

(19) Országkód:

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**200 695 B**

(22) Bejelentés napja: 1986.05.27.

(21) 2239/86.

(33) GB

(32) 1985.05.28., 1985.08.31.

(31) 85.13358, 85.21704

(51) Int Cl<sup>5</sup>

**A 61 K 37/48**

(41) (42) Közzététel napja: 1987.07.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma

a Szabadalmi Közlönyben: 1990.08.28. SZKV/1990.08.

(72) Feltalálók:

Johnston Michael Denis Beckenham, Kent (GB),  
Berger Henry Cary, North-Karolina (US)

(73) Szabadalmaz:

The Wellcome Foundation Limited, London  
(GB)

### **(54) ELJÁRÁS SZÖVETI PLAZMINOGÉN AKTIVÁTOR TARTALMAZÓ STABIL GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA**

#### (57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás szöveti plazminogén aktivátort (t-PA) tartalmazó nagy töménységű, stabil, vizes parenterális oldat előállítására, oly módon, hogy

(a) az ismert módon előállított szöveti plazminogén aktivátorból ismert módon készített tisztított oldat közegét pH 2–5 értékű, kívánt esetben egy vagy több ismert adalékanyagot tartalmazó vizes közegre cserélik; vagy

(b) az ismert módon előállított szöveti plazminogén aktivátort pH 2–5 értékű, kívánt esetben egy vagy több ismert adalékanyagot tartalmazó vizes közegben oldják; majd a kapott oldatot sterilizálják.

A fenti módon előállított oldat a humán- és állatorvoslás területén trombozisos betegségek kezelésére használható.

A leírás terjedelme: 6 oldal, 2 ábra

**HU 200 695 B**

A találmány tárgya eljárás szöveti plazminogén aktivátort tartalmazó nagy töménységű, stabil, parenterális gyógyászati készítmények előállítására, amelyek a humán- és állatgyógyászat területén alkalmazhatók.

A véralvadék kialakítására képes enzimrendszer — azaz a koagulációs rendszer — és az ép, szabad vérpályát biztosító, véralvadékat oldó enzimrendszer — azaz a fibrinolitikus rendszer között feltehetően dinamikus egyensúly áll fenn. A sérüléseknél a vérvesztés megakadályozására a sérült véredényekben véralvadék képződik. A sérülés természetes gyógyulása után a felesleges véralvadék a fibrinolitikus enzimrendszer működése következtében feloldódik. Előfordulhat azonban, hogy külső sérülés nélkül is keletkezik véralvadék, amely a fő véredényekbe kerülhet, és ezáltal részben vagy teljesen elzárhatja a véráramlást. Ha ez a szívben, tüdőben vagy agyban következik be, szív- infarktus, tüdő-embólia vagy gutaütés lehet a következménye. A fenti okok együttesen a legfőbb betegséget és halált okozó tényezők az iparilag fejlett országokban.

A vérrögök fibrin-hálóból állnak, amelyet a plazmin nevű proteolitikus enzim képes oldani. Az enzim az inaktív proenzimből, a vérplazma egyik komponensét alkotó plazminogénből keletkezik, egy plazminogén-aktivátor hatására. Két, immunológiailag megkülönböztethető emlős plazminogén-aktivátor van. A belső (inherens) plazminogén aktivátor — amely urokináz néven is ismert — a vesében termelődik és a vizeletből izolálható. A külső (exogén) plazminogén aktivátor, más néven vaszkuláris plazminogén aktivátor vagy szöveti plazminogén aktivátor (t-PA) számos szövet-homogenizátumból — például emberi méhsejtéből — ér-sejtfalból és bizonyos sejtenyészetekből izolálható. A fenti két fajta plazminogén aktivátoron kívül egy bakteriális eredetű termék, a streptokináz is létezik, amelyet  $\beta$ -hemolizáló streptococcusokból izoláltak. A fenti két urokináz és a streptokináz közös nagy hátránya, hogy az egész keringésben, és nemcsak a vérrög kialakulásának helyén fejtik ki hatásukat. Így például más vérproteineket — fibrinogént, protrombint, V. faktort és VIII. faktort is tönkretelhetnek, ezáltal csökken a vér alvadási képessége és nő a vérzékenység veszélye. Ezzel szemben a t-PA biológiai aktivitása a fibrin jelenlététől függ, amelyhez kötődik, és ott aktiválódik. A maximális aktivitás így csak a véralvadás helyén, azaz a feloldandó fibrinháló jelenlétében jön létre, és így a vérzékenység veszélye nem áll fenn.

