

P 0 1 0 3 8 5



A2

Mikróba eredetű, hialuronsavbontó enzimet tartalmazó gyógyászati készítmény

KIVONAT

A találmány tárgya gyógyászati készítmény, amely különösen injekciós készítményként ateromatózisos lerakódásokra visszavezethető érbetegségek kezelésére alkalmas. Az injekciós készítmény baktérium eredetű hialuronát-liázt, illetve a hialuronát-liázból előállított hialuronát-bontó enzimfragmenst tartalmaz. Az utóbbi fragmens szintén a találmány tárgyát képezi. A fragmenst úgy állítják elő, hogy a holoenzimet fajlagosan bontó proteázzal kezelik.

2001.10.04

Mikróba eredetű hialuronsavbontó enzimet tartalmazó gyógyászati készítmény

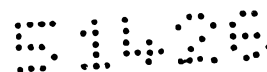
A2

Emberek és emlősek artériáinak belső falán, az ún. intimán növekvő életkorban vagy kóros állapotokban hidrofób plakkok rakódnak le, amelyek az artériafal megkeményedéséhez, lézióhoz és az erekben kialakuló neointima miatt a belső keresztmetszet csökkenéséhez vezetnek. A véredények megváltozása kóros jelenségekkel, így szívarritmiával, trombuszképződéssel és trombizissal, agyi infarktussal, magas vérnyomással és a vérellátás rosszabodásával szoros összefüggésben áll.

A találmány gyógyászati készítményekre vonatkozik, amelyeknek az a tulajdonsága, hogy intraartériális vagy intravénás alkalmazás esetén az intima plakkokkal lerakódott felületeit csökkentik, illetve a plakkos felületeknek a vérátáramlásra gyakorolt hatását csökkentik. Ez a hatás szoros összefüggésben áll azzal, hogy a találmány szerinti gyógyászati készítményekben egy komplett enzim (holoenzim) és/vagy egy, ebből az enzimből előállítható újszerű, kisebb enzimfragmens van jelen.

A javasolt enzim egy hialuronát-liáz, és a fragmens is hialuronsav-bontó aktivitással rendelkezik. Ez az aktivitás főleg a hialuronsav előnyös lebontásához vezet. Ezen túlmenően a találmány új, különleges enzimes bontófolyamattal előállított enzimfragmensekre is vonatkozik.

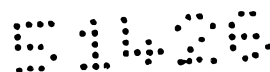
A hialuronsav a kondroitin-szulfátok, a dermatán-szulfát, a heparin és a heparán-szulfát mellett a glikózamino-glikánokhoz tartozik. A hialuronsav kivételével az említett glikózamino-glikánok szulfátcsoportokat tartalmaznak (szulfatált glikózamino-glikánok). Glikózamino-glikánok minden gerinces szövetében előfordulnak. A hialuronsav főleg a bőr és a porcszövet sejtközi mátrixában, valamint testnedvekben, így az ízületfolyadékban és a szem kamravizében fordul elő. A véredények fala és valószínűleg az artériák belső falán lévő ateromatózisos lerakódások, plakkok is tartalmaznak hialuronsav mellett egyéb glikózamino-glikánokat. A hialuronsav viszkózus, hidrokolloid oldatok keletkezése közben képes vizet megköt-



ni, valamint erősen bázikus proteinekkel nehezen oldódó komplexeket alkot. A hialuronsav glukuronsavból és acetilezett glükózaminból áll, ezek β -(1-3)-glikozid-kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. Az így keletkező diszacharid-egységek glikozid-(1-4)-kötésekkel kapcsolódnak egymáshoz. A hialuronsavat bontó enzimek gyűjtőfogalma: hialuronidázok.

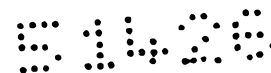
A hialuronidázok gyűjtőfogalom - enzimológiaiailag rendszerező értelemben nem korrekt módon - három különböző típusú hatásmechanizmusú hialuronsav-bontó enzimet ír le (J. Ludowieg: The mechanism of hyaluronidases, JBC 236, 333-339, 1961). Az egyik típus az endohidrolázok, amelyek a β -(1-3)-kötést víz felvétele mellett hidrolitikusan bontják. Ehhez a csoporthoz a magasabb rendű szervezetekből származó hialuronidázok zöme tartozik, például a gyógyászatban alkalmazott szarvasmarhahere-hialuronidáz. Ezek a hialuronát-glikán-hidrolázoknak (E.C. 3.2.1.35/36) is nevezett enzimek a hialuronsavan kívül korlátozott mértékben más glikózamino-glikán-kötéseket is hidrolizálnak. Egy további típust a piócából származó endo- β -hialuronidáz képvisel, amely a β -(1-4)-kötést igen fajlagosan bontja. Ezek az itt felsorolt enzimek hidrolitikusan ható hialuronidázok, illetve szűkebb értelemben vett hialuronidázok.

A harmadik típusú enzimek, a hialuronát-liázok (EC 4.2.2.1) a hialuronsav β -(1-4)-kötését bontják elimináló mechanizmus szerint, aminek során a glukuronsav (4-5)-helyzetében kettőskötés alakul ki. Ennek alapján a hialuronát-liázok nem hialuronidázok. A hialuronát-liázok mikroorganizmusokban fordulnak elő, például *Streptomyces*-ekben és egyéb baktériumokban találták azokat. Közös ismerv a hialuronsavval szembeni szoros fajlagosságuk; más glikózamino-glikánokat általában csak elhanyagolható mértékben bontanak (J.-H. Ozegowski és mtsai: Purification and characterization of Hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae*, Zbl. Bakt. 280, 497-506 (1994), A. Linker és mtsai: The production of unsaturated uronides by



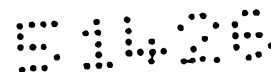
bacterial hyaluronidases, JBC 219, 13-25 (1956), T. Ohya, Y. Kaneko: Novel hyaluronidase from *Streptomyces*, BBA 198 (1970), 607-609, K. Gase, J.-H. Ozegowski és H. Malke: The *Streptococcus agalactiae* hylB gene encoding hyaluronat lyase completion of the sequence and expression analysis, BBA, 1998, 86-98). A legtöbb mikróbas hialuronát-liáz nagy móltömegű protein, móltömegük 116.000 és 120.000 Dalton közötti. Ezek a nagy móltömegű hialuronát-liázok többnyire viszonylag érzékenyek denaturáló ágensekkel és szélsőséges fiziológiai körülményekkel szemben. Így gyógyászati és állatgyógyászati készítmények előállítása során denaturáló folyamatok nyomán lényeges aktivitáscsökkenés következhet be. Emellett a viszonylag nagy enzimmolekula diffundálásra való képessége lényegesen kisebb, mint a kisebb molekulák diffundáló képessége. Ezzel elméletileg a nagy móltömegű hialuronát-liázok (holoenzimek) szövetekbe (plakkokba is) való diffúziója és ezzel a penetrációt, illetve diffúziót elősegítő hatásuk korlátozott. Az immunogén hatás gyengesége valószínű.

A technika állásához tartozik, hogy proteinek proteázokkal enzimes folyamat során bonthatók, így szekvenálás céljára - általában enzimaktivitással nem rendelkező - proteinfragmensek kaphatók. Elméletileg tehát fenn kellene állnia annak a lehetőségnek, hogy mikroorganizmusok által képzett enzimek (holoenzim) fajlagosan ható proteázzal végzett részleges emésztés útján kisebbé tehető. Mindezideg azonban nem vált ismertté mikróbas hialuronát-liáz olyan enzimfragmense, különösen enzimes aktivitással rendelkező enzimfragmense, amelynek hialuronát-liázból való származása az aminosav-szekvencia azonos szakaszai alapján felismerhető volna, vagy amely hialuronát-liázból állítottak volna elő. Eszerint olyan eljárás sem ismert, amellyel hialuronát-liázokból enzimes aktivitással rendelkező fragmensek állíthatók elő.



