

**ELJÁRÁS POLI(ALKILÉN-OXID)-DAL MÓDOSÍTOTT FEHÉRJÉK ÉS
POLIPEPTIDEK CIKLODEXTRINNEL ALKOTOTT, LIOZILIFÁLT
KOMPLEXEI ~~ÉS ELJÁRÁS LEK-ELŐÁLLÍTÁSÁRA~~**

Sterling Winthrop Inc., New York, NY

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1994. 02. 25.

Elsőbbsége: 1993. 02. 25. (023 182)(US)

KIVONAT

A találmány tárgya liofilizált (liofilizálható), vizes, fiziológiailag hatásos, fehérje jellegű készítmény, amely körülbelül 150 - 150000 egység/ml kovalensen kapcsolt, csekély-diol jellegű poli(alkilén-oxid)-ot és fehérjét, előnyösen polietilén-glikollal kapcsolt fehérjét; körülbelül 0,1 - 20 tömeg/térf.% ciklodextrint, előnyösen β -ciklodextrint; valamint körülbelül 0,01 - 50 mM puffert tartalmaz, amelynek pH-értéke körülbelül 5,7 - 6,5. A találmány továbbá a készítmény előállítására is vonatkozik, ~~ami a következő lépésekből áll.~~

a) 10 tömeg%-nál kevesebb nem-monoalkoxilezett poli(alkilén-oxid)-ot tartalmazó poli(alkilén-oxid)-ot karboxileznek;

b) a karboxilezett poli(alkilén-oxid)-ot aktiválva aktív poli(alkilén-oxid)-észtert állítanak elő;

c) az így kapott, aktív poli(alkilén-oxid)-észtert kovalensen ~~kapcsolják a biológiailag hatásos fehérjéhez;~~

jel. ábrák hiányában

Gwald

~~d) az így kapott, poli(alkilén-oxid)-észtert a biológiailag hatásos fehérjével kovalensen kapcsolva víztartalmú közegben szolubilizálják;~~

e) az így létrehozott vizes közegen ciklodextrint oldva homogén oldatot képeznek;

f) az így kapott oldat pH-értékét körülbelül 5,7 és körülbelül 6,5 közötti értékre állítják; és

g) az oldatot liofilizálják.

A találmány előnye az eddig ismert megoldásokhoz képest abban áll, hogy a β -ciklodextrin a módosított fehérjét (hatóanyagot) szerkezeti üregeiben bezárja (betokolja), s így a liofilizáláskor a nagy molekulasúlyú aggregátumok kialakulását csökkenti. A készítmény további előnye, hogy stabilitása az eddigi készítményeknél nagyobb, s így a készítmény szobahőmérsékleten hosszabb ideig tárolható. A liofilizált termék akár közönséges üvegfolyóban, akár előre töltött injekciós tűben tárolható, és felhasználás előtt közvetlenül rekonstituálható. Ennek következtében a készítmény klinikai és szükséghelyzeti körülmények között egyaránt igen jól használható.

*nagy ciklikus
szolubilizáció*

A

4007

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és

Védjegy Iroda Kft.

~~Budapest~~

5 5 6 1 / 9 5

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

ELTÁRS
POLI(ALKILÉN-OXID)-DAL MÓDOSÍTOTT FEHÉRJÉK ÉS
POLIPEPTIDEK CIKLODEXTRINNEL ALKOTOTT, LIOFILIZÁLT
KOMPLEXEI ~~ÉS ELJÁRÁS EZEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA~~

Sterling Winthrop Inc., New York, NY

Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók:

PHILLIPS, Christopher P.,

Doylestown, PA

SNOW, Robert A.,

West Chester, PA

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja:

1994. 02. 25.

Elsőbbsége:

1993. 02. 25. (023 182) (US)

79024-6458-SZÓ/KmO



A találmány „csekély-diol” típusú poli(alkilén-oxid)-dal kapcsolt, fiziológiailag hatásos fehérjék és polipeptidek, valamint krioprotektív (liofilizálás során védő hatású) ciklodextrin kombinációját (komplexét) tartalmazó, parenterális adagolásra alkalmas, vizes oldatok liofilizátumára vonatkozik.

Közelebbről a találmány csekély-diol jellegű polietilénglikollal kapcsolt szuperoxid-diszmutáz és krioprotektív ciklodextrin kombinációjának (komplexének) parenterális adagolásra alkalmas, vizes oldatai liofilizátumaira vonatkozik.

A biológiailag hatásos fehérjéket, különösen az enzimeket és a peptid-hormonokat régóta ideális gyógyszerhatóanyagoknak tekintik különböző betegségek kezelésére, mivel specifikusak és katalitikus hatásuk gyors. Ilyen enzimek például a következők:

Oxido-reduktázok, például: az urát, oxigén-oxidoreduktáz
(1.7.3.3 katalógusszámú; „urikáz”);

Hidrogén-peroxid: hidrogén-peroxid-oxidoreduktáz
(1.11.1.6.; „kataláz”);

Koleszterin, redukált-NADP: oxigén-oxidoreduktáz (20- β -hidroxilező) (1.14.1.9; „koleszterin-20-hidroxiláz”).

Transzferázok, például: UDP glükuronát-glükoronil-transzferáz (az akceptor nem specifikus) (2.4.1.17; „UDP glükoronil-transzferáz”);

UDP glükóz: α -D-galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz (2.7.7.12);

Hidrolázok, például: mukopeptid-N-acetil-muramil-hidroláz (3.2.1.17; lizozim); tripszin (3.4.4.4);

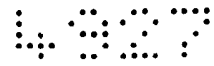


L-aszparagin-aminohidroláz (3.5.1.1.; „aszparagináz”);
Liázok, például: fruktóz-1,6-difoszfát;
D-glicerinaldehid-3-foszfát-liáz (4.1.2.12.; „aldoláz”);
Izomerázok, például: a D-xilóz-ketol-izomeráz (5.3.1.5.;
xilóz-izomeráz); és a
Ligázok, például: L-citrullin: L-aszparaginát-ligáz (AMP)
(6.3.4.5.).

A peptidhormonok például a következők:

Inzulin, ACTH, glukagon, somatosztatin, szomatotropin, timozin, paratiroid hormon; pigmenthormonok, szomatomedin, eritropoietin, luteinizáló hormon, korion-gonadotropin, a hipotalamusz felszabadító faktorai, antidiuretikus hormonok, tiroid-stimuláló hormon, kalcitonin és a prolaktin.

A fiziológiailag hatásos, fehérje jellegű anyagokkal, különösen a nem emberi eredetű enzimekkel végzett terápia ezeknek az anyagoknak a viszonylag rövid felezési ideje és immunogén jellege (immunogenitása) következtében kevésbé volt sikeres. Az adagolás után a gazdaállat védekező rendszere úgy válaszol, hogy az idegen enzimeket az ellenük ható antitestek termelésének megkezdésével eltávolítja, és ezzel lényegében azok terápiás hatékonyságát csökkenti vagy megszünteti. Idegen és egyébként rövid élettartamú emberi enzimek ismételt adagolása lényegében hatástalan, sőt, a kísérő allergiás válasz következtében veszélyes lehet. E problémák (nehézségek) megoldására különböző próbálkozások történtek, például mikrokapszulázás, liposzómákba foglalás útján, génszészeti úton, valamint enzimeknek polimerekhez kapcsolásával. A legígéretesebb törekvésnek látszik a fehérje jellegű anyagok kapcsolása poli(alkilén-



-oxid) (PAO) polimerekhez, különösen polietilénglikolokhoz (PEG). Az alábbiakban ezeket a próbálkozásokat bemutatjuk.

A 4 179 337 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismerteti fehérjékhez kötött polietilénglikolokhoz vagy polipropilénglikol alkalmazását fiziológiailag hatásos, nem-immunogén, vízoldható polipeptid készítmény előállítására, ahol a polietilénglikol (az alábbiakban esetenként rövidítve: PEG) szerepe a polipeptid védelme az aktivitásának elvesztésétől, lényeges immunogén válasz kiváltása nélkül. E szabadalomban a polietilénglikolnak fehérjéhez kapcsolására leírt módszer abban áll, hogy egy protein aminocsoportját alakítják amiddá vagy pszeudoamiddá - az aminocsoport töltéshordozó kapacitásának elvesztésével - vagy a fehérje aminocsoportján, vagy annak közvetlen szomszédságában egy heteroatomos szubsztituenst - például hidroxilcsoportot vagy gyűrűrendszert - vezetnek be, amely a polimer vázában nem ismétlődik.

F. M. Veronese és munkatársai [J. of Pharmacy and Pharmacology 35, 757-758 (1933)] közölték, hogy ha a szarvasmarha vörösvérsejtjéből származó szuperoxid-diszmutázt polietilénglikol-karbonsav-(N-hidroxi-szukcinimid)-aktív észterrel reagáltatva módosították, akkor az enzim felezési ideje patkányokban meghaladta a nem módosított fehérje felezési idejét.

Az Anjimoto, Inc. cég 0 200 467 publikált európai szabadalmi bejelentésében olyan szuperoxid-diszmutázt ismertet, amelyet a polimer mindkét végén aktivált karboxil kapcsolócsoportokkal funkcionalizált poli(alkil-oxid)-dal kémiaiilag módosítottak, és mindkét aktivált karboxilcsoport proteinekkel (fehérjékkel) reagálni képes. Mivel az aktivált kapcsolóhelyek a

polimer lánc ellentétes végein helyezkednek el, nem valószínű, hogy a polimer egyik végén lévő aktivált csoport jelenléte lényeges hatással van a polimer másik végén lévő csoport reakcióképességére. A polimerek mindkét végükön képesek fehérjével térhálósító reakcióba lépni, aminek során a fehérjéből és a poli(alkilén-oxid)-ből kopolimerek képződnek. Az ilyen kopolimereknek nincsen jól meghatározott vagy molekulárisan (molekuláris alapon) sztöchiometrikus összetétele.

F. M. Veronese és munkatársai [J. of Controlled Release 10, 145-154 (1989)] közlik, hogy a szuperoxid-diszmutáz (a továbbiakban esetenként rövidítve: SOD) monometoxi-polietilén-glikollal (a továbbiakban esetenként: MPEG) végbe-menő származékképzése (derivatizálása) termékek heterogén keverékéhez vezet. Kimutatták, hogy ez a heterogenitás attól függ, hogy milyen mértékben vannak jelen bifunkciós (dimetoxilezett) polietilén-glikol-molekulák (DPEG) a monometoxilezett molekulák között.

A fenti próbálkozások némileg hosszabb felezési idejű és kevésbé immunogén fehérje jellegű, fiziológiailag hatásos anyagokat eredményeztek; úgy látszik azonban, hogy további tökéletesítések szükségesek arra a célra, hogy sokféle betegséget ezekkel az ígéretes biológiai anyagokkal kezelhessünk.

Az egyidejűleg vizsgálat alatt lévő 07/936,416 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben közlik, hogy biológiai határos, fehérje jellegű anyagok felezési ideje meghosszabbítható, és immunogén sajátágaik csökkenthetők úgy, hogy azokat csekély-diol típusú poli(alkilén-oxid)-dal, előnyösen polietilén-glikollal kémiai módon módosítják. Az ismertett

készítményeknek határozott előnyei vannak az előzőleg közölt, polietilénglikollal módosított, fehérje jellegű anyagok készítményeivel szemben.

Folyékony állapotban végzett tárolás során a polietilénglikollal módosított fehérjemolekulák hidrolizálnak, s így szabad polietilénglikol, polietilénglikollal kapcsolt fehérje és szukcinát-fehérje molekulaegységek keveréke képződik. E destabilizáló folyamat megelőzése céljából a készítmények liofilizálhatók. Liofilizálás során azonban a fehérje és a stabilizálószer koncentrációja magas, és ez - az alkalmazott vivőanyagoktól függően - a tárolás során végbemenő, molekulák közötti halmozódás (aggregáció) mértékét károsan befolyásolja.