A t-PA-t főleg intravaszkuláris infúzió formájában alkalmazzák, így a t-PA-t parenterális oldattá kell formálni. Általában kívánatos, hogy a parenterális oldatok a hatóanyagot nagy koncentrációban tartalmazzák. Ennek oka az, hogy az ilyen oldatból bármely adott helyzetben további oldószer vagy közeg hozzáadásával egyszerűen hígítással elkészítheti az orvos vagy az állatorvos a kívánt koncentrációjú oldatot. Másrészt nem tanácsos szív- vagy vese-betegségben szenvedő betegnek nagy oldat-térfogatokat adagolni, mivel ezzel a szívet vagy vesét még nagyobb igénybevételnek tennék ki. Ezért a koncentreáltabb oldatok alkalmazásával az infúziós oldat térfogatát a lehető legkisebbre kell csökkenteni. Ugyanakkor a parenterális oldatnak stabilnak is kell lennie, vagyis

a hatóanyagoknak nem szabad kicsapódni az oldatból sem raktározás közben, se a hígítási művelet során.

A t-PA-t hatóanyagként tartalmazó parenterális oldatok általában az A-41.766., A-93.619., A-112.122., A-113.319., A-123.304. számú európai szabadalmi leírások, továbbá az 65-6936 és 56-163145. számú, 57-120523., illetve 58-65218. számon közrebocsátott japán szabadalmi leírások ismertetik. A fenti készítmények a t-PA vizes sóoldattal készült oldatait, amelyek pH-ja közel semleges, és hátrányuk, hogy a t-PA oldhatósága ilyen körülmények között alacsony, ion-erősséget növelő anyagok távollétében. Ennek következtében a fenti ismert készítmények vagy alacsony koncentrációban tartalmazzák a t-PA-t, ezért bizonyos esetekben nagy térfogatban kell azokat adagolni a betegnek, vagy hipertóniások, ami a vörös-vértestekre káros lehet az alkalmazáskor.

Találmányunk azon a felismerésen alapul, hogy a t-PA oldhatósága vizes parenterális oldatban növelhető, ha az oldat pH-ja a savas tartományba esik, és hogy alkalmazáskor az oldat savassága nem okoz jelentős fiziológiai problémákat. Ennek megfelelően a találmány szerinti eljárással előállított vizes parenterális t-PA-oldat pH-ja 2 és 5 közötti pH-tartományban van.

A találmány szerinti eljárással előállított parenterális oldatban a t-PA fokozott oldékonysága következtében a t-PA nagy koncentrációban van jelen, annak veszélye nélkül, hogy a t-PA az oldatból kicsapódna. Ezenkívül azt tapasztaltuk, hogy a találmány szerinti eljárással előállított, a t-PA-t nagy koncentrációban tartalmazó oldatot semleges vagy savas pH-jú vízzel is hígíthatjuk, ha a t-PA koncentrációját csökkenteni kívánjuk anélkül, hogy azzal a t-PA kicsapódását idéznénk elő. A találmány szerinti eljárással előállított parenterális oldat tehát stabil, amely az orvosok vagy állatorvosok számára könnyebben kezelhető, mint az ismert készítmények.

A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítményben a t-PA bármely, lényegében emlős, különösen humán t-PA-nak megfelelő biológiailag aktív proteint lehet, akár glükozilált, akár glükozilálatlan formában. Lehet egy- vagy kétláncú t-PA, vagy ezek elegye, amint azt az A-112.122. számú európai szabadalmi leírásban ismertettük, és teljesen glükozilált humán t-PA esetén látszólagos móltömege poli(akril-amid) gélen 70.000, és izoelektromos pontja 7,5–8,0. A t-PA specifikus aktivitása közel előnyös 500.000 NE/mg [NE, azaz nemzetközi egység, amelyet a WHO National Institute for Biological Standards and Control (Holly Hill, Hampstead, London, NW3 6RB, Nagy-Britannia) definiált].

A t-PA aminosav-szekvenciája lényegében az 1. ábra szerinti szekvenciának felel meg, azaz vagy az 1. ábra szerinti, vagy egy vagy több allél-eredetű vagy egyéb aminosav-kiesést, -szubsztitúciót, -beillesztést, -inverziót vagy -addíciót tartalmaz oly módon, hogy a kapott szekvencia legalább 80%-ban, előnyösen 90%-ban homológ az 1. ábra szerinti szekvenciával, és lényegében megtartja a proteint biológiai és immunológiai tulajdonságait. Közelebbről, a t-PA szekvenciája azonos az 1. ábrán látható szekvenciával, vagy attól annyiban tér el, hogy az N-terminális szerintől a 245. aminosav metionin helyett valin, melletti adott esetben a szekvenciából az első három aminosav bármelyike hiányozhat, vagy az N-termi-

nálison egy Gly-Ala-Arg többlet-szekvenciát is tartalmazhat a peptid.

