

(11) Patent numeris: **3909**

(51) Int.Cl.⁵: **C07K 3/08,**
A61K 39/395

(21) Paraiškos numeris: **IP1632**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 20**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 07 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1996 04 25**

(60) SU duomenys: **PCT/SE 91/00496, 1991 07 16**

(31,32,33) Prioritetas: **9002484, 1990 07 20, SE 9002479, 1990 07 20, SE**

(72) Išradėjas:
Terje Kalland, SE
Gunnar Hedlund, SE
Mikael Dohlsten, SE
Peter Lando, SE
Eva Akerblom, SE

(73) Patent savininkas:
KABI PHARMACIA AB, Rapskatan 7, S-751 82 Uppsala, SE

(74) Patentinis patikėtinis:
Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Nauji antikūnio-superantigeno konjugatai, jų gavimo būdas, ląstelės-taikinio lizavimo būdas ir konjugatų panaudojimas farmacinėse kompozicijose

(57) Referatas:

Tirpstantis antikūno konjugatas, turintis antikūną, sujungtą su struktūra, kurią atpažįsta T-ląstelės, sugebančia nukreipti T-ląsteles ląstelių-taikinių, atpažįstamų antikūnu, lizavimui. Konjugatas pasižymi tuo, kad nurodyta struktūra yra superantigenas. Svarbiu aspektu yra ląstelių-taikinių lizavimo būdas, pagal kurį ląstelės-taikiniai kontaktuoja su efektyviu ląstelių-taikinių lizavimui konjugato kiekiu. Lizavimo būdas yra efektyvus vėžio, autoimuninių susirgimų, užkrėtimų parazitais ir infekcijų, sukeltų grybeliais, virusais ir bakterijomis gydymo režimo dalis. Aprašyme pateikiami taip pat tokie aspektai, kaip konjugato sintezė, farmacinės kompozicijos ir jų paruošimas.

Šis išradimas skirtas antikūnų konjugatams, kurie gali aktyvinti citotoksines T-ląsteles (CTL). Konjugatai naudojami suardymui nepageidaujamų ląstelių, susijusių su įvairiomis vėžio formomis, autoimuniniais procesais, 5 parazitiniais užkrėtimais ir bakterinėmis, virusinėmis ir grybelinėmis infekcijomis.

Žinomi bandymai panaudoti antikūnus derinyje su agentais, darančiais tiesioginį toksinį poveikį ląstelėms- 10 taikiniams (citotoksiniai agentai, citotoksikai), užtikrinant selektyvinių ląstelių-taikinių paveikimą ir užkertant kelią bei sumažinant nespecifinį poveikį kitoms ląstelėms. Pasiūlytos kombinacijos apima sritį nuo kovalentiškai sujungtų kompleksų, panaudojant molekules- 15 tiltelius, ir nekovalentiškai sujungtų kompleksų iki paprastų mišinių (pvz., Ghose et al., J. Natl. Cancer Inst. 61 (1979)657-676; Karlsson et al., Biotechnology 7(1989)567-73). Žinomi tokie citotoksikai, kaip difterijos toksinas, ricinas, ricino domenai A, geloninas ir 20 Pseudomonas aeruginosa egzotoksinas A (Takada Chemical Ind., EP-A-336405 ir Pastan ir kt., WO-A-38/00703; abu šaltiniai pacituoti ryšium su prioritetine paraiška SE-9002479).

25 Pasirodžius hibridomų technologijai ir ją lydintiems monokloniniams antikūnams tapo galimu panaudoti kompleksus, sudarytus iš antikūnų ir citotoksinių junginių tam, kad specifiškiau nukreipti citotoksinius agentus į reikalingą ląstelių-taikinių populiaciją.

30 Kadangi žinomas citotoksinių ląstelių pažeidžiantis poveikis kitoms ląstelėms, besiskiriančioms nuo ląstelių-taikinių, pasiūlyta citotoksinius agentus pakeisti imunostimuliatoriais, stimuliuojančiais T-limfocitus ir 35 aktyvuojančiais CTL. Konkretūs pasiūlymai lietuviškai antikūnus, konjuguotus su:

- (i) antikūnais, nukreiptais prieš T-ląstelių receptorius, arba junginiais, sugebančiais jungtis su T-ląstelių receptoriais (Mass. Inst. Techn., EP-AI-180171);
- 5 (ii) junginiais, tokiais kaip antigenai, mitogenai, kiti svetimi baltymai ir peptidai, kurie aktyvina citotoksines T-ląsteles (Noereks Korp., EP-AI-334300);
- 10 (iii) Pagrindinio audinių suderinamumo komplekso antigenais (PASKA) (Begringverco AG EP-AI-352761);
- 15 (iv) antigenais, prieš kuriuos gydomasis asmuo turi imunitetą (Med. Ros. Counc. WO-A-90/II779 (skelbt. 1990.10.18)); ir
- 20 (v) neišvardintu bakteriniu enterotoksinu (Ochi ir Wake, Simpoziumas UCLA: Ląstelinis imunitetas ir vėžio terapija, 1990 m. sausio 27-vasario 30 d.d., pranešimo CE 515 tezės, 109 psl.).

25 Tačiau iki šiol pasiūlyti imunostimuliatoriai savo veikimu buvo arba labai specifiški, arba labai bendri. Pvz., klasikiniai antigenai aktyvina tik apie I iš 10^5 T-ląstelių, tuo tarpu kai mitogenai potencialiai gali aktyvinti daugumą iš jų.

30 Buvo nustatyta, kad kai kurie agentai aktyvina T-ląsteles saikingai, t.y. jie aktyvina T-ląsteles gana aukštu dažnumu, tačiau toli gražu ne 100%. /Fleisher et al., J. Exp. Med., 157 (1988)1697-1707; Wait et al., Cell, 56(1989)27-35; abu straipsniai įtraukti į šį aprašymą kaip nuorodos/. Šio tipo agentai yra efektyvesni
35 aktyvintojai, negu klasikiniai antigenai, ir todėl jie gavo pavadinimą superantigenai/apžvalgai žr.: Kecler ir Marrac, Science 248:705, (1990)/. Toliau, buvo pa-

- rodyta/Doglstén et al., Immunol. 71(1990)96-100; Chedlund et al., Cell Immunol. 129(1990)426-34/, kad žinomi superantigenai gali ant ląstelių-taikinių susijungti su pagrindinio audinių suderinamumo komplekso (PASK) II
- 5 Klasės molekulėmis ir aktyvinti citotoksines T-ląsteles, turinčias T-ląstelės receptoriaus variabilios zonos beta-grandinę. Paskelbti duomenys rodo, kad jungimasis su PASK yra būtina išankstinė sąlyga tam, kad įvyktų T-ląstelių surišimas ir aktyvacija. Negalima
- 10 atmesti ir tai, kad ateityje bus rasti superantigenai, veikiantys per T-ląstelės receptoriaus variabilios zonos alfa-grandinę, arba per kitas paviršiaus struktūras, esančias T-ląstelių subpopuliacijose.
- 15 Superantigeno-Staphylococcus enterotoksino A imunomoduliuojantis poveikis taip pat buvo aprašytas Plattsokus et al., /Cell Immunol., 97(1986)371-85/.
- 20 Daugumai dabar žinomų superantigenų anksčiau buvo nustatyta, kad jie yra toksinai ir yra mikrobinės kilmės. Stafilokokų enterotoksinais, pvz., yra enterotoksiški ir aktyvina T-ląsteles, ir šie du efektai skiriasi vienas nuo kito/Fleisher et al., Cell Immunol., 118(1989)92-101; Alber et al., J. Immunol., 144(1990),501-06; ir
- 25 Infact. Immun. 59(1991)2126-34/.
- Anksčiau buvo pasiūlyta panaudoti superantigenus tam, kad nukreipti CTL vykdomą lizavimą ląstelių, turinčių II Klasės pagrindinio audinių suderinamumo komplekso antigenus (PASKA), (Farmacia AB, WO-A-91/04053, paskelb. 1991.04.04). WO-A-91/04053 apima superantigenus, bet nemini įjungtų į kovalentinius imunokonjugatus. Ląstelės, neturinčios II Klasės PASK baltymų, arba ekspresuojančios šių baltymų slenkstinius kiekius, nesuriša pakankamų superantigenų kiekių, kad efektyviai nukreiptų jų lizę CTL. Tokiu būdu, dėl didelio bendro kiekio ląstelių, nešančių II Klasės PASKA ir dėl mažo
- 30
- 35

kiekio II Klasės PASKA ant daugumos vėžinių ląstelių, superantigenai neturi turėti didelės vertės tokių nepageidaujamų ląstelių specifinio sunaikinimo požiūriu.

5 Tačiau, mūsų buvo aptikta, kad ląstelių naikinimo, vykdomo CTL, specifinis efektas gali būti pasiektas superantigenų pagalba, jeigu jie kovalentiškai sujungti su antikūnu prieš epitopą, kuris yra specifinis naikinajamajai ląstelei. Imuninės sistemos aktyvacija gali iš-
10 šaukti II Klasės PASKA ekspresiją ląstelėmis-taikiniais, neturinčiomis šių antigenų, kas, savo ruožtu, gali padaryti galimu pageidaujamą lizuojantį efektą.

Trumpas išradimo esmės išdėstymas

15 Šis išradimas apima (i) naujus antikūnų konjugatus, turinčius (I) antikūną prieš ląsteles-taikinius, ir (2) superantigeną. t.y. struktūrą, kuri atpažįsta (sąveikauja ir/arba susijungia) ir aktyvina T-ląsteles, ypačingai
20 CTL;

(ii) ląstelių-taikinių suardymo būdus, ypačingai ryšium su terapiniais žinduolių gydymo metodais, ir T-ląstelių, tokių kaip CTL, specifinio aktyvumo būdus;

25 (iii) konjugatų sintezės būdus; ir

(iv) turinčias konjugatus farmacinės kompozicijas ir šių kompozicijų paruošimo būdus.

30 Ląstelių-taikinių sunaikinimo būdai apima terapinio vėžio, virusinių, bakterinių, grybelinių infekcijų, parazitinių užkrėtimų ir kitų susirgimų gydymo metodus, kuriuose pagrindinis tikslas yra tam tikrų ląstelių sunaikinimas, pasiekiant aukštą tikslumo laipsnį. Su-
35 tinkamai su šiuo išradimu, konjugatai gali būti panaudojami gaunant farmacinės kompozicijas, skirtas ląs-

telių-taikinių, susijusių su aukščiau paminėtais susirgimais, suardymui. Gydomo objektai yra žinduoliai, pirmoje eilėje žmonės.

5 Superantigeninė konjugato dalis

Nauji antikūnų konjugatai pasižymi struktūra, kurią atpažįsta T-ląstelės, kadangi ji yra superantigenas. Paprastai konjugatai tirpsta prie fiziologinių pH reikšmių, o ir vitro jie tirpsta serume.

Geriausiu atveju superantigenus renka iš stafilokokų enterotoksinų (SE) grupės, tokius, kaip SEA, SEB, SEC, SED, ir SEE, toksoidų, jų aktyvių fragmentų arba peptidų, ir kitų junginių, pasižyminčių iš esmės tokio pat veikimo charakteriu CTL aktyvinime. Į superantigenus gali įeiti kiti mikrobiniai produktai (bakteriniai ir virusiniai), tokie, kaip produktai iš stafilokokinių štamų, pvz., toksinio šoko sindromo toksinai (TSST-I) iš Strept. okocci, pvz., pirogeninis egzotoksinas A, ir bakteriniai ekzoproteinai ir baltymai, gaminami pleuropneumonoidinių mikroorganizmų, turinčių panašų sugebėjimą sąveikauti su T-ląstelėmis taip, kaip sąveikauja su jomis superantigenai. Superantigenai gali būti gaminami auginant jų gamtinius gamintojus arba ląsteles, gautas geninės inžinerijos metodais (rekombinantiniais metodais), ir potencialiai - taip pat peptidine sinteze. Superantigenas, naudojamas šio išradimo rėmuose, bandant jį ant pateikiamo šiame aprašyme eksperimentinio modelio, turi parodyti veikimą, analogišką tam, kuris pristatytas šio aprašymo eksperimentinėje dalyje.

Optimalūs superantigenai turi potencialų sugebėjimą susijungti su T-ląstelių paviršiaus I-40 % izoformų polimorfinio baltymo, susijusio su CTL aktyvacija, optimaliausia - su T-ląstelės receptoriaus variabilios zonos beta-grandine.

Konjugato antikūninė (AK) dalis

Antikūnas geriausiu atveju yra monokloninis antikūnas (monAK), nors gali būti panaudoti ir polikloniniai antikūnai, jei jie turi pakankamai siaurą specifiškumo intervalą. Terminas "antikūnas" yra taikomas antikūnams visumoje, ir, tokiu būdu, apima antikūnų aktyvuosius fragmentus ir kitas molekules, imituojančias antikūnų surišamąjį sugebėjimą, su sąlyga, kad jie pasižymi atitinkamu specifiškumu, aviditetu ir giminingumu duotos ląstelės-taikinio atžvilgiu. Į čia įeina genų inžinerijos metodais (rekombinantiniais metodais) gauti antikūnai, antikūnų dariniai, ir kitos struktūros su panašiu surišimo sugebėjimu. Viena išradimo realizavimo variante antikūnas yra specifinis vėžinių ląstelių antigeninei determinantei, pvz., determinantei, susijusiai su storosios žarnos vėžiu (epitopas, struktūra). Taip pat suprantama, kad antikūnas gali būti specifinis antigeninei determinantei ant atsakingų už autoimuninę reakciją ląstelių, ląstelių, užkrėstų virusu, bakterijų, parazitų, grybelių arba kitų nepageidaujamų ląstelių. Priklausomai nuo konjugato efektyvumo, antikūnas gali būti nukreiptas prieš antigeną, internalizuojantį antikūną po sujungimo, nors ir yra požiūris, kad tokie specifiniai antikūnai nėra optimaliausi.

Ryšium su šiuo išradimu, ištirtais monokloniniais antikūnais yra antikūnas C215 prieš GA-733 šeimos antigeną /žr. pvz., EP-A-376746 ir cituotas šiame šaltinyje nuorodas, ir Larsson et al., Int. J. Canc. 42(1988)877-82/, antikūnas C242 /Larsson et al. Int. J. Canc. 42(1988)877-82/ ir antikūnas Thy-1.2 /monAK C, Opitz et al., Immunobiol. 160(1982)438-/. Suprantama, kad gali būti panaudoti monokloniniai AK, specifiškai kitoms ląstelių-taikinių paviršinėms struktūroms. Paruošimas monokloninių antikūnų prieš epitopus, unikalių pasirinktoms ląstelėms-taikiniams, gerai žinomas. Žiūrėk, pvz.,

anksčiau minėtas publikacijas. Tokie išsireiškimai, kaip "monokloniniai antikūnai prieš C242-epitopą arba "C215-epitopą", apima antikūnus, reaguojančius su kryžmai reaguojančiais epitopais.