Azt találtuk, hogy ciklodextrinek a csekély-diol típusú polietilénglikollal kovalensen kapcsolt fehérjék tárolás során bekövetkező intramolekuláris halmozódásának sebességét csökkentik, s így hosszabb tárolási időtartamot tesznek lehetővé.

Ismert, hogy a ciklodextrinek zárványkomplexeket képesek alkotni, és ehhez szolubilizáló sajátságok társulnak. Ismert továbbá, hogy ciklodextrinszármazékok is ilyen sajátságokkal rendelkeznek. Ezek alkalmazását a következő szabadalmak mutatják.

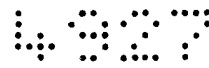
A 4 596 795 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás nemi hormonok adagolására vonatkozik ciklodextrin hidrofil származékaival, így poli(β -ciklodextrin)-nel vagy (hidroxi-propil)- β -ciklodextrinnel alkotott komplexeik alakjában, szublingvális vagy bukkális (szájüregi) úton. Úgy találták, hogy

ezek a komplexek vízben igen jól oldódnak, és más ciklodextrinszármazékokkal összehasonlítva erős hatásúak.

A 4 727 064 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban vízben kevésbé oldható hatóanyag és amorf, vízben oldható, ciklodextrin-alapú keverékből álló gyógyászati készítményeket írnak le. A ciklodextrin-alapú keverék hozzáadása a hatóanyag oldódási sajátságait javítja. A ciklodextrin-alapú keveréket nemszelektív alkilezéssel amorffá alakított α -, β - vagy γ -ciklodextrinből állítják elő.

A WO 90/03784 számmal közzétett PCT/US89/04099 számú nemzetközi bejelentésben olyan liofilizált készítményeket ismeretnek, amelyek egy polipeptidet, valamint β - és γ -ciklodextrin (hidroxi-propil)-, (hidroxi-etil)-, glükózil-, maltozil-, vagy maltotriazolilszármazékainak stabilizáló, szolubilizáló mennyiségét tartalmazzák.

A 4 983 586 számú, amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban módszert közölnek lipofil és/vagy vízzel szemben labilis hatóanyagok az injekció helyén végbemenő kicsapódása csökkentésére a hatóanyag parenterális adagolása során. Ez a módszer abban áll, hogy a hatóanyagot körülbelül 20-50 % (hidroxi-propil)- β -ciklodextrint tartalmazó vizes oldatban adagolják. Közlik e módszer alkalmazását számos hatóanyagra, ilyenek például: a daganatgátlók, szedatívumok (nyugtatók), trankvillánsok, görcsgátlók, depresszió elleni hatóanyagok, altatók, izomrelaxánsok, görcsoldók, gyulladáscsökkentők, antikoagulánsok, kardiotóniás hatású anyagok, értágítók és antiaritmikumok.



Meglepő módon azt találtuk, hogy olyan liofilizált, parenterális adagolásra alkalmas készítmények, amelyek „csekély-diol” típusú poli(alkilén-oxid)-dal kapcsolt, fiziológiailag hatásos fehérjét vagy polipeptidet ciklodextrinnel alkotott komplex alakjában tartalmaznak, hosszabb tárolási idő során a készítményeknek intermolekuláris aggregáció nélküli stabilitást biztosítsanak.

Ennek alapján lehetővé válik csekély-diol típusú poli(alkilén-oxid)-dal (azt alábbiakban röviden: LDPAO), előnyösen csekély dioltartalmú polietilén-glikollal (az alábbiakban röviden: LDPEG) kovalensen kapcsolt, fiziológiailag hatásos fehérjék ciklodextrinnel alkotott komplexeinek átalakítása stabilis, parenterális készítményekké.

A találmány szerint tehát megvalósítható olyan vizes, fiziológiailag hatásos, fehérje jellegű, liofilizálható készítmény, amely

körülbelül 150 és körülbelül 150 000 egység/ml közötti mennyiségben csekély-diol típusú, poli(alkilén-oxid)-dal kovalensen kapcsolt fehérjét,

körülbelül 0,1 és körülbelül 20 tömeg/térf.% közötti mennyiségben ciklodextrint, és

körülbelül 0,01-től körülbelül 50 mM koncentrációban puffert tartalmaz, s amely készítmény pH-értéke körülbelül 5,7 és körülbelül 6,5 között van.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a készítmény körülbelül 25 000 és körülbelül 150 000 egység/ml, legelőnyösebben körülbelül 50 000 és körülbelül 150 000 egység/ml közötti

mennyiségű, (polialkilén-oxid)-dal kapcsolt fehérjét és körülbelül 1,0-tól körülbelül 15 tömeg/térf.%-ig terjedő mennyiségű, legelőnyösebben körülbelül 5 és körülbelül 10 tömeg/térf.% mennyiségű ciklodextrint tartalmaz.

E leírásban a „csekély-diol” típusú kifejezés - a poli(alkilén-oxid), így a polietilén-glikol vonatkozásában olyan lineáris poli(alkilén-oxid)-ot jelent, amely legfeljebb körülbelül 10 % nem-monoalkoxilezett poli(alkilén-oxid)-ot, előnyösen nem-monometoxilezett polietilén-glikolt tartalmaz.

A találmány megvalósítása során alkalmazott előnyös, csekély-diol típusú poli(alkilén-oxid)-ok előnyösen olyan polietilén-glikol-polimerek, amelyek legfeljebb körülbelül 10 tömeg% nem-monometoxilezett polietilén-glikolt tartalmaznak, és átlagos molekulatömegük körülbelül 1000 és körülbelül 15000 dalton között van; ezek különösen alkalmasak biológiailag hatásos fehérjékkel, kiváltképpen szuperoxid-diszmutázzal kovalens kötés kialakítására. A találmány szerint még előnyösebben polietilén-glikolokat alkalmazunk, amelyek átlagos molekulatömege körülbelül 2000 és körülbelül 10 000 dalton közötti, legelőnyösebben körülbelül 4000 és körülbelül 6000 dalton közötti, és ahol a polietilén-glikol előnyösen körülbelül 7 tömeg%-nál, legelőnyösebben körülbelül 5 tömeg%-nál kevesebb nem-monometoxilezett polietilén-glikolt tartalmaz.

A találmány megvalósítása során például a következő biológiailag/fiziológiailag hatásos fehérjéket, polipeptideket és hormonokat alkalmazunk:

Rekombináns emberi interleukin-4 (rhIL4);

Carlsberg-féle szubtilizin proteáz;

szuperoxid-diszmutázok, így a szarvasmarha-, emberi- és különböző rekombináns szuperoxid-diszmutázok, például a rekombináns emberi szuperoxid-diszmutáz (rhuSOD); valamint

Oxidoreduktázok, transzferázok, hidrolázok, liázok, izomerázok és ligázok, például a fentebb felsoroltak, valamint a már fentebb felsorolt peptidhormonokon kívül az alábbiak:

interferonok (α -, β - és γ -); antitestek (IgG, IgE, IgM, IgD); az interleukin-1, -2, -3, -4 és -7; a granulocita-kolónia-stimuláló faktor (GCSF); granulocita-makrofág kolóniát stimuláló faktor (GM-CSF); a daganatnekrózis faktor (TNF); a trombocita-eredetű növekedési faktor (PDGF); az epidermisből eredő növekedési faktor (EGF); idegnövekedési faktor (NGF); csontnövekedési faktor (BGF); a növekedési hormont felszabadító faktor (GNRH); papain; kimotripszin; termolizin; valamint a sztreptokináz és az aktiváz.

A találmány szerint alkalmazott ciklodextrinek 6, 7, illetve 8 glükózegységből álló α -, β - és γ -ciklodextrinek. Ezek ismertek; valamint ismert, hogy képesek zárványkomplexek kialakítására egyes gyógyszerhatóanyagokkal, fehérjékkel és polipeptidekkel, továbbá ezzel együttjáró szolubilizáló sajátságokkal rendelkeznek.

A ciklodextrin belső ürege lipofil, a ciklodextrin külső felülete viszont hidrofil. E sajátságok alapján a ciklodextrineket felhasználták zárványkomplexek kialakítására gyógyszeranyagokkal. A csekély-diol típusú poli(alkilén-oxid) és fehérjék

konjugátumainak stabilizálására a β -ciklodextrin hidroxi-etil-, hidroxi-propil-, glükózil-, maltozil- és maltotriozil-származékai különösen alkalmasak.

A találmány megvalósítása során alkalmazott, gyógyászati szempontból elfogadható vizes vivőanyag nemtoxikus, közömbös (inert) közeg, amelyben a ciklodextrinnek a csekély dioltartalmú poli(alkilén-oxid)-dal konjugált peptiddel alkotott komplexét és gyógyászati szempontból elfogadható puffert - így nátrium-foszfátot, nátrium-acetátot, nátrium-karbonátot - valamint ásványi és szerves savakból eredő pufferokat oldunk. Gyógyászati szempontból elfogadható puffereken azt értjük, hogy a puffer az emlősök organizmusára a pufferanyagok szokásos orvosi adagjaiban viszonylag ártalmatlan, tehát a hatásos komplex kedvező sajátságait a pufferoknak tulajdonítható mellékhatások nem rontják.

A találmány szerinti készítmények előállítási eljárásában először a csekély-diol típusú polialkilénglikolt - ez esetben polietilénglikolt - kovalensen kötjük a biológiailag hatásos fehérjéhez, vázlatosan a következő módon:

- a) LDPEG + karboxilező szer -----→ LDPEG-COOH
- b) LDPEG-COOH + karboxilcsoportot aktiváló szer -----→
az LDPEG-COOH aktív észtere
- c) n(LDPEG-COOH aktív észter) + fehérje -----→ (LDPEG-
-CO)_n-fehérje

- ahol

LDPEG-COOH jelentése: a hidroxilcsoportos helyeken karboxilezett LDPEG; és



n jelentése: az LDPEG fehérjével végbe-
ment kapcsolás helyeinek szá-
ma.

Az LDPEG-et a hidroxilcsoportok helyein karboxilezzük, majd a karboxilcsoportokat karboxil-aktiváló szerrel észterezük, s így aktív észtereket alakítunk ki, amelyeket azután a fehérjemolekulával kapcsolunk. A fehérjéhez kötött LDPEG molekulák száma a proteinmolekulán jelenlévő reakcióképes csoportok - például aminocsoportok - számától függ.

Ezt követően az LDPEG-t gyógyászatilag elfogadható vizes vivőanyagban oldjuk, majd a kívánt ciklodextrint hozzáadjuk és feloldjuk. Ekkor az oldatot liofilizáló berendezésben liofilizáljuk. A liofilizált oldatot a betegnek végzett adagolás előtt steril vízzel helyreállítjuk (rekonstituáljuk).

A találmány egy másik jellemző sajátysága eljárást tesz lehetővé liofilizált, biológiailag hatásos, fehérje jellegű készítmény előállítására, amely a következő lépésekből áll:

a) 10 tömeg%-nál kevesebb nem-monoalkoxilezett poli(alkilén-oxid)-ot tartalmazó poli(alkilén-oxid)-ot karboxilezünk;

b) a karboxilezett poli(alkilén-oxid)-ot aktiválva aktív poli(alkilén-oxid)-észtert állítunk elő;

c) az így kapott, aktív poli(alkilén-oxid)-észtert kovalensen kapcsoljuk a biológiailag hatásos fehérjéhez;

d) az így kapott, poli(alkilén-oxid)-észtert a biológiailag hatásos fehérjével kovalensen kapcsolva víztartalmú közegben szolubilizáljuk;

e) az így létrehozott vizes közegen ciklodextrint oldva homogén oldatot képezünk;

f) az így kapott oldat pH-értékét körülbelül 5,7 és körülbelül 6,5 közötti értékre állítjuk; és

g) az oldatot liofilizáljuk.