Az 1. ábra szerinti polipeptidben 35 cisztein-maradék van, így 17 diszulfid-híd kialakítására van lehetőség. Más, részletesen felderített szerkezetű proteinek analógiájára alapozva a diszulfid-kötés kialakulásából kiindulva a 90-es helyzetű aminosav és a C-terminális prolin közötti szekvencia feltételezett szerkezete a 2. ábra szerinti. Az N-terminális rész szerkezete kevésbé világos, noha már arról is ismertettek néhány elképzelést [Progress in Fibrinolysis, 6, 269–273 (1983); és Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 5355–5359 (1984)]. A t-PA szerkezetének legfontosabb jellemzője az a két „kringle régió” (a 92. és a 173. aminosav, és a 180. és 261. aminosavak között), amely a protein fibrinhez kötődéséért felelős, és a szerin-proteáz régió, amely a B-lánc legnagyobb részét magában foglalja, és amely a plazminogén aktiválásért felelős. A szerin-proteázokban különleges fontosságú aminosavak a His/Asp/Ser katalitikus triád, amelyek a t-PA-ban a 322., 371. és 463. helyzetben fordulnak elő. A 264. és 395. cisztein aminosav-maradékok közötti diszulfid-híd is fontos, mert ez tartja össze a t-PA A- és B-láncát, a t-PA kétláncú formájában.

Az 1. és 2. ábrán az aminosav-maradékok jelölésére a szokásos egy, illetve hárombetűs kódokat használjuk, az alábbiak szerint:

Asp	D	aszparaginsav	Cys	C	cisztein
Thr	T	treonin	Val	V	valin
Ser	S	szerin	Met	M	metionin
Glu	E	glutamin	Ile	I	izoleucin
Pro	P	prolin	Tyr	Y	tirozin
Gly	G	glicin	Phe	F	fenilalanin
Ala	A	alanin	His	H	hisztidin
Lys	K	lizin	Trp	W	triptofán
Leu	L	leucin	Gln	Q	glutamin
Arg	R	arginin	-Asn	N	aszparagin

A t-PA-t az ismert eljárások bármelyikével előállíthatjuk, például kinyerhetjük normál vagy rákos sejtenyészetekből [Biochim et Biophys. Acta 580, 140–153 (1979); A–41.766., vagy A–113.319. számú európai szabadalmi leírások]. A t-PA-t előnyösen rekombináns DNS-technika alkalmazásával nyert transzformált vagy transzfektált sejtvonal tenyésztéséből állítjuk elő, például az A–93.619., A–117.059. vagy A–117.060. számú európai szabadalmi leírásokban ismertetett módon. Különösen előnyös, ha a t-PA termelésére kínai hörcsög ovárium (CHO) sejteket használunk, amelyet a [Molecular and Cellular Biology 5(7), 1750–1759 (1985)] szerint állítunk elő. Ekkor a klónozott gént a dihidrofolát-reduktázi kódoló génnel (dhfr) kontranszfektálva visszük a dhfr CHO sejtekbe. A dhfr-t expresszáló transzformált sejteket nukleozidoktól mentes táptalajon szelektáljuk, és növekvő koncentrációjú metotrexáttal kezeljük. A dhfr és t-PA gének így egyesülnek és olyan stabil sejtvonalat eredményeznek, amelynek t-PA termelő képessége igen magas.

A t-PA-t előnyösen ismert módon tisztítjuk [például Biochim. et Biophys. Acta 580, 140–153 (1979); J. Biol. Chem. 254(6), 1998–2003 (1979); J. Biol. Chem. 256(13), 7035–7041 (1981); Eur. J. Biochem. 132 681–686 (1983); A–41.766., A–113.319. számú európai vagy A–2.122.219. számú nagy-britanniai szabadalmi leírások].

Úgy tűnik, hogy a t-PA oldékonyságának nincs felső határa a parenterális oldatban. Igen nagy koncentrációkban — 150.000.000 NE/ml-nél magasabb koncentrációban — az oldat csak viszkózussá válik, anélkül, hogy a t-PA jelentős mértékben kicsapódna. A t-PA koncentrációját a parenterális oldatban így széles határok között változtathatjuk, például az 50.000–50.000.000 NE/ml lehet. A találmány szerinti eljárás előnyének maximális kihasználására a t-PA koncentrációját 100.000 NE/ml-nél nagyobbra, közelebből 500.000 NE/ml-nél nagyobbra, legelőnyösebben 1.000.000 NE/ml-nél nagyobbra választjuk. A legelőnyösebb, ha a t-PA koncentrációja közel 5.000.000 NE/ml.

A parenterális oldat pH-értékének felső határa előnyösen 4,5. Az oldat pH-ja előnyösen 2,5–4,0, még előnyösebben 2,8–3,5, legelőnyösebben 3,0. A parenterális oldat kívánt pH-értéket célszerűen fiziológiailag elfogadható szervesen vagy szerves savakkal — például hidrogén-kloriddal, kénsavval, salétromsavval; illetve citromsavval, borkéssavval vagy benzolszulfonsavval — állítjuk be. A fenti savak közül előnyösen hidrogén-kloridot használunk.

Noha az oldatban bizonyos fiziológiailag elfogadható társ-oldószerek is jelen lehetnek, a parenterális oldat közege előnyösen teljes egészében vagy lényegében víz.

