

1824/59

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A 7

3710
69785

SZÓJAPROTEINEK VAGY -HIDROLIZÁTUMOK GYÓGYÁSZATI KÉSZÍTMÉ-
NYEKBEN BIOAKTÍV PEPTIDEK ENZIMATIKUS INAKTIVÁLÁS ELLENI
VÉDELMÉRE

Pfizer Inc., New York, Amerikai Egyesült Államok

Kivonat

A találmány proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagok biológiai értékesülésének a növelésére vonatkozik olyan megoldással, hogy a gyógyászati hatóanyagot egy védőanyaggal kombinálva adagolják. E védőanyag például fehérje, tisztított, természetes eredetű fehérje, frakcionált molekulatömegű vagy parciálisan hidrolizált fehérje lehet.

A találmányban proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagokként például kalcitonint, növekedési hormont, gonadotrop hormont, gasztrint, gonadotropint, leuprolidot, enkefalint, kolecisztokinint, interleukint, interferont, terlakirént vagy inzulint alkalmaznak.

A találmány szerinti védőanyagok védelmet nyújtanak például tripszin, kimotripszin, elasztáz, karboxipeptidáz, aminopeptidáz enzimek hidrolizáló hatásával szemben, és ezen az úton növelik a gyógyászati hatóanyagok - például a fentebb felsorolt hatóanyagok - felszívódott hányadának biológiai értékesülését.

*adva a...
Lud*

1824/94

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



"A"

Képviseelő:

Danubia Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Budapest

SZÓJAPROTEINEK VAGY -HIDROLIZÁTUMOK GYÓGYÁSZATI KÉSZÍTMÉ-
NYEKBEN BIOAKTÍV PEPTIDEK ENZIMATIKUS INAKTIVÁLÁS ELLENI
VÉDELME

Pfizer Inc., New York, Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók:

AMIDON Gordon L., Ann Arbor

LEESMAN Glen D., Ann Arbor

SINKO Patrick J., Oakland

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1992. 11. 09.

Elsőbbsége: 1991. 12. 18. (810 593), Amerikai

Egyesült Államok

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US92/09336

A nemzetközi közrebocsátás száma: WO 93/11799

Aktaszámunk: 79522-4185A-fa

Ügyintézőnk: dr. Palágyi

A találmány gyógyászati készítményekre, valamint proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagok biológiai értékesülésének ("bioavailability"-jének) a növelésére vonatkozik olyan módon, hogy a gyógyászati hatóanyagot egy védőszerrel kombinálva adagoljuk, amely fehérjét, tisztított, természetes eredetű fehérjét, molekulatömeg szempontjából frakcionált fehérjét vagy parciálisan hidrolizált fehérjét tartalmaz.

A peptid jellegű, valamint a peptidáz enzimmel szemben labilis kötést tartalmazó gyógyszerhatóanyagok a modern idők legígéretesebb terápiás hatóanyagai közé tartoznak; proteolitikus enzimek jelenlétében a gyomor-bélcsatornában és más nyálkahártyákban lévő proteolitikus enzimekkel szemben mutatott instabilitásuk azonban általában parenterális adagolást igényel. Jóllehet a betegek képesek megtanulni a parenterális befecskendezést, régóta fennáll az igény a peptid természetű hatóanyagok adagolására nem invazív módszerrel.

A proteáz-gátló és az áthatolást elősegítő hatóanyagokról úgy tartják, hogy megkerülik a peptid és fehérje felszívódásának nyálkahártyán végzett adagolás utáni enzimátikus és áthatolási akadályait. Az ilyen akadályok következtében a peptid- és a fehérje-jellegű hatóanyagok nyálkahártyán történő adagolás után biológiailag csak kevéssé értékesülnek.

A peptid hatóanyagok nem parenterális adagolása különösen gyakran eredményez igen csekély biológiai értékesülést, mert a proteolitikus enzimek a peptideket hidrolizálják. A leuprolid esetében például orális adagolás után a biológiai értékesülés 0,05%, de ez egészen 38%-ig terjed, ha hüvelyen

át adagolják; inzulin esetében ez a két érték 0,05%, illetve 18% [Lee: J. of Controlled Release 13, 213 (1990)].

A proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagokat inaktiváló proteolitikus enzim például a pepszin, a tripszin, a kimotripszin, az elasztáz és a vékonybél lumenében lévő karboxipeptidáz; valamint a gyomor-bélrendszer (röviden: GI csatorna), az orr és a hüvely nyálkahártyájának felületén elhelyezkedő aminorpeptidázok.

Intakt oligopeptidek transzportját kimutatták érett emlősök éhbelén (jejunumán) át mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között, peptidáz-gátlókkal kombináltan is [Friedman és Amidon: Pharmaceutical Research 8, 93 (1991)].

Fujii és munkatársai a 4 639 435 számú, 1987-ben engedélyezett egyesült államokbeli szabadalmi leírásban igénylik az 1-izopropil-4-[4-(1,2,3,4-tetrahidronaftoil-oxi)-benzoil]-piperazin metánszulfonát alkalmazását kimotripsint gátló anyagként, amelyet orálisan vagy rektálisan kimotripsinnel szemben labilis hatóanyaggal (kallikreinnel vagy kalcitoninnal) együtt adagolnak. E leírásban közlik továbbá benzoil-piperazin-észterek alkalmazását ugyanerre a célra. E leírás nem ismerteti ezen inhibitorok hatásmechanizmusát.

Cho és Flynn a WO-90/03164 (1990) számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben ismertetik proteáz-gátlók alkalmazását orális gyógyszerformában, azonban nem közlik részletesen az ilyen gátlás jellegét; a bejelentés példái között az aprotinin az egyetlen proteáz-gátló hatású vegyület.

Kidron és munkatársai a 4 579 730 számú, egyesült álla-

mokbeli szabadalmi leírásban (1986) ismertetik proteáz-gátlók alkalmazását inzulin orális gyógyszerformájában. Közlük, hogy a szójaliszt a szójababból származó tripszin-gátló anyag forrása (Bowman-Birk-féle tripszin/kimotripszin-gátló, molekulatömege 8000 dalton).

Ziv és munkatársai [Biochem. Pharmacol. 36, 1035-1039 (1987)] ismertetik az aprotinin mint proteáz-gátló alkalmazását fehérjék orális felszívódásának a növelésére.

Losse és munkatársai a DD 252 539 A1 (1987) számú Német Demokratikus Köztársaság-beli szabadalmi leírásban leírják az ϵ -amino-kapronsav és aprotinin-proteáz-gátló hatóanyagok alkalmazását peptidek orális gyógyszerformáinak a kialakításában.

J. Lee [Controlled Release 13, 213-223 (1990)] áttekintheti a proteáz-gátlók használatát peptidek orális, nazális, bukkális, rektális, vaginális, tüdőn át és más úton végzett adagolásra szánt gyógyszerformák kialakításában.

Kimutatták, hogy egyes kis tagszámú peptidek - négy aminosavig bezárólag - növelik peptid jellegű hatóanyagok biológiai értékesülését.

Hussain és munkatársai [Biochemical and Biophysical Research Communications 133, 923 (1985)] valószínűsítik, hogy peptidek orrnyálkahártyán át végzett adagolásának fontos szerepe lehet azzal a feltétellel, hogy az orrnyálkahártyában jelenlévő peptidázok farmakológiailag hatástalan peptidáz-szubsztrátumok együttes (egyidejű) adagolásával átmenetileg gátolhatók.

Faraj és munkatársai [J. of Pharmaceutical Sciences 79,

698 (1990)] kimutatták, hogy kisméretű peptidek - így az L-tirozil-L-tirozin és a tri-L-tirozin-metil-észter - jelenlétében a leucin-enkefalin hidrolízise mérséklődik, valószínűleg azért, mert a kis peptidek az orrnyálkahártyán jelenlévő peptidázokat kompetitíven gátolják.

Friedman és Amidon fentebb idézett közleményükben igazolják, hogy az YGG tripeptid enkefalinnal (YGGFL) egyidejű perfúziója következtében az YGGFL felszívódása fokozódik a perfúciónak alávetett patkánybélben.