A szarvasmarha herejéből származó hialuronidázt arra használják, hogy emberi vagy állati szövetet áteresztőbbé tegyenek, tehát a penetrációt és a felszívódást gyorsító anyagként szubkután vagy intramuszkulárisan beadott gyógyszerkészítményekben, vagy nagyobb mennyiségű folyadék perfúziójának megkönnyítésére, ödémek gyorsabb visszafejlődésére. Már a 60-as években nagy dózisban intravénásan adagolt, „Dessau” nevű szarvasmarha-here-hílázzal szép eredményeket értek el akút tendovaginitisz és Paratenonitis crepitans esetén, a plantár saroktüske intravénás kezelésében és a bőrgyógyászatban is. Így előrehaladó szklerodermia, kör alakú szklerodermia és keloidok esetén a hialuronidázzal végzett kezelés lényegesen csökkentette a panaszokat. A 70-es években azzal kísérleteztek, hogy állatmodellen a szívinfarktus késői következményeit hialuronidázokkal befolyásolják. A tanulmányok célja az elhalt szívszövet területének csökkentése volt annak alapján, hogy az infarktus után felgyorsuljon a véredények újraképződése és javuljon a perifériás vér-ellátás.

A 60-as évek óta utalások vannak az irodalomban arra vonatkozólag, hogy a szarvasmarhaherejéből származó hialuronidáz emberen artériás véredénybetegségek terápiás befolyásolására, főleg a perifériás szövetek vérellátásának javítására alkalmazható (például Thurnherr és Koch, idézve Wolff könyvében: *Behandlungsergebnisse mit intravenösen Magnesium comp./Hylase-Mischinjektionen bei Arteriopathien vom Beckentyp im Stadium II.* Z. ärztl. Fortbild., 1972, 66, 446-448). Wolff ott arról számolt be, hogy szarvasmarhaherejéből származó hialuronidáz, magnéziumionokkal együtt intravénásan alkalmazva (keverékinjekció, hetente 3x 300 NE, azaz nemzeti egység 6 héten keresztül) a II. szakaszban lévő medende-típusú arteropátiában szenvedő páciensek 90 %-ának esetén az erek véráramlását javította. Grosshennig (*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) hasonló keverékterápiát folytatott az alsó végtagok degeneratív artériabetegségeiben, valamint medence típusú, magas elhelyezkedésű érobliterációban szenvedő páciensek esetén „mely benyomást gyakoroló sikerrel”. Hetente 3x 300 NE-t adagolt mintegy 5 héten át. Néhány súlyos esetben összesen 30 injekciót adott. A kezelés befejezése után 6-8 héttel végzett utóvizsgálat során az elért állapotban romlás nem volt észlelhető.

Bizonyára igen hátrányos volt, hogy a szarvasmarhaherből származó hialuronidáz, amely rendelkezésre állt, csak viszonylag csekély aktivitással rendelkezett, így csak kevés enzimaktivitást lehetett alkalmazni. Így például az egy hónapon át i.v., i.p. vagy s.c. adagolt csekély hialuronidáz-aktivitás (300 NE) hiperkoleszterinemiás házinyúlon az ateroszklerotikus érelváltozást nem befolyásolta. Az említett dózis három hónapon keresztül ismételt beadása a vér koleszterolszintjét és a plazma fibrin tartalmát csökkentette, a plazmában lévő szabad heparin mennyiségét növelte, az erek → szövet átteresztőképességét fokozta és az ateromatózisos érplakkokat szignifikánsan csökkentette (A.I. Pertsovskii, S.I. Koval'chuk, V.A. Baronenko, R.N. Gold'man, S. Ya. Guz és T.L. Fonbarova (1973): Effect of hyaluronidase on the course of experimental atherosclerosis. Kardiologija, 13, 37-40).

Gottlieb és mtsai GB 1 060 513 szerint állati szövetből izoláltak és hialuronát-liáznak deklaráltak egy enzimet, amely lényegében homogén anyagnak tűnt és hialuronidáz-aktivitással rendelkezett. Ezt az enzimet például a GB 1 098 957 szerzői, állati eredetű hialuronidázzal együtt a GB 1 179 787 szerzői allergiás tünetek ellen javasolták. Gottlieb azt is javasolta (US 3 708 575), hogy az emberi érbetegségeket, így szívritmiát, trombózist, agyi infarktust, agyi trombózist és szívinfarktust, valamint ateroszklerózist ezzel a hialuronidázzal, ill. hialuronát-liázzal kellene kezelni. Izotonikus, steril, például 10 000 NE/ml enzimet tartalmazó intravénásan,

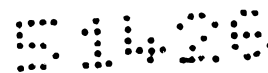


intraarteriálisan vagy intratekálisan injektálnak. Az enzimet az US 3 708 575 szerint állati eredetű anyagokból nyerték. A szabadalmi leírásból egyértelműen kitűnik, hogy az alkalmazott enzimek testikuláris hialuronidázok voltak. Az enzimnek tulajdonított észteráz-aktivitás, a megadott további fajlagosság, valamint az aktivitás bemutatott, liáz-reakciókra nem fajlagos meghatározási módszere állati hialuronidázra mutatnak. Ezzel egybecseng, hogy a legújabb irodalom hialuronát-liázok bontófajlagosságával rendelkező, állati heréből izolált enzimekről már nem számol be (Review: G. Frost, T. Csoka és R. Stern: Trends Glycisci. Glycorechnol. 8, 419-434).

Az idézett irodalmi adatok szerint a szarvasmarha heréből nyert hialuronidáz alkalmas arra, hogy a véredényen keresztül áramló vér mennyiségét ateromatózisos lerakódások, esetleg véralvadék és kezdődő vértrombusok feloldásával, lebontásával vagy áteresztővé tételével megnövelje. Az adott esetben feloldásra kerülő vértrombusmag talán olyan plakkrészecske, amely az intimáról levált, és amelyből vértrombus képződött. Utalások arra is vannak, hogy a hialuronidáz alkalmazása az érfalat áteresztőbbé teszi a szövetek felé, esetleg a szomszédos szövetet is áteresztőbbé teszi.

Az állati eredetű hialuronidáznak, különösen a szarvasmarha heréből nyertnek viszont az a hátránya, hogy eredeténél fogva az enzim vírusok, BSE (bovine spongiform encephalopatie = szarvasmarha szivacsos agyvelőgyulladás) és egyéb fertőző anyagok terjesztésének veszélye hordja magában. Hátrányos továbbá, hogy a hialuronidáz előállításánál a szennyeződések, idegen enzimek eltávolítása céljából igen ráfordításos tisztításnak kell alávetni az állati szövetet. Megfelelő mennyiségű hialuronidáz kinyerése érdekében igen nagy mennyiségű kiindulási anyagot kell összegyűjteni olyan körülmények között, amelyek a romlást kizárják.

Az emlősek herejéből nyert hialuronidáz - nem fajlagos jellege miatt - az érfalban előforduló szulfatált glikózamino-glikánokat is hidrolizálja. A dermatán-



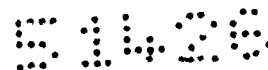
szulfátról vagy kondroitin-szulfátról, heparinról és heparin-szulfátról viszont feltételezik, hogy véralvadásgátló tulajdonságaik miatt a vértrombusznak az ér belső falára történő lerakódását gátolják. Fennáll tehát annak lehetősége, hogy ezen vegyületek hidrolízise a véralvadék intima melletti szekunder képződését fokozza, azaz a testikuláris hialuronidáznak kedvezőtlen mellékhatása is lehet.

Sawyer és mtsai (EU 193330 B1) piócából nyert, 28.500 móltömegű speciális endo- β -glukuronidáz enzim előállítását és - szembetegségnél - fiziológiai folyadékok folyásának serkentésére történő alkalmazását írják le. Ez az enzim igen fajlagos hialuronsavra, és a piócából (*Hirudo medicinalis*) nyert ismert endo- β -glukuronidáztól abban különbözik, hogy emelt hőmérsékleten, szélsőséges pH-értékek mellett jobb a stabilitása.