A parenterális oldat a beteg vérszérumával hipertóniás, hipotóniás vagy izotóniás lehet. A nemkívánatos mellékhatások elkerülésére az oldat előnyösen izotóniás, noha kis eltéréseknek nincs nagy fiziológiai jelentőségük. Lényegében izotóniás parenterális oldatot egy olyan fiziológiailag elfogadható anyag bevitelével állíthatunk elő, amely képes az oldat tonicitását a kívánt szintre növelni. A fenti anyag ismert módon például dextróz (vízmentes vagy monohidrát formában), nátrium-klorid, vagy ezek elegye lehet. Az anyag koncentrációja a parenterális oldatban természetesen az alkalmazott anyag minőségétől függően változik. Nátrium-klorid esetén a koncentráció előnyösen 7–10 mg/ml, legelőnyösebben 8,5 mg/l, ez utóbbi koncentrációt gyakran a fiziológiai sóoldat koncentrációjának is nevezik. Vízmentes dextróz esetén a koncentráció előnyösen 30–70 mg/ml, legelőnyösebben 50 mg/ml. Abban az esetben, ha a t-PA koncentrációját a lényegében izotóniás parenterális oldatban csökkenteni kell, a hígítást ugyanazon anyag ugyanazon koncentrációjú vizes oldatával végezzük előnyösen, így az oldat izotóniás marad.

A parenterális oldat a fenti típusú gyógyszerkészítményekben szokásosan alkalmazott adalékanyagokat is tartalmazhat, példaként a humán szérumbalbumint említhetjük. Ezenkívül, mivel a t-PA hajlamos üveg- és műanyagfelületekhez adszorbeálódni, az adszorpció csökkentésére vagy elkerülésére a parenterális oldat célszerűen felületaktív szert is tartalmazhat. Felületaktív szerként például a szorbit-anhidrid részleges zsírsav-észtereinek poli(oxi-etilén)-származékait használhatjuk, például a Tween 80 néven kereskedelmi forgalomban lévő anyagot.

A t-PA lényegesen megnövekedett oldékonyságán kívül a találmány meglepő előnye, hogy a fent megadott pH-értékek közé eső, savas parenterális oldat használata nem okoz semmiféle káros fiziológiai hatást a betegben. Úgy tűnik, hogy a véráram általában

képes az oldat pH-ját semlegesre növelni, szinte azonnal, ahogy azzal érintkeznek, mivel a t-PA gyorsan eloszlik a véráramban. Előnyös, ha ezt a folyamatot semmi nem gátolja, így a parenterális oldat nem tartalmaz erős pufferanyagot. Gyenge pufferoló hatású anyag — amely ezt a folyamatot nem gátolja jelentősen — lehet a készítményben, valójában savas pH-n a t-PA maga fejt ki gyenge pufferhatást. Ezenkívül a humán szérum-albumin is képes gyenge pufferhatás kifejtésére.

Mivel a t-PA oldékonysága a találmány szerinti eljárással előállított parenterális oldatban igen nagy, nincs szükség egyéb anyagokkal — például lizinnel, ornitinnel, vagy ezek sóival — növelni a t-PA oldhatóságát.

A parenterális oldatot a gyógyszerkészítésben szokásosan használt formálási eljárásokkal állíthatjuk elő, a t-PA-t tisztított oldata formájában vagy szilárd anyagnaként használva. A találmány szerinti eljárással a t-PA-t hatóanyagként tartalmazó vizes parenterális oldatot úgy állítjuk elő, hogy

(a) az ismert módon előállított t-PA-ból ismert módon készített tisztított oldat közegét pH 2–5 értékű vizes közegre cseréljük; vagy

(b) a t-PA-t 2–5 pH-jú vizes közegben oldjuk, majd a kapott oldatot sterilizáljuk.

Vizes közegként előnyösen egy fiziológiásan elfogadható szervesen só — például nátrium-klorid — vizes oldatát használjuk.

A t-PA tisztítását a protein kromatográfiás oszlopról való eluálásának utolsó fázisaként hajthatjuk végre, amikor a proteint erős puffert tartalmazó oldat formájában kapjuk. Mint említettük, a parenterális oldat előnyösen nem tartalmaz erős pufferanyagot, ezért azt célszerűen dialízissel távolítjuk el, miközben a közegét is kicseréljük. A dialízist dializáló csőben vagy mesterséges vesében hajthatjuk végre, amelyben a tisztított oldatot 2–5 pH-jú vizes közeggel szemben dializáljuk. Célszerűen úgy járunk el — különösen akkor, ha a t-PA koncentrációja a tisztított oldatban magas —, hogy először az oldat pH-ját állítjuk 2–5 értékre. Az erős puffer eltávolításának másik módja a közeg egyidejű kicserélésével az, hogy a tisztított oldatot gélszűrőnek vetjük alá, és az oszlopot 2–5 pH-jú vizes közeggel eluáljuk.

