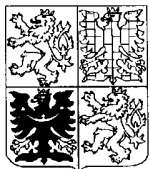


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.12.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.12.1998 23.12.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/19860541 1998/19860542**

(33) Země priority: **DE DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.12.2000**
(Věstník č. 12/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/DE99/04108**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/39290**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3061

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 9/88
A 61 K 38/51
A 61 P 7/02
A 61 P 9/06
A 61 P 9/10

(71) Přihlašovatel:

ID-PHARMA GMBH, Jena, DE;

(72) Původce:

Presselt Norbert, Kahla, DE;
Müller Peter-Jürgen, Jena, DE;
Ozegowski Jörg-Hermann, Jena, DE;
Härtl Albert, Jena, DE;
Peschel Gundela, Jena, DE;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Farmaceutické přípravky obsahující enzym
mikrobiálního původu štěpící kyselinu
hyaluronovou**

(57) Anotace:

Řešení se týká farmaceutických přípravků vhodných jako injekční preparáty k terapeutickému používání při léčení onemocnění cév, která se vyskytují přímo jako následek ateromatózní usazeniny na vnitřních stěnách arterií. Injekční preparáty obsahují hyaluronátlyázu bakteriálního původu respektive u tohoto enzymu připravený enzymový fragment štěpící hyaluronát. Tento enzymový fragment bakteriální hyaluronátlyázy štěpící hyaluronát je rovněž předmětem řešení. Lze ho připravit tím, že se holoenzym podrobí působení specificky štěpící proteázy.

FARMACEUTICKÉ PŘÍPRAVKY OBSAHUJÍCÍ ENZYM MIKROBIÁLNÍHO
PŮVODU ŠTĚPÍCÍ KYSELINU HYALURONOVOU

Oblast techniky

Na vnitřní stěně artérie, intimy, se usazují u lidí tak jako u savců s přibývajícím věkem nebo při patologických stavech hydrofóbní plaky, které vedou k ztvrdnutí stěn arterie, k lézi a k zmenšení vnitřní světlosti tvorbou neointimy v tkáních. Se změnou tkáně úzce souvisí patologické jevy, jako srdeční arytmie, tvorba trombů a trombózy, cerebrální infarkty, cerebrální trombózy, vysoký krevní tlak a snížení zásobování krví.

Vynález se týká farmaceutických přípravků, které vykazují vlastnost zmenšit při intraarteriálním nebo intravenózním použití rozsah ploch intimy pokrytých plakem, respektive zmenšit jejich účinek na průtok krve. Tento účinek úzce souvisí s přítomností kompletního enzymu (holoenzymu) a/nebo z něho připravitelného, menšího enzymového fragmentu nového druhu ve farmaceutických přípravcích podle vynálezu.

Navržený holoenzym je hyaluronátlyáza a také fragment vykazující aktivitu štěpit kyselinu hyaluronovou. Tato aktivita vede především k přednostnímu odbourávání kyseliny hyaluronové.

Dále se vynález týká nových fragmentů enzymu, připravených speciálním enzymatickým degradačním procesem.

Hyaluronová kyselina patří vedle chondroitinsulfátů, dermatansulfátu, heparinu a heparansulfátu ke glykosaminoglykanům. Zmíněné glykosaminoglykany obsahují

kromě kyseliny hyaluronové sulfátové skupiny (sulfátované glykosaminoglykany). Glykosaminoglykany se vyskytují v tkáni všech obratlovců. Kyselina hyaluronová existuje obzvláště v intercelulárních matrixech, kůži a chrupavkových tkáních, jakož i v tělních tekutinách, jako je kloubní kapalina a voda oční komory. Společně s jinými glykosaminoglykany je obsažena ve stěnách krevních cév a pravděpodobně také v ateromatózních usazeninách respektive plaku vnitřních stěn artérií. Vlastností kyseliny hyaluronové je vázat vodu za tvorby viskózních hydrokoloidních roztoků a tvořit těžce rozpustné komplexy se silně basickými proteiny. Skládá se z kyseliny glukuronové a acetylovaného glukosaminu, které jsou vázané β -(1-3)-glykosidickými vazbami. Tyto disacharidové jednotky jsou opět spolu vzájemně vázány glykosidickými β -(1-4)-vazbami. Hyaluronová kyselina je štěpena enzymy, které jsou zahrnuty pod pojmem hyaluronidázy.

Tento název hyaluronidázy popisuje - nesprávně ve smyslu enzymologického systému - tři různě účinné typy enzymů štěpících hyaluronovou kyselinu (J. Ludowieg: The mechanism of hyaluronidases, JBC 236, 333-339, (1961)). Jsou to právě jednak endohydrolázy, které hydrolyticky štěpí β -(1-3)-vazby za adice vody. K nim patří většina hyaluronidáz z vyšších organismů, například terapeuticky použitelná hyaluronidáza z hovězích varlat. Také tyto enzymy nazvané hyaluronát-glykanhydrolázy (E.C.3.2.1.35/36) hydrolyzují kromě hyaluronové kyseliny v omezené míře také jiné glykosaminoglykanové vazby. Další typ představuje endo- β -hyaluronidáza z pijavic, která vysoce specificky štěpí β -(1-4)-vazbu. Všechny jmenované enzymy jsou hydrolyticky působící hyaluronidázy respektive hyaluronidázy v užším slova smyslu.

Třetí typ enzymů, hyaluronátlyázy (EC 4.2.2.1), štěpí kyselinu hyaluronovou v β -(1-4)-vazbách podle eliminačního mechanismu za tvorby dvojné vazby v poloze (4-5) kyseliny glukoronové. Hyaluronátlyázy nejsou tudíž žádné hyaluronidázy.

Hyaluronátlyázy se vyskytují v mikroorganismech. Nacházejí se například ve streptomycetách a v jiných bakteriích. Jejich společným znakem je jejich úzká specifita vůči kyselině hyaluronové. Jiné glykosaminoglykany se zpravidla štěpí v zanedbatelné míře (J.-H. Ozegowski et al.: Purification and characterization of Hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae*, Zbl. Bakt. 280, 497-506 (1994), A. Linker et al: The production of unsaturated uronides by bacterial hyaluronidases, JBC 219 13-25, (1956), T. Ohia, Y. Kaneko: Novel hyaluronidase from *Streptomyces*, BBA 198 (1970), 607-609 a K. Gase, J.-H. Ozegowski, and H. Malke: The *Streptococcus agalactiae* hylB gene encoding hyaluronat lyase completion of the sequence and expression analysis, BBA, 1998, 86-98).

Většinou jsou mikrobiální hyaluronátlyázy vysokomolekulárními proteiny s molekulovými hmotnostmi mezi 116000-120000 Dalton. Tyto vysokomolekulární hyaluronátlyázy jsou většinou relativně citlivé vůči denaturačním činidlům a extrémním fyziologickým podmínkám. Zejména při přípravě farmaceutických a veterinárních léčebných přípravků může dojít k významným ztrátám aktivity denaturačními procesy. Navíc je difúzní schopnost relativně velkých enzymů podstatně menší než schopnost difúze menších molekul. Teoreticky se tím omezuje difúze a tím i penetrační respektive difuzní transport hyaluronátlyáz (holoenzymů) o vysoké molekulové hmotnosti v tkáních, například také do plaku. Menší imunogenní účinek je pravděpodobný.

Dosavadní stav techniky

Dosavadní stav techniky je, štěpit proteiny pomocí proteáz během enzymatického procesu, aby se získaly pro sekvenování proteinové fragmenty, které nejsou zpravidla enzymaticky aktivní. Teoreticky by tedy mělo být možné zmenšit enzymy (holoenzymy), které jsou tvořeny mikroorganismy, částečným strávením specificky působícími proteázami.