A következőkben a találmányt konkrétan a szuperoxid-diszmutázra hivatkozva (egyes esetekben rövidítve: SOD) részletesen ismertetjük.

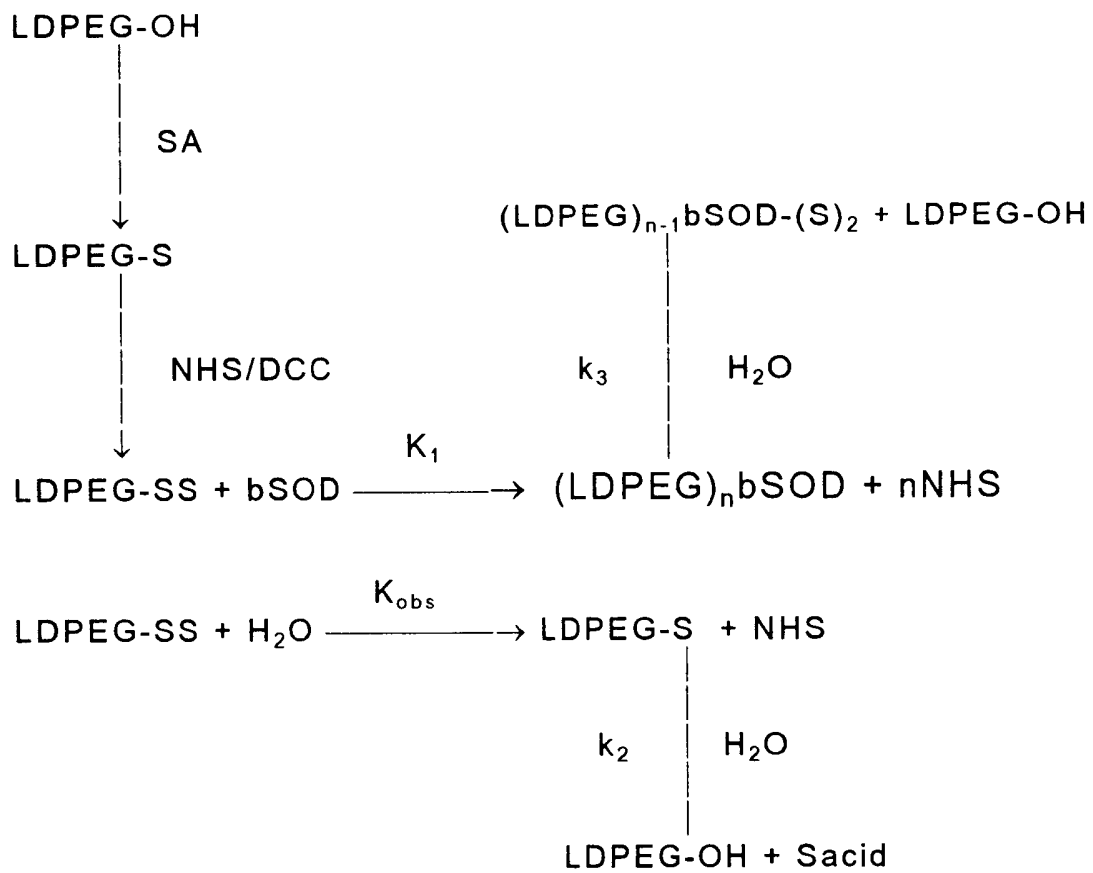
A szuperoxid-diszmutáz sejten belüli (intracelluláris) enzim, amely valamennyi, az oxigént metabolizáló sejtben jelen van, és felelős a szuperoxid gyök oxigénné és hidrogén-peroxiddá végbemenő konverziójáért. A szuperoxid-gyökről és az abból származó egységekről úgy vélik, hogy többféle típusú gyulladási megbetegedés kóroka. A szuperoxid-diszmutázt jelenleg is alkalmazzák egyes gyulladási állapotok kezelésére Orgotein védett néven. Ezen túlmenően vizsgálták a SOD alkalmazását bronchus-tüdőfejlődési rendellenességekben, túlnyomásos oxigén toxicitásában, égési sebek és fertőzések okozta heveny gyulladásban, szervátültetéseket követő reperfüziós károsodásban, szemlencse mögötti rostsövetképződés, valamint gyógyászati célból alkalmazott ionizáló sugárzás mellékhatásai és egyes kóros bőrállapotok eseteiben. Ha azonban a SOD-t egy emlősállatnak intravénás befecskendezéssel adagolják, akkor az enzim felezési ideje csupán néhány perc, majd a keringésből eltűnik. Ennek eredményeként az enzimaktivitás nem elegendő a toxikus anyagok eltávolítására a vérkeringésből. Másrészt az ismételt adagolás káros mellékhatásokkal jár.

Ha az LDPAD-t - amely különböző molekulatömegű poli(alkilén-oxid)-ok láncait és láncként legalább egy hidroxilcsoportot tartalmaz - amilyen például az LDPEG - a SOD-hoz kapcsoljuk, akkor olyan biológiailag hatásos készítményt alakíthatunk ki, amelynek felezési ideje hosszabb és immunogenitása csekélyebb, mint akár a natív SOD vagy a PAO-SOD készítményé. A liofilizálás során az LDPEG nemkivánt halmazokat alkot, amelyek biológiai hatásosságát befolyásolják. Az LDPEG ciklodextrinnel képezett komplexe a halmaz kialakulását kiküszöböli, és a rekonstituált készítményt tartós tárolásra is stabillá teszi.

Az LDPEG SOD-hoz kapcsolódásának eljárása (esetenként a továbbiakban: LDPEG-kapcsolás) az alábbi lépésekből áll:

A kevés diolt tartalmazó metoxi-PEG-t - amelynek átlagos molekulatömege körülbelül 1000 és körülbelül 15 000 közötti, még előnyösebben körülbelül 2000 és körülbelül 10 000 közötti, legelőnyösebben körülbelül 4000 és körülbelül 6000 dalton közötti, és amely legfeljebb körülbelül 10 % nem-monometoxilezett PEG-t tartalmaz - szukcinilezés útján, előnyösen borostyánkősavanhidriddel (a továbbiakban röviden: SA), a reakcióképes észterszármazékká aktiváljuk; ezt előnyösen N-hidroxi-szukcinimiddal (NHS) végezzük, amellyel LDPEG-SS-t alakítunk ki, majd az így kapott LDPEG-SS terméket reagáltatjuk a SÓSAV-OLDATTAL enzim valamely hozzáférhető reakcióképes helyével, előnyösen az SOD-on jelenlévő primer aminnal, főként a lizin ϵ -aminocsoportjával.

Az LDPEG-SOD esetében az eljárás konkrétan az alábbi:



ahol:

LDPEG-OH = csekély-diol típusú CH₃O-PEG-OH, amely legfeljebb körülbelül 10 tömeg/térf.% HO-PEG-OH-t tartalmaz;

LDPEG-S = csekély-diol típusú CH₃O-PEG-OCOCH₂CH₂COOH, amely legfeljebb 10 % [HOOC-CH₂CH₂-COO]₂PEG-t tartalmaz;

LDPEG-SS = csekély-diol típusú CH₃O-PEG-OCOCH₂CH₂COO(C₄H₄NO₂), amely legfeljebb 10 % [(C₄H₄O₂N)OOC-CH₂CH₂COO]₂-PEG-t tartalmaz;

DCC = dicitklohexil-karbodiimid;

bSOD = szarvasmarha-eredetű szuperoxid-diszmutáz;

NHS = $(C_4H_4NO_2)OH$, N-hidroxi-szukcinimid;

$(LDPEG)_n bSOD$ = csekély-diol típusú $(CH_3O-PEG-$
 $-OCOCH_2CH_2CO)_n-bSOD$;

$(LDPEG)_{n-1} bSOD-S$ = csekély-diolt tartalmazó $(CH_3O-PEG-$
 $-OCOCH_2CH_2CO)_{n-1}-bSOD-$
 $-COCH_2CH_2COOH$;

Sacid: borostyánkősav;

n = a csekély diolt tartalmazó PEG száma SOD-
 -onként; és

K_1 , K_{obs} , k_2 , valamint k_3 a reakciók sebességi állandói.

Az alábbiakban ismertetjük a találmány szerinti készítményekben felhasznált, alapvetően fontos komponenseket.

Kiindulási anyagok, közbenső termékek és reagensek

Szuperoxid-diszmutáz (röviden: SOD)

A szuperoxid-diszmutáz olyan enzimes csoport neve, amelynek tagjai katalizálják a szuperoxid gyökkanion (O_2^-) lebomlását oxigénre és hidrogén-peroxidra.

A SOD a Nemzetközi Biokémiai Egyesület rendszeres nomenklatúrájában szuperoxid-oxidoreduktáz néven ismert, az Enzim Katalógusban a száma 1.15.1.1. Ezeket az anyagokat orgoteineknek, hemokupreineknek, valamint szuperoxid-diszmutázoknak is nevezték; molekulatömegük körülbelül 4000-tól körülbelül 48000-ig terjed. A réz-cink-diszmutázok figyelemre méltóan egységes vegyületcsoport, ha a szerkezeti sajátosságukat nagyjából vesszük figyelembe. Kimutatták, hogy a tisztított enzimek kivétel nélkül dimerek (molekulatömegük általában

31000-33000), és molekulánként két atom rézont és két atom cinkont tartalmaznak. A mangán-vas enzimescsoport az alapvető sajátságok szempontjából - amilyen a molekulatömeg, az alegységek szerkezete és a fémtartalom - nem ilyen egységesek. Egyesek dimerek, mások tetramerek. Fémtartalmuk a polipeptid láncú alegység 1 molekulájára számítva körülbelül 0,5 - 1 mól. Az emlősökből származó, természetes előfordulású cink-réz-tartalmú enzimeket és ezek funkcionálisan kompetens analógjait és muteinjeit tekintik emlős cink/réz-szuperoxid-diszmutázoknak (mSOD).

A találmány szerinti készítményekben jelenlévő mSOD bármilyen eredetű lehet. Iparilag szarvasmarha-eritrocitákból és emberi eritrocitákból, valamint mikroorganizmusokban, így E. coli-ban és élesztőben lejátszódó, rekombináns szintézis útján állítják elő. Egyéb források közül a szarvasmarha májában lévő réz-cink-szuperoxid-diszmutáz (SOD, EC 1.15.1.1) („EC” jelentése: Enzim-Katalógus) például a DDI Pharmaceuticals, Inc. cégtől szerezhető be (Mountain View, California).

