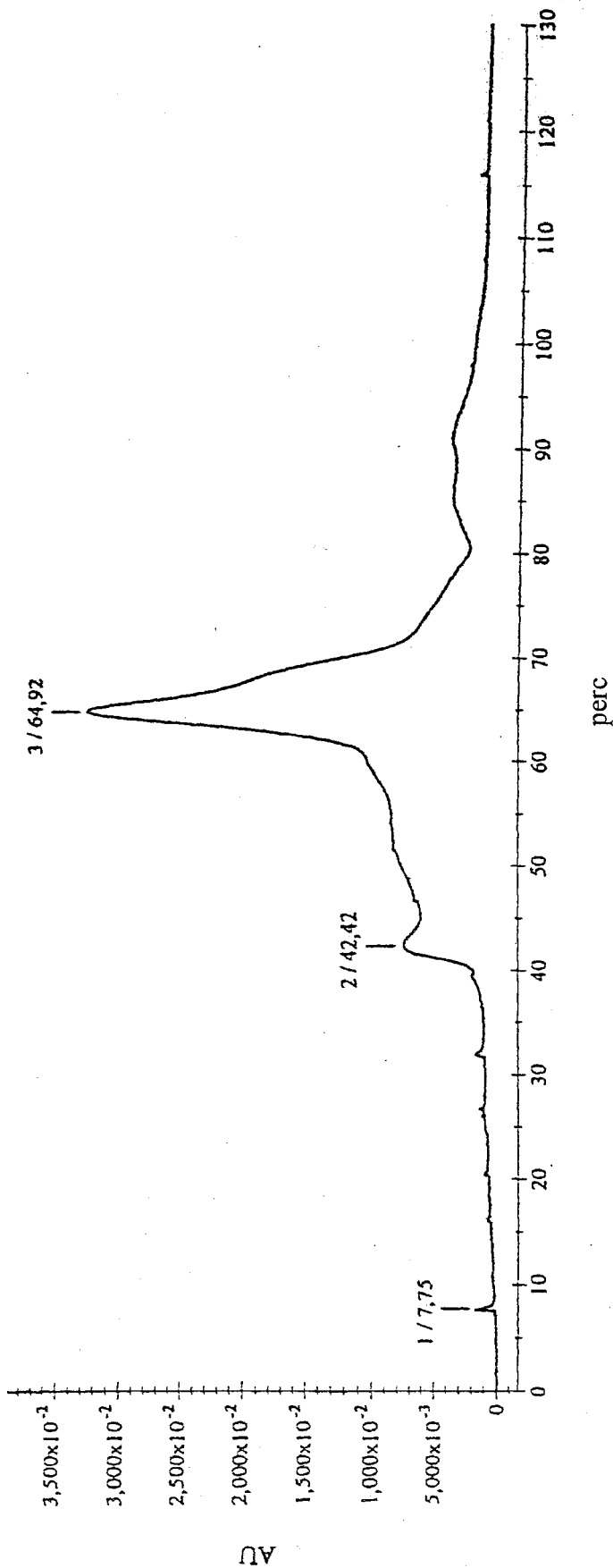
Sb. ábra



6. ábra



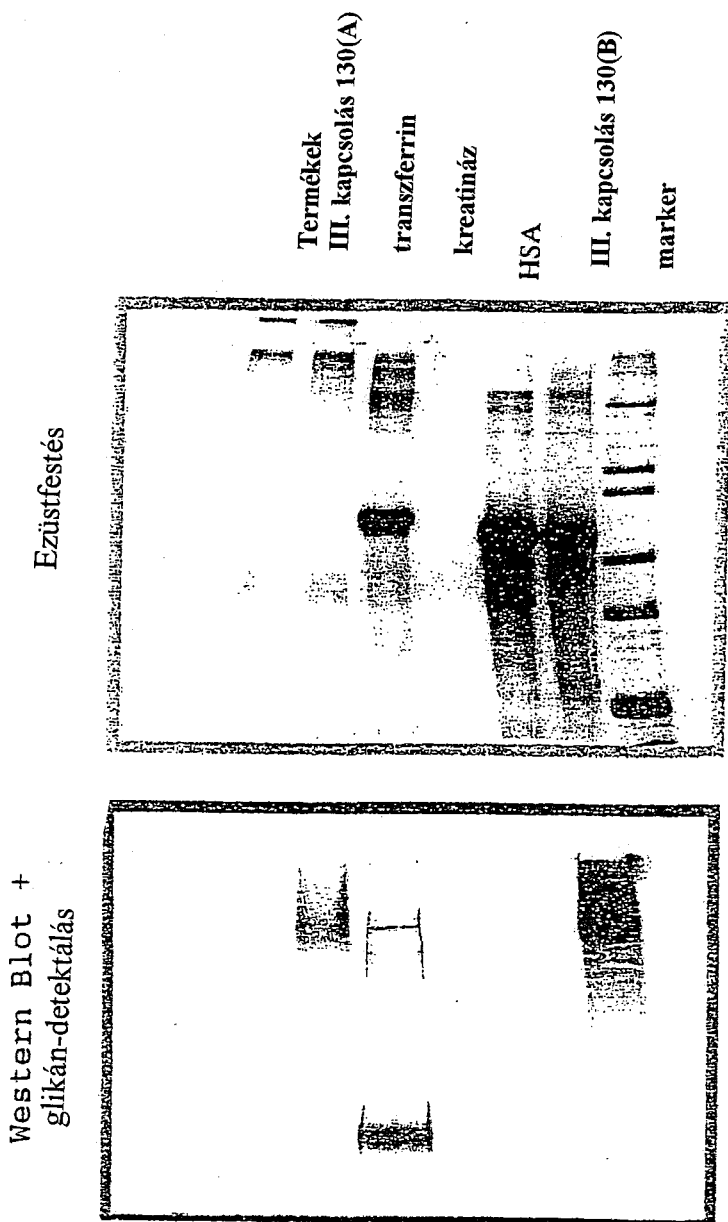
KÖZZÉTETELI PÉLDÁNY



7. ábra

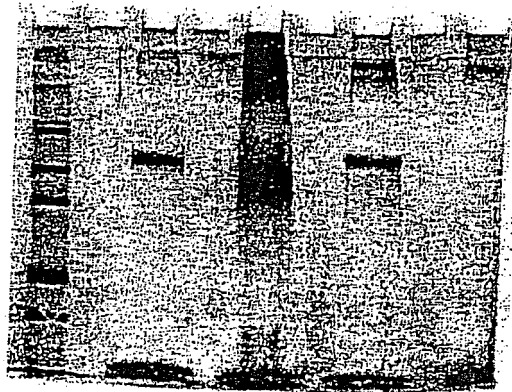


KÖZZÉTETELI PÉLDÁNY



8. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



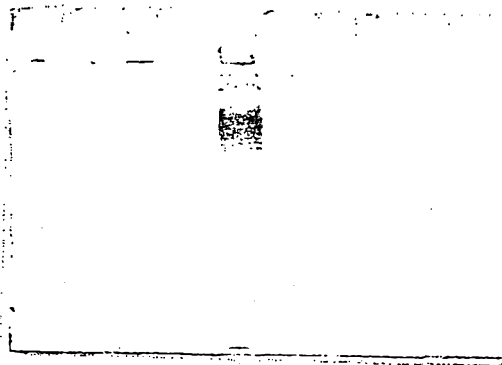
M

HSA

V. kapcsolás
OX-HES 10 kD

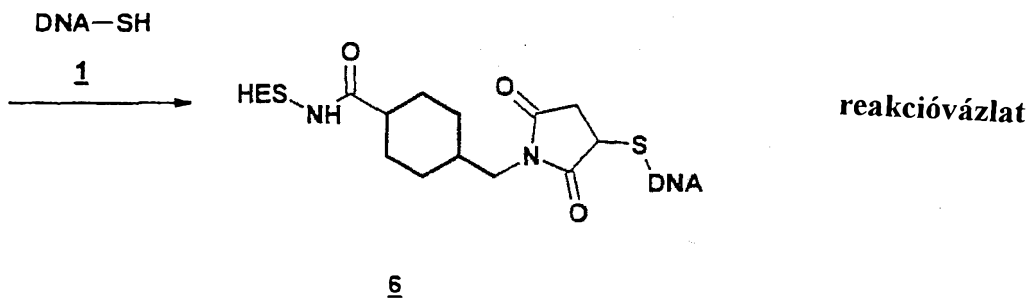
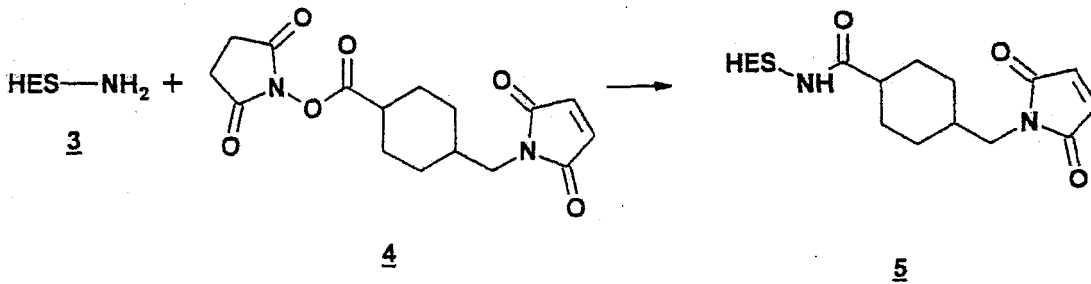
transzferrin