Hori és munkatársai [J. Pharm. Sci. 72, 435-439 (1983)] közölték, hogy különböző, aminocsoportjukon védett peptidek szubkután befecskendezés után az inzulint megvédik a bomlástól. Peptidekként a (benzil-oxi-karbonil)-Gly-Pro-Leu-Gly, (benzil-oxi-karbonil)-Gly-Pro-Leu, (dinitro-fenil)-Pro-Leu-Gly és (benzil-oxi-karbonil)-Gly-Pro védett peptideket alkalmazták.

Számos közleményben ismertetik növényi fehérjék enzimes kezelését. John R. Turner a régebbi, 2 489 208 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban egy pepszinnel módosított habosító komponenst ismertet. A glicinint valamilyen alkálikus anyaggal, például nátrium-szulfittal, nátrium-karbonáttal vagy nátrium-hidroxiddal 6,4-6,8 pH-értéken extrahálják, majd a kivonatból a glicinint - például 4,2-4,6 pH mellett - az izoelektromos pH-értéken kicsapják (beállítás céljára kén-dioxid mint sav használható). Az így kicsapott glicininterméket azután pepszinnel módosítják olyan hőmérsékleti és pH körülmények között, amelyek a fehérje hidrolíziséhez vezetnek. A glicinint pepszinnel addig

hidrolizálják, amíg vízoldékonysága 40-50%-ra nem növekszik. Sair és munkatársai a 2 502 482 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban szintén ismertetik a glicinin enzimatisz módosítását pepszinnel; olyan izolátumot kapnak, amelyben a pepszinnel módosított izolátumnak legalább 60 tömeg%-a 5,0 pH-érték mellett vízben oldható.

Puski ismerteti szójaizolátumok (4,5 pH-n lecsapott termék) enzimés módosítását *Aspergillus oryzae*-val ["Szója-fehérjék funkcionális sajátságainak módosítása proteolitikus enzimés kezeléssel" (angolul); *Cereal Chem.* 52, 655-665 (1975)].

Számos közleményben számolnak be konyhasóoldatok alkalmazásáról szójafehérjék kivonására. A. K. Smith és munkatársai [*J. Am. Chem. Soc.* 60, 1316-1320 (1938)] közlik, hogy szójaliszt extrakciója vízzel 6,7 pH-értéken több fehérjét eredményez, mint amikor az extrakciót neutrális sókat tartalmazó vízzel hajtják végre.

Petit a 4 131 607 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban kétlépéses alkálikus extrakciót ismertet. Az első extrakciót nátrium-szulfít és magnézium-só jelenlétében 7,0-8,5 pH-értéken végzik, majd a pH értékét 10,0-10,5-re növelik az extrakció teljessége céljából. Ezt követően a fehérjekivonatokat kicsapják vagy alvasztják úgy, hogy a kivonat pH-értékét 4,5-5,5-re állítják. Martinez és munkatársai a 3 579 496 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásban szintén több lépésből álló oldószeres extrakciós eljárást ismertetnek.

Azt találtuk, hogy fehérjék, peptidek, tisztított, ter-

mészetes eredetű fehérjék, valamint szűrt, oldószerrel extrahált, molekulatömeg szempontjából frakcionált vagy parciálisan hidrolizált fehérjék - az alábbiakban e fehérjéket védőszereknek nevezzük - növelik olyan, proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagok orális, nazális, rektális és vaginális adagolás utáni biológiai értékesülését, amelyek a védőszerek hiányában orális, nazális, rektális vagy vaginális adagolás után enzimes behatásra hatástalanokká válnának.

A találmány tárgya olyan gyógyászati készítmény, amely egy védőanyagot és egy proteolízissel szemben labilis (proteolítikusan érzékeny) gyógyászati hatóanyag gyógyászati szempontból hatásos mennyiségét tartalmazza, azzal a megkötéssel, hogy ha a védőanyag szójaliszt, akkor a gyógyászati hatóanyag az inzulintól eltérő.

A találmány továbbá módszert biztosít proteolítikusan érzékeny gyógyászati hatóanyagok biológiai értékesülésének a növelésére emlős állatokban vagy más állatokban, amelyek az adott gyógyászati hatóanyagot igénylik; ez a módszer abban áll, hogy a gyógyászati hatóanyagot egy védőanyag biológiai értékesülést növelő mennyiségével kombinálva adagoljuk, azzal a megkötéssel, hogy ha a védőanyag szójaliszt, akkor a gyógyászati hatóanyag az inzulintól eltérő.

A találmány szerinti gyógyászati készítményben jelenlévő, proteolítikusan labilis gyógyászati hatóanyagok szerkezetükben peptidkötéseket tartalmaznak, vagy - különböző, az emésztőcsatornában vagy az orr vagy a hüvely nyálkahártyáján jelenlévő proteolítikus enzimek hatására - bomlás, denaturá-

lás vagy más folyamat következtében hatástalanná válnak. Ennek következtében, ha ezeket a gyógyászati hatóanyagokat orálisan, nazálisan, rektálisan vagy vaginálisan adagoljuk, akkor nem szívódnak fel, vagy terápiásan nem fejtik ki hatásaikat megfelelő mértékben.

Ilyen, proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagok például a peptidek: így a kalcitonin, a prolaktin, az adrenokortikotropin, a tiotropin, a növekedési hormon, a gonadotrop hormon, az oxitocin, a vazopresszin, a gasztrin, a tetragasztrin, a pentagasztrin, a glukagon, a szekretin, a pankreozimin, valamint a P anyag ("substance P") és a gonadotropin. A proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyag például a luteinizáló hormont felszabadító hormon, a leuprolid, az enkefalin, a tüszőstimuláló hormon, a kolekisztokinin, a timopentin, az endotelin, a neurotenzin, az interferon, az interleukinek, az inzulin és az inzulinotropin. További példaként említjük a terápiás hatású antitesteket, így a szeptikus sokk kezelésére alkalmazott antitesteket.

Proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagokként természetes eredetű, tisztított kivonatok és ezek kémiailag módosított változatai, valamint génsebészeti eljárással termelővé tett mikroorganizmusok vagy sejtek tenyésztésével kapott szövettenyészetből nyert termékek is alkalmazhatók. A proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyag szintetikus peptid vagy annak származéka is lehet, amilyen például a terlakiren (kémiailag N-[N-(4-morfolino-karbonil)-L-fenil-alanin-S-metil-cisztein]-2(R)-

-hidroxi-3(S)-amino-4-ciklohexil-butánsav-izopropil-észter; lásd a 4 814 342 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást).

A jelen találmány szerinti védőanyagok lehetnek kémiai úton szintetizált fehérjék és peptidek, természetes eredetű fehérjék, tisztított, természetes eredetű fehérjék, kémiai-lag módosított természetes fehérjék, parciálisan hidrolizált természetes fehérjék vagy olyan fehérjék, amelyek molekula-tömegük, polaritásuk vagy töltésük szerint frakcionáltak, vagy a fentiek keverékei. Előnyösek a természetes eredetű, élelmiszer minőségű fehérjék vagy a parciálisan hidrolizált, élelmiszer minőségű fehérjék. A védőanyag molekulatömegének 1000-nél nagyobb-nak kell lennie.

A védőanyag molekulatömeg szerinti frakcionálásának eljárásai különbözők lehetnek, és így a természetes eredetű fehérje bármely kívánt molekulatömegű frakciója megkapható. A fehérjéknek molekulatömegük, polaritásuk vagy töltésük szerinti elkülönítésére oldószeres extrakció alkalmazható. A fehérje enzim-es vagy kémiai hidrolízisét követheti a kívánt molekulatömegű frakció elkülönítése ultraszűrő vagy dializáló membránokon. A molekulatömeg szerinti frakcionálás gél-kromatográfiával vagy más módon is végezhető.

A fehérjék vagy peptidek hidrolízisét hőkezeléssel, hideg savval, brómciánnal vagy más kémiai eszközökkel végezhetjük.

Az enzim-es kezelés kivitelezhető egyetlen proteolítikus enzim-mel vagy - egyidejűleg vagy egymás után ható - különböző proteolítikus enzimek kombinációival. Sokféle proteolíti-

kus enzim alkalmazható, például - azonban korlátozás szándéka nélkül - tripszin, kimotripszin, elasztáz, karboxipeptidáz, aminopeptidáz, peptid és kollagenáz.