Poli(alkilén-oxid), amelyet itt a polietilén-glikol példáján mutatunk be

A találmány gyakorlati megvalósítása során biológiailag hatásos fehérjéhez kapcsolás céljára előnyösen a csekély-diol típusú PEG-t használjuk. Jóllehet bizonyos molekulatömegű metoxi-polietilén-glikolok kereskedelmi forgalomból beszerezhetők (így például a metoxi-PEG₅₀₀₀ beszerezhető a Union Carbide Corporation cégtől kétféle formában: egyik a szokásos úton beszerezhető „sok diol” típusú metoxi-PEG₅₀₀₀, amely 14-17 % magasabb molekulatömegű PEG-diolt tartalmaz; a másik forma

egy csekély-diol típusú termék, amely legfeljebb 4 % PEG-diolt tartalmaz); egyeseket elő kellett állítanunk és tisztítanunk, hogy kevésbé immunogén kapcsolt fehérjét kapjunk. Így például SOD kapcsolása egyes kereskedelmi forrásokból származó metoxi-PEG-SS-anyaggal olyan terméket eredményez, amely magas molekulatömegű komponenseket tartalmaz, amint ezt mérethátár-kizárásos kromatográfiával igazoltuk. Úgy véljük, hogy ez a nagy molekulatömegű termék a fehérjének aktivált diészterrel végbemenő térhálósításából ered; ez az aktív diészter az M-PEG kereskedelmi forrásaiban található PEG-diol különböző mennyiségeiből keletkezik. Az egyes aktív észterek - jóllehet azonos polimer láncon helyezkednek el - kémiaailag egymástól távol állnak. Így a polimeren egy második reakcióképes funkciós csoport jelenléte mindinkább elhanyagolható hatást fejt ki az első reaktív funkciós csoport reakcióképességére, amint a két funkciós csoport közötti távolság növekszik. Ennek következtében a csoportok egyedi reakcióképessége hajlamos függetlenné válni a polimer lánc két ellenkező végén elhelyezkedő egységektől, és a reagensek végtelen hígítása nélkül a térhálósítás nem kerülhető el. Ennek megfelelően lényeges szempont olyan M-PEG-SS szintetizálása, amelyről tudjuk, hogy nagyon csekély mennyiségű vagy egyáltalán semmi diésztert nem tartalmaz. S. Zalipsky és munkatársai [J. of Bioactive and Compatible Polymers 5, 227-231 (1990)] közölték polietilén-glikol 2000 megtisztítását a metoxi-etilén-glikol 2000-től. A szukcinát-észtereket is előállítottuk, és kimutattuk, hogy DEAE-Sephadex ioncserélő gyantán kromatografálva elkülöníthetők. A preparatív módszert a 3. példában mutatjuk be.

Bár a 3. példában közölt eljárás a PEG-2000 esetében jól használható, nagyobb molekulatömegű PEG-ok esetében csődöt mond. Magasabb molekulatömegű PEG-savak anionos vagy kationos gyantákhoz nem kötődnek; nézetünk szerint a polietilén-váz nagyobb tömege az adott sav ionos sajátosságait elfedi (maszkírozza). Úgy találtuk, hogy rendkívül csekély ionerősségű puffer szükséges a PEG-szukcinátok kötésére, és a PEG-szukcinátok az ionerősség igen csekély növelése útján eluálhatók. Ez arra utal, hogy a gyantához csak nagyon gyengén kötődnek.

Azt találtuk, hogy magasabb molekulatömegű metoxi-PEG-ok a diol-komponensektől elválaszthatók, ha a hidroxil funkciós csoportokat előbb - a fordított fázisú vékonyrétegkromatográfia alkalmazása előtt - dimetoxi-tritil (DMT) éter-csoportokká alakítjuk. Savas kezeléssel a hidroxilcsoportok felszabadíthatók.

Az alábbiakban vázlatosan ismertetjük PEG₅₀₀₀ dimetoxi-tritil-származékainak (M-PEG-DMT) az előállítását és tisztítását. Erre vonatkozó részleteket a 4.-7. példákban írunk le.

Az M-PEG-DMT-t és DMT-PEG-DMT-t ugyanúgy állítjuk elő. A poliétert etanolmentes kloroformban oldjuk, és az oldatot úgy szárítjuk, hogy a kloroformnak mintegy felét argongáz alatt atmoszféranyomáson ledesztilláljuk. Ezután az oldatot szobahőmérsékletre hűlni hagyjuk argongáz alatt, majd 1,5 ekvivalens, azaz fölös diizopropil-amint, 10 mól% 4-(dimetil-amino)-piridint katalizátorként, végül 1,2 ekvivalens, fölös mennyiségben 4,4-dimetoxi-tritil-kloridot adunk hozzá. 15 órás reakció után az oldatot forgóbepárlón (rotavaporon) bepároljuk, majd az oldatot vízmentes éterhez adva a tritilezett PEG-t lecsapjuk. Normál

fázisú vékonyrétegkromatográfiával a kiindulási anyagtól a termék világosan elkülönül, mivel a PEG váza Dragendorf-reagenssel festődik. Jóllehet M-PEG-DMT normál fázisú vékonyrétegkromatográfia (VRK) segítségével nem különíthető el a DMT-PEG-DMT-től, fordított fázisú C-18 VRK lemezeken az M-PEG-DMT, DMT-PEG-DMT, DMT-klorid és DMT-alkohol világosan elkülönülnek egymástól (mozgó fázisként acetonitril, víz és izopropanol 4:1:1 arányú elegyét alkalmazzuk). A PEG-vázat alátámasztja, hogy a Dragendorf-reagenssel narancsvörösre színeződik; a tritilcsoportok beépülését azzal támasztjuk alá, hogy a lemezt savgőzök hatásának tesszük ki; ekkor narancsszínűre festődik.

Kimutattuk, hogy autentikus M-PEG-DMT 5000 világosan elkülönül az autentikus DMT-PEG-DMT 8000-től egy Waters C-8 300 Å pórusméretű, 15-20 mikronos részecskeméretű Prep-Pak Bondapak tölteten. A nyers M-PEG-DMT-t ultrahangkezelés közben 30 % acetonitrilt tartalmazó vízben megközelítőleg 12 mg/ml koncentrációban oldottuk, majd 2,5 mikron szűrőnyílású szűrőn vezettük át. A mintát két oszlopra vittük fel (25 ml-ben 2 g) 30 % acetonitrilt tartalmazó vízben, mint mozgó fázisban. Nyolc perces izokratikus eluálással eluálható volt egy szennyező csúcs (amelyet nem azonosítottunk; 280 nm hullámhosszon magas abszorbanciát mutatott, viszonylagos tömege azonban nagyon csekély). 30-70 % acetonitrilt tartalmazó vízzel gradiens eluálást kezdtünk 21 percig, és a kívánt M-PEG-DMT-t 58-60 % acetonitriltartalomnál eluáltuk. Az autentikus DMT-PEG-DMT általában 80 % acetonitriltartalomnál eluálható. A kívánt csúcs első 3/4 részét gyűjtjük, az utolsó 1/4 részét elvetjük. Ezen az

úton 22,6 g nyers M-PEG-DMT-ből tisztítás után 15,4 g M-PEG-DMT-t kaptunk.

A tritilcsoportot az M-PEG-DMT-ből a következőképpen hasítjuk le.

Ha az M-PEG-DMT-ből a DMT csoportot HCl-val kíséreltük meg eltávolítani, akkor a nyers, hígítatlan reakcióelegy VRK vizsgálata a tritilcsoport teljes eltávolítására utal. A kloroformos kivonat bepárlása azonban egy visszafelé irányuló reakcióhoz vezetett, amelynek eredményeként a PEG jelentős hányada ismét tritileződött. Ezt a terméket szelektív kicsapással nem lehetett tisztítani. A hidratált tritil-kation és klorid látszólag egyensúlyban vannak, s ennek eredményeként- amint ez oldószer eltávolítása során történik - jelentős mennyiségű DMT-klorid termelődik. E retritilezés kiküszöbölhető egy egyensúlyban részt nem vevő társion alkalmazásával. Kimutattuk, hogy kénsavval az M-PEG-DMT irreverzibilisen detritilezhető. A kénsavval végzett hasítás után az M-PEG kloroformmal extrahálható, az oldatot bepároljuk, és éterrel végzett kicsapás után tiszta, diolt nem tartalmazó M-PEG-t kapunk. Ezzel a módszerrel 10 g M-PEG-DMT-ből hasítás útján 8,68 g zérus diol-tartalmú M-PEG-t kaptunk. A méretkizáró kromatográfia mutatja, hogy ez a termék 0,3 %-nál kevesebb diolt tartalmaz.

Hasonló eljárással más, magasabb molekulatömegű metoxi-PEG-származékok is készíthetők.

Az alábbiakban a találmányt példákban (részletesen) mutatjuk be. E példák szemléltetik a csekély-diol típusú PEG és fehérje jellegű anyagok konjugátumainak az előállítását

ciklodextrin-komplex kialakítása céljából; azonban a példák a találmány oltalmi körét semmiképpen sem korlátozzák.

1. példa

A. (Metoxi-polietilén-glikol)-szukcinát (M-PEG-S)

2 literes lombikban 100 g (0,02 mól) metoxi-PEG₅₀₀₀ (M-PEG) terméket keverés közben 300 ml meleg (40 °C hőmérsékletű) vízmentes toluolban oldunk. Ezután a térfogatot úgy csökkentjük, hogy 147 ml toluolt nitrogéngáz alatt azeotróposan ledesztillálunk, s így az M-PEG eredeti 1,73 % víztartalmát 0,23 %-ra csökkentjük. Környezeti hőmérsékletre hűlés után előbb 233 ml száraz diklór-metánt (a továbbiakban esetenként: DKM), s utána 3,0 g (0,09 mól) borostyánkősavanhidridet és 1,1 g (0,01 mól) 4-(dimetil-amino)-piridint (DMAP) adunk hozzá. A reakcióelegyet éjszakán át keverés közben visszafolyató hűtő alatt forraljuk, majd 200 ml DKM-t vákuumban lepárolunk. A maradékot keverés közben 4 literes lombikba helyezett 1,6 literes éterbe öntjük, az elegyet 45 percig keverjük, majd szűrjük. Így 100,4 g nyers, fehér, szilárd M-PEG-szukcinátot kapunk (M-PEG-S), amely DAMP-t tartalmaz.

100 g M-PEG-S nyersterméket 633 ml DKM-ban oldunk, és 114 g (előzőleg 272 ml dioxánnal, majd 316 ml száraz DKM-mal mosott Dowex 50x8-100H+ gyantát tartalmazó oszlopon vezetjük át, utána az oszlopot további 316 ml DKM-nal mossuk, az eluátumokat egyesítjük, és vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk. A DKM-t (800 ml) vákuumban lepároljuk, és a visszamaradó oldatot keverés közben 4 literes lombikban elhelyezett 1600 ml éterhez adjuk. 30 perces keverés után a szuszpenziót 30 percig állni hagyjuk, majd szűrjük. A szűrőkalácsot 75 ml

éterrel mossuk, utána vákuumban szárítjuk. Így 96,0 g (94 %) hozammal fehér, szilárd M-PEG-S-t kapunk, amely a várt szerkezettel megegyező $^1\text{H-NMR}$ színképet mutatott.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 4,27 (triplett, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$), 3,68 (széles szingulett, PEG metilén $\text{O}-\text{CH}_2$ -k), 3,39 (szingulett, 3H, OCH_3) és 2,65 ppm (szűk multipllett, 4H, $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$). Titrálással mérve a karbonsavtartalmat 0,000207 mol/g-nak találtuk.

B. (Metoxi-polietilénlikol)-(N-szukcinimidil-szukcinát) (M-PEG-SS)

98,48 g (0,0192 mól) (metoxi-polietilénlikol-szukcinát)-ot (M-PEG-S) 2 literes lombikban, 40 °C hőmérsékleten 468 ml száraz toluolban oldunk. Az oldatot szűrjük, és a szűrlet térfogatát azeotrópos desztillációval nitrogéngáz alatt 263 ml-rel csökkentjük. Az így kapott, viszkózus folyadékot nitrogéngáz alatt 225 ml száraz DKM hozzáadásával 1 literes háromnyakú lombikba visszük át, 2,22 g (0,0192 mól) N-hidroxi-szukcinimidet (NHS) adunk hozzá, és a reakcióelegyet az NHS oldódásáig keverjük, majd 5 °C-ra hűtjük jégfürdőben, és 4,44 g (0,0125 mól) DCC 24 ml DKM-nal készült oldatát 5 perc alatt hozzácsepegtetjük. A DKM-DCC oldat hozzáadása során a reakcióelegyből dicitklohexil-karbamid (DCU) kezd kikristályosodni. A reakcióelegyet szobahőmérsékletre hagyjuk felmelegedni, majd éjszakán át keverjük. Ekkor a lombik tartalmát 25 ml DKM alkalmazásával (ezzel öblítünk) 2 literes lombikba visszük át.

