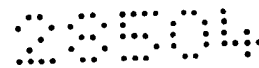


8022/91

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**



54.944/DE

62197

**ELJÁRÁS FIBROBLASZT NÖVEKEDÉSI FAKTORT TARTALMAZÓ GYÓGY-
SZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA VIRUSFERTŐZÉSEK MEGELŐZÉSÉHEZ
ÉS KEZELÉSÉHEZ**

FARMITALIA CARLO ERBA S.R.L., Milánó, Olaszország

A bejelentés napja: 1990.12.18.

Elsőbbsége: 1989.12.22. (22804 A/89) OLASZORSZÁG

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP 90/02231

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/09610

KIVONAT

A találmány fibroblaszt növekedési faktort tartalmazó gyógyszerkészítmények előállításával foglalkozik, amely gyógyszerkészítmények burkolatos vírusok által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmasak. Azok a vírusok, amelyek ellen a nevezett gyógyszerkészítmények hatásosak, elsősorban az alábbiak: 2. típusú Herpes simplex vírus (HSV₂), humán légzőrendszeri szincitiális vírus (HRSV), Semliki Forest vírus (SFV), a szerzett immunhiány szindrómáért felelős vírus (HIV) és a Moloney szarkómáért felelős vírus (MSV).

jelentő ábra vírus

hd

3022/91

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

54.944/DE

Sz. és Szabadalmi Iroda
1061 Budapest,
Dalszínház u. 10.
Telefon 153-3733, 131-4200

92197

NSZOS

AGIK 37/02

AGIK 37/56

ELJÁRÁS FIBROBLASZT NÖVEKEDÉSI FAKTORT TARTALMAZÓ GYÓGY-
SZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA VIRUSFERTŐZÉSEK MEGELŐZÉSÉHEZ
ÉS KEZELÉSÉHEZ

FARMITALIA CARLO ERBA S.R.L., Milánó, OLASZORSZÁG

Feltalálók: VERINI Maria Antonietta, Milánó
UNGERI Domenico, Parabiago
BATTISTINI Carlo, Novate Milanese
CARMINATI Paolo, Milánó
MAZUE Guy, Milánó, OLASZORSZÁG

A bejelentés napja: 1990.12.18.

Elsőbbsége: 1989.12.22. (22804 A/89) OLASZORSZÁG

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP90/02231

A nemzetközi közzététel száma: WO 91/09610

A találmány tárgya eljárás fibroblaszt növekedési faktorokat (FGF) tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására a burkolatos vírusként ismert vírusok által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére; az ilyen vírusok közé értjük pl. az alfa típusú herpeszvírusokat, pl. a 2. típusú Herpes simplex vírust (HSV₂) és a herpesz Varicella zoster, a béta vagy gamma típusú herpeszvírusokat, pl. citomegalovírust, az ortomixovírusokat, pl. humán légzőrendszeri szincitiális vírust (HRSV), a trópusi vírusokat, amelyek felelősek a bőrkiütéses lázért és/vagy az encefalitiszért, pl. a Semliki Forest vírust (SFV), vagy felelősek más trópusi betegségekért, pl. a vírusok "Alfa", "Flavi" vagy "A-rena" csoportjába tartozó vírusokat, a retrovírusokat, pl. a szerzett immunhiány szindrómáért felelős HIV vírust, és azt a vírust, amely a Moloney szarkómáért felelős (MSV).

Bár eddig már sok erőfeszítést tettek, hogy harcoljanak a fentebb említett vírusok által okozott fertőzések, különösen pl. HSV₂ által okozott fertőzések ellen, valóban hatásos gyógyszert ezekre eddig még nem azonosítottak.

A fibroblaszt növekedési faktorok pl. a humán és szarvasmarha bázisos fibroblaszt növekedési faktor (bFGF) és a humán és szarvasmarha savas fibroblaszt növekedési faktor (aFGF).

Az említett faktorokról ismeretes, hogy erőteljes mitogének nagyon sokféle, különböző sejtre, beleértve a fibroblasztokat és véredény hámsejteket. Említést tettek már ezek angi-

ogenikus hatásáról, pontosabban ezek burjánzáskeltő hatásáról a véredények hámsejtjeire, valamint ezek felhasználásáról sebek behegesztésére és szövetek regenerálására, ide értve a csont- és idegszöveteket is.

