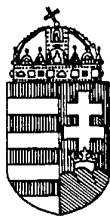


(19) Országkód:

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG

ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés száma: 5847/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 11. 09.
(30) Elsőbbségi adatok:
269 815 1988. 11. 10. US

(40) A közzététel napja: 1990. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1995. 02. 28. SZKV 95/02

(11) Lajstromszám:

210 147 B

(51) Int. Cl.⁶

C 07 K 16/00

C 07 H 15/252

C 07 D 519/04

A 61 K 39/44

A 61 K 31/70

A 61 K 31/395

(72) Feltaláló:

Barton, Russell Lavern, Indianapolis, Indiana (US)

(73) Szabadalmaz:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana (US)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) Eljárás antitest-gyógyszer konjugátumok és az azokat tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az (I) általános képletű – ahol
Ab valamely antitest vagy annak antigént felismerő
fragmentje,

R (V) vagy (XIII) általános képletű csoport, ahol
R⁵ hidrogénatom vagy hidroxilcsoport; vagy ha
R¹⁷ és R¹⁶ egyikének etilcsoport, a másik jelen-
tése hidrogénatom vagy hidroxilcsoport, akkor
R¹⁸ hidrogénatom; vagy
R¹⁷ és R¹⁸ a szénatomokkal együtt, melyekhez

kapcsolódnak, egy oxirángyűrűt képeznek, és
ekkor az R¹⁶ etilcsoport;

R¹⁹ hidrogénatom vagy acetilcsoport, és

p 0 vagy 1;

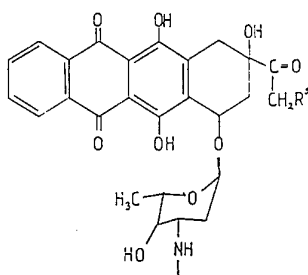
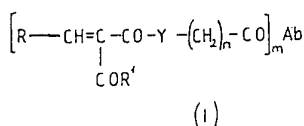
R¹ 1–4 szénatomos alkoxycsoport;

Y oxigénatom vagy -NH- csoport;

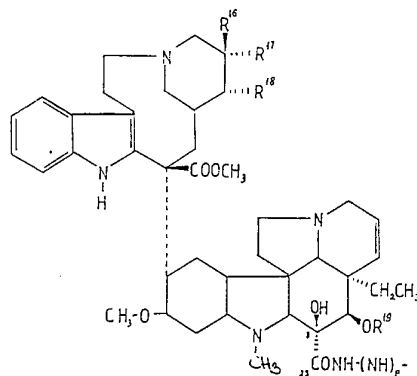
n 1–8;

m 1–10 –

konjugátum előállítására.



(V)



(XIII)

A szerves kémia, gyógyszerkémia és az immunológia területére tartozó találmány tárgya eljárás hatóanyagok antitestekkel képzett új konjugátumainak előállítására. A konjugátumok alkalmasak a hatóanyag célzott bevitelére, minthogy az antitest irányítva viszi a hatóanyagot a kívánt szövethez vagy sejtekhez. A konjugátum egy két-kötőértékű kötőcsoportra épül fel, mely egyik kötőhelyén az antitest, másik kötőhelyén a hatóanyagot köti meg. Ugyancsak foglalkozunk a konjugátumok előállításának köztesanyagaival is.

A gyógyszerkémia egyre specifikusabb és hatásosabb gyógyszereket nyújt az egyes betegségek kezelésére, illetve megelőzésére. Egészen mostanáig azonban nem volt arra mód, hogy a hatóanyagot a szervezetnek közvetlenül ahhoz a részéhez juttassuk el, ahol a hatást elérni szándékozunk. Noha gyakran van lehetőségünk a beteget olyan gyógyszerrel kezelni, mely csak a kívánt specifikus hatást fejt ki és nincs hatással az egész szervezetre, mégis az össz-testtömegre vonatkoztatott dózisokat kell beadnunk. Ezzel szemben, ha lehetőség nyílna a hatóanyagoknak közvetlenül a kezelendő szervhez, szövethez, sőt sejtekhez való eljuttatásához, igen kis mennyiségű össz-dózist kellene bevinnünk, minthogy a hatóanyag koncentráltan ott hatna, ahol erre szükség van. A beteg biztonsága és a hatóanyag alkalmazásának gazdaságossága szempontjából nyilvánvaló ennek az eljárásnak az előnye.

Néhány éve az immunológiában már történnek kísérletek a célzott kezelésre, oly módon, hogy a hatóanyagot olyan antitesttel kötik össze, mely irányítottan eljut azokhoz az antigénekhez, melyek azokon a területeken lokalizáltak, ahol a hatóanyag hatása kívántatik. Számos szabadalom és tudományos közlemény foglalkozik ilyen hatóanyag/antitest konjugátummal. Mostanáig azonban nem került terápiás alkalmazásra ilyen konjugátum.

A találmány tárgya eljárás az (I) általános képletű – ahol

Ab valamely antitest vagy annak antigént felismerő fragmentje,

R (V) vagy (XIII) általános képletű csoport, ahol R^5 hidrogénatom vagy hidroxilcsoport; vagy ha

R^{17} és R^{16} egyikének jelentése etilcsoport, a másik jelentése hidrogénatom vagy hidroxilcsoport, akkor

R^{18} hidrogénatom; vagy

R^{17} és R^{18} a szénatomokkal együtt, melyekhez kapcsolódnak, egy oxirángyűrűt képeznek, és ekkor az R^{16} etilcsoport;

R^{19} hidrogénatom vagy acetylcsoporthoz, és p 0 vagy 1;

R^1 jelentése 1–4 szénatomos alkoxycsoport;

Y jelentése oxigénatom vagy -NH- csoport;

n jelentése 1–8;

m jelentése 1–10 –

fiziológiai szempontból alkalmazható gyógyszerkonjugátum előállítására, melynek során az alábbi említésre kerülő (IV) általános képletű hatóanyag-származékot a fentiekben meghatározott Ab antitesttel vagy antitest-fragmentekkel reagáltatjuk.

A találmány további tárgya eljárás gyógyszerkészítmények előállítására, melyek a találmány szerinti konjugátumot és parenterális úton bevihető közeg tartalmaznak.

5 A (II) és (IV) általános képletű vegyületek új köz-belső termékek.

A leírásban megadott hőmérsékleti értékek mind Celsius-fokban értendők. Valamennyi százalék, koncentráció és hasonló tömegegységre vannak megadva, hacsak másként nem jelöljük. A konjugátumra vonatkozó koncentrációk és dózisok a konjugátumban lévő hatóanyagra vonatkoznak.

10 Az „1–4 szénatomszámú alkoxycsoport” kifejezésen metoxi-, propoxi-, izopropoxycsoportot, és a butoxycsoport különféle izomerjeit értjük, beleértve az n-butoxi- és terc-butoxycsoportot.

A találmány szövegében a vegyületek általánosságban malonátokként szerepelnek. Nyilvánvaló azonban, hogy azoknál a vegyületeknél, ahol Y jelentése aminocsoport, a malonát elnevezés a helyes és ezt az elnevezést használjuk, ahol specifikusan ezek a vegyületek szerepelnek.

A „karboxilcsoportot védő csoport” kifejezés alatt olyan szerves csoportokat értünk, melyek alkalmasak arra, hogy miközben a molekula más részén reakciót hajtunk végre, a karboxilcsoportot megvédjük. A szintetikus kémiában igen sok ilyen csoport ismert és felhasználásra kerül, különösen a peptidkémia-ban. E tárgyban különösen hasznos Gree könyve: „Protective groups in organic synthesis” (John Wiley and Sons, New York, 1981). A karboxilcsoportok védőcsoportjaival az 5. fejezet foglalkozik. A mi szempontunkból a rövidszénláncú alkilcsoportok a legelőnyösebbek, ezen belül is főleg az etoxycsoport. Green szerint további előnyös és alkalmazható védőcsoport például a metoxi-metoxi-, a tetrahidropiránil-oxi-, tetrahidrofuranil-oxi-, benzil-oxi-metoxi-, fenacil-oxi- és szubsztituált fenacil-oxi-csoport, a 2,2,2-triklór-etoxi- és más, halogénnel szubsztituált etoxycsoport, a trimetil-szilil-etoxi-, metil-tio-etoxi-, toluolszulfonil-etoxi-, terc-butoxi-, ciklopentoxi-, benzil-oxi-csoport, a tri- és trifenil-oxi-metoxi-csoport és hasonló, valamint az amidképző csoportok, mint amilyen az amino-, etil-amino-, dime-til-amino-, pirrolidino-, morfolino-, piperidino-, dietil-amino-etil-amino-csoport, stb.

45 A „karbonsavat aktiváló csoport” kifejezés azokra a csoportokra vonatkozik, melyeket a szintetikus szerves kémiában használnak a karbonsavak reakcióképességének fokozására. Ilyen csoport a benzolszulfonil-oxi-, 50 metánszulfonil-oxi-, toluolszulfonil-oxi-, ftálimidil-oxi-, szukcinimid-oxi-, klór-, benzo-triazolil-oxi-, bróm-, azidocsoport, stb. A találmány szempontjából előnyös aktiváló csoport az N-szukcinimid-oxi-, ftálimidil-oxi- és a benzo-triazolil-oxi-csoport.

55 A „karbonsavval söt képző csoport” kifejezésen olyan általánosan értelmezett csoportokat értünk, melyek egy oxigénatomon keresztül söt képeznek a karbonsavval. Ilyen kívánatos sóképzők például az alkálifémek, az aminocsoportok és a kvaterner ammónium- 60 csoportok; közelebből a legelőnyösebbek a nátrium-,

kálium-, lítium-, az 1–4 szénatomszámú alkil-amino-, dialkil-amino- és trialkil-amino-csoport, a kvaterner ammóniumcsoportok, ahol a nitrogénatom négy hidrogénnel szubsztituált, az 1–4 szénatomszámú alkilcsoport, a fenil- vagy benzilcsoport. A körülményektől függően például az alábbi kvaterner ammóniumcsoportok közül választhatunk: ammónium, tetrametil-ammonium, dietil-dimetil-ammonium, dietil-dibutil-ammonium, benzil-trimetil-ammonium, terc-butil-trimetil-ammonium, fenil-trietil-ammonium, dietil-dipropil-ammonium, szek-butil-trimetil-ammonium, izobutil-trietil-ammonium és hasonló. Alkalmas sóképzők továbbá az olyan aminok, mint például a metil-amin, butil-amin, trietil-amin, dipropil-amin, dietanol-amin, trietil-amin, dipropil-amin, dietanol-amin, stb.

A találmány szerinti gyógyszerkonjugátum antitestből, egy adott kémiai csoportba tartozó hatóanyagból és a kettőt összekapcsoló kötőcsoportból áll. Foglalkozik a találmány a konjugátumok elkészítéséhez használt malonát köztesanyagokkal és az antitestszármazékokkal is, melyeket az antitestek, vagy antitest fragmentek és a malonát köztesanyagok reagáltatásával állítunk elő. Elsőként az antitesteket és a hatóanyagokat tárgyaljuk meg, majd a malonát köztitermékeket, részletezzük a szintéziseket és végül a szintézisre és a konjugátumok biológiai hatékonyságára adunk meg példákat.

A találmány szerinti gyógyszerkonjugátum hatását a hatóanyag biológiai hatékonysága és az antitest antigén-szelektivitása határozza meg. Az antitestet aszerint választjuk ki, hogy felismeri-e azt az antigént, mely ahhoz a sejthez kötődik, melyet a hatóanyaggal számunkra kívánt módon befolyásolni akarunk. Így például, ha a hatóanyag neoplazma ellenes szer, olyan antitestet kell kiválasztanunk, mely a tumorsejthez kötődő antigént ismeri fel. Az alkalmazandó hatóanyag jellegétől függően, adott esetben előnyösen olyan antitesteket választunk, melyeket a sejt belsejébe felvesz vagy a felületi antigén felismerésével a felszínen megkötve tart.

Az antitest forrása a jelen találmány szempontjából nem döntő. Kiválaszthatjuk az immunglobulinok bármelyik csoportjából vagy alcsoportjából, ideértve az IgG-t, IgA-t, IgM-t, IgE-t, és az IgD-t. Hasonlóképpen nem döntő a faj, ahonnan származik, ha az antitest megcélazza azt a sejtet, ahol a hatóanyagnak ki kell fejtenie hatását.

