(19) Országkód:
HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS TALÁLMÁNYI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:
205 144 B

(21) A bejelentés száma: 2895/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 06. 06.
(30) Elsőbbségi adatok:
138 907/88 1988.06.06. JP
185 772/88 1988.07.25. JP

(51) Int. Cl.[5]
C 07 K 7/10
A 61 K 37/36
A 61 K 47/36

(40) A közzététel napja: 1990. 07. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1992.03.30. SZKV 92/03

(72) Feltalálók:
Kato, Koichi, Hyogo (JP)
Kawahara, Kenji, Osaka (JP)
Kajio, Tomoko, Osaka (JP)

(73) Szabadalmas:
Takeda Chemical Co. Ltd., Osaka (JP)

(54) Eljárás bázikus fibroblaszt növekedési faktort tartalmazó stabilizált kompozíció és e kompozíciót tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására

(57) KIVONAT

Bázikus fibroblaszt növekedési faktort (bFGF), illetve változatát úgy stabilizálják, hogy vizes oldatban glükán-szulfáttal hozzák érintkezésbe. Így a bFGF aktivitása hosszú időn keresztül és szélsőséges körülmények között is fenntartható, és gyógyszerkészítmény formájában melegvérű állatoknak és embernek előnyösen adagolható.

A leírás terjedelme: 17 oldal (ezen belül 3 lap ábra)

HU 205 144 B

A találmány tárgya eljárás bázikus fibroblaszt növekedési faktor (a továbbiakban bFGF) vagy változatát tartalmazó stabilizált kompozíció előállítására.

Az FGF-t először olyan faktorként választották el, amely erős növekedésfokozó hatást gyakorolt fibroblasztokra, mint például BALB/c3T3 sejtekre (Gospodarowicz: Nature, *249*, 123 /1974/). Ma már tudjuk, hogy az FGF szinte minden mezodermális eredetű sejtre növekedésgyorsító hatást gyakorol. Az FGF durván két típusra osztható az izoelektromos pont alapján: bázikus FGF (továbbiakban bFGF) és savas FGF (a továbbiakban aFGF). Erős növekedésfokozó hatásuk és az endoteliális sejtekre gyakorolt plazminogén aktivátor indukáló hatásuk alapján ezek az FGF típusok feltételezhetően alkalmazhatók angiogenezis fokozó szerként, trauma esetén terápiás szerként és preventív és terápiás szerként trombózis és arterioszklerózis esetén.

Az FGF-t szokásos módon állati szervekből, például borjú hipofízisből tisztítják, ennek a szokásos módszernek azonban hátrányai vannak, például a termelésnek mennyiségi határai vannak, és a kapott FGF nemkívánt antigén hatást mutat, mivel heterogén állattól származik. Az FGF nagy mennyiségben történő előállítását nemrégiben fejlesztették ki, amelynek során rekombináns DNS technikát hasznosítanak klónozott humán FGF gén kifejezésére mikroorganizmusokban vagy állati sejtekben (FEBS Letters, *213*, 189–194 /1987/, 237 966 sz. közzétett európai bejelentés).

Az FGF gyorsan elveszti aktivitását vizes oldatban, és emellett biológiai aktivitása könnyen lebomlik a liofilizálás következtében. Emellett, ha az FGF-t hosszú időn keresztül adagolják, például intravénás cseppinfúzió formájában, elkerülhetetlen, hogy az aktivitás csökken az adagolási idő alatt, ami nagy problémát jelent.

Közlemények szerint az FGF inaktiválódása megakadályozható bizonyos glükózaminoglükánok, például heparin adagolásával (Journal of Cellular Physiology, *128*, 475 /1986/), a heparint azonban nehéz injekcióban alkalmazni, mivel erős antikoaguláns aktivitással rendelkezik.

Abból a célból, hogy az FGF stabilitását javítsák oldatban, illetve a liofilizálás körülményei között, különböző anyagok adagolását próbálták ki az injekciókhoz. Mindeddig azonban sikeres módszert a stabilizálásra nem találtak.

Kísérleteink során úgy találtuk, hogy az FGF, illetve változatainak stabilitása meglepő módon jelentősen fokozható úgy, hogy az FGF-t, illetve változatait glükán-szulfáttal, mint például dextrán-szulfáttal hozzuk érintkezésbe vizes oldatban.

A találmány tárgya tehát eljárás stabilizált FGF-kompozíció előállítására, amelynek során FGF-t vagy változatát glükán-szulfáttal hozzuk érintkezésbe vizes közegben.

A találmány szerinti eljárásban bázikus FGF-t (a továbbiakban bFGF) alkalmazunk.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható FGF lehet például emlős eredetű, például emberi, majom, sertés, szarvasmarha, birka vagy ló eredetű FGF.

Az FGF származhat különböző olyan szervek extraktumából, amelyekről bebizonyosodott, hogy FGF-t tartalmaz, így például agy vagy hipofízis, vagy alkalmazható rekombináns DNS-technológiával előállított FGF.

Ilyen rekombináns DNS-technológiával előállított FGF-t ismertetett például a WO/87/02728 közzétételi számú nemzetközi bejelentés; az FEBS Letters, *213*, 189–194 /1987/; a 237 966 számon közzétett európai bejelentés.

A jelen leírásban a rekombináns humán bázikus FGF-t helyenként rhbFGF rövidítéssel jelöljük.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott FGF-változat olyan aminosavszekvenciát tartalmaz, amely az eredeti peptid vagy protein szekvenciájának variációja, az ilyen variációkba beletartoznak az aminosav hozzáadása, alkotó aminosav törlése, kihagyása, vagy lehasítása és alkotó aminosav más aminosavval történő helyettesítése.

Az ilyen aminosav hozzáadásába beletartozik legalább egy aminosav hozzáadása.

Ilyen alkotó aminosav kihagyásába vagy lehasításába beletartozik legalább egy, bFGF-t alkotó aminosav hiánya.

Az ilyen, alkotó aminosav más aminosavval történő helyettesítésébe beletartozik legalább egy, bFGF-t alkotó aminosav más aminosavval történő helyettesítése.

Az egy aminosav hozzáadása a változathoz, amely a bFGF-t egy aminosavval meghosszabított formáját tartalmazza, nem vonatkozik a metioninra, amely a peptid expressziójához tartozó iniciáló kodonból és a szignálpeptidből származik.

A hozzáadott aminosavak száma legalább egy, de bármennyi lehet, míg az bFGF jellemzője nem vész el. Az aminosavak előnyösen a bFGF aktivitásához hasonló aktivitással rendelkező, a bFGF-fel homológ proteinek aminosavszekvenciáinak részét vagy egészét képezik.

A bFGF-t alkotó aminosavak közül hiányzó aminosavak száma bármennyi lehet, amíg a bFGF jellemzői megmaradnak.

Ilyen hiányzó alkotó aminosavak lehetnek például:

– aminosavak hiánya az amino- vagy karboxil-terminálisról;

– a humán bFGF aminoterminális következő 10 maradékának hiánya:

Met-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser;

– a következő 14 maradék a humán bFGF aminoterminálisán:

Met-Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro;

– a következő 41 maradék a humán bFGF terminálisán:

1 2 3 4 41

Met-Pro-Ala-Leu- ... -Val

– vagy 61 maradék hiánya a humán bFGF karboxil-terminálisán:

87 88 146 147

Lys-Cys- -Lys-Ser.

Továbbá olyan változatként, ahol alkotó aminosavak hiányoznak megemlíthető olyan bFGF változata, ahol a karboxil-terminálisról hiányzik a 7–46. aminosav maradék.

A hiányzó aminosavszekvenciák lehetnek például az rhgFGF 102., 106., 115., 119., 124., 130. és 138 aminosavval kezdődő aminosav szekvenciái.

Ezek az aminosavszekvenciák más aminosavval helyettesíthetők.

A bFGF-t alkotó aminosavak közül a változatban helyettesíthető annyi, amennyivel a bFGF jellemzői még nem vesznek el.

A helyettesítés előtti alkotó aminosavak lehetnek például cisztein vagy ciszteintől eltérő aminosavak. Előnyös a cisztein. Ciszteintől eltérő aminosavak lehetnek például az aszparaginsav, argininsav, glicin, szerin, valin, stb.

Amennyiben ciszteint cserélünk ki, akkor előnyösek például a semleges aminosavak. Ilyen semleges aminosavak például a glicin, valin, alanin, leucin, izoleucin, tirozin, fenil-alanin, hisztidin, triptofán, szerin, treonin és metionin. Különösen a szerin és a treonin előnyös.

Amennyiben ciszteintől eltérő aminosavat helyettesítünk, akkor olyan aminosavat választunk, amely a helyettesítés előtti aminosavtól hidrofilitásban, hidrofóbitásban vagy elektromos töltésben eltérő.

Amennyiben a helyettesítés előtti alkotó aminosav az aszparaginsav, akkor a helyettesítő aminosav lehet például aszparagin, treonin, valin, fenil-alanin vagy arginin; aszparagin és arginin előnyös.

Amennyiben a helyettesítés előtti alkotó aminosav az arginin, akkor helyettesítő aminosavként alkalmazhatunk például glutamint, treonint, leucint, fenil-alanint vagy aszparaginsavat; előnyös a glutamin.

Amennyiben a helyettesítés előtti alkotó aminosav a glicin, akkor a helyettesítő aminosav lehet például a metionin, alanin, leucin, cisztein, glutamin, arginin vagy aszparaginsav; előnyös a metionin.

Amennyiben a helyettesítés előtti alkotó aminosav a valin, akkor helyettesítő aminosavként alkalmazható például a szerin, leucin, prolin, glicin, lizin vagy aszparaginsav; előnyös a szerint.

Helyettesítendő aminosavként előnyös az aszparagin, glutamin, arginin, treonin, metionin, szerin és a leucin.

Helyettesítő aminosavként előnyös az aszparagin, glutamin, arginin, treonin, metionin, szerin és a leucin.

Mutein esetén legelőnyösebb a ciszteint szerinnel helyettesíteni.

Ilyen helyettesítés esetén legalább két helyettesítés következhet be, előnyös a két vagy három helyettesítés.

A találmány szerinti eljárással előállított változat két vagy három fent említett hozzáadást, hiányt vagy helyettesítést tartalmazhat.

