

57.009/SM

K I V O N A T

Aszialo-glikoprotein tartalmú konjugált <sup>humán plazma</sup> gyógyhatású szer

Liver Research Foundation of Korea,	SEOUL,
KIM Chung Yong,	SEOUL,
LEE Hyo Suk,	SEOUL,
	KOREA

A bejelentés napja: 1992. 06. 19.

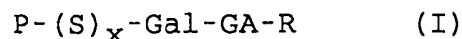
Elsőbbsége: 1991. 06. 19. (1991/10186)

KOREA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/KR92/00023

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/22310

A találmány tárgya (I) általános képletű aszialo-glikoprotein-konjugált <sup>humán</sup> ~~gyógyhatású szerek~~



- ahol

P jelentése humán szérum glikoprotein peptid maradéka;

S jelentése humán szérum glikoprotein cukor maradéka;

Gal jelentése galaktóz maradék;

GA jelentése glutáraldehid maradék;

x jelentése egész szám, melynek értéke = 1 vagy nagyobb 1-nél;

és

R jelentése valamilyen gyógyhatású komponens, így interferon, aciklovir-nátrium, ribavirin, vidaravin, zidovudin, suramin, antiszensz oligonukleotid, ribozim, leukovorin-kalcium, nátrium-meglumin-diatrizoát, gadolinium-DTPA, glutation, prosztoglandin,  $^{99m}\text{Tc}$  és  $^{131}\text{I}$ .

A találmány szerinti gyógyhatású szerek a vírusos hepatitisz kezelésében alkalmazhatók.

Gwala

—57.009/SM—

S.P.O. & K.  
Budapesti Nemzetközi  
Szabványi Iroda  
H-1051 Budapest, Dózsa György u. 10.  
Tel: 153-3733, Fax: 153-3664

A 63861

447193

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

NSZOR	C O 7 K	15 114
	C O 7 K	15 126
	A 61 K	37 102
	A 61 K	37 166

FC 1202

Aszialo-glikoprotein tartalmú konjugált ~~gyógyhatású szer~~

Liver Research Foundation of Korea, SEOUL,  
 KIM Chung Yong, SEOUL,  
 LEE Hyo Suk, SEOUL,  
 KOREA KR

Feltalálók: KIM Chung Yong, SEOUL,  
 LEE Hyo Suk, SEOUL,  
 KOREA KR

A bejelentés napja: 1992. 06. 19.

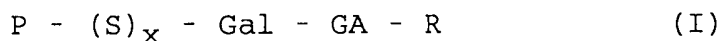
Elsőbbsége: 1991. 06. 19. (1991/10186)

KOREA KR

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/KR92/00023

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/22310

A találmány tárgya aszialo-glikoprotein és valamilyen specifikusan a májra ható gyógyhatású komponens kombinálásával előállított (I) általános képletű új konjugált gyógyhatású szer.

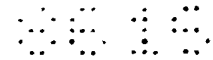


ahol P jelentése valamilyen humán szérum glikoprotein peptid maradéka; S jelentése valamilyen humán szérum glikoprotein cukor maradéka; Gal jelentése galaktóz-maradék; GA jelentése glutár-aldehid maradék; x jelentése egész szám, melynek értéke 1 vagy 1-nél nagyobb, R jelentése valamely gyógyhatású komponens.

Közelebbről, a találmány tárgya új konjugált interferon gyógyhatású szer, amely a vírusos hepatitisz kezelésében hatásos. A találmány szerinti konjugált interferon szelektíven csak a májban, a fő hepatitisz vírus replikációs helyen abszorbeálódik és jól alkalmazható a B-típusú és C-típusú hepatitisz kezelésében.

A találmány oltalmi körébe tartozik az új konjugált gyógyhatású szer előállítására vonatkozó eljárás, valamint a új konjugált gyógyhatású szert tartalmazó gyógyszerkészítmény és ennek alkalmazása is.

A krónikus vírusos hepatitisz igen elterjedt betegség a világban. Becslések szerint a világ népességének körülbelül 5%-a, Korea népességének körülbelül 10%-a szenved krónikus vírusos hepatitisztől. Gyógyászati és szociális fontosságát az indokolja, hogy igen kedvezőtlenül befolyásola az életminőséget és produktivitást. Általában májcirrózishoz és esetenként primer hematómához vezet, amely halálos. A krónikus hepatitiszes vírusfertőzés a hepatoma fő okozója és igen magas halálozási arányú betegség lévén, nagy szükség lenne olyan hatásos vírusellenes szerre, amelynek segítségével sikeresen küzdene a világ ez ellen a betegség ellen. Ezidáig még nem született meg a krónikus vírusos hepatitisz vírusellenes terápiája. Bár léteznek részlegesen hatásos



szerek a krónikus vírusos hepatitisz ellen, de ezek alkalmazása mellékhatásaik miatt kérdéses.

A múltban általánosan használt vírusellenes szerek egyike az adenozin arabinóz monofoszfát (Ara-AMP), amely egy purin-bázisú készítmény és erőteljes víruselleni aktivitását a DNA polimeráz aktivitásának gátlásán keresztül fejti ki. Az 1980-as években közölt adatok szerint az Ara-AMP a krónikus hepatitisz B kezelésében 10-17%-ban volt hatásos. 1987-ben azonban Garcia és társai (Garcia G., Smith CL., Weissberg, J. I. és társai: Adanin arabinóz monofoszfát humán leukocita interferonnal kombinálva a krónikus hepatitisz B kezelésében; randomizált, kettős vakpróbás placebo-kontrolált vizsgálat *Ann. Intern. Med.* 107:278.285, 1987) vizsgálataik alapján azt közölték, hogy az Ara-AMP-s kezelés után a kontrolcsoporttal összehasonlítva egyáltalán nem volt kimutatható szignifikáns javulás, sőt, néhány esetben igen komoly mellékhatások jelentkeztek, így a csontvelőképződés zavarai és irreverzibilis neuromuskuláris fájdalom. Ennek megfelelően az Ara-AMP-t már nem alkalmazzák a krónikus vírusos hepatitisz B kezelésében.

Általánosan ismert, hogy az állati sejtek által képzett interferon, azaz a természetben előforduló interferon hatásos a krónikus vírusos hepatitisz B kezelésében. A természetes interferon egy glikoprotein, azaz egy konjugált protein, amelyben a nem-protein csoport kis molekulatömegű szénhidrát. Vírus elleni hatásáról 1957-ben számoltak be először. Azóta az ipari és az alapkutatásban egyaránt, számtalan vizsgálatot végeztek hatásával, hatásmechanizmusával, tisztításával, tömeges előállításával, stb. kapcsolatosan, mivel az interferon vírusellenes hatása mel-



lett tumor elleni szerként is hatásos.

Napjainkban a következő interferon fajták ismertek:

- 1) alfa-interferon, amely a leukociták vírusos fertőzése nyomán keletkezik és amely vírusellenes hatást mutat és fokozza a killer limfociták aktivitását;
- 2) béta-interferon, amely vírusfertőzés nyomán, főként a fibroblasztok kettős szálú RNA vírus általi, fertőzése nyomán keletkezik és vírusellenes hatású; és
- 3) gamma-interferon, amely limfociták nitrogénnel vagy antigénnel létrehozott immunológiai stimulációjának hatására keletkezik és immunomodulációs aktivitást mutat.

Az alfa- és béta-interferonnal összehasonlítva a gamma-interferon kiemelkedő tumorellenes és vírusellenes aktivitással bír.

Napjainkban genetikai rekombinációs módszerekkel létrehozták a rekombináns interferont, melyet ipari méretekben gyártanak és széleskörűen alkalmazzák vírusellenes és immunmodulátor hatásait.

A nyilvánosságra hozott adatok szerint rekombináns interferon terápiás hatása a krónikus hepatitisz B esetében a nyugati világban, ahol a krónikus hepatitisz B viszonylag alacsony %-ban fordul elő, 30-40%-os.

Azonban, ha ezt az adatot összehasonlítjuk a kezeletlen csoport 15-20%-os gyógyulási arányával, akkor a rekombináns interferon klinikai hatásossága csak körülbelül 10-15%-os a krónikus hepatitisz B betegségben szenvedő páciensek esetében.

Becslések szerint a világ népességét tekintve a hepatitisz B antigén hordozók száma közelítőleg 300 millió, ennek 80%-a az ázsiai népességből kerül ki. Ha ezeket az ázsiai betegeket rekomb-



bináns interferonnal kezeljük, a betegek csökkenése csupán 10-15%-os, ami hasonló a korábban megfigyelt 16-17%-os spontán gyógyulási arányszámhoz. Ebből az látható, hogy a rekombináns interferon nem mutat jelentős hatékonyságot az ázsiai népesség esetében, beleértve a koreai népességet is.

Ismeretes, hogy bár a krónikus hepatitisz B-vel fertőzött beteg esetében az interferon eltávolíthatja vagy csökkentheti a páciens szérumában jelenlévő hepatitisz B vírust (HBV), bizonyos esetekben HBV DNA maradhat a páciens májsejtjeiben. Ennek megfelelően az interferon kezelés megszakításakor magas visszaesési arány várható.

A krónikus C-típusú hepatitisz esetében a nyilvánosságra került vizsgálati adatok szerint 28-71%-os a rekombináns interferonos kezelés terápiás hatása, bár kevés a különbség a B-típusú hepatitisz esetében beadott dózis és a kezelés időtartama között. A klinikai terápiás hatás elbírálásához egy biokémiai májfunkciós vizsgálat keretében a szérum alanin aminotranszferáz érték csökkenését vették alapul.

Mégis, mivel a pácienseknek közel fele visszaesik a hepatitiszbe a rekombináns interferonnal való kezelés után, látszik, hogy a C-típusú hepatitisz esetében a rekombináns interferon terápiás hatása csupán átmeneti. A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy a kereskedelemben kapható rekombináns interferon beadása csak átmeneti hatású kezelést biztosít a B-típusú és C-típusú krónikus hepatitiszben szenvedő betegek esetében.

A rekombináns interferon a természetben előforduló interferonnal ellentétben egy polipeptid interferon, amelynek nincsenek cukor csoportjai. Mivel a rekombináns interferon közvetlenül a

beadás után a veséken keresztül kiválasztódik a vizeletbe, az a vélemény, hogy a rekombináns interferon kötődése a májsejtekhez kisebb mértékű, mint a természetes interferoné és ezért a rekombináns interferon hatása igen korlátozott. A gyakorlat azt bizonyítja, hogy a rekombináns interferon klinikai hatása a B- és C-típusú krónikus hepatitiszre csupán átmeneti és a kezelési elégtelenség aránya, valamint a kezelés megszűnése utáni visszaesés egyaránt szignifikánsan magas. Emellett, a terápiás hatás fokozása céljából nagy mennyiségű interferont kell beadni. A nagy dózis alkalmazásához azonban elkerülhetetlenül olyan mellékhatások társulnak, mint a pyrexia, myalgia, artralgia és a csontvelő működésének megszűnése. Mindezekből látszik, hogy mivel az eddig ismert rekombináns interferon nem mutat nagy hatékonyságot mint terápiás szer, krónikus hepatitisz kezelésében sürgetően szükség lenne egy új, hagyhatású és minimális mellékhatású szer kifejlesztésére.

Az interferon átmeneti hatásosságának oka az, hogy bár az interferon képes lecsökkenteni a vírusos DNA szintet a szérumban, a májsejtekben lévő vírusokra nem hat hatékonyan. Ez lehetővé teszi, hogy a hepatitisz vírus folyamatosan replikálódjék a májsejtekben. Ezért eshetnek vissza a betegek a hepatitiszbe a rekombináns interferonnal való kezelés megszakítása után.

A fentiek figyelembevételével a legideálisabb módszernek egy olyan célzott terápia látszik, ahol a leghatékonyabb vírusellenes szert közvetlenül a célbavett májsejtekbe juttatjuk be.

Az irodalomban ismertek olyan módszerek, ahol a víruselleni szert egy specifikusan csak a májsejtekben jelen lévő receptoron keresztül juttatják be, ily módon meggátolva a májsejtekben a



vírusreplikációt. Fiume és társai (Biochem. Pharm. 35: 967, 1986) szintetizálták az L-SA-ara-AMP-t, amely egy vírusellenes szer, a 9- $\beta$ -D-azabino-furanozil-adenil-5'-monofoszfát (ara-AMP) és laktózaminált szérumalbumin (L-SA) - amely szérumalbumin és laktóz konjugációjával szintetizált új protein - kombinációja. Elméletileg az L-SA-ara-AMP képes specifikusan abszorbeálódni a májsejtekben. Ennek ellenére az L-SA-ara-AMP mégsem játszik nagy szerepet a hepatitisz kezelésében, mert a laktózaminált szérumalbumin előállítása igen bonyolult eljárással történik, és a felhasznált albumin nagyon drága. Emellett, az LSA-ara-AMP-t szintetikus glikoprotein felhasználásával is előállítják, amely a természetben nincs jelen az emberi testben, és ezt kombinálják ara-AMP-vel, amely hatástalan a krónikus hepatitisz B kezelésében.

Minden, a vérben jelen lévő plazma protein - az albumin kivételével - egy olyan glikoprotein, amely szénhidrát láncot tartalmaz egy láncvégi szialinsav maradékkal. Ezek a plazma proteinek kiürülnek a cirkuláló vérből azáltal, hogy a szialinsav maradékokat különféle enzimek lehasítják. Például a neuraminidáz egy olyan enzim, amely az emlősök szérumában képes lehasítani a szialinsav maradékokat a glikoproteinről. (Rosenberg A., Schengrund CL: Sialidases, Rosenberg A., Schengrund kiadók: Biological voles of sialic acid New York, Plenum, 1976).