A gyógyszerkonjugátumokhoz leginkább monoklonális antitesteket használnak, a jelen találmány szerinti konjugátumhoz is ezt előnyös alkalmazni, de a poliklonális antitestek alkalmazása sem kizárt. Újabb típusú antitest a kiméra-antitest, amit rekombináns technikával állítanak elő laboratóriumban. Ezek olyan DNS-ek expressziójával keletkeznek, melyek bármelyik kívánt antitest antigén-kötőhely régióját vagy az antitest más aminosavszekvenciáját kódolják. Így olyan kiméra-antitestek kaphatók, melyek egyik része egy adott fajból, a másik része egy másiktól származik. Ezek is előnyösen felhasználhatók a találmány szerinti konjugátumhoz.

Az antitest eredete és természete mindaddig nem kritikus, amíg megcélazza a kezelendő sejtet, és nem teszi a konjugátumot elfogadhatatlanul toxikussá. A szakemberek számára az itt leírtak alapján a kiválasztott antitestekből könnyen előállítható a konjugátum és könnyen minősíthető is. Az antitestek és a konjugátumok vizsgálatára megadunk néhány módszert.

Először is az antitestet egy olyan hibridómának kell termelnie, ami elég stabil ahhoz, hogy jelentős mennyiségű antitest termelődjön. Az antitestnek részt kell vennie a konjugációs reakcióban és a tisztítási eljárásokban, és különösen lényeges a kellő vízdoldékonysága, hogy a kémiai aktivitásokat elfogadható koncentrációkban lehessen végrehajtani.

A kiválasztott antitesttel képzett konjugátumot először az antigén-kötőképessége szempontjából vizsgáljuk. A szabad antitest kötőképességéhez viszonyított enyhe csökkenés várható és elfogadható. Ezt követően megvizsgáljuk a konjugátum in vitro toxicitását az antigén-pozitív sejtekkel szemben. A hatékony konjugátumnak valamivel kisebb citotoxicitása van, mint a szabad hatóanyagnak ugyanolyan körülmények között vizsgálva. Az első két vizsgálaton átjutó konjugátumot meztelen egerekbe átültetett humán tumoron értékeljük Johnson és Laguzza módszere szerint [Cancer Res. 47, 3118–22 (1987)]. A kiválasztott konjugátumot meztelen egereken teszteljük a szabad hatóanyaghoz, a szabad hatóanyag és a szabad antitest keverékéhez és egy olyan konjugátumhoz viszonyítva, melynek nincs jelen megcélzandó immunglobulinja. A konjugátumnak mindezekhez képest hatásosabbnak és biztonságosabbnak kell lennie. A dózistartományra vonatkozó vizsgálatokat xenográft modellel végezzük.

Nyilvánvaló, hogy a helyesen megválasztott antitest-fragmentek ugyanolyan eredménnyel alkalmazhatók, mint az ép antitest. Következésképpen a gyakorlatban az antitest megfelelő fragmenteit, főként az $F(ab')_2$ fragmenst, mely a kezelendő sejtekhez kötődő antigént felismeri, ugyanúgy használhatjuk, mint az intakt antitestet.

A pontos mechanizmus, mellyel a kötőcsoportot szolgáltató vegyület reagál az antitesttel és megkötődik azon, nem teljesen ismert és az (I) általános képletben a kapcsolódás nem részletezett. Feltehető, hogy acileződési reakción keresztül történik. Az antitest molekulán több acilelezhető hely is van. Legáltalánosabb a feltételezés, hogy a reakció a lizin szabad aminosocsoportján történik, de acileleződhet hidroxilcsoport, fenolcsoport, imidazolgyűrű és talán más csoport is.

Az (I) általános képlet mutatja, hogy egy antitest-molekulához 1–10 kötőcsoport/hatóanyag egység kapcsolódik. Ez természetesen egy átlagos szám, egy konjugátumban az egyes antitestmolekulákhoz kötődő egységek száma, a konjugációs arány adott tartományon belül változó. A költséges antitest akkor a leggazdaságosabban kihasználható, ha minden egyes antitestmolekulához kötődik adott számú hatóanyag. Ha viszont az optimálisnál több hatóanyag kötődik egy antitestmolekulához, az már rontja az antitest antigénfelismerő képességét és kötőképességét, ezért meg kell találni az

optimális m értéket. Az előnyös m érték általában 4–10, még előnyösebben 3–8.

Nagyszámú antigén áll rendelkezésre, melyet a találmány szerint felhasználhatunk, és a szakfolyóiratok minden számában találhatunk további alkalmas antitestekről szóló leírást. Lehetetlen és szükségtelen, hogy felsoroljuk mindazokat az antitesteket, amelyeket a találmány szerint felhasználhatunk. Az átlagos szakismertető immunológus és kémikus képes az antitest kiválasztására, ha olyan forrásokat használ fel, mint az American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) katalógusa vagy a Linscott's Directory által szerkesztett (40 Glen Krive, Mill Valley, California, USA 94941) Biological Reagents című kézikönyv. Ezek szerint a szakember könnyen kiválaszthatja az antitestet bármelyik determinánssal szemben, ami lehet egy tumor, baktérium, gomba, vírus, parazita, mikoplazma vagy egy hisztokompatibilis antigén, illetve egy patogén felületi antigén, toxin, enzim, allergén vagy más típusú, fiziológiai szempontból fontos sejtekkel kapcsolatos antigén.

A találmány legelőnyösebb alkalmazási területe, a citotoxikus hatóanyagok eljuttatása rákos sejtekhez, melyek lehetnek pikkelyes-karcinóma sejtek, adenokarcinóma-sejtek, kis sejtű karcinómasejtek, glióma-sejtek, melanómasejtek, vesekarcinómasejtek, átmeneti típusú karcinómasejtek, szarkóma sejtek, támasztószöveti tumor erezetének sejtjei, lifoid tumorok – például leukémia és limfóma – sejtjei.

Valamennyi ilyen típusú célsejtnek megfelelő antitest a rendelkezésünkre áll, és lelőhelyei a „Linscott's Directory”-ban megtalálható. Ezen túlmenően az ilyen antitestek termeléséhez szükséges hibridómák a szokásos módon beszerezhetők az ATCC és más gyűjteményeken keresztül.

A találmány rákellenes felhasználhatósága szempontjából számos ma ismert antitest különösen fontos lehet. Ilyen előnyös, specifikus antitest például az ATCC HB 9682 hibridóma által termelt L/102 antitest.

Egy másik érdekes antitest a KS1/4, melyet elsőként Varki és munkatársai fedeztek fel [Cancer Research, 44. 681–686 (1984)]. Ma már számos olyan plazmid van letétbe helyezve, melyek a monoklonális KS1/4 antitest különböző részeinek kódoló szekvenciáját tartalmazzák. Ezek a plazmidok a Northern Regional Research Laboratory-tól (Peoria, Illinois, USA) beszerezhetők. A szakemberek ezekkel a plazmidokkal rekombinációs eljárások útján olyan kiméra antitesteket állíthatnak elő, melyek hozzákapszolódnak az adenokarcinóma sejtek felületén sűrűn található antigénekhez. Az ilyen antitestek elkészítésére részletes leírást találunk a 89 303 814. 1 számú (1989. április 18.) európai szabadalmi leírásban. Az alábbi plazmidok a KS1/4 antisszel vannak kapcsolatban.

pGKC2310 plazmid – a könnyű lánc kódoló szekvenciája, a könnyű láncához kapcsolódó szignál peptid és a 5', valamint a 3' nem transzlálódó szakaszok; a K12 MM294/pGKC2310, NRRL B-18356 E. coliból izolálva.

pG2A52 plazmid – a nehéz láncot kódoló szekven-

cia, a nehéz láncához kapcsolódó szignálpeptid szekvenciája, az 5', valamint a 3' nem transzlálódó szakaszai; a K12 MM294/pG2A52, NRRL B-18357 E. coliból izolálva.

5 CHKC2–6 plazmid – a könnyű lánc variábilis szakaszának kódoló szekvenciája, a könnyű láncához kapcsolódó szignálpeptid kódoló szekvenciája, a humán Ig könnyű láncának konstans szakaszát kódoló szekvencia; K12 DH5/CHKC2–18, NRRL B-18358 E. coliból izolálva.

10 CHKC2–18 plazmid – módosított könnyű lánc variábilis szakaszának kódoló szekvenciája, a könnyű láncához kapcsolódó szignálpeptid kódoló szekvenciája, a humán IgG könnyű láncának konstans szakaszát kódoló szekvencia; K12 DH5/CHKC2–6, NRRL B-18359 E. coliból izolálva.

CH2A5 plazmid – a nehéz lánc variábilis szakaszának kódoló szekvenciája, a nehéz láncához kapcsolódó szignálpeptid kódoló szekvenciája, a humán IgG1 nehéz láncának konstans szakaszát kódoló szekvencia; K12 MM294/CH2A5, NRRL B-18360 E. coliból izolálva.

CH2A5IG2 plazmid – a nehéz lánc variábilis szakaszát kódoló szekvencia, a nehéz láncához kapcsolódó szignálpeptid kódoló szekvenciája, a humán IgG2 nehéz láncának konstans szakaszát kódoló szekvencia; K12 DH5/CH2A5IG2, NRRL B-18361 E. coliból izolálva.

CH2A5IG3 plazmid – a nehéz lánc variábilis szakaszát kódoló szekvencia, a nehéz láncához kapcsolódó szignálpeptid kódoló szekvenciája, a humán IgG3 nehéz láncának konstans szakaszát kódoló szekvenciája; K12 DH5/CH2A5IG3, NRRL B-18362 E. coliból izolálva.

35 CH2A5IG4 plazmid – a nehéz lánc variábilis szakaszát kódoló szekvencia, a nehéz láncához kapcsolódó szignálpeptid kódoló szekvenciája, a humán IgG4 nehéz láncának konstans szakaszát kódoló szekvencia; K12 DH5/CH2A5IG4, NRRL B-18363 E. coliból izolálva.

40 Az ATCC HB21 hibridóma által termelt 5E9C11 antitest felismeri a transzferrin receptort, melyet sok tumor kifejez. A National Cancer Institute-től beszerezhető B72.3 antitest a mellrák és a vastagbélrák által kifejezett antigéneket ismeri fel.

45 Az OKT3 és az OKT4 két olyan érdekes antitest, mely nem tumorális antigénnel szemben aktív, hanem a perifériás T-sejtekhez, illetve a humán T-helper sejtekhez kötődnek. Ezeket a antitesteket az ATCC CRL8001, illetve a CRL8002 hibridómák termelik.

50 Különböző terápiás célokkal alkalmazható antitestek további forrásai a következők. Humán anti-limfocita és anti-monocita antitestek, melyek immunmodulációs céllal és a tumorterápiában felhasználhatók: az ATCC HB2, HB22, HB44, HB78 és HB136 kultúrák által termelt antitestek.

55 Az ATCC HB84 kultúra tumorterápiára felhasználható antitranszferrin receptor antitestet termel. Az ATCC HB8059 kultúra a vastag- és végbélrák monoszialoganglioziddal szembeni antitestet, a HB136 kul-

túra az érett humán T-sejt felszíni antigénnel szembeni antitestet termel, mely felhasználható immunmodulációra és a T-sejt leukémia terápiában.

Az ATCC HB9620 hibridóma egy karcinoembriónik antigénnel szemben antitestet termel, jele: CEM 231.6.7.

Egy immunológus vagy a hatóanyag célzott bevitelében ismeretekkel rendelkező szakember számára az ismert közlemények és a fenti eligazító példák és leírások segítségével nem nehéz kiválasztani egy olyan antitestet, mellyel a kívánt hatóanyagot a kezelendő célsejthez eljuttatja.

Hangsúlyozni kívánjuk, hogy a jelen találmány lényege az az eljárás, hogy egy hatóanyagot a fentebb leírt malonát kötőcsoporton keresztül egy antitesthez kötjük, és ebből a szempontból semmi korlátozás nem vonatkozik az antitestre. A találmány szerinti malonát kötőcsoport kedvezően alkalmazható bármilyen terápiás vagy profilaktikus céllal használt hatóanyaghoz, kizárólag azzal a követelménnyel, hogy a hatóanyag rendelkezzen olyan kémiai funkciók csoportjával, mely a malonátcsoporthoz kötődni tud, és természetesen ugyanez vonatkozik arra az antitestre is, mellyel a hatóanyagot a kívánt célsejthez eljuttatni akarjuk. A találmány szerinti metilén kötési mechanizmus azt ígéri, hogy a hatóanyag reaktív amino-, hidroxil- vagy tiolcsoporttal rendelkezzen. Továbbá a hatóanyag természetesen olyan tulajdonságúnak kell lennie, hogy a funkciók csoportja és a kötőcsoportot szolgáltató reagens közötti reakcióban a hatóanyag aktivitása ne károsodjon.

