

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

208 637 B

(21) A bejelentés száma: 2742/91
(22) A bejelentés napja: 1990. 12. 19.
(30) Elsőbbségi adatok:
P 39 42 143 1989. 12. 20. DE
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 90/02251
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/08766

(51) Int. Cl.⁵

A 61 K 37/43

(40) A közzététel napja: 1992. 06. 29.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1993. 12. 28. SZKV 93/12

(72) Feltalálók:

dr. Kohnert, Ulrich, Habach (DE)
dr. Rudolf, Rainer, Weilheim (DE)

(73) Szabadalmas:

Boehringer Mannheim GmbH.,
Mannheim-Waldhof (DE)

(74) Képviselő:

S.B.G. és K. Ügyvédi és Szabadalmi Iroda,
Budapest

(54) Eljárás nem glikozilezett, t-PA aktivitással rendelkező proteint tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás nem glikozilezett, t-PA-aktivitással rendelkező proteint tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, amelynek enzimaktivitása legalább 0,1 MU/ml és pH-értéke 4,5–6.

A találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy 5–100 mmól/l citrátot és az alábbiak közül legalább egy vegyületet kombinálunk:

- a) 0,1–1 mól/l aszkorbinsav
 - b) 1–200 mmól/l etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA)
 - c) 0,5–500 mmól/l R^1R^2N-R-X általános képletű – ahol
- X jelentése szulfo-, amino-karboxi-metil-
[$-CH(NH_2)-COOH$], karboxil-, amino- vagy hidroxilcsoport vagy hidrogénatom,

R jelentése 1–9 szénatomos alkilén-, 3–6 szénatomos cikloalkilén- vagy benzilidencsoport és

R^1 és R^2 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom vagy 1–3 szénatomos alkilcsoport – aminovegyület,

d) 10–200 mmól/l guanidino-vajsav

e) 50–400 mmól/l dimetil-biguanid

f) 10–200 mmól/l arginin

h) 1–300 mmól/l pirimidin-nukleozid vagy pirimidin-nukleotid

i) 0,001–1 mól/l egy vagy több hidroxil-, oxo- vagy/és további karboxilcsoporttal szubsztituált karbonsav.

A találmány tárgya eljárás nem glikozilezett, t-PA aktivitással rendelkező, proteint tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására, amelyek véralvadékok feloldására szolgálnak.

A humán szöveti plazminogén aktivátor (t-PA) nagy gyógyászati jelentőséggel bír a véralvadékok feloldásánál, például szívinfarktus esetén. A t-PA a véralvadékok oldására a plazminogén plazminná való aktiválása útján hat. A plazmin viszont oldja a fibrint, az alvadt vér protein-mátrixának fő komponensét.

A természetes t-PA több funkcionális doménből, az F, E, K1, K2 és P doménekből tevődik össze. A P domén tartalmazza a proteolitikusan aktív centrumot, amely a plazminogén plazminná való hasítását végzi. A t-PA vagy különböző olyan t-PA-mutainak (protein mutánsok) gén-technológiai előállítására, amelyekben az F, E, K1 és K2 domének közül egy vagy több deletált, eukarióta vagy prokarióta sejtekben már ismert. A prokariótákból származó t-PA-származékok a természetes t-PA-val ellentétben nem glikozilezett formában szintetizálódnak.

Ismeretes továbbá az is, hogy a cukorrész a proteinek oldhatóságára és aggregációjára jelentős befolyással rendelkezik [J. Biol. Chem., 263, 8832–8837 (1988)]. Azt észlelték, hogy a nem glikozilezett t-PA a glikozilezett t-PA-nál lényegesen rosszabbul oldódik.

A nem glikozilezett t-PA (t-PA pro) csak nagyon rosszul oldódik a proteinek szolubilizálására szokásosan használt pufferokban, például 50 mmól/l koncentrációjú nátrium-citrát-oldatban, 50 mmól/l koncentrációjú foszfátoldatban vagy fiziológiás nátrium-klorid-oldatban. Gyógyászati hatóanyagként való felhasználás céljára azonban magasabb, legalább 0,1 MU/ml, előnyösen 0,1 MU/ml-től 10 UM/ml-ig terjedő enzimaktivitású t-PA pro kellene. Az aktivitást a WHO, National Institute for Biological Standards and Control [ZGIMAL 42, 478–486 (1987)] szerint definiáljuk.

Az EP-A 0217379 számú európai szabadalmi bejelentésből ismert, hogy a prokariótákból származó t-PA oldhatósága semleges vagy enyhén lúgos arginin-készítményekkel növelhető. Ezen eljárás hátránya azonban, hogy a t-PA pro jó oldhatósága csak nagyon magas arginin-koncentrációval érhető el.