A plazma proteinek, amelyek oldhatóak és cirkulálnak a vérben, egy idő után elvesztik oldhatóságukat és fiziológiás aktivitásukat. Ennek az akciónak a mechanizmusa a májban kere-sendő. Ismeretes, hogy a glikoproteinek eltávolítása a máj feladata. Ez abból a tényből látszik, hogy olyan páciensek esetében,



akik hepatitiszes cirrózisban vagy hepatitiszben szenvednek, és így rendellenes a glikoproteinek májsejtekből való eltávolításának folyamata, a cirkuláló aszialo-glikoproteinek, amelyek a normál szérumban nincsenek jelen, az ilyen betegek szérumában megjelennek. A gyakorlatban, ha deszialisált ceruloplazmint injektálunk egy nyúlba, a deszialisált ceruloplazmin felezési ideje 2 perc, amely sokkal rövidebb a természetes ceruloplazmin 55 órás felezési idejénél. Ezt a jelenséget más plazma proteinek esetében is igazolták. A szialil-csoportnak a glikoprotein lánc végéről való eltávolítása által a galaktóz-csoport védtelen marad és megköti egy, a májsejt membránban lévő receptor, aminek eredménye az, hogy a galaktóz csoport receptor mediált endocytosison (RME) keresztül gyorsan bejut a májsejtbe és eltűnik a cirkuláló véráramból.

Az 1960-as években Morell, Aschwell és társaik meghatározták, hogy ha egy ceruloplazmin szialil-csoportot neuraminidázzal eltávolítanak, ez a plazmaprotein gyorsan eltűnik a szérumból. A szerzők szerint ez a jelenség annak köszönhető, hogy a májsejtekben lévő ASGP receptor megköti a plazmaproteint (Adv. Enzymol., 41:99, 1974). A májsejteknek ezt a specifikus felvételét úgy azonosították, hogy ha triciummal megjelölt aszialo-ceruloplazmint vagy aszialo-orozomukoidot injektálunk az élő testbe, az izotópot csak a májsejtekben lehet detektálni (Scheinberg IH, Morell A G, Stockert RJ: Hepatic removal of circulating proteins Davidson CS., ed, Problems in Liver Diseases. pp 279-285, New York, Stratton Company, 1979). Emellett a kísérletek azt is megmutatták, hogy ez a receptor specifikusan felismeri és abszorbeálja a terminális cukorcsoportként D-galak-



tózt vagy N-acetil-galaktóزامint tartalmazó glikoproteineket (Ann. Rev. Biochem., 51, 531, 1982). A májsejtek sejtmembránja olyan sejtstruktúrával rendelkezik, amely kötődik a galaktóz-terminált aszialoglikoproteinekhez. Ezt a sejtstruktúrát először hepato-kötő proteinek (HBP) nevezték, most inkább aszialoglikoprotein receptornak nevezik. Azt is megfigyelték, hogy a különféle deszialilált glikoproteinek közül a deszialilált alfa(1)-sav glikoprotein, az aszialo-ozomukozid tűnik el leggyorsabban a szérumból a beinjekciózás után. Ennek alapján kimondhatjuk - amint az 1. táblázat adataiból jól látható -, hogy aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein specifikusan és jól kötődik a májsejtekhez (J. Biol. Chem., 245; 4397, 1970).

A jelentős vírusellenes aktivitással rendelkező természetes interferon szintén olyan glikoprotein, amely szialinsavat tartalmaz egy szénhidrátlánc végén és intravénás beadás után gyorsan kiürül a véráramból. A galaktóz-terminált aszialo-interferon, amely a természetes interferonból egy, a terminális szialilcsoportot lehasító enzimmel való kezeléssel jön létre, a természetes interferonnal összehasonlítva gyorsabban kiürül a véráramból. Ezt állapították meg a többi glikoprotein, így a ceruloplazmin esetében is.

Ennek ellenére a kutatások azt mutatják, hogy az interferon molekula szénhidrát csoportjának több mint 85%-át glikozidázzal eltávolítva és csak a polipeptid részt megtartva, ez a kezelés nem változtatja meg az interferon vírusellenes aktivitását, de csökkenti a májsejtekhez való kötődést és ez növeli az interferon felezési idejét a vérben (Bose S., Hickman J.,: Role of carbohydrate moiety in determining the survival of interferon in the



circulation, J. Biol. Chem., 252: 8336, 1977., Figure 2): Ebből az látszik, hogy az aszialo-interferon, hasonlóan más aszialo-plazma-glikoproteinekhez, szintén az aszialo-glikoprotein receptoron keresztül szelektív kötődéssel jut a májsejtekbe, amely megmagyarázza eltűnését a cirkuláló véráramból.

1980-ban Weissmann és társai előállítottak egy rekombináns interferont oly módon, hogy a humán leukocita  $\text{INF-}\alpha_{2b}$  gént bejuttatták E. coliba. Mivel a rekombináns interferon csak 165 aminosavat tartalmaz és nincsenek benne szénhidrát láncok, a rekombináns interferon bejutása a májsejtekbe igen gyenge, hasonlóan a polipeptid interferonhoz, amelyet a természetben előforduló interferonból glikozidázzal való kezeléssel állítanak elő.

A fentiek értelmében a találmány rekombináns interferon bejuttatása a specifikusan a májsejtekben lévő aszialo-glikoprotein (ASGP) receptorokhoz azon célból, hogy fokozzuk a rekombináns interferon vírusellenes aktivitását a csaknem kizárólagosan a májsejtekben replikálódó hepatitisz vírusokkal szemben.

A találmány tárgya továbbá egy olyan interferon-konjugátum, amely hepatitiszben szenvedő emlősöknek - így embernek is - beadva, alkalmas a hepatitisz vírusfertőzés, így a B-, C-, D-típusú hepatitisz kezelésére.

A találmány oltalmi körébe tartozik továbbá a vírusos hepatitisz kezelése oly módon, hogy ebben a betegségben szenvedő pácienseknek a májsejtekben jelenlévő hepatitisz vírus replikációjának gátlásához elegendő mennyiségben az (1) általános képletű konjugált interferont beadjuk.



A találmány tárgya továbbá egy, a vírusos hepatitisz kezelésére szolgáló készítmény, amely a májsejtekben jelenlévő hepatitisz vírus replikációjának gátlásához elegendő mennyiségben (I) általános képletű konjugált interferont tartalmaz, gyógyászatilag alkalmazható hordozóanyagok, adalékanyagok vagy segédanyagok mellett.

Végül, a találmány tárgya az új konjugált vírusellenes szer előállítására szolgáló eljárás, amely szerint aszialo-glikoproteint (ASGP) rekombináns interferonnal (INF) kombinálva előállítjuk az új interferon-konjugátumot, amely a betegnek parenterálisan beadva kötődik a májsejtekben specifikusan jelen lévő ASGP receptorokhoz.

A találmány szerinti megoldás előnye, hogy az új interferon-konjugátum alkalmazása csökkenti a rekombináns interferon alkalmazásánál fellépő mellékhatásokat.

A találmány szerinti új (I) általános képletű konjugált gyógyhatású szert és előállítási eljárását az alábbiakban ismertetjük részletesen.

A találmány tárgya (I) általános képletű új konjugált gyógyhatású szer



ahol P jelentése valamilyen humán szérumban glikoprotein peptid maradéka; S jelentése valamilyen humán szérumban glikoprotein cukor maradéka; Gal jelentése galaktóz-csoport; GA jelentése glutáraldehid maradék; x jelentése egész szám, melynek értéke 1 vagy 1-nél nagyobb, R bejelentése valamilyen gyógyhatású komponens.

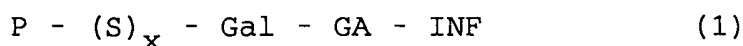
A fenti (I) általános képletű konjugált gyógyhatású szernek az aszialo-glikoproteinhez kapcsolt gyógyhatású komponense bár-



milyen, a májra specifikusan ható szer lehet. Így, előnyösen alkalmazható gyógyhatású komponens lehet valamilyen, a B- és C-típusú krónikus vírusos hepatitisz kezelésére alkalmas vírus-elleni szer, például interferonok, aciklovir nátrium, ribavirin, vidarabin (adenozin arabinóz), zinovudin (AZT), antiszensz oligonukleotid és ribozim (katalitikus RNSA); valamilyen, a rákelleni kemoterápia által kiváltott toxicitás elleni védelemre szolgáló biomodulátor, például a metotrexát toxicitás ellen alkalmazott leukovorin kalcium; valamilyen a máj képi diagnosztizálására szolgáló radiológiai kontrasztanyag, például nátrium-meglumin-diatrizoát és gadolinium-DTPA; valamilyen májmérgezés-védő szer, például glutation (GSH) és prosztoglandin; valamint valamilyen, a máj vizsgálatára alkalmas radioizotóp, így például  $^{99m}\text{Tc}$  (technécium) és  $^{131}\text{I}$ .

Még előnyösebben a találmány szerinti (I) általános képletű konjugált szer gyógyhatású komponense interferon (INF), amely a leghatékonyabb a krónikus vírusos hepatitisz kezelésében. Ennek megfelelően a találmány tárgya közelebbről aszialo-glikoprotein és interferon kombinálásával készült konjugált interferon.

A találmány tárgya vírusos hepatitisz kezelésére alkalmas, víruselleni hatású konjugált-interferon készítmények, amelyeket a véráramon keresztül bejutva közvetlenül megkötnek a májsejtek. A találmány szerinti konjugált interferonok az (1) általános képletek lehetnek



ahol P jelentése valamilyen humán szérum glikoprotein peptid maradéka; S jelentése valamilyen humán szérum glikoprotein cukor maradéka; Gal jelentése galaktóz maradék; GA jelentése glutáral-



dehid maradék; X jelentése egész szám, amelynek értéke = 1 vagy 1-nél nagyobb; INF jelentése interferon, előnyösen rekombináns interferon.

Az (1) általános képletben INF jelentése alfa-interferon, béta-interferon vagy gamma-interferon, előnyösen alfa-interferon lehet.

Előnyös humán szérum glikoproteinek az alfa(1)-sav glikoprotein (orozomukoid), fetuin, ceruloplazmin, haptoglobulin, thyroglobulin, makroglobulin.

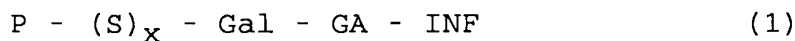
Az (1) általános képletben a  $P-(S)_x$ -Gal-csoport valamilyen deszialilált humán szérum glikoprotein, így aszialo-orozomukoid, aszialo-fetuin, aszialo-ceruloplazmin, aszialo-haptoglobulin, aszialo-thyroglobulin és aszialo-makroglobulin lehet.

A találmány oltalmi körébe tartozik a hepatitisz kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény, amely valamely (1) általános képletű konjugált interferont tartalmaz a vírusos hepatitiszben szenvedő beteg májsejtjeiben lévő hepatitisz vírus replikációjának gátlásához szükséges mennyiségben, gyógyászatilag alkalmazható hordozó-, adalék- vagy segédanyagok mellett. Előnyösen a találmány szerinti gyógyászati készítmény valamilyen intravénás beadásra alkalmas készítmény.

A találmány tárgyát képezi vírusos hepatitiszben szenvedő beteg kezelési eljárása is, amelynek során valamely (1) általános képletű konjugált interferont beadunk a beteg májsejtjeiben lévő vírus replikációjának meggátlásához szükséges mennyiségben. Előnyösen, a találmány szerinti konjugált interferont intravénás injekció formájában adjuk be.



A találmány tárgya végül eljárás valamely (1) általános képletű



konjugált interferon, ahol -

P jelentése valamilyen humán szérumban glikoprotein peptid maradvány;

S jelentése valamilyen humán szérumban glikoprotein cukor maradvány;

Gal jelentése galaktóz maradvány;

Ga jelentése glutáraldehid maradvány;

x jelentése egész szám, melynek értéke = 1 vagy 1-nél nagyobb; és

INF jelentése interferon, előnyösen rekombináns interferon előállítására.

A találmány szerinti eljárásban először előállítjuk a humán vérszérumot, amely egy  $(cukor)_x$ -Gal-NaNa általános képletű glikoproteint tartalmaz, ahol a cukor részhez kapcsolódó vége a molekulának D-galaktóz (Gal), és a maradvány N-acetil-neuramin sav (NANA) vagy szialinsav. Ezt követően a humán vérszérumot kezelve elválasztjuk a Protein- $(cukor)_x$ -Gal-NANA molekulát a humán vérszérumtól és kinyerjük a P- $(S)_x$ -Gal-NaNa molekulát. A P- $(S)_x$ -Gal-NaNa molekulát ezután neuraminidázzal kezelve kinyerjük a NaNa részt és megkapjuk az aszialo-glikoprotein (ASGPA), P- $(S)_x$ -Gal csoportot, amely egy deszialilált humán szérumban glikoprotein maradvány.

Az aszialo-glikoproteint [P- $(S)_x$ -Gal] ezután egy glutáraldehid (GA) keresztkötéses módszerrel (Reichlein M: Use of glutáraldehid as a coupling agent for protein and peptide Methods Enzy-



mol 70:159-165, 1980) összekapcsoljuk az interferonnal. Ezt követően kinyerjük az (1) általános képletű  $P-(S)_x$ -Gal-GA-INF konjugált interferont.

A humán vérszérum előnyösen humán szérum Cohn V frakció felülúszója, amelyet ismert módon, DEAE-Sephadex vagy CM-Cellulóz kromatográfiával kezelve elkülönítjük a Protein-(cukor) $_x$ -Gal-NaNa-t a Cohn V frakció felülúszójától.