250 ml DKM-t 30 °C hőmérsékleten vákuumban eltávolítunk, a visszamaradó szuszpenziót szűrjük, és a szűrőkalácsot 25 ml száraz toluóllal mossuk. A szűrletet 1,2 liter vízmentes éterhez adjuk keverés közben, és szűrés előtt az így kapott szuszpenziót 45 percig keverjük. A szűrőkalácsot 100 ml száraz éterrel mossuk és 2 órán át szárítjuk. Az így kapott, szilárd terméket ezután igen jó vákuumban szárítjuk, majd argongáz alatt lombikba visszük át. Így 96,13 g (96,1 %) cím szerinti vegyületet kapunk (M-PEG-SS) fehér, szilárd termékként amelynek ¹H-NMR színeképe a várható szerkezettel összhangban van.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 4,32 (triplett, 2H, -CH₂-O-C(=O)-), 3,68 (széles szingulett, PEG metilén-O-CH₂-k), 3,39 (szingulett, 3H, OCH₃), 2,99 és 2,80 (triplettpár, egyenként 2H, szukcinát -C(=O)-CH₂-CH₂-C(=O)-) és 2,85 ppm (szingulett, 4H, szukcinimid -C(=O)-CH₂CH₂-C(=O)-).

A termék aktív észter tartalmát úgy határozzuk meg, hogy feleslegben vett benzil-aminnal reagáltatjuk toluolban, majd dioxánban perklórsavval visszatitráljuk a bázis maradékát metilvörös indikátor végpontjáig. Az aktív-észter-tartalmat 0,000182 mól/g értéknek találtuk.

C. Csekély diol típusú PEG-SOD

82, 1 mg/g fehérjét tartalmazó 11,8 g vizes SOD-oldatot 0,1 M nátrium-foszfát pufferoldattal 7,8 pH-n 200 g összes tömegre hígítunk, és a kapott oldathoz 30 °C hőmérsékleten, mágneses keverés közben 3,4 g csekély-diol típusú metoxi-PEG-SS-t adunk (amelyet az 1B. példa szerint állítottunk elő). A reakció-

elegy pH-értékét pH-sztat üzemmódra programozott Mettler DL25 titrátor alkalmazásával, 0,5 N nátronlúgoldat szükség szerinti hozzáadásával 7,8 pH-n tartjuk. Egy óra elmúltával a reakcióelegyet egy 0,2 mikron szitanyílású, csekély fehérjekötésű poliszulfon-szűrőn szűrjük, rozsdamentes acél Millipore Mini-tan eszköz alkalmazásával körülbelül 60 ml-re töményítjük, majd diaszűrésnek (dializáló szűrésnek) vetjük alá 2 liter 50 mM nátrium-foszfáttal pufferolt 0,85 %-os konyhasóoldattal szemben 6,2-6,3 pH-értéken. A csekély diol-tartalmú PEG-SOD terméket tartalmazó, visszamaradó oldatot 0,2 mikronos szűrőn szűrjük.

2. példa

A. (Monometoxi-polietilénlikol)-szukcinát

12 literes, háromnyakú lombikban 4 liter toluolt és 2212 g metoxi-polietilénlikolt teszünk, melyeket nitrogéngáz alatt előzőleg 70 °C-ra melegítettünk. Az oldat térfogatát azeotróposan vákuumban 1,3 liter toluol ledesztillálásával csökkentjük. A visszamaradó oldatot 30 °C-ra hűtjük, előbb 4 liter DKM-t, utána 66,4 g borostyánkősavanhidridet (SA-t), majd 4-(dimetil-amino)-piridint adunk hozzá, és a reakcióelegyet 32 órán át visszafolyató hűtő alatt forraljuk. Ezután környezeti nyomáson 3,8 liter DKM-t lepárolunk, a reakcióelegyet lehűtjük, és 28 liter metil-(terc-butil)-étert tartalmazó üvegballonba öntjük keverés közben. Az így kapott szuszpenziót 1 órán át keverjük, majd Lapp-szűrőn szűrjük. A szűrőkalácsot 1 liter metil-(terc-butil)-éterrel mossuk, másnapig szobahőmérsékleten vákuumban szárítjuk, s így 2,252 kg cím szerinti nyers, fehér szilárd vegyületet kapunk.

A cím szerinti nyersterméket 8 liter DKM-ban oldjuk, és 3,0 kg - előzőleg 5 liter acetonnal és utána 4 liter DKM-mal mosott -

Dowex 50W-X8 kationcserélő, hidrogénfázisban lévő, nyomásálló üvegoszlopban elhelyezett gyantán vezetjük át. Ezt követően az oszlopot 3 liter DKM-nal mossuk. Az oszlopról kapott eluátumokat egyesítjük, és környezeti nyomáson 10 liter DKM-t eltávolítunk. A visszamaradó oldatot keverés közben 26 liter metil-(terc-butil)-éterbe öntjük. Az így kapott szuszpenziót 45 percig keverjük, majd a szilárd terméket szűrjük, 3 liter metil-(terc-butil)-éterrel mossuk, és vákuumkemencében szobahőmérsékleten szárítjuk. Így 2,46 kg (95 %) cím szerinti, fehér, szilárd anyagot kapunk, amely 1,5 % metoxi-polietilénlikolt tartalmaz, mért értéke $2,72 \times 10^{-4}$ mól/g (elméletileg $1,96 \times 10^{-4}$ mól/g).

B. (Metoxi-polietilénlikol)-(N-szukcinimidil)-szukcinát

12 literes lombikban nitrogéngáz alatt 1,5 kg (monometoxi-polietilénlikol)-szukcinátot 7,2 liter toluolban melegítéssel oldunk. Az oldat térfogatát 2,8 liter toluol vákuum alatti lepárlásával csökkentjük, így víztartalmát eltávolítjuk. Az így kapott viszkózus folyadékot 40-45 °C-ra hűtjük, és 3,4 liter DKM-t, majd utána 33,89 g NHS-t adunk hozzá. A reakcióelegyet 1 órán át keverjük, míg az NHS teljesen fel nem oldódik, majd a reakcióelegyet 10 °C-ra hűtjük, és 30 perc alatt 368 ml, 67,75 g DCC-t tartalmazó DKM-oldatot csepegtetünk hozzá. A reakcióelegyet 18 órán át keverés közben, lassan szobahőmérsékletre hagyjuk felmelegedni, utána 3,2 litert ledesztillálunk környezeti nyomáson, s így térfogatát csökkentjük. Ekkor a szuszpenziót 0-5 °C-ra hűtjük, 30 percig keverjük, majd szűrjük, és a szűrőkalácsot 250 ml toluollal mossuk. A szűrletet és mosófolyadékot egyesítjük, és keverés közben 28 liter metil-(terc-butil)-éterhez adagol-

juk. Az így kapott szuszpenziót 45 percig keverjük, majd Lapp-szűrőn szűrjük. A szűrőkalácsot 1 liter metil-(terc-butil)-éterrel mossuk, és 4 órán át szárítjuk, majd a szárítást szobahőmérsékleten, vákuumkemencében másnapig folytatjuk. Így 1,5 kg (100 %) fehér, szilárd terméket kapunk. Mérésünk szerint ez a termék $1,79 \times 10^{-4}$ mól/g-t tartalmaz (az elméleti érték $1,92 \times 10^{-4}$ mól/g).

c. (Metoxi-polietilén-glikol)-szukcinoil-(szarvasmarha szuperoxid-diszmutáz)

42 literes, pH-elektóddal felszerelt reaktorban elhelyezett 32 liter 29-30 °C hőmérsékletű, 7,8 pH-értékű foszfátpufferoldathoz 194,0 g szarvasmarha-eritrocitából származó szuperoxid-diszmutázt adunk. A térfogatot 39,5 literre állítjuk be, és a reakcióelegyet 29 °C-ra melegítjük. A pH-titráló műszer nátrium-hidroxidos adagoló csövét a reaktor középtengelyében, közvetlenül a folyadék felszíne alá helyezzük. A pH-titrálót megindítjuk, és a pH értékét 0,5 n nátrium-hidroxid-oldattal 7,8-ra állítjuk. Ekkor az elegyhez 2 perc alatt 614,7 g (metoxi-polietilén-glikol)-(N-szukcinimidil)-szukcinátot adunk, és a reakcióelegyet 41 percig keverjük, mialatt a pH-értékét 0,5 n nátrium-hidroxid-oldattal 7,8-ra állítjuk, és a reakció hőmérsékletét állandóan 30 °C-on tartjuk. A reakcióelegyet 200 Millipak szűrőn, és rozsdamentes acélból készült Millipora Pellicon dializáló szűrőrendszeren átszűrjük, a betöményített oldathoz adjuk, így a koncentrátumnak a végtérfogata körülbelül 9 litert tesz ki. ekkor a koncentrátumot dializáló szűrésnek vetjük alá Millipore Pellicon diaszűrőrendszeren 200 liter 6,2 pH-értékű foszfátpufferrel szemben 2,17 órán át. A diaszűrő rendszert 1,5

liter 6,2 pH-értékű foszfátpuffer-oldattal öblítjük. A koncentrátum végtérfogata körülbelül 8 liter. Ezután a koncentrátumot át-
visszük egy tiszta, 30 literes üvegballonba, miközben egy, a műveleti sorban elhelyezett Millipore 200 Millipak szűrőn átszűr-
jük, és a szűrőt 500 ml, 6,2 pH-értékű foszfátpufferoldattal öblít-
jük. Így 11,98 kg (91,4 %) cím szerinti vegyületet kapunk tiszta,
zöldeskék oldat alakjában. (Aktivitása 32,960 egység/ml).

3. példa

A. Parciálisan karboxi-metilezett poli(etilén-oxid) előál- lítása

25 g 2000 molekulatömegű poli(etilén-oxidot) (Fluka, 25 milliekvivalens OH) 120 ml toluolban oldunk, és azeotróposan desztillálva addig szárítjuk, amíg a Dean-Stark feltétben vízle-
válás már nem figyelhető meg (ehhez körülbelül 25 ml toluol le-
desztillálása szükséges). Az oldatot 50 °C-ra hűtjük, és 15 mmól (1,7 g) kálium-terc-butanolátot adunk hozzá, majd forrás-
pontra hevítjük, és körülbelül 25 ml oldószert ledesztillálunk. Ekkor a reakcióelegyet keverés közben 25 °C-ra hűtjük, és 3,4 ml (16 mmól) bróm-ecetsav-etil-észter hozzáadása után más-
napig állni hagyjuk. A kicsapódott sókat normál nyomáson szűrjük, 30 ml DKM-nal mossuk. A polimert úgy nyerjük ki, hogy a szűrletet részlegesen (körülbelül 60 ml-re) töményítjük, és töményített oldatot 5 °C hőmérsékleten erélyes keverés közben lassan 300 ml dietil-éterbe öntjük. A fehér, porszerű polimert összegyűjtjük, vákuumban szárítjuk, így 24 g polimert kapunk, amelynek IR színeképében (önmagában felvéve) 1753 cm⁻¹-nél jelentkező észter-abszorpció figyelhető meg. Ezt a polimert 50 ml 1 n nátrium-hidroxid-oldatban oldjuk, 10 g nátrium-kloridot

adunk hozzá, mintegy 45 perc múlva az oldatot 6 N sósavoldattal 3,0 pH-értékre savanyítjuk, és háromszor extraháljuk 60 ml DKM-nal. Az egyesített szerves fázist magnézium-szulfáton szárítjuk, megközelítőleg 50 ml-re töményítjük, és keverés közben 300 ml jéghideg éterbe öntjük. A kapott csapadékot szűrőre gyűjtjük, vákuumban szárítjuk, így 22 g terméket kapunk, amelynek önmagában felvett IR színe az ω -karboxil-csoportnak megfelelően 1730 cm^{-1} -nél mutat abszorpciót.