Ez a kötőcsoport lényegében valamennyi típusú hatóanyaghoz felhasználható, vagyis például antibakteriális, antivirális, antifungális, rákellenes, mikroplazmaellenes, stb. hatóanyagokhoz. Az így felépített gyógyszerkonjugátumok azzal a céllal használhatók fel, mellyel az illető hatóanyagok, és fokozott hatékonysággal rendelkeznek az antitest jelenlétéből következőleg, mely a hatóanyagot ahhoz a sejthez vezeti, ahol hatásának kifejtése kívánt.

A 4 671 958 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismerteti azokat a hatóanyagokat és más vegyületeket, melyek felhasználhatók a gyógyszerkonjugátum elkészítéséhez.

Amint említettük, a hatóanyag az amino, hidroxil vagy tiol funkciók csoportján keresztül reagál. Ezeket a kifejezéseket kiterjesztett értelemben használjuk, azaz az „aminocsoport” kifejezés magába foglalja azokat az aminocsoportokat, melyek karboxamidok, hidrazidok, karbamátok, stb. részét képezik és azokat az aminocsoportokat, melyek egyszerűen egy szénhidrogén szerkezethez kapcsolódnak. Az aminocsoportnak lehet egy harmadik kis szubsztituense, akkora csoport, mely nem okoz térbeli gátlást a malonátszerkezettel való reakciónál. Ilyen szubsztituens lehet például egy egyenes láncú alkilcsoport vagy hasonló.

Hasonlóképpen a hidroxilcsoport vagy a tiolcsoport része lehet egy karbonsavnak vagy tiosavnak.

Noha a hatóanyag bármilyen kémiai típusú és terápiás vagy profilaktikus hatású lehet, előnyös olyan

hatóanyagokat használni, melyek a reakcióban aminocsoporttal vesznek részt. Még előnyösebbek azok a hatóanyagok, ahol az aminocsoport hidrazinnak vagy egy hidrazin szerkezetnek a része.

Az előnyösen alkalmazható hatóanyagok a citotoxikus anyagok csoportja, különösen azok, melyeket a rák gyógyításánál használnak. Ide tartoznak általában az alkilezőszerek, antiproliferatív anyagok, tubulinkötő anyagok, stb. A citotoxikus anyagok előnyös csoportját képezik például a daunomicin típusú hatóanyagok, a vinca hatóanyagok, a hatóanyagok pteridin típusú csoportja és a podofiltoxinok. A felsorolt csoportba tartozók közül különösen alkalmas például a doxorubicin, daunorubicin, aminopterin, metotrexát, metopterin, diklór-metotrexát, mitomicin-C, porfiromicin, 5-fluoruracil, 6-merkaptopurin, citozin-arabinozid, podofiltoxin, etopozid, melfalan, vinblasztin, vinkrisztin, leurozidin, vindezin, leurozin, stb. Nyilvánvaló, hogy jelentéktelen kémiai módosításokat elvégezhetünk az előnyös és általánosságban felsorolt vegyületeken, abból a célból, hogy a reakciókat kedvezőbb körülmények között végezzük.

Az is nyilvánvaló, hogy az előnyös konjugátumok előnyös hatóanyagokból készíthetők.

Az (V) általános képletű csoportok a daunomicin (vagy adriamicin) csoportba tartozó vegyületekből vezethetők le, míg a (XIII) képlet a vinka hatóanyagból származó csoportot szemlélteti.

A jelen találmányban alkalmazott vinka hatóanyagok ismertek a szakterületen, főként Cullinan és munkatársai, valamint Tronet és munkatársai szabadalmából és közleményeiből. Cullinan és munkatársainak a 4 203 898 számú szabadalmi leírása különösen sok tájékoztatást ad a vinka hatóanyagok szintézisét illetően.

A leginkább előnyösek a fenti (XIII) általános képlettel leírható vinka hatóanyagok. Nyilvánvaló, hogy a szerkezeti képlet különféle generikus vagy triviális nevű vegyületre vagy azok származékaira jellemző. Az egyszerűség kedvéért a találmányban nem használjuk a vinka hatóanyagok bonyolult elnevezéseit, hanem ezeket az anyagokat vinblasztin-származékokként említjük. A vinblasztinnál a fenti képletben az egyes csoportok jelentése a következő: az

R¹⁶ etilcsoportot,

45 R¹⁷ hidroxilcsoportot,

R¹⁸ hidrogénatomot,

R¹⁹ acetilcsoportot jelent,

és a 23-as szénatomnál a képletben szereplő karboxamid szerkezet helyett inkább metilészter szerkezet van.

Különösen előnyösek azok az alábbi vinka hatóanyagok, melyekre a feltüntetett megszorítások érvényesek. Nyilvánvaló, hogy az egyes megszorításokat kombinálhatjuk is, még szűkebbre korlátozva a legelőnyösebb hatóanyagok körét. Előnyösen tehát azok a vinka hatóanyagok, ahol

A) R¹⁶ jelentése etilcsoport,

B) R¹⁸ jelentése hidrogénatom,

C) az R¹⁶ és R¹⁷ egyikének jelentése etilcsoport, a másik hidrogénatom vagy hidroxilcsoport,

- D) R^{17} jelentése hidroxilcsoport,
 E) R^{19} jelentése hidrogénatom,
 F) R^{19} jelentése acetilcsoport,
 G) p jelentése 1,
 H) p jelentése 0.

A találmány szerinti malonát köztesanyagok reagálnak az antitesttel és a hatóanyaggal. A malonát köztesanyagok tehát annak a kapcsolócsoportnak az előanyagai, melyek az antitestet és a hatóanyagot összekötik; következésképpen a köztesanyag-malonátok megfelelnek a konjugátumok előnyös szerkezetének.

A köztesanyagok a malonsav származékai; a szakemberek számára ismert vagy könnyen megtervezhető folyamatokkal állíthatók elő.

A találmány szerinti hatóanyag-származékokat úgy állítjuk elő, hogy valamely (IV) általános képletű hatóanyag-származékot – ahol R, R^1 , Y és n jelentése az (I) általános képletnél megadott és R^3 jelentése hidroxilcsoport vagy karboxilcsoportot aktiváló csoport vagy karbonsavval sőt képező csoport – valamely antitesttel vagy annak antigént felismerő frangmentjével reagáltatjuk. A kiindulási anyagok előállítására a megfelelő hatóanyagot azzal a (II) általános képletű malonát köztesterméssel reagáltatjuk, melyeket a konjugátumok elkészítésekor az antitesttel reagáltatunk. A hatóanyag-származékok fenti meghatározásában az R, R^1 , R^3 , Y és n jelentésének általános és előnyösként korlátozott értelmezését a fentiekben már ismertettük. Nyilvánvaló, hogy bármelyik kívánt vagy előnyös hatóanyag-származék előállítható, ha a különféle változtatható csoportok közül a kívánt csoportokat, a malonát köztesanyag főként előnyös csoportjait választjuk ki. A hatóanyag-származékokat az alábbiakban tárgyalt szintézis módszerekkel állítjuk elő.

A szerves kémikusok előtt magától értetődő, hogy a többlépcsős szintetikus folyamatban a kiindulási és köztesanyagok különféle reaktív funkciós csoportjait az alatt az idő alatt védeni kell, mialatt a molekulák más funkciós csoportjain a reakciót végrehajtjuk. A reakciók befejeztével a védőcsoportokat általában el kell távolítani. A védőcsoportok felhelyezését és eltávolítását a szerves kémiában szokásosan használt eljárásokkal végezzük, így nincs arra szükség, hogy e műveleteket teljes egészükben tárgyaljuk. Megjegyezzük azonban, hogy a fent említett Greene kézikönyvben megtárgyaljuk valamennyi általában előforduló csoport – hidroxilcsoport, tiolcsoport, aminocsoport, stb. – védőcsoportjait, illetve összefoglalva a csoportok felvitelének és eltávolításának eljárásait.

Egy általánosan képzett szerves kémikus számára nem jelent nehézséget, hogy az általános ismeretek és az átlagos szakirodalom ismeretében a malonát köztestermékeket elkészítse. Az az előnyös, ha az eljárást olyan malonsavszármazékkal kezdjük, ahol a karboxilcsoportok egyikén rajta van az R^2 védőcsoport. A másik karboxilcsoport lehet ugyanígy vagy ettől eltérően szubsztituált. Amennyiben a szubsztituensek különbözőek, a nem $-R^2$ szubsztituensnek az R^2 -nél könnyebben eltávolíthatónak kell lennie. A kiindulási vegyület olyan halogén- vagy aminocsoporttal szubsztituált

alkanoáttal reagáltatjuk, amelynél az alkilánc hossza megfelel az n számú metilencsoportnak. Halo-alkanoáttal használunk azoknak a köztestermékeknek az elkészítéséhez, ahol Y jelentése oxigénatom, kialakítva így az észterkötést. Ebben az esetben a halogéncsoport – vagy más könnyen leváló csoport – a molekulalánc végén van. A molekula végén aminocsoporttal szubsztituált amino-alkánt használunk azoknak a köztestermékeknek az előállításához, ahol Y jelentése aminocsoport. Az alkanoát-észter R^3 csoportjának jelentése védőcsoport.

A reakciót úgy hajtjuk végre, hogy eltávolítjuk a nem- R^2 csoportot a kiindulási vegyületről, majd az így keletkező karbonsavgyököt reagáltatjuk az alkanoáttal. A reakciót sikeresen hajtjuk végre egy bevezető redukcióval, például hidrogénezési katalizátor alkalmazásával ciklohexadién jelenlétében. Alkalmazhatunk hidrogénezést megfelelő katalizátor, például nemesfémkatalizátor jelenlétében.

Elvégezhetjük a reakciót úgy is, hogy a nem $-R^2$ észterkötést erős bázissal felszakítjuk. Ehhez főként lítium-hidroxidot alkalmazunk vizes oldószerben, például vizes acetonban. Miután létrejött a karbonsavgyök, a reakciókeverékhez hozzáadjuk a halo-alkanoáttal. A malonát köztesanyag gyorsan képződik, főként savkötő anyag jelenlétében. Ha azonban a reakcióhoz amino-alkanoáttal használunk, a karbonsavgyököt előzőleg aktiválni kell a fent említett aktiváló csoportok egyikének hozzáadásával.

A fenti reakcióban keletkező malonát köztesanyag rendelkezik az R^3 védőcsoporttal, de nincs rajta az $R^4-CH=$ általános képletű csoport. Ezt az alkoxi-metilén-csoportot úgy visszük rá az első köztesanyagra, hogy azt egy Lewis-sav, például cink-klorid jelenlétében a megfelelő alkil-ortoformiáttal reagáltatjuk. A reakciót 100–200 °C hőmérsékleten végezzük, teljességéhez néhány óra szükséges.

A fenti, valamint az alábbi más reakciókban sincs szükség arra, hogy a kiindulási anyagot szokatlan feleslegben alkalmazzuk. Amint az a szerves kémiában szokásos az aránylag olcsóbb reagensből tanácsos mérsékelt felesleget alkalmazni, hogy ezzel biztosítsuk a drágább reagens teljes mértékű felhasználódását. Ez a szabály különösen igaz az antitestekkel való reakciók esetében, melyek tipikusan drága reagens, nehéz az előállításuk és tisztításuk. Általában feleslegben alkalmazzuk a reaktánst, ha ezzel maximalizáljuk az eljárás gazdaságosságát, tekintettel a reaktánsok árára és a berendezés kihasználtságára.

Szükségtelen azonban felesleget alkalmazni csak azért, hogy a reakciót gyorsítsuk.