5

Iš trijų išbandytų monokloninių antikūnų C125-konjugatai, pagal viską, mažiausiai įdomūs, kadangi jie reaguoja su epitopu vėžio antigene, kuris labai dažnai ekspresuojasi normaliose ląstelėse. C242-konjugatai, išeinant iš specifiškumo duomenų, atrodo labiau perspektyvūs, nors mūsų rezultatai rodo, kad jie gali pareikalauti didesnių dozių. MonAK C prieš Thy-1.2, galbūt, nebus vertingi kovoje su žmogaus vėžinėmis ląstelėmis, kadangi antigenas Thy-1.2 yra specifiškas ne žmogaus, o kitų žinduolių vėžio ląstelėms.

10
15

Linija hibridomos ląstelių, gaminančių monokloninį antikūną C242, buvo padėta saugoti į Europos Gyvulinių ląstelių kultūrų kolekciją, Porton Down, Selisberi, Wilts, England, 1990.01.26, Nr. ECACC 90012601.

20

Struktūra, sujungianti superantigeną su antikūnu

Sutinkamai su šiuo išradimu, tinkamame konjugate superantigenas kovalentiškai sujungtas su antikūnu per kovalentinę jungtį-tiltelį (-B-). Svarbu, kad konjugatas nesuirtų panaudojant jį prieš ląsteles, skirtas sunaikinimui, pvz., įvedant gyvuliui. Todėl tiltelis turi būti metaboliškai atsparus gana ilgą laiką, kad būtų pasiektas efektas. Be to, reikia, kad pats tiltelis nesukeltų imunologinių reakcijų. Bendrai, tiltelis turi būti inertinis ta prasme, kad konjugatas išsaugotų aukštą specifiškumą susiriant su ląstelėmis-taikiniais (priešvėžinį, priešvirusinį ir t.t.) ir didelį sugebėjimą aktyvinti citotoksines T-ląsteles.

25

30

35

- Mokslinėje ir patentinėje literatūroje buvo pasiūlyta keletas funkcinų grupių, galinčių atlikti tiltelių vaidmenį imunokonjugatuose. Atitinkamai, tiltelis -B-siūlomuose naujuose konjugatuose gali turėti struktūras, pasirinktas iš grupės, sudarytos iš: (i) amidų ir hidrazidų (amidai $-\text{CONR}_1$ arba $-\text{NR}_1\text{CO}-$, kur kiekvienas iš laisvų valentingumų sujungtas su sočiuoju anglies atomu, o R_1 gali būti vandenilis ar alkilas, toks, kaip žemesnioji alkilo grupė (C_{1-6}) arba gamtinės alfa-aminorūgšties alfa-N-pakaitas, geriausiai, hidrofilinės aminorūgšties; ir hidrazidai $-\text{CONHNH}-$ arba $-\text{NHNHOC}-$, kur kiekvienas iš laisvų valentingumų sujungtas su sočiuoju anglies atomu;
- (ii) tioeterių ir disulfidų ($-\text{S}_r-$, kur kiekvienas iš laisvų valentingumų betarpiškai sujungtas su sočiuoju anglies atomu, S yra sieros atomas, ir r yra sveikas skaičius, lygus 1 arba 2);
- (iii) nešakotų, šakotų arba ciklinių angliavandenilių, kurie yra sotūs ir gali turėti vieną ar keletą hidroksilo ar aminogrupės pakaitų;
- (iv) eterių ($-\text{O}-$, kur kiekvienas laisvas valentingumas betarpiškai sujungtas su sočiuoju anglies atomu); ir
- (v) pirminių aminų arba dipakeistų hidrazinų ($-\text{NH}-$ arba $-\text{NH}-\text{NH}-$, atitinkamai, kur kiekvienas iš laisvų valentingumų betarpiškai sujungtas su sočiuoju anglies atomu).
- Tiltelio ilgis yra ribose, naudojamose šioje srityje, tai yra mažiau, negu 180 atomų, pvz., mažiau negu 100 atomų, bet turi būti daugiau negu 3-6, geriausia, daugiau, negu 16 atomų.

Tinkamesnis tiltelis yra hidrofilinis ir jame neturi būti kokių nors aromatinių ciklų. Tinkamesnėmis hidrofilinėmis struktūromis, kurios gali sudaryti tiltelio -B- dalį, yra: (i) gamtinių hidrofilinių alfa-aminorūgščių polipeptidinės grandinės (pvz., asparagino rūgšties ir jos amido, gliutamino rūgšties ir jos amido, lizino, arginino, glicino, treonino, serino, ir, gal būt, taip pat histidino); (ii) oksialkileninės grandinės, tokios kaip $-O(CH_2)_n/n'$, kur n yra sveikas skaičius nuo 2 iki 5, geriau 2 arba 3, ir n' gali būti sveikas skaičius nuo 1 iki 20; ir (iii) -S- (tio-eteriai), -O- (eteriai) ir nepakeisti amidai (-CONH-), kiekvienas iš kurių sujungtas su trumpomis nepakeistomis angliavandenilinėmis grandinėmis (C_{1-4}), geriau, turinčiomis 1 ar 2 anglies atomus.

Hidrofilinės aminorūgštys gali būti hidrofilinėse tipo $/F-(O_2O)_n/mF$ struktūrose, kur F yra aminorūgščių seka, geriau, iš 4-8 liekanų, kur kiekviena aminorūgštis pasirenkama iš serino, glicino ir treonino, m yra sveikas skaičius nuo 1 iki 4, ir n yra sveikas skaičius nuo 4 iki 8 (Cetus Corp., WO-A-85/03508).

Tiltelis -B- gali būti pritvirtintas arba konkrečiose vietose antigeno ar superantigeno dalyse konjugate, arba atsitiktinėse vietose. Potencialios vietos yra amino galas, karboksilo galas ir lizino liekana (omega-aminogrupė). Jei antikūne ar superantigene yra merkaptogrupė arba disulfido grupė (cistinas arba cisteinas, atitinkamai), tai šios grupės taip pat gali būti naudojamos kovalentiniam sujungimui, jei tik jos nevaidina esminio vaidmens aktyvių konjugato dalių darbe. Angliavandenių struktūros, jei jos yra, gali būti oksiduotos iki aldehydų grupių, kurios, savo ruožtu, gali būti panaudotos sujungimui su kita konjugato dalimi (Cetus Corp., EP-A-240200).

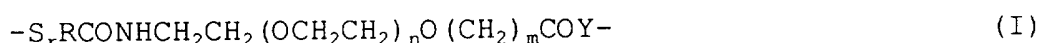
Konjugate, siūlomame šiame išradime, neturi būti daug esterinių ir labilių amidinių jungčių, ypač sudaromų tirozinių ir histidinių liekanų, atitinkamai. Jei sintet-
 5 naudojant susidarė tokios jungtys, jas reikia pašalinti naudojant hidroksilaminą /Endo et al., Cancer Res. 48(1988)3330-3335/. Konjugate esančių superantigeninių fragmentų, tenkančių vienam aktyviam AK fragmentui, skaičius, paprastai sudaro 1-5, dažniausiai 1 arba 2.

10 Gerame variante konjugatas turi būti iš esmės vientisas superantigenas/antikūnas proporcijos atžvilgiu, ir/arba panaudotų surišimo vietų superantigene ir antikūne, atitinkamai, ir/arba tiltelio -B- atžvilgiu, ir pan. Kitaip sakant, visos atskiros konjugato molekulės, su-
 15 darančios konjugatą kaip medžiagą, turi būti vienodos šių besikeičiančių charakteristikų atžvilgiu.

Medžiaga turi būti iš esmės laisva nuo nesurištų anti-
 kūnų arba superantigenų.

20 Tikslus santykis superantigenas/antikūnas, tiltelio struktūra ir pan., optimaliame konjugate priklauso nuo pasirinkto monokloninio antikūno (įskaitant klasę, poklasį, produkuojantį kloną, specifiškumą) ir pasi-
 25 rinkto superantigeno. Pateikti šiame aprašyme eksperimentiniai modeliai leidžia atrinkti pagal optimalius parametrus taip pat ir kitus superantigenus ir anti-
 kūnus.

30 Pagal išradimo realizavimo variantą, labiausiai ištirtą iki paraiškos padavimo datos, tiltelis -B- turi struk-
 tūrą:



35 Laisvi valentingumai formulėje I sujungti su aktyviomis dalimis, atitinkamai. Tai yra betarpiškai, arba per ki-

tas divivalentes inertines struktūras, esančias tiltelyje -B-.

5 n yra sveikas skaičius didesnis už 0, pvz., 1-20, geriau 2 arba daugiau 2, ir daugeliu atvejų mažiau 10. m lygus 1 arba 2.

10 S yra sieros atomas, ir kiekvienu savo valentingumu sujungtas betarpiškai su anglies atomu (-S_r- yra tioeteris ar disulfidas), r lygus 1 ar 2.

15 Y yra -NH-, -NHNH-, arba -NHN=CH- grupės, kurios savo kairiaisiais galais surištos su CO grupe, pavaizduota dešiniojo I formulės galo dalyje, o savo dešiniuoju galu - su sočiu anglies atomu arba su karboksilo grupe (tiksliai, jeigu Y yra -NHNH-).

20 R, geriau, yra alkileno grupė (turinti nuo 1 iki 4 anglies atomų, dažniausiai, 1 ar 2 anglies atomus), kuri gali būti pakeista viena ar keliomis (1-3, tikamiausiu atveju mažiau negu 2) hidroksilo grupėmis.

Antikūno-superantigeno konjugato gavimas

25 Sutinkamai su šiuo išradimu antikūnų konjugatai gali būti gauti prisotinimo keliu ir jų išskyrimo iš produkuojančių juos ląstelių kultivavimo terpės, arba iš kitų terpių, kuriose jie buvo susintetinti.

30 Naujų konjugatų sintezė gali būti įvykdyta žinomais šioje srityje metodais, pvz., genų inžinerijos metodais (rekombinantiniais metodais) arba iš atitinkamo antikūno ir antigeno, klasikinių kondensacijos reakcijų pagal tinkamas funkcinės grupės pagalbą. Baltymuose yra
35 ir paprastai naudojamos šios funkcinės grupės:

(i) Angliavandenių struktūros. Ši struktūra gali būti oksiduota iki aldehydų grupių, kurios, savo ruožtu, reaguoja su junginiais, turinčiais H_2NNH- grupę, susidarant $-C=NH-NH-$ grupei.

5

(ii) Merkaptų grupė ($HS-$). Merkaptų grupė gali reaguoti su junginiu, turinčiu grupę, galinčią sąveikauti su merkaptų grupe, susidarant tioeterio grupei arba disulfido grupei. Laisvos merkaptų grupės yra baltymuose cistinių liekanose, ir gali būti įvestos į baltymus tiolinant arba suskaldant disulfidus gamtinių cisteinų liekanose.

10

(iii) Laisvos aminogrupės (H_2N-) aminorūgščių liekanose. Aminogrupės gali reaguoti su junginiais, turinčiais elektrofilinę grupę, tokią kaip aktyvuota karboksilo grupė, susidarant amido grupei. Geriau, laisva aminogrupė yra lizino liekanos galinė aminogrupė arba omega-aminogrupė.

15

20

(iv) Laisvos karboksilų grupės aminorūgščių liekanose. Karboksilo grupė gali būti paversta aktyvuota karboksilo grupe, kuri po to reaguoja su junginiu, turinčiu aminogrupę, susidarant amido grupei. Tačiau turi būti imtasi atsargumo priemonių, kad minimaliai susidarytų amidų su aminogrupėmis, kurios yra greta karboksilo grupių tame pačiame baltyme. Dažnai laisva karboksilo grupė yra galinė karboksilo grupė arba karboksilo grupė dvibazinėje alfa-aminorūgštyje.

25

30

Junginiai, turintys H_2NNH- grupę, galinčią reaguoti su merkaptų grupe, aktyvuota karboksilo grupe ar aminogrupe, gali būti bifunkciniu kondensacijos reagentu, arba antikūnu, ar superantigenu. Grupės sujungiamos betarpiškai su sočiu anglies atomu, išskyrus H_2NNH- grupę, kuri, kaip alternatyva, gali būti sujungta su kar-

35

bonilo anglies atomu. Grupės gali būti įvestos į antikūną arba superantigeną paprasto pakeitimo pagalba.

5 Rekombinantiniai metodai yra efektyvios priemonės gavi-
mui konjugatų, kuriuose dalys specifiškai sujungtos
viena su kita jungtimi tarp galinės karboksilo grupės
vienoje dalyje su galine aminogrupe kitoje dalyje. Taip
pat gali būti įvesta jungiančioji struktūra, suderinama
su naudojamu metodu.

10 Naudojami reagentai parenkami tokiu būdu, kad gautų
apibūdintą anksčiau tiltelį -B-. Įprasti bifunkciniai
reagentai turi formulę Z -B'-Z', kur Z ir Z' yra funk-
cinės grupės, suderinamos viena su kita, įgalinančios
15 realizuoti kovalentinį sujungimą su funkcinė grupe,
esančia baltyme. Žr. aukščiau, B yra inertinis til-
telis, kuris gali turėti tas pačias struktūras, kaip ir
anksčiau paminėtas tilteliui -B-. Konkrečiai, Z ir Z'
gali būti vienodi ar skirtingi ir parenkami iš merkaptų
20 grupės, grupės, galinčios reaguoti su merkaptų grupe,
aktyvuotos karboksilo grupės, -CONHNH₂, ir t.t. Šių
grupių apibūdinimą žr. toliau, poskyriuje "Nauji rea-
gentai".

25 Į mūsų vartojamų konjugatų, naudotų eksperimentinėje
dalyje, gavimo būdą įeina:

(i) antikūno ir superantigeno reakcija su organiniu
reagentu, turinčiu grupę, galinčią reaguoti su merkaptų
30 grupe, ir grupę, galinčią reaguoti su aminogrupe, gau-
nant antikūną arba superantigeną, turintį grupę, galin-
čią reaguoti su merkaptų grupe, ir

(ii) superantigeno ir antikūno likusios dalies reakcija
35 su organiniu reagentu, turinčiu merkaptų grupę, ir gru-
pę, galinčią reaguoti su amino grupe, gaunant super-

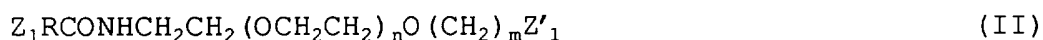
antigeną arba antikūną, turintį merkaptų grupę arba blokuotą merkaptų grupę, po ko (iii) stadijose (i) ir (ii) gauti produktai sąveikauja vienas su kitu, susidarant konjugatui, kuriame superantigenas sujungtas su antikūnu disulfidine ar tioeterine jungtimi.