Až dosud však nebyly známy žádné fragmenty enzymů, zejména žádné enzymaticky aktivní fragmenty mikrobiálních hyaluronátlyáz, u kterých je původ hyaluronátlyázy rozpoznatelný na základě identického úseku sekvence aminokyselin nebo sekvence, které byly z hyaluronátlyázy připraveny. Nejsou tedy známy způsoby, kterými lze připravit enzymaticky aktivní fragmenty z hyaluronátlyáz.

Hyaluronidáza z hovězích varlat se používá proto, aby se zvířecí respektive lidská tkáň učinila propustnější. Slouží jako penetrační nebo resorpční urychlovač pro subkutánně nebo intramuskulárně podávaná léčiva nebo k usnadnění perfúze větších množství kapalin a pro rychlejší vstřebání edémů. Dobrých účinků bylo dosaženo už v 60. letech s vysokými dávkami intravenózně podávané hyaluronátlyázy z hovězích varlat „Dessau“ při akutních *tendovaginitinis* a *paratenonitis crepitans*, při intravenózním léčení plantárních patních ostruh a v dermatologii. Tak došlo k podstatnému zmenšení potíží po léčení hyaluronidázou u progresivní sklerodermie, při cirkumskriptní sklerodermii a u keloidů.

V 70. letech byly činěny pokusy ovlivnit následky srdečního infarktu hyaluronidázou na zvířecím modelu. Cílem studií bylo zmenšení kardiálního areálu nekrózy podmíněné

zrychlenou novou tvorbou tkáně po infarktu a zlepšením periferního prokrvení.

Od 60. let existují literární odkazy, že hyaluronidáza z hovězích varlat může být použita k terapeutickému ovlivnění arteriálních onemocnění cév u lidí, zejména k zlepšení prokrvení periferních cév (například Thurnherr a Koch, citováno u Wolff: Behandlungsergebnisse mit intravenösen Magnesium comp. /Hylase-Mischinjektionen bei Arteriopathien vom Beckentyp im Stadium II. Z. ärztl. Fortbild., 1972, 66, 446-447). Wolff referoval, že hyaluronidáza z hovězích varlat při současném použití hořečnatých iontů, intravenózně aplikovaná (kombinované injekce, týdně třikrát 300 IU po 6 týdnů), zlepšuje prokrvení cév u 90 % sledovaných pacientů s arteriopatií typu Becken ve stadiu II. Grosshenig (v: Ergebnisse der Behandlung degenerativer arterieller Gefässerkrankungen der unteren Extremitäten mit intravenösen Gaben von magnesium compositum „Scharffenberg“ und Hyaluronidase. Dtsch. Ges.-wesen, 1965, 21, 869-872) provedl podobné kombinované léčení u degenerativních onemocnění cév nižších extremít jakož i u pacientů s vysokou degenerativní obliterací cév typu Becken s „jednoznačným úspěchem“. Podával 300 IU třikrát týdně po dobu asi 5 týdnů. V některých těžkých případech zaznamenal úspěch po aplikaci celkem 30 injekcí. Při zkoumání po 6 až 8 týdnech po ukončení léčení nebylo zjištěno žádné zhoršení dosaženého stavu.

Určitě bylo velmi nevýhodné, že byla k dispozici hyaluronidáza z hovězích varlat jenom s relativně malými aktivitami a tím se mohly aplikovat jenom malé enzymové aktivity. Tak neměla jednoměsíční i.v., i.p. nebo s.c. dávka velmi nízké hyaluronidázové aktivity 300 IU u hypercholesteronemických králíků vliv na aterosklerotické změny cév. Opakované podávání tohoto množství po dobu až do

3 měsíců snížilo obsah cholesterolu v krvi a obsah fibrinu plazmy, zvýšilo obsah volného heparinu plazmy, zvýšilo vaskulární permeabilitu ve směru tkáně a vedlo také k významnému snížení ateromatozního plaku cév (A.I. Pertsovskii, S. I. Koval'chuk, V. A. Baronenko, R. N. Gold'man, S. Ya. Guz, a T. L. Fonbarova (1973): Effect of hyaluronidase on the course of experimental atherosclerosis. Kardiologija, 13, 37-40).

Enzym, který byl deklarován jako hyaluronátlyáza a „which appears to be a substantially homogeneous material, is particularly effective hyaluronidase because of its wide specificity“ byl popsán Gottliebem et al. podle GB 1,060,513 ze zvířecích tkání. Enzym byl například v patentech GB 1,098.957 a ve směsi s hyaluronidázou zvířecího původu v patentu GB 1.179,787 navržen k léčení alergických jevů. Gottlieb navrhl také (US 3,708,575) léčit onemocnění cév u lidí jako srdeční arytmie, trombózy, cerebrální infarkty, cerebrální trombózy a srdeční infarkty zejména arteriosklerózu touto hyaluronidázou respektive hyaluronátlyázou. Izotonický sterilní roztok například s 10000 IU/ml se injektuje intravenózně, intraarteriálně nebo intratekálně. Enzym byl získán ze zvířecího materiálu podle údajů chráněných patentem (US 3,708,575). Z popisu vynálezu jednoznačně vyplývá, že se při použití enzymu (enzymů) jedná o použití testikulárních hyaluronidáz. Aktivita esterázy připisovaná enzymu, domnělá široká specifita stejně tak jako metoda, použitá pro určení aktivity, která není specifická pro reakci lyázy, se vztahuje na zvířecí hyaluronidázu. Odpovídajícím způsobem nebyly také uváděny enzymy se specifikou štěpení hyaluronátlyázy ze zvířecích varlat v nejnovější literatuře (Přehled: G.L. Frost, T. Csoka a R. Stern: Trends Glycosci. Glycotechnol. 8, 419 - 434).

Podle údajů uvedených v literatuře je vhodná hyaluronidáza z hovězích varlat, která zvyšuje propustnost krve cévami pro krevní tok, takže ateromatózní usazeniny a pokud možno také konstituenty krevních chuchvalců a krevních trombů rozpouští, odbourává nebo činí propustnými. U konstituentů krevních trombů, které se pokud možno rozpouštějí, by se mohlo jednat o částice plaku, které se z intimy rozpouštějí a na nichž se krevní chuchvalce utvářely.

Dále existují důkazy, že použití hyaluronidázy činí stěny cév propustnějšími jak ve tkáni tak i pokud možno na hraniční tkáni.

Nevýhodou je však při použití hyaluronidázy zvířecího původu, zejména hyaluronidázy z hovězích varlat to, že enzym na základě svého původu s sebou nese nebezpečí přenosu virů, BSE (bovine spongiform encephalopathie) a jiného infekčního materiálu. Dále je nevýhodné, že při přípravě hyaluronidázy k odstranění znečištěnin ve formě obsažených látek, zejména cizích proteinů ze zvířecích materiálů, se musí počítat s velmi vysokými náklady na čištění. Aby se získalo dostatečné množství hyaluronidázy musí se dále - tak jak to odpovídá příslušně velkým množstvím výchozího materiálu - shromažďovat za podmínek, při kterých je zabráněno ztrátám.

Hyaluronidáza ze savčích varlat hydrolyzuje na základě své nespecifity také sulfátované glycosaminoglycany přítomné ve stěně cév. Avšak je možno se domnívat, že dermatansulfát nebo chondroitinsulfát, heparin a heparinsulfát zabraňují připojení krevních trombů na vnitřní stěnu cév vlivem svých inhibičních vlastností. Existuje tudíž možnost, že hydrolyza těchto sloučenin zvyšuje sekundární tvorbu krevních

chuchvalců na intimě a tím by mohla mít testikulární hyaluronidáza také nežádoucí vedlejší účinek.