A találmány szerinti védőanyagok előállítására alkalmazható frakcionálás és enzimes kezelések a fehérjeanyagok széles körére alkalmazhatók. Előnyösen a természetben előforduló fehérjéket vagy állati vagy növényi eredetű fehérjéket alkalmazunk. Ilyen fehérje típusú kiinduló anyagok például - azonban korlátozás szándéka nélkül - a szójaliszt, a szójafehérje, a búza gluténje, a mandulapor, a mogorópor, a kazein és a halfehérje.

A korlátozás szándékát nélkülöző nézetünk szerint a találmány szerinti védőanyagok "önfeláldozó" proteáz-gátlókként hatnak, és így növelik az olyan gyógyászati hatóanyagok biológiai értékesülését, amelyek labilisak olyan proteázokkal szemben, amelyek orális, nazális, vaginális vagy rektális adagolás során képesek elbontani a gyógyászati hatóanyagokat. E védőanyagoknak a labilis gyógyászati hatóanyagokkal végzett együttes adagolása eredményeként (1) a védőanyagok kompetitív úton lefoglalják a lebontó proteázokat; (2) a gyógyászati hatóanyagok proteáz általi lebomlásának gátlása fokozza a felszívódást és a terápiás hatékonyságot, és (3) a védőanyagok metabolizálódnak és felszívódnak.

A fentebb javasolt hatásmechanizmussal kapcsolatban azt gondoljuk, hogy kívánatos a védőanyag oldódási sebességének és a proteolízissel szemben érzékeny gyógyászati hatóanyag oldódási sebességének a kiegyenlítése. Általában azt találtuk, hogy rövid idő alatt oldódó védőanyagok a kis molekula-

tömegű gyógyászati hatóanyagok esetében hatásosabbak; előnyös az 1000-nél nagyobb, de 100 000-nél kisebb, és különösen előnyös az 1000 és 30 000 közötti molekulatömegű peptidok alkalmazása.

A hatásos védőanyagfrakciónak összhangban kell lennie a proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyag labilitási jellemzőivel. Így olyan gyógyászati hatóanyag esetén, amely aminopeptidázzal szemben érzékeny, olyan védőanyagfrakció előnyös, amely gyorsan oldódik, és aminopeptidázzal szemben hatékony. Az aminopeptidázzal szemben érzékeny D-Ala-D-Leu-enkefalin (YdAGFdL) gyógyászati hatóanyag esetében a pepszinnel kezelt, dekantált szójaliszt 30 000-nél kisebb molekulatömegű frakciója az előnyös védőanyag, amint ezt a 15. példában bemutatjuk. Általában egy vagy több, a lumenben vagy a nyálkahártyában levő proteázokkal szemben proteolitikus hatásra labilis gyógyászati hatóanyag előnyös védőanyaga olyan anyag, amely a gyógyászati hatóanyag szisztémás értékesülését javítja, ha a védőanyagot gyakorlatilag teljes dózisban adagoljuk (amint ezt fentebb leírtuk). Egy adott, proteolízissel szemben érzékeny gyógyászati hatóanyag esetében az előnyös védőanyagfrakciókat az alábbiakban leírt dekantáló, szűrő, extrakciós, hidrolizáló és molekulaméretfrakcionáló eljárások útján kapjuk. Egy adott, proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyag esetében az előnyös védőanyagfrakciókat az alábbi példákban leírt *in vitro* és *in vivo* próbákkal azonosítjuk.

A jelen találmány szerinti gyógyászati készítményt egy ilyen kezelésre szoruló emlősnek vagy más állatnak előnyösen

bármely olyan formában adagolhatunk, amely a védőanyagnak és a proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagnak a bélben egymás melletti megmaradását biztosítja: így például tabletták, szemcsék vagy kapszulák alakjában úgy, hogy mindkét komponens külön-külön vagy kombináltan, bélben oldódó bevonatot visel. A készítmény rektális vagy vaginális úton is adagolható kúpok segítségével, amelyeket úgy állítunk elő, hogy mindkét komponenst egy általánosan használt végbélkúp-alapanyagba helyezzük. Hasonlóképpen a védőanyag és a proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyag együttesen adagolható nazális permet alakjában. Kívánt esetben ezekhez az adagolási formákhoz különböző, gyógyászati szempontból elfogadható adalékok, például hígítószeresek és emulgeálószeresek adhatók.

A proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyag adagja előnyösen 0,0001-1-szerese annak a dózisnak, amelyet a technika jelenlegi állása szerint orálisan adagolnak. A védőanyag mennyisége az adagolás módjától, valamint a gyógyászati hatóanyag labilitásától és adagjától függ. Orális, rektális és vaginális adagolás esetén a védőanyag adagja általában körülbelül 10-1500 mg. Orálisan adott oldatok vagy szuszpenziók esetében a védőanyagot körülbelül 10 mg-tól körülbelül 15 g-ig terjedő mennyiségben adagoljuk. Nazális adagolás során a védőanyag adagja általában kisebb, körülbelül 1 mg és 100 mg közötti tartományban van.

Több, bélben végbemenő felszívódásra szánt, találmány szerinti gyógyászati készítmény hatékonyságát értékeltük ki; e vizsgálataink eredményeit alább ismertetjük.

A találmányt az alábbi, nem korlátozó jellegű példákban részletesen ismertetjük.

1. példa

Kereskedelmi fehérjék és lisztek feldolgozása; frakcionálás szolubilizálás útján; szójaliszt vizsgálata

4,5 g szójalisztet (a Sigma Chem. Co. cég terméke) 135 ml 0,01 mólos, 7,5 pH-értékű foszfát-pufferoldatban 15 ml 0,05%-os timeroszállal 15 percig keverünk, utána 10 percig ultrahanggal kezeljük, majd 25 órán át szobahőmérsékleten keverjük. Ezt követően a keveréket ülepedni hagyjuk, majd a felülúszót leszívjuk, centrifugáljuk és szűrjük. Így egy közvetlenül oldható frakciót kapunk, amelyet elkülönítünk és felhasználunk, vagy további feldolgozásnak vetjük alá.

2. példa

Kereskedelmi fehérjék és lisztek feldolgozása; frakcionálás molekulatömeg szerint szolubilizálás és dialízis útján; szójaliszt vizsgálata

Az 1. példában leírt eljárást követve szójalisztből dekantált és szűrt oldatot állítunk elő, amelyet az alábbiak szerint molekulatömeg (MW) megoszlattással dolgozunk fel. A szolubilizált frakciót 55 °C hőmérsékleten vákuumkemencében szárazra pároljuk. A párlási maradékot vízben oldjuk, és 1000 alsó molekulatömeg-mérethatárú dializáló csőben vízzel szemben 24 órán át dializáljuk, miközben a dializáló közeget időnként frissítjük. A visszamaradó elegyet bepárolva 1,17 g 1000-nél nagyobb molekulatömegű, szolubilizált szójaliszt-

frakciót kapunk.

3. példa

Kereskedelmi fehérjék és lisztek feldolgozása; a molekulatömeg frakcionálása szolubilizálással és ultraszűrés (UF) útján; az 1 kD - 30 kD és 30 kD - 100 kD molekulatömegű frakció

288 g kereskedelmi szójalisztet (a Sigma-cég S-9633 tételszámú terméke) keverés közben 8640 ml 0,01 mólus, 7,5 pH-értékű foszfát-pufferoldat és 1920 ml 0,1%-os timeroszál-oldat elegyéhez adunk. A szuszpenziót mágneses keverővel még 15 percig keverjük, utána az elegyet 10 percig ultrahanggal kezeljük, majd szobahőmérsékleten 24 órán át keverjük. Ezt követően az oldatot 1 órán át 2500-3000 fordulat/perc (rpm) sebességgel centrifugáljuk. A felülúszó folyadékot ultraszűréssel, 100 kD névleges molekulatömeg-mérethatárú Pellicon-membrán (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) alkalmazásával elkülönítjük. A visszamaradó részt (>100 kD) elvetjük, az áthaladó részt (<100 kD) 30 kD névleges molekulatömeg-mérethatárú Pellicon-membrán alkalmazásával elkülönítjük. A második (30 kD - 100 kD) frakciót megőrizzük, és a harmadik áthaladó részt (<1 kD) elvetjük. Az 1 kD - 30 kD frakciót liofilizáljuk, a 30 kD - 100 kD frakciót vákuumszekrényben megszárítjuk. Az 1 kD - 30 kD frakció hozama 7,33 g, a kiinduló anyagként használt szójalisztre számítva 2,5%. A 30 kD - 100 kD frakció hozama 5,25 g, azaz a kiinduló szójalisztre vonatkoztatva 1,8 %.