Kaner és munkatársai /Science 248, 1410-1413 (1990)/ nemrégiben leírták a fibroblaszt növekedési faktorok és analógjaik aktivitását 1 típusú Herpes simplexvírusra (HSV₁), úgy véelve, hogy ez az aktivitás nagy mértékben fajlagos, mert csak a HSV₁ típusú vírusra találták meg ezt az aktivitást.

A növekedési faktor kötődése fajlagos celluláris receptoraikhoz megakadályozhatja, hogy a vírusok receptoraikhoz kötődjenek, amelyek pedig arra tennék képessé ezeket, hogy internalizálódjanak.

Mivel már beszámoltak arról, hogy a HSV₁ és HSV₂ receptorok eltérőek /Vahlne A. és munkatársai: J. Gen. Virology 44, 217-225 (1979)/, nem jósolható meg, vajon a HSV₁ típusú vírusra a növekedési faktor által gyakorolt vírusellenes tevékenység kiterjed-e a HSV₂ típusú vírusokra is. Ezt igazolja az a tény is, hogy egy gyógyszer különböző módon hat HSV₁-re és HSV₂-re /Langeland N. és munkatársai: Biochem. Biophys. Res. Comm. 141, 198-203 (1986)/.

Most arra jöttünk rá, hogy a fibroblaszt növekedési faktorok (FGF) és analógjaik képesek megakadályozni bizonyos vírusok növekedését és fertőzőképességét.

A jelen találmány tárgya eljárás fibroblaszt növekedési

faktort (FGF) tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására burkolatos vírusok által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére, az ilyen vírusok közé értjük pl. az alfa típusú herpeszvírusokat, pl. a 2. típusú Herpes simplex vírust (HSV_2), és a herpesz Varicella zostert, a béta vagy gamma típusú herpeszvírusokat, pl. citomegalovírust, az ortomixovírusokat, pl. influenza vírust, vagy paramixovírusokat, pl. humán légzőrendszeri szincitiális vírust (HRSV), a trópusi vírusokat, amelyek felelősek a bőrkiütéses lázért és/vagy az enkefalitiszért, pl. a Semliki Forest vírust (SFV), vagy felelősek más trópusi betegségekért, pl. a vírusok "Alfa", "Flavi" vagy "Arena" csoportjába tartozó vírusokat, a retrovírusokat, pl. a szerzett immunhiány szindrómáért felelős HIV vírust, és azt a vírust, amely a Moloney szarkómáért felelős (MSV).

Jó példák azokra a vírusokra, amelyekre a fibroblaszt növekedési faktorokat a jelen találmány szerint kipróbálták és hatékonyak találták pl. a 2. típusú Herpes simplex vírus (HSV_2), a humán légzőrendszeri szincitiális vírus (HRSV), a Semliki Forest vírus (SFV), a szerzett immunhiány szindrómáért felelős vírus (HIV) és a Moloney szarkómáért felelős vírus (MSV).

A jelen találmány szerinti fibroblaszt növekedési faktor (FGF) lehet vagy bázisos FGF (bFGF) (humán vagy szarvasmarha), vagy savas FGF (aFGF) (humán vagy szarvasmarha), vagy lehet a fentebb említett bFGF vagy a FGF valamely analógja.



70 80
Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly
90
Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu
100 110
Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr
120
Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser
130 140
Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala
146
Lys Ser.

A szarvasmarha bFGF közel azonos szekvenciával bír, a különbség csak annyi, hogy a humán bFGF 112. helyénél levő Thr aminosav Ser-rel van helyettesítve a szarvasmarha bFGF-ben, és a humán bFGF 128. helyénél levő Ser aminosav Pro-val van helyettesítve a szarvasmarha bFGF-ben.

A humán bFGF molekulája, valamint a szarvasmarha bFGF molekulája rendelkezhet N-terminális kiterjesztéssel, amely tartalmazhatja az alábbi 11 aminosav szekvenciájának egészét vagy részét:

- (i) Gly-Thr-Met-Ala-Ala-Gly-Ser-Ile-Thr-Thr-Leu
elsősorban pl. az alábbi 9 aminosavat:
- (ii) Met-Ala-Ala-Gly-Ser-Ile-Thr-Thr-Leu



A szarvasmarha aFGF szintén 140 aminosavas polipeptid, amelynek aminosavszekvenciája az alábbi, és amelyet nagy mértékű homológia jellemez a humán aFGF-fel:

1 10
Phe Asn Leu Pro Leu Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys
20 30
Ser Asn Gly Gly Tyr Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp
40
Gly Thr Lys Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Cys Ala
50 50
Glu Ser Ile Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Phe
70 80
Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn
90
Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr
100 110
Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys His Trp Phe Val Gly Leu Lys
120
Lys Asn Gly Arg Ser Lys Leu Gly Pro Arg Thr His Phe Gly Gln Lys
130 140

Mind a humán, mind a szarvasmarha aFGF rendelkezhet bizonyos kiterjesztésekkel és kiiktatásokkal az N-terminálisnál hasonlóképpen, mint ahogyan ezt a bFGF molekuláknál leírtuk.

A jelen találmány szerinti fibroblaszt növekedési faktorok lehetnek amidálva is C-terminálisuknál.

A fentebb említett fibroblaszt növekedési faktorok analógja lehet pl. a teljes FGF molekula bármely fragmentuma, akár amidált formában is, amely megtartja azt a képességet, hogy a receptorához kötődjék.

Az ilyen fragmentumokra példákat írnak le a 246753 számú európai szabadalmi közzétételi iratban. Ezek főleg az alábbi aminosavszekvenciákból összeállított polipeptidek lehetnek: mint a humán, mind a szarvasmarha bFGF 93.-120., 97.-120., 100.-120., 103.-120., 103.-146., 106.-115., 106.-118., 106.-120., 106.-125., 106.-130., 106.-135., 106.-140., 106.-146., és 107.-110. aminosavszekvenciái, mind szabad, mind amidált formában.

A jelen találmány szerinti fibroblaszt növekedési faktorok analógja lehet valamely mutein is, amely a fentebb említett FGF polipeptidekből vagy analógjaikból - legyenek ezek akár amidált, akár nem-amidált formában - származik egy vagy több aminosav helyettesítésével és/vagy kiiktatásával, és amely megtartja a növekedési faktor megfelelő tulajdonságait, elsősorban megfelelő képességét, hogy az FGF receptorhoz kötődjék. Így pl. a 112. helyen levő aminosav lehet vagy Thr, vagy Ser, a 128. helyen levő aminosav lehet Ser vagy Pro, a 113. helyen levő aminosav lehet Ala vagy Ser, a 114. helyen levő aminosav lehet Met vagy Trp, és a 115. helyen levő aminosav lehet Phe vagy Tyr. Az FGF különböző formáinak, elsősorban a korábban hivatkozott, az N-terminálisnál különböző típusú kiterjesztésekkel vagy kiiktatásokkal bíró formáinak keverékeit szintén úgy tekintjük, hogy a jelen találmány keretein belül vannak. A "fibroblaszt növekedési

faktor" kifejezés tehát utal minden fentebb említett analógia és keverékre is.

Amint korábban említettük, a jelen találmány szerint alkalmazott növekedési faktorok ismert faktorok, ennek megfelelően ismert eljárásokkal állíthatók elő, pl. rekombináns DNS technikával, elsősorban olyan eljárásokkal, amelyek hasonlóak a korábban már említett PCT W0 86/07595 és PCT W087/01728 számú PCT szabadalmi közrebocsátási iratokban és a 226181, 237966 és 259953 számú európai szabadalmi közrebocsátási iratokban leírt eljárásokhoz.

Ismert technikák alkalmazhatók ahhoz is, hogy FGF analógokat kapjunk, pl. olyan FGF fragmentumokat, amelyek a jelen találmányban alkalmazást nyerhetnek. Lehet használni pl. olyan eljárásokat, amelyek a fentebb említett 246753 számú európai szabadalmi közrebocsátási iratban és az ebben említett szabadalmi utalásokban vannak leírva, ilyen pl. az eljárás szilárd fázisú szintézis segítségével, amint ezt a JACS 85, 2149 (1963) irodalmi helyen leírják.

A kémiai szintézis olyan fragmentumoknál előnyös, amelyeknek aminosav-lánca rövid, pl. 40 aminosavnál kevesebbet tartalmaznak, míg az előállítás rekombináns DNS technikával akkor előnyös, ha pl. teljes hosszúságú natív FGF molekulákat vagy analógjaikat szándékozunk elkészíteni, amelyek pl. 40 aminosavnál többet tartalmaznak.