Változatként előnyösek azok, amelyekben a humán bázikus FGF alkotó aminosavai közül legalább egyet más aminosavval cserélünk ki.

A szokásos DNS rekombináns technika mellett helyre irányuló mutagenezist alkalmazunk a találmány szerinti változat előállítására. Ez a technika jól ismert például a Genetic Engineering, Lather, R. F. és Lecoq, J. P., Academic Press, 31–50, /1983/ irodalmi helyről. Oligonukleotidra irányuló mutagenezist ismertet például Genetic Engineering: Principles and Methods, Smith, M. és Gillam, S., Plenum Press, *3*, 1–32 /1981/.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott változatot kódoló struktúrgén kialakítását például a következőképpen végezzük:

a) Egy mutagén oligonukleotid primerrel hibridizálunk egy, az FGF struktúrgénjének egy szálát tartalmazó egyszálú DNS-t (az említett primer az olyan szál területének komplementere, amely a helyettesítendő cisztein kodonját tartalmazza, vagy egy olyan terület komplementere, amely a kodonnal párt alkotó értelmetlen triplettnek felel meg, kivéve ezzel a kodonnal vagy a másik aminosav kodonjával alkotott téves kapcsolódást, valamint ezzel a kodonna és az értelmetlen triplett kodonjával képzett téves kapcsolódást),

b) a primer DNS polimeráz alkalmazásával meghosszabbítjuk, így egy mutációs heteroduplexet képezünk, és

c) ezt a mutációs heteroduplexet replikáljuk.

Ezután a mutációs gént hordozó fág DNS-t izoláljuk, és egy plazmidba visszük be.

A plazmid segítségével egy gazdasejtet transzformálunk. A kapott transzformánst olyan tenyészközegen tenyésztjük, amely lehetővé teszi a változat előállítását.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott FGF változatokat például a következő helyeken ismertetik: Biochemical and Biophysical Research Communications, 151, 701–708 (1988), 281 822 és 288 687 számú közzétett európai szabadalmi bejelentésnek, 89101162.9 számú európai szabadalmi bejelentés.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható glükán-szulfát a dextrán-szulát, ciklodextrin-szulfát, β-1,3-glükán-szulfát. Az említett glükán-szulfátok a D-glükóz polimer kénsavészterei. Az említett glükán-szulfát kéntartalma előnyösen legalább 3 tömeg%, előnyösebben 12–20 tömeg%, még előnyösebben 16–20 tömeg%. Különösen a dextrán-szulfát előnyös.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható dextrán-szulfát például a szacharózból Leuconostoc mesenteroides mikroorganizmus segítségével előállított dextrán szulfátja. Az alkalmazott dextrán-szulfát olyan dextrán szulfátja, amely 1–6 kötéseket tartalmaz, és kéntartalma legalább 12 tömeg%, előnyösen 16–20 tömeg%. A molekulatömeg 1000–40000000, előnyösen 3000–1000000, a dextrán-szulfát ismert eljárással előállítható.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható ciklodextrin-szulfát olyan ciklodextrin szulfátja, amelyet Bacillus macerans segítségével keményítőből állítunk elő. A ciklodextrin, amely 1–4 helyen kapcsolódó D-

glükóz molekulából álló gyűrűszerkezettel rendelkezik, a gyűrűt alkotó D-glükóz molekulák száma alapján különböző típusokra osztható: α-típus (6 molekula), β-típus (7 molekula), γ-típus (8 molekula), stb. A találmány szerinti eljárásban ezek közül bármelyik alkalmazható.

A ciklodextrin-szulfát az említett ciklodextrinek szulfatálásával kapott észter, ezt a szulfatálást ismert módszerrel lehet végezni. Szulfatálási módszereket ismertetnek például a 2 923 704 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás és a 36422/1975 számon közzétett japán szabadalmi bejelentés.

A ciklodextrin-szulfát kéntartalma normál esetben több, mint 3 tömeg%, előnyösen 12–24 tömeg%. A ciklodextrin-szulfát nagyon jól oldódik vízben.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható ciklodextrin-szulfát szulfatálási foka kéntartalom alapján számítva legalább 12 tömeg%, különösen előnyös, ha a ciklodextrin-szulfát 16–21 tömeg% ként tartalmaz. Alkalmazható olyan ciklodextrin-szulfátok elegye, amelyek különböző mértékben vannak szulfatálva, alkalmazható azonban olyan tisztított ciklodextrin-szulfát is, amely egy bizonyos szulfatálási fokkal rendelkezik. A tisztítást végezhetjük például úgy, hogy a ciklodextrin-szulfát alkálifémsóját tartalmazó reakcióelegyet szárazra pároljuk, a kapott koncentrátumot vízben oldjuk, és a vizes oldatot hidrofil oldószerrel elkeverjük, így elválasztjuk a kívánt terméket.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható β-1,3-glükán-szulfát például olyan egyenes szénláncú β-1,3-glükán-szulfátja, amelyet Alcaligenes vagy Agrobacterium nemzetségbe tartozó mikroorganizmus segítségével állítunk elő. Az alkalmazott β-1,3-glükán lehet olyan kis molekulatömegű polimer, amely egyenes szénláncú β-1,3-glükán szerkezettel rendelkezik, amelyet az egyenesláncú β-1,3-glükán hidrolízisével állítunk elő.

Vízben oldhatatlan, hőre gélesedő, nem elágazó glükán, amely egyenes láncú β-1,3-glükán kötéseket tartalmaz, amelyet az Alcaligenes vagy Agrobacterium nemzetségbe tartozó mikroorganizmus segítségével állítanak elő, a Curdlan (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. gyártmánya; 7000/1968, 32673/1973 és 32674/1973 számú közzétett japán szabadalmi bejelentések). A Curdlan-termelő Alcaligenes faecalis var. mixogenes NTK-u, Agrobacterium radiobacter és Agrobacterium radiobacter U–19 törzseket az American Type Culture Collection 1982-es katalógusa ATCC–21680, ATCC–6466 és ATCC–21679 számon említi.

A Curdlan részleges hidrolizátumának (kis molekulatömegű származékok) tulajdonságait és azok előállítását a 83798/1980 számon közzétett japán szabadalmi bejelentés ismerteti.

Az említett egyenes láncú β-1,3-glükán-származékot szemlélteti például az (I) általános képlet, ahol n értéke 4–1000.

Az említett β-1,3-glükán átlagos polimerizációs foka (DP) 1000 alatt bármennyi lehet. Különösen előnyös az olyan részleges hidrolizátum, ahol DP= 6–300, még előnyösebb az olyan részleges hidrolizátum, ahol DP= 15–200.

Az (I) képletben jelölt n és a DP közötti összefüggés: DP–2= n.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott egyenes láncú β-1,3-glükán-szulfátot úgy állítjuk elő, hogy a β-1,3-glükán vagy rövidebb polimerje intermedier monoszacharid egységének 3-hidroxil-csoportját, és a végső monoszacharid egységek hidroxilcsoportjait szulfonáljuk, rendszerint olyan észtert használunk, amelynek átlagos szubsztitúciós foka (DS) 0,5–3/monoszacharid egység, előnyösen olyan észter, amelynek DS értéke 1–2.

Egyenes láncú β-1,3-glükán vagy ennek kis molekulatömegű polimerje szulfatálását úgy végezzük, hogy a β-1,3-glükánt egy szulfatálószerrel, mint például klór-szulfonsavval vagy kénsav-anhidrid és egy szerves bázis, mint például piridin, dimetil-formamid, trimetil-amid vagy dimetil-anilin komplexével reagáltatjuk (Journal of Biological Chemistry, *239*, 2986 /1964/).

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott β-1,3-glükán-szulfát nagyon jól oldódik vízben, alacsony a toxicitása.

A β-1,3-glükán-szulfát kéntartalma rendesen 5 tömeg% fölötti, előnyösen 10 és 24 tömeg% közötti és nagyon jól oldódik vízben.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott glükán-szulfát igen alacsony toxicitást mutat melegvérű állatok esetén, így FGF vagy változata kompozíciójában előnyösen alkalmazható, és melegvérű állatoknak biztonságosan adagolható orálisan vagy parenterálisan.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott glükán-szulfát lehet szabad formában vagy sója formájában. Sóként alkalmazhatunk például nátrium-, kálium-, ammónium-, trimetil-ammónium-sókat, stb.

Amikor glükán-szulfátot hozunk érintkezésbe FGF-fel vagy annak muteinjével vizes közegben, akkor ezt úgy végezhetjük, hogy először a glükán-szulfátot szabad formában adagoljuk, majd szükséges mennyiségű bázist vagy savat adagolunk a pH kívánt értékre állításához. Bázis adagolásával a dextrán-szulfát vizes közegben só formába alakul, vagy a szabad dextrán-szulfát és glükán-szulfát a só mellett keverék formájában fordul elő.

A találmány szerinti eljárásban, amikor FGF-t vagy annak változatát vizes közegben glükán-szulfáttal hozzuk érintkezésbe, ezt előnyösen két- vagy háromértékű karbonsav jelenlétében végezzük az FGF vagy változata stabilizálása érdekében. Kétértékű savként alkalmazhatunk borkősavat, maleinsavat, almasavat, fumársavat stb.

Háromértékű savként alkalmazhatunk citromsavat, izocitromsavat stb.

Az említett savakat alkalmazhatjuk szabad formában vagy só formájában. Eljárhatunk úgy is, hogy a karbonsavat szabad formában adagoljuk a vizes közeghez, amelyhez azután kívánt mennyiségű bázist adagolunk a pH kívánt értékre állításához. A bázis adagolásával a dextrán-szulfát a vizes közegben só

formájában alakul, vagy a szabad dextrán-szulfát és a dextrán-szulfát sója egymás mellett fordul elő.

Amikor az FGF-t vagy változatát vizes közegben glükán-szulfáttal hozzuk érintkezésbe, a glükán-szulfát mennyisége körülbelül 0,1–100 mól, előnyösen 0,5–4 mól, 1 mól FGF-re vagy változatára számítva.

A dextrán-szulfát koncentrációja a vizes közegben előnyösen 0,0005–5 tömeg/térf.%, előnyösen 0,01–1 tömeg/térf.%.

Az FGF koncentrációja a vizes közegben előnyösen 0,0005–5 tömeg/térf.%, még előnyösebben 0,01–1 tömeg/térf.%.