Sawyer et al. (EU 193330B1) popsal přípravu a použití speciální endo- β -glukoronidázy s molekulární hmotností 28.500 D z pijavic ke stimulaci toku fyziologických kapalin při očních onemocněních. Tento enzym je vysoce specifický pro hyaluronovou kyselinu a liší se od známé endo- β -glukuronidázy z lékařských pijavic (*hirudo medicinalis*) vyšší stabilitou při vyšších teplotách a extrémních hodnotách pH.

Cílem předkládaného vynálezu je zabránit nevýhodám dosud navržených použití hyaluronidáz zvířecího původu jako enzymu odbourávajícího plak tím, že enzymy získané z mikroorganismů ve vhodném galenickém přípravku se použijí jak k terapii tak i k prevenci aterosklerotických cévních změn. Mikrobiální enzymy jsou možnostmi jejich biotechnologické přípravy v zásadě získatelné jednoduchým způsobem.

Cílem vynálezu je též připravit enzymaticky aktivní fragmenty enzymů s aktivitou odbourávat plak jednoduchým způsobem z vhodných mikrobiálních holoenzymů a použít je jako galenické přípravky. Od použití fragmentů se očekává, že jsou ve farmaceutických preparátech stabilnější, při použití méně imunogenní, a že lépe penetrují.

Enzymy připravené podle vynálezu nemají mít dále při podávání vyšších enzymových aktivit po delší dobu negativní vliv na žijící savčí organizmus. Enzymy mají také ovlivňovat jenom omezeně štěpení sulfátovaných glykosaminoglykanů, aby se na jedné straně s hyaluronidázou ze zvířecích varlat dosahovalo srovnatelného rozpouštění plaku a srovnatelných

konstituentů krevních chuchvalců. Na druhé straně nesmí dojít silně omezeným odbouráváním sulfátovaných glykosaminoglykanů v intimě nedostatkem sulfátovaných glykosaminoglykanů k silně zvětšenému nebezpečí tvorby krevních chuchvalců.

Vynález si proto klade za cíl nalézt plak odbourávající enzymy mikrobiálního původu, které jako konstituenty ve farmaceutických formulacích mají při rozpouštění plaku srovnatelný respektive lepší účinek ve srovnání s hyaluronidázou z hovězích varlat, respektive při zmenšování plakem pokrytých vnitřních stěn cév jakož i součástí trombů a krevních chuchvalců při použití v krevním systému cév, které vývoj onemocnění u nemocí cév pozitivně ovlivňují, nejsou toxické a nemají žádné jiné negativní účinky při použití jako injekční preparát u lidí nebo zvířat.

Částí úlohy, která vedla k vynálezu, je také připravit menší protein respektive fragment s aktivitou hyaluronátlyázy a poskytnout způsob její přípravy. Fragment má vykazovat podobné nebo stejné enzymatické aktivitní vlastnosti jako holoenzym.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se proto týká vhodných farmaceutických přípravků k léčení onemocnění cév, která se vyskytují přímo nebo jako následek ateromatózní tvorby plaku. Dále vynález zahrnuje nový fragment enzymu, jeho přípravu jakož i použití.

Podle vynálezu bylo shledáno, že farmaceutický přípravek, který obsahuje jeden nebo více bakteriálních enzymů s aktivitou hyaluronátlyázy (E.C. 4.2.2.1.), zejména hyaluronátlyázu vyměšovanou mikroorganizmy kmene *Streptococcus*, s výhodou obecně dostupných druhů *Streptococcus agalactiae* nebo *Streptococcus eyuisimilis* fermentací do submersního media, respektive fragment enzymu připravený z hyaluronátlyázy, za podmínek *in vitro* uvolňuje materiál nebo rozpouští tenké úseky plaku z izolovaných nánosů plaku, které byly získány z ateromatózních cév savců a lidí.

Dále se prokázalo, že při často opakovaných intravenózních injekcích srovnatelně vysokých enzymatických aktivit, obsahujících farmaceutické přípravky podle vynálezu, které hyaluronátlyázu a/nebo enzymový fragment obsahují, se u živých „Watanabe“ králíků, kteří na základě genetického defektu aorty vykazovali velké nánosy plaku, po léčení v pozoruhodné míře zmenšila plaková usazení v cévách. Zatímco vnitřní cévy neošetřovaných zvířat vykazovaly tenkou bělavou vrstvu povrchového plaku jakož i také tlustší plak, byly vnitřní cévy léčených zvířat bez tenčích usazenin plaku a vykazovaly tmavočervené zabarvení zdravé vnitřní povrchové tkáně. Rozšíření plochy silnějšího usazení plaku byl rovněž redukován.

Je překvapující, že tento účinek není omezen jen na přítomnost holoenzymů s molekulovou hmotností v oblasti od 114.00 do 124.000 D ve farmaceutických přípravcích, nýbrž obzvláště také působí vysoce aktivním stabilním fragmentem holoenzymů s molekulovou hmotností například 84.000 až 86.000 D.

Dále bylo nalezeno, že fragmenty podle vynálezu mohou být připraveny proteolytickým strávením bakteriálních hyaluronátlyáz proteiny, s výhodou proteázou, která štěpí C-koncovou peptidickou vazbu aromatických aminokyselin. V příkladu se s výhodou štěpí hyaluronátlyáza s molekulovou hmotností 116.000 D ze *Streptococcus agalactiae* na enzymaticky aktivní fragment hyaluronátlyázy. Fragment má molekulovou hmotnost 84.000 - 86.000 D. V jeho specifitě štěpení nejsou žádné rozdíly od nestrávené hyaluronátlyázy (holoenzymu). Oproti holoenzymu se však fragment vyznačuje významně vyšší stabilitou ve vodných roztocích a vůči denaturačním činidlům. Fragment má specifickou aktivitu mezi 400.000 IU/ml až 800.000 IU/ml a vykazuje tím oproti holoenzymu se specifickou aktivitou 400.000 IU/mg stejnou, respektive dokonce vyšší specifickou aktivitu.

Vynález se týká tomu odpovídajícího farmaceutického přípravku obsahujícího hyaluronátlyázu mikrobiálního původu jako holoenzym, jejího fragmentu štěpícího hyaluronát nebo směsi obou forem, pokaždé ve vysoce vyčištěné formě a přinejmenším s jedním stabilizátorem anebo farmaceuticky nezávadnou nosičovou nebo pomocnou látku jakož i právě tak farmaceuticky nezávadným ředidlem.

Farmaceutické přípravky podle vynálezu jsou vhodné v první řadě k léčení cévních onemocnění, jako jsou poruchy srdečního rytmu, ateroskleróza, cerebrální infarkty, cerebrální trombózy, koronární trombózy a kardiální infarkty, které pocházejí z přítomnosti ateromatózního plaku v krevních cévách savců (lidí a zvířat).

Podle vynálezu připravené farmaceutické přípravky jsou zejména injekční preparáty pro intravenózní a

intraarteriální injekce, které se skládají z izotonického sterilního vodného roztoku vysoce čistého enzymového proteinu, holoenzymu a/nebo fragmentu nebo definované směsi obou aktivních enzymových specií, přičemž enzymové aktivity jsou mezi 20.000 až 4.000.000 IU/ml. Tyto enzymové proteiny byly s výhodou použity ve formě dosucha vymražené pevné látky, která zpravidla obsahuje stabilizující přísady. Stabilizující přísady mohou být například chlorid sodný, glukóza, hořečnaté sole, polyvinylpyrrolidon, aminokyseliny, albumin, zejména ovalbumin a jeho hydrolyzáty nebo cereální proteiny a jejich hydrolyzáty. Při injekčním použití leží použitá množství hyaluronátlyázy a/nebo jejího fragmentu mezi 2.000 až 12.000 IU/kg tělesné hmotnosti léčeného savce nebo člověka.