Abból a célból, hogy a jelen találmány szerint bemutassuk a

fibroblaszt növekedési faktorok vírusellenes aktivitását, vizsgálatokat hajtunk végre különböző típusokhoz és családokhoz tartozó, DNS és RNS természetű vírusokat alkalmazva. Példaként azokat a kísérleteket adjuk meg, amelyeket sokféle, jelen találmány szerinti fibroblaszt növekedési faktor aktivitásának bizonyítására végzünk HSV₂, SFV, HRSV, HIV és MSV vírusok ellen. Ezekben a kísérletekben az alábbi törzseket használjuk: humán sima artéria izomsejtek diploid törzse (A617), epiteloid karcinóma heteroploid törzse (Hep 2), humán primer limfociták tenyésztete, és Balb C egér primer fibroblasztok tenyésztete.

Az első két törzs azonos tűrőképességet mutat a Herpes simplex vírus 2. típusú törzsével (HSV₂) és a Semliki Forest vírussal (SFV) szemben, ezt megfigyelhetjük mind a 24 órára stabilizált egy-rétegben, mind a tripszinezéssel kapott sejtszuszpenziókban, mégpedig 96 üreges (szövet/tenyésztet) lemezekon titrálva és megfigyelve a citopátikus hatás végpontokat (CEP).

Az A617 nem tűrőképes a humán légzőrendszeri szincitiális vírussal (HRSV) szemben, ezért csak a Hep 2 sejteket alkalmazhatjuk ebben a fertőzésben, akár egy-rétegben, akár szuszpenzióban. Az egy-rétegekkel végzett kísérletekben a vizsgálandó anyagok különböző koncentrációit inkubáljuk a tenyészközeg eltávolítása után a tenyészetekben, amelyek a 96 üregben nőttek.

2 órás, 37⁰C hőmérsékleten és 5% CO₂-ben végzett inkubálás

után 50-100 tarfoltképző egység (PFU) HSV₂-t, vagy 50-100 50%-os fertőző egység (ID₅₀) SFV-t vagy HRSV-t adunk hozzá.

Más kísérletekben a sejtszuspenziót közvetlenül kezeljük a vizsgálandó anyagok különböző koncentrációival 96 üreges lemezekben.

Két órás, 37^oC-hőmérsékleten és 5% CO₂-ben végzett inkubálás után fertőzést indukálunk, amint fentebb leírtuk.

A CPE mértékét 24-96 órás inkubálási időtartam után határozzuk meg az alkalmazott vírus típusától függően olyan módon, hogy területeket jelölünk meg a friss készítményeknél, amikor fordított mikroszkóppal megfigyeljük (35-szörös nagyítás). A CPE csökkenésének százalékát a kezelt tenyészetben a fertőzött kontrollokkal összehasonlítva átvisszük féllogaritmikus koordinátapapírra.

Ugyanezeket a tenyészeteket azután lefagyasztjuk abból a célból, hogy a vírustartalmakat különböző kísérleti körülmények közt titrálhassuk (I.V. titrálás).

A kriolizátumokat valamely standard technikával titráljuk, amely alkalmas arra, hogy a Leighton csövekben levő lemezekben nőtt Hep 2 összefolyó egy-rétegein a tarfoltokat meghatározzuk.

Az I.V. titert PFU értékben adjuk meg különböző kísérleti körülmények között, és a kontrollok, valamint kezelt tenyészetek közti különbségek szignifikanciáját a Dunnett

vizsgálat szerint értékeljük (JASA, 1955. december, 1096-1121).

Az aktivitást HIV vírusra humán perifériás limfociták primer tenyészetein vizsgáljuk, ahol a limfocitákat gradiens centrifugálással izoláljuk és mitogénekkal stimuláljuk.

A fertőzést HIV standard preparátummal végezzük, és a fertőzött tenyészeteket 4 napon át inkubáljuk a gyógyszer jelenlétében.

Az eredmények értékelését úgy végezzük, hogy a fertőzéstől számított harmadik és negyedik napon mérjük P24 mag (core) vírusfehérje-mennyiségét (Elisa-val), és a szintetizált RNS teljes mennyiségét (nukleinsavval való molekuláris hibridizációs technikával) a kontrollal összehasonlítva.

Az aktivitást Moloney szarkóma vírusra (MSV) standard mennyiségű MSV vírussal fertőzött Balb C egerek embrionális fibroblasztjainak primer tenyészetein vizsgáljuk. Az eredmények értékelésének alapja a transzformációs gócpontok csökkenése a kezelt tenyészetekben a kontroll tenyészetekkel összehasonlítva.