Kondensacijos sąlygos kiekvienai grupei baltymų chemijoje žinomos. Kondensacija gali vykti stadijomis arba vienoje stadijoje, susidarant tarpinėms funkcinėms grupėms, kurios gali būti prijungtos prie pradinių medžiagų inertiniais speiseriais. Bendru atveju, sąlygos, kuriose vykdoma sintezė ir valymas/konjugato išskyrimas, visuomet yra tokios, kad nesukeltų naudojamų baltymų denatūracijos. Paprastai tai yra vandeninės terpės, pH reikšmių diapazonas - nuo 3 iki 10, ir temperatūra - nuo 0 iki 50°C. Konkrečios sąlygos priklauso nuo to, kokios grupės reaguoja ir kokią konjugatą reikia išskirti. Detaliau žr. poskyryje "Nauji reagentai".

20 **Nauji reagentai (sukurti ryšium su šiuo išradimu)**

Konjugatų, turinčių -B- tiltelių, cheminei sintezei buvo sukurtas naujas heterobifunkcinis reagentas, turintis bendrą formulę II:

25



kur m ir n turi tas pačias reikšmes, kaip ir anksčiau paminėtoje formulėje (I). Z_1 yra elektrofilinė grupė, galinti reaguoti su HS- grupe, merkaptų (-SH) arba blokuota merkaptų grupė (pavyzdžiui, AcS-), su sąlyga, kad merkaptų ir hidroksilo grupės negali būti sujungtos su tuo pačiu anglies atomu R radikale. Elektrofilinės grupės, galinčios reaguoti su HS- grupe, yra šios:

30

(i) halogenas, sujungtas su sočiuoju anglies atomu, geriau, alfa-halogen-alkilkarbonilo formoje (pvz., Z_1CH_2CO-);

(ii) aktyvuota merkaptų grupė, geriau, taip vadinamas reaktingas disulfidas ($-SSR_1$), sujungtas su sočiuoju anglies atomu;

(iii) 3,5-diokso-1-aza-ciklopent-3-en-1-ilas.

10 Reaktingo disulfido apibūdinimas, žr. pvz., EP-A-125885, duotas šiame aprašyme nuorodoje.

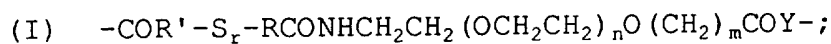
Z'_1 yra aktyvuota karboksilo grupė, tai yra, elektrofiliinė grupė. Pavyzdžiais yra karboksirūgščių halogenanhidridai ($-COCl$, $-COBr$ ir $-COJ$), karboksirūgščių mišrūs anhidridai ($-COOCR_1$), reaktingi esteriai, tokie kaip N-sukcinimidiloksi karbonilas, $-C(=NH)-OR_2$, 4-nitrofenilkarboksilatas ($-CO-OC_6H_4NO_2$) ir t.t. R_1 ir R_2 gali būti žemesnieji alkilo radikalai (C_1-C_6); be to, R_2 gali būti taip pat benzilo grupė.

Vienas iš naujų reagentų pranašumų yra tai, kad jie įgalina gauti vienalytį konjuguotą junginį sveiko skaičiaus n reikšmių struktūroje (OCH_2CH_2) n atžvilgiu, t.y. n yra vienodas kiekvienai atskirai duoto konjuguoto junginio molekulei.

Funkcinės grupės, reaguojančios su Z'_1 ir Z_1 gali būti gamtinės antikūnų ir superantigenų molekulėse, arba jos gali būti į jas įvestos. Po to galinės Z'_1 ir Z_1 grupės gali selektyviai reaguoti su atitinkamais antikūnų ar superantigenų būdais, žinomais šių tipų grupėms.

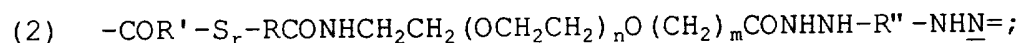
35 Į žinomas metodikas įeina grandinės, kurią pradeda nuo naujo reagento, arba nuo junginių, kuriuos reikia kon-

juguoti, ilginimas. Grandinės ilginimas, panaudojant naują reagentą, gali duoti konjugatą, kuriame -B- yra:

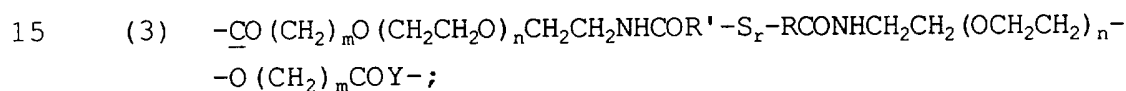


5

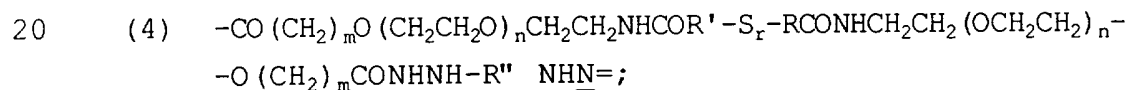
CO sujungtas su NH



10 N= paprastai sujungtas su sp^2 -hibridizuotu anglies atomu, gautu iš oksiduotos struktūros angliavandenio, esančio antikūnyje arba superantigene (kai jie yra glikoproteinai),



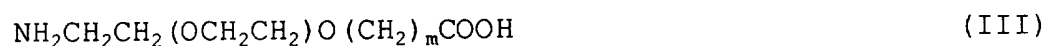
CO - sujungtas su NH,



N= sujungtas taip pat, kaip ir anksčiau (2),

25 R, R' ir R'' yra alkileno grupės, parenkamos kaip ir R formulėje (I). r turi tokias pat reikšmes, kaip išvardinta anksčiau.

30 Reagentą (formulė II) galima gauti, panaudojant junginius, turinčius formulę III:



kur m yra 1 arba 2, n yra sveikas skaičius nuo 1 iki 20, pavyzdžiui, 2-20 arba 3-9.

Kai kurių junginių, turinčių formulę III, kur $m = 1$ ir 2, ir $n = 1-10$, sintezė buvo aprašyta anksčiau./Juljen et al., Tetrahedron Letters, 29(1988)3803-06; Houghton, Saubi, Synth. Commun. 19(18)(1989)3199-3209; ir EP-A-410280 (atsp. 20.1.91) ir Slama and Rando, Carbohydrate Research 88(1981)213-221 ir Biochemistry 19(1980)4595-4600).

Naujuosius reagentus, turinčius formulę II, galima gauti reaguojant junginiui, turinčiam formulę III, su bifunkciniais reagentais, turinčiais formulę $Z-B'-Z'$, kur $Z=Z_1$, $B'=R''$, turintiems tas pačias reikšmes, kaip ir anksčiau aprašytosios R ir R', ir Z' yra aktyvuota karboksilo grupė pagal anksčiau duotą apibūdinimą. Po reakcijos $-COOH$ grupė tampa aktyvuota karboksilo grupe, pvz., Z'_1 - aktyvuotas esteris, toks kaip N-sukcinimidiloksikarbonilas, 4-nitrofeniloksikarbonilas, 2,4-dinitrofeniloksikarbonilas, 2,4-dinitrofeniloksikarbonilas, ir t.t.

Nauji junginiai, turintys formulę (III) ir jų naujieji dariniai, yra polieteriai, turintys bendrą formulę



kur n yra sveikas skaičius nuo 2 iki 20, geriau, 3-20 arba 3-9; X yra NH_2 - grupė, įskaitant jos protonuotą formą ($^+H_3N-$), arba pakeista $-NH_2$ grupė, iš kurios gali būti gauta $-NH_2$ grupė, geriau, hidrolizės ar redukcijos būdu. Pavyzdžiais yra nepakeista aminogrupė (H_2N-), nitrogrupė, amido (karbamido) grupė, tokia kaip žemesniojo alkilamido grupė (formilamido) acetilamido... heksanoilamido), įskaitant ir acilamido grupes, turinčias elektronoakceptorinius pakaitus prie anglies alfa-atomo acilinėje dalyje, ypač CF_3CONH- , CH_3COCH_2CONH- , ir t.t.; ftalimidoilo grupė, kuri gali turėti pakaitą žiede; karbamato grupė (ypač $R'_1OCONH-$ ir

- ($R'_1 - \text{OCO}$) ($R'_2 - \text{OCO}$)N- taip pat N-(tret-butiloksikarbonil)-amino (Bok), N-(benziloksikarbonil)amino ir di(N-benziloksikarbonil)-amino (Z ir di Z, atitinkamai), kurie turi pakaitus žiede; alkilamino grupė,
- 5 kurioje anglies atomas, sujungtas su azoto atomu, yra alfa-padėtyje aromatinės sistemos atžvilgiu, tokia kaip N-monobenzilamino, N,N-dibenzilamino, N-tritilamino (trifenilmetilamino) ir t.t., įskaitant ir analogiškas grupes, kuriose metilo anglies atomas (įskaitant ben-
- 10 zilo anglies atomą) pakeistas silicio atomu (Si), tokie kaip N,N-di(tret-butilsilil) amino; ir 4-okso-1,3,5-triazin-1-ilas, įskaitant turinčius žemesnius al-
- kilo pakaitus 3 ir/arba 5 padėtyje.
- 15 Anksčiau ir toliau R_1 ir R_2 yra žemesniojo alkilo grupė, ypač antrinio ir tretinio alkilo grupė, ir metilo grupė, pakeista 1-3 fenilo grupėmis, kurios, savo ruožtu, gali būti pakeistos. Žemesniojo alkilo ir žemesniojo acilo grupė turi 1-6 anglies atomus.
- 20 Y yra karboksilo grupė ($-\text{COOH}$, įskaitant $-\text{COO}-$), arba grupė, kurią galima paversti į karboksilą, geriau hidrolizinant arba oksiduojant. Svarbiausiomis grupėmis yra esterinės grupės, kuriose karbonilo anglies atomas
- 25 arba atitinkamas atomas ortoesteriuose sujungtas su metilo grupe dešiniajame formulę (I) turinčio junginio gale. Pavyzdžiais yra alkilesterinės grupės ($-\text{COOR}'_1$); ortoeterinės grupės ($-\text{C}(\text{OR}'_3)_3$) ir reaktingos esterinės grupės pagal anksčiau pateiktą apibūdinimą. R'_3 turi tas
- 30 pačias reikšmes, kurios buvo apibrėžtos anksčiau R'_1 .
- Kitomis grupėmis yra $-\text{CHO}$, $-\text{CN}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONR}_1\text{R}_2$, kur R_1 ir R_2 turi tas pačias reikšmes, kaip ir anksčiau.
- 35 Formulę IV turintį junginį galima susintetinti panaudojus žinomas pradines medžiagas, žinomų būdų kombinacijų pagalba. Tinkamais sintezės būdais yra:

A) Grandinės formavimas.

B) Galinių funkcinių grupių transformacija.

5 C) Simetrinio poliesterio transformacija į nesimetrinį eterį.

D) Bisimetrinės grandinės suskaidymas į du vienodus fragmentus.

10

Tinkami pradiniai junginiai, turintys besikartojančią grandį $-OCH_2CH_2-$, yra komerciškai prieinami. Pavyzdžiais gali būti oligoetilenglikoliai, turintys nuo 2 iki 6 pasikartojančių grandžių. Kitais tinkamais junginiais su vienodomis galinėmis grupėmis yra atitinkamos dikarboninės rūgštys ir diaminai.

15

Tinkamomis pradinėmis medžiagomis, turinčiomis skirtingas galines grupes, yra omega-hidroksimonokarbonsirūgštys, kuriose galinės grupės perskirtos grynu polietilenoksidiniu tilteliu. Tokie junginiai, turintys iki 5 pasikartojančių grandžių, buvo aprašyti anksčiau /Nakadzui, Kavamura, Okahara, Synthesis (1981), p. 42 /.

20

25 **Farmacinės kompozicijos ir jų gavimas**

Pagal šį išradimą farmacinės kompozicijos sudarytos iš receptūrų, žinomų šioje srityje, bet jose yra mūsų nauji konjugatai. Kompozicijos gali būti liofilizuotų dalelių pavidalo, sterilių ar aseptiškai paruoštų tirpalų pavidalu, tabletės, ampulės ir t.t. Jose gali būti nešėjai, tokie kaip vanduo (geriau buferis, fiziologinių pH reikšmių, pavyzdžiui, fosfatinis druskų buferis (FDB)), arba kita inertinė kieta ar skysta medžiaga.

30

35

Bendrais bruožais, kompozicija ruošiama maišant, tirpinant, surišant arba koku tai kitu būdu kombinuojant konjugatą su vienu ar keletu vandenyje netirpiaais ar vandenyje tirpiaais, vandeniniais ar nevandeniniais nešėjais, ir, jei reikia, su tinkamais priedais ir adjuvantais. Būtina, kad nešėjai ir sąlygos neturėtų neigiamos įtakos konjugato aktyvumui. Pats vanduo taip pat yra nešėjų tarpe.

10 Panaudojimas ir panaudojimo būdai

Paprastai konjugatai yra kieti ir naudojami iš anksto paruoštomis dozėmis, kiekvienoje kurių yra efektyvus konjugato kiekis, kuris, remiantis pateiktais rezultatais, yra nuo 10 μg iki 50 mg. Tiksliai dozė keičiasi nuo vieno atvejo iki kito, ir priklauso nuo paciento svorio ir amžiaus, vartojimo būdo, susirgimo pobūdžio, antikūno, superantigeno, tiltelio (-B-), ir t.t.

Vartojimo būdas atitinka žinomiems paminėtoje srityje, t.y. efektyvus ląstelei-taikiniui lizuoti. Konjugato kiekis arba terapiškai efektyvus konjugato kiekis pagal šią išradimą kontaktuoja su ląstelėmis-taikiniais. Anksčiau paminėtuose atvejuose tai dažniausiai reiškia parenteralinį vartojimo būdą, tokį kaip injekcija arba išvirkštimas (po oda, į veną, į arteriją, į raumenis) į žinduolio, pvz., žmogaus, organizmą. Konjugatas gali būti įvestas gydymo objektui lokaliai ar sistemiškai.

"Efektyviu ląstelių-taikinių lizavimui kiekiu" suprantamas toksai kiekis, kuris efektyviai aktyvuoja ir nukreipia CTL ląstelių-taikinių sunaikinimui.