A karbonsav koncentrációja a vizes közegben előnyösen 1 mmól/liter–1 mól/liter, előnyösebben 10–500 mmól/liter.

Az FGF-t vagy változatát glükán-szulfáttal, továbbá karbonsavval egyszerű összekeveréssel hozzuk érintkezésbe vizes közegben.

Vizes közegként bármilyen, injekciós célra alkalmas vizes közeg használható, különösen injekciós desztillált víz, fiziológiás sóoldat és fiziológiás glükózoldat alkalmazható. A vizes közegben pufferek, mint például foszfát-puffer és tris-hidroxi-metil-aminometán-hidroklorid-puffer szintén alkalmazható.

Amikor az FGF-t vagy változatát, glükán-szulfátot és karbonsavat keverjük, ezek lehetnek vizes oldatban, illetve a szilárd anyagok elegye oldható a vízben. Ezen anyagok keverését 0–40 °C-on, előnyösen 3–10 pH-értéknél, még előnyösebben 5–9 pH-értéknél végezzük. A keveréshez szükséges idő általában 1–30 perc.

Az említett eljárással az FGF vagy változata stabilizált kompozíciója állítható elő.

Az FGF vagy változata stabilizált kompozíciójában előfordul, hogy az FGF vagy változata és a glükán-szulfát bizonyos arányban összekapcsolódva komplexet formál, az FGF vagy változata komplexe kívánt esetben izolálható. Az izolálást végezhetjük Sephadex vagy TSK-gélen végzett szűréssel, DEAE- vagy CM-Toyopearl tölteten végzett ioncserélő kromatográfiával vagy izoelektromos frakcionálással. Az FGF vagy változata komplexe tehát izolálható és kívánt esetben összegyűjthető vagy izolálás nélkül kompozíció formájában alkalmazható.

A kapott komplexben az FGF vagy változata és a glukán-szulfát aránya 1:0,5–1:5. Megjegyzendő, hogy a komplex só nagy koncentrációja, például 1 mól/liter nátrium-klorid jelenlétében disszociál. Az izolálási eljárás során nagy ionerősségű oldószer nem lehet jelen.

A találmány szerinti eljárással tehát FGF vagy változata stabilizált kompozícióját állítjuk elő. Amint a példákban az alábbiakban bemutatjuk, a kompozíció hővel, pH-val és proteázokkal szemben stabil.

A találmány szerinti eljárással előállított kompozíció különösen stabil savas és bázikus, valamint semleges körülmények között.

Az FGF vagy változata kompozíciója biztonságosan adagolható vagy orálisan vagy parenterálisan melegvérű állatoknak (például embernek, egérnek vagy patkánynak, hörcsögnek, nyulaknak, kutyáknak, macskának), közvetlenül vagy gyógyszerkészítmény formájában (például injekció, tabletta, kapszula, oldat, kenőcs formájában), farmakológiailag elfogadható hordozó- vagy hígítószerrel együtt.

Az említett gyógyszerkészítmény előnyös formája injekció, injekciós oldat, fagyasztott készítmény vagy liofilizált készítmény.

Az említett gyógyszerkészítmény elkészítéséhez a gyógyszerkészítésben szokásos farmakológiailag elfogadható adalékanyagok, hígítószerek, hordozók alkalmazhatók kívánság szerint.

Ha a gyógyszerkészítményt például injektálható vizes oldattá alakítjuk, a kívánt oldatot úgy állítjuk elő, hogy standard módszerrel egy oldószert, például vizes oldószert (például desztillált vizet), vízoldható oldószert (például fiziológiás sóoldatot, Ringer-féle oldatot) vagy olajos oldószert (például szezámolajat, olívaolajat) vagy kívánt esetben adalékanyagokat, például oldódást elősegítő adalékanyagokat (például nátrium-szalicilátot, nátrium-acetátot), puffert (például nátrium-citrátot, glicerint), izotóniát biztosító szert (például glükózt, invert cukrot), stabilizálószert (például humán szérumalbumint, polietilén-glikolt), konzerválószert (például benzil-alkoholt, fenolt), vagy analgetikumot (például benzalkónium-kloridot, prokain-hidrokloridot) alkalmazunk.

Az említett gyógyszerkészítmény például injekciókészítménnyé történő alakításakor szokásos módon alkalmazhatunk hígítószert (például desztillált vizet, fiziológiás sóoldatot, glükózt), töltőanyagot (például karboxi-metil-cellulózt [CMC], nátrium-arginátot), konzerválószert (például benzil-alkoholt, benzalkónium-kloridot, fenolt) vagy analgetikumot (például glükózt, kalcium-glükonátot, prokain-hidrokloridot).

A gyógyszerkészítménnyé alakításkor adagolhatunk monoszacharidokat (például glükózt), aminosavakat, különböző sókat és humán szérumalbumint, adagolhatunk továbbá izotóniát biztosító szert, pH-szabályozót, analgetikumot, antiszeptikumot, stb. az FGF vagy muteinje stabil és hatásos készítménye előállítására.

Az említett módszerekkel előállított FGF-t vagy változatát tartalmazó kompozíció fibroblaszt növekedést elősegítő hatással és más hatásokkal rendelkezik, igen stabil és alacsony a toxicitása, ezért gyógyulást elősegítő szerként alkalmazható égési sebek, sebek, posztoperatív szövetek esetén, továbbá angiogén aktivitása alapján, trombózis és arterioszklerózis terápiás szerként.

A kompozíció alkalmazható továbbá sejtnövekedésfokozó reagensként.

A találmány szerinti FGF-t vagy változatát tartalmazó kompozíció az előbbiekben említett bármelyik gyógyszerkészítmény formájában melegvérű állatoknak 1–100 μg/kg napi adagban adagolható, az FGF-re vagy változatára számítva, figyelembevéve az adagolás módját, tüneteket, stb.

A találmány szerinti eljárással előállított, FGF-t vagy változatát tartalmazó kompozíció sejtnövekedést fokozó szerként a közeghez előnyösen olyan mennyiségben adagolható, hogy a közeg literenként

0,01–10 μg, előnyösebben 0,1–10 μg FGF-t vagy muteinjét tartalmazzon.

Mivel az FGF vagy változata stabilizálható úgy, hogy vizes közegben glükán-szulfáttal hozzuk érintkezésbe és így FGF vagy változata stabilizált kompozíciója kapható, lehetséges, hogy az FGF-t vagy változatát gyógyszerkompozícióvá alakítsuk, miközben hatását stabilan fenntartjuk.

Emellett a glükán-szulfát koagulálás elleni hatása nem jelent problémát a találmány szerinti eljárással előállított kompozíció adagolásakor, mivel ez a hatás gyengébb, mint a hepariné.

FGF vagy változata glükán-szulfáttal vizes közegben történő érintkezésbe hozásával FGF vagy változata stabilizált kompozícióját állíthatjuk elő. Így az FGF vagy változata stabilizált kompozíciója gyógyszerkészítménnyé alakítható, mialatt az FGF vagy muteinje hatása fennmarad.

Az 1. ábra azt a bázisszekvenciát, amely a humán bFGF-t kódolja, továbbá az ebből levezethető aminosavszekvenciát mutatja.

A 23. ábra a 12. példa szerint előállított CS23 jelű rhbFGF változatot és kis molekulatömegű heparint tartalmazó kompozíció gélszűrési mintáját mutatja. A rekombináns humán bázikus FGF-t (továbbiakban rhbFGF), amelyet a későbbiekben a példákban bemutatunk, a 237 966 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés szerint állítottunk elő. Az említett rhbFGF-t a 237 966 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés 1., 3. és 6. vagy 8. példája szerint állítottuk elő Escherichia coli K12 MM294/pTB669 (IFO 14532, FERM BP–1281) transzformáns segítségével.

A rekombináns humán bázikus FGF CS23 jelű változata (a továbbiakban CS23 jelű rhbFGF változat), amelyeket a további példákban alkalmaztunk, a 281 822 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés 7. és 24. példája, a 288 687 számon közzétett európai szabadalmi bejelentés 10. referenciapéldája szerint (ez utóbbi megfelel az 50 249/1988 számon közzétett japán szabadalmi bejelentésnek), illetőleg a Biochemical and Biophysical Research Communications, *151*, 701–708 /1988/ helyen ismertetett módon állítottunk elő. Ennek megfelelően az alábbiakban ismertetett 1–3. referenciapéldákban leírt módon a CS23 jelű rhbFGF változatot az Escherichia coli MM294/pTB669 transzformáns (amely a pTB669 plazmidot tartalmazza, amelyet az 1. referenciapéldában alkalmaztunk) és az E. coli MM294/pTB762 (lásd 3. referenciapélda) transzformánsokat az Institute for Fermentation, Osaka (IFO), Japán és Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (FRI), Japán intézetnél helyeztük letétbe. A deponálási számot és dátumokat az 1. táblázat tartalmazza. Az FRI-nél letétbe helyezett törzsek először FERM P számot kaptak. Ezeket a letéteket azután a Budapesti Szerződés szerinti letétté alakítottuk, és ezeket a transzformánsokat az intézet (FRI) a FERM BP szám alatt tárolja.

1. táblázat

Transzformáns	IFO	FRI
E.coli K12	IFO 14532	FERM P-8918 FERM BP–1281
MM294/pTB669	(1986.augusztus 11.)	(1986.augusztus 21.)
E.coli	IFO 14613	FERM P–9409 FERM BP–1645
MM294/pTB762	(1987.május 27.)	(1987. június 11.)

A humán bFGF aminosav szekvenciájában az aminosavakat a humán bFGF 1. ábrán bemutatott aminosavszekvenciájának N-terminális Met aminosavmaradékától kezdve számoztuk, amelyet az első aminosavként jelöltünk.

A találmány szerinti eljárást a következő példákkal szemléltetjük közelebbről a korlátozás szándéka nélkül.