A malonát köztesanyagokat olyan körülmények között reagáltatjuk a hatóanyagokkal, ahol az R^4 alkoxi-csoport lehasad, és a visszamaradó metilencsoport reagál a hatóanyag funkciós amino-, hidroxil- vagy tiolcsoportjával. A reakciót általában enyhe körülmények között hajtjuk végre; 0–50 °C hőmérsékleten, olyan szerves oldószerben – vagy annak vizes elegyében –, mely nem reagál egyik reaktánssal sem, és általában egy enyhe bázis – alkálifém-hidrogén-karbonát, alkáli-

fém-karbonát vagy alkálifém-hidroxid – jelenlétében. A reakció rendszerint kvantitatíve lejártszódik, nincs szükség szokatlan reagensfelesleg alkalmazására. A termék tisztítása azonban nagynyomású kromatográfiát vagy más bonyolultabb eljárást kíván, minthogy a hatóanyagszármazékot általában meglehetősen óvatossággal kell tisztítani. A konjugátum elkészítésénél az antitesttel reagáltatjuk a hatóanyagszármazékot. Ha a hatóanyagszármazék bármiféle reaktív szennyezést tartalmaz, az elfoglalja az antitest reaktív helyeit, ezáltal veszteséget okoz a költségesen előállított antitestben.

Abban az esetben, amikor a hatóanyag több reaktív hellyel rendelkezik – mint például a több hidroxilcsoportot tartalmazó nukleozidoknál –, rendszerint arra van szükség, hogy védjük azokat a csoportokat, melyeket a reakcióban nem akarunk felhasználni. Az előzőekben már említettük ezeket a védőcsoportokat, melyek kiválasztása egy szerves kémikus számára nem jelenthet nehézséget.

A karboxilcsoport R^3 védőcsoportját a malonát köztestermékekről eltávolíthatjuk a hatóanyaggal való reakció előtt vagy után. Amennyiben a hatóanyagon védőcsoportokat kell alkalmaznunk, ajánlatos lehet olyanokat kiválasztani, melyek az R^3 csoport eltávolításakor szintén lehasíthatók, ezáltal a védőcsoport eltávolításával kettős célt érhetünk el.

Az antitestet olyan aktivált állapotban lévő malonát köztesanyagokkal reagáltatjuk, melyeknél R^3 jelentése karboxilcsoportot aktiváló csoport. Ennek értelmezését az előzőekben már megadtuk. Az aktiváló csoportot a szokásos észterező reagensekkel – például karbodiimidekkel, főként diciklohexil-karbodiimiddel – visszük fel a karbonsavra (ahol R^3 jelentése hidrogénatom). Ezt a reakciót akkor hajtjuk végre, miután a védőcsoportnak megfelelő módszerrel eltávolítottuk az R^3 savvédő csoportot. Az aktiváló csoport felvitelét közömbös oldószerben – dioxánban, tetrahidrofuranban, klórozott szénhidrogénekben, stb. – hajtjuk végre, általában 0–50 °C közötti hőmérsékleten.

Az antitest és a malonát köztesanyag közötti reakció körülményeinek megválasztásakor a fő szempont az antitest stabilitása. A reakciót olyan összetételű vizes közegben kell elvégezni, ami az antestre nincs káros hatással. Különösen alkalmas vizes közegben ebből a szempontból a borátpuffer, melyben a borátion koncentrációja 0,1–0,5 mól. A másik ilyen alkalmas vizes közeg a puffertolt fiziológiás sóoldat. A közeg kémhatásának enyhén bázikusnak kell lennie, pH = 7–9 közötti értéken. Noha a közegnek vizesnek kell lennie, kis mennyiségű szerves oldószer jelenléte még nem káros, sőt kifejezetten előnyös lehet. Így például a legelőnyösebb a malonát köztesanyagot kis mennyiségű szerves oldószerben – például dimetil-formamidban, acetonnitrilben, tetrahidrofuranban, dioxánban vagy egy glikol-éterben – oldani, és ezt a szerves oldatot adni a vizes közegben készült antitest oldathoz.

Általában viszonylag alacsony koncentrációkkal kell dolgoznunk, mert az antitest oldékonysága nem nagy. Vizes közegben az antitest koncentrációja a leg-
többször 5–25 mg/ml.

Mint fentebb már említettük, minden mólyi antitesthez 1–10 mól kötőcsoport és hatóanyag kötődik. Hogy megkapjuk ezt a konjugációs arányt, az szükséges, hogy a kötőcsoportot reagáltató köztesanyagot feleslegben alkalmazzuk. Az antitestek és az aktív észterek reaktivitása az acilezés körülményei között némileg változó, de általában egy mól antitesthez 5–15 mól kötő köztesanyagot használunk. Az acilezési reakció ideje 0–40 °C hőmérsékleten néhány perctől néhány óráig terjed. Magasabb hőmérsékleten károsodik az antitest, ezért tanácsosabb alacsony hőmérsékletet használni, annál is inkább, hiszen a reakció jellemzően gyors.

Amikor a kötőcsoportokkal ellátott antitestszármazékokat elkészítettük, a reakciókeveréket a szokásos módon végzett kromatografálásnak vetjük alá, hogy elválasszuk az antitestszármazékot a nem reagált kötőcsoportot szolgáltató köztesanyagtól.

Amikor az hatóanyagszármazékot készítjük és a konjugátum előállításának végső lépéseként az antitesttel azt reagáltatjuk, a fenti elővigyázatosságokat ugyanúgy szem előtt kell tartani. Az ott említett elvek szerint határozzuk meg az antitest és a hatóanyagszármazék mennyiségi arányát is. A reakciókörülmények megválasztásánál rendszerint az antitest stabilitására kell tekintettel lennünk, minthogy a hatóanyag várhatóan elviseli mindazokat a hatásokat, melyeket az antitest is károsodás nélkül elvisel.

A hatóanyagszármazékot olyan aktív állapotba kell hozni, ahol R^3 jelentése egy aktiváló csoport. Ezt már az antitestszármazék előállításánál a fentiekben részleteztük.

Az antitestszármazék előállításánál és végső lépéseként a hatóanyaggal való reagáltatásánál be kell tartani azokat az elővigyázatossági szempontokat, melyek az antitest stabilitását biztosítják.

A figyelmet igénylő lépés a hatóanyagszármazék előállítása és annak az antitesttel történő reagáltatása. A módosított antitest és a hatóanyag közti reakciót viszonylag alacsony hőmérsékleten, 0–40 °C tartományban hajtjuk végre, és olyan közeget alkalmazunk, ami az antitestet nem károsítja. Különösen előnyös reakcióközeg például a borátpuffer, különösen a pH = 7–9 kémhatású, 0,1–0,5 mólos nátrium-borát puffer. A reakciót azonban elvégezhetjük más borátpufferben, gyengén savas foszfátpufferben, puffertolt fiziológiás sóoldatban is. Mint fentebb már említettük kevés szerves oldószer jelenléte nem zavaró, amíg ezeknek nincs káros hatásuk az antestre.

Végső lépésként a gyógyszerkonjugátumot tisztítjuk és elkülönítjük. Ez rendszerint kromatográfiás eljárással történik. A konjugátum eluálására alkalmazhatunk olyan koncentrációjú eluent, mely mint közeg megfelel a konjugátumnak a beteg szervezetbe való bejuttatására is. Általában a konjugátum kromatografálás tisztításánál olyan eluent alkalmazunk – előnyösen egy fiziológiai szempontból puffertolt sóoldatot –, mely az oldhatóságból adódó legmagasabb koncentrációt biztosítja. Az eluátumot rendszerint fagyaszttva szárítással beszáritjuk, a konjugátumot ezáltal olyan álla-

potba hozva, hogy az a tárolást, szállítást biztonságosan elviseli. Felhasználáskor steril vizet adva a készítményhez, visszaállítjuk az eredeti állapotot.

Az alábbiakban ismertetünk néhány eljárást, melyek segítségével a konjugátumok hatásossága vizsgálható.

- 1) In vitro vizsgálat: a citotoxikus hatóanyagot tartalmazó konjugátum hatékonyságát úgy határozzuk meg, hogy mérjük a konjugátum humán ráksejtek szövettenyésztésével szembeni citotoxicitását. Az alkalmazott sejtek: a humán tüdő adenokarcinóma UCLA/P3 sejtvonala, a humán pikkelyes karcinóma T222 sejtvonala. Az alábbi táblázatban néhány konjugátum 50%-os gátlási koncentrációját adjuk meg, az adatok a konjugátumban szereplő hatóanyagra vonatkoznak:

konjugátum (a példa száma)	UCLA/P3	T222
8A.	0,1 mcg/ml	>10 mcg/ml
8B.	>10	>10
9A.	>10	>10
11.	>10	
11A.	>10	3,3
20.	>0,0001	
30.	0,26	

- 2) UCLA/P3 teszt egérben: a 20. példában ismertetésre kerülő konjugátumot in vivo vizsgáljuk nőstény Charles River meztelen egereken UCLA/P3 tüdő adenokarcinómával szemben xenográft modellezéssel. Az eljárást azzal kezdjük, hogy minden egyes egérbe szubkután bejuttatunk 10^7 UCLA/P3 tumorsejtet. A beültetést követő 2., 5. és 8. napon az állatokba konjugátumot injektálunk, illetve a kontrollállatokat azonos módon puffert fiziológiás sóoldattal kezeljük. A dózisok a hatóanyagra vonatkoztatva: 0,09–3 mg/kg. A beültetést követő 15., 21. és 28. napon mérjük a tumor méretét. A kezelt csoport 5 állatból, a kontrollcsoport 10 állatból áll. 0,38 mg/kg vagy ennél nagyobb dózissal a 28. napon a kezelés 100%-os tumorszuppressziót eredményez. A 0,19 mg/kg dózis 60%-os, a 0,09 mg/kg dózis 25%-os tumornövekedés-szuppressziót okoz.
- 3) UCLA/P3 teszt egérben: a (2) vizsgálati módszerrel leírtak szerint a 21A. példa alapján előállított konjugátumot vizsgáljuk UCLA/P3 sejtek beültetésével kiváltott tumoron. A konjugátumot ebben az esetben 0,25, 0,5, 1 és 2 mg/kg dózisban adagoljuk, a megadott értékek a hatóanyag mennyiségére vonatkoznak. A dózisok adagolása a beültetést követő 16., 19., 22. és 25. napon történnek. Ugyanezek a napokon mérjük meg a tumorokat is.

Úgy találtuk, hogy a 0,25 mg/kg-os dózis alig befolyásolja a tumor kialakulását, és a beültetést követő 50. napon az ilyen dózissal kezelt állatokban 7500 mg-os nagy daganat alakul ki. A kontrollállatokban erre az időre 8000 mg-os tumorok jelennek

meg. A többi dózissal azonban jelentős tumorszuppresszió figyelhető meg.

70 nappal a beültetés után a 0,5 mg/kg dózist kapott állatoknál a tumor átlagos nagysága 4000; 1 mg/kg dózissal ez az érték 2000 mg; 2 mg/kg dózissal pedig csak 500 mg.

A jelen találmány fontos részét képezi a parenterálisan bevihető gyógyszerkészítmények előállítása is, melyeket a kezeléseknél alkalmazunk. Ezeket a készítményeket a gyógyszerkémiában szokásos módon állíthatjuk össze. A találmány szerinti konjugátumok elfogadható mértékben oldódnak azokban a fiziológiás szempontok alkalmazható közegekben, mint amilyen a fiziológiás sóoldat vagy más hasonló vizes oldat, amelyek biztonságosan bevihetők a szervezetbe.

A parenterális készítmények gyakran szilárd állapotban vannak, előnyösen fagyaszttva szárított formában, amit közvetlenül a felhasználás előtt hozunk eredeti állapotába vissza. Az ilyen készítmények elkészítése jól ismert a gyógyszerkémikusok előtt. A készítmények általában az izotóniát biztosító szervesen sókat és olyan diszpergálószerkeket, például laktózt tartalmaznak, melyek elősegítik a száraz készítmény gyors beoldódását a felhasználáskor. Az eredeti állapot visszaállítására nagytisztaságú vizet használunk, ezzel készítjük el az ismert koncentrációjú oldatokat.

A betegek konjugátummal vagy a konjugátumot tartalmazó gyógyszerkészítményekkel való kezelésénél a kezelés sajátosságai céljától függ az alkalmazott hatóanyag. Az alkalmazott dózis nagysága függ az éppen alkalmazott hatóanyagtól és a kezelendő személy betegségétől, állapotától. Az erre vonatkozó irányelveket az orvosi szakirodalomban megtaláljuk.

Az elmondottak szemléltetésére az alábbiakban példákat adunk meg. A példák kizárólag szemléltető célúak és a találmány oltalmi körét nem korlátozzák.