A tisztított oldatból úgy állíthatunk elő szilárd formájú t-PA-t, hogy a tisztított oldat pH-ját közel 5,5-re állítjuk, az oldatot fagyáspontja körüli hőmérsékletre hűtjük, és a kicsapódott proteint — például centrifugálással — kinyerjük. A kicsapódott szilárd anyagot ezután a szokásos módon feloldhatjuk egy 2–5 pH-jú vizes közegben.

A kapott oldatot ismert módon — például szűréssel — sterilizálhatjuk.

A parenterális oldatot rendszerint leforrasztott, steril műanyag vagy üveg tartóban szereljük ki. A parenterális oldatból egység-dózis formákat — például ampullákat, csöveket vagy egyszer felhasználásra szánt injekciós eszközöket —, vagy többszöri dózist tartalmazó formákat — például infúziós tartályokat vagy üvegeket — is készíthetünk. A fenti tartókban az oldat térfogata tág határok között változtatható, előnyösen 0,5 és 20 ml között lehet.

A t-PA stabilizálására a parenterális oldatot előnyösen megfagyaszthatjuk és –10 és –30°C közötti hő-

mérsékleten tároljuk.

A t-PA-t — a vérrögök fibrinhálóját oldó biológiai aktivitása következtében — trombozisos betegségek kezelésére használhatjuk [The Lancet, 1981. november 7., 1018–1020; ugyanitt 1985. április 13., 842–847; The New England Journal of Medicine, 310(10), 609–613 (1984); és ugyanitt, 312(14) 932–936 (1985)]. A találmány szerinti eljárással előállított gyógyszerkészítményt tehát emlősök trombozisos betegségeinek kezelésére használhatjuk oly módon, hogy a kezelendő alanyban a t-PA-t tartalmazó vizes parenterális oldatot adjuk.

A trombozisos betegség például szív-infarktus, mélyvénás trombozisz, tüdő-embólia vagy gutatítés lehet.

A találmány szerinti eljárással előállított parenterális oldatot intravaszkulárisan, különösen intravénásan adagolhatjuk, infúzió formájában, de bármely más módszert — például intramuszkuláris adagolást — is alkalmazhatunk. Az intravaszkuláris infúziót általában infúziós fecskendőben elhelyezett oldattal hajtuk végre. Az infúziós tartályból vagy üvegből a gravitáció révén vagy infúziós szivattyú alkalmazásával juttathatjuk az oldatot a betegbe. Mivel a gravitáción alapuló adagolás nem teszi lehetővé az adagolás szabályozását, ezért a parenterális oldatot előnyösen infúziós szivattyú segítségével juttatjuk a betegbe, különösen akkor, ha az oldatban a t-PA koncentrációja viszonylag magas. Még előnyösebb az elektromosan működtetett infúziós fecskendő használata, amivel az adagolási sebesség még jobban szabályozható.

A t-PA hatásos mennyisége emlősök trombozisos betegségeinek kezelésére természetesen számos tényezőtől függ, például a kezelendő alany korától és tömegétől, a kezelendő betegség tüneteitől és annak súlyosságától, a kezelés módjától, és azt végső soron a kezelő orvos határozza meg. Általában azonban például szívkoszorúér-trombus feloldására a dózis 150.000 és 450.000 NE/kg testtömeg/óra között lehet. Így 70 kg-os felnőtt esetén a hatásos mennyiség óránként általában 1.000.000–3.000.000 NE, közelebbre 2000.000 NE, és ez a mennyiség primer dózissal vagy anélkül adagolható. A dózis valószínűleg kisebb bizonyos trombozisos állapotok — például mélyvénás trombozisz vagy heveny gutatítás — esetén, vagy abban az esetben, ha egy már újra átjárható koszorúérben kell ezt az állapotot fenntartani. Ilyen esetekben a hatásos mennyiség általában 7000–36000 NE/kg testtömeg/óra.

A találmányt közelebbre — a korlátozás szándéka nélkül — az alábbi példák segítségével kívánjuk ismertetni. Az „ismert módon előállított kifejezés a jelen találmány elsőbbségi napja előtt publikált eljárásokat öleli fel.

#### 1. példa

Transzformált CHO sejtvonal tenyészetéből — melyet a [Molecular and Cellular Biology, 5(7), 1750–1759 (1985)] irodalmi helyen leírtak szerint állítunk elő — nyert, t-PA-t tartalmazó, derített oldatot kromatográfiásan tisztítunk, és a t-PA-t 0,1 mól/l nátrium-citrátot és 0,01 vegyes% Tween 80-at tartalmazó vizes oldata formájában (pH 5,5) összegyűjtjük. Az oldat pH-ját sósavval 3,0-ra állítjuk, és a kapott