1. Referenciapélda

Változatot kódoló bázisszekvenciát tartalmazó rekombináns DNS előállítása

(1) Humán bFGF gén M13 vektorjának klónozása

A 237 966 számú közzétett európai szabadalmi bejelentés 3. példája szerint kapott pTB669 plazmidot EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztettük. Az M13mp8 fág vektor (J. Messing, Methods, in Enzymology, 101, 20–78 /1983/) replikatív formájú (RF) DNS-ét EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztettük, és összekevertük az emésztett pTB669-ből származó humán bFGF DNS fragmenssel. Az elegyet T4 DNS-ligázzal ligáltuk, a ligált DNS-t Escherichia coli JM105 törzs fertőzhető sejtjébe transzformáltuk, a kapott transzformánst Xgal indikátor alkalmazása mellett lemezre oltottuk (J. Messing és munkatársai, Nucleic Acids Research, 9, 309–321 /1981/), a rekombináns fágot tartalmazó plakkokat (fehér plakk) összegyűjtöttük, és a rekombináns terület bázisszekvenciáját didezoxi-nukleotid szintetikus lánctermináció módszerrel meghatároztuk (J. Messing és munkatársai, Nucleic Acids Research, 9, 309 /1981/), így megerősítést nyert, hogy pontosan a humán bFGF DNS-t iktattuk be.

Ebből az M13–PO klónból egy egyszálú fág DNS-t tisztítottunk, amelyet azután templátként alkalmaztunk a helyre irányuló mutagenezisben, szintetikus oligonukleotid alkalmazásával.

(2) Helyspecifikus mutagenezis

0,1 mmól/l adenozin-trifoszfát (ATP), 50 mmól/l tris-hidroxi-metil-amino-metán-hidroklorid (tris-HCl, pH= 8,0), 10 mmól/l magnézium-klorid, 5 mmól/l ditiotreitol (DTT) és 9 egység T4 kináz jelenlétében, 50 µl térfogatban 40 pikomól

5'CGT TCT TGC TGT AGA GCC GCT'

szintetikus oligonukleotidot (Cys 26 Ser maradékra történő cseréléséhez primer; az RsaI restrikciós enzim felismerőhelye) 37 °C-on egy óra hosszat T4 kinázzal kezeltünk. Ezt a kinázzal kezelt primer (12 pikomól) 5 percig 67 °C-on, majd 25 percig 42 °C-on hevítettük 50 µl következő összetételű oldatban: 50 mmól/l nátrium-klorid, 1,0 mmól/l tris-hidroklorid (pH= 8,0), 10 mmól/l magnézium-klorid és 10 mmól/l β-merkapto-etanol, így a primer 5 µg egyszálú (ss) M13-PO DNS-hez hibridizált. A kapcsolt elegyet azután jégen lehűtöttük, és hozzáadtuk 50 µl reakcióelegyhez, amelynek összetétele 0,5 mmól/l dezoxi-nukleotid-trifoszfát (dNTP), 80 mmól/l tris-hidroklorid (pH= 7,4), 8 mmól/l magnézium-klorid, 100 mmól/l nátrium-klorid, 9 egység DNS-polimeráz I Klenow fragmens, 0,5 mmól/l ATP és 2 egység T4 DNS-ligáz, és a reakciót 37 °C-on 3 óra hosszat, majd 25 °C-on 2 óra hosszat folytattuk, ezután a reakciót 2 µl 0,2 mmól/l-es EDTA-val beállítottuk. A reakcióterméket fertőzhető JM105 sejtek transzformálására használtuk; az így kapott transzformáns sejteket éjszakán át nőni hagytuk, ezután az egyszálú DNS-t izoláltuk a tenyészközeg felülúszójával. Ezt az egyszálú DNS-t templátként használva a primer meghosszabbításának második ciklusában, gélen tisztított RF-típusú DNS-t a fertőzhető JM105 sejtekbe transzformáltuk, a kapott transzformáns sejteket agarlemezen szélesítettük, és éjszakán át tenyésztettük, így fág plakkokat kaptunk.

(3) Helyre irányuló mutagenezis

Az előbbi eljárást követtük, azzal az eltéréssel, hogy szintetikus oligonukleotid primerként a következő nukleotidot használtuk:

5'AAC GAT TAG CGC TCA CTC C'

amely a cisztein 70-et kódoló kodont úgy cseréli ki, hogy a kodon szerint kódol. (Azaz HaeII restrikciós enzim felismerőhelyet képeztünk.)

(4) Helyre irányuló mutagenezis

A 2. lépésben végzett eljárást ismételtük, azzal az eltéréssel, hogy szintetikus oligonukleotid primerként következő nukleotidot alkalmaztuk:

5'GTA ACA GAC TTA GAA GCT AGT'

amely a cisztein 88-at kódoló kodont úgy változtatja meg, hogy a kodon a szerint kódolja. (Azaz AluI restrikciós enzim felismerőhelyet képeztünk.)

(5) Helyre irányuló mutagenezis

A 2. lépésben végzett eljárást ismételtük, azzal az eltéréssel, hogy a következő szintetikus oligonukleotid primert alkalmaztuk:

5'TCG AAG AAG AAA GAC TCA TCC'

amely a cisztein 93-at kódoló kodont úgy változtatja meg, hogy a kodon a szerint kódolja. (Azaz HinfI restrikciós enzim felismerőhelyet képeztünk.)

(6) A mutagénné tett plakkok átvizsgálása és azonosítása

A mutált M13–PO plakkokat tartalmazó lemezeket (1. lépés) és két nem mutált M13–PO fág plakkot tartalmazó lemezt 4 °C-ra lehűtöttünk, és minden lemezről a plakkokat átvittük két kerek mikrocellulóz szűrőre oly módon, hogy az agarlemezre helyezett száraz szűrőt az első szűrő esetén 5 percig, a második szűrő esetén 15 percig rajtatartottuk. A szűrőket ezután 5 percig vastag szűrőpapíron tartottuk, amely a következő összetételű oldattal volt átitatva: 0,2 n NaOH, 1,5 mól/l NaCl és 0,2% Triton X–100, majd semlegesítettük úgy, hogy 5 percig vagy tovább olyan szűrőpapíron tartottuk, amely a következő összetételű oldattal volt átitatva: 0,5 mól/l Tris-HCl (pH= 7,5) és 1,5 mól/l NaCl. A szűrőket ezután kétszeres SSC-vel (standard nátrium-citrát) átitatott szűrőn ugyanúgy mostuk, megszárítottuk, majd 80 °C-on 2 óra hosszat vákuumkemencében szárítottuk. Az átlapoló szűrőket 4 óra hosszat 55 °C-on 10 ml/szűrő DNS hibridizáló pufferoldatban (5xSSC, pH= 7,0) előhibridizáltuk, az oldat összetétele a következő volt: 4xDenhardt-féle oldat (polivinil-pirrolidon, Ficoll és szarvasmarha szérum-albumin, 1x= 0,02%), 0,1% nátrium-dodecil szulfát (SDS), 50 mmól/l nátrium-foszfát-puffer-oldat, pH= 7,0, 100 µg/ml denaturált lazac sperma DNS.

A hibridizálást 42 °C-on 24 óra hosszat folytattuk 10^5 cpm/ml oligonukleotid primerrel. A szűrőket 1,1% SDS-t és csökkentett mennyiségű SSC-t tartalmazó pufferoldattal mostuk 30 percig 50 °C-on. A szűrőket ezután kétszer SSC-t tartalmazó pufferoldattal mostuk. A kontrollszűrőket, amelyek nem mutált M13–PO plakkokat tartalmaztak Geiger-számlálóval radioaktivitásra vizsgáltuk. Az SSC koncentrációját lépésenként csökkentve, a kontrollszűrőket addig mostuk, amíg detektálható radioaktivitás nem maradt aszűrőket addig mostuk, amíg detektálható radioaktivitás nem maradt a szűrőkön. A használt SSC minimális koncentrációja 0,1xSSC volt. A szűrőket levegőn megszárítottuk, és 2–3 napig –70 °C-on autoradiografáltuk. Az átvizsgálást 10 000 mutáns M13–PO plakkon és 100 nem mutált kontrollplakkon végeztük, kinázzal kezelt oligonukleotid mintát használva. A mintához kontrollplakk nem hibridizált, míg a mutált M13–PO plakkok közül 3–10 hibridizált.

A mutált M13–PO plakkok közül eggyel JM105 törzs tenyészközegét beoltottuk. A felülúszóból egyszálú DNS-t izoláltunk, és a baktériumsejt-üledékből kettősszálú DNS-t készítettünk. A bázisszekvencia meghatározást alkalmas oligonuleotid primerekkel és egyszálú DNS-ekkel végeztük.

Megerősítést nyert, hogy a TGC (Cys–26) kodon TCT (Ser) kodonra cserélődött, a TGT (Cys–70) kodon AGC (Ser) kodonra, a TGT (Cys–88) kodon TCT (Ser) kodonra és a TGT (Cys–93) kodon TCT (Ser) kodonra cserélődött.

A mutált M13–PO fágok közül azt a fágot, amelyben a Cys–26 kodon Ser-t kódoló kodonná alakult, M13–P1-nek neveztük, azt a fágot, amelyben a Cys–70 kodon Ser-t kódoló kodonná alakult, M13–P2-nek neveztük, azt a fágot, amelyben a Cys–88 kodon Ser-t kódoló kodonná alakult, M13–P3-nak neveztük, és azt

a fágot, amelyben a Cys–93 kodon Ser-t kódoló kodonná alakult, M13–P4-nek neveztük.