1. példa

(Benzil-oxi-karbonil-metil)-etil-malonát előállítása

Keverővel ellátott gömbloblikban lévő 400 ml acetonnal feloldunk 50 g dietil-malonátot, majd hozzáadunk 200 ml vizet, ezt követően 156 ml 2n lítium-hidroxid oldatot. A reakciókeveréket környezete hőmérsékletén keverjük 30 percen át, majd csökkentett nyomáson szárazra pároljuk. Hozzáadunk 350 ml dimetil-szulfoxidot, és kevertetés mellett 71,5 g benzil-2-brom-acetátot. A reakciókeveréket környezete hőmérsékletén keverjük 3 órán át, 1000 ml sós-vizes etil-acetáttal extrahálunk, az extraktumot kétszer sóoldattal mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, és egy éjszakán át csökkentett nyomáson betöményítjük. 76,4 g sűrűfolyó folyadékot kapunk, amit 0,1 mm higany-nyomáson desztillálunk, 18,8 g lényegében tiszta állapotban lévő, kívánt termékhez jutva.

2. példa

(Benzil-oxi-karbonil-metil)-etil-malonát előállítása

5 g, szénhordozón lévő palládium katalizátort szuszpendálunk egy keverővel ellátott edényben lévő 60 ml vízmentes etanolban, és hozzáadunk 25 g benzil-

etil-malonátot és 16 ml 1,4-ciklohexadiént. A reakciókeveréket 1,5 órán át keverjük, szűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson sűrűfolyós folyadékká töményítjük. 60 ml dimetil-formamidot és 15,6 ml trietil-amint adunk a bepárlási maradékhoz, majd ezt követően 17,7 ml benzil-(2-bróm-acetát)-ot. A reakciókeveréket a környezeti hőmérsékletén keverjük egy órán át, majd sós vizes etil-acetáttal extrahálunk, az extraktumot telített nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal, sóoldattal, 10%-os citromsav oldattal, majd újra sóoldattal, telített nátrium-hidrogén-karbonát oldattal és sóoldattal mossuk. A mosott extraktumot vízmentes magnézium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük és csökkentett nyomáson bepároljuk, 28,2 g tiszta kívánt terméket nyerve, mely a vékonyrétegkromatográfia szerint egységes. Etil-acetát/hexán futtatószerben az $R_f = 0,55$. Tömegspektroszkópia szerint az $m/e = 280$.

3. példa

(Benzil-oxi-karbonil-metil)-etil-(2-etoxi-metilén-malonát) előállítása

10 g, az 1. példában leírtak szerint előállított köztes anyagot feloldunk 11,1 ml ecetsavanhidridben, és egy keverővel ellátott edényben hozzáadunk 7,8 ml trietil-ortoformiátot. A reakciókeveréket 140–150 °C hőmérsékleten tartjuk 6,5 órán át, majd az illó anyagokat csökkentett nyomáson eltávolítjuk. A bepárlási maradékot 11,1 ml ecetsavanhidridben oldjuk és 50 mg cink-kloridot adunk hozzá. A reakciókeveréket visszafolyatós hűtő alatt 140–150 °C hőmérsékleten tartjuk 16 órán át, majd lehűtjük, 600 ml sós vizes etil-acetáttal extraháljuk, az extraktumot két adag sós vízzel mossuk. A mosott extraktumot vízmentes magnézium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük és betöményítjük. A maradékot minimális mennyiségű etil-acetátban oldjuk és az oldathoz zavarosodásig hexánt adunk. Ezt az anyagot átöntjük egy tölcseren, amit szilikagéllal töltöttünk meg. A szilikagéllal először 1 liter 10% etil-acetátot tartalmazó hexánnal, majd 1 liter 20% etil-acetátot tartalmazó hexánnal eluáljuk. A kívánt termékhez további 2 liter 20% etil-acetátot tartalmazó hexánt adunk, amit csökkentett nyomáson bepárolva, 4,9 g szintelen szirupot nyerünk, ez lényegében a tiszta, kívánt termék.

Elemanalízis:

számított:	C: 60,71, H: 5,99%;
mért:	C: 60,98, H: 6,03%.

4. példa

(Karboxi-metil)-etil-(2-etoxi-metilén-malonát) előállítása

1 g szénen palládium hidrogénező katalizátort 15 ml vízmentes etanolban szuszpendálunk, és egy keverővel ellátott edényben 10 ml etanolban hozzáadunk 4,9 g, a 3. példában leírtak szerint előállított köztesterméket, majd 2,8 ml 1,4-ciklohexadiént. A reakciókeveréket 5 percen át kevertetjük, majd 45 °C hőmérsékletre melegítjük, mely ponton a folyamat exotermmé válik. A fűtést megszüntetjük, és a keverést 45 percen át folytatjuk, mely idő alatt a reakciókeverék hőmérséklete eléri a környezet hőmérsékletét. A reakciókeveréket

leszűrjük és csökkentett nyomáson bepároljuk, 3,6 g sárga folyadékot nyerve, ami a tömegspektroszkópiás azonosítás szerint a kívánt termék; $m/e = 246$.

5. példa

A (karboxi-metil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának előállítása

Az eljárás termékeként nyert adduktban a doxorubicin a daunóz-amingyűrű aminocsoportján keresztül kapcsolódik a malonát köztes anyag metilén-csoportjához.

Egy gömblombikban 134 mg doxorubicin-hidrokloridhoz és 8,5 ml dimetilformamidhoz hozzáadunk 1 ml vizet, feloldva ezáltal a hatóanyagot, 0,5 ml dimetil-formamidban feloldunk 264 mg, a 4. példában leírtak szerint előállított terméket és hozzáadjuk az előző oldathoz, majd a reakciókeveréket 10 percen át keverjük. 1,25 ml vízben oldva 115 mg nátrium-hidrogén-karbonátot adunk hozzá, és 2 órán át kevertetünk a környezeti hőmérsékletén. Csökkentett nyomáson eltávolítjuk az illékony alkotórészeket, a bepárlási maradékot minimális mennyiségű 0,1 M nátrium-acetát pufferben, pH = 4,5, oldjuk. Az oldatot 1,75 × 6 cm méretű, C-18 adszorbenssel (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J., USA) töltött „flash-kromatográfiás” oszlopra visszük, és növekvő mennyiségű metanolt tartalmazó acetát pufferrel eluálunk. A kívánt termék az 50% vagy ennél több metanolt tartalmazó frakciókban található. A kívánt terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot néhány milliliter vízben oldjuk, és ugyanilyen oszlopra visszük. Eluáláshoz 40 ml vizet, majd 80 ml 50%-os vizes metanolt, végül 20 ml metanolt használunk. A kívánt termék az 50%-os metanolos frakcióban található, melyeket egyesítünk és csökkentett nyomáson bepárolunk. A bepárlási maradékot minimális mennyiségű metanolban oldjuk, ötszörös térfogatú benzolt adunk hozzá, az oldatot fagyaszttjuk és egy éjszakán át fagyaszttva szárítjuk, 146 mg narancssárga szilárd anyagot nyerve. FAB tömegspektroszkópia szerint $m/e = 744$. A termék a nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) analízis szerint tiszta. A HPLC analízishez C 18 adszorbenssel radiálisan töltött oszlopot használunk; eluens = 3% ammónium-acetátot tartalmazó 70%-os vizes metanol; áramlási sebesség: 5 ml/perc.

6. példa

Az etil-(N-szukcinimid-oxi-karbonil-metil)-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának előállítása

Szárítócsővel és keverővel ellátott gömblombikban lévő 1,5 ml száraz dimetil-formamidban feloldunk 17,6 mg, az 5. példában leírtak szerint előállított terméket. Az oldatot –5 °C hőmérsékletre hűtjük, és 0,1 ml vízmentes dimetil-formamidban hozzáadunk 5,2 µl N-metil-morfolint. A reakciókeveréket –5 °C hőmérsékleten keverjük 5 percen át, majd 6,14 ml izobutil-klórformiátot adunk 0,1 ml vízmentes dimetil-formamidban hozzá és állandó hőmérsékleten keverjük tovább 30 percen keresztül. 0,1 ml száraz dimetil-formamid-

ban 5,45 mg N-hidroxi-szukcinimidet adunk a reakciókeverékhez, és 20 órán át keverjük miközben a hőmérséklete a környezetének hőmérsékletére emelkedik. A csökkentett nyomáson végzett bepárlás vörös színű maradékát minimális mennyiségű diklór-metánban oldjuk és $0,75 \times 4$ cm méretű szilikagéloszlopra viszszük, melyet diklór-metánnal ekvilibráltunk. Az elúciót 50 ml diklór-metánnal, majd 10% izopropanolt tartalmazó diklór-etánnal végezzük. A második eluenssel létrejövő eluátumot csökkentett nyomáson bepároljuk, a maradékot minimális mennyiségű izopropanolban oldjuk, melyhez kevés benzolt adunk. Az oldatot lefagyaszttjuk és fagyaszttva szárítjuk, 15,9 g kívánt terméket nyerve. $m/e = 742$. Az azonosító deuterio-kloroformban 300 MHz-es készüléken felvett mágneses magrezonancia-spektrum (NMR) alapján történt, mely mutatja 2,8 ppm-nél az N-hidroxi-szukcinimid jelét.

7. példa

A (karbonil-metil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának 007B antitesttel képzett konjugátuma

A 007B antitestet a KS 1/4 antitestet termelő hibridómából származó egyik szubklón hibridóma termeli. Egy 3 ml-es, keverővel ellátott csőbe bemérünk 508 μ l 19,7 mg/ml antitestkoncentrációjú 0,34 M nátrium-borát puffert, pH = 8,6. 56,4 μ l szárított dimetil-formamidban 0,56 mg, a 6. példában leírtak szerint előállított terméket adunk az antitest oldatához, és a környezete hőmérsékletén keverjük 2 órán keresztül. A reakciókeveréket a környezeti hőmérsékleten lecentrifugáljuk, a vörös üledékről a felülúszót egy $1,75 \times 25$ cm méretű Sephadex G-25M oszlopra (Pharmacia, Inc., Piscataway, N. J., USA) visszük, amit előzőleg foszfátpufferrel puffertolt fiziológias sóoldattal ekvilibráltunk. Az oszlopot ugyanezzel a pufferral eluáljuk, és az első lejövő csúcsokat összegyűjtjük. Az eluátumot Millex GV (Millipore, Bedford, MA, USA) 0,22 μ -os szűrőn szűrjük, és 4 °C hőmérsékleten tartjuk 3 napon át. Ugyanilyen körülmények között ismét leszűrjük, majd UV spektroszkópiával analizáljuk a szűrletet. E szerint az antitest koncentrációja 1,54 mg/ml, jelezve, hogy 7,6 mg konjugátumot nyertünk. Az egy mól antitestre vonatkoztatott hatóanyag megadja a konjugátum arányt, ami adott esetben 2,2.

7A. példa

A (karbonil-metil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának 007B antitesttel képzett konjugátuma

A 7. példában leírtak szerint járunk el 7,5 mg antitestből és 1,0 mg, a 6. példában leírtak szerint előállított termékből kiindulva. 4,94 mg konjugátumot nyerünk, a konjugációs molarány: 3,1; az oldat koncentrációja: 1,10 mg/ml.

8. példa

A (karbonil-metil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának HB21 antitesttel képzett konjugátuma

A HB21 antitestet az ATCC HB21 hibridóma ter-

meli. Egy keverővel ellátott 3 ml-es edényben 0,875 ml, a 7. példában említett borátpufferben oldott L7,5 mg HB21 antitesthez hozzáadunk 97,2 μ l száraz dimetil-formamidban oldott 1,3 mg, a 6. példában leírtak szerint előállított 1,3 mg terméket. A reakciókeveréket keverjük, a konjugátumot a 7. példában ismertetett módon kinyerjük, 14,9 mg konjugátumot nyerve. Az oldat koncentrációja: 2,57 mg/ml. Konjugációs arány: 3,8.

8A. példa

A (karbonil-metil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának HB21 antitesttel képzett konjugátuma

A 8. példában leírtak szerint járunk el 12 mg antitestből és 1,30 mg, a 6. példában leírtak szerint előállított köztes anyagból kiindulva. A termék leszűrt oldatát vákuumdialízissel betöményítjük 0,82 mg oldatot nyerve, mely 3,2 mg konjugátumot tartalmaz. A konjugációs arány: 4,5.