A találmány célja, hogy az állati eredetű hialuronidázok eddig javasolt plakk-bontó enzimek alkalmazásának hátrányait azzal küszöbölje ki, hogy ateroszklerotikus érfalváltozások kezelésére és megelőzésére mikroorganizmusokból nyert enzimeket alkalmazunk megfelelő gyógyászati készítmény formájában. Mikroba eredetű enzimek a biotechnikai előállítás lehetősége folytán elvileg egyszerű módon állíthatók elő.

A találmány további célja, hogy enzim-aktivitással és plakk-bontó aktivitással rendelkező enzimfragmenseket állítsunk elő alkalmas, mikroba eredetű holoenzimből egyszerű módon, majd alkalmazzunk gyógyászati készítményként kisserelve. A fragmensek alkalmazásáról azt várjuk, hogy készítmény alakjában nagyobb a stabilitásuk, hogy immunogén hatásuk kisebb, behatolási képességük kedvezőbb.

További szempont, hogy a találmány szerinti enzimek - nagyobb enzimaktivitás hosszabb időn keresztül történő beadása esetén - az élő emlős szervezetre ne hasson hátrányosan. Az enzimeknek a szulfatált glikozamino-glikánokat csak korlátozottan szabad bontania, mert egyrészt ezeket bontania kell, hogy az állati heréből



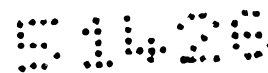
származó hialuronidázhoz hasonlóan plakkokat és kezdődő véralvadékat feloldjanak, másrészt azonban a szulfatált glikózamino-glikánok erősen korlátozott bontása arra jó, hogy az intimából ne oldódjon ki annyi szulfatált glikózamino-glikánt, hogy hiánya már fokozná a szekunder véralvadék képződését.

A találmány feladata tehát mikroorganizmusokból származó, plakk-bontó enzimek megtalálása volt, mely enzimeknek gyógyászati készítmények alkotójaként a szarvasmarha-heréből származó hialuronidáz hatásához hasonló vagy ezt meghaladó hatása van plakkok feloldása, belső érfal plakkok által foglalt terület, trombuszok és véralvadék csökkentése vonatkozásában, amelyek az érbetegségek kórfolyamatát kedvezően befolyásolják, nem-toxikusok, és injekciós készítményként emberen, állaton alkalmazva negatív hatásuk nincs.

A végül is a találmányhoz vezető feladat egy része az, hogy hialuronát-liáz-aktivitással rendelkező kisebb proteint vagy fragmenst és előállítására irányuló eljárást találjunk. A fragmens enzim aktivitása, tulajdonsága hasonló a holoenzim hatásához, illetve azzal azonos legyen.

A jelen találmány tehát közvetlenül vagy ateromatózis plakk-képződés következményeként fellépő érbetegségek terápiájához alkalmazható gyógyászati készítményekre vonatkozik. A találmány további tárgya egy új enzimfragmens, ennek előállítása és alkalmazása.

Azt találtuk, hogy gyógyászati készítmények, amelyek egy vagy több, hialuronát-liáz-aktivitással (E.C. 4.2.2.1.) rendelkező, baktériumok, különösen a *Streptococcus* nemzetséghez, előnyösen az általánosan hozzáférhető *Streptococcus agalactiae* vagy *Streptococcus equisimilis* fajtákhoz tartozó mikroorganizmusok által fermentálás során a sülyesztett tenyésztet közegébe kiválasztott hialuronát-liázokat vagy ezekből a hialuronát-liázokból előállított enzimfragmenst tartalmaznak, *in vitro*



emlősek és emberek ereinek arteromatózisos szövetéből izolált plakkokból anyagokat kiold illetve vékony plakkszeleteket felold.

Azt találtuk továbbá, hogy genetikai hiba következtében az aortában nagy plakk-lerakódással rendelkező élő Watanabe-házinyúlón a hialuronát-liázt és/vagy az enzimfragmenst tartalmazó gyógyászati készítmény viszonylag nagy enzimaktivitással gyakran ismételt beadása a plakk-lerakódásos felületét feltűnő módon csökkentette. Míg a kezeletlen állatok ereinek belsejét vékony, fehér plakkréteg borította és vastagabb plakkok is jelen voltak, addig a kezelt állatok ereinek belseje mentes volt a vékony plakk-rétegtől, és mélyvörös színt mutatott, az egészséges erek belső felületének színe. A vastagabb plakkok területe szintén csökkent.

Meglepő, hogy ez a hatást nemcsak a gyógyászati készítményben lévő, 114.000-124.000 móltömegű holoenzim váltja ki, hanem a holoenzim igen aktív, stabil, például 84.000-86.000 móltömegű fragmense is.

Azt találtuk továbbá, hogy a találmány szerinti fragmensek a baktériális hialuronát-liázok proteázokkal, előnyösen aromás aminosavak C-terminális peptidkötését bontó proteázzal végzett proteolitikus emésztéssel állíthatók elő. Egy előnyös példa szerint a *Streptococcus agalactiae* mikroorganizmusból származó, 116.000 móltömegű hialuronát-liázt enzim-aktivitással rendelkező hialuronát-liáz-fragmenssé bontjuk. A fragmens móltömege 84.000-86.000. A bontás fajlagossága szempontjából nincs különbség a nem-emésztett hialuronát-liáz (holoenzim) és a fragmens között. A holoenzimhez képest azonban a fragmens vizes oldatokban és denaturáló ágensekkel szemben határozottan stabilabb. A fragmens fajlagos aktivitása 400.000-800.000 NE/mg, a holoemzimé fajlagos aktivitása 400.000 NE/mg, tehát a fragmens aktivitása azonos, sőt nagyobb is.

A találmány tehát gyógyászati készítményre vonatkozik, amely nagy tisztaságú, mikroba eredetű hialuronát-liázt holoenzim alakjában, a hialuronát-liáz

hialuronát-bontó fragmensét vagy e kettő forma keverékét tartalmazza legalább egy stabilizátorral és/vagy gyógyászati lag elfogadható hordozó- vagy segédanyaggal, valamint adott esetben járolékos, gyógyászati lag elfogadható hígítószerrel együtt.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények emberen és állaton egyaránt elsősorban ateromatózisos plakkoknak az erekben való jelenlétére visszavezethető érbetegségek, például szívritmuszavarok, ateroszklerózis, agyi infarktus, agyi trombózis, szívkoszorúér-trombózis és szívinfarktus kezelésére alkalmazhatók.

A találmány szerinti készítmények előnyösen injekciós készítmények intravénás vagy intraartériás beadására. A készítmények a holoenzim nagyon tiszta enzimproteinjét és/vagy fragmensét vagy e két aktív forma definiált keverékét tartalmazó izotonikus, steril, vizes oldatok, amelyek milliliterenként 20.000-4.000.000 NE enzim-aktivitást tartalmaznak. Az enzimproteint előnyösen fagyasztva szárított, általában stabilizáló adalékot tartalmazó szilárd anyagként alkalmazzuk. Stabilizáló adalékként például nátrium-klorid, glükóz, magnézium-sók, polivinilpirrolidon, aminosavak, albumin, különösen előnyösen ovalbumin és hidrolizátjai vagy növényi eredetű proteinek és hidrolizátjai jöhetnek számításba. A hialuronát-liáz és/vagy fragmense egy injekció keretében alkalmazott mennyisége 200-12.000 NE/kg testtömeg, a kezelt emlős vagy ember testtömegére vonatkoztatva.

A találmány szerint alkalmazott enzim, illetve enzimfragmens a kísérleti állatok egészségi állapotára semmilyen negatív hatást nem gyakorolt. Kézenfekvő és az oltalmi körbe tartozik, hogy a javasolt enzim és/vagy fragmensének hatása nemcsak az aktuális lerakódások eltávolítására korlátozódik, hanem keringési betegségekre, u.m. szívizomisémiára, szívizominfarktusra, szívkoszorúérinfarktusra, szívritmuszavarra, ateroszklerózisra és hasonló jelenségekre kedvezően hat mind megelőzés, mind terápia értelmében.