Enzym použitý podle vynálezu, respektive fragment, nesvědčí o žádných negativních účincích na zdravotní stav pokusných zvířat. Je nasnadě a patří to i k rozsahu ochrany, že účinek navrženého enzymu a/nebo jeho fragmentu není omezen jenom na odstraňování aktuálních usazenin, nýbrž má také příznivý vliv na onemocnění krevního oběhu jako myokardischémie, infarkt myokardu, koronární infarkt, poruchy srdečního rytmu, ateroskleróza a podobné jevy ve smyslu prevence jakož i terapie.

Výhodné při použití fragmentu podle vynálezu ve srovnání s holoenzymem je, že na základě jeho menší velikosti může vniknout rychleji než holoenzym do pevných vrstev plaku a tudíž působí jejich rychlejší rozrušení.

Aniž by se hyaluronátlyáza nebo její fragment omezovala na jeden určitý mikroorganismus, bude vynález objasněn na příkladu enzymu z obecně dostupného mikroorganismu

Streptococcus agalactiae. Vytvořená hyaluronátlyáza má izoelektrický bod asi $IP = 8,6$ a molekulovou hmotnost asi 116.000 D a působí jako endoglykanáza. Enzym má tu výhodnou vlastnost, že inhibuje sulfátovanými glykosaminoglykany jako například také sulfátovaná hyaluronová kyselina. Dále se uvedeným čistícím procesem pro injekční účely získá jako vysoce čistý enzym nebo se vyčištěná hyaluronátlyáza specificky působící proteázou přemění na fragment. Jako specificky účinná proteáza se může použít - aniž by se tím rozsah vynálezu omezoval - například kyselá metaloproteáza MO/2 (DD 270924), která se může získat z mikroorganismu *Streptomyces hygroscopicus* AP40. Tato proteáza se vyznačuje molekulovou hmotností asi 14.000 kD a izoelektrickým bodem mezi 3,85 až 4,0.

Také následující detailní popis přípravy holoenzymu a také fragmentu, zejména pořadí kroků čištění, má charakter příkladu a neomezuje rozsah ochrany. Příprava vysoce čistého hyaluronátlyázy a vysoce čistého fragmentu v galenickém přípravku vhodném k injekcím se může například, pokud jde o pořadí a také o výběr kroků čištění, provádět neomezeným způsobem nezahrnutým v rozsahu ochrany vynálezu.

Fermentace mikroorganismu, například shora zmíněného, se provádí v míchaném fermentoru za udržování konstantního pH při aciditě 6,5 až 7,5. Kyselina mléčná produkovaná během fermentace se neutralizuje přidáním zředěného louhu sodného. Médium se skládá z anorganických solí, kvasinkového hydrolyzátu, podle volby kaseinpeptonu nebo sojapeptonu jakož i glukózy. Po asi dvacetihodinové fermentaci se buňky separují. Buněčná hmota se vyhodí.

Filtrát kultury se koncentruje v ultrafiltračním přístroji a čistí. Hranice výběru (cut off)

ultrafiltrovaného modulu leží mezi 30 až 50 kD. Vzniká předčištěný enzymový roztok, který musí být podroben dalším krokům čištění dříve než může být použit jako injekční preparát. Kroky čištění a použití pomocných látek zajišťují to, aby injekční preparát neobsahoval pyrogen.

Po zvýšení iontové síly přidáním síranu amonného až do nasycení 40 % se enzym adsorbuje na Phenylsepharose. Potom následuje desorpce neutrálním pufovaným vodným roztokem, který obsahuje 25 % síranu amonného, vztaženo na 100 % sycení. Roztok se po kroku dialýzy smíchá kvůli odstranění znečištěnin s Q-Sepharosou (Pharmacia). Potom se provede specifická adsorpce na barevnou látku, například na aminofenyloxaminovou kyselinu.

Konečné čištění spolu s určením molekulové hmotnosti se provede gelovou permeační chromatografií na Superdexu (Pharmacia).

Použije-li se *Streptococcus equisimilis* jako streptokok produkující enzym, odpadá čistící krok adsorpcí na barvivo. Tento enzym účinkuje jako exoglykanáza, jeho izoelektrický bod leží mezi pH 4,5 a 4,8 a je inhibován jen ve velmi malé míře sulfátovanými glykosaminoglykány.

Částečné strávení holoenzymu na fragment se provádí imobilizovanou nebo také neimobilizovanou specifickou proteázou. Výhodné na reakci s imobilizovanou proteázou je, že se docílí strávení a to samo může být provedeno bez kontaminace samotnou proteázou. V případě přímé reakce s přidanou proteázou musí po strávení následovat krok inaktivace proteázy, separace proteinu proteázy a důkladné čištění. Enzymová frakce se může použít k přípravě fragmentu následujícím způsobem:

Specificky štěpící proteáza MO/2 se váže známým způsobem například na Sepharose. Imobilizovaná proteáza se například při pH 7,5 a teplotě 37 °C smíchá s vodným roztokem hyaluronátlyázy. Po dokončeném strávení se fragment vysráží síranem amonným a pomocí gelové permeační chromatografie se získá ve vysoce čisté formě. Vyčištěný enzym nebo fragment enzymu vykazují po imunizaci u králíků jenom specifické srážení. Monoklonálními protilátkami byly všechny dokazatelné pásy v „Blot“ analýze zbarveny. Holoenzym má specifickou aktivitu asi 400.000 IU/mg a specifická aktivita fragmentu leží přibližně u 400.000 až 800.000 IU/mg. Ke stabilizaci se přidal k enzymu respektive k fragmentu alespoň jeden stabilizátor například albumin, s výhodou ovalbumin a anorganické sole.

Aniž by to vynález omezovalo, je třeba popsat metodu přípravy fragmentu. Podle vynálezu se použijí ke strávení proteázy, které štěpí C-koncovou peptidickou vazbu aromatických aminokyselin. V jednom příkladu výhodného provedení se používá metaloproteáza MO/2, která se připraví z filtrátu kultury *Streptomyces hygroscopicus* (strain AP40) MO/2 je metaloenzym s Co^{++} v aktivním centru (DD 270 924). Proteázy se s výhodou používají ve vyčištěné formě. Čištění proteázy MO/2 se provádí například chromatografií na Phenylsepharoseze, DEAE-sepharose, Q-sepharose a Sephacrylu S100 s obohacovacím faktorem 20. Specifická aktivita leží u 0,25 Kunitzových jednotek (U/mg), reakční maximum při aciditě pH = 4,2 a maximu reakční teploty u 65 °C. Molekulární hmotnost (Mm) enzymu určená SDS gelovou elektroforézou a permeační gelovou chromatografií na Sephadexu G50 superfine činí Mm = 14.000 až 15.000 D. Proteáza MO/2 je endopeptidáza s izoelektrickým bodem u IP = 3,85 a ještě jedním u 3,92. Enzym hydrolyzuje přírodní

polypeptidy jako kasein, hemoglobin, hovězí serum, albumin a ovalbumin.