A fentebb említett kísérletek eredményeit a mellékelt 1.-9. ábrákban adjuk meg.

Az ábrákkal kapcsolatban az alábbi magyarázatokat adjuk meg.

Az FCE 26184 anyag (1. anyag) egy 153-154 aminosavból álló humán bFGF-et képvisel, pontosabban mintegy 50:50 arányú keverékét az alábbiaknak: a., egy 153 aminosavból álló molekula, amely a humán bFGF korábban bemutatott 146 aminosavas szekvenciáját tartalmazza, tartalmaz továbbá egy 7 aminosavból álló kiterjesztést, amelyet az előbbieken már ismertettünk (iv) szekvencia néven, és b., egy 154 aminosavból álló molekula, amely a humán bFGF korábban bemutatott 146 aminosavas szekvenciáját tartalmazza, tartalmaz továbbá egy 8 aminosavból álló kiterjesztést, amelyet az előbbieken már ismertettünk (iii) szekvencia néven.

Ennek az anyagnak az előállítását a későbbiekben, a kiviteli példákban ismertetjük.

A 89-0925 anyag (2. anyag) egy 145 aminosavból álló humán bFGF-et képvisel, vagyis egy olyan vegyületet, amely a humán bFGF korábban bemutatott 146 aminosavas szekvenciáját tartalmazza, de az N -terminálisról hiányzik a Pro aminosav.

Ennek az anyagnak az elkészítéséhez azt a munkamenetet használhatjuk fel, amelyet a 363675 számú európai szabadalmi közreboocsátási irat ismertet.

Az "Amersham bovine"-ként bemutatott anyag (3. anyag) egy kereskedelmi forgalomban levő, 146 aminosavból álló szarvasmarha rekombináns bFGF (az Amersham cég termék).

A "(Serval) bovine"-ként bemutatott anyag (3'. anyag) egy

kereskedelmi forgalomban levő szarvasmarha bFGF, amelyet hipofízisből extraháltak (a Serva cég terméke).

Az 1A. és 1B. ábrák az 1. anyag (folytonos vonal: $-\otimes-$) és 2. anyag (szaggatott vonal: $--\circ--$) CPE-jének gátlási százaléklékát mutatják be HSV₂ (592. törzs) vírusfertőzésre, amelyet A617 sejtek (1A. ábra) illetve Hep#2 sejtek (1B. ábra) szuszpenziójában kapunk; a CPE csökkenés százalékos értékei az ordinátán, míg a bFGF koncentráció értékei az abszcisszán szerepelnek.

A 2A. és 2B. ábrák az 1. anyag CPE-jének gátlási százaléklékát mutatják be HSV₂ (592. törzs) vírusfertőzésre, amelyet A617 sejtek (2A. ábra) illetve Hep#2 sejtek (2B. ábra) sejtsuszpenziójában (szaggatott vonal $--\circ--$) és — párhuzamosan — egy-rétegén (folyamatos vonal $-\square-$) kapunk; a CPE csökkenés százalékos értékei az ordinátán, míg a bFGF koncentráció értékei az abszcisszán szerepelnek.

A 3A. és 3B. ábrák a 2. anyag CPE-jének gátlási százaléklékát mutatják be HSV₂ (592. törzs) vírusfertőzésre, amelyet A617 sejtek (3A. ábra) illetve Hep#2 sejtek (3B. ábra) sejtsuszpenziójában (szaggatott vonal $--\circ--$) és -- párhuzamosan — egy-rétegén (folyamatos vonal $-\square-$) kapunk; a CPE csökkenés százalékos értékei az ordinátán, míg a bFGF koncentráció értékei az abszcisszán szerepelnek.

A 4. ábra az 1. anyag (középső hisztogram) és a 2. anyag (jobboldali hisztogram) aktivitását mutatja be a kontrollal (baloldali hisztogram) összehasonlítva, a HSV₂ (592. törzs)

fertőző vírus termelődésének csökkenése alapján becsülve Hep 2# sejttenyészetekben; a hisztogramokon az ordinátán a különböző kísérleti csoportokban talált vírus-index van megadva 10^4 pfu/ml-ben, míg az abszcisszán a bFGF koncentráció értékek vannak megadva.