Az (1) általános képletű  $P-(S)_x$ -Gal-Ga-INF konjugált interfeferon - ahol

P jelentése egy humán szérum glikoprotein peptid maradéka;

S jelentése egy humán szérum glikoprotein cukor maradéka;

Gal jelentése humán szérum glikoprotein galaktóz maradéka;

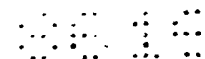
x jelentése egész szám, melynek értéke = 1 vagy 1-nél nagyobb;

és

INF jelentése interferon -

még specifikusabb előállítási eljárása szerint humán vérszérumként humán szérum Cohn V frakció felülúszójából indulunk ki, amelyet megfelelően kezelve abból elkülönítjük és kinyerjük a Protein-(cukor) $_x$ -Gal-NaNa glikoproteint, amelyet neuzaminidázzal kezelünk a glikoprotein deszialilálása céljából. Ilyen módon egy glikoprotein maradékot, aszialo-glikoproteint (ASGP) kapunk, amely egy Protein-(cukor) $_x$ -Gal szerkezetű molekula. Az aszialo-glikoproteint glutáraldehides (GA) keresztkötéses módszerrel interferonhoz kapcsoljuk, ezután kinyerjük a Protein-(cukor) $_x$ -Gal-Ga-INF szerkezetű konjugált interferont.

A humán szérum Cohn V frakció felülúszóját előnyösen DEAE-Sephadex vagy CM-Cellulóz gyantás kromatográfiával kezeljük ismert módon, így a Cohn V frakciótól elválasztjuk a Protein-

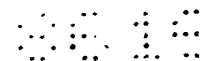


-(cukor)<sub>x</sub>-Gal-NANA molekulát.

A szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti megoldással ekvivalensnek tekinthető megoldás azonos a találmányi gondolattal, amelyet az igénypontok oltalmi köre foglal össze.

A rajzokat az alábbiakban ismertetjük:

1. ábra: intravénásan plazmába injektált deszialilált plazma proteinek megmaradási idejét mutatja;
2. ábra: a természetben előforduló interferon, neuramindázzal kezelt interferon és glikozidázzal kezelt interferon kiürülési sebessége intravénás beadás után;
3. ábra: elválasztott és tisztított alfa(1)-sav glikoprotein és aszialo-glikoprotein elektroforetikus diagramja (elektroferogram);
4. ábra: aszialo-glikoprotein és interferon összekapcsolás utáni elektroferogramja;
5. ábra: borjú szérum albumin és aszialo-glikoprotein májban való kötődésének gamma kamera képe és radioaktivitási képe;
6. ábra: interferon és a találmány szerinti új konjugált interferon májban való kötődésének gamma kamera képe és radioaktivitási képe;
7. ábra: a rajzon interferon és a találmány szerinti új konjugált interferon széteszlása látható az élő szervezetben 3 órával a beadás után; és
8. ábra: a rajzon interferon és a találmány szerinti új konjugált interferon relatív széteszlása látható a májban, megadott idő alatt.



A találmány szerinti legelőnyösebb megoldást az alábbiakban ismertetjük.

Az eddig ismert rekombináns interferon hátrányait kiküszöbölendő, az interferont a májsejtekbe kell bejuttatni. A találmány szerinti megoldással lehetséges a rekombináns interferonnak szelektíve, közvetlenül a májsejtekbe való bejuttatása. Plazma glikoproteineket neuraminidázzal kezelve felszabadítjuk a galaktóz maradékot a szialinsav-csoport eltávolításával, azaz aszialoglikoproteint (ASGP) hozunk létre. Ezután a víruselleni szer, a rekombináns interferont összekapcsoljuk a glikoprotein felszabadított galaktóz maradékával, az ASGP-vel úgy, hogy az összekapcsolt szer kötődni tudjon a májsejtekben specifikusan jelen lévő ASGP receptorokhoz. A víruselleni szer rekombináns alfa-, béta- és gamma-INF lehet; ezek közismerten a jelenleg leghatékonyabb szerek a B- és C-típusú krónikus hepatitisz kezelésében.

Fontos és meglepő tény, hogy ha alfa-, béta- vagy gamma-interferont önmagában használunk a hepatitisz kezelésére, akkor csak az alfa-interferon hatásos. Ezzel szemben, ha a találmány szerinti megoldást alkalmazva alfa-, béta- vagy gamma-interferont kapcsolunk aszialoglikoproteinnel (ASGPA), mindhárom interferon hatásos a hepatitisz kezelésében.

Mivel a találmány szerinti új konjugált interferon specifikusan csak a májsejtekben abszorbeálódik és azután hosszú ideig ott is marad, az optimális dózis lecsökkenthető. Ebből következően a gyakori beadott interferon dózisok vagy nagy dózisok következtében fellépő mellékhatások csökkennek. Bár a konjugált interferon előállításánál használt glikoproteinek fajtája nem korlátozott, előnyös a májban gyorsan abszorbeálódni képes alfa(1)-sav

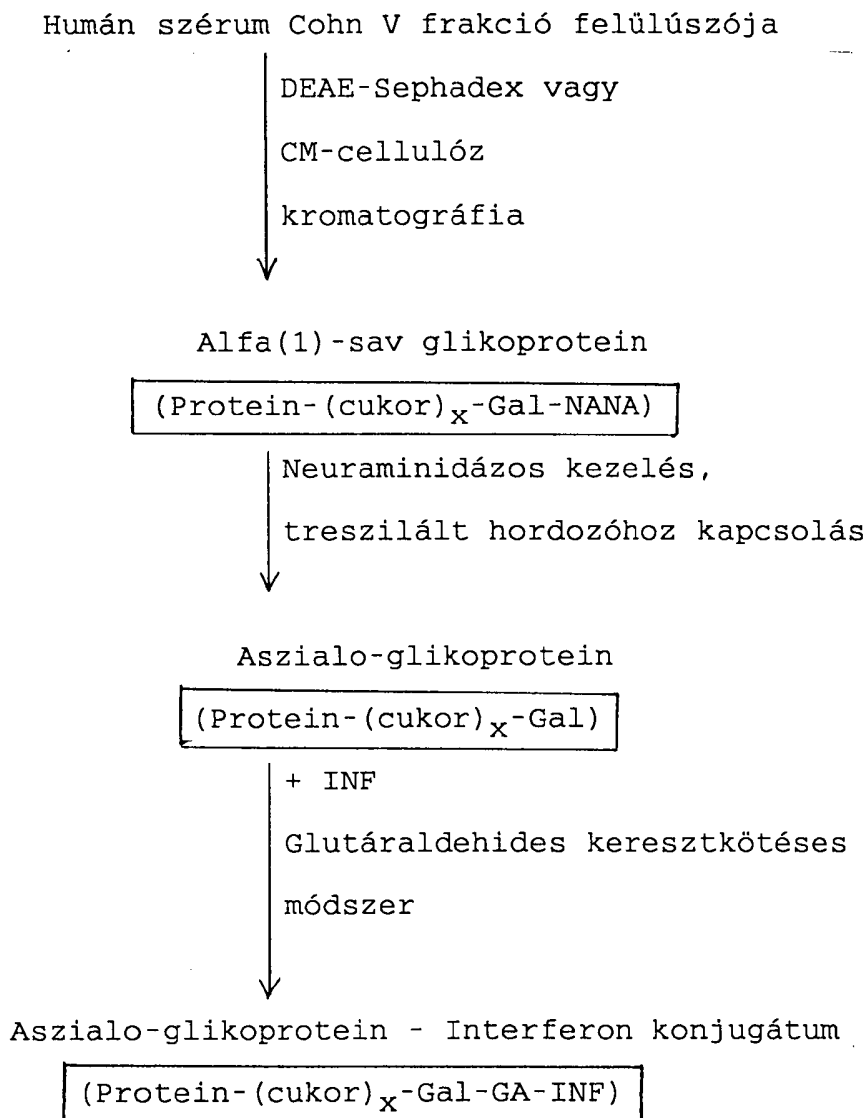
glikoprotein (orozomukoid), fetuin, ceruloplazmin, haptoglobin, thyroglobulin, valamint makroglobulin alkalmazása, amint az az 1. ábrából is látható.

A találmány szerinti konjugált interferont a következő módon állíthatjuk elő.

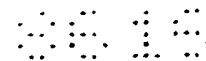
Először a humán szérum Cohn V frakció felülúszót DEAE-Sephadex vagy CM-Cellulóz kromatográfiával kezeljük ismert módon, az alfa(1)-sav glikoprotein [Protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal-NANA, ahol NaNa jelentése N-acetil-neuraminsav] elkülönítés céljából (Hao. Y-L, Wickerkanser M.: A glikoprotein, Biochem. Biophys. Acta 322; 99, 1973), amelyet azután neuraminidázzal kezelünk, így a szialinsav eltávolításával megkapjuk a Protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal szerkezetű aszialo-glikoproteint (ASGP). Az aszialo-glikoproteint ezután glutáraldehides (GA) keresztkötéses módszer segítségével interferonnal kapcsoljuk és megkapjuk a Protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal-GA-INF szerkezetű konjugátumot.

A találmány szerinti módszer folyamatábrája az 1. táblázatban látható:

1. táblázat



A fenti módszerben használt glikoprotein a humán szérumban jelen lévő glikoprotein. A találmányban bármilyen glikoprotein, így alfa(1)-sav glikoprotein (orozomukozid) is, alkalmazható, ahol a glikoprotein cukor részétől a második maradék D-galaktóz, és a glikoprotein többi maradéka N-acetil-neuraminsav (szialinsav). Ilyen megfelelő glikoproteinek a fetuin, ceruloplazmin, heptaglobin, stb.

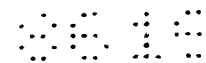


Az orozomuoid, fetuin, ceruloplazmin, haptoglobulin, thyroglobulin és makroglobulin neve deszilalizálás után aszialo-oro-  
-ozomukoid, aszialo-fetuin, aszialo-ceruloplazmin, aszialo-  
-heptoglobulin, aszialo-thyroglobulin és aszialo-makroglobulin, megfelelőleg; ezek alkalmazhatók a találmány szerinti konjugált interferon előállításában. Ezek az aszialo-glikoproteinek ugyanúgy állíthatók elő, mint az alfa(1)-sav glikoprotein deszialisálásával előállított aszialo-oro-  
-ozomukoid.

A legelőnyösebb az alfa(1)-sav glikoprotein (aszialo-oro-  
-ozomukoid) alkalmazása, mivel beinjektálás után a plazmában ebből körülbelül 0,18%/plazma ml marad meg, amint az az 1. ábrán látható. Az intravénásan beadott deszialisált plazma proteinek megmaradási idejének meghatározása céljából körülbelül 200 g-os hím albinó patkányok faroki vénájába 1 ml-es injekciókat adtunk be. Az 1 ml-es injekciók a következők voltak:

- $^3\text{H}$ -aszialo-transzferrin, 0,3 mg,  $6,6 \times 10^6$  bomlás/perc;
- $^{64}\text{Cu}$ -ceruloplazmin, 0,3 mg;
- $^3\text{H}$ -aszialo-thyroglobulin, 0,3 mg,  $12,6 \times 10^6$  bomlás/perc;
- $^3\text{H}$ -aszialo- $\alpha_2$ -makroglobulin, 0,19 mg,  $11,2 \times 10^6$  bomlás/perc;
- $^3\text{H}$ -aszialo-haptoglobulin, 0,12 mg,  $9,5 \times 10^6$  bomlás/perc;
- $^3\text{H}$ -aszialo-ceruloplazmin, 0,3 mg,  $6,7 \times 10^6$  bomlás/perc;
- $^3\text{H}$ -aszialo-fetuin, 0,11 mg,  $2 \times 10^6$  bomlás/perc;
- $^3\text{H}$ -aszialo-oro-  
-ozomukoid, 0,13 mg,  $14,4 \times 10^6$  bomlás/perc.

Bizonyos időnként vérmintákat vettünk a faroki vénából heparinezett csövekbe, a vett mintákat centrifugáltuk és meghatároztuk a plazma radioaktivitását. Ezt követően az állatokat megöltük, eltávolítottuk a májukat a megjelölt időkből, és kb. 20 mg-os nedves szövet alikvot részeket vettünk a radioaktivitás meg-

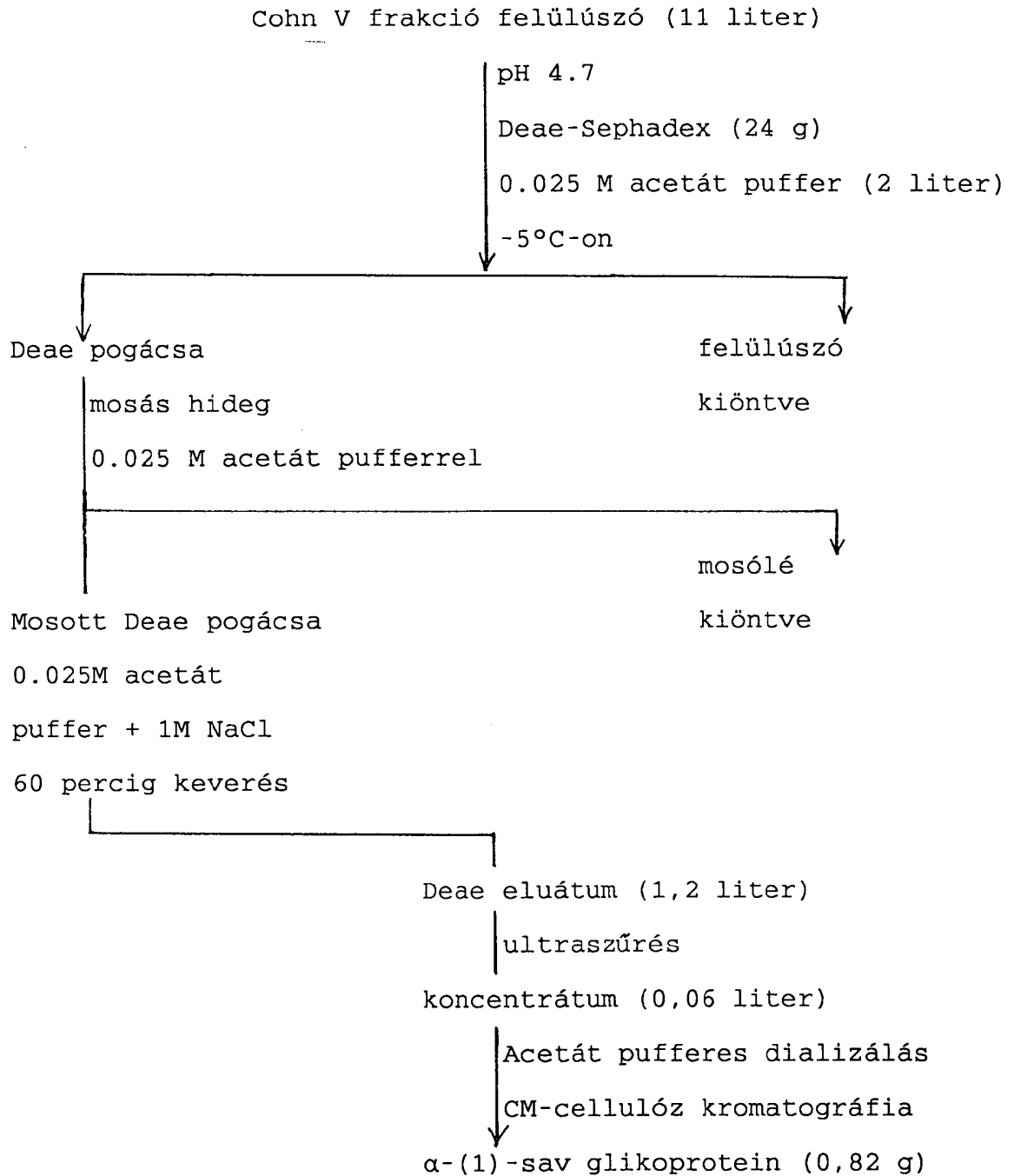


határozására. Az eredmények az 1. ábrán láthatók.