Výhodou použití proteázy MO/2 je, že enzym protein velmi specificky štěpí respektive má velmi malou obecnou stravovací aktivitu vůči proteinu. Tento enzym štěpí skoro výlučně jenom peptidické vazby C-koncových zbytků aromatických aminokyselin. Má esterolytickou aktivitu vůči N-benzoyl-L-prolin-nitroanilidu a má výrazné vlastnosti mléčného srážení. Vlastnosti mléčného srážení, které jsou prokazatelné tvorbou dlouhodobě stabilního kaseinového gelu, srovnatelné vlastnostmi gelu, který se při srážení mléka vyskytuje u velmi specificky účinkujícího labenzymu, jsou jako další kladně hodnocená indikace limitovanou, avšak pro vynález velmi výhodnou aktivitou proteázy MO/2 štěpit vazby holoenzymu specificky, aniž by to vedlo k odbourávání fragmentů.

V dalším provedení vynálezu se váže proteáza MO/2 rovněž na vhodné nerozpustné imobilizační suporty a v této formě se použije ke štěpení holoenzymu. Výhodou tohoto postupu je, že se tímto způsobem brání přechodu rozpuštěné proteázy do roztoků fragmentů.

Podle vynálezu se fragment připravuje částečným strávením respektive proteolytickým částečným odbouráním holoenzymu specificky působící proteázou, která štěpí peptidickou vazbu přednostně na C-koncové straně aromatických aminokyselin.

Vysoce čisté roztoky enzymu nebo frakce obsahující fragment mohou být použity po koncentrování za částečného odstranění vody a rovněž za přidání stabilizátorů, pomocných látek a farmakologicky aktivních látek a sterilní filtrace

jako injekční preparáty. Vysoce čistý roztok enzymů respektive fragmentů se může sušit vymrazováním po sterilní filtraci například za použití 5 mM chloridu hořečnatého a 1 % vaječného albuminu. Vymražený enzym respektive fragment se může rozpouštět v roztoku kuchyňské soli jako izotonický injekční preparát.

Vynález se rovněž týká použití hyaluronátlyázy mikrobiálního původu, jejího fragmentu štěpícího hyaluronát nebo směsi obou forem k léčení cévních onemocnění, jako jsou poruchy srdečního rytmu, ateroskleróza, cerebrální infarkty, cerebrální trombózy, koronární trombózy a kardiální infarkty, které pocházejí z přítomnosti ateromatózního plaku v krevních cévách savců a člověka.

Další předmět předkládaného vynálezu se týká fragmentů bakteriálních hyaluronátlyáz s aktivitou hyaluronátlyázy.

Následující příklady provedení slouží k objasnění vynálezu, aniž by ho omezovaly.

Příklady provedení vynálezu

Experimentální část

Příklad 1

Fermentace se provádí v míchaném fermentoru o celkovém plnicím objemu 30 l. Pracovní objem činí 20 l. K naočkování je určen všeobecně dostupný kmen druhu *Streptococcus agalacticae*, který se v Německé sbírce mikroorganismů a buněčných kultur (DSM GmbH) v Braunschweigu nachází pod číslem 2134^y (=ATCC 13813= NCT C8181). Konzervace kmenu se dosáhne kryokonzervou (Mast-diagnostica). Koule pokrytá

hmotou kmenu se vloží do šikmé agarové trubičky s agarem na počítání zárodků a pohybem přivede do styku s povrchem agaru (kultura A). Potom se kvůli kontrole sterility svinutá koule vloží do 3 ml bujónového media „srdce-mozek“ (kultura B). Obě kultury se kultivují 24 h při 37 °C jako kultury ve stojatém postavení.

1. předkultura

Do dvou 100 ml baněk se sešikmennou plochou se umístí 2 x 50 ml média, které obsahuje 5 g/l kaseinového peptonu a 10 g/l kvasnicového extraktu (Difco), a sterilizují se při pH 7,0. K tomu se k 50 ml kultivačního média přidá 5 ml Eagle média pokaždé krátce před naočkováním. Naočkování se provede proplachováním šikmé agarové trubičky kultury A kultivačním roztokem kultury B. Baňky se sešikmením se kultivují za třepání (150 rpm) při 37 °C po 24 h.

2. předkultura

2 x 1 l média, skládajícího se z 20 g/l kvasnicového extraktu a 10 g/l pankreatického peptonu, 1,75 g/l octanu sodného, 7 g/l hydrogenuhličitanu sodného (samostatně rozpuštěného), 7 g/l hydrogenufosforečnanu sodného $\times 2H_2O$ a 3,5 g/l dihydrogenufosforečnanu sodného se před sterilizací upraví na pH 6,2 pomocí 20 % H_2SO_4 . Po autoklávování leží pH kolem 7,0. Roztok obsahující 6,0 g/l roztoku glukózy se autoklávuje odděleně. Odtud se přidá 100 ml před naočkováním 2. předkultury. Naočkování se uskuteční přidáním 50 ml 1. předkultury (naočkování 5 % v/v). Kultivace probíhá za pomalého třepání při asi 45 rpm při 32 °C po 24 hodin.

Hlavní kultura

Médium hlavní kultury se skládá z 20 g/l kvasnicového extraktu, 10 g/l pankreatického peptonu a 25 g/l glukózy. Glukóza se autoklávuje samostatně. Naočkování se uskuteční litrem 2. předkultury. Fermentační parametry činí: 34 °C , pH 7,0, provzdušňování přes hlavový prostor (25 l/min vzduchu) a rychlost míchání 150 rpm. pH bylo v průběhu titrace udržováno konstantní pomocí titrace 40 % roztokem sodného louhu. Glukóza byla přidávána manuálně tak, aby koncentrace glukózy neklesla pod 5 g/l. Po 20 hodinách byla kultivace ukončena.

Příklad 2

50 l kultivačního roztoku fermentace druhu *Streptococcus agalacticae* s aktivitou hyaluronátlyázy 400 IU/ml se pomocí sterilní filtrace 0,2 µm filtrem zbaví živých buněk. Čirý roztok kultivačního filtrátu je potom ultrafiltrací při cut off 60.000 D zkoncentrován na 2 l kultivačního koncentrátu. K těmto 2 l kultivačního koncentrátu se přidá 480 g pevného síranu amonného. Proteiny, které při této koncentraci vypadnou, jsou potom odděleny vyčeřovací filtrací za použití filtračních pomůcek a čirý koncentrát se nanese na fenylsefárový sloupec 2,5 x 20 cm, předem equilibrovaný 40 % roztokem síranu amonného pH 6,5, pufrovaným fosfáty. Po vymytí 35 % roztokem síranu amonného pH 6,5 pufrovaným fosfáty je hyaluronatlyáza eluována 25 % roztokem síranu amonného pH 6,5 pufrovaným fosfáty. Eluované frakce se sjednotí a přidáním pevného síranu amonného nastaví na 80 % nasycení. Vypadlý precipitát se sbírá a rozpouští v 100 ml 0,03 M trispufu pH 8,2 a dialyzuje proti stejnému pufu. Potom se dialyzovaný surový

roztok hyaluronátlyázy prohání přes equilibrovaný Sepharose-sloupec 2,2 x 15 cm. Hyaluronátlyáza se nachází v eluátu. Eluát se nasytí na 80 % přidáním pevného síranu amonného. Vypadlý protein se sbírá, rozpouští v 0,05 M trispufru pH 8,7 a na sloupci Sephadex G 10 se zbavuje síranu amonného. Takto equilibrovaný roztok obsahující hyaluronátlyázu se nanese na přiměřeně equilibrovaný afinitní sloupec (0,8 cm x 10 cm) z agarózy s kyselinou N-(p-aminofenyl)-oxaminovou a eluuje se 0,1 M roztokem Na_2CO_3 pH 9,7.