Az 5. ábra az 1. anyag ($\text{---}\otimes\text{---}$ vonal), 2. anyag ($\text{---}\circ\text{---}$ vonal) és 3'. anyag ($\text{---}\triangle\text{---}$ vonal) CPE-jének gátlási százalékát mutatja be HRSV vírusfertőzésre, amelyet Hep # 2 sejtek egy-rétegén kapunk; a CPE csökkenés százalékos értékei az ordinátán, míg a bFGF koncentráció értékei az abszcisszán szerepelnek.

A 6. ábra az 1. anyag ($\text{---}\otimes\text{---}$ vonal), 2. anyag ($\text{---}\circ\text{---}$ vonal) és 3'. anyag ($\text{---}\triangle\text{---}$ vonal) CPE-jének gátlási százalékát mutatja be SFV vírusfertőzésre, amelyet A617 sejtek egy-rétegén kapunk; a CPE csökkenés százalékos értékei az ordinátán, míg a bFGF koncentráció értékei az abszcisszán szerepelnek.

A 7. ábra az ordinátán az 1. anyag százalékos gátlását mutatja be a P24 vírusfehérje szintézisre a harmadik napon (fehér területek) és a negyedik napon (pontozott területek) a HIV vírussal végzett fertőzés időpontjától számítva; az abszcisszán a bFGF koncentráció szerepel.

A 8. ábra az ordinátán az 1. anyag százalékos gátlását mutatja be a vírus RNS szintézisre a harmadik napon (fehér területek) és a negyedik napon (pontozott területek) a HIV

vírussal végzett fertőzés időpontjától számítva; az abszcisszán a bFGF koncentráció szerepel.

A 9. ábra az 1. vegyület százalékos gátlását mutatja be az MSV (Moloney szarkóma vírus) által indukált transzformációs gócpontokra; az ordinátán szerepelnek a százalékos gátlási értékek, míg az abszcisszán szerepelnek a bFGF koncentráció értékek.

A jelen találmány szerinti növekedési faktorokat egy vagy több említett faktort tartalmazó gyógyászati kompozíció formájában adhatjuk be; ilyen pl. egy olyan kompozíció, amely aktív anyagként a nevezett növekedési faktorokat vagy gyógyászatilag elfogadható sókat tartalmazza egy vagy több segédanyaggal, pl. gyógyászatilag elfogadható hordozókkal és/vagy hígítókkal és/vagy kötőanyaggal együtt.

A gyógyászatilag elfogadható sók gyógyászatilag elfogadható szervetlen savak, pl. sósav, bróm-hidrogén, kénsav vagy foszforsav, vagy gyógyászatilag elfogadható szerves savak, pl. ecetsav, citromsav, maleinsav, almasav, borostyánkősav, aszkorbinsav vagy borkősav sói lehetnek.

Ezeket be lehet adni helyileg, vagy parenterális, intravénás, intratekális vagy orális úton.

A beadásnak különösen előnyös útja a helyileg végzett beadás, amelyet pl. HSV₂ által okozott genitális fertőzés vagy HRSV által okozott légzőrendszeri fertőzések kezelésében

alkalmazhatunk.

A helyi beadáshoz alkalmas kompozíciók lehetnek pl. krémek, kenőcsök, balzsamok, vagy borogatóvizek dermatológiai kezeléshez; hüvelykúpok vagy pesszárriumok a hüvelyi fertőzések kezeléséhez; szemcseppek szemfertőzések kezeléséhez; vagy aeroszolok a légzési rendszer fertőzéseinek kezeléséhez, különösen pl. HRSV fertőzések kezeléséhez újszülöttekben.

Ezeket a készítményeket ismert technikák szerint készíthetjük el, így pl. a krémeket, kenőcsöket, balzsamokat vagy borogatóvizeket az aktív vegyület összekeverésével kaphatjuk meg hagyományos olajos vagy emulgeáló segédanyagokkal.

Az intravénás vagy intratekális beadáshoz alkalmas kompozíciók lehetnek pl. steril vizes oldatok vagy steril izotóniás, fiziológiás sóoldatok.

A parenterális beadáshoz alkalmas kompozíció lehet pl. szuszpenzió vagy oldat, amely az aktív anyagot és egy gyógyászatilag elfogadható hordozót, pl. steril vizet, olívaolajat, glikolokat, mint propilén-glikolt tartalmaz, és ha szükséges, tartalmaz megfelelő mennyiségű lidokain-hidrokloridot is.