Išradimas iliustruojamas keletu realizavimo variantų, kurie joku būdu neapriboja šios išradimą. Eksperimentinės dalies I skyriuje parodyta konjugatų cheminė

sintezė, o II skyriuje - T-ląstelių aktyvacija 4 konjugatų pavyzdžiu ląstelių-taikinių lizavimui. .

EKSPERIMENTINĖ DALIS. I SKYRIUS

5

Omega-amino-DEG-karboksirūgšties gavimas

Izopropil-8-hidroksi-3,6-dioksa-oktanoatas (I)

10 Į dietilenglikolį (500 ml) azoto atmosferoje dedamas porcijomis natris drožlių pavidalu (23 g, 1,0 mol). Po to, kai natris pilnai sureaguoja, mišinys atšaldomas iki kambario temperatūros, ir maišant pridedama brom-
acto rūgštis (76 g, 0,5 mol). Reakcija vykdoma 18 va-
15 landų 100°C temperatūroje, po to dietilenglikolio per-
teklius nudistiliuojamas apie 4 mm Hg stulpelio slė-
gyje. Po to pridedamas izopropilo alkoholis (400 ml) ir
porcijomis - acetilchloridas (51 g, 0,65 mol). Maišoma
16 val. 65°C temperatūroje, po to atšaldoma iki kam-
20 bario temperatūros ir neutralizuojama natrio acetatu
(3,5 g, 0,15 mol). Mišinys filtruojamas, filtratas nu-
gaminamas sausai, ir liekana tirpinama vandenyje (200 ml).
Vandens fazė ekstrahuojama 1,1,1-trichloretanu (3 kar-
tus po 50 ml). Gautosios organinės fazės praplaunamos
25 vandeniu (20 ml). Produktas ekstrahuojamas iš apjungtų
vandeninių fazių dichlormetanu (50 ml), kuri išgarinus
lieka alyva (55 g).

Izopropil-II-hidroksi-3,6,9-trioksa-undekanoatas (2)

30

Į trietilenglikolį (700 ml) azoto atmosferoje porci-
jomis dedamas natrio (23 g, 1,0 mol) drožlių pavidalu.
Po to, kai natris pilnai sureaguoja, mišinys atšaldomas
iki kambario temperatūros ir maišant pridedama bromacto
35 rūgšties (76 g, 0,5 mol). Reakcija vykdoma 18 val.
100°C temperatūroje, po to trietilenglikolio perteklius
nugaminamas distiliuojant apie 4 mm Hg stulpelio slė-

gyje. Po to pripilamas izopropiloalkoholis (400 ml) ir porcijomis acetilchloridas (51 g, 0,65 mol). Po 18 val. maišymo 65°C temperatūroje mišinys ataušinamas iki kambario temperatūros ir neutralizuojamas natrio acetatu (3,5 g, 0,15 mol). Mišinys filtruojamas, filtratas nugarinamas beveik sausai, ir liekana tirpinama vandenyje (200 ml). Vandeninė fazė ekstrahuojama 1,1,1-trichloretanu (3 kartus po 50 ml). Gautos organinės fazės praplaunamos vandeniu (20 ml). Produktas ekstrahuojamas iš apjungtų vandens fazių dichlormetanu (50 ml), kuri nugarinus gaunama alyva.

^1H -BMR (CDCl_3), δ (m.d.): 1,25 (d, 6H); 3,07 (s, 2H); 3,6-3,8 (m, 12H); 4,11 (s, 2H); 5,09 (m, 1H).

8-(N-ftalimidoil)-3,6-dioksa-oktanolis (3)

8-chlor-3,6-dioksa-oktanolis (365 g, 2,2 mol, gautas iš trietilenglikolio ir SOCl_2) tirpinamas dimetilformamide (400 ml) ir maišant pridedamas kalio ftalimidas (370 g, 2,0 mol). Po 16 val maišymo 110°C temperatūroje dimetilformamidas nugarinamas, esant sumažintam slėgiui. Liekana suspenduojama toluene (1,5 l) 40-50°C temperatūroje ir nufiltruojamas kalio chloridas. Produktas kristalinamas šaldant (-10°C). Antra frakcija gaunama iš nuovarvų, jas koncentruojant ir kartojant kristalinimo procedūrą.

^1H BMR (CDCl_3), δ (m.d.): 2,90 (s, 1H); 3,51-3,58 (m, 2H); 3,60-3,68 (m, 6H); 3,73-3,78 (t, 2H); 3,89-3,94 (t, 2H); 7,70-7,89 (m, 4H).

Izopropil-17-(N-ftalimidoil)-3,6,9,12,15-pentaoksa-heptadekanoatas. (4)

I 8-(N-ftalimidoil)-3,6-dioksa-oktanolio (3) (8,5 g, 36 mmol) ir trifluormetano sulforūgšties anhidrido (10,2 g, 36 mmol)

tirpalą dichlormetane prilašinamas, maišant apie -5°C temperatūroje, piridinas (2,8 ml, 35 mmol) dichlormetane (30 ml). Maždaug po 30 min organinė fazė praplaunama 0,5 M druskos rūgštimi ir vandeniu. Po
5 džiovinimo natrio sulfatu ir filtravimo pridedamas izopropil-8-hidroksi-3,6-dioksa-oktanoatas (I) (12 g, 48 mmol) ir Na_2HPO_4 (6,5 g, 46 mmol), ir mišinys intensyviai maišomas kambario temperatūroje 20 valandų. Reakcijos mišinys filtruojamas, ir filtratas nugarinamas.
10 Liekana paskirstoma tarp 1,1,1-trichloretoano ir vandens. Nugarinus organinę fazę, gaunama alyva (13 g).

^1H BMR (CDCl_3), δ (m.d.): 1,26 (d, 6H); 3,58-3,76 (m, 18H); 3,90 (t, 2H); 4,11 (s, 2H); 5,09 (m, 1H); 7,70-
15 7,89 (m, 4H).

17-(N-ftalimidoil)-3,6,9,12,15-pentaoksa-heptadekano rūgštis (5)

20 Izopropil-17-(N-ftalimidoil)-3,6,9,12,15-pentaoksa-heptadekanoatas (4) (13 g) tirpinamas tetrahidrofurane (50 ml) ir druskos rūgštyje (konc., 50 ml). Reakcija vykdoma 16 valandų kambario temperatūroje, po to tirpalas praskiedžiamas vandeniu (200 ml), ir tetra-
25 hidrofuranas nugarinamas sumažintame slėgyje. Vandinė fazė praplaunama toluenu (1 kartą) ir ekstrahuojama dichlormetanu (2 kartus). Džiovinama natrio sulfatu ir, nugarinus organinę fazę, gaunamas alyvos pavidalo produktas (8,5 g).

30 ^1H BMR (CDCl_3), δ (m.d.): 3,57 - 3,75 (m, 18H); 3,91 (t, 2H); 4,11 (s, 2H); 4,8 (pl.p, 2H); 7,65 - 7,90 (m, 4H).

Izopropil-17-amino-3,6,9,12,15-pentaoksa-heptadekanoatas (6)
35

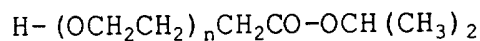
17-(N-ftalimidoil)-3,6,9,12,15-pentaoksa-heptadekano rūgštis (5) (8,5 g) ištirpinama 150 ml etanolio ir 3 ml hidrazino hidrato. Tirpalas maišomas 16 val kambario temperatūroje, po to pripilama HCl (100 ml, 3 M), ir
 5 tirpalas kaitinamas 3 val su grįžtamuoju šaldytuvu. Atšaldžius iki kambario temperatūros ir nufiltravus, pašarminama iki pH 9, pridėjus NaOH, ir filtratas nugarinamas beveik sausai, po to parūgštinama HCl iki pH 4 ir nugarinama sausai. Produktas apdorojamas izo-
 10 propanoliu (100 ml) ir acetilchloridu (2 ml) esant kambario temperatūrai visą naktį, ir tirpalas nugarinamas. Liekana tirpinama vandenyje ir ekstrahuojama dichlormetanu esant šarminiam pH (7-11). Nugarinus, gaunamas produktas (3,3 g).

15

^1H BMR (CDCl_3), δ (m.d.): 1,26 (d, 6H); 3,17 (t, 2H); 3,65-3,80 (m, 18H); 4,16 (s, 2H); 6,07 (m, 1H).

SINTEZUOTŲ AMINO-DEG-KARBOKSIRŪGŠČIŲ FORMULĖS

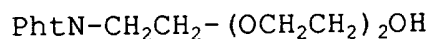
20



Junginys 1: $n = \text{I}$

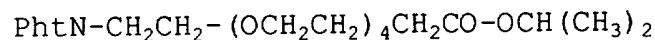
25

Junginys 2: $n = \text{I}$



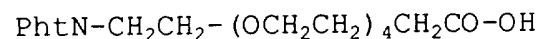
Junginys 3, PhtN- = N-ftalimidoilas

30



Junginys 4, PhtN - = N - ftalimidoilas

35



Junginys 5



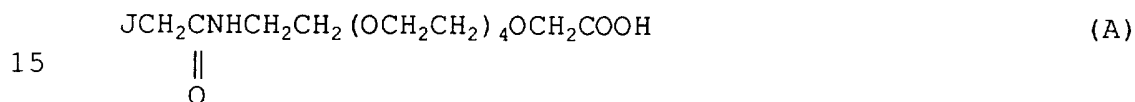
Junginys 6

5 **BIFUNKCINIŲ REAGENTŲ IR KONDENSACIJOS PRODUKTŲ GAVIMAS**

1 **Pavyzdys** 17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekano rūgšties N-hidroksisukcinimidinio esterio gavimas

10

A. 17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptano rūgšties (A) gavimas



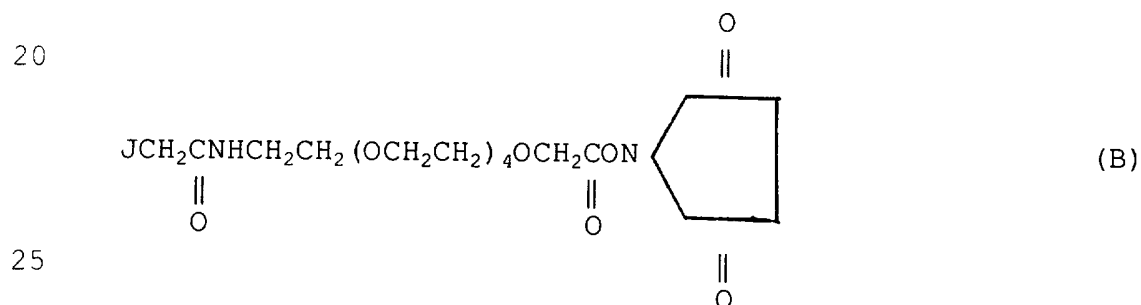
Izopropil-17-amino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoatas (žr. Eksperimentinės dalies I skyrių) (1,1 g, 3,2 mmol) ištirpinamas 3 ml 1 M natrio hidroksido tirpalo, ir paliekama kambario temperatūroje 30 minučių. Pripilama 1,6 ml 8 M druskos rūgšties, ir mišinys nugarinamas sausai. Liekana tirpinama dichlormetanu ir filtruojama, ir, nugarinus tirpiklį, gaunama 545 mg 17-amino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekano rūgšties. 460 mg (1,39 mmol) šio junginio ištirpinama 10 ml boratinio buferio, pH 8,4. Tirpalo deaeracija atliekama dujiniu azotu. Per 1 minutę sulašinamas 432 mg (1,52 mmol) N-sukcinimidil-2-jodacetato tirpalas 5 ml dioksano, palaikant pH 8,4, pridedant 5 M NaOH. Reakcijos mišinys maišomas 15 minučių, leidžiant azotą. Plonasluoksnės chromatografijos duomenimis (eliuentas : CH₂Cl₂-MeOH, 50:35) reakcija baigiasi per keletą minučių. Po 15 minučių parūgštinama iki pH₃, tirpalas užšaldomas ir liofilizuojamas. Reakcijos mišinys frakcionuojamas kolumnėje su reversinėmis fazėmis PHP-RPC HP 30/26 (Farmacia, Biosystems AB), naudojant acetonitrilo gradientą nuo 0 iki 13 %, esant 0,1 % trifluoracto

rūgštis, su vėlesniu padalinimu 13 % acetonitrilo, 0,1 % TFAR (trifluoracto rūgštis). Reikiamo piko frakcijos apjungiamos ir liofilizuojamos, gaunama 351 mg 17-jod-acetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekano rūgštis (A).
5 Išeiga: 76 %.

Produkto struktūra nustatyta BMR spektroskopijos metodu. ^1H BMR spektre (D_2O) buvo gautos šios δ (m.d.) reikšmės:

10 JCH_2C 4,23 s; OCH_2COH 3,76 s; $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 3,41; $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$
 $\begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array}$ $\begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array}$
 3,71 - 3,76; $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 3,65 t.

15 **B. 17-jodacetil-amino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekano rūgštis N-hidroksisukcinimidinio esterio (B) gavimas**

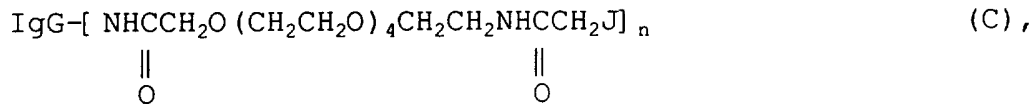


Reakcijos ampulėje sveriamas hidroksisukcinimidas (4,5 mg, 39 μmol). 17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekano rūgštis (A) (18,3 mg, 39 μmol) tirpinama 0,55 ml sauso dioksano ir supilama į ampulę. Ampulė deaeruojama dujiniu azotu, po to į ją lašinamas 0,8 mg (39 μmol) dicikloheksilkarbodiimidas 0,15 ml sauso dioksano. Ampulė užpildoma dujiniu azotu, užkemšama ir patalpinama tamsoje. Reakcijos mišinys maišomas 3,5 valandos, susidariusios nuosėdos pašalinamos filtruojant. BMR-analizė parodė, kad filtrate gautasis produktas B sudaro 89 %.