A találmány célkitűzésének azt tekintettük, hogy olyan gyógyszerkészítmények előállítási eljárását fejlesszük ki, amelyek 0,1 MU/ml-nél magasabb aktivitású t-PA-pro-t tartalmaznak, és amelyekben a t-PA pro-nak hosszabb időtartamon keresztül stabilnak kell lennie.

A találmány szerint a feladatot egy nem glikozilezett, t-PA-aktivitással rendelkező proteint tartalmazó gyógyszerkészítménnyel oldottuk meg, amelynek enzimaktivitása legalább 0,1 MU/ml és pH-értéke 4,5–6, amely 5–100 mmól/l citrátot és az alábbiakból legalább egyet tartalmaz:

- a) 0,1–1 mól/l aszkorbinsav
- b) 1–200 mmól/l etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA),
- c) 0,5–500 mmól/l R^1R^2N-R-X általános képletű – ahol

X jelentése szulfo-, amino-karboxi-metil- $[-CH(NH_2)-CO_2H]$, karboxilcsoport, hidrogénatom, amino- vagy hidroxilcsoport,

R jelentése 1–9 szénatomos alkilén-, 3–6 szénatomos cikloalkilén- vagy benzilidencsoport, és R^1 és R^2 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom vagy 1–3 szénatomos alkilcsoport – aminovegyület,

d) 10–200 mmól/l guanidino-vajsav

e) 50–400 mmól/l dimetil-biguanid

f) 10–200 mmól/l arginin

h) 1–300 mmól/l pirimidin-nukleozid és pirimidin-nukleotid

i) 0,001–1 mól/l egy vagy több hidroxil-, oxo- vagy/és további karboxilcsoporttal szubsztituált karbonsav.

A találmány leírása során t-PA pro alatt egy olyan t-PA-t értünk, amely –3-tól (Gly) a +1-ig (Ser) terjedő szakaszba eső aminosavakkal kezdődik, és az 527. aminosavnál (Pro) végződik [a nomenklatura Harris, Protein Engineering, 1, 449–458 (1987) szerint]. Egy t-PA pro a WO87/02763-ban leírt eljárás szerint állítható elő.

A t-PA pro szolubilizálására különösen alkalmas egy citrát-puffer. A citrátionok koncentrációjának legalább 5 mmól/l-nek, előnyösen 5–100 mmól/l-nek kell lennie, különösen előnyös az 50 mmól/l citrátion-koncentráció. A pH-t az adalékként hozzáadott vegyület bázicitásától függően sósavval vagy egy bázissal, például nátrium-hidroxiddal vagy kálium-hidroxiddal állítjuk be.

Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a nem glikozilezett t-PA oldhatósága más pufferrendszerekben, például foszfát-pufferben ugyanolyan ionerősségnél és ugyanolyan pH-nál lényegesen rosszabb. Az viszont megfelelőnek bizonyult, ha a lúgos citrátoldatok pH-ját sósavval állítottuk be, azaz a készítmény még kloridionokat is tartalmazott. Kloridionok jelenlétében a t-PA pro nagyon tömény oldatai lényegesen stabilabbak, mint például foszfátionok jelenlétében. A savas citrátoldatok pH-ját rendszerint nátrium-hidroxiddal állítjuk be.

A találmány szerint előállított készítmények esetében 4,5 és 6,5 közötti pH-érték a megfelelő, előnyös a 6 pH-érték.

Egy találmány szerinti készítmény előállításához aminovegyületként előnyösen taurint, 4-amino-butanol, 5-amino-pentanol, 8-amino-hexanol, 1,9-diamino-nonánt, 1,8-diamino-oktánt, 1,7-diamino-heptánt, 1,6-diamino-hexánt, 1,5-diamino-pentánt, 1,4-diamino-butánt, 1,3-diamino-propánt, lizint, ornitint, 8-amino-oktánsavat, 7-amino-heptánsavat, 6-amino-kapronsavat, 8-amino-valeriánsavat, 7-amino-vajsavat, tranexámsavat [transz-4-(amino-metil)-ciklohexán-karbonsav] vagy 4-(amino-metil)-benzoesavat használunk. A taurin és az analóg vegyületek esetében az előnyös koncentráció 0,1–0,5 mól/l, különösen előnyös a 0,1–0,3 mól/l tartomány. A 4-amino-butanol, 5-amino-pentanol, 6-amino-hexanol, 1,9-diamino-nonánt, 1,8-diamino-oktánt, 1,7-diamino-heptánt, 1,6-diamino-hexánt, 1,5-diamino-pentánt, 1,4-diamino-butánt vagy 1,3-diamino-propánt előnyösen 10–100 mól/l koncentrációban használjuk. A lizint, ornitint, 8-amino-

oktánsavat, 7-amino-heptánsavat, ϵ -amino-kapronsavat, δ -amino-valeriánsavat, γ -amino-vajsavat, tranexámsavat vagy a 4-(amino-metil)-benzoesavat előnyösen 0,5–20 mmól/l, különösen előnyösen 1–10 mmól/l koncentrációban alkalmazzuk.