Az 1. ábra azt mutatja, hogy 12 perccel az intravénás beinjektálás után a vérben 0,18, 0,37, 0,6 és 1,2 % aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein (aszialo-orozomukoid), aszialo-fetuin, aszialo-ceruloplazmin, és aszialo-haptoglobin maradt, megfelelőleg. Ebből látható, hogy leggyorsabban az aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein (aszialo-orozomukoid) tűnik el leggyorsabban a vérből, ami azt jelzi, hogy a többiekhez képest ezt abszorbeálják a májsejtek a leggyorsabban.

A találmány szerinti konjugált interferon előállításának első lépésében a Cohn V frakció felülúszóját ismert módon különíthetjük el és nyerhetjük ki humán szérumból (Cohn E. J. és társai, J. Am. Chem. Soc. 68:459, 1946). A Cohn V frakció felülúszójából az alfa(1)-sav glikoproteint nagymértékben ismert módon nyerhetjük ki és tisztíthatjuk (Hao Y-L, Wickerhauser M.; A Simple Method for the Large-Scale Preparation of alpha(1)-acid glycoprotein, Biochem. Biophys. Acta. 322; 99, 1973), az alábbiak szerint.

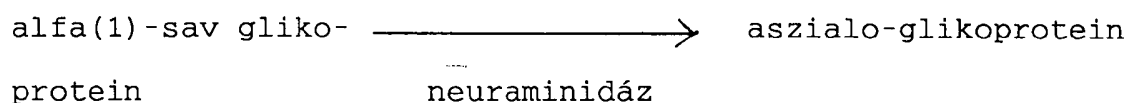
## 2. táblázat



Az elkülönített és tisztított alfa(1)-sav glikoproteinekből az 1. reakcióvázlat szerinti deszialilezési reakcióban nyerük aszialoglikoproteint:



### 1. reakcióvázlat



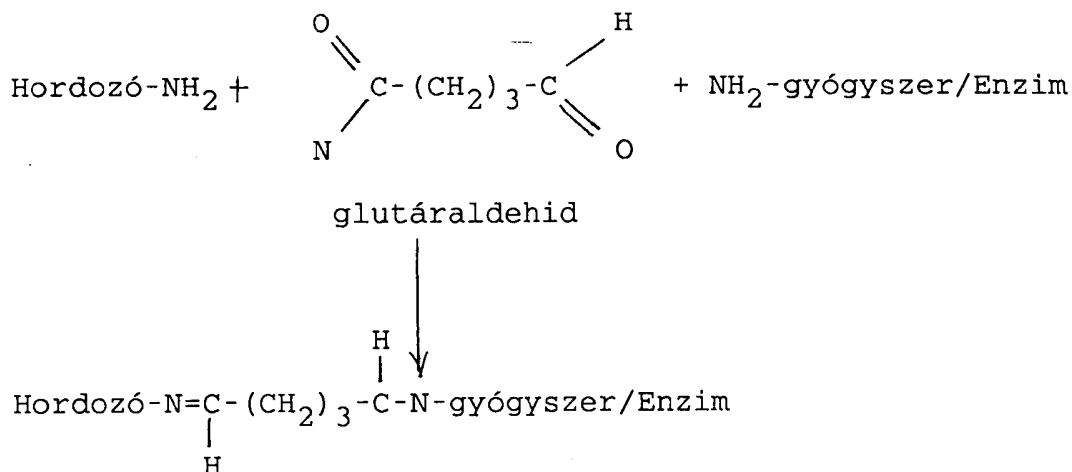
A kinyert aszialo-glikoprotein elektroforetikus diagramja a 3. ábra C oszlopában látható.

A 3. ábra A oszlopán a protein molekulasúly marker látható. A B oszlop az elkülönített alfa (1)-sav glikoprotein 43 kd-os (kilodalton) egyetlen sávját mutatja a szialinsav maradvánnyal együtt, a C oszlop pedig az aszialo-alfa (1)-sav glikoprotein körülbelül 41 kd-os egyetlen sávját mutatja, ahol a szialinsav maradvány eltávolítása 1,7 kd-ot jelent.

Az aszialo-glikoprotein-interferon konjugátum előállításának utolsó lépésében egy glutáraldehides (GA) keresztkötéses reakciót használunk, amely egyike a legkiméletesebb ilyen reakcióknak. A glutáraldehidet 6,0-8,0 közötti semleges pH tartományban, 4-40°C közötti hőmérsékleten, egy széles puffertartományt biztosító puffer alkalmazása mellett kapcsoljuk a felszabadított amino-csoporttal. A reakcióban a protein amino-csoportja és az aldehid-csoport közötti reakcióban egy Schiff bázis jön létre. Ebben a reakcióban, minthogy a glutáraldehid két aldehid-csoportot tartalmaz, ezek közvetlenül két amino-csoporttal kapcsolódnak, amint az a 2. reakcióvázlatban látható:



## 2. reakcióvázlat



(Pozmanski M. J. és Juliano R.L.: Biological approaches to the controlled delivery of drugs: a critical review. Pharmacological Reviews 36:271-336, 1984).

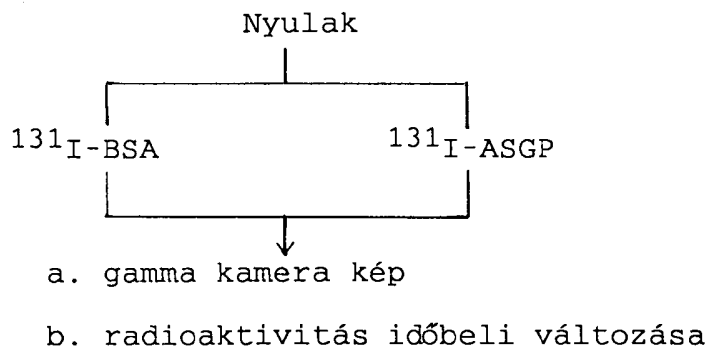
A konjugátumot autoradiográfiás berendezéssel azonosíthatjuk olyan módon, hogy először I(131) izotóppal megjelöljük a konjugátumot az interferon arányában, jodogén módszerrel I(131)-interferon-aszialo-glikoprotein konjugátumot hozva létre, majd elektroforézisnek vetjük alá és Coomassie Blue festékkel megfestjük (4. ábra, B és C oszlop). A 4. ábra C oszlopában egy protein molekulásúly marker látható; a B oszlop pedig a konjugátum 67 kilodaltonos sávját és a konjugátum létrejötte után maradt elreagálatlan aszialo-glikoprotein 41 kilodaltonos sávját mutatja. Az A oszlop a B oszlop elektroforetikus géljének autoradiográfiás képe és egy 67 kilodaltonos sávot mutat, amely megfelel a I(131)-interferon-aszialo-glikoprotein-konjugátumnak.

A találmány szerinti konjugátumban az interferon hordozójaként alkalmazott aszialo-glikoprotein májban való specifikus

abszorbeálódását a következő állatkísérletekkel bizonyítottuk. A kísérletek két csoportban folytak és minden kísérletben résztvett egy kontrol csoport is. A két kísérletet a 9. ábra és a 10. ábra illusztrálja.

### 9. ábra

Aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein  
szövet specifikusságát bizonyító kísérlet



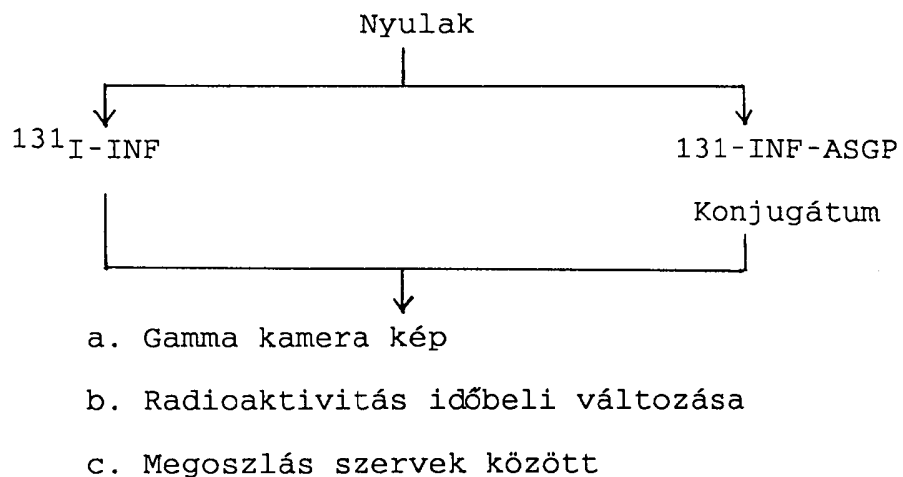
A gamma kamera képet és a radioaktivitás időbeli változását I(131) izotóppal jelölt aszialo-glikoproteinnel injektált nyulakkal végzett kísérletből kaptuk meg és I(131) izotóppal jelölt borjúsérum albuminnal (BSA) kapott eredményekkel hasonlítottuk össze. Az eredményekből az 5. ábrát nézve az látható, hogy a humán sérumból elkülönített tisztított aszialo-glikoprotein specifikusan abszorbeálódik a májban. Az 5. ábrán a felső gamma kamera kép annak a radioaktivitásnak a képe, amit hanyatt fekvő helyzetben a nyúl szervei kibocsátanak. Ebből a képből a nyúl szerveiben jelen lévő aszialo-glikoprotein mennyisége az idő függvényében összehasonlító módon azonosítható. Ebből meghatá-

rozható, hogy a I(131)-borjúszérum albuminnal összehasonlítva, a I(131)-aszialo-glikoprotein specifikusabban abszorbeálódik a májban és hosszabb ideig marad ott.

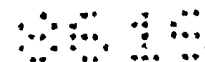
Az alsó képeken az x tengely az időt jelöli, az Y tengely pedig a májban és a szívben, azaz a véráramban detektált radioaktivitásokat jelöli, megfelelőleg. Az 5. ábra alsó képeiből az látható, hogy az albuminhoz hasonlítva az aszialo-glikoprotein erőteljesebben és specifikusan abszorbeálódik a májban, mint az albumin.

### 10. ábra

A konjugált interferon máj-szelektivitását  
bizonyító kísérlet



A másik kísérletben nyulakat injektáltunk I(131)-jelölt interferonnal és I(131)-jelölt találmány szerinti konjugált interferonnal és összehasonlítottuk a gamma kamera képet és a máj, szív, hólyag radioaktivitását az idő függvényében. A kapott



eredmények a 6. ábrán láthatók.

A 6. ábra gamma kamera képéből az látható, hogy az interferon az injekció beadása után 30 perccel főleg a májban van megkötve, de már megindul a hólyagba való kiválása. 3 óra elteltével az interferon gyakorlatilag már nincs jelen a májban, hanem főként a hólyagban található. Ezzel szemben a találmány szerinti aszialo-glikoprotein-interferon konjugátum folyamatosan megmarad a májban az injekció beadása után 30 perccel, 2 órával és 3 órával egyaránt, és nem figyelhető meg a hólyagba való kiválasztódása. Ez a radioaktivitás időbeli változását mutató alsó képen is látható. Így, az interferon esetében a máj radioaktivitását mutató felső vonal és a vér radioaktivitását mutató középső vonal fokozatosan csökken 30 percen belül, majd a hólyag radioaktivitását mutató alsó vonal emelkedik. Ezzel ellentétesen, az aszialo-glikoprotein-interferonnal injektált csoport esetében a máj radioaktivitását mutató vonal folyamatosan eredeti értékén marad és a hólyag radioaktivitásában semmiféle emelkedés nem figyelhető meg.

A találmány szerinti új konjugált interferon és az interferon szövet specifikusságát összehasonlítandó, nyúlba interferont és aszialo-glikoprotein-interferon konjugátumot injektáltunk és 3 óra elteltével a nyulat leöltük. Meghatároztuk a szervek radioaktivitását és összehasonlítottuk a szövetekben való megoszlást. Az eredmények a 7. ábrán láthatók. Hat szervben, azaz a májban, vesében, tüdőben, lépben, szívben és pajzsmirigyben észlelt radioaktivitást 100-nak véve, az aszialo-glikoprotein-interferon konjugátum esetében a májban észlelt megmaradt mennyiség körülbelül 85%-a az összesnek, és a megmaradási százalékok a vesében,



tüdőben és szívben csak 7%, 5% és 1%, megfelelőleg. Ezzel szemben az interferon esetében a májban észlelt megmaradt mennyiség csak 53%, és a vese, tüdő és szív esetében a megmaradási %-ok viszonylag magasak, azaz 32%, 11% és 2%, megfelelőleg.