Eluované frakce obsahující hyaluronátlyázu se spojí a vysráží nasycením na 80 % síranem amonným. Vypadlý precipitát se sbírá, rozpouští v 1 ml 0,1 M trispufru pH 7,5 a nanese na sloupec Superdex 200 (16 x 60). Proteinový pás hyaluronátlyázy při 116.000 D se sbírá a dialyzuje proti 0,02 M trispufru pH 7,5, který obsahuje 0,005 M MgCl_2 . Získá se 10 mg hyaluronátlyázy se specifickou aktivitou 400.000 IU/mg. K dialyzovanému roztoku hyaluronátlyázy se přidá ovalbumin v 1 % koncentraci a roztok se vysuší lyofilizací.

Příklad 3

Podle příkladu 1 a 2 se předkultivuje mikroorganismus druhu *Streptococcus equisimilis*, kultivuje se a získá se enzym v čisté formě. Odpadá krok zpracování čištěním přes agarózu s kyselinou N-(p-aminofenyl)-oxaminovou.

Příklad 4

10 mg čištěné proteázy MO/2 se rozpustí ve 2 ml 0,1 M roztoku hydrogenuhličitanu sodného. K tomu se přidá 1 ml Bromcyan-Sepharosy (Pharmacia) a protřepává 12 hodin při 4 °C. Potom se nespojený roztok obsahující MO/2 oddělí od

vznikající MO/2-proteázové sefarózy fritou. Potom jsou nenasyčená vazebná místa na Bromcyan-Sepharose blokována reakcí s 2 ml 0,1 M roztoku glycinu. Po obsazení se MO/2-Sepharosa vymyje 0,1 M kyselinou octovou o pH 4,5 a 0,1 M roztokem hydrogenuhličitanu sodného.

10 mg hyaluronátlyázy ze *Streptococcus agalacticae* se rozpustí v 1 ml 0,05 M fosfátového pufru pH 7,0 a temperuje v termostatu na teplotu 37 °C. K tomuto roztoku se přidá 0,25 g fixované MO/2-proteázové sefarózy, ke které je vázána proteolytická aktivita 0,1 Kunitzových jednotek. Po 15 minutách se proteázová sefaróza oddělí a vzniklý fragment vypadává z roztoku po nasycení síranem amonným na 80 %. Po 18 hodinách se sediment sbírá a rozpouští v 0,05 M trispufu pH 7,5. Fragment se čistí gelovou permeační chromatografií na Superdexu 200. Aktivní frakce fragmentu se sjednotí, dialyzují proti 0,05 M trispufu a lyofilizují za přidání albuminu. Fragment má specifickou aktivitu 600 000 IU/mg.

Příklad 5

4 mg hyaluronátlyázy ze *Streptococcus agalacticae* se rozpustí v 0,05 M tris-HCl-pufu pH 7,8 a v termostatu temperuje na 37 °C. K tomuto roztoku se přidá 80 µg proteázy MO/2 se specifickou aktivitou 0,1 Kunitzových jednotek/mg a směs se nechá trávit po 30 minut při 37 °C. K zastavení reakce se ke směsi přidá 10 µl 0,1 M EDTA pH 7,0. Potom se směs nanese na 3 ml afinitní sloupec z agarózy s kyselinou N-(p-aminofenyl)-oxaminovou a eluuje 0,05 M Na₂CO₃ pH 9,7. Fragment byl vysrážen nasycením na 80 % síranem amonným, sbírán a vyčištěn gelovou permeační chromatografií. Aktivní frakce fragmentu se sjednotí, dialyzují proti 0,05 %

trispufru a lyofilizují přidáním albuminu. Fragment má specifickou aktivitu 460 000 IU/mg.

Příklad 6

0,5 ml roztoku fragmentu hyaluronátlyázy (příklad 4) je přidáno k 0,5 ml 0,1 M acetátového pufru pH 6,0 a ředí se formou geometrické řady. Poté je ke každému zředění přidáno 0,5 ml roztoku kyseliny hyaluronové, který obsahuje 0,2 mg kyseliny hyaluronové / ml 0,1 M acetátového pufru pH 6,0. Tato směs se potom inkubuje 30 minut při 37 °C. Enzymová reakce se zastaví tím, že se ke každému zředění přidají 2 ml 2,5 % roztoku cetyltrimetylammoniumbromidu v 2 % sodném louhu. Po 20 minutách stání při pokojové teplotě se měří zákal v každém zředění při 600 nm v 1 cm kyvetách a na kalibrační křivce se určí množství rozštěpené kyseliny hyaluronové. Pět mezinárodních jednotek (IU) fragmentu hyaluronátlyázy štěpí 16 µg kyseliny hyaluronové/min.

Příklad 7

Vždy 20.000 IU holoenzymu a fragmentu (příklad 4) se rozpustilo ve 3 ml destilované vody. Oba roztoky byly ponechány 24 h při pokojové teplotě a potom byla změřena aktivita enzymu. Aktivita roztoku holoenzymu klesá v uvedeném časovém intervalu na 60 %, zatímco aktivita roztoku fragmentu činí 95 % aktivity výchozích roztoků.

Příklad 8

Určení aktivity hyaluronátlyázy respektive fragmentu

1. Optický test při 232 nm

Byly připraveny zásobní kmenové roztoky pro kyselinu hyaluronovou (HA) a sulfátovanou kyselinu hyaluronovou (mg/ml) a uchovávány při 4 °C. Násada standardního testu se provede v 3 ml křemenných kyvetách ($d = 1$ cm) při vlnové délce 232 nm a teplotě 26 °C následujícím způsobem. K 1,8 ml 0,1 M acetátového pufru pH 6,0 se přidá 200 μ l kmenového roztoku kyseliny hyaluronové a reakce se nastartuje se 2 až 4 U/ml (50 ml) hyaluronátlyázy. Konečný objem činí 2050 μ l.

Pro brzdicí pokusy se výše popsaná násada standardního testu upraví takto: K 1,5 až 1,8 ml pufru se přidá 300 až 500 μ l sulfatované kyseliny hyaluronové a 200 μ l kyseliny hyaluronové a reakce se nastartuje přidáním hyaluronátlyázy. Hyaluronátlyáza je parciálně nekompetitivně inhibována. Hodnota K_i činí $5,5 \times 10^{-4}$ mg/ml.

Hyaluronátlyáza vykazuje lineární stoupání extinkce při 232 nm, z jejíž směrnice lze určit aktivitu. Výpočet je založen na extinkčním koeficientu $\epsilon = 6,0 \times 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pro vytvořený $\Delta^{4,5}$ -nenasycený uronid (J. Ludowig: The mechanism of hyaluronidases. JBC 236, 333-339 (1991)).

2. Optický test při 600 nm na mikroleskách

Určení lyázové aktivity podle práce D. Gerlach, W. Köhler „Hyaluronatlyase von *Streptococcus pyogenes*. II. Charakterisierung der Hyaluronatlyase“ (E.C. 4.2.2.1.) Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221, 296-302 (1972)

Z kmenového roztoku (50.000 U/ml) se ředěním 1:50 připraví roztok hyaluronátlyázy. K 0,5 ml roztoku hyaluronátlyázy se přidá k 0,5 ml 0,1 M acetátového pufru pH 6,0 a zředí formou geometrické řady. Poté se ke každému zředění přidá 0,5 ml roztoku kyseliny hyaluronové obsahujícího 0,2 mg/ml 0,1 M acetátového pufru pH 6,0. Tato směs se potom inkubuje při 37 °C po 30 minut. Enzymová reakce se zastaví, pokud se ke každému zředění přidají 2 ml roztoku cetyltrimetylammoniumbromidu v 2 % sodném louhu. Po 20 minutách při pokojové teplotě se zákal v každém zředění měří při 600 nm v 1 cm kyvetách a z kalibrační křivky se určí množství rozštěpené kyseliny hyaluronové. 5 mezinárodních jednotek (IU) hyaluronátlyázy štěpí 16 µg kyseliny hyaluronové/min.