B. Tiszta α -hidroxi- ω -(karboxi-metil)-poli(etilén-oxid) előállítása a részben karboxi-metilezett PEO DEAE-Sephadex-en végzett elkülönítése útján

A homo- és heterobifunkciós poli(etilén-oxid)-ok 22 g tömegű keverékét 40 ml vízben oldjuk, és (a Sigma cégtől beszerezhető) 27 g (0,1 mól ioncserélő hellyel rendelkező) DEAE-Sephadex A-25 gyantát tetraborát-alakban tartalmazó oszlopra visszük fel. Az első frakciót ionmentesített vízzel eluáljuk, ez a származékképzés nélküli (nem derivatizált) polimert tartalmazza. Amikor az eluátum poliakrilsav (PAA) próbára negatívvá válik (ezzel a megmaradt PEG-t mutatjuk ki), akkor fokozatosan 6-22 mM ammónium-bikarbonáttal (minden 100 ml-ben 1-2 mM koncentrációval növelve) gradiensen eluálunk, és egyenként körülbelül 40 ml térfogatú frakciókat gyűjtünk. A 2-21. frakciók PAA próbára negatívak, és tiszta monokarboxilezett poli(etilén-oxid)-ot tartalmaznak ($R_1 = 0,49$). A következő három frakció poli(etilén-oxid)-ot nem tartalmaz; míg a 25-36. frakciók tiszta PEO-dikarbonsavat tartalmaznak ($R_1 = 0,26$). Az α -hidroxi- ω -(karboxi-metil)-poli(etilén-oxid)-ot tartalmazó frakciókat egyesítjük, és körülbelül 100 ml-re töményítjük. Az így kapott oldat-

ban 35 g nátrium-kloridot oldunk, majd pH 3-ra savanyítjuk, és 3 x 100 ml DKM-nal extraháljuk. Az egyesített DKM-oldatot magnézium-szulfáton szárítjuk, mintegy 100 ml-re betöményítjük, és lassan, keverés közben 500 ml jéghideg éterbe öntjük. A kicsapódott polimert összegyűjtjük, vákuumban alaposan szárítjuk, és így 8,8 g terméket kapunk.

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 172,7 (COOH), 72,4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 70,4 (PEO), 69,0 (CH_2COOH), 61,3 (CH_2OH) ppm.

Az oszlopról izolált bisz(karboxi-metil)-poli(etilén-oxid)-ot szintén elemezzük.

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 172,4 (COOH), 70,4 (PEO), 68,8 (CH_2COOH) ppm.

4. példa

(Dimetoxi-tritil)-(metoxi-polietilén-glikol) szintézise

36,3 g (7,26 mmól) 5000 dalton átlagos molekulatömegű metoxi-polietilén-glikolt 500 ml kloroformban oldunk, és a víztartalmat 250 ml kloroform ledesztillálásával eltávolítjuk. A lombikra szárítócsövet szerelünk, az oldatot körülbelül 50 °C-ra hagyjuk lehűlni, és sorrendben előbb 1,8 ml (10,3 mmól) N,N-diizopropil-etil-amin, utána 100 mg (0,8 mmól, 10 mól%) 4-(dimetil-amino)-piridint és 2,9 g (98 %-os) (4,4-dimetoxi-tritil)-kloridot adunk hozzá.

A keveréket éjszakán át szobahőmérsékleten keverjük, majd az oldószert rotavaporon 60 °C hőmérsékleten eltávolítjuk. A maradékot csekély mennyiségű kloroformban felvesszük, és a (dimetoxi-tritil)-(metoxi-polietilén-glikol)-t (M-PEG-DMT) 2 liter vízmentes éter hozzáadásával kicsapjuk. A csapadékot szűrőre

gyűjtjük, és C-8 300A fordított fázisú preparatív oszlopon, Waters LC4000 rendszerben 30-95 % acetonitril gradiens alkalmazásával (vízzel szemben) 20 percig kromatografáljuk. A kívánt terméket 50-60 % acetonitril-tartalomnál eluáljuk. 2 g mintát 20 ml 30 % acetonitrilt tartalmazó vizes oldatban viszünk az oszlop tetejére 50 ml/perc áramlási sebességgel. Ezt az eluenst (30 % acetonitrilt tartalmazó víz) izokratikusan engedjük folyamatosan áramlani, amíg egy terjedelmes szennyező csúcsot eluálunk, általában 3-5 percnél, mv 280 μ m. Ennek az első csúcsnak az eluálása után indítjuk a gradiens elúciót. A következő csúcs eluálása a kívánt, 5000 molekulatömegű metoxi-PEG-DMT 5000-et adja. A csúcs első 3/4-ét gyűjtjük, a csúcsnak a farokrészét elvetjük. Így 22,6 g nyers M-PEG-DMT 5000 tisztításával 2 g-os részletekben 15,44 g cím szerinti vegyületet kapunk.

5. példa

Zérus-diol típusú metoxi-polietilén-glikol szintézise (dimetoxi-tritil)-(metoxi-polietilén-glikol)-ból

10 g M-PEG-DMT 5000 terméket 500 ml-es lombikban 320 ml Milli-Q vízben oldunk, 80 ml kénsavat adunk hozzá lassú befolyatással, s így a koncentrációt 20 %-ra állítjuk. Az oldat vörös színt ölt, és homogénné válik. Éjszakán át keverjük, majd a savas oldatot 2 x 500 ml kloroformmal extraháljuk, az egyesített kivonatott magnézium-szulfáton szárítjuk, betöményítjük, és a vörös, olajszerű maradékot vékony sugárban, 20 °C hőmérsékleten 2 liter vízmentes éterbe folytatjuk. A csapadékot 24 órán át üleptítjük, majd zsugorított üvegszűrőre gyűjtjük, és 2 x 20 ml vízmentes éterrel mossuk. A csapadékból álló szűrőkalácsot

porítjuk, vákuumban szárítjuk, így 8,68 g zérus-diol típusú metoxi-PEG 5000 terméket kapunk.

6. példa

Zérus-diol típusú (metoxi-polietilén-glikol)-szukcinát előállítása zérus-diol típusú metoxi-polietilén-glikolból

4,7 g (0,94 mmól) M-PEG-OH 5000 zérus-diol típusú anyagot 100 ml toluolban oldunk, az oldatot visszafolyató hűtő alatt forraljuk, és a víztartalom eltávolítására Dean-Stark csapdát alkalmazunk. Egy óra visszafolyós forralás után összesen 80 ml toluolt desztillálunk le, és a 20 ml toluolt tartalmazó edényt pozitív argonnyomású atmoszférában lehűlni hagyjuk. Előbb 110 mg (1,1 mmól) borostyánkősavanhidridet, utána 137 mg (1,12 mmól) 4-(dimetil-amino)-piridint adunk hozzá. Mivel a borostyánkősavanhidrid nem oldódik, 10 ml kloroformmentes, vízmentes etanolt adunk hozzá, és az oldatot kemencében szárított hűtő alkalmazásával visszafolyatással forraljuk. 15 óra forralás után az oldatot lehűtjük, 10 g kationcserélő gyantával keverjük, szűrjük, és a szűrletet bepároljuk. Így a cím szerinti vegyülethez jutunk.

7. példa

Zérus-diol típusú (metoxi-polietilén-glikol)-szukcinimidil-szukcinát szintézise (metoxi-polietilén-glikol)-szukcinátnál

4,15 g (0,83 mmól) 6. példában előállított M-PEG-szukcinát 100 ml toluollal készült oldatát azeotróposan szárítjuk. A toluol egy részét ledesztilláljuk (60 ml-t), így a lombikban 40 ml marad. 100 mg (0,87 mmól) NHS-t, majd óvatosan 30 ml etanolmentes, vízmentes kloroformot adagolunk hozzá. További

25 ml oldószerkeletet desztillálunk le, és utána az oldatot argongáz alatt szobahőmérsékletre hagyjuk lehűlni. Ekkor az oldathoz 200 mg (9,7 mmól) DCC-t adunk, és az oldatot keverjük. 10 perc múlva megkezdődik a diciklohexil-karbamid (DCU) kristályos kiválása. 2 nap keverés után még 25 mg (0,22 mmól) NHS-t adunk hozzá. A DCU szuszpenzióját szűrjük, és a csapadékot toluollal mossuk. A szűrletet rotavaporon bepárolva további DCU csapadék válik ki. A szűrt koncentrátumot 1 liter vízmentes éterbe csepegtetjük, a csapadékot Whatman 9 cm 6F/F üvegrostszűrőn szűrjük, igen jó vákuumban 15 órán át szárítjuk, s így 3,37 g M-PEG-SS terméket kapunk.

A termék aktív-észter-tartalma $1,71 \times 10^{-4}$ mól/g; a HPLC vizsgálat szerint 1,3 % M-PEG-S-t és 1,2 % egyéb szennyezést tartalmaz; DCU nem mutatható ki; összes szennyezéstartalma 3 %.

8. példa

Zérus-diol típusú PEG-SOD szintézise

75 mg/ml koncentrációjú törzsoldatból 1,33 ml szuperoxid-diszmutáz-oldatot 18,67 ml pufferoldathoz adunk (amely 100 mM nátrium-foszfátot tartalmaz, és pH-értéke 7,8), majd az oldatot 30 °C hőmérsékletre melegítjük. A 7. példában előállított 300 mg M-PEG-SS-t adunk hozzá egyszerre, és a pH-értékét pH-sztat alkalmazásával 7,8-on tartjuk. 28 perc múlva a reakcióelegy pH-értéke már nem változik, így a mintát Centrium centrifugális membránon - amelynek kizárási mérethatára 10000 MW (molekulatömeg) - betöményítjük. A töményített mintát ilyen módon 1 mólos sósav-oldattal 6,2 pH-ra beállított Dulbecco-féle PBS oldattal kicseréljük. Összesen 60 ml folyadékkal öt cserét

hajtunk végre. A méretkizáró HPLC vizsgálat csupán elhanyagolható magas molekulatömegű csúcsot mutat, jelezve, hogy a cím szerinti vegyület (kivánt vegyület) a diolból származó anyagot csak elhanyagolható mennyiségben tartalmazza (azaz „zérus-diol típusú”).

További, a PEG-hez kovalensen kötött, biológiailag hatásos fehérjék előállítása

9. példa

Csekély-diol típusú (metoxi-polietilén-glikol)-szukcinoil-kataláz szintézise

4,17 ml vizes kataláz-szuszpenziót - amely ml-enként 24,0 mg fehérjét tartalmaz - 0,1 mólos, 7,8 pH-értékű nátrium-foszfát-pufferoldattal 15,84 ml-re hígítunk. Ehhez az oldathoz mágneses keverés közben, 30 °C hőmérsékleten 550 mg, csekély-diol típusú metoxi-PEG-SS-t adunk. A reakcióelegy pH-értékét pH-sztat üzemmódra programozott Mettler DL25 titráló műszer alkalmazásával 7,8-on tartjuk úgy, hogy a titrátor alkalmazásával szükség szerint 0,5 N nátrium-hidroxid-oldatot adagolunk hozzá. 30 perc múlva a reakcióelegyet 0,45 mikron szűrőnyílású, csekély fehérjekötésű poliszulfon-szűrőn szűrjük, két Amicon Centriprep 30 Concentratorba helyezük (30K NMWL membrán), és a pufferoldatot többször kicseréljük Dulbecco-féle PBS-vel. A fennmaradó (visszatartott) részt - a csekély-diol típusú PEG-katalázt tartalmazó oldatot - ezután 0,2 mikron szűrőnyílású szűrőn szűrjük. A konjugátum kialakulását SEHPLC és gél-elektroforézis útján igazoljuk.