olatot H-10 Cartridge (Amicon Ltd., Upper Mill, Stonehouse, Gloucestershire, Anglia) betétet használva ultraszűrővel koncentrálnak. Így módon koncentrált, tisztított vizes t-PA oldatot kapunk (2.500.000 NE/ml), amely 0,1 mó/l nátrium-citrátot, a sósav hozzáadásából származó 0,23 mó/l nátrium-kloridot és 0,01 vegyes% Tween 80-at tartalmaz, az oldat pH-ja 3,0. A kapott oldatot kb. 14.000 móltömeg át-eresztőképességű dializáló csőben dializáljuk, a 4 °C-on, négyszer 50 ml szűrővel sterilizált, 0,01 vegyes% Tween 80-at tartalmazó fiziológiás sóoldattal (0,85 vegyes%-os nátrium-klorid-oldat) szemben, amelynek pH-ját tömény sósavoldattal 3,0-ra állítjuk. Minden egyes dialízis-lépést 12 órán át folytatunk. A vizes oldatot a dializáló tömlőből kivéve szűrővel sterilizáljuk, majd fiziológiás sóoldattal 500.000 NE/ml t-PA-koncentrációra hígítjuk. A kapott paren-terális oldatot ezután üvegcsövekbe töltjük, lefor-rasztjuk, és -20 °C-on fagyaszttva tároljuk.

### 2. példa

Transzformált CHO sejt vonal tenyészetéből — amelyet a [Molecular and Cellular Biology, 5(7), 1750-1759 (1985)] irodalmi helyen leírtak szerint állítunk elő — nyert, t-PA-t tartalmazó derített oldatot kromatográfiásan tisztítunk, és a t-PA-t 0,17 mó/l nátrium-citrátot és 0,01 vegyes% Tween 80-at tartalmazó vizes oldat formájában (pH 5,5) összegyűjtjük. Az oldat pH-ját sósavoldattal 3,0-ra állítjuk, és a kapott oldatot H-10 Cartridge (Amicon Ltd., Anglia) betétet használva ultraszűrővel koncentrálnak. A koncentrált oldatot géliszűrő-oszlopra víve (Sephadex G-150, Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Svédország) tovább tisztítjuk, az elválaszt 0,01 vegyes% Tween 80-at tartalmazó 0,85 vegyes%-os nátrium-klorid-oldattal (pH 3,0) végezzük. A t-PA nagy tisztaságú vizes oldatát egyszeri használatra szánt műve-sével dializálva újra koncentrálnak. Az oldat pH-ját nátrium-hidroxid-oldattal 5,5-re állítva kicsapjuk a t-PA-t, és a szuszpenziót 2 órán keresztül 4 °C-on tartjuk. A szuszpenziót 4000 g-vel 30 percen át centrifugáljuk 4 °C-on. A centrifugálással kiüleptített t-PA-t 0,01 vegyes% Tween 80-at tartalmazó 0,85 vegyes%-os vizes nátrium-klorid-oldatban újra oldjuk, és pH-ját sósavval 3,0-ra állítjuk. A sóoldat térfogatát úgy választjuk meg, hogy a t-PA koncentrációja 7.500.000 és 10.000.000 NE/ml közötti legyen. A kapott t-PA-oldatot 0,01 vegyes% Tween 80-at tartalmazó 0,85 vegyes%-os nátrium-klorid-oldattal (pH 3,0) és a fenti savas sóoldatban 10 vegyes% mannitot tartalmazó oldattal hígítjuk oly módon, hogy a t-PA végkoncentrációja 5.000 NE/ml, a mannit 25 mg/ml legyen. A kapott oldatot sterilre szűrjük és 1 ml-enként csövekbe töltjük, a csöveket -20 °C-on fagyaszttva tároljuk.

### 3. példa

Az 1. példa szerint előállított paren-terális oldat trombolitikus hatását in vivo nyaki véna trombózis modellen határozzuk meg.

A vizsgálatot lényegében Collen és munkatársai [J. Clin. Invest. 71, 368-376 (1983)] módszere szerint végezzük.

Az 1f. példa szerint előállított paren-terális oldatot hagyjuk felolvadni, majd 0,01 vegyes% Tween 80-at

tartalmazó, pH 3,0-ra állított steril izotoniás sóoldat-tal hígítva a t-PA-ból 500.000 NE/ml dózist biztosít-ó, 2 órás infúzióhoz elegendő mennyiségű oldatot állítunk elő. Az infúziót a jobboldali combvénába ad-juk, kanül segítségével, a fenti vizsgálatot három új-zélandi fehér nyúlón végezzük. Az infúzió beadása után kiértékeljük a trombolitikus hatást.