4. példa

Kereskedelmi fehérjék és lisztek feldolgozása; hidrolízis pepszinnel és a molekulatömeg frakcionálása dialízissel; szójaliszt vizsgálata

A szójalisztet pepszin alkalmazásával alacsonyabb molekulatömegű fragmentumokká hidrolizáljuk, majd a hidrolizátumot - az alábbi eljárás szerint - 1000-3500, 3500-6/8 kD és 6/8 kD - 12/14 kD molekulatömegfrakciókra bontjuk.

5,4 g szójalisztet (a Sigma Chemical Co. cég S-99633 tételszámú terméke) és (végkoncentrációban 50 ppm) timero-szált 180 ml olyan oldathoz adunk, amelynek pH-értéke 1,9 és mind kálium-kloridra, mind sósavra nézve 0,2 N koncentrációjú. Az elegyet 30 percig keverjük, majd 18,0 mg pepszint (a Sigma-cég P-6887 tételszámú terméke) adunk hozzá. Kilenc darab 12 000 - 14 000 molekulatömeg-mérethatárú Spectrum dializáló csőbe csövenként 20 ml fenti oldatot adagolunk, és 37 °C hőmérsékleten 55 ml 1,9 pH-értékű kálium-klorid pufferoldattal szemben rázás közben dializáljuk. A pufferoldatot 2 óra és 6 óra eltelte után cseréljük, és a dialízist 24 órán át folytatjuk. Az áthaladó részt időről időre összegyűjtjük és vákuumkemencében 55 °C hőmérsékleten bepároljuk.

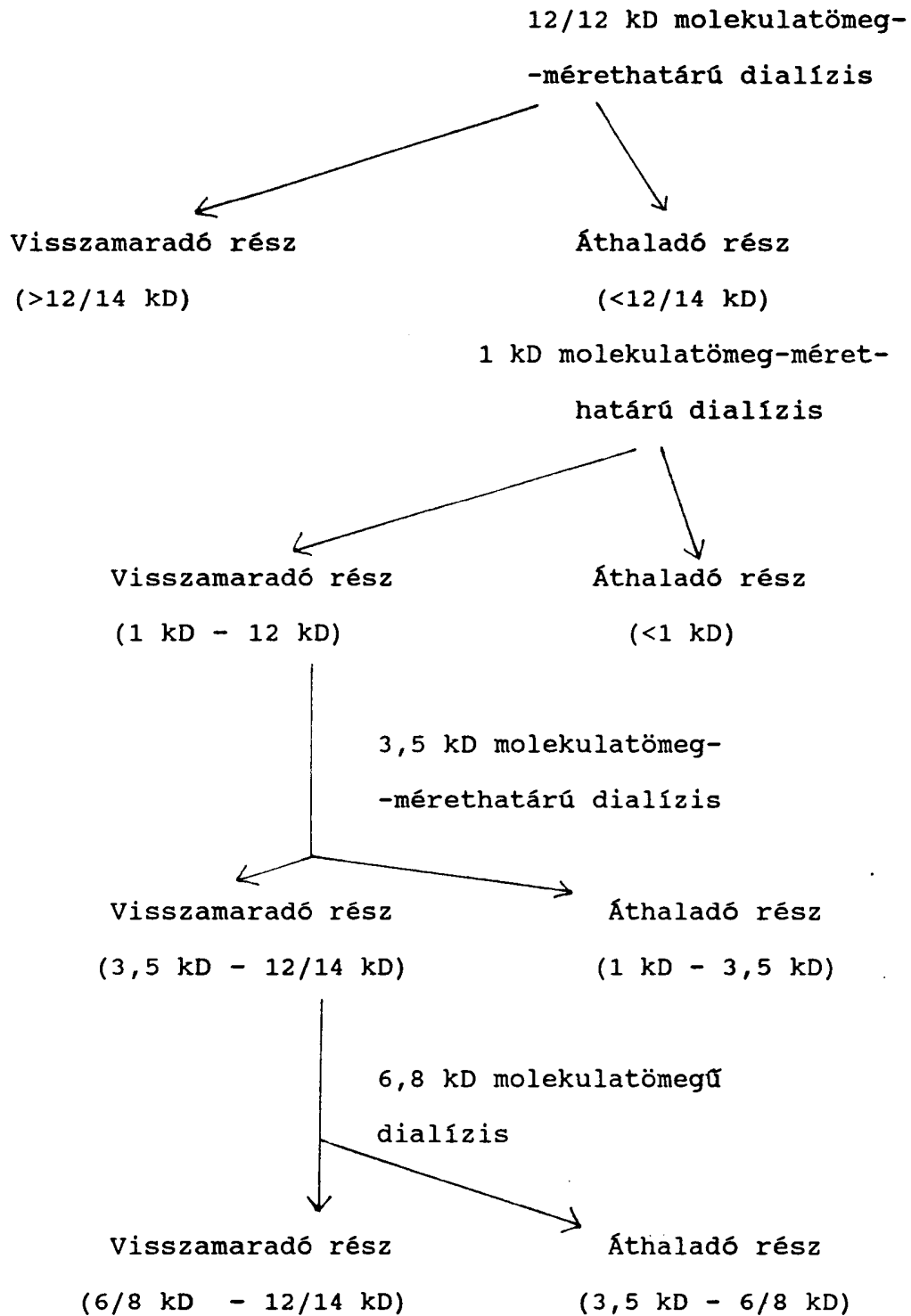
A 2, 6 és 24 órás időszakból származó mintákat 1000 molekulatömeg-mérethatárú csőbe helyezzük, és vízzel szemben dializáljuk. A visszamaradó részt (1 kD - 12/14 kD) 55 °C hőmérsékleten vákuumkemencében bepárolva összesen 449,5 mg terméket kapunk; ebből 418 mg-ot 30 ml ionmentesített vízben oldunk, és két, 3500 molekulatömeg-mérethatárú dializáló csőbe helyezzük, majd 55 ml vízzel szemben szobahőmérsékle-

ten 24 órán át dializáljuk. A dialízis 2., 6. és 24. órája után a vizet cseréljük; az áthaladó részeket (1 kD - 3,5 kD) egyesítjük és 55 °C hőmérsékleten vákuumkemencében bepároljuk.

A visszamaradó részt minden egyes csőből egy 6000/8000 molekulatömeg-mérethatárú csőbe külön-külön elhelyezzük és a fentiek szerint kezeljük. Az áthaladó részek bepárlásával 3500 - 6000/8000 molekulatömeg-tartományú fragmentumokat kapunk. A visszamaradó részeket - amelyek a 6000/8000-12 000/14 000 molekulatömeg-tartományú frakciót képviselik - szintén egyesítjük és bepároljuk. A fentebb leírt frakcionálási eljárást az I. vázlat szemlélteti.

I. vázlat

Pepszinnel kezelt szójaliszt



5. példa

Fehérjék és lisztek feldolgozása: kezelés immobilizált pepszinnel

Szójalisztet (a Sigma Chemical Co. cég S-9633 tétel-számú terméke) az 1. példa szerint feldolgozunk és szárítunk. Az így kapott anyagot 30 kD molekulatömeg-mérethatárú membránon ultraszűrésnek vetjük alá. A fennmaradó részt (>30 kD) összegyűjtjük és szárítjuk. E termékből 13,8 g-ot 900 ml vízben oldunk, a pH értékét 0,1 N sósavval 2,0-ra állítjuk, és 1,19 g immobilizált pepszint adunk hozzá (e célra 4%-os térhálósított, gyöngyformájú agarózon immobilizált pepszint alkalmazunk 40 egység/mg mennyiségben; e pepszin a Sigma Chemical Co. cég P-3286 tételszámú terméke). Az így kapott szuszpenziót 37 °C hőmérsékleten tartjuk, és három 30 kD molekulatömeg-mérethatárú membránon ultraszűrésnek vetjük alá. Az áthaladó részt (>30 kD) 15 perces időközökben összegyűjtjük és liofilizáljuk. A visszamaradó részt (>30 kD) az ultraszűrő feldolgozással reciklizáljuk. A pepszines hidrolízis termékei az áthaladó részben vannak jelen. Az I. táblázatban megadjuk minden egyes áthaladó frakció térfogatát, valamint az egyes szárított frakciókban lévő hidrolizált peptid tömegét.