A holoenzimhez viszonyítva előnyös a fragmens alkalmazásában, hogy kisebb mérete alapján a holoenzimnél gyorsabban hatolhat be a plakkok szilárd rétegeibe, így gyorsabban bonthatja le a plakkokat.

Anélkül, hogy a találmányt egy meghatározott mikroorganizmusból származó hialuronát-liázra vagy annak fragmensére korlátoznánk, a találmányt az általánosan hozzáférhető *Streptococcus agalactiae* enzimjének példáján ismertetjük. A képzett hialuronát-liáz izoelektomos pontja IP mintegy 8,6, móltömege kb. 116.000, hatása endoglikanát hatás. Az enzimnek megvan az a kedvező tulajdonsága, hogy szulfatált glikózamino-glikánok, így például szulfatált hialuronsav gátolják az enzimet. Az alábbiakban részletezett tisztítási eljárásokkal a hialuronát-liázt injekciós célokra nagy tisztaságú enzimeként nyerjük, vagy tisztított hialuronát-liázt a fajlagosan ható proteázzal fragmenssé alakítunk. Fajlagosan ható proteázként - a találmány korlátozása nélkül - például az MO/2 jelű (DD 270924) savas fémproteáz (metalloproteáz) alkalmazható, amely a *Streptomyces hygroscopicus* AP40 mikroorganizmusból nyerhető. Erre a proteázra kb. 14.000 kD móltömege és 3,85 és 4,0 közötti izoelektromos pontja jellemző.

Mind a holoenzim, mind a fragmens előállításának az alábbi részletes leírása, különösen a tisztító lépések sorrendje példazerű, az oltalmi kört nem korlátozza. A nagy tisztaságú hialuronát-liáz és a nagy tisztaságú fragmens előállítása, injekciós készítménybe való inkorporálása a tisztító lépések sorrendje és kiválasztása szempontjából például - a találmány oltalmi körének korlátozása nélkül - az alábbiak szerint végezhető el.

A mikroorganizmust, például a fent említettek valamelyikét keverővel ellátott fermentorban állandó értéken, még pedig 6,5 és 7,5 között tartott pH-érték mellett fermentáljuk. A fermentálás során keletkező tejsavat híg nátrium-hidroxid-oldat adagolásával semlegesítjük. A közeg szervesetlen sókat, élesztőhidrolizátumot, kazeinpeptont



vagy szójapeptont, valamint glükózt tartalmaz. Mintegy 20 órás fermentálás után a sejteket elválasztjuk. A sejtömeget eldobjuk. A tenyészet szűrletét ultraszűrő-készülékben betöményítjük és tisztítjuk. Az ultraszűrő modul kizárási határa 30 és 50 kD közötti. Előtisztított enzimotozatot kapunk, amelyet további tisztító lépéseknek kell alávetni, mielőtt injekciós készítményként alkalmazható. A tisztító lépések, valamint a pirogénmentes segédanyagok alkalmazása az injekciós készítmény pirogénmentességét biztosítja. Az ionerősséget ammónium-szulfát 40 %-os telítettséggel folytatott adagolásával emeljük, majd az enzimet fenilszefarózon (Sepharose) adszorbeáltatjuk. Deszorpcióhoz semleges, puffertolt vizes oldatot használunk, amely - 100 %-os telítettségre vonatkoztatva - 25 % ammónium-szulfátot tartalmaz. Egy dialízislépés után az oldathoz szennyeződések eltávolítása céljából Q-szefarózt (Pharmacia) adunk. Ezt követi színezéken, például aminofenil-oxaminsavon történő fajlagos adszorbeáltatás. Végző tisztításként és egyben a móltömeg meghatározására móltömeg.-kromatográfiát végezhetünk Superdexen (Pharmacia).

Ha enzimképzőként a *Streptococcus equisimilis* mikroorganizmust alkalmazzuk, a színezéken való adszorbeáltatásból álló tisztító lépés elmarad. Ez az enzim exo-glikanázként hat, izoelektromos pontja 4,5 és 4,8 pH között van, szulfatált glikózamino-glikánok csak igen csekély mértékben gátolják.

A holoenzim - fragmensét eredményező - részleges emésztése immobilizált vagy nem-immobilizált fajlagos proteázzal történik. Az immobilizált proteázzal való reagáltatás azzal az előnnyel jár, hogy az emésztés szabályozottan végezhető, a proteáz nem kontaminálja az enzimet. Ha a proteázt közvetlenül adagoljuk, az emésztés után a proteáz inaktiválása, a proteáz-protein eltávolítása és többlépcsős tisztítás szükséges. Az enzimfrakciót az alábbiak szerint használhatjuk fel a fragmens előállítására: a fajlagosan bontó MO/2 jelű proteázt ismert módon például szefarózhhoz kötjük. Az immobilizált proteázt például 7,5 pH mellett 37 °C-os hőmér-



sékleten vizes hialuronát-liáz-oldattal keverjük. Befejezett emésztés után a fragmenst ammónium-szulfáttal kicsapjuk, móltömegkromatográfiásan tisztítjuk. A nagy tisztaságú enzim vagy enzimfragmens, ha házinyúlat immunizálunk vele, csak fajlagos precipitációt mutat. Monoklónos antitestekkel minden kimutatható sávot a blotban befestünk. A holoenzim fajlagos aktivitása mintegy 400.000 NE/mg, és a fragmens fajlagos aktivitása kb. 400.000 NE/mg és 800.000 NE/mg közötti. Stabilizálás céljából az enzimhez, ill. fragmenshez legalább egy stabilizátort, például albumint, előnyösen ovalbumint és szervesetlen sókat adunk.

A találmány korlátozása nélkül az alábbiakban példaként leírunk egy módszert a fragmens előállítására. Az emésztéshez a találmány értelmében olyan proteázt alkalmazunk, amely aromás aminosavak C-terminális peptidkötését bontja. Előnyös kiviteli példaként az MO/2 jelű fémpoteázt alkalmazzuk, amelyet *Streptomyces hygroscopicus* (AP40 törzs) tenyészetének szűrletéből nyerünk ki. Az MO/2 fémenzim Co^{++} -t tartalmaz az aktív központban (DD 270 924). A proteázokat előnyösen tisztított állapotban alkalmazzuk. Az MO/2 jelű proteáz tisztítása például fenilszefazózon, DEAE-szefarózon, Q-szefarózon vagy Sephacryl S 100-on végzett kromatográfiás eljárással történik, a feldusulási tényező 20. A fajlagos aktivitás 0,25 Kunitz-egység/mg (E/mg), a reakció maximuma 4,2 pH mellett van és a reakció hőmérsékleti maximuma 65 °C. Az enzim móltömege, SDS-gélelektroforetikusan és Sephades G50 superfine segítségével móltömegkromatográfiás eljárással meghatározva, 14.000-15.000 D. Az MO/2 proteáz – endopeptidáz, amelynek izoelektromos pontja IP = 3,85, I-pontja 3,92. Az enzim természetes polipeptideket, így kazeint, hemoglobint, szarvasmarhaszérumot, albumint és ovalbumint hidrolizálja.

Az MO/2 proteáz alkalmazásának előnye, hogy az enzim a proteineket nagyon fajlagosan bontja, illetve proteinekkal szembeni általános emésztőképessége igen csekély. Az enzim csaknem kizárólagosan csak aromás aminosavak C-terminális ma-



radékának peptidkötését bontja. N-benzoil-L-prolin-nitroaniliddal szemben észterolitikus aktivitása van, és kifejezett tejkicsapó tulajdonságokkal rendelkezik. A hosszú időn keresztül stabil (a nagyon fajlagosan ható láb-enzimmel tejből kicsapott gélhez hasonló) kazein-gél képződése alapján kimutatható tejkicsapás további utalás arra, hogy az MO/2 proteáz aktivitása a találmány szempontjából előnyösen korlátozott. azaz a holoenzim kötéseit fajlagosan bontja, de a fragmenseket nem bontja tovább.