Egy vagy több hidrox-, oxo- vagy/és további karboxicsoporttal szubsztituált karbonsavakként például almasavat, tejsavat, fumársavat vagy 2-oxo-glutársavat használunk. Ezeket az anyagokat előnyösen 1 mmól/l-től 1000-mmól/l-ig, különösen előnyösen 10 mmól/l-től 500 mmól/l-ig terjedő koncentrációban használjuk.

A guanidino-vajsavat előnyösen 10–200 mmól/l, különösen előnyösen 50–100 mmól/l koncentrációban használjuk. Dimetil-biguanid esetében a koncentráció 50–400 mmól/l, előnyösen 100–300 mmól/l lehet.

EDTA-t előnyösen 1–100 mmól/l, különösen előnyösen 10–100 mmól/l koncentrációban használunk. Az aszkorbinsavból előnyösen 0,1–1 mól/l-t, különösen előnyösen 0,2–0,3 mól/l-t használunk.

Pirimidin-nukleozidként vagy pirimidin-nukleotidként például timidin, citozin és uridin, illetve a megfelelő nukleotidok alkalmazhatók. Ezeket az anyagokat előnyösen 1–300 mmól/l, különösen előnyösen 10–300 mmól/l koncentrációban használjuk.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan készítmény előállítási eljárása is, amely még egy vagy több aminosavat, főként hisztidint tartalmaz.

A továbbiakban egy sor találmány szerinti különösen előnyös összetételt mutatunk be.

Egy készítmény 50 mmól/l nátrium-citrát/NaOH-t (pH = 6) és 0,1–0,3 mól/l taurint tartalmaz. Előnyös egy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/NaOH-t (pH = 6) és 0,2–0,3 mól/l aszkorbinsavat tartalmazó készítmény is.

Előnyös továbbá egy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffert és 1–10 mmól/l 7-amino-heptánsavat, 8-amino-oktánsavat, 4-(amino-metil)-benzoesavat, ϵ -amino-kapronsavat, δ -amino-valeriánsavat, γ -amino-vajsavat, tranexámsavat, lizint vagy ornitint tartalmazó készítmény is.

Különösen előnyösek továbbá olyan találmány szerinti előállított készítmények is, amelyek 50 mmól/l 6,0 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffert és 50–100 mmól/l guanidino-vajsavat vagy arginint tartalmaznak.

Előnyös egy olyan készítmény is, amely 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrátot és 10–100 mmól/l EDTA-t tartalmaz. Egy további készítmény 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffert és 100–300 mmól/l dimetil-biguanidot tartalmaz.

Egy másik további készítmény 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffert és 10–300 mmól/l timidint, citozint vagy uridint tartalmaz. Egy ugyancsak további készítmény 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffert és 10–100 mmól/l 4-amino-butanolt, 5-aminopentanolt, 6-amino-hexanolt, 1,9-diamino-nonánt, 1,8-diamino-oktánt, 1,7-diamino-heptánt, 1,6-diamino-hexánt, 1,5-diamino-pentánt, 1,4-diamino-butánt vagy 1,3-diamino-propánt tartalmaz.

Végül egy készítmény 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrátot és 10–500 mmól/l almasavat, tejsavat, fumársavat vagy 2-oxo-glutársavat tartalmaz.

Több fentebb említett vegyület kombinációit tartalmazó citrátos készítmény is nagyon jó oldhatóságot biztosít t-PA-aktivitással rendelkező proteineknek.

A találmány tárgyát képezi egy hatóanyagként t-PA-aktivitással rendelkező proteint a megadott hatóanyagokkal és adott esetben még további, gyógyászatiilag elfogadott adalék-, segéd-, hordozó- és töltőanyagokkal együtt oldatban vagy liofilizátumként tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítási eljárása is.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmények elsősorban injekciós vagy infúziós oldatokként kerülnek alkalmazásra. A felhasználás történhet úgy, hogy egy már elkészített, injektálásra kész oldat áll rendelkezésre, amely a találmány szerinti összetételű. Lehetséges azonban az is, hogy a gyógyszerkészítmények liofilizátumok formájában álljanak rendelkezésre. Ezeket azután önmagukban ismert, injekciós célokra alkalmas szerekkel vagy oldatokkal elegyítve hozzuk felhasználásra kész állapotba.