I. táblázat

Az 5. példában leírt módon, pepszines hidrolízissel kapott peptidek hozama

A gyűjtés időtartama (perc)	Térfogat (ml)	Az összegyűjtött tömeg (mg)
15	600	361,1
30	300	385,0
45	300	341,5
60	300	361,3
75	275	403,2
90	350	390,1
105	500	557,8
120	600	410,5
135	550	261,6

6. példa

Kereskedelmi fehérjék és lisztek feldolgozása: hidrolízis szekvenciális enzimmal végzett kezelés útján; tripszin és elasztáz alkalmazása; szójaliszt vizsgálata

600 mg szójalisztet 20 ml 0,01 mólus, 7,5 pH-értékű, 50 ppm timeroszált tartalmazó kálium-foszfát-pufferoldatban diszpergálunk, majd 2 mg tripszint adunk hozzá. Az így kapott elegyet 12/14 kD molekulatömeg-mérethatárú dializáló csőbe helyezzük és 50 ml pufferoldattal szemben 37 °C hőmérsékleten vízfürdőn rázás közben dializáljuk. A pufferoldatot 2, majd 6 óra múlva cseréljük, és a dialízist 24 órán át végezzük. A 6. óra után a használt pufferoldathoz 50 ppm time-

roszált adunk. Az eljárást három párhuzamos próbával végezzük.

Mindhárom próba dialízisének 2, 6 és 24 óra alatt áthaladó részét egyesítjük, 280 nm hullámhosszon meghatározzuk az abszorbanciát, majd a mintákat 55 °C hőmérsékleten vákuumkemocéban bepároljuk. A három bepárlási maradékot egyenként 20 ml ionmentesített, 50 ppm timeroszált tartalmazó vízben ismét feloldjuk.

Mindegyik mintához 2,0 mg elasztázt adunk (0,182 ml elasztázoldat, 11 mg fehérje/ml), és a mintákat 12/14 kD molekulatömeg-mérethatárú dializáló csőbe téve a pufferoldattal szemben dializáljuk. A pufferoldatot 6 óra múlva cseréljük, és a dialízist 24 órán át folytatjuk. 280 nm hullámhosszon meghatározzuk az abszorbanciát, és az áthaladó részeket a fentiek szerint bepároljuk.

Az így kapott terméket szekvenciálisan tripszinnel, majd elasztázzal kezelt szójának nevezzük, molekulatömege kisebb 12/14 kD-nál.

7. példa

Orális úton adagolt terlakirén felszívódásának növelése kutyákon védőszerek segítségével

A renin-antagonista hatású terlakirén tripeptidet (200 mg szilárd, kristályos, poralakú hatóanyag keményszelatin-kapszulás formában) 1 g vizsgálandó gátló anyag 150 ml vízzel készült vizes szuszpenziójával együttesen adagoljuk négy éheztetett vadásztacskónak. A tripeptid szérumkoncentrációját az adagolás után hat időpontban, azaz az adagolás után

15 és 30 perccel, majd 1, 2, 3 és 4 órával mértük. Minden egyes vizsgálatunkhoz 4 éheztetett kutyát használtunk, az állatok az előző héten saját kontrolljaikat képviselték. A szérumot n-butil-kloriddal extraháltuk, majd vizes kimotripszin-oldattal inkubáltuk. Fluoreszkaminnal végzett származékképzés után mértük a bomlásterméket. Fluoreszcencia-detektorként Kratos Spectroflow 280 eszközt és Waters Novapak C-18 oszlopot használtunk. Az emissziós hullámhossz 380 nm. Mozgó fázisként víz és acetonitril 75:25 arányú elegyét alkalmaztuk 1,0 ml/perc áramlási sebességgel. A kimutatási határt 10 µg/ml-nek találtuk. Minden egyes kutya esetében a trapezoid szabály alkalmazásával a koncentráció idő szerinti függvényének 0-4 órás görbe alatti területét számítottuk ki.

A II. táblázatból látható, hogy a kereskedelmi forgalomból beszerezhető szójafehérje (a Protein Technologies Inc. PP 620 jelű terméke), valamint a feldolgozott szójaliszt (amelyet a 3. példa szerint állítottunk elő) 1-30 kD tartományú frakciója növeli az orálisan adagolt terlakirén (egy kimotripszinre érzékeny gyógyászati hatóanyag) biológiai értékesülését.

II. táblázat

A plazmakoncentráció idő szerinti függvényeként ábrázolt
görbe alatti terület (AUC) kutyákon
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{óra}/\text{ml}$)

Készítmény	A kutya számjele				
	34112	34101	04132	04094	Átlag
PP620 (1-30 kD)	0,863	0,436	0,117	0,417	0,458
Szója	0,420	0,320	0,078	0,326	0,286
Kontroll	0,043	0,026	0,022	0,106	0,049
PP620/kontroll arány	20,1	16,8	5,3	3,9	11,5
Szója (1-30 kD) / /kontroll arány	9,8	12,3	3,5	3,1	7,2

8. példa

A terlakirén védelme a kimotripszin-okozta bomlás ellen: *in vitro* vizsgálati módszer

Különböző fehérjék és feldolgozási termékeik terlakirén kimotripszin-előidézte bomlásával szemben mutatott *in vitro* gátló hatékonyságának a kiértékelésére az alábbi standard eljárást alkalmaztuk.

Vizsgálati oldatokat készítettünk alfa-kimotripszinből ($0,67 \times 10^{-7}$ M), terlekirénből (0,065 mM) és a vizsgálandó gátló anyagból (körülbelül 0,1 mg/ml-től 0,5 mg/ml-ig terjedő koncentrációban) 6,5 pH-értékű, 0,10 M citromsavat és 0,20 M dinátrium-hidrogén-foszfátot tartalmazó pufferoldatban úgy, hogy a pufferoldat végső koncentrációja 300 mOsm-nak felelt meg; ezeket az oldatokat 37 °C hőmérsékleten in-

kubáltuk. A zérus-időpontban, majd 5 perces időközökben mintákat vettünk, és ezeket sósav hozzáadásával 2,0-s pH-ra állítottuk a HPLC elemzés végrehajtásához. A terlakirén HPLC elemzését Waters Resolve 5u C-18 oszlopon végeztük. Mozgó fázisként víz és acetonitril 50:50 arányú keverékét használtuk, melyhez literenként 1 ml foszforsavat adtunk. Az adatokat a terlakirén bomlása gátlásának százalékos értékében fejeztük ki a zérus-időponthoz mint kontrollértékhez viszonyítva. A számítást az alábbi egyenlet alapján végeztük:

$$\text{Gátlás \%} = 100 \times [1 - k_{inh}/k_c]$$

ahol k_{inh} a terlakirén kezdeti bomlásának sebessége védőszer jelenlétében és k_c a terlakirén kezdeti bomlási sebessége védőszer nélkül.

A gátlás %-os értékeit dekantált, ultraszűrt szójaliszt 1 kD - 30 kD frakcióján határoztuk meg. Az eredmények a III. táblázatban láthatók.

III. táblázat

A terlakirén kimotripszinnel katalizált bomlásának gátlása dekantált, ultraszűrt szójaliszt 1-30 kD frakciójával

A gátló anyag koncentrációja (mg/l)	A gátló anyag koncentrációja* (mg fehérje/ml)	Gátlás %
0,5	0,04905	75,4
0,25	0,02453	79,8
0,1	0,00981	21,5
0,05	0,00491	29,3
0,01	0,00098	4,8

* A fehérjetartalomra korrigált érték

9. példa

A terlakirén α -kimotripszinnel katalizált hidrolízise:
módszer a gátló anyagok K_i értékeinek meghatározására

A K_i érték, definíció szerint a gátlás Michaelis-Menton állandója, konvencionális mértéke a gátló anyag affinitásának az aktív hely iránt, és így az enzimgátló hatékonyság mértéke. A K_i meghatározása elvégezhető az inhibitor több koncentrációjával kapott, kezdeti bomlási sebességi adatokból azonos szubsztrátum- és enzimkoncentráció mellett. A kezdeti sebességeket a terlakirén percenként elbomló millimóljainak számával fejezzük ki, amint ez a IV. táblázatból kitűnik.