A találmány egy további kialakítása értelmében az MO/2 proteázt adott esetben alkalmas oldhatatlan immobilizáló hordozóhoz kötjük és ebben a formában alkalmazzuk a holoenzim bontásához. Ennek az az előnye, hogy oldott proteáz nem kerülhet a fragmensek oldatába.

A találmány szerint a fragmenst a holoenzim részleges emésztésével, illetve proteolitikus részleges bontásával állítjuk elő fajlagosan bontó proteázzal, amely főleg az aromás aminosavak C-terminális végén lévő peptidkötést bontja.

A nagy tisztaságú enzimoldatok vagy fragmens tartalmú frakciók betöményítés és részleges vízelvonás után, adott esetben stabilizátorok, segédanyagok vagy gyógyászatilag hatásos anyagok adagolása, majd sz oldat sterilre szűrése után injekciós készítményként alkalmazhatók. A nagy tisztaságú enzim-, illetve fragmens-oldatot sterilre szűrés és például 5 mM magnézium-klorid és 1 % tojásalbumin adagolása után fagyasztva száríthatjuk. A fagyasztva szárított enzimet, ill. fragmenst konyhasó-oldatban feloldva izotoniás injekciós készítményt kapunk.

A találmány tárgyához a mikroba eredetű hialuronát-liáz, annak hialuronát-bontó fragmensének vagy a két forma keverékének alkalmazása is tartozik ateroszklerózis plakkoknak az erekben való jelenlétére visszavezethető érbetegségek, így szívritmuszavarok, ateroszklerózis, agyi infarktus, agyi trombózis, szívkoszorúér



trombózis és szívizominfarktus kezelésére és megelőzésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására.

A találmány egy további tárgya batériumokból származó hialuronát-liázok hialuronát-liáz-aktivitású fragmensek.

Az alábbi példák a találmányt közelebbről ismertetik, de nem korlátozzák.

Kísérleti rész

1. példa

A fermentálást 30 liter bruttó töltőtérfogatú, keverővel felszerelt fermentorban végezzük. A tényleges töltőtérfogat 20 liter. Beoltáshoz egy általánosan hozzáférhető *Streptococcus agalactiae* törzset alkalmazunk, amely a Német Mikroorganizmus- és Sejt kultúrák Gyűjteményében DSM 2134 (= ATCC 13813 = NCT 8181) szám alatt letétben van. A törzs konzerválása kriokonzervként történik (Mast-Diagnostica). Egy, a törzs anyagával borított golyót csíraszamláló agarral töltött ferdeagar csőbe adunk és a csövet mozgatva az agarfelülettel érintkeztetjük („A” kultúra). Utána steril-ellenőrzésre a legördült golyót 3 ml szív-agy-bullionba adjuk („B” kultúra), és mindkét tenyészetet 37 °C-on álló tenyészetként 24 órán át inkubáljuk.

1. előtenyészet

5 g/l kazeinpeptont és 10 g/l élesztőkivonatot (Difco) tartalmazó közegből 50-50 ml-t 2 db 100 ml-es tenyésztő üvegbe töltünk és pH 7,0 mellett sterilizálunk. Az 50 ml közeghez még - rövidesen az oltás előtt - 5 ml Eagle-közeg adunk. Az oltás úgy történik, hogy a „B” tenyészet oldatával az anyagot az „A” tenyészet agarfelületéről bemossuk az üvegbe. A tenyészetet rázás közben (150 perc⁻¹) 37 °C-on 24 órán át tenyésztjük.

2. előtenyészet

20 g/l élesztőkivonatot és 10 g/l pankreaz-peptont, 1,75 g Na-acetátot, 7 g/l Na-hidrogén-karbonátot (külön feloldva), 7 g/l di-Na-hidrogén-foszfát-dihidrátot és



3,5 g/l Na-di-hidrogénfoszfátot tartalmazó közegből 2x1litert sterilizálás előtt 20 %-os kénsavval pH 6,2-re állítunk. Az autoklávos kezelés után a pH-érték mintegy 7,0. 6,0 g/l glükózt tartalmazó oldatot külön autoklávban kezelünk. Ennek az oldatnak 100 ml-jét adjuk a 2. előtenyészethez oltás előtt. A közeget úgy oltjuk be, hogy az 1. előtenyészet 50 ml-jét adjuk hozzá (5 térfogat%). A tenyésztés lassú rázással (kb. 45 perc⁻¹) történik 32 °C-on 24 órán át.

Főtenyészet

A főtenyészet közegének összetétele az alábbi: 20 g/l élesztőkivonat, 10 g/l hasnyálmirigyes pepton és 25 g/l glükóz. A glükózt külön sterilizáljuk. A közeget a 2. előtenyészet 1 literével beoltjuk. A fermentálás paraméterei: 34 °C, pH 7,0, levegőztetés a fejtérben 25 l levegő/perc, keverés fordulatszáma: 150 perc⁻¹. A pH-értéket 40 %-os nátrium-hidroxid-oldat adagolásával tartjuk állandó értéken. A glükózt kézzel adagoljuk olyan ütemben, hogy a glükóz-koncentráció ne csökkenjen 5 g/l alá. Húsz óra elteltével e tenyésztést befejezzük.

2. példa

A *Streptococcus agalactiae* mikroorganizmus fermentálásának 400 NE/ml aktivitású tenyészlevéből 50 litert 0,2 µm-es szűrőn átszűrve élő sejtektől mentesítünk. A tiszta tenyészfolyadékot ezt követően 60.000 móltömeggig kizáró ultraszűréssel vetjük alá, így 2 liter koncentrátumot kapunk. Ehhez 480 g szilárd ammónium-szulfátot adunk. Az ennél a koncentrációnél kicsapódó proteinek szűrési segédanyaggal végzett tisztánszűréssel eltávolítjuk és a tiszta koncentrátumot 2,5x20 cm méretű, előzőleg foszfáttal pufferolt 6,5 pH-jú, 40 %-os ammónium-szulfát-oldattal kiegyensúlyozott fenil-szefaróz-oszlopra visszük. Az oszlopot foszfáttal pufferolt, 6,5 pH-jú 35 %-os ammónium-szulfát-oldattal mossuk, utána a hialuronát-liázt foszfáttal pufferolt, 6,5 pH-jú 25 %-os ammónium-szulfát-oldattal eluáljuk. Az eluált frakciókat egyesítjük és szilárd ammónium-szulfát adagolásával 80 %-os telítettségre állítjuk. A



kicsapódó csapadékot gyűjtjük, 100 ml 8,2 pH-jú 0,03 M triszpufferral oldjuk és ugyanazzal a pufferrel szemben dializáljuk. A dializált, nyers hialuronát-liáz-oldatot 2,2x15 cm-es kiegyensúlyozott Q-szefaróz-oszlopon átengedjük. A hialuronát-liáz az átfolyt részben van. A folyadékhoz szilárd ammónium-szulfátot adva annak telítettségét 80 %-ra állítjuk be. A kicsapódó proteint gyűjtjük, 8,7 pH-jú 0,05 M triszpufferben oldjuk és szefadex G 10 oszlopon az ammónium-szulfáttól mentesítjük. Az így kapott hialuronát-liáz tartalmú oldatot megfelelően kiegyensúlyozott, 0,8x10 cm-es affinitás-oszlopra [N-(p-amino-fenil)-oxaminsav-agaróz] visszük fel, majd 9,7 pH-jú 0,1 M NaCO₃-oldattal eluáljuk.

Az eluált hialuronát-liáz tartalmú frakciókat egyesítjük és 80 %-os telítettségnek megfelelő ammónium-szulfát adagolásával kicsapjuk. A csapadékot 1 ml 7,5 pH-jú 0,1 M triszpufferben oldjuk és az oldatot 16x60 méretű Superdex 200 oszlopra visszük fel. A 116.000 D-nél megjelenő hialuronát-liáz-proteinsávat gyűjtjük és 0,005 M MgCl₂-t tartalmazó, 7,5 pH-jú 0,02 M triszpufferrel szemben dializáljuk. 10 mg hialuronát-liázt kapunk, amelynek fajlagos aktivitása 400.000 NE/mg. A dializált hialuronát-liáz-oldat ovalbumint adunk 1 % mennyiségben, és az oldatot liofilizáljuk.