Injekciós közegként előnyösen vizet használunk, amely az injekciós oldatoknál szokásos adalékanyagokat, így stabilizálószerket, oldásközvetítőket, pufferokat és izotóniás adalékokat, például fiziológiás koncentrációjú nátrium-kloridot tartalmaz. Ilyenfajta adalékokként például mannit, tartarát- vagy citrát-pufferok, etanol, komplexképzők, így etilén-diamin-tetraecetsav és ennek nem toxikus sói, valamint viszkozitásszabályozásra szolgáló nagymolekulájú polimerek, így folyékony polietilén-oxid említhetők. Az injekciós célokra szolgáló folyékony hordozóknak sterilnek kell lenniük, és előnyösen ampullákba töltve kerülnek forgalomba.

A találmány tárgyát képezi végül a t-PA-aktivitással rendelkező proteinek találmány szerinti gyógyszerkészítmények előállítására való alkalmazása is.

A következő példák a találmány konkrét kivitelezésének bővebb szemléltetését hivatottak szolgálni:

1. példa

t-PA pro oldhatósága

Tisztított t-PA pro-t (7,2 pH-jú 0,5 mól/l koncentrációjú arginin/foszforsav puffert oldva) egy YM 10 membránon (Amicon) végzett ultraszűréssel koncentrálnak. A koncentrátum 1-1 ml-ét (aktivitás: 2,4 MU/ml) az 1. táblázatban felsorolt pufferokkal szemben dializáljuk. A minták centrifugálása után a tiszta felülúszóban mérjük az enzimaktivitást.

Az enzimaktivitást térfogategységben MU/ml-ben és összaktivitásként MU-ban adjuk meg.

A t-PA-aktivitás mérése szokásos módon egy kromogén szubsztrát hasításával történhet [H. Lill, ZGI-MAL 42, 478–486 (1987)].

Ez az U egység az aktivitásnak a WHO, National Institute for Biological Standards and Control definíciója szerinti egysége.

1. táblázat

Puffer	Aktivitás	
	MU/ml	MU
50 mmól/l Na-citrát/NaOH, pH 6 0,3 mól/l taurin	0,34	0,20

Puffer	Aktivitás	
	MU/ml	MU
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 0,3 mól/l fruktóz	0,12	0,07
50 mmól/l Na-citrát/NaOH, pH 6 0,3 mól/l aszkorbinsav	0,34	0,18
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 10 mmól/l ϵ -amino-kaprónsav	0,21	0,28
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 10 mmól/l lizin	0,17	0,12
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 10 mmól/l tranexámsav	0,26	0,36
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 10 mmól/l 4-(amino-metil)-benzoésav	0,24	0,33
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 0,3 mól/l dimetil-biguanid	1,20	1,50
0,05 mól/l trisz/HCl, pH 7,2	0,01	0,01
50 mmól/l ammónium-hidrogénkarbonát	0,05	0,04
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 10 mmól/l δ -amino-valeriánsav	0,17	0,23
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 10 mmól/l γ -amino-vajsav	0,27	0,20
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 10 mmól/l 7-amino-heptánsav	0,20	0,27
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 50 mmól/l arginin	0,19	0,21
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 50 mmól/l guanidino-vajsav	0,16	0,19
50 mmól/l Na-citrát/NaOH, pH 6 10 mmól/l EDTA	0,10	0,12
50 mmól/l Na-citrát/NaOH, pH 6 50 mmól/l EDTA	0,18	0,22
50 mmól/l Na-citrát/NaOH, pH 6 100 mmól/l EDTA	0,26	0,29
50 mmól/l Na-citrát/NaOH, pH 6 50 mmól/l 1,6-diamino-hexán	0,29	0,37
50 mmól/l Na-citrát/NaOH, pH 6 50 mmól/l 5-amino-pentanol	0,29	0,36
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6 0,1 mól/l timidin	0,16	0,21
50 mmól/l Na-citrát/HCl, pH 6	0,07	0,09
50 mmól/l dinátrium-hidrogénfoszfát/foszforsav, pH 6	0,02	0,03
50 mmól/l Na-citrát/NaOH, pH 6 0,3 mól/l fumársav	0,19	0,19