8B. példa

A (karbonil-metil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának HB21 antitesttel képzett konjugátuma

A 8A. példában leírtak szerint járunk el 12 mg antitestből és 2,60 mg, a 6. példában leírtak szerint előállított köztes anyagból kiindulva. 0,72 ml oldatot nyerünk, ami 1,37 mg konjugátumot tartalmaz; a konjugációs molarány: 5,6.

9. példa

A (karbonil-metil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának L4KS antitesttel képzett konjugátuma

Starling és munkatársai [J. Cell. Biochem. Supp., 11B, 1982 (1987)] által leírt L4KS antitestet 0,34 M nátrium-borát-pufferbe dializáljuk, pH = 8,6, hogy 17,5 mg antitestet tartalmazó 0,875 ml puffert kapjunk. Ehhez 97,2 μ l szárított dimetil-formamidban hozzáadunk 1,3 mg, a 6. példában leírtak szerint előállított köztes anyagot. A reakciót a 7. példában ismertetett módon végezzük, a terméket is aszerint nyerjük ki. 11,6 mg konjugátumhoz jutunk 2 mg/ml koncentrációjú oldat alakjában. A konjugációs molarány: 2,6.

9A. példa

A (karbonil-metil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának L4KS antitesttel képzett konjugátuma

A 9. példában leírtak szerint állítjuk elő 10 mg antitestből és 0,59 mg, a 6. példában leírtak szerint elkészített köztes anyagból kiindulva. A terméket tartalmazó oldatot vákuumdialízissel betöményítjük 1,16 ml térfogatra, mely 4,03 mg terméket tartalmaz; konjugációs arány: 2,9.

10. példa

L/IC2 antitest előállítása

A lefagyaszttott L/IC2 hibridómát az American

Type Culture Collection-tól szerezhetjük be a HB9682 nyilvántartási számon. 37 °C hőmérsékletű vízfürdőben forgatva a csöveket felolvasztjuk a tartalmukat. A sejtszuszpenziót 1:2 arányban felhígítjuk kiegyensúlyozott sóoldattal [balanced salt solution; Grand Island Biological Company (GIBCO), 3175 Staley Road, Grand Island, New York 14072]. A szuszpenziót alája rétegzett szérumon keresztül centrifugáljuk, hogy elválasszuk a sejteket a lefagyasztott tenyészet közegétől. A felülúszót légáramban lepároljuk, a sejtüledéket T75 szövettenyészet-edényben tápközegeben [10% borjúembrió szérummal, 2 mM L-glutaminnal (GIBCO) és 50 µl/ml gentamicin-szulfáttal (GIBCO) kiegészített Ventrex HL-1 (Ventrex Laboratories, Portland, ME, USA)] szuszpendáljuk, és 37 °C hőmérsékleten tartjuk 5%-os széndioxidos légterben. A csaknem összefüggő tenyészetről összegyűjtjük a felülúszót és a benne maradt sejteket centrifugálással eltávolítjuk. A sejtmentes felülúszót Protein A Sepharose oszlopon (Pharmacia) átengedve tisztítjuk meg az antitestet. Az antitest hozzákötődik az oszlophoz, a tápközeget 0,01 M nátrium-foszfát-pufferrel, pH = 8,0 mossuk le. Az antitest eluálásához 0,1 M nátrium-foszfát-puffert használunk, pH = 3,5. Az eluátumot azzal semlegesítjük 1 M Trizma pufferrel (Sigma, St. Louis, MO, USA) pH 7,4, dializáljuk és vákuum dializátorban (Bio-Molecular Dynamics, Beaverton, OR), mely 0,15 M nátrium-kloriddal kiegészítve 0,01 M nátrium-foszfátot, pH = 7,4, tartalmaz, betöményítjük. Az antitest preparátumot 0,2 µm pórusú szűrőn átszűrve sterilizáljuk, és felhasználásig 4 °C hőmérsékleten tartjuk.

11. példa

A (karbonil-metil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának L/IC2 antitesttel képzett konjugátuma

0,94 ml 0,34 M nátrium-borát pufferben lévő 10,1 mg L/IC2 antitestet hozzáadunk 54,7 µl szárított dimetil-formamidban lévő 0,85 mg, a 6. példában leírtak szerint előállított köztes anyaghoz. A reakciókeveréket a környezete hőmérsékletén kevertetjük 1,5 órán át, majd a terméket a 7. példában leírtak szerint nyerjük ki. A kapott oldatot 4 °C hőmérsékleten 16 órán át vákuumdializáljuk 5 liter fiziológiás pufferolt sóoldattal szemben, 9,16 mg konjugátumot nyerve. Az oldat koncentrációja 5,33 mg/ml. A konjugációs molarány: 1,7.

11A. példa

A (karbonil-metil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának L/IC2 antitesttel képzett konjugátuma

A 11. példában leírtak szerint járunk el, elhagyva a dializációs lépést. A kiindulási anyagok: 24 mg antitest és 1,75 mg, a 6. példában leírtak szerint előállított köztes anyag. 2,69 ml oldatban 8,56 mg konjugátumot kapunk; a konjugációs arány: 2,8.

12. példa

(5-Benzil-oxi-karbonil-pentil)-etil-malonát előállításához egy keverővel ellátott gömblombikba bemé-

rünk 200 ml acetont, 100 ml vizet és 25,3 g dietil-malonátot. 5 perc alatt hozzáadunk az oldathoz 78,9 ml lítium-hidroxid oldatot. Miután a környezeti hőmérsékleten kevertünk 75 percen keresztül, az illékony alktörészeket eltávolítjuk, a maradékot 35 ml száraz dime-
5 til-formamidban szuszpendáljuk. Hozzáadunk 38,3 g benzil-6-bróm-hexanoátot, és a reakciókeveréket 65 °C hőmérsékleten kevertetjük 20 órán át. A hőmérsékletét környezete hőfokára hűtjük, és 1000 ml sóoldatos etil-acetáttal extraháljuk. Az extraktumot sóoldattal kétszer
10 mossuk, majd csökkentett nyomáson betöményítjük. A folyékony maradékot szilicagélre visszük, 500 ml heptánnal mossuk, 1 liter 10% etil-acetátot tartalmazó heptánnal eluálunk. 1 liter 15% etil-acetátot tartalmazó he-
15 xánnal távolítjuk el a kívánt terméket. A csökkentett nyomáson végzett bepárlás után 22 g terméket kapunk. m/e = 336.

13. példa

Az (5-benzil-oxi-karbonil-pentil)-etil-(2-metilén-malonát) előállításához hűtővel és keverővel ellátott edénybe bemérünk 15 g, a 12. példában leírtak szerint előállított köztes anyagot, hozzáadunk 8,4 ml trietil-or-
20 to-formiátot és 8,6 ml ecetsavanhidridet. 48 mg cink-klorid hozzáadása után a reakciókeveréket 16 órán át 125 °C-on, 3,5 órán át 150–160 °C hőmérsékleten ke-
25 verjük. A lehűtött oldatot 600 ml sóoldatos etil-acetáttal extraháljuk. Az extraktumot sóoldattal kétszer mos-
30 suk és csökkentett nyomáson bepároljuk. A folyékony maradékot 500 ml heptánnal, 1500 ml 15% etil-acetátot tartalmazó heptánnal és 500 ml 20% etil-acetátot tartalmazó heptánnal mossuk. 500 ml 40% etil-acetátot tartalmazó heptánnal eluálva jutunk 2,78 g kívánt ter-
35 mékhez. m/e = 392.

14. példa

Az (5-karboxi-pentil)-etil-(2-metilén-malonát) előállításához egy keverővel ellátott edénybe bemérünk 2 ml vízmentes etanolban 0,49 g 10%-os, szerves hordozón lévő palládiumkatalizátort, 1 g, a 13. példában leírtak szerint előállított terméket és 1 ml 1,4-ciklohe-
40 xadiént. A csövet lezárjuk és 5 percen át 60 °C hőmérsékleten kevertetjük, majd környezete hőmérsékletére hűtjük és 30 percen át tovább keverjük. A reakcióke-
45 réket leszűrjük, a szűrletet csökkentett nyomáson bepároljuk. A folyékony maradékot minimális mennyiségű etil-acetátban oldjuk és zavarosodásig heptánt adunk hozzá. A tisztítás szilikagélen végzett kromatográfiával történik, először 250 ml 10% etil-acetátot tartalma-
50 zó heptánnal, majd 250 ml 30% etil-acetátot tartalmazó heptánnal mossuk az oszlopot. A terméket 500 ml 50% etil-acetátot tartalmazó heptánnal eluáljuk. 0,56 g kívánt terméket kapunk. m/e = 303.

15. példa

Az (5-karboxi-pentil)-etil-(2-metilén-malonát) és a doxorubicin adduktjának előállításánál a malonát köztes anyagot az 5. példában leírtak szerint kötjük a doxorubicin molekulához.

A reakciót az 5. példában ismertetett körülmények

között hajtjuk végre 142 mg doxorubicin-hidrokloridból, 159 mg, a 14. példában leírtak szerint előállított termékéből és 75,5 mg nátrium-hidrogén-karbonátból kiindulva. A termék kinyerését az 5. példában ismertetett módon végezzük, a terméket 60 ml 70%-os metanolt tartalmazó acetátpufferrel eluálva az oszlopról. Ugyancsak az ott ismertetettek alapján végezzük a további tisztítást, 95 mg terméket nyerve vörös szilárd anyag alakjában. $m/e = 403, 398$.

16. példa

Az etil-(N-szukcinimid-oxi-karbonil-pentil)-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktját lényegében a 6. példában leírtak szerint állítjuk elő. 12,5 mg, a 15. példában leírtak szerint előállított terméket 3,5 g N-hidroxi-szukcinimiddel reagáltatva N-metil-morfon és izobutil-klór-formiát jelenlétében. 9,7 mg kívánt termékhez jutunk. $m/e = 896$.

17. példa

Az (5-karbonil-pentil)-etil-(2-metilén-malonát) doxorubicin adduktjának 007B antitesttel képzett konjugátuma

Két konjugációs reakciót hajtunk végre. Mindegyik esetben 0,862 μ l 007B antitest oldatot alkalmazunk. Az oldat 0,34 M nátrium-borát pufferben készül, pH = 8,6; az oldat koncentrációja: 17,4 mg/ml.

(1) Az antitest oldatához hozzáadunk 1,17 mg, a 16. példában leírtak szerint előállított terméket, 95,8 ml szárított dimetil-formamidban oldva.

(2) 1,79 mg ugyanilyen köztes terméket használunk 95,8 μ l szárított dimetil-formamidban oldva.

Mindkét reakciókeveréket a környezete hőmérsékletén kevertetünk 1,5 órán át, majd 1,75 $\times$ 25 cm méretű Sephadex G-25M oszlopon kromatografálunk. A terméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, 0,22 μ -os Millex GV szűrőn szűrjük és 16 órán át tartjuk 4 °C hőmérsékleten.

A terméket ismét leszűrjük és UV spektroszkópiával minősítjük.

(1) 11,1 mg konjugátumot nyerünk; az oldat koncentrációja: 1,75 mg/ml. A konjugációs molarány: 3,8.

(2) 6,7 mg terméket kapunk; az oldat koncentrációja: 1,33 mg/ml konjugációs molarány: 4,5.

18. példa

(5-Karboxi-pentil)-etil-[2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonát]

60,2 mg 4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazin-szulfátot feloldunk 1 ml szárított dimetil-formamidban és 0,5 ml szárított dimetil-formamidban oldva hozzáadunk 48,6 mg, a 14. példában leírtak szerint előállított terméket. A reakciókeveréket a környezete hőmérsékletén keverjük 16 órán át, majd az illó alkotórészeket csökkentett nyomáson elpárologtatjuk. A maradékot minimális mennyiségű metanolban oldjuk és annyi vizet adunk hozzá, hogy 15%-os vizes metanolt kapjunk. Az oldatot egy 1,5 $\times$ 6 cm méretű, C-18 adszorbenssel töltött „flash-kromatográfiás” oszlopra visszük, amit 10% metanolt tartalmazó vízzel ekvilib-

rálunk. Az oszlopot növekvő metanol tartalmú vizes eleggyel eluáljuk. A terméket a 60–100% metanolt tartalmazó eluátumban találjuk. A kívánt terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük, csökkentett nyomáson bepároljuk, és a maradékot kevés mennyiségű metanolban oldjuk. Hozzáadunk 100 ml benzolt, az oldatot lefagyasztjuk és fagyaszta szárítjuk, 46 mg kívánt köztes anyaghoz jutva. $m/e = 952$.