kreatináz

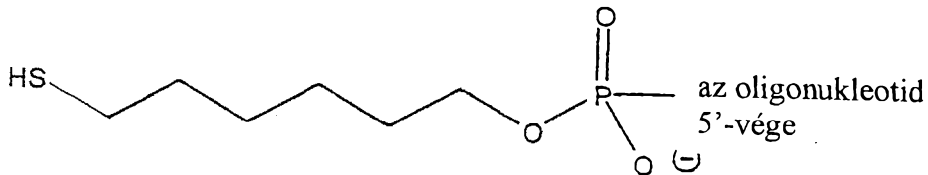


9. ábra

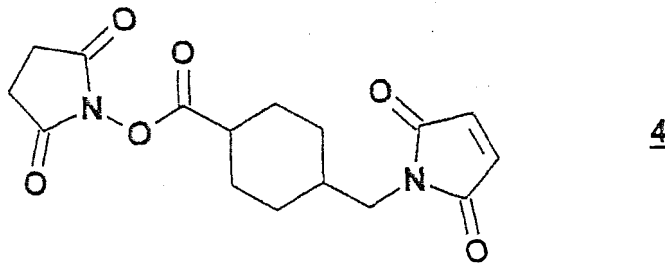
KÖZZÉTETELI PÉLDÁNY



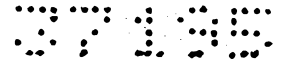
A DNS tiomódosított szerkezete



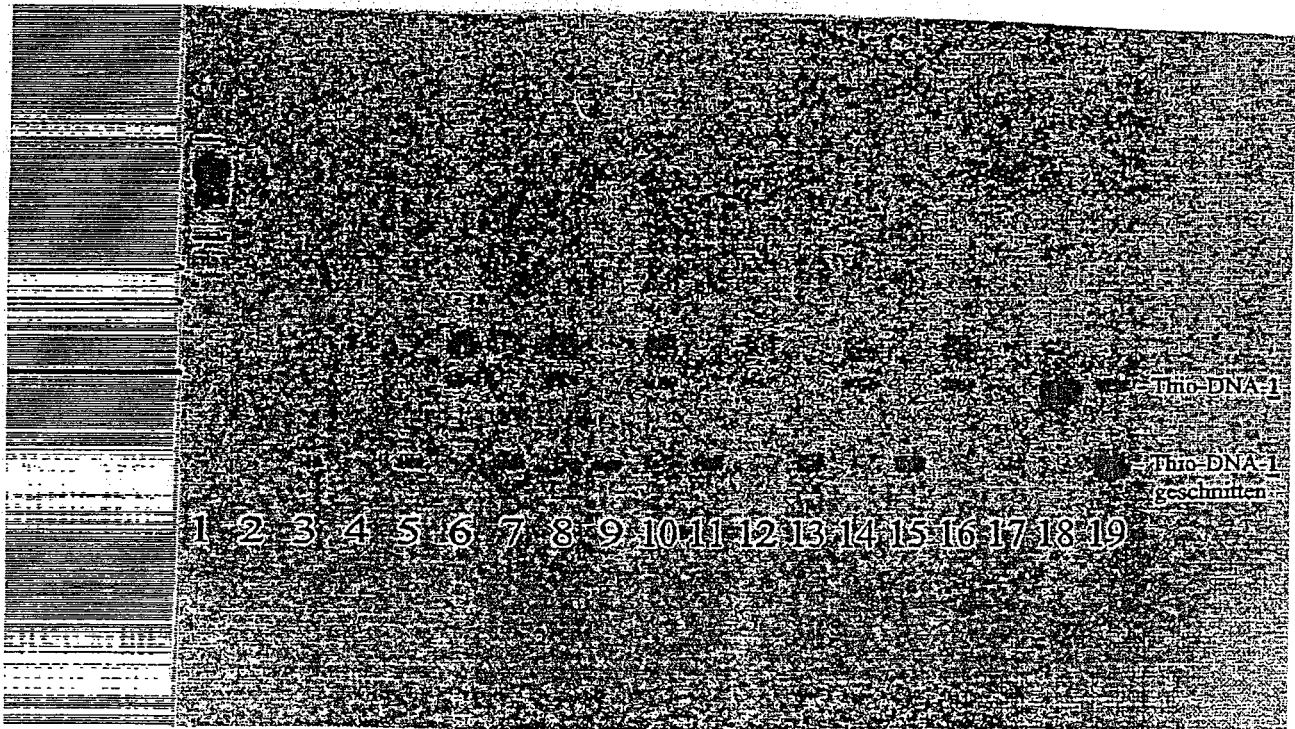
SMCC szerkezete



10. ábra



KÖZZÉTÉTELI PÉLDANY



11. ábra