Az orális beadáshoz alkalmas kiszerezés lehet pl. gyomor- és bél-rezisztens réteggel borított tabletták vagy kapszula, amelyben az aktív anyag el van keverve pl. hígítókkal, mint laktózzal, glükózzal és hasonlókkal; csusztatóanyagokkal, mint kovafölddel, talkummal, sztearinsavval és hasonlókkal;

kötőanyagokkal, mint keményítővel; szétesést elősegítő anyagokkal, mint alginsavval és alginátokkal; és más segédanyagokkal, amelyeket általában alkalmaznak ilyen típusú készítményekben.

A jelen találmány szerinti gyógyászati kompozíciókat általában ismert technikákkal és a galenusi készítmények területében általánosan használt munkamenetekkel állíthatjuk elő.

Az előnyös dózis függ a kezelendő beteg betegségi állapotától és kondíciójától, az alkalmazott készítmény típusától, és a kezelés időtartamának hosszúságától.

Igy pl. helyi beadásoknál, pl. krémek, kenőcsök, balzsamok, borogatóvizek, hüvelypesszárumok, hüvely-golyócskák és szemcseppek beadásánál a jelen találmány szerinti növekedési faktorokat 1 mikromól és 1 millimól közti koncentrációtartományban alkalmazhatjuk.

A jelen találmány szerinti növekedési faktorok beadása hasznos lehet mind a vírus elterjedésének megakadályozásában, mind a már fertőzött betegek kezelésében.

Amikor kezelést igénylő sérülések is vannak, a bFGF és a FGF különösen kívánatos ezen faktorok ismert behegesztési és szövet-helyreállító tulajdonságai miatt.

Az alábbi kiviteli példák nem korlátozó jelleggel bemutatják

a jelen találmány szerinti FGF növekedési faktorok és az ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítási eljárásait.

1. példa

b-FGF előállítása: FCE 26185

A b-FGF-hez tartozó szintetikus szekvencia és az ezt a szekvenciát hordozó kifejező plazmid megalkotását az EP-A-363675 számú európai szabadalmi közrebocsátási iratban leírt munkamenet szerint hajtjuk végre. A fermentációs és tisztítási folyamatot az alábbiak szerint végezzük.

(a) Fermentációs folyamat

B típusú E.coli baktériumtörzset (a Pasteur Institute gyűjteményéből) transzformálunk egy olyan plazmiddal, amely hordozza mind a b-FGF-et kódoló humán gént, mind a tetraciklin rezisztencia génjét. Ezt a transzformált törzset alkalmazzuk rekombináns, nem glikozilezett h-b-FGF (humán b-FGF) előállítására. Elkészítjük ennek a törzsnek a minta sejtbankját (Master Cell Bank) (15 fagyasztva szárított ampulla) és működő sejtbankját /Working Cell Bank (W.C.B)/ (70 ampulla folyékony nitrogénben tárolva -190°C hőmérsékleten). Egy W.C.B. ampulla tartalmát alkalmazzuk inokulumpént a fermentációs fázisban.

A fermentációs folyamatot 10 literes, 4 liter tenyésztő tápközeggel töltött fermentorokban végezzük.

A tápközeghez tetraciklin hidrokloridot : adunk abból a célból, hogy fenntartsuk a törzsszelekció körülményeit.

20 órás, 37⁰C hőmérsékleten végzett növesztés után a végső biomassa 42[±]2 g/l szárastömeg, és a bFGF termelése 2500[±]500 mg/l, amint ezt összehasonlító gélelektroforézissel mérjük.

A fermentációs fázis^{korán} szükséges a dúsítás tiszta oxigénben, hogy lehetővé tegyük a jelentős baktérium-növekedést.

(b) Kezdeti tisztítás

A sejteket (mikroorganizmusokat) centrifugálással elkülönítjük a teljes fermentációs tápközegből. Az így létrejövő üledéket újra szuszpendáljuk nátriumfoszfát pufferban, amely nátrium-kloridot is tartalmaz.

Legalább három átbocsátás szükséges nagynyomású homogenizátoron, hogy a sejteket hatásosan összezzuk. Az így létrejövő sejt-lizátumot centrifugálással tisztítjuk és a felülúszót összegyűjtjük a további feldolgozáshoz.