Az 1. példa szerint előállított paren-terális oldat trombolitikus hatását az azzal elérhető 22,3 ± 4,2% trombolízis bizonyítja. Ezen túlmenően, semmiféle káros hatást nem tapasztaltunk a paren-terális oldat in-fúziós adagolása során.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- 15 1. Eljárás hatóanyagként szöveti plazminogén aktívátort tartalmazó stabil, vizes, paren-terális oldat előállítására, *azzal jellemezve*, hogy
  - 20 (a) az ismert módon előállított szöveti plazmino-gén aktívátortól ismert módon készített tisztított oldat közegét pH 2-5 értékű, kívánt esetben egy vagy több ismert adalékanyagot tartalmazó vizes közegre cseréljük; vagy
  - 25 (b) az ismert módon előállított szöveti plazmino-gén aktívátort pH 2-5 értékű, kívánt esetben egy vagy több ismert adalékanyagot tartalmazó vizes közegben oldjuk; majd a kapott oldatot sterilizáljuk. (Elsőbbsége: 1985.08.31.)
- 30 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemez-ve*, hogy szöveti plazminogén aktívátorként vagy egyláncú, vagy kétláncú formában lévő szöveti plaz-minogén aktívátort használunk. (Elsőbbsége: 1985.08.31.)
- 35 3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan szöveti plazminogén aktívátort használunk, amelynek aminosav-szekvenciája az 1. ábra szerinti, vagy attól annyiban tér el, hogy az N-terminális szerintől a 245. aminosav metionin helyett valin, vagy úgy, hogy a szekvenciából az első három aminosav bármelyike is hiányzik, vagy úgy, hogy az N-terminálison egy Gly-Ala-Arg többlet-szekvenciát is tartalmaz adott esetben. (Elsőbbsége: 1985.08.31.)
- 40 4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljá-rás, *azzal jellemezve*, hogy szöveti plazminogén akti-vátorként rekombináns DNS-technikával nyert transzformált vagy transzfektált sejt vonal tenyészté-sével előállított szöveti plazminogén aktívátort hasz-nálunk. (Elsőbbsége: 1985.08.31.)
- 50 5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljá-rás, *azzal jellemezve*, hogy a szöveti plazminogén akti-vátor koncentrációját 100.000 NE/ml-nél nagyobb-ra állítjuk be. (Elsőbbsége: 1985.08.31.)
- 55 6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemez-ve*, hogy a szöveti plazminogén aktívátor koncentrá-cióját 500.000 NE/ml-nél nagyobbra állítjuk be. (Elsőbbsége: 1985.08.31.)
- 60 7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szöveti plazminogén aktívátor koncentráció-ját 1.000.000 NE/ml-nél nagyobbra állítjuk be. (Elsőbbsége: 1985.08.31.)
- 65 8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szöveti plazminogén aktívátor koncentráció-

ját 5.000.000 NE/ml-nél nagyobbra állítjuk be.  
(Elsőbbsége: 1985.08.31.)

9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pH 2 és 4,5 közötti értékű vizes közeget használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.08.31.)

10. Az 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pH 2,4 és 4,0 közötti értékű vizes közeget használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.08.31.)

11. Az 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pH 2,8 és 3,5 közötti értékű vizes közeget használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.08.31.)

12. Az 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pH 3,0 értékű vizes közeget használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.08.31.)

13. Az 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nem pufferolt vizes közeget használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.08.31.)

14. Az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vizes közeghez adalékanyagként olyan fiziológiailag elfogadható anyagot is adunk, amely az oldatot a humán vérszérummal izotóniássá teszi.  
(Elsőbbsége: 1985.08.31.)

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy adalékanyagként nátrium-kloridot használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.08.31.)

16. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy adalékanyagként dextrózt használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.08.31.)

17. Az 1–16. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vizes közeghez adalékanyagként egy felületaktív szert is adunk.  
(Elsőbbsége: 1985.08.31.)

18. Eljárás hatóanyagként szöveti plazminogén aktivátort tartalmazó stabil, vizes, parenterális oldat előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(a) az ismert módon előállított szöveti plazminogén aktivátorból ismert módon készített tisztított oldat közegét fiziológiásan elfogadható szervesen só, kivánt esetben egy vagy több ismert adalékanyagot tartalmazó, pH 2–5 értékű vizes oldatára cseréljük, vagy

(b) az ismert módon előállított szöveti plazminogén aktivátort fiziológiásan elfogadható szervesen só, kivánt esetben egy vagy több ismert adalékanyagot tartalmazó, pH 2–5 értékű oldatában oldjuk; majd a kapott oldatot sterilizáljuk.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szöveti plazminogén aktivátorként vagy egyláncú vagy kétláncú formában lévő szöveti plazminogén aktivátort használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

20. A 18. vagy 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan szöveti plazminogén aktivátort használunk, amelynek aminosav-szekvenciája az 1. ábra szerinti, vagy attól annyiban tér el, hogy az N-terminális szerintől a 245. aminosav metionin helyett valin, vagy úgy, hogy a szekvenciából az első három aminosav bármelyike is hiányzik, vagy úgy, hogy az N-terminálison egy Gly-Ala-Arg többlet-szekvenciát is tartalmaz adott esetben.