A 8. ábra az interferon és az új konjugált interferon relatív megmaradási arányait mutatja az idő függvényében. Az ábrából az látható, hogy az aszialo-glikoprotein-interferon konjugátum megmaradása a májban szignifikánsan magasabb és hosszabb ideig tart, mint az interferoné. Ez azt jelenti, hogy az aszialo-glikoprotein-interferon megmaradása 1,5-, 4,3- és 6-szorosa az interferonénak az injekció beadása után 30 perccel, 3 órával és 12 órával, megfelelőleg.

A találmány szerinti interferon konjugátumot a hepatitisz kezelése céljából injektálható gyógyszerkészítménnyé alakíthatjuk ismert módon, a gyógyszeriparban az interferon készítményeknél szokásosan használt adalékanyagokkal, stabilizálószerekkel, pufferekkel, stb. összekeverve. A célra használt puffer előnyösen nátrium-foszfát, kálium-foszfát, stb. A találmány szerinti gyógyszerkészítmény tartalmazhat még konzerválószereket, így fenolt; stabilizálószereket, így albumint, L-cisztein hidrokloridot, maltózt, nátrium-kloridot vagy kálium-kloridot, stb.

Az alkalmazott dózis a beteg korától, testsúlyától, a betegség fokától, stb. függ, az általánosan alkalmazott dózis intravénás injekció esetében 0,2-2,0 millió nemzetközi egység az interferonra vonatkoztatva/m<sup>2</sup> testfelszín, egyszer naponta vagy kétnaponként egyszer. Az alkalmazott dózisok és a beadási periódus ettől eltérhetnek és meghatározásuk a szakember feladata.



A találmány szerinti konjugált interferon specifikusan a májsejtekben abszorbeálódik és hosszú ideig megmarad a májban. Ennek megfelelően a konjugált interferon dózis sokkal kisebb lehet, a közönséges interferon készítményekkel összehasonlítva. Ennek a csökkentett dózisak köszönhetően a betegeket kisebb mértékben veszélyeztetik az interferon terápiával együtt járó mellékhatások, mint a láz, myalgia, a csontvelőképződés leállása, stb. Ennek következtében a találmány szerinti konjugált interferonnal szembeni humán tolerancia szignifikánsan jobb, mint a közönséges interferon esetében.

A találmány szerinti gyógyszerkészítmény intravénás beadása utáni eredmények láthatók a 7. és 8. ábrákon.

Az alább következő példák a találmány szerinti megoldást szemléltetik anélkül, hogy igényünket ezekre a példákra korlátoznánk.

#### Aszialo-glikoprotein

(Protein-(cukor<sub>x</sub>)-Galaktóz) előállítása

##### 1. példa

#### Aszialo-glikoprotein előállítása alfa(1)-sav glikoproteinből

##### 1. Treszilált hordozó előállítása

10 g nedves Sepharose 4B (Pharmacia) gélt üvegszűrőbe teszünk és egymás után 10 ml 30 tf%-os, 80 tf%-os vizes acetone oldattal, majd 100%-os abszolút acetonnal mossuk. A mosott Sepharose 4B gélt 30 ml absz. acetont és 150  $\mu$ l treszil-kloridot (2,2,2-trifluor-etánszulfonil-klorid) (Fluka AG, Buchs, Switzerland) tartalmazó lombikba helyezzük és mágneses keverővel kever-



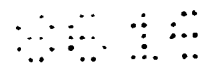
jük az elegyet. Ezt követően a lombikot szobahőmérsékleten hagyjuk állni 10 percig, az elegyet átszűrjük az üvegszűrőn, majd 50 mM-es sósavban feloldott 70 tf%-os, 50 tf%-os és 30 tf%-os acetonos oldattal, végül pedig 1 mM-os sósavval mossuk. A kapott terméket 4°C-on tároljuk, acetonnal kezeljük, szárítjuk, majd szobahőmérsékleten tároljuk. Az így kapott hordozó körülbelül 450  $\mu$ mol enzim/1 g száraz gélhordozója lehet.

## 2. A neuraminidáz kötése a treszilált hordozóhoz

1 ml (0,4 mg/ml) neuraminidázt (Sigma Chem) NAP<sup>TM</sup>-10 oszlopon (Pharmacia) átengedünk, majd 1,5 ml 0,2 M nátrium-foszfát-0,5M nátrium-klorid pufferben feloldjuk (pH = 7.0) ( $A_{280} = 0.534$ ) és 1,0 g aktivált treszil-Sepharose 4B-t adunk hozzá. Az elegyet 16 órán át 4°C-on rázzuk lassan és 1,5 ml 0,5M trisz puffert (pH = 7.5) adunk hozzá. Az így kapott elegyet 4°C-on tartjuk 5 órán át. A kapott gélt 0,1M nátrium-foszfát-0.15M nátrium-klorid (pH = 5.5) pufferrel mossuk, a kapott neuraminidáz-Sepharose 4B-t 4°C-on tároljuk ( $A_{280} = 0.45$ ) (neuraminidáz termelés a pufferben;  $OD\ 0.084/OD\ 0.534 = 0.064\ Mg/0.4 = 16\%$ ).

## 3. Aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein előállítás

250 ml alfa(1)-sav glikoproteint 25 ml 0.15M nátrium-klorid-0.1M nátrium-acetát pufferben (pH = 5.5) feloldunk, majd a kapott oldatot 2 ml neuraminidáz-Sepharose 4B oldattal keverjük. Az elegyet egy éjszakán át hagyjuk állni 37°C-on. Az eluátumot kinyerjük, majd a deszialilálás hatékonyságát tiobarbitursavas analízissel határozzuk meg. (Warren L: The thiobarbituric acid assay of sialic acids J. Biol. Chem. 234: 1971-1975, 1959). Ennek értelmében úgy járunk e., hogy 1.0 ml neuraminidáz-Sepharose B-vel kezelt alfa(1)-sav glikoprotein oldatot (10 mg/ml) NAP<sup>TM</sup>-10



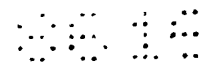
oszlopon engedjük át a só oltávolítása céljából. Ezután 50 µl 1N kénsavat adunk 1 ml eluátumhoz és az elegyet rázzuk, 1 órán át 80°C-on inkubáljuk, majd lehűtjük, hogy az alfa(1)-sav glikoproteinből eltávolítsuk a neuraminidázos kezelés után még megmaradt szialinsav csoportot. Egy 0.2 ml-es mintát 0.1 ml perodáttal összekeverünk, a keveréket 20 percig állni hagyjuk és 1,0 ml arzenit hozzáadása után addig rázzuk, amíg a sárgásbarna szín eltűnik. A kapott oldathoz 3 ml tiobarbitursavat adunk és az elegyet 15 percig forraljuk, majd jeges-vízzel 5 percig hűtjük. Az elegy 2.0 ml-es alikvot részét 2 ml ciklohexanonnal keverjük, 3 percig centrifugáljuk és megmérjük a vörös felülúszó abszorbanciáját 549 nm hullámhossznál. A kontrol alfa(1)-sav glikoprotein abszorbanciája 0.008, az aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein abszorbanciája pedig 0.118.

A fentiek alapján a tiszta szialinsav abszorbanciája 0.110 (0.118-0.008) O.D. A szialinsav molekuláris abszorbancia indexe 57,000 és a lehasadt szialinsav mennyiséget (µmol) a következő egyenlet alapján számíthatjuk ki:

$$\frac{V \cdot \text{O.D.}_{549}}{57,000} \cdot 1000 = \frac{V \cdot \text{O.D.}_{549}}{57} = \frac{4 \cdot 3 \cdot \text{O.D.}_{549}}{57} =$$

$$0.075 \cdot \text{O.D.}_{549}, \quad \text{ahol}$$

V = tiobarbitursav mennyisége  
 1000 = ml → liter szorzó, és  
 O.D. = optikai sűrűség



Az aszialo-glikoproteinekből a kénsav segítségével felszabadult szialinsav mennyiség  $0.00825 \mu\text{mol}$  ( $= 0,075 \cdot 0,110$ ). Egy (1) ml alfa(1)-sav glikoprotein (1 mg/ml)  $0.369 \mu\text{mol}$  szialinsavat tartalmaz. Ebből kifolyólag, mivel a kísérletben használt alfa(1)-sav glikoprotein mennyisége 2 mg, a szialinsav összes mennyisége  $0.738 \mu\text{mol}$  ( $= 0,369 \mu\text{mol} \cdot 2$ ) és a neuraminidázos kezelés hatására felszabadult szialinsav mennyiség  $0.7298 \mu\text{mol}$  ( $= 0.738 - 0.0082$ ). Mindezek alapján a számított hatékonyság  $0.7298 / 0.738 \cdot 100 = 99\%$ .

### 2. példa

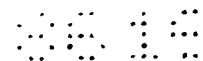
Az 1. példában ismerttetettek szerint eljárva, alfa(1)-sav glikoprotein helyett fetuint, ceruloplazmint, haptoglobint és thyroglobulint használunk aszialo-fetuin, aszialo-uruloplazmin, aszialo-haptoglobulin és aszialo-thyroglobulin előállítására.

### 3. példa

#### Aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein és rekombináns interferon konjugátum előállítása

#### (Protein-(cukor)<sub>x</sub>-Galaktóz-Glutáraldehid-Interferon)

A konjugátum előállítását egy lépésben, Harlow és Lane (1988) egylépéses módszerével végezzük. 1.0 ml I(131)-jelölt interferont ( $150 \mu\text{g/ml}$ ) NAP<sup>TM</sup>-10 oszloppal kezelünk, a 0.5M nátrium-foszfát puffer oldatnak (pH = 7.5) 0.1M nátrium-foszfát oldatra (pH = 6.8) való cseréje céljából. A kapott oldatot mágneses keverővel ellátott lombikba öntjük és  $100 \mu\text{l}$  (0.6 mg) aszialo-alfa(1)-sav glikoproteint adunk hozzá. Ezt követően keverés közben  $100 \mu\text{l}$  1%-os glutáraldehidet adunk az elegyhez

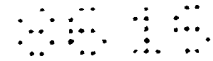


cseppenként, 1 perc alatt és 3 órán át inkubáljuk szobahőmérsékleten, majd 100  $\mu$ l 1M etanol-amint (pH = 7.2) adunk hozzá. Ezután az elegyet szobahőmérsékleten 1 óra hosszat inkubáljuk és a folyadék kromatográfiával (FPLC), Sepharose 12 oszlopon elválasztjuk: 214 nm-nél két frakciót kapunk. Az első I(131)-jelzett interferon izotópszintje 86,1  $\mu$ Ci, az első és második frakció izotópszintje 6  $\mu$ Ci és 6  $\mu$ Ci, megfelelőleg. Az elektroforézis három sávot mutat: a világos és széles sáv 70 kd-nál nagyobb értéknél a polimerizált konjugátumot jelenti, e mellett azonosítható a 67 kd-os konjugátum sáv és a reakció után megmaradt aszialo-glikoprotein sávja 41 kd-nál. Agélt elektroforézis után autoradiográfiának vetjük alá két sáv azonosítása céljából: ez a két sáv a polimerizált konjugátum sötét és széles sávja 70 kd feletti értéknél és a 67 kd-os konjugátum sáv. Az állatkísérletben használt aszialo-glikoprotein konjugátum és I(131)-jelölt interferon megfelel az FPLC-vel elkülönített 67 kd-os frakciónak.

#### 4. példa

A 3. példában ismertettek szerint eljárva, aszialo- $\alpha$ (1)-sav glikoprotein helyett aszialo-fetuint, aszialo-ceruloplazmint, aszialo-haptoglobulint és aszialo-thyroglobulint használva állítunk elő konjugátumokat a fent felsorolt aszialo-plazma proteinek és interferon között.

Az aszialo- $\alpha$ (1)-sav glikoprotein szövetspecifikusságát és a találmány szerinti interferon konjugátum májsejt-specifikusságát az alábbi állatkísérletekkel illusztráltuk.



A. Az összehasonlító vizsgálati minta előállítása

Franker és Speck (Biochem. Biophys. Res. Commun. 80. 849-857) módszere szerint eljárva, interferont, borjúsérum albumint és aszialo-alfa(1)-sav glikoproteint jelöltünk radioaktív jóddal ( $^{131}\text{I}$ ). Az állatkísérletben használt előbbi jelölt készítmények specifikus aktivitása az alábbi volt:

- jódozott interferon specifikus aktivitása:

$$359 \mu\text{Ci}/15 \mu\text{g} = 23.9 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$$

- jódozott borjúsérum albumin specifikus aktivitása:

$$400 \mu\text{Ci}/30 \mu\text{g} = 13.3 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$$

- jódozott aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein specifikus aktivitása:

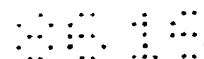
$$1607 \mu\text{Ci}/60 \mu\text{g} = 26.8 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$$

B. Vizsgálati módszer és eredmények

1. vizsgálat: az aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein szövet-specifikussága

1.5-2.0 kg súlyú nyulakat elaltattunk és I(131)-jelölt jódozott borjúsérum albumint vagy jódozott alfa(1)-sav glikoproteint injektáltunk a füli vénájukba. Ezután egy képkalkotó (image computer) computerrel, gamma kamera segítségével meghatároztuk a fontos részek képét úgy, hogy mértük a szervek radioaktivitását. A használt, Ohio Nuclear <sup>TM</sup> 410 gamma kamera egy nagy felbontóképességű kollimátorra volt egybeépítve. Minden öt percben készítettünk fotókat, így 30 perc alatt 6 fotográfiát kaptunk. Az így kapott képeket látjuk az 5. ábrán.