19. példa

Etil-(N-szukcinimid-oxi-karbonil-pentil)-[2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonát]

2 ml száraz dimetil-formamidban feloldunk a 18. példában leírtak szerint előállított 36,9 mg köztes anyagot, és száraz dimetil-formamidban lévő 7,56 mg N-hidroxi-szukcinimiddel reagáltatjuk 10,8 μ l N-metil-morfolin és 8,5 μ l izobutil-klór-formiát jelenlétében –20 °C hőmérsékleten 5 percen át. Ezt követően a reakciókeverék hőmérsékletét fokozatosan a környezeti hőmérsékletre emeljük, majd 40 °C hőfokon tartjuk 30 percen keresztül. Lehűtjük környezete hőmérsékletére, és 16 órán keresztül kevertetünk, majd csökkentett nyomáson bepároljuk. A maradékot diklór-metánban oldjuk és 0,75 $\times$ 6 cm méretű szilikagéloszlopra visszük. Az oszlopot 20 ml diklór-metánnal, 30 ml etil-acetát/diklór-metán eleggyel eluáljuk, ami lehozza a terméket az adszorbensről. Az eluátumot csökkentett nyomáson bepárolva 28,3 mg kívánt terméket kapunk, amit NMR módszerrel azonosítunk, kimutatva az N-hidroxi-szukcinimid jelét 2,88 ppm-nél.

20. példa

(5-Karbonil-pentil)-etil-[2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonát] L4KS antitesttel képzett konjugátumának előállításához két eljárást alkalmazunk. Mindkét esetben 625 μ l antitestoldatból indulunk ki. A 0,34 M nátrium-borát pufferben, pH = 0,6, készült antitestoldat koncentrációja: 16 mg/ml.

(1) 0,75 mg, a 19. példában leírtak szerint készült terméket 51 μ l száraz dimetil-formamidban oldunk és hozzáadjuk az antitestoldathoz.

(2) 1,2 mg, a 19. példában leírtak szerint készített terméket 51 μ l száraz dimetil-formamidban oldunk és hozzáadjuk az antitestoldathoz.

Mindkét reakciókeveréket a környezete hőmérsékletén kevertetjük 1,5 órán keresztül, majd lecentrifugáljuk, egy fehér üledéket elválasztva. A felülúszókat 1,75 $\times$ 25 cm méretű oszlopon kromatografáljuk, az oszlopot foszfáttal puffertolt fiziológiás sóoldattal ekvilibrált Sephadex G-25 M adszorbenssel készítjük és ugyanezzel a pufferral eluálunk. A terméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, 0,22 μ -os Millex-GV szűrőn szűrjük és 4 °C hőmérsékleten tartjuk 17 napon át. Még egyszer ugyanúgy szűrjük, a szűrletet UV analízissel minősítjük.

(1) 6,3 mg konjugátumot nyerünk 1,26 mg/ml koncentrációjú oldatban; a konjugációs molarány: 2,5.

(2) 4,5 mg konjugátumot kapunk 0,68 mg/ml koncentrációjú oldatban; a konjugációs molarány: 3,6.

20A. példa

A (karbonil-pentil)-etil-[2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonát] L4KS antitesttel képzett konjugátumát a 20. példában leírtak szerint állítjuk elő, de 595 mg antitestből és 57,9 mg, a 19. példában leírtak szerint előállított termékből indulunk ki. A terméket tartalmazó oldatot vákuumdialízisnek vetjük alá, a betöményített oldatot újra szűrjük, így 17,8 ml oldatot kapunk, ami 125 mg konjugátumot tartalmaz; konjugációs mólarány: 2,8.

21. példa

A (karbonil-pentil)-etil-[2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonát] 007B antitesttel képzett konjugátumát három módon állítjuk elő. Mindegyik esetben 10 mg 007B antitestből indulunk ki, amit 0,5 ml 0,34 M nátrium-borát pufferben, pH = 8,6, oldunk.

- (1) 41 µl száraz dimetil-formamidban 0,89 mg, a 19. példában leírtak szerint előállított köztes anyagot reagáltatunk;
- (2) 41 µl száraz dimetil-formamidban 1,20 mg ugyanilyen köztes anyagot reagáltatunk;
- (3) 41 µl száraz dimetil-formamidban 1,49 mg ugyanilyen köztes anyagot reagáltatunk.

Mindhárom reakciókeveréket a környezete hőmérsékletén kevertetjük 1,5 órán át, majd centrifugáljuk, és a felülúszót a 6. példában ismertetett módon kromatografáljuk. A terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük és UV spektrofotometriával minősítjük.

- (1) 5,95 mg konjugátumot kapunk 1,35 mg/ml koncentrációjú oldatban; a konjugációs mólarány: 3,0.
- (2) 3,76 mg konjugátumot nyerünk 0,76 mg/ml koncentrációjú oldatban; a konjugációs mólarány: 3,6.
- (3) 1,54 mg konjugátumot kapunk 0,34 mg/ml koncentrációjú oldatban; a konjugációs mólarány: 6,1.

21A. példa

Az (5-karbonil-pentil)-etil-[2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonát] 007B antitesttel képzett konjugátuma

A 21. példában leírtakat ismételtük meg 396 mg antitestből és 35,6 mg, a 19. példában leírtak szerint előállított köztes anyagból kiindulva. A terméket tartalmazó oldatot vákuumdialízissel betöményítjük, sterilre szűrjük, 39,4 ml oldatot nyerve, ami 307 mg konjugátumot tartalmaz; a konjugációs mólarány: 2,6.

22. példa

Az (5-karbonil-pentil)-etil-[2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonát] 9.2.27 antitesttel képzett konjugátumát három módon hajtjuk végre.

A 9.2.27 antitestet Bumol és Reifeld ismertetik [Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 79: 1245 (1982)].

Mindegyik eljárásnál 10 mg antitestből indulunk ki, amit 0,36 ml 0,34 M nátrium-borát-pufferben, pH = 8,6, oldunk.

- (1) 41 µl száraz dimetil-formamidban 0,6 mg, a 19.

példában leírtak szerint előállított köztes anyagot adunk az antitestoldathoz;

- (2) 41 µl száraz dimetil-formamidban 0,89 mg, a 19. példában leírtak szerint előállított köztes anyagot adunk az antitestoldathoz;

- (3) 41 µl száraz dimetil-formamidban 1,2 mg, a 19. példában leírtak szerint előállított köztes anyagot adunk az antitestoldathoz.

A reakciókeveréket a 21. példában ismertetett módon kevertetjük, centrifugáljuk és kromatografáljuk, a terméket UV spektrometriával minősítjük.

- (1) 5,2 mg konjugátumot kapunk 0,95 mg/ml koncentrációjú oldatban; a konjugációs mólarány: 3,4.
- (2) 1,5 mg konjugátumot kapunk 0,32 mg/ml koncentrációjú oldatban; a konjugációs mólarány: 6,1.
- (3) 0,6 mg konjugátumot kapunk 0,16 mg/ml oldatban; a konjugációs mólarány: 7,3.

23. példa

Az (5-karbonil-pentil)-etil-[2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonát] L/1C2 antitesttel képzett konjugátuma

2,9 ml 0,34 M nátrium-borát-pufferben, pH = 8,6, oldott 43 mg L/1C2 antitesthez hozzáadjuk 238 µl, 10,7 mg/ml koncentrációjú, a 19. példában leírtak szerint előállított köztes anyag száraz dimetil-formamid oldatát. A 21. példában ismertetett módon elvégezzük a reakciót, kinyerjük és minősítjük a terméket. 9,35 mg konjugátumot kapunk 0,69 mg/ml koncentrációjú oldatban; a konjugációs mólarány: 2,6.

24. példa

Az etil-N-(2-benzil-oxi-karbonil-etil)-malonamidát előállításához egy 100 ml-es edénybe bemérünk 2 g szenes hordozón 5% palládiumot tartalmazó hidrogénező katalizátort, 10 g benzil-etil-malonátot és 8,6 ml 1,4-ciklohexadiént. A reakciókeveréket a környezete hőmérsékletén keverjük, kb. 40 perc elteltével a reakció exoterm lesz. A keverést addig folytatjuk, amíg a reakciókeverék hőmérséklete ismét le nem hűl a környezete hőmérsékletére, majd szűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson bepároljuk. A maradék sűrű folyadékot minimális mennyiségű etil-acetátban oldjuk és egy 150 ml-es tölcsérben lévő szilikagélre visszük. A szilikagélt 400 ml 20% etil-acetátot tartalmazó hexánnal mossuk, a kívánt terméket 400 ml etil-acetáttal eluáljuk. Az eluátumot csökkentett nyomáson betöményítjük, sűrűnfolyó folyadék alakjában 5,48 g köztes anyagot kapunk.

- (2) Ezt a köztes anyagot 100 ml száraz dimetil-formamidban oldjuk, és 4,77 g N-hidroxi-szukcinimidet adunk hozzá. A beoldódás után 8,56 g dicitlohexil-karbodiimidet adunk adagokban a reakcióelegyhez. Exoterm reakció indul meg. Környezeti hőmérsékleten keverünk egy éjszakán át, majd szűrünk. A szűrletbe beoldunk 8,95 g benzil-3-amino-propionsav-hidrokloridot, majd hozzáadjuk 4,56 ml N-metil-morfolint. A reakcióelegyet környezeti hőmérsékleten keverjük 1,5 órán át, majd sóoldatos etil-acetáttal extrahálunk. Az extraktumot 10%-os vizes citromsavas oldattal, só-

oldattal, nátrium-karbonát telített vizes oldatával és újra sóoldattal mossuk, szárítjuk, szűrjük és csökkentett nyomáson betöményítjük. A sűrűnfolyó maradékot etil-acetátban oldjuk és hexánt adunk hozzá, amíg zavarosodás nem indul meg. A terméket szilikagélre visszük, a szilikagélt 200–200 ml 10, 20 és 30% etil-acetátot tartalmazó hexánnal mossuk. A kívánt terméket 600 ml 40% etil-acetátot tartalmazó hexánnal eluáljuk. Az eluátumot csökkentett nyomáson bepárolva 5,05 g terméket kapunk halványsárga sűrűnfolyó folyadék alakjában.

A tömegspektroszkópia szerint a molekulaion súlya: 293.

Elemanalízis:

számított: C: 64,42, H: 6,75, N: 4,78%;

mért: C: 61,21, H: 6,31, N: 4,76%.

25. példa

Az etil-N-(2-benzil-oxi-karbonil-etil)-2-etoxi-metilén-malonamidát előállításához 5,05 g, a 24. példában leírtak szerint előállított köztes terméket feloldjuk 10,7 ml ecetsavanhidridben, és hozzáadunk 7,45 ml trietil-ortoformiátot, majd 80 mg cink-kloridot és a reakciókeveréket visszafolyatós hűtő alatt melegítjük 140–150 °C hőmérsékleten 16 órán keresztül. A reakciókeveréket a környezetének hőmérsékletére hűtjük és csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot etil-acetáttal és sóoldattal extraháljuk, az extraktumot sóoldattal mossuk, szárítjuk, szűrjük és csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot minimális mennyiségű etil-acetátban oldjuk, zavarosodás megjelenéséig hexánt adunk az oldathoz. A terméket szilikagélre visszük, a szilikagélt növekvő arányban etil-acetátot tartalmazó hexánnal eluáljuk. A terméket tartalmazó, 30–50% etil-acetátos frakciókat egyesítjük, csökkentett nyomáson bepároljuk, 3,4 g kívánt terméket nyerve, melynek molaránya a tömegspektroszkópia szerint: 349.

26. példa

Az etil-N-(2-karboxi-etil)-2-etoxi-metilén-malonamidát előállításához 1,64 g, a 25. példában leírtak szerint előállított köztes terméket és 0,5 g szenes hordozón 5% palládiumot tartalmazó hidrogénező katalizátort adunk 10 ml etanolhoz. 0,89 ml 1,4-ciklohexadiént adunk a fenti keverékhez és visszafolyatós hűtő alatt forraljuk, majd lehűtjük és 1 órán át környezeti hőmérsékleten keverjük. Ezután ismét felmelegítjük, lehűtjük és egy órán át keverjük, leszűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson bepároljuk. A maradékot etil-acetátban eldörzsöljük, a szilárd anyagot szűrővel összegyűjtjük, dietil-éterrel mossuk, 0,61 g kívánt termékhez jutva. A tömegspektroszkópia molekulaionjai: 260, 244, 214 és 171.