10. példa

Csekély-diol típusú PEG-ovalbumin szintézise

503 mg (Sigma-cégtől beszerezhető) ovalbumint 50 g 0,25 mólos, 7,8 pH-értékű foszfátpufferoldatban szobahőmérsékleten teflon-bevonatos mágneses keverőrúddal ellátott polietilén hengerpohárban szobahőmérsékleten oldunk. 15 perc keverés után egyszerre hozzáadunk 1,900 g csekély-diol típusú M-PEG(5000)-SS-t, miközben a reakcióelegy pH-értékét 0,5 N nátrium-hidroxid-oldatot szükség szerint adagoló Mettler DL25 pH-sztat segítségével 7,8-on tartjuk. A reakciót szobahőmérsékleten még 1 órán át állni hagyjuk, majd a reakcióelegyet Amicon YM300 membránon, keverőcellás eszköz alkalmazásával diaszűrjük (a cellát éjszakán át a hűtőszekrényben 4 °C hőmérsékleten, 172 kPa argonnyomás alatt működtetjük). 800 ml pufferoldat diaszűrése után a terméket ultraszűréssel töményítjük, 0,2 mikron szűrőnyílású poliszulfon-szűrőn szűrjük, és steril üvegfiolákba osztjuk. Így 44,3 g oldatot kapunk, amelynek fehérjetartalma 10,5 mg/ml. A lizin aminocsoportjának titráló elemzésével meghatározva a fehérje módosításának a mértéke 71,4 %-osnak adódott.

11. példa

Csekély-diol típusú mPEG_{SK}-S-ovalbumin szintézise

10 ml, 10 mg/ml koncentrációjú, hideg ovalbumint (Sigma-cég, VI. minőség) 0,25 mólos foszfátpufferben, amelynek pH-értéke 7,4, 382 mg csekély-diol típusú MPEG_{SK}-SS termékhez adunk, és 16 órán át 5 °C hőmérsékleten keverjük. A terméket Centriprep 30 Concentrator eszközben (Amicon, 30K NMWL membrán) kicserélő pufferként Dulbecco-féle PBS alkalmazásá-

val tisztítjuk. A tisztított oldatot 0,2 μm szűrőnyílású szűrőn átszűrve 6,539 g oldat hozammal 13,8 mg/ml koncentrációban 74 %-os mértékben módosított fehérjét kapunk (a módosítás mértékét TNBS titráló módszerrel határoztuk meg).

Hasonló módon, 100 mg ovalbumint 283 mg csekély-diol típusú mPEG_{SK}-SS-vel reagáltatva 6,274 g oldatot kapunk, amely 13,8 mg/ml koncentrációban 74 %-os mértékben módosított fehérjét tartalmaz.

Hasonló módon, 100 mg ovalbumint 190 mg csekély-diol típusú mPEG_{SK}-SS-vel reagáltatva 5,704 g oldatot kapunk, amely 16,8 mg/ml koncentrációban 67 %-os mértékben módosított fehérjét tartalmaz.

12. példa

Csekély-diol típusú mPEG_{SK}-S-rhu-IL4 szintézise

190 μl 5,26 mg/ml koncentrációban rhu-IL4'-et (Immunex-et) tartalmazó oldatot 772 μl 8,5 pH-értékű, 0,1 mólos borátpufferrel hígítunk, majd ezt az rhu-IL4 oldatot 29,2 μl , 34 mg/ml oldat koncentrációban csekély-diol típusú metoxi-PEG-SS-t tartalmazó DMF-oldattal kezelünk. 80 perc múlva szobahőmérsékleten a reakcióelegyet centrifugáljuk, és közvetlenül visszük fel egy preparatív SEHPLC oszlopra. A tisztított konjugátumról kimutattuk, hogy gél-elektroforézis során lényegében egyetlen sávval jelentkezik.

13. példa

Csekély-diol típusú mPEG_{SK}-S-NT szintézise

8,7 mg neurotenzint (röviden: NT; a BaChem-cég terméke) 2,175 ml 0,25 mólos, 7,8 pH-értékű foszfátpufferben tartalmazó oldatot 174 mg csekély-diol típusú MPEG_{SK}-SS termékhez

adunk. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten tartjuk 1,75 órán át, majd hűtjük. A tiszta mono-MPEG_{5K}-S-NT terméket úgy kapjuk, hogy az NT-PEG_{8K}-NT terméktől preparatív, fordított fázisú HPLC útván elkülönítjük C-8 oszlopon, eluálószerként víz/acetonnitril gradiens alkalmazásával.

A találmány szerinti készítményeket a szokásos, a szakterületen jártas egyén számára ismert technológiával állítjuk elő. Adott esetben a készítmény szacharózt vagy trehalózt tartalmazhat.

Az 1. táblázatban konkrét készítményeket mutatunk be; HPCD jelentése (hidroxi-propil)-ciklodextrin.

1. táblázat

A példa száma	PEG-SOD (E/ml) (nM)	Foszfát-puffer	pH	HPCD tömeg/térf.%	Szacharóz tömeg/térf.%
14.	25000	10	6,2	-	5
15.	50000	10	6,2	-	5
16.	75000	10	6,2	-	5
17.	100000	10	6,2	-	5
18.	125000	10	6,2	-	5
19.	150000	10	6,2	-	5
20.	25000	10	6,2	-	10
21.	50000	10	6,2	-	10
22.	75000	10	6,2	-	10
23.	100000	10	6,2	-	10
24.	125000	10	6,2	-	10
25.	150000	10	6,2	-	10

1. táblázat (folytatás)

A példa száma	PEG-SOD (E/ml) (nM)	Foszfát-puffer	pH	HPCD tömeg/térf.%	Szacharóz tömeg/térf.%
26.	25000	10	6,2	-	20
27.	50000	10	6,2	-	20
28.	75000	10	6,2	-	20
29.	100000	10	6,2	-	20
30.	125000	10	6,2	-	20
31.	150000	10	6,2	-	20
32.	25000	10	6,2	5	-
33.	50000	10	6,2	5	-
34.	75000	10	6,2	5	-
35.	100000	10	6,2	5	-
36.	125000	10	6,2	5	-
37.	150000	10	6,2	5	-
38.	25000	10	6,2	10	-
39.	50000	10	6,2	10	-
40.	75000	10	6,2	10	-
41.	100000	10	6,2	10	-
42.	125000	10	6,2	10	-
43.	150000	10	6,2	10	-
44.	25000	10	6,2	20	-
45.	50000	10	6,2	20	-
46.	75000	10	6,2	20	-
47.	100000	10	6,2	20	-
48.	125000	10	6,2	20	-

1. táblázat (folytatás)

A példa száma	PEG-SOD (E/ml) (nM)	Foszfát-puffer	pH	HPCD tömeg/térf.%	Szacharóz tömeg/térf.%
49.	150000	10	6,2	20	-
50.	25000	10	6,2	5	5
51.	50000	10	6,2	5	5
52.	75000	10	6,2	5	5
53.	100000	10	6,2	5	5
54.	125000	10	6,2	5	5
55.	150000	10	6,2	5	5
56.	25000	10	6,2	10	10
57.	50000	10	6,2	10	10
58.	75000	10	6,2	10	10
59.	100000	10	6,2	10	10
60.	125000	10	6,2	10	10
61.	150000	10	6,2	10	10
62.	25000	10	6,2	15	5
63.	50000	10	6,2	15	5
64.	75000	10	6,2	15	5
65.	100000	10	6,2	15	5
66.	125000	10	6,2	15	5
67.	150000	10	6,2	15	5
68.	25000	10	6,2	5	15
69.	50000	10	6,2	5	15
70.	75000	10	6,2	5	15
71.	100000	10	6,2	5	15

1. táblázat (folytatás)

A példa száma	PEG-SOD (E/ml) (nM)	Foszfát-puffer	pH	HPCD tömeg/térf.%	Szacharóz tömeg/térf.%
72.	125000	10	6,2	5	15
73.	150000	10	6,2	5	15

A találmány szerinti készítményeket az alábbi eljárással liofilizáljuk.

Kiválasztjuk a megfelelő méretű fiolákat, amelyeket a kívánt adagokra alapozott készítményekkel töltünk meg. A dózishoz megfelelő fiolák megválasztása során a töltőtér fogat nem haladhatja meg a fiola átmérőjét. Így például 5 ml térfogatnál többet nem vihetünk be egy 10 ml-nél kisebb térfogatú fiolába. Töltés után a fiolákat szárítókamrába helyezzük, és közvetlenül a hűtött polcokra helyezzük, amelyeket előzetesen 4 °C-ra hűtöttünk. A fiolák meghatározott számába termoelemeket helyezünk a készítmény hőmérsékletének monitorozására a liofilizációs folyamat során. Ezután a fiolákat egyensúlyba hozzuk a polcok hőmérsékletével (4 °C), mielőtt a polcok hőmérsékletét -40 °C-ra hűtjük. A -40 °C hőmérséklet elérése után a fiolákat ezen a hőmérsékleten tartjuk körülbelül 6 órán át a készítmény teljes megfagyasztása céljából. E periódus után a hűtőkígyókat -80 °C-ra hűtjük, és a vákuumszivattyú bekapcsolásával a kondenzáló kamrát evakuáljuk, majd ezt követi a primer és szekunder szárítás folyamata. A primer (elsődleges) szárítási folyamat során a szárítókamra és a kondenzáló egység között a főszelep nyitva van, és a szárítókamrát körülbelül 100 mikronos nyomás-

ra evakuáljuk egy nitrogén-gázöblítőcső alkalmazásával. Amikor a 100 mikronos nyomást elérjük, a polchőmérsékletet -20 °C -ra emeljük a szublimációs folyamat megindítása céljából. A liofilizáló ciklusnak ez az időszaka körülbelül 10-18 órát vesz igénybe. A primer szárítási folyamat akkor teljes, ha a fagyasztott mátrixról a jég teljesen eltűnik, és a termoelem hőmérséklete a -20 °C -ot eléri. A szekunder szárítás során a hőmérsékletet -20 °C -ról $+25\text{ °C}$ -ra emeljük, s így valamennyi jeget eltávolítjuk, amely a liofilizálási folyamat alatt még nem távozott el. Ez az eltávolítási eljárás mintegy 4 - 8 órát igényel.

A szekunder szárítási folyamat befejezése után a főszelepet zárjuk, és a szárítókamrát nitrogénnel töltjük úgy, hogy a kamrában egy enyhe vákuum még megmaradjon. Ekkor működésbe hozzuk a zárófejet, és a zárat a fiolába nyomjuk. Majd a szárítókamrát a környezeti nyomással egyensúlyba hozzuk, és a kamra ajtaját a fiolák eltávolítása és a betéztár felrakása céljából keményítjük. Utána a fiolákat az előírt hőmérsékleten tároljuk egészen a befecskendezés céljából vízzel végzett oldás (rekonstituálás) időpontjáig.