Az 5. ábrán a felső sor azt mutatja, hogy a I(131)-aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein specifikusabban abszorbeálódik a máj-

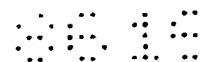


ban, mint a I(131)-borjúszérum albumin. Az 5. ábra alsó részén látható diagramon az x tengely az időt jelöli, a felső vonal a májban detektált radioaktivitást jelenti, az alsó vonal pedig a szívben, azaz a véráramban detektált radioaktivitást jelenti, ezekből a grafikonokból az látható, hogy az aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein specifikusan a májban kötődik.

2. vizsgálat: az interferon és a találmány szerinti konjugált interferon máj-specifikusságára vonatkozó összehasonlító mérés

Az 1. vizsgálatban ismertetett módon eljárva, I(131)-interferont és I(131)-aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein konjugátumot injektáltunk a nyulak füli vénájába. A májban mért radioaktivitás összehasonlítása céljából minden 30 percben fotográfiát készítettünk, 300 000 beütéssel, így 3 óra alatt 6 fotográfiát kaptunk. A fotókat a 6. ábrán láthatjuk. A 6. ábra gamma kamera képén az látható, hogy az interferon az injekció beadása után 30 perccel még főképp a májban található, majd ezután a veséken keresztül kiválasztódik a hólyagba. 3 órával a beinjektálás után az interferon gyakorlatilag nincs jelen a májban, hanem főként a hólyagban található. Az aszialo-alfa(1)-sav glikoprotein-interferon konjugátum viszont az injekció beadása után 30 perccel, 2 órával és még 3 órával is megmarad a májban, jelenléte a hólyagban nem kimutatható.

A 6. ábra alsó grafikonjait összehasonlítva, a máj radioaktivitását a felső vonal mutatja, a vér radioaktivitását mutató középső vonal fokozatosan csökken 30 percen át, majd a hólyag radioaktivitását mutató alsó vonal emelkedik. Az aszialo-alfa(1)-



-sav glikoprotein-konjugátum esetében a máj radioaktivitása folyamatosan megmarad, a hólyag radioaktivitásában semmi emelkedés nem figyelhető meg. A fenti teszt azt bizonyítja, hogy a találmány szerinti interferon-konjugátum megmaradási ideje a májban sokkal hosszabb, mint a természetes interferoné.

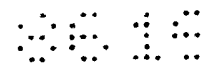
3. vizsgálat: az interferon és a találmány szerinti konjugált interferon megoszlása a szövetekben

Miután az előbbi 2. vizsgálatot befejeztük, a nyulakat leöltük és kiemeltük a májukat, veséjüket, tüdejüket, lépüket és pajzsmirigyüket. A szervekben megoszlott radioaktivitást megmértük azon célból, hogy kiszámítsuk a bennük széteszlott interferon mennyiségét. A kapott eredmények a 7. ábrán láthatók.

A fenti vizsgálatból az látható, hogy a találmány szerinti interferon konjugátum behatolása a májba erőteljesebb, mint a közönséges interferonoké, és a konjugátum szignifikánsan hosszabb ideig marad a májban, miáltal farmakológiai hatása szignifikánsan hosszabb ideig megmarad.

1. készítmény példa

Aszialo-orozomukoid-alfa-interferon-	
-konjugátum	500,000 N.E.*
Nátrium-klorid	8.0 mg
Dinátrium-foszfát	1.74 mg
Kálium-hidrogénfoszfát	0.2 mg
Kálium-klorid	0.2 mg
Fenol	3.3 mg
Albumin (humán)	1.0 mg



A fenti komponenseket injekciós desztillált vízben feloldjuk és a kapott oldatot steril 1 ml-es fiolába tesszük, majd 2-10°C-on tároljuk.

\* Az interferon aktivitására vonatkozó nemzetközi egység (N.E.)

#### 2-4. készítmény példák

Az 1. készítmény példában alkalmazott aszialo-orozomukoid-  
-alfa-interferon-konjugátum helyett 500,000 N.E. aszialo-fetuin-  
-interferon-konjugátumot, 600,000 N.E. aszialo-ceruloplazmin-  
-interferon-konjugátumot vagy 1,000,000 N.E. aszialo-haptoglobu-  
lin-interferon-konjugátumot keverjük össze az 1. példában alkal-  
mazott konzerváló-, puffer- és stabilizálószerrel. A keveréket  
injekciós desztillált vízzel szolubilizáljuk és az oldatot  
steril 1 ml-es ampullákba tesszük, majd az 1. példában ismerte-  
tett módon tároljuk.

#### 5. készítmény példa

Aszialo-orozomukoid-béta-interferon-  
-konjugátum

1,000,000 N.E.

Nátrium-klorid

9,0 mg

Albumin (humán)

5,0 mg

Fenol

3,0 mg

A fenti komponenseket steril injekciós vízben feloldjuk és a kapott oldatot steril 1 ml-es ampullákba helyezük, majd 2-10°C-on tároljuk.



6. készítmény példa

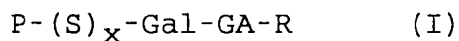
Az 5. példában alkalmazott aszialo-orozomukoid-béta-interferon-konjugátum helyett aszialo-orozomukoid-gamma-interferon-konjugátumot (500,000 N.E.) használunk és összekeverjük az 5. példa szerinti adalékanyagokkal, majd 1 ml-es fiolákba rakjuk.

A készítmények intravénás injekciós beadásra alkalmasak.



## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. (I) általános képletű aszialo-glikoprotein-konjugált gyógyhatású szerek -



- ahol

P jelentése humán szérum glikoprotein peptid maradéka;

S jelentése humán szérum glikoprotein cukor maradéka;

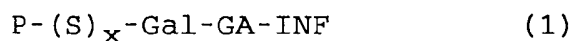
Gal jelentése galaktóz maradék;

GA jelentése glutáraldehid maradék;

x jelentése egész szám, melynek értéke = 1 vagy nagyobb 1-nél;  
és

R jelentése valamilyen gyógyhatású komponens, így interferon, aciklovir-nátrium, ribavirin, vidaravin, zidovudin, suramin, antiszensz oligonukleotid, ribozim, leukovorin-kalcium, nátrium-meglumin-diatrizoát, gadolinium-DTPA, glutation, proszttaglandin,  $^{99m}\text{Tc}$  és  $^{131}\text{I}$ .

2. Az 1. igénypont szerinti aszialo-glikoprotein-konjugált gyógyhatású szerek szűkebb körébe eső (1) általános képletű konjugált gyógyhatású szerek -



- ahol

P jelentése humán szérum glikoprotein peptid maradéka;

S jelentése humán szérum glikoprotein cukor maradéka;

Gal jelentése galaktóz maradék;

GA jelentése glutáraldehid maradék;



x jelentése egész szám, melynek értéke = 1 vagy nagyobb 1-nél;  
és

INF jelentése interferon.

3. A 2. igénypont szerinti konjugált gyógyhatású szerek,  
ahol INF jelentése alfa-interferon.

4. A 2. igénypont szerinti konjugált gyógyhatású szerek,  
ahol INF jelentése béta-interferon.

5. A 2. igénypont szerinti konjugált gyógyhatású szerek,  
ahol INF jelentése gamma-interferon.

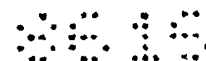
6. A 2. igénypont szerinti konjugált gyógyhatású szerek,  
ahol a  $P-(S)_x$ -Gal- maradék olyan deszialilált humán szérum  
glikoprotein maradék, ahol P jelentése egy humán szérum glikopro-  
tein protein maradéka, S jelentése egy humán szérum glikoprotein  
cukor maradéka és Gal D-galaktóz maradékot jelent.

7. A 6. igénypont konjugált gyógyhatású szer, ahol a deszi-  
alilált humán szérum glikoprotein aszialo-orozomukoid, aszialo-  
-fetuin, aszialo-ceruloplazmin, aszialo-haptoglobulin, aszialo-  
-thyroglobulin vagy aszialo-makroglobulin lehet.

8. A 2. igénypont szerinti konjugált interferon, ahol INF  
jelentése rekombináns interferon.

9. Hepatitisz kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény, azzal  
jellemezve, hogy valamely (1) általános képletű konjugált in-  
terferont tartalmaz vírusos hepatitiszben szenvedő betegek máj-  
sejtjeiben jelen lévő hepatitisz vírus replikációjának gátlásá-  
hoz elegendő mennyiségben, a gyógyszeriparban szokásosan alkalma-  
zott hordozó és/vagy segédanyagok mellett.

10. A 9. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, azzal  
jellemezve, hogy intravénás injekciós beadásra alkalmas.

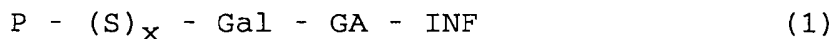


11. Vírusos hepatitisz kezelési módszer, azzal jellemezve, hogy vírusos hepatitiszben szenvedő betegnek valamilyen, a 2. igénypont szerinti (1) általános képletű konjugált interferont adunk be, a beteg májában jelen lévő hepatitisz vírus replikációjának gátlásához elegendő mennyiségben.

12. A 11. igénypont szerinti kezelési módszer, azzal jellemezve, hogy a konjugált interferont intravénás injekció formájában adjuk be.

13. A 12.igénypont szerinti kezelési módszer, azzal jellemezve, hogy a 2. igénypont szerinti (1) általános képletű konjugált interferon vírus replikációt gátlómennyisége 0.2-2.0 millió nemzetközi egység, az interferon/testfelület  $m^2$ -re vonatkoztatva, naponta egyszer vagy kétnaponta egyszer.

14. Eljárás (1) általános képletű konjugált interferon -



- ahol

P jelentése humán szérum glikoprotein peptid maradéka;

S jelentése humán szérum glikoprotein cukor maradéka;

Gal jelentése galaktóz maradék;

GA jelentése glutáraldehid maradék;

x jelentése egész szám, melynek értéke = 1 vagy nagyobb 1-nél;

és

INF jelentése interferon -

előállítására, azzal jellemezve, hogy humán szérum Cohn V frakció felülúszóját kezelve elkülönítjük belőle a protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal-NANa általános képletű alfa(1)-sav glikoproteint; és a kapott alfa(1)-sav glikoproteint neuraminidázzal kezelve eltávolítjuk a szialinsavat; és



a kapott protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal általános képletű aszialoglikoproteint glutáraldehides (GA) keresztkötéses módszerrel interferonnal kapcsoljuk; és  
a protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal-Ga-INF általános képletű konjugált interferont kinyerjük.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a humán szérum Cohn V frakció felülúszóját DEAE-Sephadex vagy CH-Cellulóz kromatográfiával kezeljük.

16. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy alfa(1)-sav glikoproteinként orozomukoidot alkalmazunk.

17. Eljárás (1) általános képletű konjugált interferon -  
$$P - (S)_x - Gal - GA - INF \quad (1)$$

- ahol

P jelentése humán szérum glikoprotein peptid maradéka;

S jelentése humán szérum glikoprotein cukor maradéka;

Gal jelentése galaktóz maradék;

GA jelentése glutáraldehid maradék;

x jelentése egész szám, melynek értéke = 1 vagy nagyobb 1-nél;

és

INF jelentése interferon -

előállítására, azzal jellemezve, hogy humán vérszérumot - amely protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal-NANA maradékot tartalmazó humán szérum glikoprotein, a cukor részhez kapcsolódva D-galaktóz (Gal) csoporttal és a másik maradék N-acetil-neuraminsav (NANA) - kezeljük; és

a kinyert protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal-NaNa általános képletű glikoproteint neuraminidázzal kezeljük; és



a kapott protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal általános képletű aszialoglikoproteint glutáraldehides (GA) keresztkötéses módszerrel, interferonnal kapcsoljuk; és

a P-(S)<sub>x</sub>-Gal-GA-INF (1) általános képletű konjugált interferont kinyerjük.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy humán vérszérumként humán szérum Cohn V frakció felülúszóját alkalmazzuk, amelyet DEAE-Sephadex vagy CM-Cellulóz kromatográfiával kezelünk.