2. Referenciapélda

Mutagénné tett plakkok átvizsgálása és azonosítása

Az 1. referenciapéldában kapott mutált M13–P2 fág plakkokat tartalmazó lemezeket és kettő, nem mutált M134–P0 fágot tartalmazó plakkokat tartalmazó lemezt 4 °C-ra lehűtöttünk, és minden lemezről a plakkokat két kerek nitrocellulóz szűrőre vittük át úgy, hogy az első szűrő esetén 15 percig tartottuk a száraz szűrőt. A szűrőket ezután 5 percig vastag szűrőpapíron tartottuk, amely a következő oldattal volt átitatva: 0,2 n NaOH, 1,5 mól/l NaCl és 0,2% Triton X–100, majd 5 percig 0,5 mól/l Tris-HCl (pH= 7,5) és 1,5 mól/l NaCl tartalmú oldattal átitatott szűrőpapíron tartva semlegesítettük. A szűrőket kétszer SSC oldatba itatott szűrőkön mostuk ugyanúgy, majd hagytuk megszáradni, utána 80 °C-on 2 óra hosszat vákuumkemencében szárítottuk. Az egymásra helyezett szűrőket 55 °C-on 4 óra hosszat 10 ml/szűrő DNS hibridizáló pufferben (5xSSC) 7,0 pH-értéknél előhibridizáltuk, az oldat összetétele a következő volt: 4xDenhardt-féle oldat (polivinil-pirrolidon, Ficoll és szarvasmarha szérumalbumin, 1x= 0,02%), 0,1% Na-dodecil-szulfát (SDS), 50 mmól/l Na-foszfát-puffer pH= 7,0, és 100 μg/ml denaturált lazac sperma DNS. A hibridizálást 42 °C-on 24 óra hosszat folytattuk 10^5 cpm/ml oligonukleotid primerrel. A szűrőket ezután egyenként mostuk 0,1% SDS-t tartalmazó és egy csökkentett mennyiségű SSC-t tartalmazó pufferoldattal 30 percig 50 °C-on. A szűrőket ezután kétszer SSC-t tartalmazó pufferoldattal mostuk, a kontrollszűrőket, amelyek nem mutált M13-P2 plakkokat tartalmaztak, Geiger-számlálóval radioaktivitásra vizsgáltuk. A kontrollszűrőket fokozatosan csökkentett koncentrációjú SSC oldattal mostuk, amíg detektálható radioaktivitás nem maradt a szűrőkön. A minimális SSC koncentráció 0,1xSSC volt. A szűrőket levegőn megszárítottuk, és –70 °C-on 2–3 napig autoradiografáltuk. Az átvizsgálást 10 000 mutált M13–P2 plakkon és 100 nem mutált kontrollplakkon végeztük, kinázzal kezelt oligonukleotid minták használatával. A mintákhoz egyetlen kontrollplakk sem hibridizált, míg a mutált M13–P2 plakkok közül 3–10 hibridizált a mintához.

A mutált M13–P2 plakkok közül eggyel JM105 tenyészközeget oltottunk be. A kapott felülúszóból egyszálú DNS-t állítottunk elő. A bázisszekvencia analízisét alkalmas oligonukleotid primerekkel és egyszálú DNS-ekkel végeztük.

Megerősítést nyert, hogy a TGC (Cys–26) kodon TCT (Ser) kodonra, a TGT (Cys–88) kodon a TCT (Ser) kodonra, és a TGT (Cys–93) kodon TCT (Ser) kodonra cserélődött.

A mutált M13–P2 fágok közül azt a fágot, amelyben a Cys–26 és –70 kodon Ser-t kódoló kodonná alakult, M13–P12-nek, azt a fágot, amelyben a Cys–70 és –88 kodon Ser-t kódoló kodonná alakult, M13–P23-nak és azt a fágot, amelyben a Cys–70 és –93 kodon Ser-t kódoló kodonná alakult, M13–P24-nek neveztük.

3. Referenciapélda

Humán bFGF változatot kódoló gén kifejezése Escherichia coliban

(1) pTB762 plazmid készítése humán bFGF változat expressziójához

A 2. referenciapélda szerinti módon kapott, replikatív formájú (RF) M13–P23-t EcoRI és PstI restrikciós enzimekkel hasítottuk, így körülbelül 0,5 kb DNS fragmenseket kaptunk, amelyek a humán bFGF változatot kódoló területet tartalmazták.

Emellett a trp promotert tartalmazó ptrp781 plazmid DNS-t (Kurokawa, T. és munkatársai, Nucleic Acids Research, 11, 3077–3075 /1983/) EcoRI–PstI hasításnak vetettünk alá, így kb. 3,2 kb DNS fragmenst választottunk el, amely egy trp promotert, tetraciklin rezisztencia gént és egy plazmid replikáció iniciáló helyet tartalmazott. Az előbbi 0,5 kb hosszúságú EcoRI–PstI DNS fragmenst, amely a humán bFGF változatot kódoló területet tartalmazza, és ezt a 3,2 kb hosszúságú DNS fragmenst T4 DNS ligázzal ligáltuk, így a pTB762 plazmidot kaptuk a humán bFGF változat kifejezéséhez.

Ezzel a pTB762 plazmiddal Escherichia coli MM294 törzset transzformáltunk, így az Escherichia coli MM294/pTB762 (IFO 14613, FERM BP–1645) törzset kaptunk, amely magában foglalja a pTB762 plazmidot, amely a utein CS23-t kódoló gént tartalmazza.

(2) Baktériumsejt-extraktum előállítása

A fenti transzformánst 1% glükózt, 0,4% kazaminosavat és 8 μg/ml tetraciklint tartalmazó M9 tápközegen tenyésztettük, és amikor a Klett-érték kb. 200-at ért el, 3β-indolilakrilsavat adagoltunk 25 μg/ml koncentrációig, és a tenyésztést további 4 óra hosszat folytattuk. Ezután a baktériumsejteket összegyűjtöttük, és 10%-os szacharózoldatban szuszpendáltuk, amely 1/20 mennyiségű 20 mmól/l Tris-hidrokloridot (pH=7,6) tartalmazott. A szuszpenzióhoz hozzáadtunk fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) 1 mmól/l-ig, EDTA-t 10 mmól/l-ig, nátrium-kloridot 0,1 mól/l-ig, spermidin-hidrokloridot 10 mmól/l-ig és lizozimot 100 μg/ml-ig (a számok a végső koncentrációt mutatják), és az elegyet 0 °C-on 45 percig állni hagytuk, majd 30 másodpercig ultrahanggal kezeltük. Az oldatot 10 000 fordulat/perc sebességgel 30 percig centrifugáltuk (Sorval centrifuga, SS34 rotor), a kapott felülúszót baktériumsejt-extraktumként használtuk.

(3) A baktériumsejt-extraktum humán bFGF aktivitása

Egy 96 nyílású Nunc mikrotiter lapra, amely nyílásonként 0,2 ml, 5% borjúszérumot tartalmazó DMEM tápközeget tartalmazott, $2x10^3$ sejt/nyílás egér BALB/c3T3 sejteket oltottunk, és tenyésztettünk. Másnap a tápközeget 0,5% borjúszérumot tartamazó DMEM tápközeggel cseréltük ki. Három napi tenyésztés után minden nyíláshoz 10 μl baktériumsejt-extraktumot adtunk, amelyet előzőleg ötlépéses sorozathígítással 0,5% BSA-t tartalmazó DME tápközeggel

hígítottunk, és folytattuk a tenyésztést. 20 óra múlva minden nyíláshoz 2 µl ^{3}H-Tdr-t adtunk (5 Ci/mmól, 0,5 mCi/ml RCC Amersham). 6 óra múlva a sejtekről a sejtfalat 0,2% tripszint, 0,02% EDTA-t tartalmazó foszfáttal pufferolt sóoldattal végzett kezeléssel eltávolítottuk, és a sejteket egy üvegszűrőn egy titertech sejtgyűjtóvel összegyűjtöttük, majd a sejtek által felvett ^{3}H-Tdr mennyiséget szcintillációs számlálóval meghatároztuk.

Úgy találtuk, hogy az E. coli MM294/pTB762 baktériumsejt-extraktum FGF aktivitással rendelkezett.

Így tehát a CS23 jelű rhbFGF változatot kaptunk, amelyben a humán bFGF 70. és 88. helyzetében a Cys t Ser-re van cserélve.

(4) A (3) lépésben kapott sejtextraktumból 25 ml-t (amelyet 500 ml tenyészközegből készítettünk) egy 20 mmól/l Tris-hidroklorid (pH= 7,4) és 0,2 mól/l nátrium-klorid tartalmú oldattal kiegyenlített DE-AE cellulóz oszlopra vittünk. (DE 52, Whatman, Nagy-Britannia, 2 cm átmérő, 10 cm hossz) a nukleinsav komponensek eltávolítása érdekében. Az oszlopról elfolyó oldatot, és a 20 mmól/l Tris-hidroklorid (pH= 7,4) és 0,2 mól/l nátrium-klorid tartalmú mosóoldatokat egyesítettük (a DEAE oszlopon átengedett frakció 60 ml-e).

Ezt a frakciót egy Shodex AF-pak HR–894 (8 mm x 5 cm, Showa Denko, Japán gyártmány) heparinoszlopon nagysebességű folyadékkromatográfiának (Gilson, Franciaország) vetettük alá. Az oszlopot 20 mmól/l Tris-hidroklorid oldattal (pH= 7,4), majd 20 mmól/l Tris-hidroklorid (pH= 7,4) és 0,5 mól/l nátrium-klorid tartalmú oldattal mostuk egymás után, majd lineáris gradiens eluálással fejlesztettük ki (60 ml térfogat, 1,0 ml/perc átfolyás) 0,5 mól/l-től 2 mól/l-ig változó nátrium-klorid tartalmú 20 mmól/l-es Tris-hidroklorid pufferrel (pH= 7,4).

Úgy találtuk, hogy a 15. és 25. perc között eluáló frakció CS23 jelű rhbFGF változatot tartalmazott, ezeket a frakciókat összegyűjtöttük. A frakciók fajlagos aktivitása 1,1 mg protein FGF/mg protein volt a standard szarvasmarha agyból származó FGF minták (95% fölötti tisztaság, Takara Shuzo Co., Ltd., Japán gyártmány) FGF aktivitása alapján számítva.

4. Referenciapélda

β-ciklodextrin-tetradekaszulfát nátriumsójának készítése

(a) 5 g β-ciklodextrint feloldunk 250 ml dimetil-formamidban. Ehhez az oldathoz 5 perc alatt, 70 °C-on, keverés közben hozzáadunk 15 g kén-trioxid/trimetil-amin komplex sót, és a keverést ezen a hőmérsékleten 16 óra hosszat folytatjuk. Az oldatot ezután lehűtjük, hozzáadunk 250 ml etanolt, az oldatot dekantáljuk, az oldhatatlan anyagot kismennyiségű etanollal mossuk. A maradékot 250 ml vízben feloldjuk, és az oldhatatlan anyagot leszűrjük. A szűrlethez hozzáadunk 75 ml 30 tömeg/térf.%-os nátrium-acetát vizes oldatot, és az elegyet egy óra hosszat szobahőmérsékleten keverjük.

(b) A kapott, β-ciklodextrin-tetradekaszulfát-nátri - umsót tartalmazó reakcióelegyet csökkentett nyomáson szárazra pároljuk. A koncentrátumot 75 ml vízben feloldjuk. A kapott oldathoz hozzáadunk 150 ml etanolt, és a gumiszerű szilárd anyagot dekantálással elválasztjuk. A gumiszerű szilárd anyagot 30 ml etanol hozzáadásával porrá alakítjuk, leszűrjük, és megszárítjuk, így 10,3 g terméket kapunk.