2 Pavyzdys (17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekamoilamino)-imunoglobulino (C) gavimas .

A. Monokloninis antikūnas monAK C215

5



10 $n = 4, 7, 9, 12, 14, 18$

I ampulę pridedamas imunoglobulino klasės IgG2a monokloninis antikūnas (monAK C215) (34 mg, 0,218 μmol), ištirpintas 17,7 ml 0,1 M boratinio buferio, pH 8,1, kuriame yra 0,9 % natrio chlorido. I buferinį tirpalą
15 pripilama 146 μl dioksano tirpalo, turinčio 3,6 mg (6,4 μmol) 17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekano rūgšties N-hidroksisukcinimidinio esterio (B) ir reakcija vykdoma iki užbaigimo maišant kambario temperatūroje 25 minutes. Reakcijos ampulė uždengiama folga, kad nepatektų šviesa. Reagento B perteklius pašalinamas frakcionuojant kolonėlėje su Sephadex G 25 K 26/40, naudojant eliuentu 0,1 fosfatinį buferį, pH 7,5, turintį 0,9 % NaCl. Surenkamos ir apjungiamos frakcijos, kuriose yra reikiamas produktas C. Tirpalas (22 ml) koncentruojamas Amicon gardelėje per YM 30 filtrą iki 8 ml tūrio. Koncentracija ir pakeitimo laipsnis nustatomas aminorūgščių analize. Jie sudaro 4,7 mg/ml ir 18 speiserių/monAK C215, atitinkamai.

30

B. Monokloninis antikūnas monAK C242

Pagal metodiką, aprašytą 2A Pavyzdyje reakcija atliekama imunoglobulininio Ig G1 klasės monokloninio antikūno (monAK C242) su 15-, 20- ir 22-kartiniu 17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekano rūgšties N-hidroksisukcinimidinio esterio (B) molių pertekliais, gaunant nona-, dodeka-, ir tetradeka(17-jodacetilamino-

35

3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino)-monAK C242, atitinkamai (C).

C. Monokloninis antikūnas monAK C

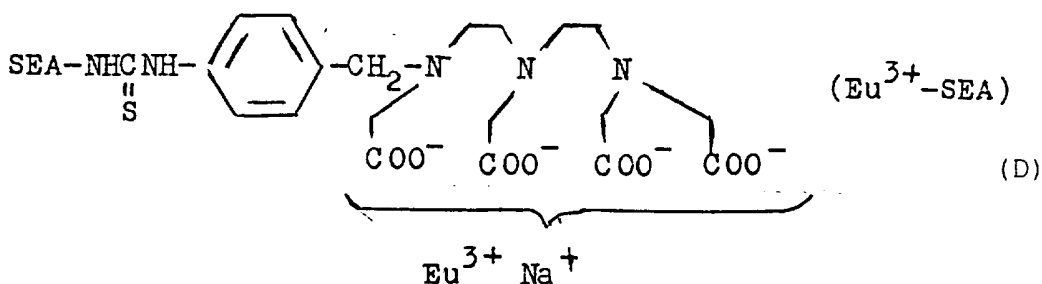
5

Pagal metodiką, aprašytą 2A Pavyzdyje, imunoglobulinų klasės Ig G 2a monokloninis antikūnas (monAK C) veikiamas 17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekano rūgšties N-hidroksisukcinimidinio esterio 14- ir 18-kartiniu molių pertekliais, gaunant tetra- ir hepta(17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino)-monAK C, atitinkamai, (C).

15 **3 Pavyzdys** Stafilokokų enterotoksino A (SEA), žymėto 2-merkaptopropionilamino-Eu³⁺ gavimas

A. Eu³⁺-žymėto SEA (D) gavimas

20



25

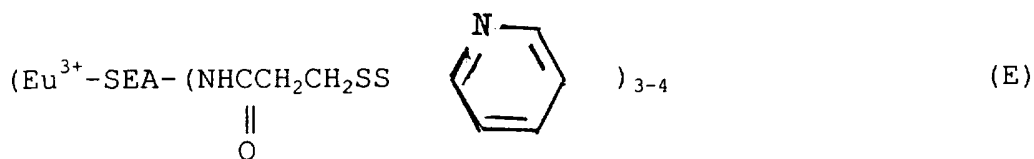
SEA (liofilizuotas produktas, gautas Toksin technology inc.) (2 mg, 72 nmol) ištirpinamas 722 μ l vandens ir patalpinamas į 15 ml izopropileno vamzdelį. Pridedama 100 μ l 0,1 M boratinio buferio, pH 5,6, o po to 2160 nmol Eu³⁺ komplekso su chelatais (Farmacia Vallac Oi) 178 μ l milli-Q. Reakcija pilnai įvyksta per naktį kambario temperatūroje. Reagentų perteklius pašalinamas frakcionuojant reakcijos mišinį kolonėlėje su Sephadex G 25 PD 10 (Farmacia Biosystems AB), naudojant eliuentu 0,1 M fosfatinį buferį, pH 8,0. Frakcijos, turinčios norimą produktą D, apjungiamos. Tirpalas (3 ml) kon-

centruojamas Amicon gardelėje per YM5 filtrą iki 0,8 ml tūrio. Koncentracija, nustatyta aminorūgščių analizės būdu, sudarė 1,7 mg/ml. Pakeitimo laipsnis, nustatytas lyginant su standartiniu EuCl_3 tirpalu, sudarė 0,8 $\text{Eu}^{3+}/\text{SEA}$.

5

BI. 3-(2-piridiltio)propionilamino- Eu^{3+} -žymėto SEA (E) ir 3-merkaptopropionilamino- Eu^{3+} -žymėto SEA (F_1) gavimas

10



15

I 15 ml izopropileno vamzdelį patalpinamas Eu^{3+} -SEA (1,24 mg, 44,5 nmol) 0,75 ml 0,1 M fosfatinio buferio, pH 8,0. Į vamzdelį pripilamas 35 μl (180 nmol) 1,6 mg N-sukcinimidil-3-(2-piridiltio)-propionato viename mililitre etanolio tirpalo, ir reakcijos mišinys maišomas 30 min kambario temperatūroje. Gautas produktas E neišskiriamas prieš redukuojant jį į produktą F_1 .

20



25

I anksčiau paminėtąją reakcijos mišinį pridedama 20 μl 0,2 M Eu^{3+} citrato tirpalo ir 50 μl 2 M acto rūgšties, kad nustatytų pH iki 5,0. Po to pripilama 3,1 mg di-tiotrentolo (Merk) 0,1 ml-tre 0,9%-nio natrio chlorido tirpalo, ir reakcijos mišinys maišomas 20 min kambario temperatūroje. Po to bendras tūris padaromas iki 1 ml pridedant 50 μl 0,9 % natrio chlorido tirpalo. Reakcijos tirpalas patalpinamas į kolonėlę (1 ml), užpildytą Sephadex G25 NAP 10 (Farmacia Biosystems AB) ir norimas produktas F_1 išplaunamas 1,5 ml 0,1 M fosfatinio buferiu pH 7,5, turinčiu 0,9 % natrio chloridą. Išskirtas

30

35

produktas F_1 surenkamas 15 ml izopropileno vamzdelyje ir tuoj pat panaudojamas produkto G sintezei, kad išvengtų disulfidinio produkto oksidacijos.

- 5 B2. 2-merkaptopropionilaminostafilokokų enterotoksino A (SEA) (F_2) gavimas



10

Gamtinis SEA (liofilizuotas produktas, Toksin Technology Inc.), ar gautas rekombinantiniais metodais SEA (rSEA) veikiami N-sukcinimidil-3-(2-piridiltio)propionato dvigubu molių pertekliumi pagal metodiką, aprašytą 3BI pavyzdyje.

15

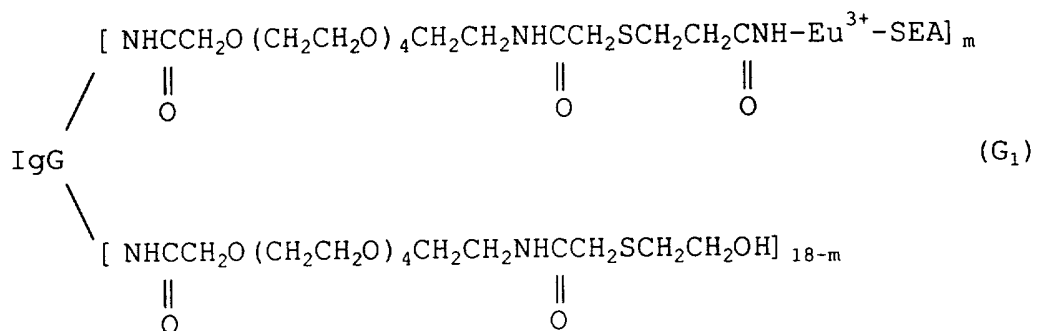
Pakeitimo laipsnis, nustatytas UV analizės metodu pagal Karlsson ir kt. /Biochem. J. 173(1978)723-737/ yra 1,9 merkaptopropionilo grupių vienai SEA molekulei.

20

4 Pavyzdys SEA monokloninio antikūno konjugato (G_1 arba G_2) gavimas

A. Eu^{3+} -SEA konjugatai su monAK C215 (G_1)

25



30

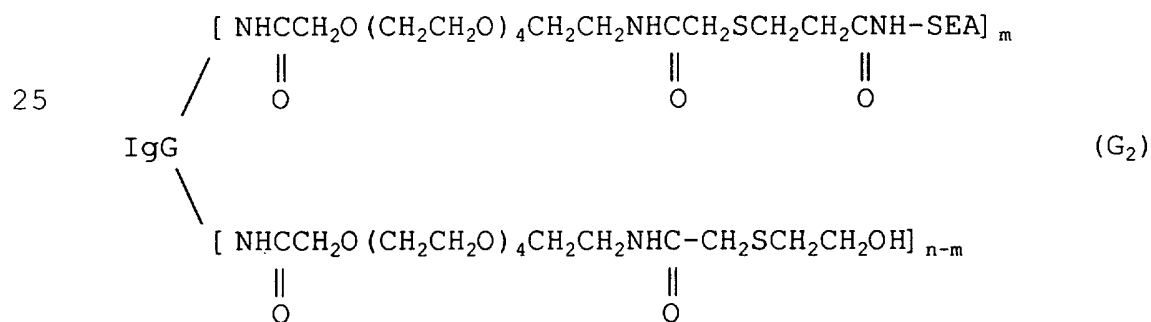
I tirpalą 4-merkaptopropionilamino- Eu^{3+} -žymėto SEA (F),
35 aprašyto 3B pavyzdyje, pripilama oktaheksa (17-jodo-
acetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino)monAK
C215 (C) (4 mg) 1,2 ml 0,1 M fosfatinio buferio, tu-

rinčio 0,9 % natrio chlorido, pH 7,5. Reakcija pasi-
baigia per naktį kambario temperatūroje. Nesurea-
gavusios jodoalkilo grupės blokuojamos pridedant 5 µl
(1,2 µmol) merkptoetanolio tirpalo, gauto ištirpinus
5 20 µl viename ml vandens. Reakcijos tirpalas paliekamas
4 valandoms kambario temperatūroje, po ko filtruojama.
Filtratas frakcionuojamas kolonėlėje, užpildyta Superos
12 HR 16/50 (Farmacia Biosystems AB), naudojant eliu-
entu 0,002 M fosfatinį buferį, pH 7,5, turintį 0,9 %
10 natrio chlorido. Frakcijos, kuriose yra galutinis
produktas G, apjungiamos ir analizuojamos. Pagal amino-
rūgščių analizės duomenis baltymo kiekis sudaro
0,22 mg/ml. Pakeitimo laipsnis, nustatytas pagal Eu^{3+}
kiekį, yra viena SEA molekulė vienai IgG molekulei.
15 Produktas buvo tirtas, kad nustatytų imunostimuliuo-
jančias savybes ir antikūno sujungimo gebą.

Didinant junginio (F) kiekį junginio (C) kiekio atžvil-
giu, gaunamas didesnis pakeitimo laipsnis.

20

B. rSEA konjugatai su monAK C215 (G_2)



30

Oktadeka (17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksahepta-
dekanoilamino)monAK C215 (C) veikiamas 2-merkaptopro-
pionilamino-rSEA (F_2) 1,8-gubu molių pertekliumi, pagal
metodiką, aprašytą 4A pavyzdyje. Konjugato sudėtis ana-
lizuojama elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje,
35 esant natrio dodecilsulfatui (DSN-PAGE), esant Phast-
Gel™ gradientui 4-15, ir juostos, skanuojamos Phast

IMAGE pagalba (Pharmacia Biosystems AB). Gautas konjugatas yra sudarytas iš 6 % monAK C215 su 3 SEA, 15 % su dviem SEA, 28 % su vienu SEA ir 51 % nepakeisto monAK C215.

5

Kitame bandyme naudojamas 2,7-gubas F_2 molinis perteklius, gaunant šios sudėties konjugatą: 15 % monAK C215 su trim SEA, 25 % su dviem SEA, 34 % su vienu SEA ir 26 % nepakeisto monAK C215.

10

C. rSEA konjugatai su monAK C242

Pagal metodiką, aprašytą 4A pavyzdyje, tetradeka (17-jodoacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino)monAK C242 (C) veikiamas 3,2-gubu 2-merkaptopropionilamino-rSEA (F_2) molių pertekliumi. Konjugato sudėtis analizuojama, kaip aprašyta 4B pavyzdyje, gaunant šiuos rezultatus: 4 % monAK C242 su keturiais SEA, 12 % su trim SEA, 28 % su dviem SEA, 36 % su vienu SEA ir 20 % nepakeisto monAK C242.

20

Vykdoma tokia pat reakcija, tik prieš frakcionuojant kolonėlėje, produktas 4 valandas apdorojamas 0,2 M hidrosilamino nestabilių jungčių tarp monAK C242 ir sierio ir tarp SEA ir merkaptopropionilo grupės pašalinimui. Gautas konjugatas yra šios sudėties: 1 % monAK C242 su keturiais SEA, 12 % su trim SEA, 27 % su dviem SEA, 36 % su vienu SEA ir 24 % nepakeisto monAK.

25

30 **C2.** Pagal metodiką, aprašytą 4A pavyzdyje, dodeka (17-jodoacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino)monAK C242 veikiamas trigubu 2-merkaptopropionilamino-rSEA (F_2) molių pertekliumi. Gautas konjugatas yra šios sudėties: 6 % monAK C242 su trim SEA, 26 % su dviem SEA, 36 % su vienu SEA ir 31% nepakeistas monAK C242.

35

C3. Pagal metodiką, aprašytą 4A pavyzdyje, nona(17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino)monAK C242 (C) veikiamas trigubu 2-merkaptopropionilamino-rSEA (F_2) molių pertekliumi. Gautas konjugatas yra šios sudėties: 15 % monAK C242 su dviem SEA, 39 % su vienu SEA ir 46 % nepakeisto monAK C242.