A meghatalmazott

**Somlai Mária**  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.  
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

13 megk  
Gwala

1. táblázat

Humán szérum Cohn V frakció felülűszója

↓  
DEAE-Sephadex vagy  
CM-cellulóz  
kromatográfia

Alfa(1)-sav glikoprotein

(Protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal-NANA)

↓  
Neuraminidázos kezelés,  
trezilált hordozóhoz kapcsolás

Aszialo-glikoprotein

(Protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal)

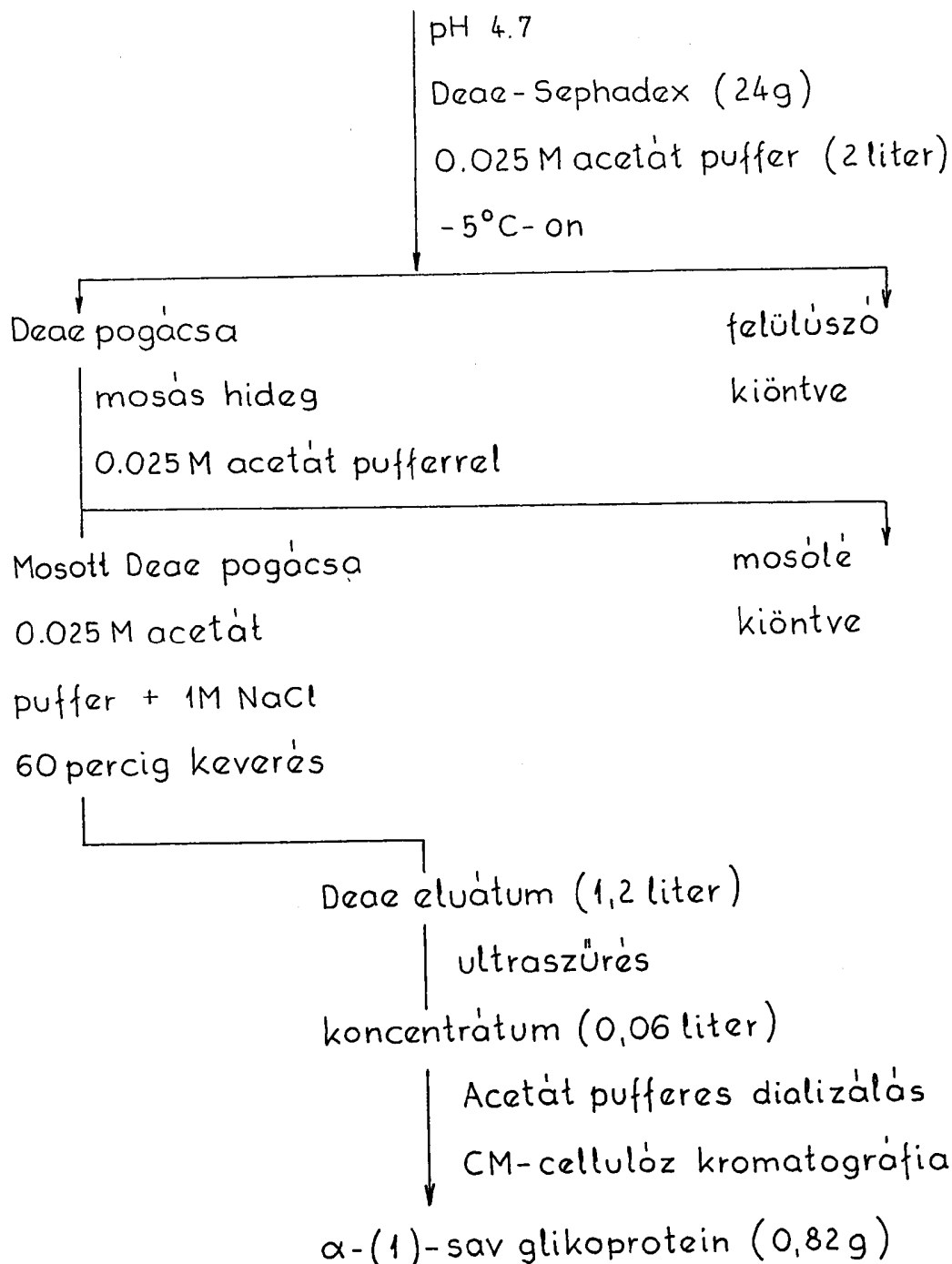
↓  
+ INF  
Glutaraldehydes keresztkötéses  
módszer

Aszialo-glikoprotein - Interferon konjugátum

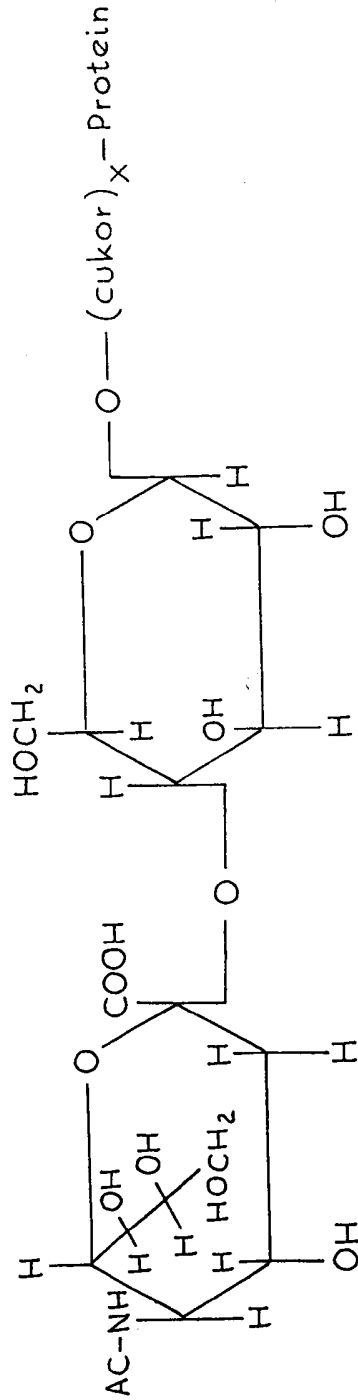
(Protein-(cukor)<sub>x</sub>-Gal-GA-INF)

2. táblázat

Cohn V frakció felülűsző (11 liter)