IV. táblázat

A terlakirén kimotripszin-katalizálta bomlásának gátlása dekantált, ultraszűrt szójaliszt 1 kD - 30 kD frakciójával

A gátló anyag koncentrációja (mg/l)	A gátló anyag koncentrációja** (mg fehérje/ml)	k^* (mmol/perc)
0,5	0,04905	$1,93 \times 10^{-4}$
0,25	0,02453	$1,59 \times 10^{-4}$
0,1	0,00981	$6,17 \times 10^{-4}$
0,05	0,00491	$5,56 \times 10^{-4}$
0,01	0,00098	$7,48 \times 10^{-4}$
Halmozott kontrollérték		$7,86 \times 10^{-4}$

- * A terlakirén kezdeti bomlási sebességének csökkenése
- ** A fehérjetartalomra korrigált érték

Egy másik módon a K_i értéke a gátló anyag egyetlen koncentrációjára is meghatározható (egy pontos K_i érték) a kompetitív gátlásra érvényes standard Michaelis-Menton egyenlet felhasználásával. A K_i értéke több koncentrációra (több pontos K_i) meghatározható ugyanazon összefüggés alkalmazásával úgy, hogy a nemlineáris regressziós analízisből származó adatokat vezetjük be az egyenletbe.

10. példa

Az oldódási idő a találmány szerinti védőszerek teljesítményének lényeges tényezője. E leírásunkban oldódási időnek nevezzük azt az időt, amely a vizsgálandó szilárd anyag 0,5 mg/ml koncentrációjú szuszpenziójának teljes oldódásához szükséges 7-es pH-értékű, 0,1 mól koncentrációban citromsavat, 0,2 mól koncentrációban dinátrium-hidrogén-foszfátot tartalmazó pufferoldatban, szobahőmérsékleten, 8 fordulat/perc keverési sebesség mellett. A teljes oldódás végpontját vizuálisan határoztuk meg.

11. példa

Meghatároztuk különböző anyagok - mint védőanyagok - fehérjetartalmának százalékos értékét. A szén, hidrogén és nitrogén koncentrációját a mintában 2400 típusú Perkin-Elmer C, H, N elemanalizáló eszközzel határoztuk meg. Körülbelül 2 mg mintát pontosan bemértünk és az elemző készülékbe helyeztük. A minta százalékban kifejezett nitrogéntartalmát 6,25-

tel szorozva kaptuk a fehérje becsült tartalmát (%-ban).

12. példa

Meghatároztuk számos kereskedelmi és feldolgozott fehérjefrakció gátló hatását a terlakirén kimotripszin-okozta bomlására. A szójalisztet a Sigma Chem. Co. cégtől, a mandula- és mogyorólisztet a Pert Labs Intézménytől, a búza-sikért a Total Foods Corp. cégtől szereztük be.

A Sigma Chemical Co. cégtől kapott szójaliszt pörköletlen, tehát tartalmazza a Bowman-Birk-féle, tripszint és kimotripszint hatásosan gátló anyagot, amelynek molekulatömege 8000.

A Protein Technologies, Inc. cégtől származó szójafehérje (PP620 tételszámú termék) hővel kezelt készítmény, amelyben a Bowman-Birk-féle tripszin/kimotripszin gátló anyag inaktivált. A gátlás százalékos értékét a 8. példában leírt módon határoztuk meg. Az V. táblázatból látható, hogy a vizsgált védőanyagfrakciók csökkentik a terlakirén (egy kimotripszinre érzékeny renin-gátló hatóanyag) kimotripszin-katalizálta bomlását.

V. táblázat

A terlakirén bomlásának gátlása kereskedelmi és feldolgozott fehérjékkel (0,5 mg/ml) in vitro körülmények között

Anyagforrás és leírása	A gátlás %-a (a 8. példa szerint)
1. Pepszinnel kezelt, dializált szójaliszt (>1 kD)	87
2. Pepszinnel kezelt, frakcionált szójaliszt (4. példa) Molekulatömeg: 1000-3500	24,0
3500-6/8 kD	46,6
6/8K-12/14 kD	85,1
3. Szójaliszt	69,9
4. Dekantált, ultraszűrt szójaliszt 1 kD - 30 kD	75,4 és 93,3 (két készítmény)
30 kD - 100 kD	75,4 és 86,8 (két készítmény)
5. Dialízissel kapott szójaliszt, molekulatömege >1000	97,6
6. Búzasikér, dekantált, ultraszűrt, molekulatömege 1 kD - 30 kD	95,8
7. Búzasikér	76,8
8. Dekantált, ultraszűrtogyoróliszt, molekulatömege 1 kD - 30 kD	28,6
9. Dekantált, ultraszűrt mandulaliszt, molekulatömege 1 kD - 30 kD	37,6
10. Szójafehérje (Protein Techn., Inc.)	86,0

13. példa

Különböző, kereskedelmi forgalomban lévő fehérjetermékek és feldolgozott fehérjefrakciók esetében meghatároztuk a fehérje százalékos tartalmát, az oldódási időt és a K_i állandót (amint ezt a fenti 11., 10., illetve 9. példában leírtuk). Ezeket az adatokat a VI. táblázatban összegeztük. Az eredmények azt mutatják, hogy olyan bomláscsökkentő frakciók állíthatók elő, amelyek K_i állandója csekély és oldódási idejük is rövid.

A Sigma Chemical Co. cégtől származó szójaliszt pörköletlen, és így 8000 molekulatömegű aktív Bowman-Birk-féle tripszin/kimotripszin-gátló anyagot tartalmaz.

VI. táblázat

Jellegzetes, kereskedeli forgalomban lévő, valamint feldolgozott fehérjék oldódási sebessége és gátlási állandója

Az anyag forrása és leírása	Fehérje %	Oldódási idő	K_i mért értéke
A. Kereskedelmi fehérjék és lisztek:			
1. Kazein (Sigma C-5890)	87,94	>4 nap	0,240*
2. Szójaliszt	51,69	>4 nap	0,18*
3. Búzasikér	78,81	>4 nap	0,091*
B. Ultraszűrt (1 kD - - 30 kD) anyagok:			
1. Szójaliszt	9,81	0,1 perc	0,00765
2. Mandulaliszt	10,37	2,3 perc	0,0618*
3. Kazein	71,31	1,8 perc	-

VI. táblázat folytatása

Az anyag forrása és leírása	Fehérje %	Oldódási idő	K _i mért értéke
4. Mogyoróliszt	13,19	3,1 perc	0,120*
5. Búzasikér	37,81	3,8 perc	0,0060*
C. Ultraszűrt (30 kD - - 100 kD) anyagok:			
1. Szójaliszt	44,44	2,6 perc	0,0029
D. Dialízis, >1 kD			
1. Szójaliszt	76,5	>4 nap	0,010
E. Ultraszűrt, pepszinnel kevert (<30 kD) anyagok			
1. Szójaliszt (16. példa)	80,1	0,1 perc	0,0094

* Egy pontos K_i meghatározással (a gátló anyag koncentrációja 0,5 mg/ml)

14. példa

Nyúlbel-bolyhok határán elhelyezkedő membránhólyagocskák ("brush border membrane vesicles", röviden BBMV): a kolecisztokinin-8 (CCK-8) enzimes lebomlásának gátlása szójafehérje-frakciókkal

Patkány-éhbél-bolyhok határszéli membránhólyagocskáit (BBMV) Kessler és munkatársai módszerével kipreparáltuk [Biochem. Biophys. Acta 506, 136 (1978)]. 25 mikrogramm fehérjének megfelelő BBMV-t 10 mikromólos koncentrációjú CCK-8-val inkubáltunk 0,15 mg/ml koncentrációjú védőszerek jelenlétében vagy a nélkül, 1 ml össztérfogatban, 37 °C hő-

mérsékleten. Mintákat vettünk 1 és 3 perc múlva, és azokat jégfürdőben acetonitrillel kevertük. Túlnyomásos folyadék-kromatográfiás elemzéssel megállapítottuk a bomlatlan CCK-8 mennyiségét. A VII. táblázatban feltüntetett adatok azt mutatják, hogy a feldolgozott szójafehérje két, különböző molekulatömegű frakciója hatékonyan gátolta a CCK-8 BBMV-proteázok, feltehetően aminopeptidázok hatására végbemenő bomlását.