(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

21. A 18–20. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szöveti plazminogén aktivátorként rekombináns DNS-technikával nyert transzformált vagy transzfektált sejtvonal tenyésztésével előállított szöveti plazminogén aktivátort használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

22. A 18–21. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szöveti plazminogén aktivátor koncentrációját 100.000 NE/ml-nél nagyobbra állítjuk be.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szöveti plazminogén aktivátor koncentrációját 500.000 NE/ml-nél nagyobbra állítjuk be.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

24. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szöveti plazminogén aktivátor koncentrációját 1.000.000 NE/ml-nél nagyobbra állítjuk be.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szöveti plazminogén aktivátor koncentrációját 5.000.000 NE/ml-nél nagyobbra állítjuk be.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

26. A 18–25. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pH 2 és 4,5 közötti értékű vizes sóoldatot használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

27. A 26. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pH 2,4 és 4,0 közötti értékű vizes sóoldatot használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

28. A 27. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pH 2,8 és 3,5 közötti értékű vizes sóoldatot használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

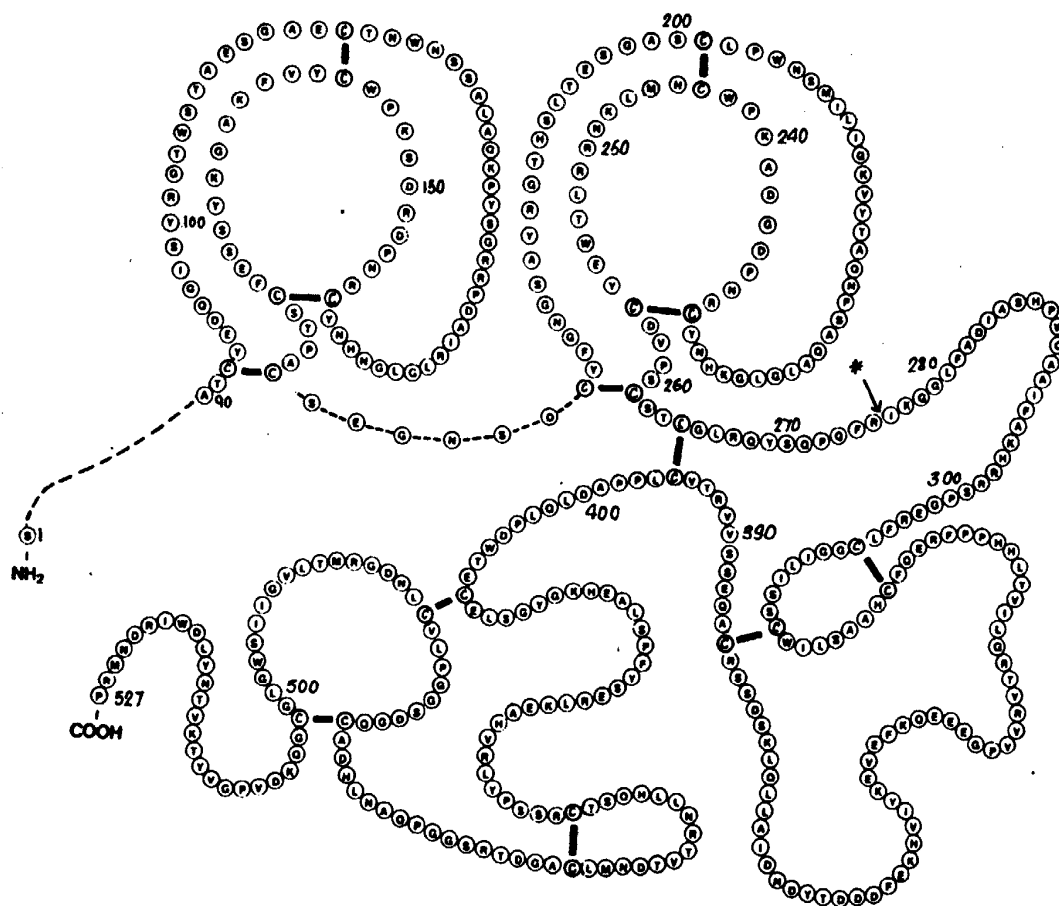
29. A 28. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy pH 3,0 értékű vizes sóoldatot használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

30. A 18–29. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy nem pufferolt vizes sóoldatot használunk.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

31. A 18–30. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vizes sóoldathoz adalékanyagként egy felületaktív szert is adunk.  
(Elsőbbsége: 1985.05.28.)

Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser  
1  
Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly  
Arg Ala Gln Cys His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn  
50  
Gly Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu  
Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr Glu Asp Gln  
Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp  
100  
Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg  
Leu Gly Leu Gly Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp  
150  
Cys Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys  
Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg Gly Thr His  
Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys  
200  
Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr  
Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Met Leu Lys Asn Arg Arg  
250  
Leu Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr  
Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp  
Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly  
300  
Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe  
Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu  
Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr  
350  
Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln  
Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp  
400  
Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr  
Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser  
Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg  
450  
Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu  
500  
Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp  
Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro  
527

1. abra



\* Hasítási hely az egyláncú t-PA-ban

## 2. ábra

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest  
Felelős kiadó: Szvoboda D. Gabriella

UNITAS-KÓDEX