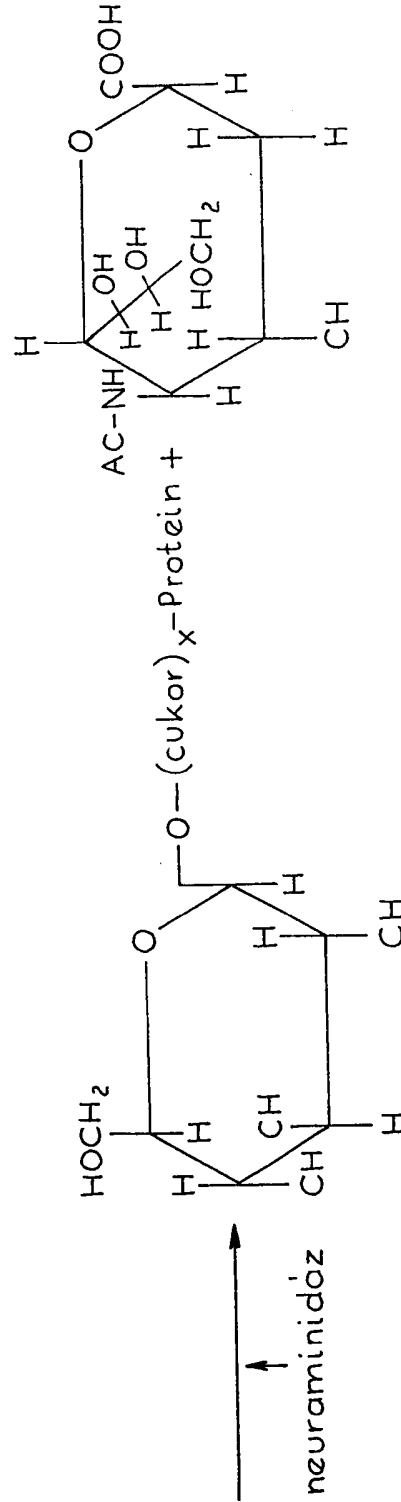


1. reakcióvázat



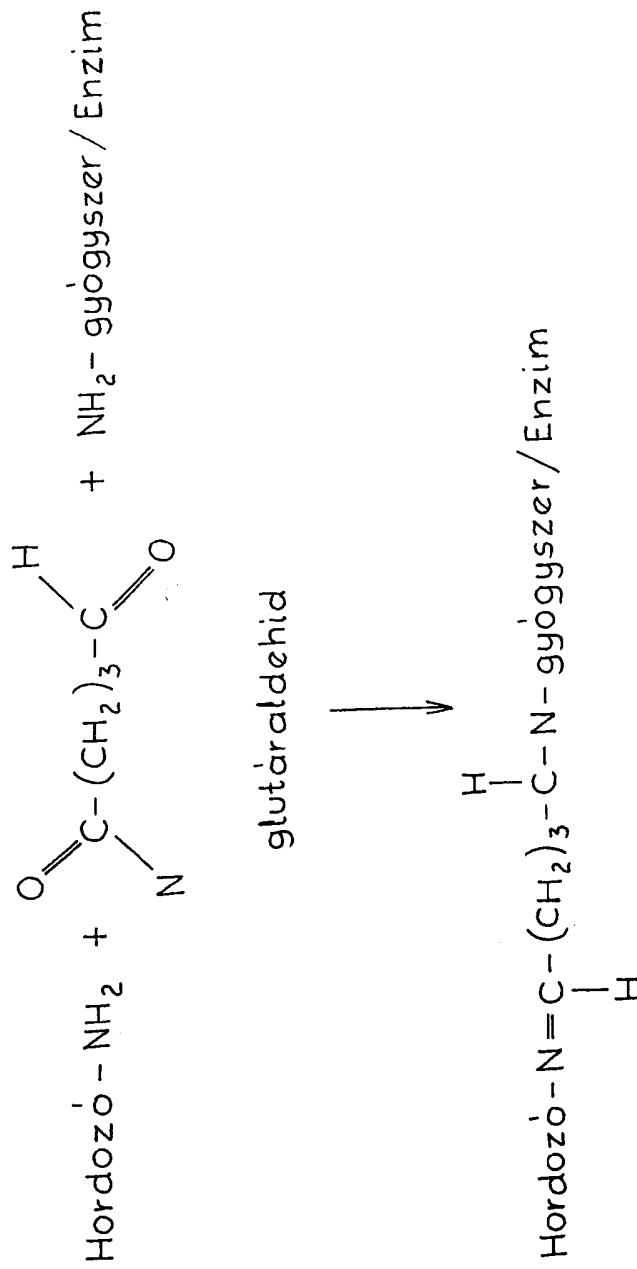
Galaktóz

N-acetil-neuraminsav

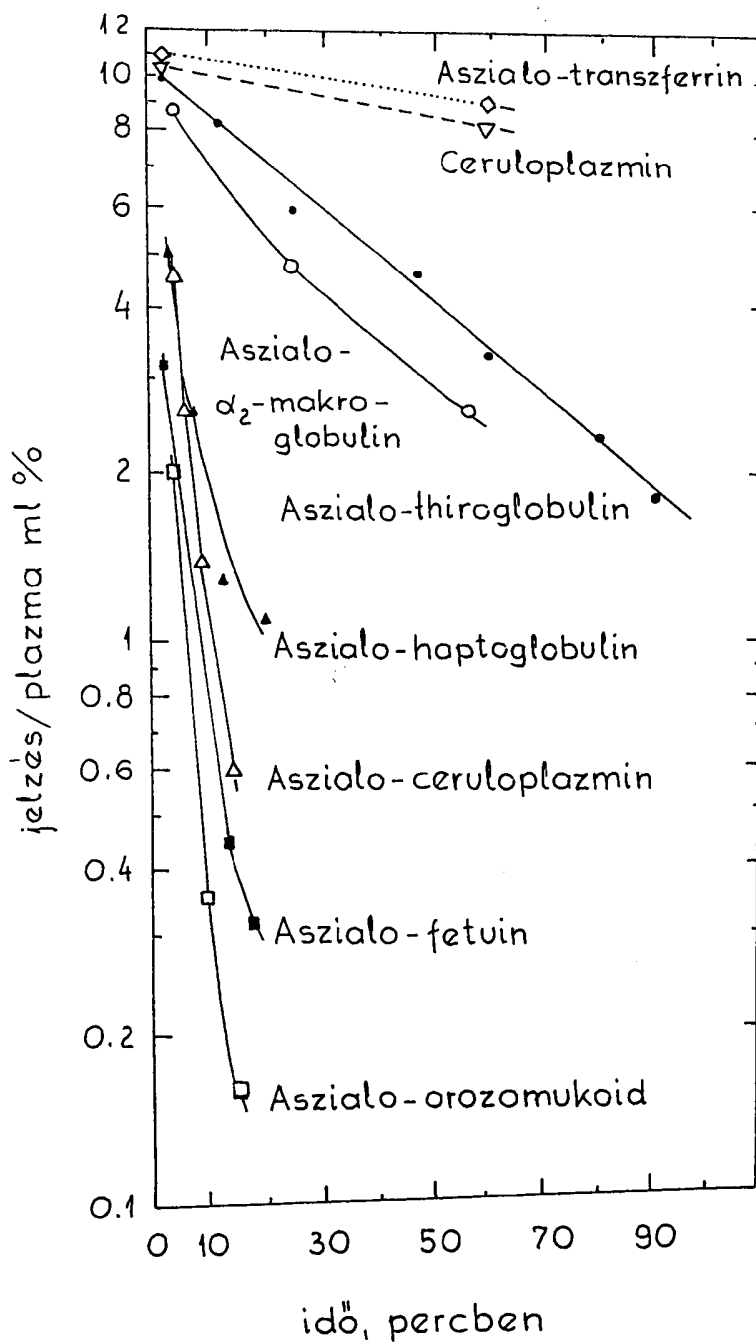


neuraminidóz

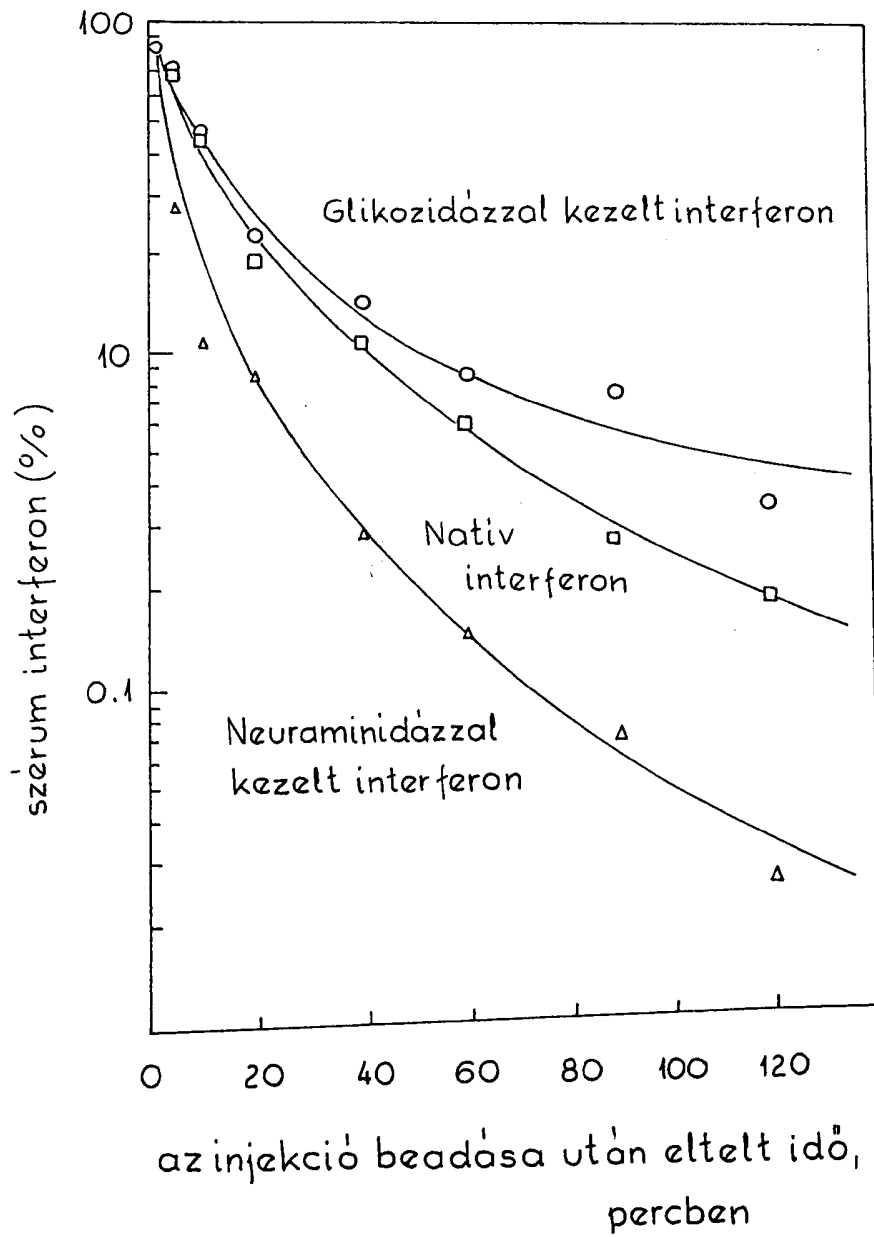
2. reakcióvázlat



1. ábra

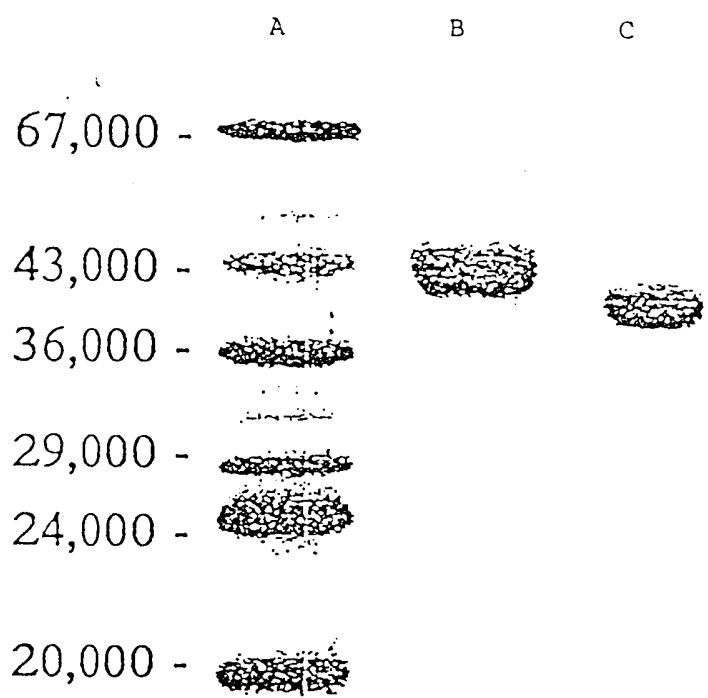


2. ábra



13/7

3. ÁBRA

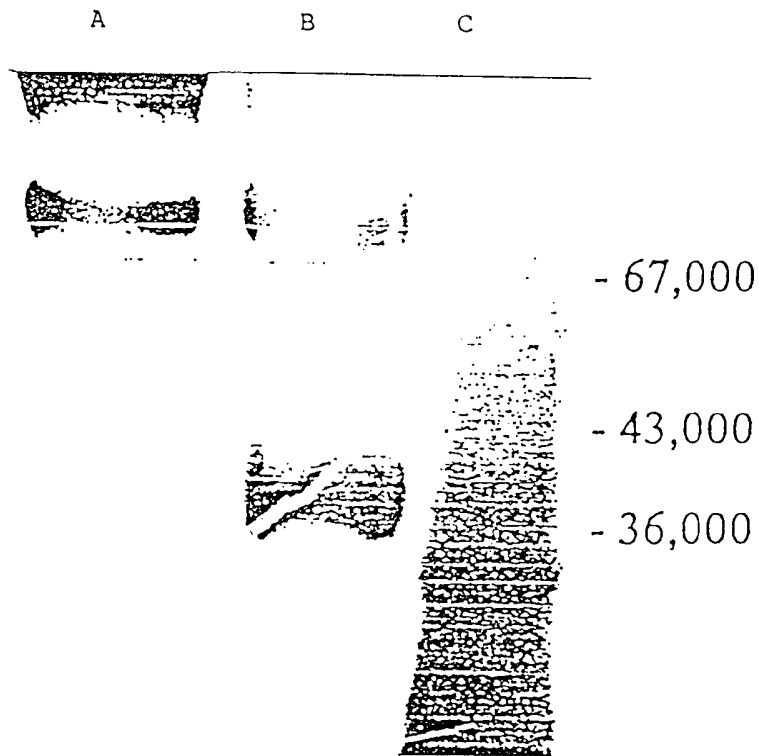


A : protein molekulaszúly marker

B :  $\alpha_1$ -sav glikoprotein

C : aszialo-glikoprotein

4. ÁBRA



A : Az elektroforetikus gél autoradiográfiás képe

B : <sup>131</sup>I-*INF*-ASGP konjugátum

C : Protein molekulaszúly marker

Somlai Mária  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi  
Szabadalmi Társaság tagja  
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.  
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

5. ÁBRA

131<sub>I</sub>-BSA

131<sub>I</sub>-ASGP

5 perc

10 perc

5 perc

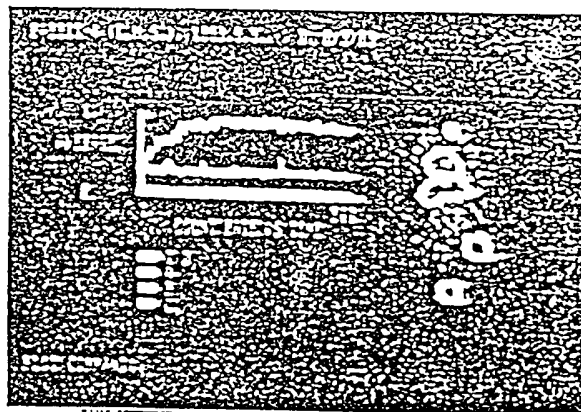
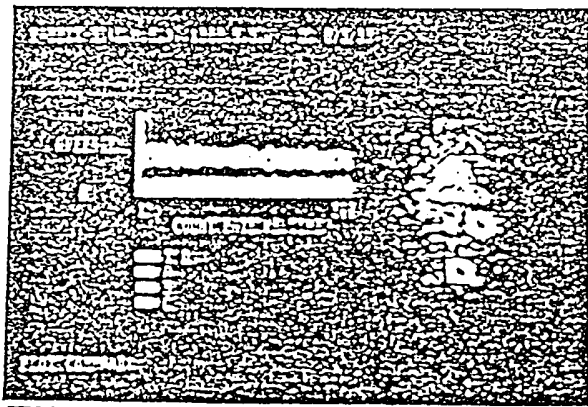
10 perc

20 perc

30 perc

20 perc

30 perc



Somlai Mária  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.  
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

13/10

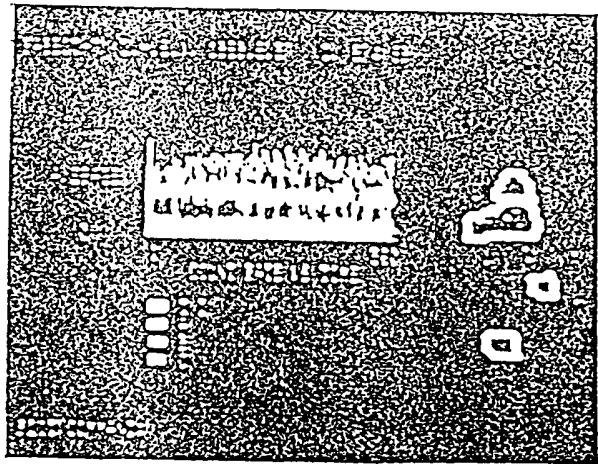
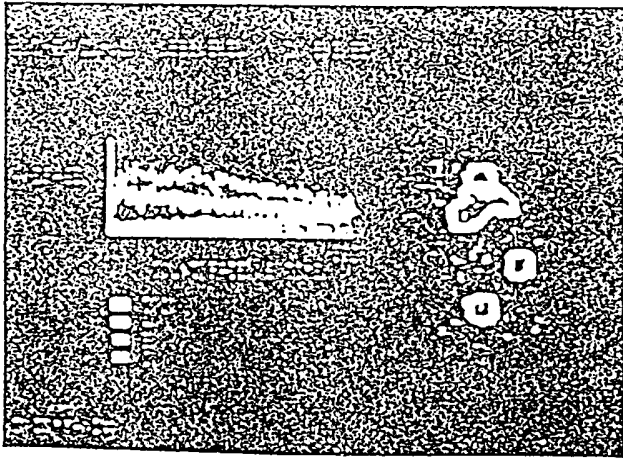
6. ÁBRA

$^{131}\text{I}$ -INF

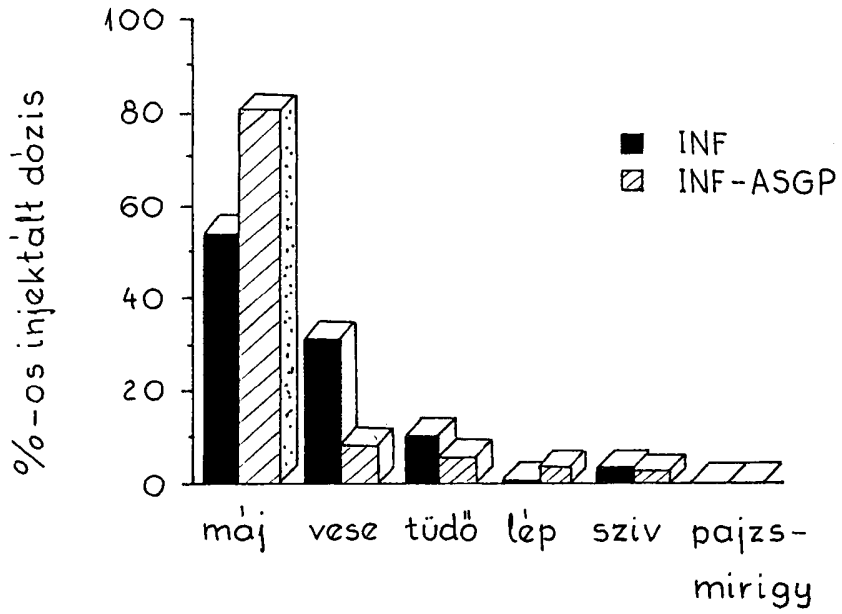
$^{131}\text{I}$ -INF-ASGP

30 perc 2 óra 3 óra

30 perc 2 óra 3 óra

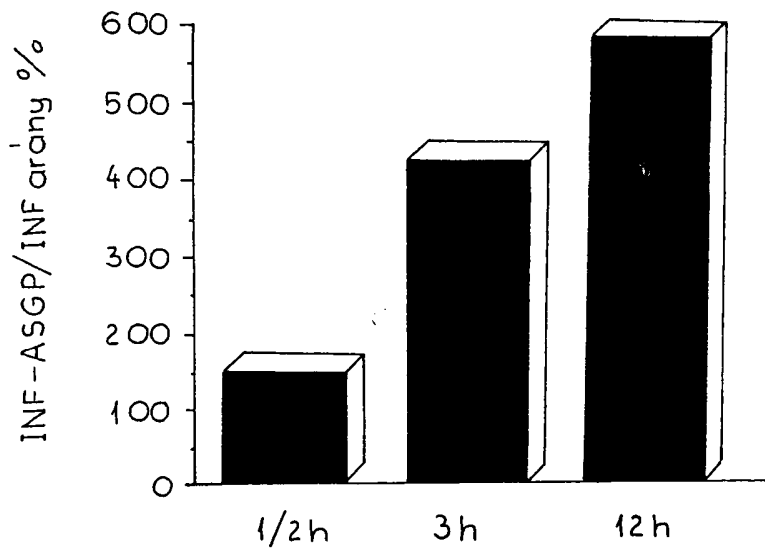


7. ábra



Somlai Mária  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.  
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

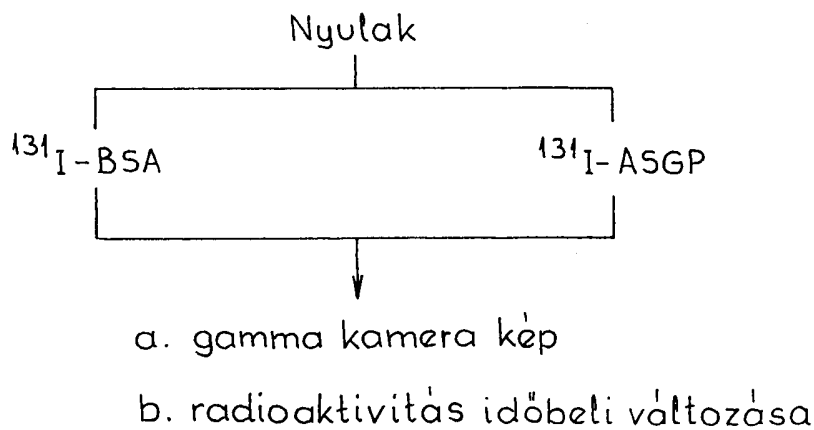
8. ábra



Az injekció beadása után  
eltelt idő, órákban

9. ábra

Aszialo-alfa (1)-sav glikoprotein szövet specifikusságát bizonyító kísérlet



10. ábra

A konjugált interferon máj-szelektivitását bizonyító kísérlet