VII. táblázat

CCK-8 bomlása BBMV-proteáz hatására; frakcionált szójafehérje hatása a bomlásra

A bomlatlanul maradó CCK-8 százaléka			
Inkubálási idő	1 kD - 30 kD molekulatömegű		30 kD - 100 kD molekulatömegű
Perc	Gátló nélkül	Gátló jelenlétében	Gátló jelenlétében
1 perc	42 %	59 %	67 %
3 perc	8 %	10 %	16 %

15. példa

Védelem az aminopeptidáz-okozta bomlás ellen in vivo körülmények között

1,0 mg, az enkefalin pentapepddel analóg D-Ala-D-Leu-enkefalint (YdAGFdL) ileumban krónikusan sipolyozott patkányok csípőbelébe (ileumába) közvetlenül, krónikusan adagoltunk. Minden egyes védőszerrel együtt 1,12 mikrogramm radio-

aktívan jelzett YdAFGdL-t adagoltunk. A négy védőszer: (1) dekantált szójaliszt, molekulatömege 1 kD-nál kisebb; (2) dekantált és ultraszűrt szójaliszt, molekulatömege 1 kD - 30 kD; (3) pepszinnel kezelt (FMC ACTI-MOD) szójaliszt, molekulatömege 30 kD-nál kisebb; (4) amasztatin, az aminopeptidáz enzim hatásos gátlója (pozitív kontroll). Az adagolás után különböző időpontokban a nyaki vénába helyezett kanülön át vért vettünk, és a bomlatlan YdAGFdL-t radioaktív vékonyréteg-kromatográfiával (VRK), fordított fázisú KC-18 vékonyréteg-lemezek (Whatman Co.) alkalmazásával mennyiségileg meghatároztuk. A VRK-lemezek a kifejlesztést 1-propanol és 0,1 mólos, 4,1 pH-értékű foszfát-pufferoldat 30:70 arányú elegyével végeztük.

A VIII. táblázat összegezi a különböző kezelésekkel elért biológiai értékesülés abszolút értékeit. A pepszinnel kezelt (FMC ACTI-MOD), 30 kD-nál kisebb molekulatömegű szójaliszt különösen hatásos védőszernek bizonyult a bél amino-peptidáz enzimek ellen; ezt bizonyítja, hogy felszívódott hányadának százalékos értéke majdnem 11-szeresére növekedett. Az amasztatin, az aminopeptidáz hatékony gátlója szintén hatásos volt; ez arra utal, hogy az YdAGFdL biológiai értékesülését a bél aminopeptidázai által előidézett bomlás részben korlátozza. A pörköletlen szójaliszt a bél-aminopeptidázok-előidézte bomlása ellen nem fejtett ki védőhatást.

VIII. táblázat

Védőszer	n	Az YdAGFdL biológiai értékesülése %-ban
Nincsen (kontroll)	16	1,78±0,46
Dekantált szójaliszt (<1 kD) (100 mg)	4	1,74±0,68
Dekantált, ultraszűrt sojaliszt (FMC ACTI-MOD; 1 kD - 30 kD; 150 mg)	4	2,76±1,43
Pepszinnel kezelt szója- liszt (<30 kD; 100 mg)	4	19,54±13,75
Amasztatin (1 mg; Sigma Chemical Co.; pozitív kontroll)	6	8,76±4,47
Pörköletlen szójaliszt (Sigma; 50 mg)	2	1,88±0,67

16. példa

Pepszinnel kezelt szójaliszt előállítása immobilizált pepszin alkalmazásával

36 g szójalisztet (a Sigma Chem. Co. cég terméke) 1080 ml víz és 120 ml 0,1 tömeg/térf. %-os timeroszál-oldatban szuszpendáltunk, és a szuszpenziót 24 órán át szobahőmérsékleten kevertük, majd 1 órán át 3600 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk. A felülúszót 30 kD molekulatömeg-méret-határú membránon ultraszűrtük. A 30 kD-nál kisebb molekulatömegű frakciót összegyűjtöttük, majd bepároltuk, és a maradék pH-értékét 0,5 N sósavoldattal 2-re állítottuk. Ezt a 30

kD-nál kisebb molekulatömegű frakciót egy ACTI-MOD spirális reaktoregységbe tápláltuk, amelybe előzőleg 8 g immobilizált pepszint helyeztünk (az FMC Corp., Pinebrook, NJ. USA, terméke). Az enzimreaktorból távozó folyadékot 30 kD molekulatömeg-mérethatárú membránon ultraszűrtük. A 30 kD-nál kisebb molekulatömegű frakciót eltettük, és a 30 kD-nál nagyobb molekulatömegű frakciót visszavezettük az enzimreaktoron át. Összesen 2 órás enzimkezelés és ultraszűrés után az összes, 30 kD-nál kisebb molekulatömegű frakciót megtartottuk, és "ultraszűrt, pepszinnel kezelt (<30 kD) szójaliszt" elnevezéssel jelöltük.

17. példa

A benzoil-arginin-(para-nitro-anilid) tripszinnel katalizált bomlásának gátlása in vitro körülmények között

Egy találmány szerinti védőanyagnak benzoil-arginin-(para-nitro-anilid) (röviden: BAPNA) tripszinnel katalizált bomlását gátló, in vitro hatékonyságának kiértékelésére az alábbi eljárást alkalmaztuk. Vizsgálati oldatot készítettünk tripszinből (1,25 µg/ml, 103 BAEE egység/ml), 0,5 mg/ml koncentrációjú BAPNA-ból és 0,5 mg/ml vizsgálandó gátló anyagból 8 pH-értékű TRIS-t (0,048 M) és 0,019 M kalcium-kloridot, valamint 3,75 µg/ml szarvasmarha-szérumalbumint tartalmazó pufferoldatban, és 37 °C hőmérsékleten inkubáltuk az oldatokat. Összesen 40 percig az első 5 perc után, majd 5 perces időközökben mintákat vettünk, azután 40 perc múlva azonos térfogatú 30 térf. %-os ecetsavoldattal elegyítettük az oldatokat az elemzés előkészítéséhez. A BAPNA hidrolízi-

séből származó bomlásterméket, azaz a 4-nitro-anilint Perkin-Elmer Lambda 38 UV/Vis spektrofotométerrel határoztuk meg. Az elbontott minták abszorbanciáját 410 nm hullámhosszon mértük. Az eredményeket a BAPNA bomlásának százalékos gátlásával fejeztük ki a gátló anyagot nem tartalmazó kontrollhoz viszonyítva, az alábbi egyenlet alapján:

$$\text{Gátlás \%} = 100\% \times [1 - (S_{inh}/S_0)]$$

ahol S_{inh} az abszorbancia változásának sebessége az idő függvényében gátló anyag jelenlétében; és S_0 az abszorbancia változásának idő szerinti sebessége az idő függvényében gátló anyag nélkül.

A gátlás százalékos értékét szűrt szójaliszt 30 kD - 100 kD molekulatömegű frakciójával határoztuk meg. Ezt a feldolgozott szójaliszt-frakciót a 3. példában leírt szolubilizálási és ultraszűrési módszer szerint állítottuk elő. Eredményeinket a IX. táblázatban mutatjuk be; az adatok igazolják, hogy a vizsgált, feldolgozott fehérjefrakció csökkentette a BAPNA tripszin-katalizálta bomlását.

IX. táblázat

A BAPNA tripszin-katalizálta bomlásának csökkenése feldolgozott szójaliszt 30 kD - 100 kD molekulatömegű frakciójával

A gátló anyag koncentrációja (mg/ml)	A gátló fehérje koncentrációja (mg fehérje/ml)	Gátlás %
0,5	0,41	73

18. példa

Egyéb frakcionálási és enzimmel végzett kezelési eljárások

A fehérjék és peptidek molekulatömeg szerinti frakcionálási, 1-8. példákban leírt eljárásait variálva az ultra-szűréshez és dialízishez alkalmazott membránok megfelelő megválasztásával bármely kívánt molekulatömegű frakciót előállítottunk. A molekulatömeg frakcionálását gélkromatográfiával is végrehajtottuk.

A 4-7. példákban leírt enzimatikus kezelést egyetlen proteolitikus enzimmel vagy proteolitikus enzimek különböző kombinációival - azok egyidejű vagy egymást követő hatása mellett - is elvégeztük. Különböző proteolitikus enzimeket, így például - azonban korlátozás szándéka nélkül - tripszint, kimotripszint, elasztázt, karboxipeptidázt, aminopeptidázt, pepszint és kollagenázt alkalmaztunk.