Elemanalízis a $C_{42}H_{56}O_{77}S_{14}Na_{14}$ képlet alapján:
számított: C: 19,68, H: 2,20, S: 17,51%,
talált: C: 20,67, H: 3,40, S: 16,29%.
$[\alpha]^{22}_D$ +83,5° (c= 1,55, víz)
Víztartalom: 1,5 tömeg% (Karl-Fischer-módszer).

5. Referenciapélda

100 ml dimetil-formamidban szuszpendálunk 2,5 g, 540 átlagos polimerizációs fokú β-1,3-glükánt (Gurdlan). A szuszpenzióhoz hozzáadunk 13,5 g klór-szulfonsavból és 11,7 g trietil-aminból szintetizált 12,5 g trimetil-amin-szulfonsavat, és a reakcióelegyet 24 óra hosszat jeges vizes fürdőn keverjük. Ezután a reakcióelegyet 0,1 mól/l-es ammónium-hidrogén-karbonáttal szemben dializáljuk, majd liofilizáljuk, így 4,4 g terméket kapunk. A kapott β-1,3-glükán-szulfát ammóniumsó átlagos szubsztitúciós foka (DS) 1,04 (szulfáttartalom 12,7%).

6. Referenciapélda

150 ml dimetil-formamidban szuszpendálunk 2,5 g, kis molekulatömegű β-1,3-glükánt (átlag polimerizációs fok 6), amelyet 540 átlagos polimerizációs fokú β-1,3-glükán 90%-os hangyasavval 95 °C-on, 40 perc alatt végzett részleges hidrolízisével állítottunk elő. A szuszpenzióhoz hozzáadunk 50 g trietil-amin-szulfonsavat, és a reakcióelegyet 24 óra hosszat jeges vizes fürdőn keverjük. Ezután a reakcióelegyet 0,02 mól/l-es ammónium-hidrogén-karbonáttal kiegyenlített Sephadex G–25 oszlopon (2,5 liter, finom) gélszűrésnek vetjük alá. Az eluátumot cukortartalomra vizsgáljuk fenolszulfonsav-módszerrel. Ezután a cukorfrakciókat egyesítjük és liofilizáljuk, így 5,6 g β-1,3-glükán-szulfátot kapunk. A kapott termék DS-értéke 1,12 (kéntartalom 13,3%).

7. Referenciapéda

150 ml dimetil-formamidban szuszpendálunk 2,5 g kis molekulatömegű β-1,3-glükánt (átlagos polimerizációs fok 26), amelyet 540 átlagos polimerizációs fokú β-1,3-glükán 90%-os hangyasavval 90 °C-on, 40 perc alatt végzett részleges hidrolízisével kaptunk. A szuszpenzióhoz hozzáadunk 50 g trietil-amin-szulfonsavat, és a reakcióelegyet 24 óra hosszat jeges vizes fürdőn keverjük. Ezután a reakcióelegyet a 6. referenciapélda szerinti módon feldolgozzuk, így 6,1 g β-1,3-glükán-szulfát ammóniumsót kapunk. A kapott termék DS-értéke 1,22 (kéntartalom 14,0%).

8. Referenciapélda

100 ml dimetil-formamidban szuszpendálunk

2,5 kis molekulatömegű β-1,3-glükánt (átlagos polimerizációs fok 131), amelyet 540 átlagos polimerizációs fokú β-1,3-glükán 85%-os hangyasavval 80 °C-on, 30 perc alatt végzett részleges hidrolízisével kaptunk. A szuszpenzióhoz hozzáadunk 12,5 g trietil-amin-szulfonsavat, és a reakcióelegyet 24 óra hosszat jeges vizes fürdőn keverjük. Ezután 0,5 mól/l-es ammónium-hidrogén-karbonáttal szemben dializáljuk, majd liofilizáljuk, így 3,9 g β-1,3-glükán-szulfát ammóniumsót kapunk. A kapott termék DS-értéke 1,46 (kéntartalom 15,4%).

9. Referenciapélda

A példánkban bemutatott FGF aktivitás meghatározást a következő (1) és (2) pontban leírt módszerrel végeztük.

(1) Egy 96-nyílású Nunc mikrotiter lapra nyílásonként 0,2 ml ($2x10^3$ sejt) 5% borjúszérumot tartalmazó DMEM tápközegben szuszpendált egér BALB/c3T3 sejteket oltottunk, és tenyésztettünk. Másnap a tápközeget 0,5% borjúszérumot tartalmazó DMEM tápközeggel cseréltünk ki. Három napi tenyésztés után minden nyílásba 10 µl baktériumsejt-extraktumot adtunk, amelyet előzőleg ötlépéses sorozathígítással 0,5% BSA-t tartalmazó DME tápközeggel hígítottunk, és a tenyésztést folytattuk. 20 óra múlva minden nyíláshoz hozzáadtunk 2 µl ^{3}H-Tdr-t (5 Ci/mmól, 0,5 mCi/ml RCC Amersham). 6 óra múlva a sejtek sejtfalát 0,2% tripszint és 0,02% EDTA-t tartalmazó foszfáttal pufferolt sóoldattal végzett kezeléssel eltávolítottuk, és a sejteket egy Titertech sejtgyűjtővel üvegszűrőn összegyűjtöttük, majd a sejtek által felvett ^{3}H-Tdr mennyiségét szcintillációs számlálóval meghatároztuk.

(2)

A 10% borjúszérumot tartalmazó DMEM tápközeggel kétlépésben hígított mintákat 50 µl/nyílás mennyiségben egy 96-nyílású Nunc Titertech lapra vittük, majd minden nyílásra 50 µl ($2x10^3$ sejt) magzati szarvasmarha szív endoteliális sejtet (CRL1395, American Type Culture Collection forgalmazza) juttattunk, és 3 napig tenyésztettünk. Ezután minden nyílásba 20 µl MTT oldatot adtunk (5 ml/ml PBS, Sigma). 4,5 óra múlva hozzáadtunk 100 µl 10%-os SDS–0,01 n HCl oldatot, és a lemezeket éjszakán át inkubátorban tartottuk, majd meghatároztuk az abszorbanciát 590 nm-nél egy Titertech Multiscan készülékkel (Tada és munkatársai; Journal of Immunological Methods, *93*, 157 /1986/).

1. példa

10% borjúembrió-szérumot tartalmazó Dulbecco MEM tápközeghez (Virology *8*, 396 /1959/) rhbFGF-t adtunk 10 µg/ml koncentrációig, ehhez hozzáadtunk dextrán-szulfát-sót 25 µg/ml végső koncentrációig, és az elegyet 37 °C-on 24 óra hosszat inkubáltuk. Az alkalmazott dextrán-szulfát-só nátriumsó volt, 5000, 7500 és 500 000 átlagmolekulatömeggel. Kontrollként olyan közeget alkalmaztunk, amelyhez nem adtunk dextrán-szulfát-nátriumot. A 24 óra után mért maradék aktivitást a 2. táblázatban foglaltuk össze. A kontrollban lényegében nem maradt FGF-aktivitás, míg a vizsgálati csoportokban az FGF-aktivitás stabil volt.

2. táblázat

Adalék	Maradék FGF-aktivitás (%)
Dextrán-szulfát-nátrium (átlag molekulatömeg 5000)	100
Dextrán-szulfát-nátrium (átlag molekulatömeg 7500)	100
Dextrán-szulfát-nátrium- (átlag molekulatömeg 500 000)	100
–	4

2. példa

10% borjúembrió-szérumot tartalmazó Dulbecco MEM tápközeghez (Virology 8, 396 /1959/) rhbFGF mutein CS23-at adtunk 10 µg/ml koncentrációig, ehhez hozzáadtunk dextrán-szulfát-sót 25 µg/ml végső koncentrációig, és az elegyet 37 °C-on 24 óra hosszat inkubáltuk. Az alkalmazott dextrán-szulfát-só nátriumsó volt, 5000, 7500 és 500 000 átlagmolekulatömeggel. Kontrollként olyan közeget alkalmaztunk, amelyhez nem adtunk dextrán-szulfát-nátriumot. A 24 óra után mért aktivitást a 3. táblázatban foglaltuk össze. A kontrollban lényegében nem maradt FGF-aktivitás, míg a vizsgálati csoportokban az FGF-aktivitás stabil volt.

3. táblázat

Adalék	Maradék FGF-aktivitás (%)
Dextrán-szulfát-nátrium (átlag molekulatömeg 5000)	93
Dextrán-szulfát-nátrium (átlag molekulatömeg 7500)	100
Dextrán-szulfát-nátrium (átlag molekulatömeg 500 000)	100
–	6

3. példa

20 mmól/l-es foszfát-puffer oldathoz (pH= 7,4) hozzáadtunk rhbFGF-t 10 µg/ml végső koncentrációig, majd ehhez dextrán-szulfát-nátriumot adtunk (átlagos molekulatömeg 7500, kéntartalom 17,4%) különböző arányban, majd 72 óra hosszat 37 °C-on inkubáltuk az elegyeket.