Příklad 9

10 mg hyaluronátlyázy (holoenzymu) se rozpustí v 1 ml 0,05 M fosfátového pufru pH 7,0 a v termostatu temperuje na 37 °C. K tomuto roztoku se přidá 0,25 g specificky štěpící proteázové sefarozy s proteolytickou aktivitou 0,1 Kunitzových jednotek/mg. Po 15 minutách se nerozpustná proteázová sefaroza oddělí a vzniklý fragment vypadne z roztoku nasycením na 80 % síranem amonným. Po 18 hodinách se sediment oddělí a rozpustí v 0,05 M trispufu pH 7,5. Fragment se čistí gelovou permeační chromatografií na Superdexu 200. Aktivní frakce jsou spojeny , dialyzovány proti 0,05 M trispufu a lyofilizovány přidavkem albuminu.

Příklad 10

Pro důkaz aktivity hyaluronátlyázy rozpouštět plak jsou z lidské neointimy *arteria carotis interna* odebrány asi 0,3 mm velké, žlutobílé kousky tkáně (kousky plaku - pláty),

suspendovány do roztoků hyaluronátlyázy (asi 20.000 IU v 1 ml trispufru, 10 mM, pH 7,0) a inkubovány po 12 hodin při pokojové teplotě. Došlo k částečnému rozrušení dříve ostrých fázových rozhraní kousků plaku právě tak jako k uvolnění suspendovaného jemně rozptýleného materiálu. Paralelně byly kousky plaku ošetřeny pouze trispufrem. Přitom nedošlo k žádným známkám rozpouštění.

Příklad 11

Pokus s fragmentem hyaluronátlyázy na rozpouštět ateromatózní usazeniny v cévách lidského původu:

Asi 0,3 mm velké žlutobílé kousky tkáně odebrané z neointimy lidské *arteria carotis interna* (kousky plaku) byly suspendovány v roztoku fragmentu (asi 15.000 IU v 1 ml trispufru, 10 mM, pH 7,0) a inkubovány po 12 hodin při pokojové teplotě. Došlo k pokračujícímu rozpouštění dříve ostrých fázových rozhraní kousků plaku právě tak jako k uvolňování suspendovaného jemně rozptýleného materiálu. Paralelně byly kousky plaku ošetřeny jen trispufrem. V tomto případě nedošlo k žádnému rozpouštění.

Příklad 12

Vliv hyaluronátlyázy na ateromatózní usazeniny v cévách u králíků Watanabe Ibm: WHHL (Watanabe heritable hyperlipidemia). Králík byl chován od roku 1981 Y. Watanabem, Univerzita Kobe, Japonsko a roku 1992 se dostal jako vypěstovaný kmen do Charles River Savo a od roku 1994 se dále chová v Broekmanově institutu v Someren, Nizozemí. Králík Watanabe má dědičnou hypercholesterolémii, způsobenou dědičně podmíněným deficitem LDL receptorů. Následkem hypercholesterolémie (>400 mg/100 ml plazmy) dochází u

všech zvířat k časně arterioskleróze aorty.

14 dní před začátkem pokusu bylo 10 králíků Watanabe (Ibm: WHHL; 4♀ a 6♂) stáří od 9 do 11 měsíců zakoupeno z Broekmanova institutu v Someren, Nizozemí. Zvířata byla umístěna jednotlivě v klecích (0,5 x 1 m) při teplotě místnosti $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a zaopatřena standardním krmivem (*ssniff* držení králíků) a pitnou vodou ad libitum.

Před začátkem pokusu, tedy před 1. klinicko-chemickým studiem, se 10 králíků, rozdělených podle pohlaví, randomizovalo a poté označilo čísla 1 - 10.

Zvířata dostávala 3x týdně (pondělky, čtvrtky a pátky) infuze. 4 kontrolním králíkům (1 - 4) bylo podáváno vždy 20 ml apyrogenního 0,9 % roztoku NaCl intravenózně (i.v.) po dobu 1 hodiny. 6 pokusných zvířat (5 - 10) dostalo i.v. vždy s infuzním objemem 20 ml apyrogenního 0,9 % roztoku NaCl 30 000 IU vysoce čištěné hyaluronátlyázy na hodinu. To odpovídá dávkování 10.000 IU/kg tělesné hmotnosti.

Během pokusu bylo sledováno všeobecné chování, tělesná hmotnost (KM), tělesná teplota a klinicko-chemické parametry (cholesterol, triglyceridy a amyláza).

Všeobecné chování zvířat nebylo pozoruhodně ovlivněno ani podáváním 0,9 % roztoku NaCl ani hyaluronátlyázou. Tělesné hmotnosti dospělých králíků Watanabe, kontrolních nebo ošetřených hyaluronátlyázou, se v době ošetřování od 18.11.96 do 3.2.97 změnily jen nepatrně.

Změny tělesné teploty, měřené před a po každé infuzi, kolísaly v rozmezí od $-0,3$ do $+1,2^{\circ}\text{C}$. Nebyly změřeny nápadné rozdíly mezi kontrolními a hyaluronátlyázou léčenými králíky. Hodnoty sérového cholesterolu kontrolních zvířat se

infuzí 0,9 % roztoku NaCl podstatně nezměnily. U jednoho ze čtyř (1/4) došlo ke snížení koncentrace cholesterolu v séru na polovinu.

Podávání hyaluronátlyázy také nevedlo k nápadnému posunutí koncentrací sérového cholesterolu. Při infuzním podání částečně poklesly u všech zvířat velmi vysoké hodnoty sérových triglyceridů.

Po 20. infuzi ležely hodnoty u kontrol mezi 570 a 740 mg/dl a u králíků léčených hyaluronátlyázou mezi 200 a 290 mg/dl.

U 2 ze 4 kontrolních králíků byly oblouky aorty značně ateromatózní a u 2 ze 4 středně až značně. U 2 ze 6 králíků léčených hyaluronátlyázou byly oblouky aorty středně a u 4 ze 6 nepatrně až středně ateromatózní.

U 2 ze 4 kontrolních králíků byla *a. thoracica* značně ateromatózně a u 2 ze 4 středně ateromatózně potažena. U 4 ze 6 hyaluronátlyázových králíků byla *a. thoracica* nepatrně ateromatózní a u 2 ze 6 byly povlaky sotva znatelné.

U 2 ze 4 kontrolních králíků byla *a. abdominalis* značně a u 2 ze 4 málo až středně ateromatózní. U 2 ze 6 hyaluronátlyázových králíků byly znatelné střední a u 4 ze 6 slabé až nepatrné povlaky.

U 2 ze 4 kontrolních králíků byly *aa. pulmonalis* silně potaženy plakem a u 2 ze 4 málo až středně.

U 1 ze 6 hyaluronátlyázových králíků byla *a. pulmonalis* potažena plakem silně, u 2 ze 6 málo až středně a u 3 ze 6 se nevyskytoval žádný plak.