D. rSEA konjugatai su monAK C

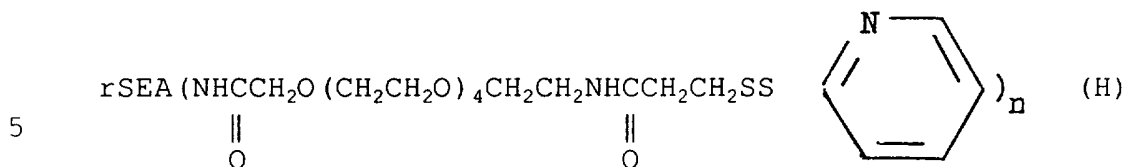
DI. Pagal metodiką, aprašytą 4A pavyzdyje, hepta(17-jodo-acetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino)monAK veikiamas 2-merkaptopropionilamino-rSEA (F_2) 5,4-kartiniu molių pertekliumi. Konjugato sudėtis analizuojama, kaip aprašyta 4B pavyzdyje, gaunant šiuos rezultatus: 15 % su keturiais SEA, 24 % su trim SEA, 29 % su dviem SEA, 19 % su vienu SEA, 3 % nepakeisto monAK C ir 10 % dimero.

Ta pati reakcija vykdoma esant 0,2 M hidroksilamino nestabilioms jungtims tarp monAK C ir speiserio ir tarp rSEA ir merkaptopropionilo grupės pašalinimui. Gautas konjugatas yra šios sudėties: 11 % monAK C su trim SEA, 24 % su dviem SEA, 30 % su vienu SEA, 18 % nepakeisto monAK C ir 17 % dimero.

D2. Pagal metodiką, aprašytą 4B pavyzdyje, tetra (17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino)monAK C veikiamas 2-merkaptopropionilamino-rSEA (F_2) 5,7-kartiniu molių pertekliumi. Konjugatas yra šios sudėties: 8% monAK C su keturiais SEA, 18 % su trim SEA, 30 % su dviem SEA, 26 % su vienu SEA, 5% nepakeisto monAK C ir 12 % dimero.

5 Pavyzdys. /17-(3-merkaptopropionilamino)-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino/-rSEA (H) gavimas

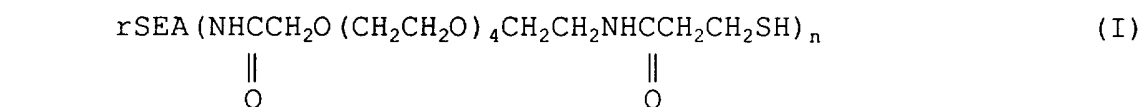
A. 17-/3-(2-piridiltio)propionilamino/-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino-rSEA (H) gavimas



17-/3-(2-piridiltio)propionilamino/-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekano rūgšties N-hidroksisukcinimidinio
 10 esterio (0,53 mg, 896 nmol) tirpalas 43 µl dioksano
 ipilamas į 3,65 mg (128 nmol) rSEA tirpalo viename ml
 0,1 M fosfatinio buferio, pH 7,5, turinčio 0,9 % natrio
 chlorido. Reakcija baigiasi per 30 min kambario tem-
 peratūroje. Paimama 100 µl pakeitimo laipsnio analizei.
 15 Likusioji dalis saugoma užšaldyta iki jos redukavimo į
 produktą.

Pakeitimo laipsnis nustatomas pašalinus druskas iš 100 µl
 reakcijos mišinio kolonėlėje, turinčioje Sephadex G50
 20 NICK (Farmacia Biosystems AB) ir analizuojant eliuatą
 UV-spektroskopijos metodu pagal Karlsson ir kt.
 /Biochem. J., 173(1978)723-737/. Su rSEA sujungta 2,7
 speiserio.

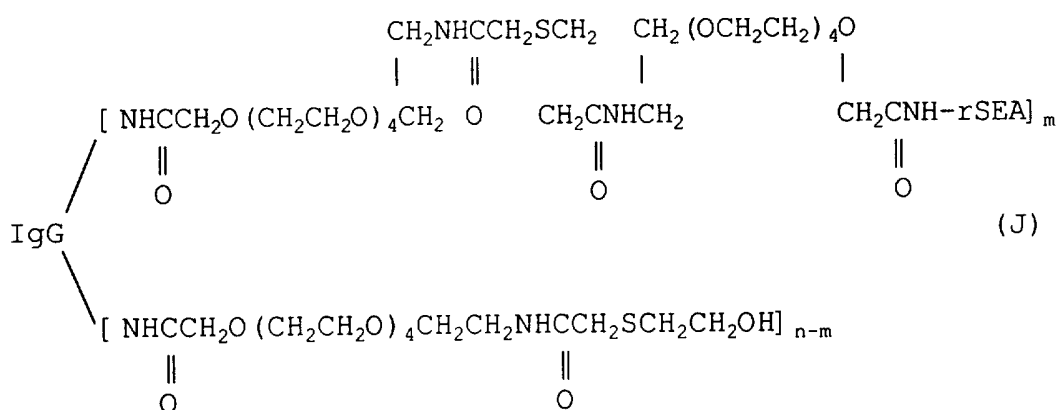
B. /17-(3-merkaptopropionilamino)-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino/-rSEA (I) gavimas



Reakcijos tirpalas, turintis produktą H (0,9 ml) pa-
 rūgštinamas iki pH 4,4 2 M HCl, ir pridedama 2,9 mg
 ditiotrentolo, ištirpinto 75 µl 0,9%-nio natrio chlo-
 rido tirpalo. Redukcija įvyksta per 30 min. Reakcijos
 35 mišinys tiekiamas į kolonėlę su Sephadex G 25 NAP 10
 (Farmacia, Biosystems AB) ir išplaunamas 1,5 ml 0,1 M
 fosfatinio buferio, pH 7,5, turinčio 0,9 % natrio chlo-

rido, po to tuoj pat naudojamas produkto J sintezei pavyzdyje II.

6 Pavyzdys. SEA-monokloninio antikūno konjugato J su dvigubu speiseriu gavimas



Dodeka (17-jodacetilamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekanoilamino)monAK C242 (B) (4,2 mg, 27 nmol, 0,1 ml 0,1 M fosfatinio buferio, pH 7,5, turinčio 0,9 % natrio chlorido) 43 valandas tamsoje reaguoja azoto atmosferoje su /17-(3-merkaptopropionilamino)-3,6,9,12,15-pentaoksoheptadekanoilamino/-rSEA (I) (1,17 mg 42 nmol 1 ml anksčiau nurodyto buferio). Po to pridedama 1,14 μmol merkaptetoetanolio. Dar po 1 val reakcijos mišinys skirstomas kolonėlėje Superdex 200 HR 16/55. Produktas išplaunamas 2 mM fosfatinio buferiu, pH 7,5, turinčiu 0,9 % natrio chlorido. Frakcijos, turinčios galutinį produktą J, apjungiamos ir analizuojamos, kaip aprašyta 4B pavyzdyje. Konjugatas susideda iš 9% monAK C242 su dviem SEA, 25 % su vienu SEA ir 60 % nepakeisto monAK C242.

II EKSPERIMENTINIS SKYRIUS

Superantigenas-antikūnas konjugatų poveikis ląstelėms

Sekančiuose eksperimentuose bakteriniu toksinu buvo panaudotas Staphylococcus A enterotoksinas (SEA), gautas

iš Toksin Technology (Viskonsin, JAV), arba pagamintas kaip rekombinantinis baltymas E. coli ląstelėse.

Antikūnais buvo C215, C242 ir Thy-1.2 monAK. C215 yra
 5 Ig G2a monAK prieš žmogaus storosios žarnos vėžio ląs-
 telių liniją ir ant kai kurių žmogaus storosios žarnos
 ląstelių linijų reaguoja su baltyminiu antigenu, tu-
 rinčiu 37 kD masę. Nuorodos šiems monAK buvo pateiktos
 anksčiau. Konjugatų paruošimas aprašytas pirmame sky-
 10 riuje.

Iki paraiškos įteikimo datos (prioriteto datos) buvo
 tik atlikti tyrimai su Eu^{3+} - žymėtais konjugatais SEA-
 C215 monAK. Sekančiais metais buvo patvirtinti rezul-
 15 tatai nežymėtiems konjugatams SEA-215, SEA-242 ir SEA-
 Thy-1.2 monAK. Čia pateikti rezultatai gauti su nežy-
 mėtais konjugatais.

Nustatymui citotoksiškumo, indukuojamo konjugatu SEA-
 20 C215 monAK ir nekonjuguotais SEA ir C215 monAK,
 atžvilgiu storosios žarnos vėžio ląstelių, neekspres-
 suojančių II Klasės PASKA, arba ekspresuojančių mažus
 ir nedetektuojamus II Klasės PASKA kiekius, mes pa-
 naudojome įvairias žmogaus T-ląstelių linijas, pa-
 25 veiktas SEA, kaip efektorines ląsteles, ir storosios
 žarnos ląstelių sluoksnį ir Raji ląsteles, ekspres-
 suojančias II Klasės PASKA (II^+ Klasės PASKA), kaip
 ląsteles-taikinius. Storosios žarnos vėžio ląstelių
 linijos Colo 205, SW 620 ir WiDr II Klasės PASKA
 30 neekspresuoja, kas buvo nustatyta dažymo monAK prieš
 HLA-DR, HLA-DP ir HLA-DQ ir aktyvuojamos fluorescencija
 ląstelių analizės pagalba. T-ląstelių linijos, apdo-
 rotos SEA, buvo gaunamos iš periferinio kraujo pagalba
 savaitinių restimuliacijų paveiktomis mitomicinu C II^+
 35 PASKA limfomos BSM ląstelėmis, iš anksto padengtomis
 SEA, Dalyvaujant rekombinantiniam IL-2 (20 vienetu/ml).
 Šios T-ląstelių linijos pasižymėjo dideliu citotok-

siškumu atžvilgiu Raji arba BSM ląstelių, padengtų SEA, bet ne atžvilgiu neturinčių padengimo, arba ląstelių, padengtų stafilokokų enterotoksinu B (SEB). Šis indukuojamas SEA sunaikinimas priklauso nuo SEA sąveikos ant ląstelės-taikinio su II Klasės PASKA, kaip nustatyta panaudojant blokuojančius antikūnus HLA-DR, mutantines Raji ląsteles, neekspresuojančias II Klasės PASKA (II⁻ Klasės PASKA) ir L-ląsteles, transfektuotas HLA-DR /Doglsten et al., Immunology 71(1990)96-100/.

Šias T-ląstelių linijas pasirodė galima aktyvinti konjugatu C215-SEA, storosios žarnos vėžio C215⁺II⁻Klasės PASKA ląstelių sunaikinimui. Priešingai, nekonjuguoti SEA ir C215 monAK pasirodė nesugebantys iššaukti daugiau negu marginalinį sunaikinimą T-ląstelėmis storosios žarnos vėžio C215⁺II⁻Klasės PASKA ląstelių. Indukuotas ląstelėmis citotoksiškumas, priklausomas nuo stafilokoko enterotoksin-antikūnas konjugato, priklauso nuo konjugato SEA-C215 monAK surišimo su C215⁺vėžinėmis ląstelėmis. Šio surišimo specifiškumas buvo pademonstruotas tuo, jog perteklius nekonjuguoto monAK C215, bet ne C242 ir W8/32 monAK, inhibuoja storosios žarnos vėžio ląstelių lizę. T-ląstelės CD4⁺ ir CD8⁺ naikina storosios žarnos vėžio C215⁺ ląsteles, paveiktas SEA-C215, bet nelizuoja ląstelių, paveiktų SEA. Matomai, T-ląstelių sąveika su konjugatu SEA-C215 monAK, surištu su navikinės ląstelės II⁻Klasės PASKA, apima sąveiką su T-ląstelės receptoriaus variabilios dalies beta-grandinės specifinėmis sekomis būdu, analogišku anksčiau demonstruotam SEA iššaukiamam II⁺Klasės PASKA ląstelių sunaikinimui. Tai buvo parodyta SEA-specifinės, bet ne autologinės SEB-specifinės T-ląstelių linijos sąveikos su C215-SEA konjugatu pagalba. Konjugatai C242 monAK ir Thy-1.2 monAK rodo aktyvumą, analogišką konjugato C215 monAK aktyvumui.

Žymėjimas chromu ir ląstelių-taikinių inkubavimas su SEA

0,75 x 10⁶ ląstelių-taikinių ir 150 µCi ⁵¹Cr (American Corp., Arlington Heits, Anglija) inkubavo 100 µl tūryje
 5 45 minutes. Ląsteles laikė pilnoje terpėje, turinčioje
 RPMI-1640 terpę (Gibco, Peizli, Didžioji Britanija),
 papildytoje 2,8 % (tūris/tūris) 7,5 NaHCO₃, 1 % natrio
 piruvato, 2 % 200 mM l - glutamino, 1 % Hepes, 1 %
 10 mg/ml gentamicino ir 10 % veršelio embriono serumo
 10 (VES, Gibco, Peizli, Didžioji Britanija). Po inkubavimo
 ląstelės buvo vieną kartą praplautos pilnoje terpėje be
 VES, inkubuotos prie 37°C 60 min, praplautos ir resu-
 spenduotos pilnoje terpėje, turinčioje 10 % VES. Į
 kiekvieną iš lizdelių, 96 lizdelių mikrolitrinėse lėkš-
 15 telėse U pavidalo dugnu (Costar, Cambridg, JAV) buvo
 pridėta po 5x10³ ląstelių-taikinių.

Citotoksiškumo išbandymas

20 Į lizdelius buvo pridėta įvairiais santykiais ląstelės-
 efektoriai/ląstelės-taikiniai efektorinių ląstelių.
 Kiekviename lizdelyje galinis tūris sudarė 200 µl.
 Kiekvieną išbandymą kartojo tris kartus. Lėkšteles
 inkubavo 37°C temperatūroje 4 val, po to buvo surinktas
 25 išsiskyres chromas. ⁵¹Cr kiekis buvo nustatytas gama-
 skaitliuku (Cobra, Auto-gamma, Paccard). Citotoksiškumo
 procentas buvo nustatinėjamas pagal formulę:

$$\text{citotoksiškumo \%} = (X-M)/(T-M) \times 100, \text{ kur}$$

30

X reiškia chromo išsiskyrimą (imp/min vienetais), gautą
 bandomajam pavyzdyje, M reiškia spontaninį chromo iš-
 skyrimą ląstelėmis-taikiniais, inkubuotomis su terpe,
 ir T reiškia pilną chromo išsiskyrimą, gautą inku-
 35 buojant ląsteles-taikinius su 1 % natrio dodecil-
 sulfatu.