A dextrán-szulfát-nátriumot olyan mennyiségben adagoltuk, hogy az rbhFGF-re vonatkoztatva 0–16 mól legyen a koncentrációja. Kontrollként olyan közeget alkalmaztunk, amely nem tartalmazott dextrán-szulfátot. A 72 óra után mért maradék aktivitást a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat

rhbFGF és dextrán-szulfát-nátrium mólaránya	Maradék FGF-aktivitás (%)
1:0	
1:0,25	15
1:1	99
1:4	95
1:16	100

4. példa

20 mmól/l-es foszfát-puffer oldathoz (pH= 7,4) rhbFGF-t adagoltunk 10 μg/ml végső koncentrációig, amelyhez azután dextrán-szulfát-nátriumot és/vagy nátrium-citrátot adtunk, majd fagyasztva szárítottuk. A dextrán-szulfát-nátrium (átlagos molekulatömeg 7500, kéntartalom 17,4%) koncentrációja 25 μg/ml volt, míg a nátrium-citrát koncentrációja 50 mmól/l volt. A fagyasztva szárított anyagot desztillált vízzel visszaoldottuk, és mértük a maradék aktivitást. Az eredményeket az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat

Adalék	Maradék FGF-aktivitás (%)
Dextrán-szulfát-nátrium	100
Nátrium-citrát	48
Dextrán-szulfát-nátrium+ +nátrium-citrát	97
–	6

5. példa

20 mmól/l-es foszfát-puffer oldathoz (pH= 7,4) rhbFGF-t adtunk 10 μg/ml végső koncentrációig, amelyhez azután dextrán-szulfát-nátriumot (átlagos molekulatömeg 7500, kéntartalom 17,4%) adtunk 25 μg/ml végső koncentrációig, majd az elegyet 72 óra hosszat 37 °C-on inkubáltuk. Másrészt olyan mintákat készítettünk, amelyekben dextrát-szulfát-nátrium helyett nátrium-citrátot, nátrium-maleátot, nátrium-malátot, nátrium-fumarátot, illetve nátrium-tartarátot adtunk a puffer oldathoz 0,4 mól/l koncentrációig. Ezeket az anyagokat önmagukban, illetve dextrán-szulfát-nátriummal (25 μg/ml) alkalmaztuk. Az elegyeket 24 óra hosszat 37 °C-on inkubáltuk. A 72 óra utáni maradék aktivitást a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat

Adalék	Maradék FGF-aktivitás (%)
dextrán-szulfát-nátrium	91
nátrium-citrát	72
nátrium-citrát+ +dextrán-szulfát-nátrium	100
nátrium-malát	40
nátrium-malát+ +dextrán-szulfát-nátrium	93
nátrium-maleát	54
nátrium-maleát+ +dextrán-szulfát-nátrium	94
nátrium-fumarát	35
nátrium-fumarát+ +dextrán-szulfát-nátrium	90
nátrium-kálium-tartarát	63
nátrium-kálium-tartarát+ +dextrán-szulfát-nátrium	97
–	2

6. példa

50 mmól/l-es nátrium-citrát-oldathoz (pH= 7,4) rhbFGF-t adtunk 100 μg/ml koncentrációig. Az elegyhez dextrán-szulfát-sót adtunk 46 μg/ml végső koncentrációig (1:1 mólarány), majd az elegyet 56 °C-on 30 percig inkubáltuk. Dextrán-szulfát-sóként nátriumsót alkalmaztunk, amelynek átlag molekulatömege 7500 volt. Kontrollként dextrán-szulfát nélküli oldatot alkalmaztunk. Az eredményeket a 7. táblázat tartalmazza. Amint a 7. táblázatból látható, az FGF aktivitása szinte teljesen megszűnt a kontrollban, míg a dextrán-szulfát alkalmazása mellett még ilyen magas hőmérsékleten is megmaradt az aktivitás.

7. táblázat

Adalék	Maradék FGF-aktivitás (%)
dextrán-szulfát-nátrium (átlagos molekulatömeg 7500)	100
-	11

7. példa

2 mmól/l-es foszfát-puffer-oldathoz (pH= 7,0) rhbFGF mutein CS23-t adtunk (amelyet a 3. referenciapélda szerint állítottunk elő) 100 μg/ml végső koncentrációig. Ehhez az elegyhez dextrán-szulfát-nátriumot adtunk, melynek átlagos molekulatömege 7500 volt, 46 μg/ml végső koncentrációig (1:1 mólarány), és az elegyet 37 °C-on 2 óra hosszat inkubáltuk 3,0, 5,0, 7,4 illetve 9,7 pH-értéknél. A maradék FGF-aktivitást 2 ra inkubáció után a 8. táblázat tartalmazza.

Amint a 8. táblázatból látható, az FGF-aktivitás jelentősen csökkent minden pH-értéknél a kontroll esetén, míg dextrán-szulfát alkalmazása mellett lényegében megmaradt az aktivitás.

8. táblázat

Adalék	pH	Maradék FGF-aktivitás (%)
dextrán-szulfát-nátrium	3,0	80
dextrán-szulfát-nátrium	5,0	100
dextrán-szulfát-nátrium	7,4	100
dextrán-szulfát-nátrium	9,7	87
–	3,0	30
–	5,0	45
–	7,4	60
–	9,7	28

8. példa

8 mmól/l sósavat és a 3. referenciapélda szerint előállított CS23 jelű rhbFGF változatot tartalmazó oldathoz 7500 átlag molekulatömegű dextrán-szulfát-nátriumot adtunk 100 μg/ml, illetve 90 μg/ml végső koncentrációig (1:1 mólarány), majd az elegyhez pepszint adtunk 4 μg/ml koncentrációig (végső pH= 2,1). Kontrollként dextrán-szulfátot nem tartalmazó oldatot alkalmaztunk. A reakcióelegyeket 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, és mértük a maradék FGF-aktivitást (9. táblázat). Amint a táblázatból látható, a kontroll oldatban a CS23 jelű rhhbFGF változat szinte teljes aktivitása eltűnt, míg a dextrán-szulfát-nátriumot tartalmazó oldatban az FGF-aktivitás stabilan megmaradt a pepszines emésztéssel szemben.

9. táblázat

Adalék	Maradék FGF-aktivitás (%)
dextrán-szulfát-nátrium	98
–	2

9. példa

20 mmól/l-es foszfát-puffer-oldathoz (pH= 7,4) a 3. referenciapélda szerint előállított CS23 jelű rhbFGF változatot adtunk 100 μg/ml koncentrációig. Az elegyhez azután 7500 átlag molekulatömegű dextrán-szulfát-nátriumot adtunk 94 μg/ml koncentrációig (1:1 mólarány), majd tripszint, illetve α-kimotripszint adtunk hozzá 4 μg/ml koncentrációig. Ezután a reakcióelegyet 16 óra hosszat 37 °C-on inkubáltuk. Kontrollként dextrán-szulfát-nátriumot nem tartalmazó oldatot alkalmaztunk.

Az eredményeket a 10. táblázat tartalmazza. Amint a táblázatból látható, a kontrolloldatokban a CS23 jelű változat aktivitása szinte eltűnt, míg a dextrán-szulfát-nátriumot tartalmazó oldatban az aktivitás stabilan megmaradt proteázok, úgymint tripszin, illetve α-kimotripszin jelenlétében.

10. táblázat

Enzim	Adalék	Maradék FGF-aktivitás (%)
tripszin	dextrán-szulfát-nátrium	95
tripszin	-	4
α-kimotripszin	dextrán-szulfát-nátrium	92
α-kimotripszin	–	92 6

10. példa

10% szarvasmarha-embrió szérumot tartalmazó Dulbecco-féle MEM tápközeghez rhbFGF-t adtunk 10 μg/ml koncentrációig.

Ehhez az elegyhez a 4. referenciapélda szerint kapott β-ciklodextrin-tetradekaszulfát-nátriumot, illetve az 5–8. referenciapélda szerint előállított β-1,3-glükán-szulfát-ammóniumot adtunk 500 μg/ml végső koncentrációig, és a reakcióelegyet 37 °C-on 24 óra hosszat inkubáltuk.

Az alkalmazott β-1,3-glükán-szulfát-ammónium átlag polimerizációs foka 6 (kéntartalma 13,5%), 26 (kéntartalma 14,0%), 131 (kéntartalma 15,4%), illetve 540 (kéntartalma 12,7%) volt.

Kontrollként szulfatált glükánt nem tartalmazó oldatot alkalmaztunk. A 11. táblázatban foglaltuk össze a 24 órai inkubálás után kapott maradék FGF-aktivitásokat.

Amint látható, a kontroll oldatban szinte teljesen eltűnt az FGF-aktivitás, míg az aktivitás stabil maradt a β-ciklodextrin-szulfátot, illetve a β-1,3-glükán-szulfátot tartalmazó oldatokban.

11. táblázat

Adalék	Maradék FGF-aktivitás (%)
β-ciklodextrin-tetradeka-szulfát-nátrium	100
β-1,3-glükán-ammónium (átlag polimerizációs fok 6)	75
β-1,3-glükán-szulfát-ammónium (átlag polimerizációs fok 26)	100
β-1,3-glükán-szulfát-ammónium (átlag polimerizációs fok 131)	100
β-1,3-glükán-szulfát-ammónium (átlag polimerizációs fok 540)	100
–	4

11. példa

10% szarvasmarha-embrió szérumot tartalmazó Dulbeco-féle MEM tápközeghez CS23 jelű rhbFGF változatot adtunk μg/ml koncentrációig. Ehhez az elegyhez a 4. referenciapélda szerint kapott β-ciklodextrin-tetradekaszulfát-nátriumot, illetve az 5–8. referenciapélda szerint előállított β-1,3-glükán-szulfát-ammóniumot adtunk 500 μg/ml végső koncentrációig, és a reakcióelegyet 37 °C-on 24 óra hosszat inkubáltuk. Az alkalmazott β-1,3-glükán-szulfát-ammónium átlag polimerizációs foka 6 (kéntartalma 13,5%), 26 (kéntartalma 14,0%), 131 (kéntartalma 15,4%), illetve 540 (kéntartalma 12,7%) volt. Kontrollként szulfatált glükánt nem tartalmazó oldatot alkalmaztunk. A 12. táblázatban foglaltuk össze a 24 órai inkubálás után kapott maradék FGF-aktivitásokat. Amint látható, a kontroll oldatban szinte teljesen eltűnt az FGF-aktivitás, míg az aktivitás stabil maradt a β-ciklodextrin-szulfátot, illetve β-1,3-glükán-szulfátot tartalmazó oldatokban.