Az 1-8. példákban leírt frakcionálást és enzimes kezeléseket különböző, állati vagy növényi eredetű, fehérje-jellegű anyagokra alkalmaztuk. Ilyen fehérjeszerű kiinduló anyagok például - azonban korlátozás nélkül - a szójaliszt, a szójafehérje, a búzasikér, a mandulapor, a mogyorópor, a kazein és a halfehérje.

19. példa

A védőszernek az a tulajdonsága, hogy gyorsan oldódik és hatása közvetlenül az *in vivo* felszabadulása után bekövetkezik, a találmány szerinti, bomlást csökkentő szerek teljesítményének fontos tényezője. Ebből a célból *in vitro*

körülmények között összehasonlítottuk a szójaliszt és a 30 kD - 100 kD molekulatömegű, dekantált és ultraszűrt szójaliszt terlakirénnek dinamikus környezetben végbemenő lebomlását csökkentő hatását. Ennek során a 8. példában leírt *in vitro* módszert követtük azzal az eltéréssel, hogy a vizsgálati oldat csak enzimet és terlakirént tartalmazott pufferoldatban. A vizsgálandó gátló anyagot (egyrészt szójaliszt, másrészt 30 kD - 100 kD molekulatömegű, dekantált és ultraszűrt szójaliszt) 0,01 mg/ml koncentrációban további keverés nélkül adtuk hozzá, miközben az oldatot vízfürdőben 5-ös sebességgel rázattuk 37 °C hőmérsékleten (American Scientific, model YB531). Mintákat vettünk 19 másodperc és 1 perc elteltével, majd 2 perces időközökben 11 perc elteltéig, majd 5 perces időközökben összesen 46 percig. A folyamat leállítását, a HPLC elemzést és az adatok elemzését a 8. példa szerint végeztük.

X. táblázat

A vizsgált gátló anyag 0,01 mg/ml	k* (mmol/perc)	Gátlás %
Szójaliszt	$2,96 \times 10^{-4}$	27,1
Szójaliszt dekantált és ultraszűrt, 30 kD - 100 kD molekulaméretű frakciója	$0,86 \times 10^{-4}$	78,8

Jóllehet a találmányt előnyös megvalósítási formáinak alapján írtuk le - amelyek a feltalálók által jelenleg

ismert legkedvezőbb kiviteli módot jelentik -, nyilvánvaló, hogy különböző változtatások és módosítások - amelyek e szakterületen jártas egyének számára kézenfekvők - végezhetőek a találmány oltalmi körének túllépése nélkül.

Szabadalmi igénypontok

1. Gyógyászati készítmény, azzal j e l l e m e z v e, hogy valamilyen védőanyagot és egy proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyag biológiailag hatásos mennyiségét tartalmazza, azzal a megkötéssel, hogy ha a védőanyag szójaliszt, akkor a gyógyászati hatóanyag az inzulintól eltérő.

2. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal j e l l e m e z v e, hogy védőanyagként valamilyen fehérjét, peptidet, természetes eredetű, tisztított fehérjét, molekulatömeg szerint frakcionált fehérjét, oldószerrel extrahált fehérjét vagy részben hidrolizált fehérjét tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal j e l l e m e z v e, hogy védőanyagként olyan, részben hidrolizált fehérjét tartalmaz, amelyet előzőleg enzimatisz uton hidrolizáltunk.

4. A 3. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal j e l l e m e z v e, hogy hidrolizáló enzimként tripszint, kimotripszint, elasztázt, karboxipeptidázt, aminopeptidázt, pepszint vagy kollagenázt tartalmaz.

5. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal j e l l e m e z v e, hogy védőanyagként részben hidrolizált, molekulatömeg szerint frakcionált, 1000-nél nagyobb molekulatömegű fehérjét tartalmaz.

6. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal j e l l e m e z v e, hogy védőanyagként részben hidro-

lizált, molekulatömeg szerint frakcionált, 1000 és 30 000 közötti molekulatömegű fehérjét tartalmaz.

7. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, az-
zal j e l l e m e z v e, hogy védőanyagként szójalisztet,
szójafehérjét, búzasikért, mandulalisztet, mogyorólisztet,
kazeint vagy halfehérjét tartalmaz.

8. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, az-
zal j e l l e m e z v e, hogy védőanyagként természetes
eredetű fehérjéből származó fehérjét vagy molekulatömeg
szerint frakcionált, részben hidrolizált fehérjét tartalmaz.

9. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, az-
zal j e l l e m e z v e, hogy proteolízissel szemben labi-
lis gyógyászati hatóanyagként kalcitonint, prolaktint, adre-
nokortikotropint, kirotropint, növekedési hormont, gonado-
trop hormont, oxitocint, vazopresszint, gasztrint, tetra-
gasztrint, pentagasztrint, glukagont, szekretint, pankreozi-
mint, P anyagot, gonadotropint, immunglobulint, leuprolidot,
luteinizáló hormont felszabadító hormont, enkefalint, kole-
cisztokinint, tüsző-stimuláló hormont, interferont, inter-
leukint, timopentint, endotelint, neurotenzint, inzulint,
inzulinotropint vagy terlakirént tartalmaz.

10. Módszer proteolízissel szemben labilis gyógyászati
hatóanyag biológiai értékesülésének a növelésére, azzal
j e l l e m e z v e, hogy egy ilyen gyógyászati hatóanyagra
szoruló emlősnek a gyógyászati hatóanyagot egy védőanyag
olyan mennyiségével adagoljuk, amely elegendő a gyógyászati
hatóanyag biológiai értékesülésének a növelésére, azzal a
megkötéssel, hogy ha a védőanyag szójaliszt, akkor a gyógyá-

szati hatóanyag az inzulintól eltérő.

11. A 10. igénypont szerinti módszer, azzal j e l l e - m e z v e, hogy védőanyagként valamilyen fehérjét, peptidet, természetes eredetű, tisztított fehérjét, frakcionált molekulatömegű fehérjét, oldószerrel extrahált fehérjét vagy részben hidrolizált fehérjét adagolunk.

12. A 10. igénypont szerinti módszer, azzal j e l l e - m e z v e, hogy védőanyagként olyan, részben hidrolizált fehérjét adagolunk, amelyet előzőleg enzimatis úton hidrolizáltunk.

13. A 12. igénypont szerinti módszer, azzal j e l l e - m e z v e, hogy hidrolizáló enzimeként tripszint, kimotripsint, elasztázt, karboxipeptidázt, aminopeptidázt, pepszint vagy kollagenázt alkalmazunk.

14. A 10. igénypont szerinti módszer, azzal j e l l e - m e z v e, hogy védőanyagként részben hidrolizált, 1000-nél nagyobb molekulatömegű fehérjét adagolunk.

15. A 10. igénypont szerinti módszer, azzal j e l l e - m e z v e, hogy védőanyagként részben hidrolizált, 1000 és 30 000 közötti molekulatömegű fehérjét adagolunk.

16. A 10. igénypont szerinti módszer, azzal j e l l e - m e z v e, hogy védőanyagként szójalisztból, szójafehérjéből, búzasikérből, mandulalisztból, mogyorólisztból, kazeinből vagy halfehérjéből származó fehérjét vagy részben hidrolizált fehérjét adagolunk.

17. A 10. igénypont szerinti módszer, azzal j e l l e - m e z v e, hogy védőanyagként természetes eredetű fehérjét vagy részben hidrolizált fehérjét adagolunk.

18. A 10. igénypont szerinti módszer, azzal j e l l e m e z v e, hogy proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagként kalcitonint, prolaktint, adrenokortikotropint, tiotropint, növekedési hormont, gonadotrop hormont, oxitocint, vazopresszint, gasztrint, tetragasztrint, pentagasztrint, glukagont, szekretint, pankreozimint, P anyagot, gonadotropint, immunglobulint, fibrinogént, leuprolidot, luteinizáló hormont felszabadító hormont, enkefalint, koleciszto-kinint, tüszőstimuláló hormont, interferont, interleukint, timopentint, endotelint, neurotenzint, inzulint, inzulinotropint vagy terlakirént adagolunk.

19. A 18. igénypont szerinti módszer, azzal j e l l e m e z v e, hogy proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagként terlakirént adagolunk.

20. A 9. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal j e l l e m e z v e, hogy proteolízissel szemben labilis gyógyászati hatóanyagként terlakirént tartalmaz.

Hand

Pfizer Inc. helyett
a meghatalmazott:

DANUBIA
Szabaddalmi és Védjegy Iroda Kft.