3. példa

Az 1. és 2. példa szerint *Streptococcus equisimilis* mikroorganizmust tenyésztünk, ill. a főtenyészetet fermentáljuk és az enzimet tisztán formában kinyerjük. Az N-(p-amino-fenil)-oxaminsav-agarózos tisztító lépés kimarad.

4. példa

10 mg MO/2 jelű tisztított proteázt 2 ml 0,1 M nátrium-hidrogén-karbonát-oldatban oldunk. Az oldathoz 1 ml brómcián-szefarózt (Pharmacia) adunk és az elegyet 4 °C-on 24 órán át rázzuk. A képződött MO/2-proteáz-szefarózzal a nem kötött MO/2-oldatot üvegszűrőn elválasztjuk. A bróm-cián-szefarózon esetleg még nem telített kötési helyeket 2 ml 0,1 M glicin-oldattal blokkoljuk. Blokkolás után a az



MO/2-szefarózt 4,5 pH-jú 0,1 M ecetsavval, majd 0,1 M nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal mossuk.

Streptococcus agalactiae mikroorganizmusból származó 10 mg hialuronát-liázt 1 ml 0,05 M 7,0 pH-jú foszfátpufferben oldunk és az oldatot termosztátban 37 °C-os hőmérsékletre melegítünk. Az oldathoz 0,25 g rögzített MO/2-proteáz-szefarózt adunk (proteolitikus aktivitása 0,1 Kunitz-egység/g). Tizenöt perc elteltével a proteáz-szefarózt elkülönítjük és az oldatot ammónium-szulfáttal 80 %-ig telítve a képződött fragmenst kicsapjuk. A csapadékot 18 óra állás után elkülönítjük és 0,05 M 7,5 pH-jú trisz-pufferben oldjuk. A fragmenst móltömegkromatográfiásan Superdex 200 adszorbensen tisztítjuk. Az aktív fragmensfrakciókat egyesítjük, 0,05 M trisz-puffer ellen dializáljuk, majd albumin adagolása mellett liofilizáljuk. A fragmens fajlagos aktivitása 600 000 NE/mg.

5. példa

Streptococcus agalactiae mikroorganizmusból származó 4 mg hialuronát-liázt 1 ml 7,8 pH-jú 0,05 M trisz-HCl-pufferben oldunk és az oldatot termosztátban 37 °C-os hőmérsékletre melegítünk. Az oldathoz 80 µg 0,1 Kunitz-egység/mg aktivitású MO/2-proteázt adunk, és az elegyet 37 °C-on 30 percen át emésztjük. A reakció megszakítása céljából 10 µl 7,0 pH-jú 0,1 M EDTA-t adunk. Utána az elegyet felvisszük 3 ml affinitás-oszlopra [N-(p-amino-fenil)-oxaminsav-agaróz], majd 9,7 pH-jú 0,05 M nátrium-karbonát-oldattal eluáljuk. Az oldatot ammónium-szulfáttal 80 %-ig telítve a képződött fragmenst kicsapjuk, összegyűjtjük, majd móltömegkromatográfiásan tisztítjuk. Az aktív fragmens-frakciókat egyesítjük, 0,05 M triszpuffer ellen dializáljuk, majd albumin adagolása mellett liofilizáljuk. A fragmens fajlagos aktivitása 460 000 NE/mg.

6. példa



A 4.példa szerinti hialuronát-liáz-fragmens-oldat 0,5 ml-jét 0,5 ml 6,0 pH-jú 0,1 M acetátpufferhez adunk, és az oldatot mértani haladvány formájában hígítjuk. Mindegyik hígításhoz 0,5 ml olyan hialuronsav-oldatot adunk, amely 1 ml 6,0 pH-jú 0,1 M acetátpufferben 0,2 mg hialuronsavat tartalmaz. Az elegyeket 37 °C-on 30 percen át inkubáljuk. Az enzimreakció megszakítására minden hígításhoz 2 ml (2 %-os nátrium-hidroxid-oldattal készített) 2,5 %-os cetil-trimetil-ammónium-bromid-oldatot adunk. A hígításokat szobahőmérsékleten 20 percen át állni hagyjuk, utána a hígításokban mutatkozó zavarosságot 1 cm-küvettákban 600 nm hullámhosszon mérjük, és kalibráló görbe segítségével a bontott hialuronsav mennyiségét határozzuk meg. 5 NE (nemzetközi egység) hialuronát-liáz-fragmens perenként 16 µg hialuronsavat bont.

7. példa

A holoenzim, valamint a 4. példa szerinti fragmens 20 000 – 20 000 NE-t 3 ml deszt. vízben oldunk. Mindkét oldatot szobahőmérsékleten 24 órán át tároljuk, utána az enzimaktivitást mérjük. A holoenzim-oldat aktivitása 60 %-ra csökkent, míg a fragmens-oldat aktivitása a kiindulási aktivitás 95 %-a volt.

8. példa

Hialuronát-liáz, illetve a fragmens aktivitásának meghatározása

1. Optikai vizsgálat 232 nm-en

Hialuronsavból és szulfatált hialuronsavból törzsoldatokat készítünk, 4 °C-on tároljuk. A mérés 232 nm hullámhosszon és 26 °C-on történik. 3 ml-es kvarcküvettákba ($d = 1$ cm) az alábbi oldatot készítjük: 1,8 ml 6,0 pH-jú 0,1 M acetátpufferhez 200 µl hialuron-törzsoldatot adunk és a reakciót 2-4 NE/ml (50 ml) hialuronát-liázzal indítjuk. A végső térfogat 2050 µl.



A gátlási kísérletekhez a fent leírt összetétel az alábbiak szerint módosul: 1,5-1,8 ml pufferhez 300-500 μ l szulfatált hialuronsavat és 200 μ l hialuronsavat adunk, és a reakciót hialuronát-liáz adagolásával indítjuk. A hialuronát-liáz részben nem-kompetitív módon gátolva lesz. A K_i -érték $5,5 \times 10^{-4}$ mg/ml.

A hialuronát-liáz 232 nm-nél az extrinkció lineáris növekedését mutatja, amelynek tangenséből az aktivitás számítható. Ennek során a keletkező $\Delta^{4,5}$ -telítetlen uronid extinkciós tényezőjét $\epsilon = 6,0 \times 10^3 \text{ lxm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ értékkel vesszük figyelembe (J. Ludowig: The mechanism of hyaluronidases. JBC 236, 333-339 (1991)).

2. Mikorlemezeken végzett optikai kísérlet 600 nm-en

A liáz-aktivitás meghatározása D. Gerlach és W. Köhler „Hyaluronatlyase von *Streptococcus pyogenes*. II. Charakterisierung der Hyaluronatlyase” (E.C. 4.2.2.1.) szerint (Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221, 296-302 (1972))

50.000 E/ml aktivitású törzsoldatból 1:50 arányban végzett hígítással hialuronát-liáz-oldatot készítünk, és 0,5 ml hialuronát-liáz-oldatot 0,5 ml 6,0 pH-jú 0,1 M acetátpufferhez adunk. A kapott oldatot mértani haladvány szerint hígítjuk. Mindegyik hígításhoz 0,5 ml olyan hialuronsav-oldatot adunk, amely 1 ml 6,0 pH-jú 0,1 M acetátpufferben 0,2 mg hialuronsavat tartalmaz. Az elegyeket 37 °C-on 30 percen át inkubáljuk. Az enzimreakció megszakítására minden hígításhoz 2 ml (2 %-os nátrium-hidroxid-oldattal készített) 2,5 %-os cetil-trimetil-ammónium-bromid-oldatot adunk. A hígításokat szobahőmérsékleten 20 percen át állni hagyjuk, utána a hígításokban mutatkozó zavarosságot 1 cm-küvettákban 600 nm hullámhosszon mérjük, és kalibráló görbe segítségével a bontott hialuronsav mennyiségét határozzuk meg. A hialuronát-liáz 5 NE-e (nemzetközi egysége) percenként 16 μ g hialuronsavat bont.