A találmány szerinti készítmények tárolási élettartamát kitűnőnek találtuk. A tárolási élettartamot az alábbi összehasonlító vizsgálatokkal illusztráljuk rekonstituált oldatok alkalmazásával a készítmények külsejének vizuális megfigyelése céljából; valamint mérethatár-kizáró túlnyomásos folyadékkromatográfia (röviden: SEHPLC) használatával a 74. és 75. példákban bemutatott készítményekben jelenlévő, nagy molekulatömegű (HMW) anyag százalékos értékének meghatározására.

A találmány szerinti „A” készítmény 2 % HPCD-t tartalmaz.

Az összehasonlítás céljára készült „B” készítmény 10 % szacharózt tartalmaz HPCD nélkül.

Mindkét készítmény 10 mM 6,2 pH-értékű foszfátpuffert, valamint 75000 HE/ml PEG-SOD terméket tartalmaz. A fiolák töltőtér fogata 0,5 ml; a hőmérsékleti körülmények: 4 °C, 22 °C, 30 °C és 50 °C. Mindkét készítményt előzőleg liofilizáljuk, és a fenti hőmérsékleten 30 hónapon át tároltuk, majd rekonstituáltuk, és az alább leírt módon vizsgáltuk.

74. példa

Rekonstituált készítmények külleme

„A” készítmény	Küllem	„B” készítmény	Küllem
4 °C	átlátszó, kékeszöld	4 °C	átlátszó, kékeszöld
22 °C	átlátszó, kékeszöld	22 °C	átlátszó, kékeszöld
30 °C	átlátszó, kékeszöld	30 °C	átlátszó, kékeszöld
50 °C	átlátszó, kékeszöld	50 °C	zavaros, sárgásbarna

A nagy molekulatömegű anyag meghatározása méretkizáró, túlnyomásos folyadékromatográfiával (SEHPLC)

Az SDEHPLC műveletet úgy végezzük, hogy 0,8 x 30 cm méretű Shodex WS-803F oszlopon 0,1 mólos, 6,5 pH-értékű, 0,15 M nátrium-kloridot tartalmazó pufferoldatot bocsátunk át 1 ml/perc áramlási sebességgel, és egy 280 nm hullámhosszon működő detektor-berendezésen át nyomjuk. Ez az oszlop képes frakcionális tartománya és méretkizáró határa alapján 1 000 000-nál nagyobb molekulatömegek különbségeinek a fel-

oldására (megkülönböztetésére). E körülmények között a nagy molekulatömegű anyag a kis molekulatömegű anyagok (sók és kis molekulatömegű komponensek) előtt eluálódik. A detektort számítógéphez kapcsoljuk, amelyet úgy programozunk, hogy a számos paraméterre alapozott csúcsokat integrálja, és a csúcsok mennyiségét százalékos alapon mennyiségileg megadja.

A 75. példában talált és bemutatott, magas molekulatömegű anyagok százalékos mennyisége a polipeptid tárolása során végbemenő aggregációjának a mértéke. A 75. példában megmutatjuk a „szabad PEG” arányát (amely jelzi a szukcinát-észterkötés hidrolízisének mértékét), valamint az enzimaktivitás százalékos értékét is.

75. példa

Stabilitási vizsgálatok különböző hőmérsékleteken¹ 2, illetve 10 hónapon át tárolt, 10 % szacharózt vagy 10 % (β-hidroxi-propil)-ciklodextrint (HPβ CD)-t tartalmazó, liofilizált PEG-SOD készítményeken

Készítmény (75000 E/mg)	Hőmérséklet (°C)	HMW ² (%)		Szabad PEG ³ (mg/ml)		Aktivitás % ⁴	
		2 mo	10 mo	2 mo	10 mo	2 mo	10 mo
10 % szacharóz	4	0,3	0,2	0,35	0,1	99	--
	22	0,4	0,6	0,36	0	100	--
	30	0,7	0,9	0,44	0	98	100
	50	20	>50	3,45	≈10	71	--
10 % HPβCD	4	0,3	--	0,12	--	100	--
	22	0,4	--	0,08	--	99	--
	30	0,4	0,7	0,14	0,9	100	100
	50	0,6	4,8	0,87	3,23	95	92

¹ A liofilizált termékek vizuális vizsgálata rekonstituálás előtt azt mutatta, hogy a szacharóztartalmú készítmény 50 °C-on elszíneződött.

² A HMW (magas molekulatömegű) szennyezések polipeptid-aggregációra vallanak; ezt a kontrollkörülmenyektől (időtartalmtól) eltérő különbség százalékában fejezzük ki.

³ A szabad PEG a szukcinil-észter-kötés hidrolízisének mértéke, amelyet a kontrollkörülmenyektől (idő) eltérő különbség százalékában fejezünk ki.

⁴ A kezdeti érték százalékában fejezzük ki.

A 75. példa adataiból látható, hogy a HP β CD-t tartalmazó készítmény 30 °C-on végzett tárolás során kiváló stabilitást mutat. Az enzimaktivásban még 10 hónapos tárolás során sem figyeltük meg az enzimaktivitás jelentős változását; ez arra utal, hogy az enzim kielégítő stabilitása megmarad. A HP β CD kifejezetten kedvezőbb stabilizálószer; ez kitűnik akkor, ha a HMW anyagok százalékos értékét a szacharózos készítmény és a HP β CD készítmények 50 °C-on végzett tárolása után összehasonlítjuk: a HP β CD készítmény esetén a HMW értéke a hőstressz - 50 °C 10 hónapon át - után mindössze 4,8 %, míg azonos körülmények között a szacharózt tartalmazó készítmény esetén ez az érték 50 %-nál nagyobb. A HP β CD-nek még magas hőmérsékleten végzett tárolása során is megfigyelhető drámai stabilizáló képessége egy különleges stabilizáló mechanizmus jele - amelyet ez a stabilizáló anyag nyújt - amely minimálissá teszi a fehérje kölcsönhatását, s így csökkenti HMW anyagok kialakulását. Elméletileg feltételezhető, hogy - mivel a ciklodextrin szerkezeti üregeket tartalmaz - a védőmechanizmus kapcsolatban áll bizonyos reakcióképes centrumok betokolódásával [ami magas molekulatömegű (HMW) aggregátumok kialakulásával jár együtt], és ez a betokolódás a kölcsönhatást, így az aggregációt minimálisra csökkenti.

A jelen találmány útján megvalósított, fokozott stabilitás lehetővé teszi a termék tárolását szobahőmérsékleten, és tárolási élettartamát („polc-élettartamát”) növeli. A liofilizált termék alkalmas akár közönséges üvegfiolákba, akár előre töltött injekciós tűbe való csomagolásra. Az előre töltött injekciós tű a terméknek „felhasználásra kész” jelleget biztosít, amely csupán

minimális kezelést igényel, és sürgősségi alkalmazásra igen hasznos. A készítmények használhatósága az eddig ismert megoldásoknál mind klinikai, mind kórházi és sürgősségi (vészhelyzeti) körülmények között kedvezőbb.

Szabadalmi igénypontok

1. Vizes, fiziológiailag hatásos, fehérje jellegű, liofilizálásra alkalmas készítmény, amely

körülbelül 150 és körülbelül 150 000 egység/ml közötti mennyiségben csekély-diol típusú, poli(alkilén-oxid)-dal kovalensen kapcsolt fehérjét,

körülbelül 0,1 és körülbelül 20 tömeg/térf.% közötti mennyiségben ciklodextrint, és

körülbelül 0,01-től körülbelül 50 mM koncentrációban puffert tartalmaz, s amely készítmény pH-értéke körülbelül 5,7 és körülbelül 6,5 között van.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a ciklodextrint körülbelül 1,0 tömeg/térf.%-tól körülbelül 15 tömeg/térf.%-ig terjedő mennyiségben alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy csekély-diol típusú poli(alkilén-oxid)-ként legfeljebb körülbelül 10 tömeg% nem-monoalkoxilezett poli(alkilén-oxid)-ot tartalmazó, lineáris poli(alkilén-oxid)-ot tartalmaz.

4. A 3. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy nem-monoalkoxilezett poli(alkilén-oxid)-ként nem-monometoxilezett polietilénlikolt tartalmaz.

5. A 4. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy körülbelül 1000 daltontól körülbelül 15000 daltonig terjedő átlagos molekulatömegű polietilénlikolt tartalmaz.

6. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy ciklodextrinként β -ciklodextrin valamilyen származékát tartalmazza.

7. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy fehérjeként rekombináns emberi interleukin-4-et (rhIL-4), Carlsberg-féle szubtilizin-proteázt, oxidoreduktázt, katalázt, koleszterin, redukált-NADP: (20- β -hidroxilező) oxigén-oxidoreduktázt (1.14.1.9 katalógusszámú „koleszterin-20-hidroxilázt”), transzferázt, UDP glükózt, hidrolázt, tripszint (katalógusszáma 3.4.4.4.), L-aszparagin-aminohidrolázt (katalógusszáma 3.5.1.1. „aszparagináz”), liázt, izomerázt, illetve ligázt tartalmaz.

8. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy fehérjeként inzulint, ACTH-t, glukagont, szomatotropint, szomatosztatint, timozint, paratiroid hormont, pigmenthormont, szomatomedint, eritropoietint, illetve luteinizáló hormont tartalmaz.

9. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy fehérjeként korion-gonadotropint, hipotalamuszból származó felszabadító faktort, antidiuretikus hormont, pajzsmirigy-stimuláló hormont, kalcitonint, prolektint, alfa-, béta- vagy gamma-interferont, antitesteket (IgG, IgE, IgM, IgD, interleukin-1-, -2-, -3-, -4- vagy -7-et, granulocita-kolónia-stimuláló faktort (GCSF) vagy granulocita-makrofág-kolónia stimuláló faktort (GM-CSF) tartalmaz.

10. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy fehérjeként daganat-elhalási faktort (tumornekrózis-faktor, röviden: TNF), trombocitából (vérlemezkéből) származó növekedési faktort (PDGF), epidermis-növekedési faktort (EGF), idegnövekedési faktort (NGF), csontnövekedési faktort (BGF), növekedési hormont fel-

szabadító faktort (GHRF), papaint, kimotripsint, termolizint, sztreptokinázt vagy aktivázt tartalmaz.

11. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy fehérjeként szuperoxid-diszmutázt tartalmaz.

12. A 11. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy szuperoxid-diszmutázként rekombináns emberi szuperoxid-diszmutázt tartalmaz.

13. Eljárás liofilizált, biológiailag hatásos, fehérje jellegű készítmény előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) 10 tömeg%-nál kevesebb nem-monoalkoxilezett poli(alkilén-oxid)-ot tartalmazó poli(alkilén-oxid)-ot karboxilezünk;

b) a karboxilezett poli(alkilén-oxid)-ot aktiválva aktív poli(alkilén-oxid)-észtert állítunk elő;

c) az így kapott, aktív poli(alkilén-oxid)-észtert kovalensen kapcsoljuk a biológiailag hatásos fehérjéhez;

d) az így kapott, poli(alkilén-oxid)-észtert a biológiailag hatásos fehérjével kovalensen kapcsolva víztartalmú közegben szolubilizáljuk;

e) az így létrehozott vizes közegen ciklodextrint oldva homogén oldatot képezünk;

f) az így kapott oldat pH-értékét körülbelül 5,7 és körülbelül 6,5 közötti értékre állítjuk; és

g) az oldatot liofilizáljuk.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti készítmény előállítására alkalmazzuk.

15. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti készítmény alkalmazása emlősök szöveteiben a szuperoxid-anionok által előidézett kóros állapot kezelésére alkalmazható gyógyszer előállítására.

A meghatalmazott:

**Danubia Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft.**


Szemző Györgyné

szabadalmi ügyvivő

szemző Györgyné