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás nem glikozilezett, t-PA-aktivitással rendelkező proteint tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, amelynek enzimaktivitása legalább 0,1 MU/ml és pH-értéke 4,5–6, *azzal jellemezve*, hogy a t-PA-aktivitással rendelkező, nem glikozilezett proteint és 5–100 mmól/l citrátot az alábbiak közül legalább egy vegyülettel kombinálunk:

- a) 0,1–1 mól/l aszkorbinsav
b) 1–200 mmól/l etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA)
c) 0,5–500 mmól/l R^1R^2N-R-X általános képletű – ahol
- 5 X jelentése szulfo-, amino-karboxi-metil-
 $[-CH(NH_2)-COOH]$, karboxil-, amino- vagy hidroxilcsoport vagy hidrogénatom,
R jelentése 1–9 szénatomos alkilén-, 3–6 szénatomos cikloalkilén- vagy benzilidencsoport és
- 10 R^1 és R^2 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom vagy 1–3 szénatomos alkilcsoport – aminovegyület,
- d) 10–200 mmól/l guanidino-vajsav
e) 50–400 mmól/l dimetil-biguanid
- 15 f) 10–200 mmól/l arginin
h) 1–300 mmól/l pirimidin-nukleozid vagy pirimidin-nukleotid
i) 0,001–1 mól/l egy vagy több hidroxil-, oxo- vagy/és további karboxilcsoporttal szubsztituált karbonsav.
- 20 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy aminovegyületként taurint, 4-amino-butanolt, 5-amino-pentanolt, 6-amino-hexanolt, 1,9-diamino-nonánt, 1,8-diamino-oktánt, 1,7-diamino-heptánt, 1,6-diamino-hexánt, 1,5-diamino-pentánt, 1,4-diamino-butánt, 1,3-diamino-propánt, lizint, ornitint, 8-amino-oktánsavat, 7-amino-heptánsavat, ϵ -amino-kaprónsavat, delta-amino-valeriánsavat, gamma-amino-vajsavat, transz-4-(amino-metil)-ciklohexán-karbonsavat (tranexámsavat) vagy 4-(amino-metil)-benzoésavat alkalmazunk.
- 25 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy vagy több hidroxil-, oxo- vagy/és további karboxilcsoporttal szubsztituált karbonsavként alkalmazunk, tejsavat, fumársavat vagy 2-oxo-glutársavat alkalmazunk.
- 30 4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy járulékosan egy vagy több aminosavat is alkalmazunk.
- 40 5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l koncentrációban alkalmazunk citrátot.
6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy még kloridionokat is alkalmazunk.
- 45 7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrátot és 0,1–1 mól/l, előnyösen 0,2–0,3 mól/l aszkorbinsavat alkalmazunk.
- 50 8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrátot és 1–200 mmól/l, előnyösen 10–100 mmól/l EDTA-t alkalmazunk.
9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrátot és 0,1–0,5 mmól/l, előnyösen 0,1–0,3 mól/l taurint alkalmazunk.
- 55 10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffert és 0,5–20 mmól/l lizint, ornitint, 8-amino-oktánsavat, 7-amino-heptánsavat, ϵ -amino-kaprónsavat, delta-
- 60

amino-valeriánsavat, gamma-amino-vajsavat, tranexámsavat vagy 4-(amino-metil)-benzoésavat alkalmazunk.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffer és 10–100 mmól/l 4-amino-butanolt, 5-amino-pentanolt, 6-amino-hexanolt, 1,3-diamino-propánt, 1,4-diamino-butánt, 1,5-diamino-pentánt, 1,6-diamino-hexánt, 1,7-diamino-heptánt, 1,8-diamino-oktánt vagy 1,9-diamino-nonánt alkalmazunk.

12. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffer és 10–200 mmól/l, előnyösen 50–100 mmól/l guanidino-vajsavat vagy arginint alkalmazunk.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffer és 50–400 mmól/l, előnyösen 100–300 mól/l dimetil-biguanidot alkalmazunk.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffer és 1–300 mmól/l, előnyösen 10–300 mmól/l timidint, citozint vagy uridint alkalmazunk.

5 15. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffer és 0,001–1 mól/l, előnyösen 0,01–0,5 mól/l almasavat, tejsavat, fumársavat vagy 2-oxo-glutársavat alkalmazunk.

10 16. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 50 mmól/l 6 pH-jú nátrium-citrát/sósav puffer és az 1. igénypontban az a)–i) csoportokban felsorolt anyagok kombinációját alkalmazzuk.

15 17. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a komponenseket injekciós oldattá vagy liofilizátummá alakítjuk.