9. példa

10 mg hialuronát-liázt (holoenzim) 1 ml 7,0 pH-jú 0,05 M foszfátpufferben oldunk és az oldatot termosztatban 37 °C-on tartjuk. Ehhez az oldathot 0,1 Kunitz-egység/mg proteolitikus aktivitású, fajlagosan bontó proteáz-szefarózt adunk. Tizenöt perc elteltével az oldhatatlan proteáz-szefarózt elválasztjuk és az oldatot ammónium-szulfáttal 80 %-ig telítve a keletkezett fragmenst kicsapjuk. 18 órával később a csapadékot elválasztjuk és 7,5 pH-jú 0,05 M triszpufferben oldjuk. A fragmenst Superdex 200 adszorbenssel móltömegkromatográfiásan tisztítjuk. Az aktív frakciókat egyesítjük, 0,05 M triszpuffer ellen dializáljuk és albumin adagolása közben liofilizáljuk.

10. példa

A hialuronát-liáz plakk-oldó aktivitásának kimutatására mintegy 0,3 mm méretű, humán Arteria carotis interna neointimájából vett fehéres-sárgás szövetdarabokat (plakk-darabokat) hialuronát-liáz-oldatban (mintegy 20.000 NE/1 ml triszpuffer; 10 mM, pH 7,0) szuszpendálunk és a szuszpenziót szobahőmérsékleten 12 órán át inkubáljuk. A plakk-darabok eredetileg éles fázishatárainak részleges oldódása, valamint finom eloszlású szuszpendált anyag felszabadulása figyelhető meg. Párhuzamosan plakk-darabokat csak trisz-pufferrel kezeltünk, oldódási jelenségek itt nem léptek fel.

11. példa

Kísérlés a hialuronát-liáz fragmensével humán eredetű ateromatózisos érlerkódások feloldására

Mintegy 0,3 mm méretű, humán Arteria carotis interna neointimájából vett fehéres-sárgás szövetdarabokat (plakk-darabokat) a fragmens oldatában (mintegy 15.000 NE/1 ml triszpuffer; 10 mM, pH 7,0) szuszpendálunk és a szuszpenziót szobahőmérsékleten 12 órán át inkubáljuk. A plakk-darabok eredetileg éles fázishatárai nagy mértékben feloldódnak, és finom eloszlású szuszpendált anyag szabadul fel.



Párhuzamosan plakk-darabokat csak trisz-pufferrel kezeltünk, oldódási jelenségek itt nem léptek fel.

12. példa

A hialuronát-liáznak a Watanabe-házinyúl *Ibm:WHHL* (Watanabe heritable hyperlipidemic) ateromatózisos érlerakódásainak gyakorolt befolyása

Az említett házinyúlat 1981 óta Y. Watanabe (Kobe egyetem, Japán) tenyészt; 1992 tenyésztörzsként került Charles River Savohoz és 1994 óta a Németalföldön lévő Someren található Broekman-Intézet tenyészt. A Watanabe-házinyúl örökölten hiperlipidémiás, az LDL-receptoroknak egy öröklődő hibája miatt. A hiperkoleszteinémia (> 400 mg/100 ml plazma) következtében az állatokban korán alakul ki aorta-artérioszklerózis.

Tíz, 9-11 hónapos Watanabe-házinyúlat (*Ibm:WHHL*; 4 nőnemű, 6 hímnemű) vásároltunk a hollandi Broekman-Intézettől (Someren, Hollandia) 14 nappal a kísérlet kezdete előtt. Az állatokat egyedi ketrecekben (0,5 x 1 m) tartottuk szobahőmérsékleten (20 ± 2 °C-on), szabványtápot (ssniff házinyúltartás) és ivóvizet kaptak ad libitum. A kísérlet kezdete, azaz az 1. klinikai-kémiai vizsgálat előtt a 10 házinyúlat nemek szerint elkülönítve randomizáltuk, majd 1-től 10-ig terjedő számokkal jelöltük.

Hetente háromszor (hétfőn, szerdán és pénteken) infúziót kaptak. A négy kontroll házinyúl (1-4) 20 ml pirogénmentes 0,9 %-os NaCl-oldatot kaptak egy óra alatt intravénásan. A 6 kísérleti nyúl (5-10) a 20 ml pirogénmentes 0,9 %-os NaCl-oldattal 30 000 NE nagyon tiszta hialuronát-liázt kaptak egy óra alatt. Ez 10.000 NE/kg testtömeg dózisznak felel meg.

A kísérlet alatt az általános viselkedést, a testtömeget, testhőmérsékletet, valamint a klinikai-kémiai paramétereiket (koleszterin, trigliceridek, amiláz) ellenőriztük.



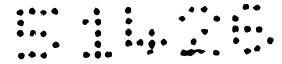
Az állatok általános viselkedését sem a 0,9 %-os NaCl-oldattal, sem a hialuronát-liázzal végzett kezelés nem befolyásolta észrevehető módon. A felnőtt Watanabe-házinyúlak testtömege (kontroll és kezelt) a kísérlet időtartama alatt, azaz 1996.11.18-tól 1997.02.03-ig csak lényegtelen mértékben változott.

A testhőmérséklet, amelyet minden infúzió előtt és után mértünk, átlagosan $-0,3$ és $+1,2$ °C ingadozott. A kontroll és a kezelt állatok között feltűnő különbséget nem tapasztaltunk. A kontroll állatok szérum-koleszterin-értékei a 0,9 %-os NaCl-oldattól nem lényegesen változtak. A négy kontroll állat közül egynek a szérum-koleszterinje a felére csökkent. A hialuronát-liázzal végzett kezelés szintén nem járt a szérum-koleszterin-koncentráció feltűnő eltolódásával. Az infúziós kezelés során az összes állat részben igen magas szérum-triglicerid-értékei csökkentek. A 20. infúzió után a kontroll értékei 570-740 mg/100 ml, a hialuronát-liázzal kezelt állatok értékei 200-290 mg/100 ml.

2/4 kontroll állat esetén az aortaívek nagy mértékben ateromatózisosak voltak, további 2/4 állat esetén az ateromatózis közepes és nagymértékű között volt. A hialuronát-liázzal kezelt állatok közül 2/6 nyúl esetén az aortaívek közepesen, 4/6 állat esetében csekély mérték és közepes mérték közötti volt a lelet.

2/4 kontroll állat esetén az A. thoracica nagy mértékű, 2/4 további állat esetén közepes ateromatózisos lerakódásokat mutatott. A hialuronát-liázzal kezelt állatok közül az A. thoracica 4/6 állat esetén csekély mértékben, 2/6 állat esetén alig észlelhetően mutatott lerakódásokat.

2/4 kontroll állat esetén az Aorta abdominalis nagy mértékű, további 2/4 állat esetén csekély és közepes közötti ateromatózisos lerakódást mutatott. A hialuronát-liázzal kezelt állatok közül az A. abdominalis 2/6 esetben közepes, 4/6 esetben gyenge, ill. alig észlelhető lerakódást mutatott.



2/4 kontroll állat esetén az Aorta pulmonalis nagy mértékben, további 2/4 állat esetén csekély mértékben, illetve közepesen volt borítva plakkokkal. A hialuronát-liázzal kezelt állatok 1/6 állat esetén az A. pulmonalis erős lerakódást mutatott, 2/6 esetén a lerakódás csekély, illetve közepes mértékű volt, 3/6 állat esetén plakk nem volt. A 0,9 %-os NaCl-oldattal és a hialuronát-liázzal kezelt Watanabe-házinyúlak között az általános viselkedés, testtömeg-fejlődés, infúzió előtti és utáni testhőmérséklet és klinikai-kémiai paraméterek vonatkozásában a 10-10 infúziót magában foglaló két kezelési ciklus alatt feltűnő különbségek nem voltak, tehát az infúziós folyadék jó elviselhetőségére lehet következtetni.