Rezultatai

Konjugatai SEA-C242, SEA-C215 ir SEA-anti-Thy-1.2 monAK susiriša su ląstelėmis, ekspresuojančiomis atitinkamus monokloninių antikūnų epitopus, atitinkamai, ir su II⁺ Klasės PASKA ląstelėmis. Iš kitos pusės, nekonjuguotas SEA susiriša tik su II⁺ Klasės PASKA ląstelėmis. Ne-konjuguoti monokloniniai antikūnai C215, C242 ir Thy-1.2 susiriša su ląstelėmis, ekspresuojančiomis atitinkamus epitopus, tačiau ne su Raji ląstelėmis (1 Lent.).

Žmogaus T-ląstelių linijos lizuoja linijų SW620, Colo 205 ir WiDr II⁻ Klasės PASKA ląsteles, esant konjugatui SEA-C215 monAK, bet nelizuoja esant nekonjuguotiems SEA ir C215 monAK (I pav.). Storosios žarnos vėžio ląstelių lizė vyko prie 10-100 ng/ml SEA-C215 monAK konjugato koncentracijų. Aukšti lizės rodikliai įvairiuose efektorius/taikinyse santykiuose buvo stebėti SEA-215 monAK santykyje su SW620 (I pav.). Atvirkščiai, nekonjuguoti SEA arba C215 monAK neindukuoja citotoksiškumo SW620 ląstelių atžvilgiu visuose bandytuose efektorius-taikinyse santykiuose. Šitas rodo, jog sugebėjimas lizuoti Colo 205 linijos II⁻ Klasės PASKA ląsteles yra susijęs su konjugatu ir neiššaukiamas nekonjuguotais SEA ir C215 monAK. SEA ir konjugatas SEA-C215 monAK, bet ne C215 monAK indukuoja II⁺ Klasės PASKA Raji ląstelių ir paveiktų interferonu Colo 205 linijos II⁺ Klasės PASKA ląstelių sunaikinimą T-ląstelėmis.

Tam, kad parodyti, jog į indukuojamą SEA-C215 monAK konjugatu lizę įjungiamas specifinis konjugato surišimas su C215 monAK molekule ant ląstelės-taikinio, praveistas inhibavimo tyrimas su nekonjuguotų C215 monAK ir C242 monAK pertekliumi, kuris susijungia su pašaliniais antigenais ant storosios žarnos vėžio ląstelių (C215 monAK surišimo atžvilgiu). monAK C215 pridėjimas stipriai inhibuoja citotoksiškumą, tuo tarpu kai C242

monAK nerodo jokio poveikio (Fig. 2). Analogiškai, lizė SEA-C242 monAK konjugatu specifiškai inhibuojama per-
tekliumi nekonjuguoto C242 monAK, bet ne C215 monAK.

5 SEA-C215 monAK konjugato sugebėjimas iššaukti pri-
klausomą nuo T-ląstelių storosios žarnos vėžio SW620
linijos II Klasės PASKA ląstelių lizę buvo stebimas ir
CD4⁺ ir CD8⁺ T-ląstelių populiacijoms. SEA neaktyvina
nei vieno iš šių T-ląstelių poklasio, ir neindukuoja
10 SW620 linijos ląstelių sunaikinimo, bet lizuoja II⁺Kla-
sės PASKA Raji ląsteles (2 Lentelė).

Konjugatas SEA-C215 monAK sukelia SW620 ir Raji ląs-
telių lizę linija T-ląstelių, paveiktų SEA, bet ne li-
15 nija T-ląstelių, paveiktų SEB (Fig. 3). SEA- ir SEB-
linijų selektyvumą rodo jų selektyvinis atsakas ati-
tinkamai, į SEA ir SEB, kontaktuojant su Raji ląs-
telėmis (Fig. 4). Tai rodo, jog SEA-C215 monAK konju-
gatas išsaugo specifiškumą T-ląstelės receptoriaus va-
20 riabilios dalies beta-grandinės atžvilgiu, analogišką
specifiškumui nekonjuguoto SEA.

Paveikslų aprašymas

25 **1 fig.** SEA-C215 monAK konjugatas nukreipia CTL prieš
storosios žarnos vėžio II⁻Klasės PASKA ląsteles. Kai-
riajame viršutiniame grafike parodytas CTL, jautrių
SEA, poveikis SW620 ląstelėms, esant įvairiems efek-
torius/taikinyis santykiams, nedalyvaujant (-) arba da-
30 lyvaujant SEA-C215 monAK konjugatui, SEA, C215 ir
mišiniui C215 ir SEA(C215+SEA); esant kiekvieno priedo
1 µg/ml koncentracijai. Kituose grafikuose parodytas
SEA-C215 monAK konjugato ir SEA sugebėjimas nukreipti
SEA jautrias CTL prieš storosios žarnos vėžio SW620,
35 Colo205 ir WiDr linijų II⁻Klasės C215⁺PASKA ląsteles,
paveiktas interferonu Colo 205 II⁺Klasės PASKA C215⁺lās-
telės ir Raji II⁺Klasės PASKA C215⁻ ląsteles. Efek-

torius/taikiny's santykis lygus 30:1. Pridėjimas nekonjuguoto C215 monAK kai kuriose koncentracijose nenukreipia CTL prieš šių linijų ląsteles. Aktyvuojama fluorescencija ląstelių analizė, naudojama SW620, Colo 205 ir WiDr ląstelėms, panaudojant monAK prieš HLA-DR, -DP, -DQ, neaptiko kokios nors paviršinės II Klasės PASKA ekspresijos, tuo tarpu kai buvo stebima gausi HLA-DR-, -DP, ir -DQ ekspresija ant Raji ląstelių, ir HLA-DR ir -DP ant paveiktų interferonu Colo 205 ląstelių. Colo 205 ląstelės prieš panaudojant CTL-teste, 48 valandų laikotarpyje buvo veiktos 1000 vnt/ml rekombinantiniu gama-interferonu.

2 fig. Indukuojamo SEA-C215 monAK ir SEA-C242 monAK konjugatais CTL nukreipimo prieš storosios žarnos vėžio ląsteles priklausomybė nuo antigeninio monAK selektyvumo. Colo 205 ląstelių, jautrių SEA CTL, lizė, esant SEA-C215 monAK ir SEA-C242 monAK (3 µg/ml) konjugatams inhibuojama pridėjus atitinkamai nekonjuguotų C215 ir C242 monAK (30 µg/ml). Nekonjuguoti monAK arba kontrolinė terpė (-) buvo pridedama ląstelėms-taikiniams 10 min iki konjugatų.

3 fig. Lizė storosios žarnos vėžio ląstelių, padengtų konjugatu SEA-C215 monAK, indukuojama CTL, duodančių atsaką į SEA, bet ne į SEB. Buvo panaudotos autologinės T-ląstelių SEA-ir SEB- selektyvios linijos, efektorius/taikiny's santykiu, lygiu 10:1, prieš ląsteles-taikinius SW620 ir Raji, nedalyvaujant (kontrolė) ir dalyvaujant SEA-C215 monAK konjugatui, o t.p. mišiniui nekonjuguotų C215 monAK ir SEA (C215+SEA) ir nekonjuguotų C215 monAK ir SEA (C215+SEB), esant kiekvieno priedo koncentracijai 1 µg/ml.

4 fig. Citotoksiškumas, indukuojamas SEA-C242 monAK ir SEA-anti-Thy-1.2 monAK konjugatais, prieš ląsteles-

taikinius (navikines ląsteles Colo 205 ir navikines ląsteles EL-4, atitinkamai).

I Lentelė

5

SEA-C215 monAK konjugato surišimas su storosios žarnos vėžio C215⁺ ląstelėmis ir su Raji II⁺ Klasės PASKA ląstelėmis

Reagentas	Ląstelė	Fluorescentinė analizė
SEA-C215 monAK	Colo205	Teigiama
	Raji	Teigiama
C215 monAK	Colo205	Teigiama
	Raji	Neigiama
SEA-C242 monAK	Colo205	Teigiama
	Raji	Teigiama
C242 monAK	Colo205	Teigiama
	Raji	Neigiama
SEA-anti-Thy-1.2 monAK	EL-4	Teigiama
anti-Thy-1.2 monAK	EL-4	Teigiama
SEA	Colo205	Neigiama
	Raji	Teigiama
Kontrolė	Colo205	Neigiama
	Raji	Neigiama
	EL-4	Neigiama

10

Ląstelės buvo inkubuotos su įvairiais priedais prie kontrolės (jaučių serumo albuminas) 30 min ant ledo, praplautos ir apdorotos, kaip aprašyta anksčiau. C215 monAK ir C242 monAK, surištų su Colo205, nudažymą nustatinėjo, panaudojant FITC - žymėtą triušių I g

15

prieš pelių antigenus. SEA sujungto su Raji ląstelėmis nudažymą nustatinėjo panaudojant triušių antiserumus prieš SEA, o po to - FITC-žymėtą kiaulių Ig prieš triušių antigenus. SEA-C215 monAK konjugato, surišto su Colo205 ir Raji ląstelėmis nudažymą nustatinėjo, panaudojant procedūras, aprašytas anksčiau dėl C215 monAK ir SEA. Aktyvuojama fluorescencija analizė buvo atliekama su firmos "Becton and Dickinson" prietaisu. Fono nustatymui buvo naudojamas nudažymas antrai ir trečiai stadijai.

2 Lentelė

Apibūdinanti C215-SEA konjugatą storosios žarnos vėžio ląstelių lizė, CD4⁺ CTL ir CD8⁺ CTL poveikyje

Efektorius*	Taikiny	Citotoksiškumo %		
		kontrolė	SEA	C215-SEA
CD4 ⁺	SW620	2	5	50
CD4 ⁺	Raji	0	41	43
CD8 ⁺	SW620	0	1	23
CD8 ⁺	Raji	2	72	68

* CTL(SEA-3) buvo naudojamos santykiu efektorius/taikiny, lygiu 30:1, nedalyvaujant (kontrolė) arba dalyvaujant SEA ir C215-SEA 1 µg/ml koncentracijoje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Tirpus antikūno konjugatas, apimantis antikūną ir
superantigeną, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
5 (i) nurodytas antikūnas yra specifinis susijusios su
susirgimu ląstelės-taikinio paviršinei struktūrai, ir
(ii) nurodytas superantigenas atpažįstamas T-ląstelėmis
ir sugeba aktyvinti citotoksines T-ląsteles (CTL), ir,
dažniausiai, sugeba sąveikauti su T-ląstelės recep-
10 toriaus variabilios zonos beta-grandine.

2. Konjugatas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad ląstelė-taikinys, susijusi su susirgimu,
parinktu iš grupės tokių susirgimų kaip vėžys, auto-
15 imuniniai susirgimai, parazitiniai užkrėtimai ir mikro-
binės infekcijos, tokios kaip virusinė, grybelinė ir
bakterinė infekcija, ir antikūnas, specifiškai nu-
kreiptas prieš antigeninę determinantę, esančią ant
nurodytos ląstelės-taikinio.

20

3. Konjugatas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad susirgimas yra vėžys, ir anti-
kūnas nukreiptas prieš antogeninę determinantę (epi-
topą), esančią ant navikinės ląstelės, tokios kaip
25 ląstelė, susijusi su storosios žarnos vėžiu.

4. Konjugatas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad antikūnas specifiškai nukreiptas prieš epitopą
C242.

30

5. Konjugatas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad antikūnas specifiškai nukreiptas prieš epitopą
baltyme, priklausančiam GA-733, būtent prieš epitopą
C215.

35

6. Konjugatas pagal bet kurią iš 1-5 punktų, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad vienam antikūnui tenka
mažiausiai 1-5, geriausiai atveju 1-3 superantigenai.

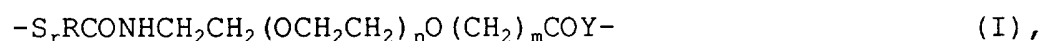
5 7. Konjugatas pagal bet kurią iš 1-6 punktų, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad kaip antikūną panaudoja
monokloninį antikūną.

10 8. Konjugatas pagal bet kurią iš 1-7 punktų, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad superantigenas yra
bakterinės kilmės, ir parenkamas iš grupės, suside-
dančios iš stafilokokų enterotoksinių.

15 9. Konjugatas pagal bet kurią iš 1-8 punktų, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad kaip superantigeną
naudoja stafilokokų enterotoksinius SEA.

20 10. Konjugatas pagal bet kurią iš 1-9 punktų, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad superantigenas ir
antikūnas sujungti vienas su kitu kovalentiniu orga-
niniu tilteliu -B-, kuris, geriausia, turi mažiausiai
vieną amidinę struktūrą ir kuris yra hidrofilišnis,
turintis grandinę, sudarytą iš mažiausiai 6 atomų.

25 11. Konjugatas pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad tiltelis -B- turi šią struktūrą:



30 kurioje: r yra 1 arba 2;

R yra alkileno grupė, turinti 1-4 anglies atomus;

n yra sveikas skaičius nuo 1 iki 20;

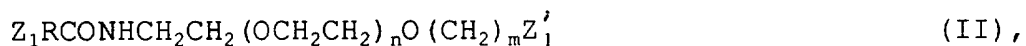
35

m yra 1 arba 2; ir

Y yra -NH-, -NHNH- arba -NHN=CH-.