Všeobecné chování, vývoj tělesné hmoty, tělesná teplota před a po infuzích a klinicko-chemické parametry králíků Watanabe ošetřených 0,9 % roztokem NaCl a hyaluronátlyázou nevykazovaly během dvou cyklů ošetřování žádné nápadné rozdíly, takže lze usuzovat na dobrou snášenlivost infuzních roztoků.

Subjektivní hodnocení makroskopického materiálu z aorty prokazuje, že se - co do rozsahu - jeví ateromatózní povlaky u 4 králíků Watanabe ošetřených 0,9 % roztokem NaCl značnější než u 6 králíků Watanabe léčených mikrobiální hyaluronátlyázou.

Příklad 13

Vysoce čistý koncentrovaný roztok enzymu se zředí takovým množstvím roztoku kuchyňské soli, aby vzniklý roztok obsahoval 0,9 % kuchyňské soli a 10.000 IU/ml hyaluronátlyázy. Roztok se sterilně filtruje přes sterilní filtr s šířkou pórů 0,2 μ m. Z tohoto roztoku se za sterilních podmínek plní do ampulí vždy 1 ml. Ampule jsou za sterilních podmínek sušeny vymrazováním a za sterilních podmínek uzavřeny. Před injekcí se přidává 1 ml sterilní destilované vody.

Příklad 14

Vysoce čistý roztok enzymu je zředěn roztokem nikotinátu hořečnatého a adipinátu hořečnatého (Magnesium compositum „Scharffenberg“) tak, aby vzniklý roztok obsahoval 25 mg nikotinátu hořečnatého a 88 mg adipinátu hořečnatého a 10.000 IU/ml hyaluronátlyázy. Roztok se plní do ampulí jako v příkladu 13.

Příklad 15

Roztok vysoce čisté hyaluronátlyázy se zředí roztokem kuchyňské soli a vaječného albuminu tak, aby roztok obsahoval 40.000 IU/ml, 0,9 % kuchyňské soli a 1 % vaječného

albuminu. Roztok se dále zpracovává tak, jak je popsáno v příkladu 13.

Příklad 16

Roztok vysoce čisté hyaluronátlyázy se zředí roztokem kuchyňské soli a sójového proteinového hydrolyzátu tak, aby roztok obsahoval 40.000 IU/ml, 0,9 % kuchyňské soli a 1 % hydrolyzátu připraveného ze sójového proteinu. Roztok se dále zpracovává tak, jak je popsáno v příkladu 13.

Příklad 17

Roztok vysoce čistého fragmentu holoenzymu ze *Streptococcus agalacticae* se zředí roztokem kuchyňské soli a vaječného albuminu tak, aby roztok obsahoval 40.000 IU/ml, 0,9 % kuchyňské soli a 1 % vaječného albuminu. Roztok se dále zpracovává tak, jak je popsáno v příkladu 13.

Příklad 18

Vysoce čistý koncentrovaný roztok fragmentu ze *Streptococcus agalacticae* se zředí roztokem kuchyňské soli a chloridem hořečnatým tak, že vzniklý roztok obsahuje 0,9 % kuchyňské soli a 100.000 IU/ml lyázové aktivity. Roztok se sterilně filtruje sterilním filtrem s šířkou pórů 0,2 μ m. Z tohoto roztoku se za sterilních podmínek plní do ampulí vždy 1 ml. Ampule jsou za sterilních podmínek vysušeny vymrazováním a za sterilních podmínek uzavřeny. Před injekcí se přidává 1 ml sterilní vody.

PATENTOVÉ NÁROKY

69691

1. Farmaceutické přípravky obsahující hyaluronátlyázu bakteriálního původu jako holoenzym, jako její fragment štěpící hyaluronát nebo jako směs obou forem a alespoň jeden stabilizátor a/nebo farmaceuticky nezávadnou nosičovou nebo pomocnou látku.

2. Farmaceutické přípravky podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že hyaluronátlyáza pochází z mikroorganismu rodu *Streptococcus*.

3. Farmaceutické přípravky podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že hyaluronátlyáza pochází z mikroorganismu *Streptococcus agalactiae*.

4. Farmaceutické přípravky podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že bakteriální hyaluronátlyáza ve formě holoenzymu má izoelektrický bod v oblasti $IP = 8,6$ a molekulovou hmotnost v oblasti 116 kD.

5. Farmaceutické přípravky podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že fragment hyaluronátlyázy má molekulovou hmotnost v oblasti 84 - 86 kD.

6. Farmaceutické přípravky podle nároku 1 pro léčení cévních onemocnění vybraných ze skupiny srdečních arytmií, aterosklerózy, cerebrálních infarktů, trombóz, koronárních trombóz a srdečních infarktů.

7. Farmaceutické přípravky podle nároku 1 obsahující fragment hyaluronátlyázy štěpící hyaluronát získaný z bakteriální hyaluronátlyázy prostřednictvím parciální

enzymatické hydrolýzy proteázou, která štěpí peptidickou vazbu C-koncového zbytku aromatických aminokyselin.

8. Farmaceutické přípravky podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že to jsou injekční preparáty pro intravenózní nebo intraarteriální injekce.

9. Farmaceutické přípravky podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že aktivita hyaluronátlyázy mikrobiálního původu a/nebo jejího fragmentu je mezi 20 000 až 4 000 000 IU/ml.

10. Farmaceutické přípravky podle nároku 1 zahrnující vyčištěný vodný injekční roztok obsahující hyaluronátlyázu a/nebo její fragment a cca 1 % (w/w) albuminu a/nebo jeho hydrolyzátu.

11. Farmaceutické přípravky podle nároku 1 zahrnující vyčištěné vodné injekční roztoky obsahující hyaluronátlyázu a/nebo její fragment a hořečnaté soli.

12. Farmaceutické přípravky podle nároku 1, zahrnující vyčištěné vodné injekční roztoky obsahující hyaluronátlyázu a/nebo její fragment a glukózu.

13. Fragment enzymu bakteriální hyaluronátlyázy **vyznačující se tím**, že vykazuje aktivitu hyaluronátlyázy.

14. Fragment enzymu podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že hyaluronátlyáza pochází z mikroorganismu rodu *Streptococcus*.

15. Fragment enzymu podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že hyaluronátlyáza pochází z mikroorganismu rodu *Streptococcus agalactiae*.

16. Fragment enzymu podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že se připravuje z bakteriální hyaluronátlyázy parciální enzymatickou hydrolýzou pomocí proteázy, která štěpí peptidickou vazbu C-koncového zbytku aromatických aminokyselin.

17. Fragment enzymu podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že se připravuje tak, že se bakteriální hyaluronátlyáza podrobí enzymatické parciální hydrolýze proteázou v imobilizované formě na nosiči.

18. Fragment enzymu podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že se připravuje tím, že bakteriální hyaluronátlyáza se podrobí enzymatické parciální hydrolýze metaloproteázou MO/2 v imobilizované formě na nosiči.

19. Fragment enzymu podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že se připravuje tím, že bakteriální hyaluronátlyáza ze streptokoků se podrobí enzymatické parciální hydrolýze metaloproteázou MO/2 při aciditě v oblasti pH 6,5 - 8,0 a teplotách v oblasti od 25 °C až 45 °C.

20. Fragment enzymu podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že se připravuje tím, že hyaluronátlyáza z *Streptococcus agalactiae*, s molekulovou hmotností cca 115.000 - 120.000 D, se podrobí enzymatické parciální hydrolýze.

04.10.00

21. Fragment enzymu podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že vykazuje molekulovou hmotnost cca 84.000 - 86.000 Dalton.

22. Fragment enzymu podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že vykazuje specifickou aktivitu od 400.000 do 800.000 IU/mg.