Az aortaanyag szubjektív makroszkópos elbírálása alapján az mondható, hogy a 0,9 %-os NaCl-oldattal kezelt állatok esetén az ateromatózisos lerakódások nagyobbak tűntek, mint a mikroba eredetű hialuronát-liázzal kezelt 6 állat esetén.

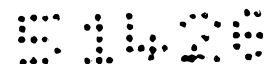
13. példa

Nagy tisztaságú tömény enzimoldatot annyi NaCl-oldattal hígítunk, hogy a keletkező oldat 0,9 % nátrium-kloridot és 10.000 NE/ml hialuronát-liázt tartalmazzon. Az oldatot 0,2 μ m pórusméretű steril szűrőn át sterilre szűrjük. Az oldat 1-1 ml-jét steril körülmények között ampullákba töltjük. Az ampullákat steril körülmények között liofilizáljuk és steril körülmények között zárjuk. Injektálás előtt az ampulla tartalmához 1 ml steril desztillált vizet adunk.

14. példa

Nagy tisztaságú enzimoldatot magnézium-nikotinát és magnézium-adipinát (?agnesium compositum „Scharffenberg”) oldattal úgy hígítunk, hogy a keletkező oldat 1 milliliterben 25 mg magnézium-nikotinátot, 88 mg magnézium-adipinátot és 10.000 NE hialuronát-liázt tartalmazzon. Az oldatot a 13. példa szerint ampullázzuk.

15. példa



Nagy tisztaságú hialuronát-liáz oldatát nátrium-klorid és tojásalbumin oldatával úgy hígítjuk, hogy az oldat 0,9 %-os NaCl-tartalmú, 1 % tojásalbumint és 1 milliliterben 40.000 NE enzimet tartalmazzon. Az oldatot a 13. példa szerint szereljük ki.

16. példa

Nagy tisztaságú hialuronát-liáz-oldatot nátrium-klorid-oldattal és szójabrotein-hidrolizátummal úgy hígítunk, hogy a keletkező oldat 0,9 / nátrium-kloridot, 1 % szójabrotein-hidrolizátumot és 1 ml-ben 40.000 NE enzimet tartalmazzon. Az oldatot a 13. példa szerint szereljük ki.

17. példa

Streptococcus agalactiae holoenzimjéből nyert fragmens oldatát nátrium-klorid-oldattal és tojásalbuminnal úgy hígítjuk, hogy a keletkező oldat 0,9 % nátrium-kloridot, 1 % tojásalbumint és 1 ml-ben 40.000 NE enzimaktivitást tartalmazzon. Az oldatot a 13. példában leírtak szerint ampullákban szereljük ki.

18. példa

Streptococcus agalactiae holoenzimjéből nyert fragmens oldatát nátrium-klorid-oldattal és magnézium-klorid-oldattal úgy hígítjuk, hogy a kész oldat 0,9 % nátrium-kloridot és 100.000 NE/ml liázaktivitást tartalmazzon. Az oldatot 0,2 µm pórusméretű steril szűrőn át sterilre szűrjük. Az oldat 1-1 ml-jét steril körülmények között ampullákba töltjük. Az ampullákat steril körülmények között liofilizáljuk és steril körülmények között zárjuk. Injektálás előtt az ampulla tartalmához 1 ml steril desztillált vizet adunk.

Szabadalmi igénypontok

1. Gyógyászati készítmény, amely baktérium eredetű hialuronát-liázt tartalmaz holoenzim, annak hialuronát-bontó fragmense vagy e két forma keveréke alakjában, legalább egy stabilizátorral és/vagy gyógyászatilag elfogadható hordozó- vagy segédanyaggal együtt.

2. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a hialuronát-liáz *Streptococcus* nemzetségbeli mikroorganizmusból származik.

3. A 2. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a hialuronát-liáz a *Streptococcus agalactiae* mikroorganizmusból származik.

4. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a baktérium eredetű hialuronát-liáznak holoenzim alakjában $IP = 8,6$ az izoelektromos pontja és 116 kD a móltömege.

5. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a hialuronát-liáz fragmensének móltömege 84 és 86 kD közötti.

6. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény érbetegségek kezelésére, mely érbetegségek az alábbi csoportból vannak kiválasztva: szívritmuszavar, ateroszklerózis, agyi infarktus, agyi trombózis, szívkoszorúér-trombózis, szívinfarktus.

7. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelyben hialuronát-liáznak olyan hialuronát-bontó fragmense van, amely baktérium eredetű hialuronát-liázból állítható elő aromás aminosavak C-terminális végének peptidkötését bontani képes proteázzal végzett részleges hidrolízis útján.

8. Az 1.igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy intravénás vagy intraartériás injekcióhoz való injekciós oldat.

9. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, *azzal jellemezve*, hogy a mikroba eredetű hialuronát-liáznak és/vagy fragmensének aktivitása 20.000 és 4.000.000 NE/ml közötti.

10. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely hialuronát-liázt és/vagy fragmensét és mintegy 1 tömeg% albumint és/vagy hidrolizátumot tartalmazó tisztított vizes injekciós oldat.

11. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely hialuronát-liázt és/vagy fragmensét és és magnéziumsót tartalmazó tisztított vizes injekciós oldat.

12. Az 1. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely hialuronát-liázt és/vagy fragmensét és és glükózt tartalmazó tisztított vizes injekciós oldat.

13. Baktérium eredetű hialuronát-liáz enzimfragmense, *azzal jellemezve*, hogy hialuronát-liáz-aktivitással rendelkezik.

14. A 13. igénypont szerinti enzimfragmens, *azzal jellemezve*, hogy a hialuronát-liáz *Streptococcus* nemzetségbeli mikroorganizmusból származik.

15. A 13. igénypont szerinti fragmens, *azzal jellemezve*, hogy a hialuronát-liáz a *Streptococcus agalactiae* mikroorganizmusból származik.

16. A 13. igénypont szerinti enzimfragmens, *azzal jellemezve*, hogy baktérium eredetű hialuronát-liázból lett előállítva aromás aminosavak C-terminális végének peptidkötését bontani képes proteázzal végzett részleges hidrolízis útján.

17. A 13. igénypont szerinti enzimfragmens, *azzal jellemezve*, hogy előállítása során baktérium eredetű hialuronát-liáz hordozón immobilizált proteázzal végzett enzimes részleges hidrolízisnek lesz alávetve.

18. A 13. igénypont szerinti enzimfragmens, *azzal jellemezve*, hogy előállítása során baktérium eredetű hialuronát-liáz hordozón immobilizált MO/2 metalloproteázzal végzett enzimes részleges hidrolízisnek lesz alávetve.



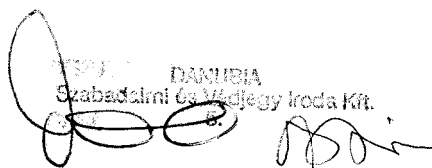
19. A 13. igénypont szerinti enzimfragsens, *azzal jellemezve*, hogy előállítása során *Streptococcus* eredetű hialuronát-liáz hordozón immobilizált MO/2 metalloproteázzal 6,5-8,0 pH mellett 25 °C és 45 °C közötti hőmérsékleten végzett enzimes részleges hidrolízisnek lesz alávetva.

20. A 13. igénypont szerinti enzimfragsens, *azzal jellemezve*, hogy előállítása során *Streptococcus agalactiae* mikroorganizmusgból származó, mintegy 115.000 és 120.000 közötti móltömegű hialuronát-liáz enzimes részleges hidrolízisnek lesz alávetve.

21. A 13. igénypont szerinti enzimfragsens, *azzal jellemezve*, hogy móltömege mintegy 84.000 és 86.000 közötti.

22. A 13. igénypont szerinti enzimfragsens, *azzal jellemezve*, hogy fajlagos aktivitása 400.000 NE/mg és 800.000 NE/mg közötti.

A meghatalmazott:


DANUBIA
Szabadalmi és Műjegy Iroda Kft.

28 + 0 = oldal


2001. 10. 09.