27. példa

Az etil-N-(2-karboxi-etil)-2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonamidát előállításánál 67 mg, a 26. példában leírtak szerint készített terméket adunk 196 mg 4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazin-szulfát 1 ml száraz dimetil-

formamidban készült oldatához. A reakciókeveréket egy éjszakán át keverjük környezeti hőmérsékletén, majd csökkentett nyomáson bepároljuk. A bepárlási maradékot 20% metanolt tartalmazó 0,5 M kálium-dihidrogén-foszfát pufferben, pH = 7, oldjuk és C-18 fordított fázisú szilikagéloszlopra visszük. Növekvő mennyiségű metanolt tartalmazó ugyanilyen pufferrel eluálunk, a terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük, csökkentett nyomáson bepároljuk. A maradékot néhány milliliter vízben oldjuk, az oldatot ugyanilyen oszlopra visszük és növekvő mennyiségű metanolt tartalmazó vizes metanollal eluálunk. A terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük, csökkentett nyomáson bepároljuk, 197 mg kívánt köztes anyagot nyerve.

28. példa

Az etil-N-(2-szukcinimidoxi-karbonil-etil)-2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonamidát előállításánál 159 mg, a 27. példában leírtak szerint előállított terméket feloldjuk 2 ml száraz dimetil-formamidban és hozzáadunk 20,5 mg N-hidroxiszukcinimidet, 33,4 mg diciklohexil-karbodiimidet és 30,8 mg p-toluol-szulfonsav-hidrátot. A reakciókeveréket a környezeti hőmérsékletén keverjük 24 órán keresztül, majd az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk. A bepárlási maradékot diklór-metánban oldjuk és diklór-metánnal ekvilibrált szilikagéloszlopra visszük. Az oszlopot izopropanol/diklór-metán, 1:1 arányú elegyével eluáljuk, a terméket tartalmazó frakciókat egyesítjük, csökkentett nyomáson bepároljuk, 45,2 mg kívánt köztes anyagot nyerve.

29. példa

Az etil-N-(2-karbonil-etil)-2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonamidát 007B antitesttel képzett konjugátumát három módon állítjuk elő, lényegében a 6. példában leírtak alapján. Mindegyik esetben 1,03 ml borátpufferben oldott 15 mg antitestből indulunk ki. A 28. példában leírtak alapján előállított köztes termékéből az alábbi mennyiségeket alkalmazzuk a három reakciónál:

(1) 0,86 mg

(2) 1,08 mg

(3) 1,30 mg

A reakciókeveréket környezetük hőmérsékletén keverjük egy órán keresztül, centrifugáljuk és végül kromatografáljuk. A terméket tartalmazó oldatot sterilre szűrve az alábbi termékekhez jutunk:

	(1)	(2)	(3)
konjugátum	14,9 mg	14,9 mg	13,6 mg
térfogat	6,2 ml	6,5 ml	7,2 ml
konjugációs arány	3,3	4,1	4,9

30. példa

Az etil-N-(2-karbonil-etil)-2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonamidát 007B antitesttel képzett konjugátumát lényegében a 6.

példában leírtak szerint állítjuk elő, 200 mg 007B antitestből kiindulva, 14,6 mg/ml koncentrációjú oldat alakjában és 18 mg, a 28. példában leírtak szerint előállított köztes anyagot felhasználva. A terméket sterilre szűrjük és vákuumdialízisnek vetjük alá, 163 mg konjugátumot nyerve 12,0 mg/ml koncentrációjú oldatban; konjugációs mólarány. 4,3.

31. példa

Az etil-N-(2-karbonil-etil)-2-(4-dezacetil-23-dezmetoxi-vinblasztin-23-hidrazo)-metilén-malonamidát és a 007B antitest $F(ab')_2$ fragmentjének a konjugátumát úgy állítjuk elő, hogy 600 mg 007B antitest $F(ab')_2$ fragmenst 30 ml 0,34 M borátpufferben oldunk, pH = 8,6. Cseppenként hozzáadunk 3,75 ml száraz dimetil-formamidban 51 mg, a 28. példa szerint előállított köztes anyagot, és a reakciókeveréket 30 percen át keverjük környezete hőmérsékletén. Ezután centrifugáljuk, a felülúszót Phenyl Sepharose CL-4B oszlopon (Pharmacia) kromatografáljuk, 0,1 M foszfátpufferrel, pH = 6,2, majd 40%-os vizes acetonitrillel eluálva. A terméket tartalmazó frakciókat pufferolt fiziológias sóoldatba dializálva betöményítjük 214 mg kívánt konjugátumot nyerve; a konjugációs mólarány: 2,9.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás (I) általános képletű – ahol Ab valamely antitest vagy annak antigént felismerő fragmentje,
- R (V) vagy (XIII) általános képletű csoport, ahol R^5 hidrogénatom vagy hidroxilcsoport; vagy ha
- R^{17} és R^{16} csoport egyikének jelentése etilcsoport, a másik jelentése hidrogénatom vagy hidroxilcsoport, akkor
- R^{18} jelentése hidrogénatom; vagy
- R^{17} és R^{18} a szénatomokkal együtt, melyekhez kapcsolódnak, egy oxirángyűrűt képeznek, és ekkor az R^{16} jelentése etilcsoport;

R^{19} jelentése hidrogénatom vagy acetylcsopót, és p jelentése 0 vagy 1;

R^1 jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport;

Y jelentése oxigénatom vagy -NH- csoport;

5 n jelentése 1–8;

m jelentése 1–10 –

konjugátum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely a (IV) általános képletű hatóanyag-szár-mazékot – ahol R, R^1 , Y és n jelentése a tárgyi kör szerinti és R^3 jelentése hidroxilcsoport vagy karboxilcsoportot aktiváló csoport vagy karbonsavval sőt képező csoport – valamely antitesttel vagy annak antigént felismerő fragmentjével reagáltatjuk.

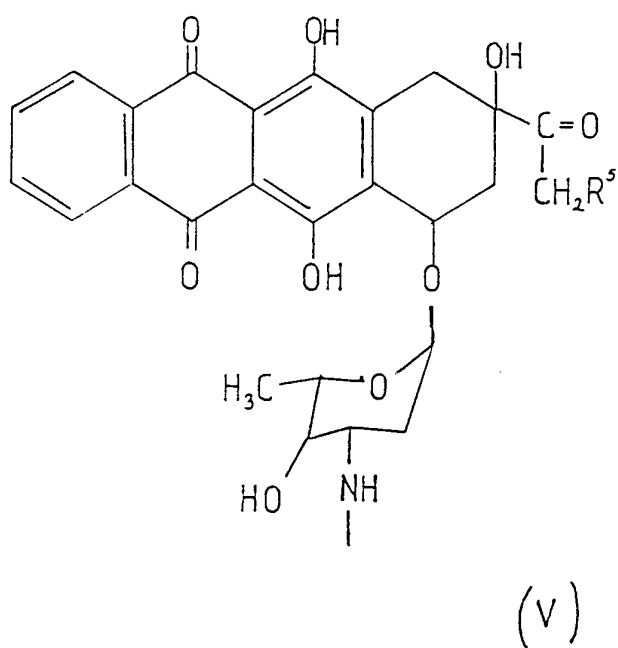
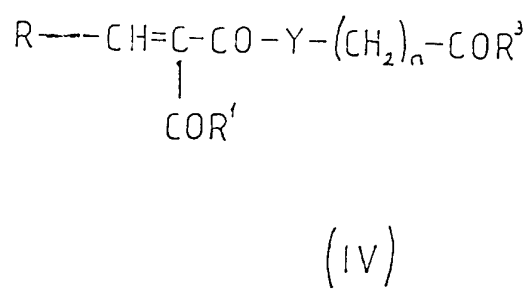
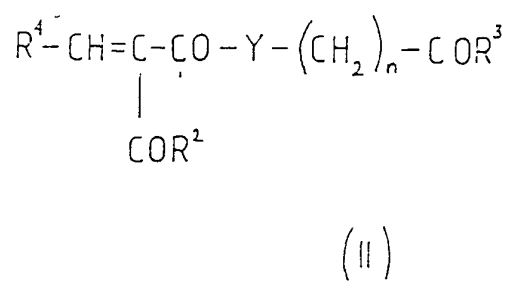
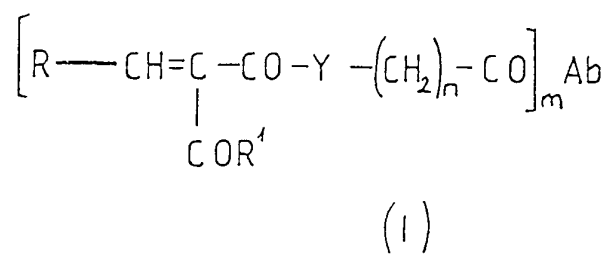
10 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás az (I) általános képletű – ahol az Ab antitest monoklonális antitest – és R, R^1 , Y, n és m az 1. igénypontban megadott – konjugátum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a reakcióban monoklonális antitestet alkalmazunk.

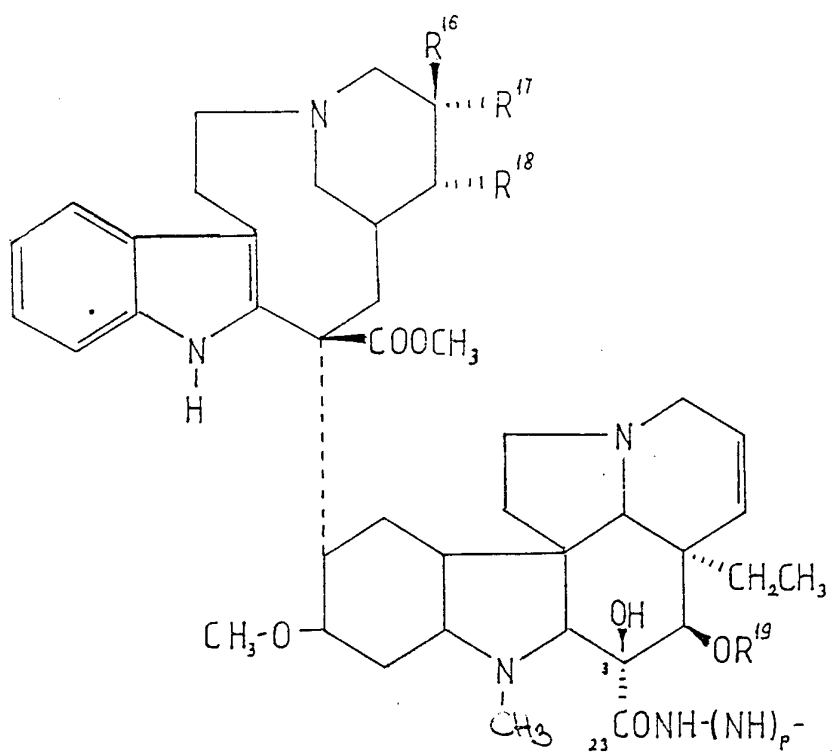
20 3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás az (I) általános képletű – ahol Ab, R, R^1 , Y és n az 1. igénypontban megadott és m jelentése 3–8 – konjugátum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelően helyettesített kiindulási vegyületeket reagáltatjuk egymással.

25 4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás az (I) általános képletű – ahol Ab, R, R^1 , Y és m az 1. igénypontban megadott és n jelentése 1–6 – konjugátum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelően helyettesített kiindulási vegyületeket reagáltatjuk egymással.

30 5. A 4. igénypont szerinti eljárás az (I) általános képletű – ahol Ab, R, R^1 , Y és m az 1. igénypontban megadott és n jelentése 1–3 – konjugátum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelően helyettesített kiindulási vegyületeket reagáltatjuk egymással.

35 6. Eljárás parenterális gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1–5. igénypontok bármelyike szerint előállított (I) általános képletű konjugátumot – ahol Ab, R, R^1 , Y, m és n az 1. igénypontban megadott – parenterális bevitelre alkalmas adalékanyaggal keverve gyógyszerkészítménnyé dolgozzuk fel.





(XIII)