12. Konjugatas pagal bet kurį iš 1-10 punktų, b e s i -
s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra naudojamas
5 lizavimui ląstelių-taikinių, turinčių paviršiaus struk-
tūrą, prieš kurią nukreiptas konjugato antikūnas.
13. Ląstelės-taikinio lizavimo būdas, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad ląstelėms-taikiniams leidžia
10 kontaktuoti su ląstelių-taikinių lizavimui reikalingu
efektyviu antikūno tirpau konjugato kiekiu, turinčiu
antikūną, surištą su superantigenu, priedo, nurodytas
antikūnas yra specifinis ląstelėms-taikiniams, ir nu-
rodytas superantigenas atpažįstamas T-ląstelių ir su-
15 geba aktyvinti citotoksines T-ląsteles (CTL).
14. Lizavimo būdas pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad superantigenas, antikūnas ir sujun-
giantis antikūną su superantigenu tiltelis atitinka
20 apibūdinimams, duotiems bet kuriame iš 1-12 punktų.
15. Konjugato gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s
tuo, kad antikūną ir/arba superantigeną sujungia ma-
žiausiai per vieną struktūrą, parenkamą iš (a) ang-
25 liavandenių ir (b) funkcinių grupių: merkaptų grupių,
disulfido grupių, karboksilo grupių ir aminogrupių;
toliau išskiria iš terpės gautąjį konjugatą.
16. Konjugato gavimo būdas pagal 15 punktą, b e s i -
30 s k i r i a n t i s tuo, kad kondensacijos reakcijoje
dalyvauja aminogrupė, esanti superantigene ir/arba an-
tikūne.
17. Konjugato gavimo būdas pagal 16 punktą, b e s i -
35 s k i r i a n t i s tuo, kad į kondensacijos reakciją
įeina šios stadijos:

- (i) antikūno ar superantigeno reakcija su organiniais reagentais, turinčiais grupę, galinčią reaguoti su merkaptogrupe, ir grupę, galinčią reaguoti su aminogrupe, gaunant antikūną ar superantigeną,
- 5 turinti grupę, galinčią reaguoti su merkaptogrupe, ir
- (ii) likusios superantigeno ar antikūno dalies reakcijos su organiniais reagentais, turinčiais merkaptogrupę ar blokuotą merkaptogrupę, arba grupę,
- 10 galinčią reaguoti su aminogrupe, gaunant superantigeną arba antikūną, turinti merkaptogrupę arba blokuotą merkaptogrupę; po to
- 15 (iii) produktai, gauti (i) ir (ii) stadijose, atitinkamai, reaguoja vienas su kitu, susidarant konjugatui, kuriame superantigenas sujungtas su antikūnu per disulfidinę ar tioeterinę grupę.
- 20 18. Konjugato gavimo būdas pagal 17 punktą, b e s i - s k i r i a n t i s tuo, kad junginys, galinti sąveikauti su aminogrupe, ir turintis grupę, galinčią sąveikauti su merkaptogrupe, yra alfa-halogenacetil-
- 25 blokuotą merkaptogrupę, yra bifunkcinis sujungiantis reagentas, turintis formulę II:



- 30 kurioje: m yra 1 arba 2, n yra sveikas skaičius nuo 1 iki 20, Z_1 yra HS-reaktinga elektrofilinė grupė, merkaptogrupė (-SH) arba blokuota merkaptogrupė (pvz., AcS-), su sąlyga, kad merkaptogrupė ir hidroksilo grupė neturi būti prijungtos prie vieno ir to paties anglies
- 35 atomo R radikale; ir Z'_1 yra aktyvuota karboksilo grupė.

19. Konjugato gavimo būdas pagal bet kurią iš 15-18 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad nurodyti superantigenas ir antikūnas atitinka apibūdinimams, duotiems bet kuriame iš 1-9 punktų.

5

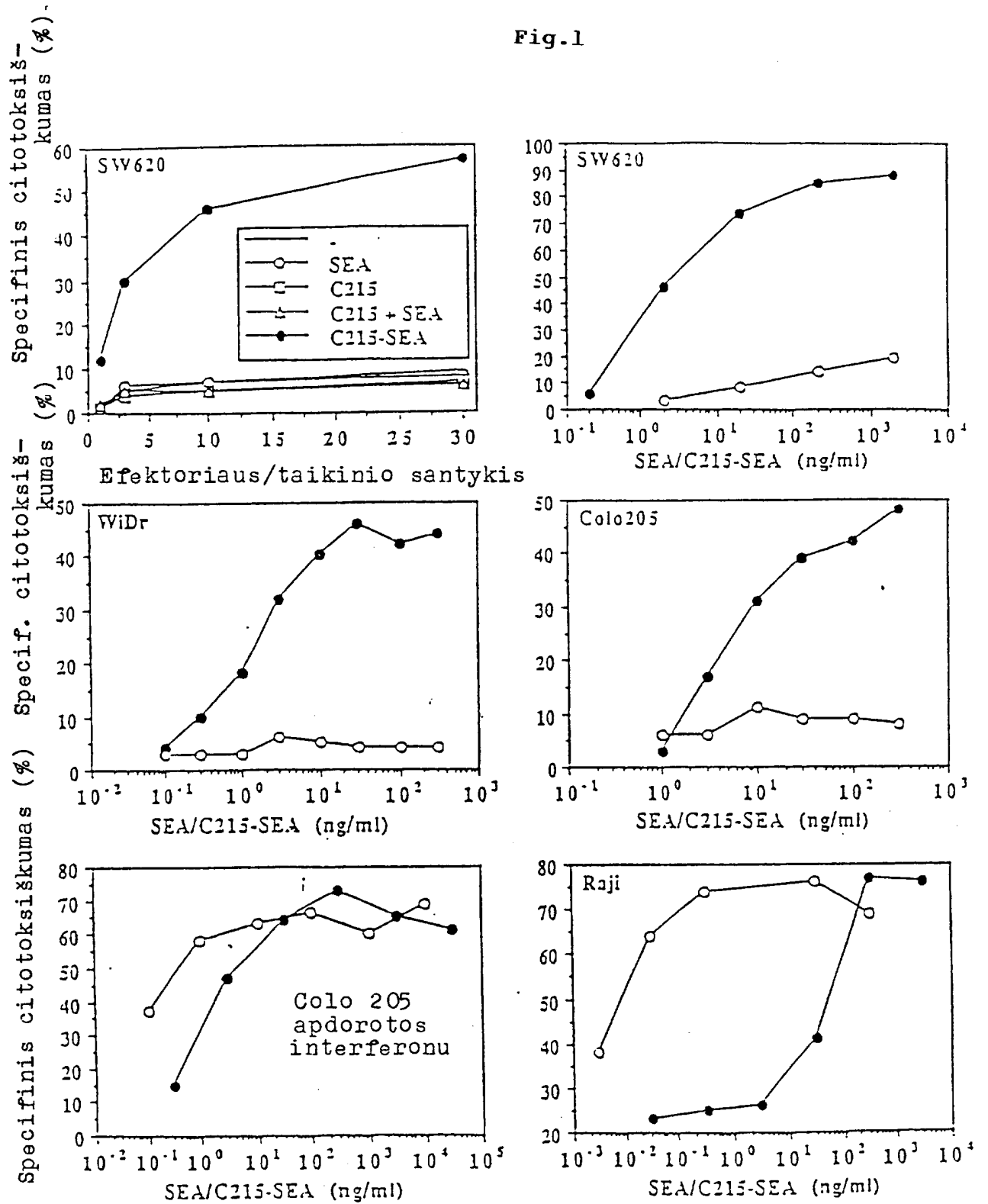
20. Konjugatas pagal bet kurią iš 1-11 punktų, skirtas gamybai medikamentų žinduolių, tame tarpe ir žmogaus, sergančių susirgimu, parinktu iš grupės, susidedančios iš vėžio, autoimuninių susirgimų, infekcijų, sukeltų virusų, bakterijų ar grybelių, ir užkrėtimo parazitais, gydymui.

10

21. Konjugato pagal bet kurią iš 1-11 punktų panaudojimas pagaminimui farmacinės kompozicijos, skirtos vėžio, autoimuninių susirgimų, infekcijų, sukeltų virusų, bakterijų ir grybelių, arba užkrėtimo parazitais, gydymui.

15

Fig.1



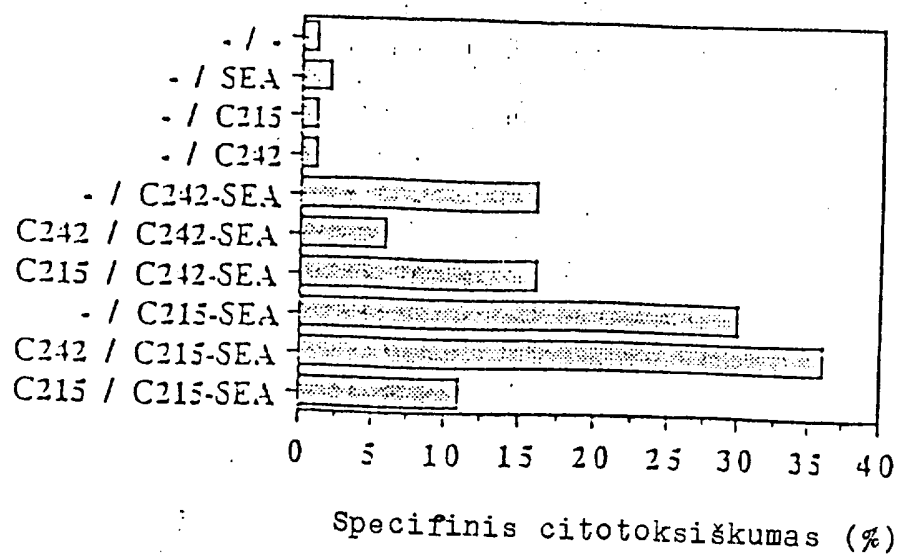


Fig.2

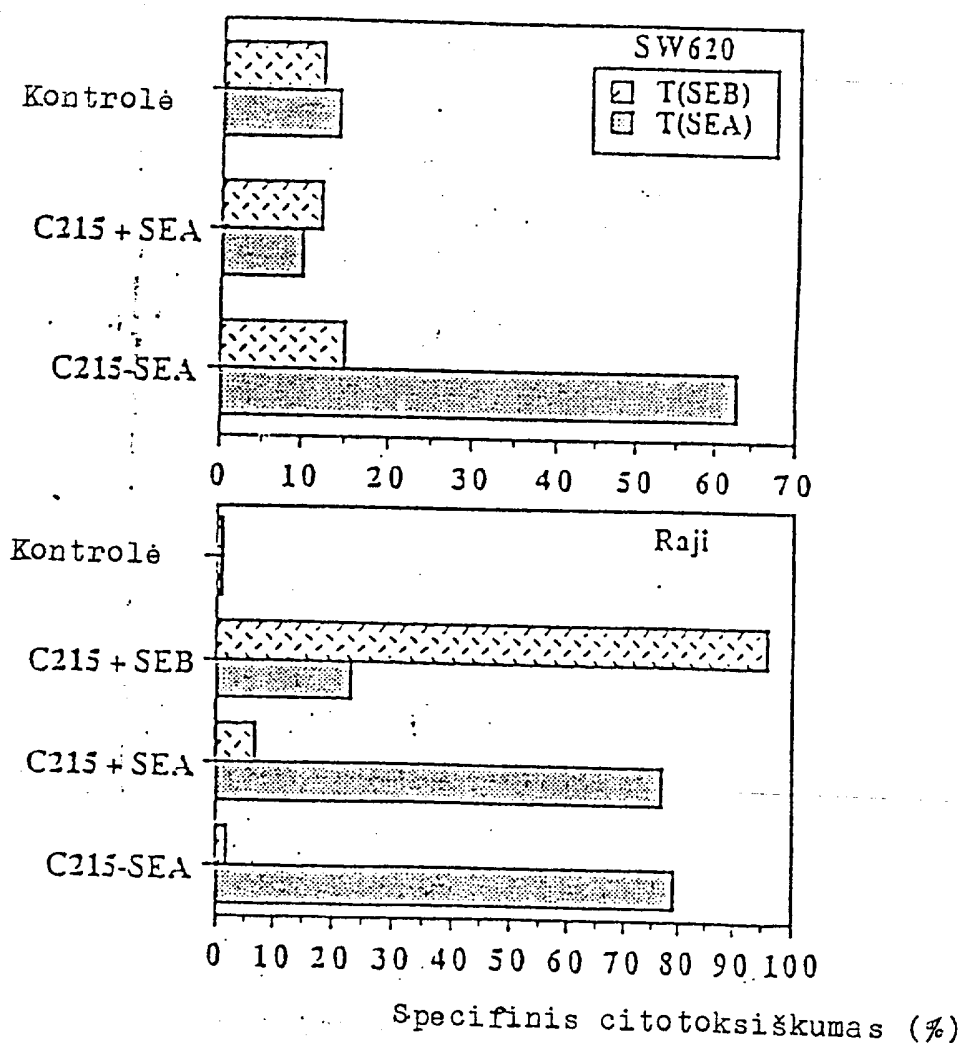
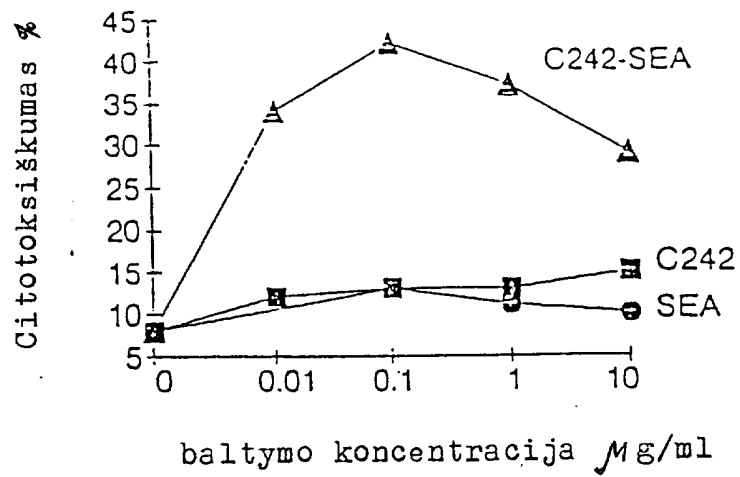


Fig.3

C242-SEA konjugatas ir Colo 205 naviko lastelēs



Anti-Thy-1,2-SEA konjugatas ir EL-4 naviko lastelēs

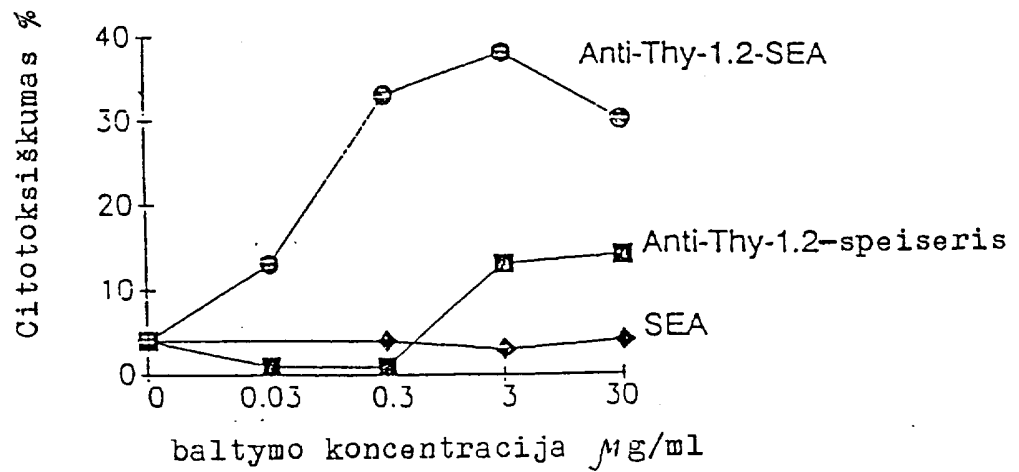


Fig.4