12. táblázat

Adalék	Maradék FGF-aktivitás (%)
β-ciklodextrin-tetradekaszulfát-nátrium	100
β-1,3-glükán--szulfát-ammónium (átlag polimerizációs fok 6)	100
β-1,3-glükán--szulfát-ammónium (átlag polimerizációs fok 26)	100
β-1,3-glükán--szulfát-ammónium (átlag polimerizációs fok 131)	100
β-1,3-glükán--szulfát-ammónium (átlag polimerizációs fok 540)	100
–	6

12. példa

1:1 térfogatarányban összekevertünk 980 μg/ml, 3. referenciapélda szerint előállított CS23 jelű változatot és 45 μg/ml, 7500 átlagos molekulatömegű dextrán-szulfát-nátriumot. 200 μl aliqoutot 0,75x60 cm méretű TSK-gél 3000SW (Tosoh, Ltd. Japán) töltettel ellátott oszlopra töltöttünk, és az oszlopot 0,1 mól/l nátrium-szulfátot tartalmazó 0,1 mól/l-es foszfát-puffer-oldattal (pH= 6,0) fejlesztettük ki. Az átfolyási arány 1,0 ml/perc volt. A proteineket 230 nm-nél figyeltük. Az elegyben két csúcsot figyeltünk meg (lásd 2. ábra): I csúcs és II csúcs. A két csúcsot külön összegyűjtöttük és analizáltuk. Úgy találtuk, hogy az I csúcs a CS23 jelű rhbFGF változat a dextrán-szulfát-nátrium 1:4 arányú komplexe, míg a II csúcs dextrán-szulfát-nátrium. A komplex molekulatömegét a 2. ábráról 45000 körüli értéknek határoztuk meg.

13. példa

Stabil injekciós vizes oldatot készítettünk (pH= 7,4) milliliterenként 0,5 mg rhbFGF, 0,23 mg dextrán-szulfát-nátrium, 15 mg nátrium-citrát összetétellel.

14. példa

Stabil injekciós vizes oldatot készítettünk (pH= 7,4) milliliterenként 0,5 mg rhbFGF mutein CS23, 0,23 mg dextrán-szulfát-nátrium, 15 mg nátrium-citrát tartalommal.

15. példa

10% borjúembrió-szérumot tartalmazó Dulbecco MEM közeghez a következő rhbFGF változatokat (Biochem. Biophys. Res. Commun., *151*, 701 (1988) adtuk 10 μg/ml koncentrációban: CS1, CS2, CS3, CS4, CS12, CS113, CS14, CS23, CS24, CS34, CS123, CS124, CS134, CS234, CS1234. Ezután az elegyet 37 °C-on 24 óra hosszat inkubáltuk 25 μg/ml dextrán-szulfát-nátrium (átlagos molekulatömeg 7500) jelenlétében, illetve anélkül. A 24 óra múlva mért aktivitást a kezdeti érték százalékában kifejezve az alábbi táblázatban foglaltuk össze. Az FGF aktivitás dextrán-szulfát-nátrium jelenlétében közel a kezdeti értéken maradt, míg dextrán-szulfát-nátrium jelenléte nélkül szinte teljesen eltűnt.

13. táblázat

rhbFGF mutein	Dextrán--szulfát-Na	Maradék FGF-aktivitás (%)
CS1	+	98
	–	3
CS2	+	99
	–	2
CS3	+	100
	–	3
CS4	+	100
	–	4
CS12	+	99
	–	4
CS13	+	97
	–	2
CS14	+	98
	–	0
CS23	+	100
	–	4
CS24	+	100
	–	3
CS34	+	99
	–	2
CS123	+	100
	–	2
CS124	+	100
	–	3
CS134	+	98
	–	2
CS234	+	97
	–	5

rhbFGF mutein	Dextrán-szulfát-Na	Maradék FGF-aktivitás (%)
CS1234	+	96
	–	2

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás bázikus fibroblaszt növekedési faktor vagy annak változata stabilizálására, *azzal jellemezve*, hogy a bázikus FGF-t vagy annak olyan változatát, amely legalább egy bázikus, az FGF-t alkotó aminosav helyett valamely más aminosavat tartalmaz, vizes közegben 1 mól bFGF-re vagy változatára számítva 0,1–100 mól glükán-szulfát arányban glükán-szulfátként dextrán-szulfáttal, β-ciklodextrin-szulfáttal vagy β-1,3-glükán-szulfáttal vagy sójával és kívánt esetben két- vagy háromértékű karbonsavval vagy sójával hozzuk érintkezésbe. (Elsőbbsége: 1988.07.25.)

2. Eljárás bázikus fibroblaszt növekedési faktor vagy annak változata stabilizálására, *azzal jellemezve*, hogy a bázikus FGF-t vagy annak olyan változatát, amely legalább egy bázikus, az FGF-t alkotó aminosav helyett valamely más aminosavat tartalmaz, vizes közegben 1 mól bFGF-re vagy változatára számítva 0,1–100 mól dextrán-szulfáttal vagy sójával és kívánt esetben két- vagy háromértékű karbonsavval vagy sójával hozzuk érintkezésbe. (Elsőbbsége: 1988.06.06.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy bFGF változatát glükán-szulfáttal hozzuk érintkezésbe. (Elsőbbsége: 1988.07.25.)

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy bFGF változatként olyan változatot alkalmazunk, amely a humán bázikus FGF alkotó aminosavainak legalább egyike helyett más aminosavat tartalmaz. (Elsőbbsége: 1988.07.25.)

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy változatként olyan rhbFGF változatot alkalmazunk, amely a humán bFGF 70. és 88. helyzetben levő ciszteinje helyett szerint tartalmaz. (Elsőbbsége: 1988.07.25.)

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy glükán-szulfátként legalább 3 tömeg% kéntartalmú glükán-szulfátot alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988.07.25.)

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy glükán-szulfátként 12–20 tömeg% kéntartalmú glükán-szulfátot alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988. 07. 25.)

8. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy glükán-szulfátként dextrán-szulfátot alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988.06.06.)

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy glükán-szulfátként ciklodextrin-szulfátot alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988.07.25.)

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy glükán-szulfátként β-1,3-glükán-szulfátot alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1988.07.25.)

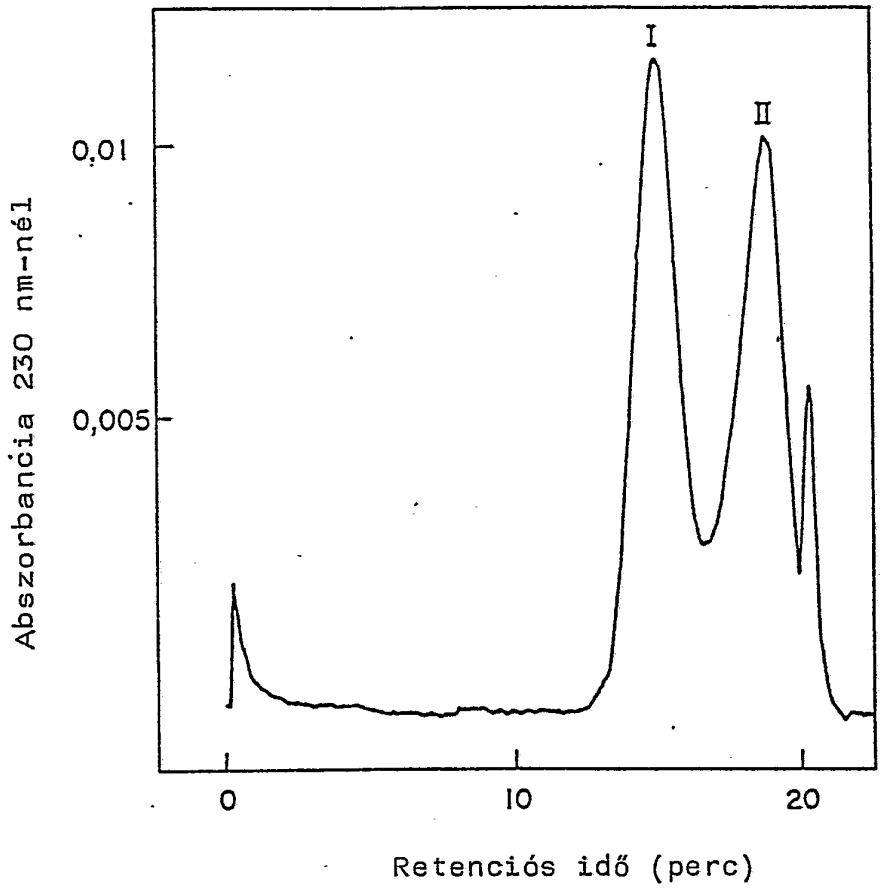
11. Eljárás gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely, az 1. igénypont szerinti eljárással stabilizált bázikus fibroblaszt növekedési faktort vagy annak változatát farmakológiailag elfogadható hordozó-, hígító- és/vagy segédanyaggal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítunk. (Elsőbbsége: 1988.07.25.)

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a gyógyszerkészítményt injekciós oldat, vagy liofilizátum formájában állítjuk elő. (Elsőbbsége: 198. 07.25.)

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a gyógyszerkészítményt injekció formájában állítjuk elő. (Elsőbbsége: 1988.07.25.)

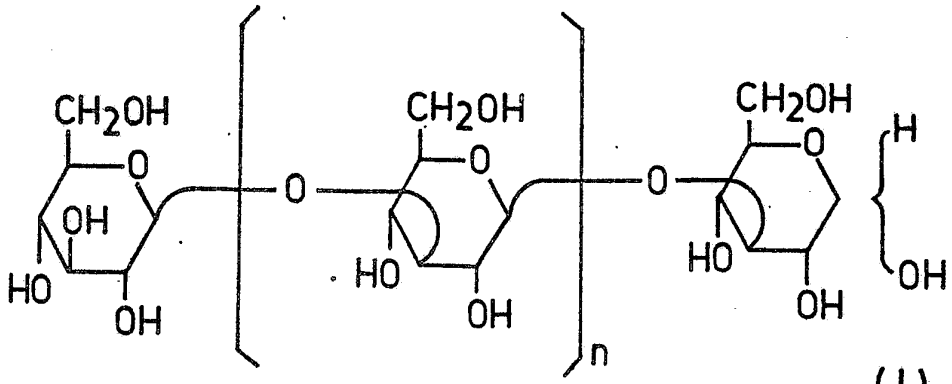
```
MetProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLysAsp      20
ATGCCAGCATTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGCGCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGAC     60

ProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGlyArg      40
CCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGA     120

ValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGluGlu      60
GTTGACGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAG     180

ArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGluAsp      80
AGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGAT     240

GlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePhePheGluArgLeuGlu      100
GGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGAACGATTGGAA     300

SerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeuLys      120
TCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAA     360

ArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeuPhe      140
CGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTT     420

LeuProMetSerAlaLysSertrm                                          147
CTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGA                                          444
```

1. ábra


I
II
0,01
0,005
Abszorbancia 230 nm-nél
0
10
20
Retenciós idő (perc)

2. ábra

Int. Cl.[5]: C 07 K 7/10



(I)