(c) Tisztítás

A tisztított felülúszót Sepharose S Fast Flow oszlopra (kationcserélő) visszük fel és a terméket erről az oszlopról foszfát-pufferban levő növekvő nátrium-klorid koncentráció gradienst alkalmazva eluáljuk. A terméket tovább tisztítjuk

Heparin Sepharose 6 B oszlopon, foszfátpufferban levő növekvő nátrium-klorid koncentrációgradienst alkalmazva. Végül puffer-cserét végzünk Sephadex G25 gyantán, hogy nagy tömegű termék-pufferban (nátrium-foszfát-EDTA) levő terméket kapjunk.

(d) Oszlop tisztítás (regenerálás)

A Sepharose S Fast Flow és Sephadex G25 oszlopokat olyan módon regeneráljuk, hogy nátrium-hidroxid oldattal mossuk.

A Heparin Sepharose oszlopot felváltva mossuk 3 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó 8,5, illetve 5,5 pH értékű oldatokkal.

Végül az FCE 26184 jelű bFGF anyagot kapjuk. Ez mintegy 50:50 arányú keveréke az alábbi két vegyületnek:

- egy 154 aminosavból álló humán bFGF, amely megfelel az Abraham és munkatársai által leírt 155 aminosavas forma aminosav-szekvenciájának (ez az ott mellékelt 1. ábrának felel meg), de annak N-terminális Met gyöke nélkül, és
- egy 153 aminosavból álló humán bFGF, amely lényegében a fenti 154 aminosavból álló formát tartalmazza, de az 1. helyen levő Ala gyök nélkül.

2. példa

bFGF fragmentumok előállítás

A bFGF 93.-120. fragmentumának, amelynek képlete:

H-Phe-Phe-Phe-Glu-Arg-Leu-Glu-Ser-Asn-Asn-Tyr-Asn-Thr-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr-Val-Ala-Leu-Lys-Arg-NH₂, szintézisét egymást követő lépésekben hajtjuk végre, peptid szintetizáló berendezést és MBHA gyantát alkalmazva. A gyantához való kötődést BOC-Val-lal érjük el, a 4,292,313 lajstromszámú amerikai egyesült államok-beli szabadalmi leírásban ismertett munkamenet szerint. A gyantához való kötődés után az amino védőcsoportot trifluor-ecetsavas, 0°C hőmérsékleten végzett kezeléssel eltávolítjuk. A védőcsoport eltávolítása és semlegesítése után a peptidláncot lépésről-lépésre megalkotjuk a gyantán, a 3,904,594 lajstromszámú amerikai egyesült államok-beli munkamenetet követve.

Hasonló eljárást alkalmazhatunk az alábbi peptidek előállításához:

1. A bFGF 97.-120. fragmentuma az alábbi képlettel:

H-Arg-Leu-Glu-Ser-Asn-Asn-Tyr-Asn-Thr-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-

Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr-Val-Ala-Leu-Lys-Arg-NH₂;

2. A bFGF 100.-120. fragmentuma az alábbi képlettel:

H-Ser-Asn-Asn-Tyr-Asn-Thr-Tyr-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-

Ser-Trp-Tyr-Val-Ala-Leu-Lys-Arg-NH₂.

3. A 103.-120. fragmentum az alábbi képlettel:

H-Tyr-Asn-Thr-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr-Val-

Ala-Leu-Lys-Arg-NH₂;

4. A 103.-146. fragmentum az alábbi képlettel:
 H-Tyr-Asn-Thr-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr-Val-
 Ala-Leu-Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu-Gly-Pro-Lys-Thr-
 Gly-Pro-Gly-Gln-Lys-Ala-Ile-Leu-Phe-Leu-Pro-Met-Ser-Ala-
 Lys-Ser-NH₂;
5. A 106.-115. fragmentum az alábbi képlettel:
 H-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr-NH₂;
6. A 106.-118. fragmentum az alábbi képlettel:
 H-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr-Val-Ala-Leu-NH₂;
7. A 106.-120. fragmentum az alábbi képlettel:
 H-Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr-Val-Ala-Leu-Lys
 -Arg-NH₂;
8. a bFGF 106.-125. amidált fragmentuma,
9. a bFGF 106.-130. amidált fragmentuma,
10. a bFGF 106.-135. amidált fragmentuma,
11. a bFGF 106.-140. amidált fragmentuma,
12. a bFGF 106.-146. amidált fragmentuma,
13. a bFGF 107.-110. amidált fragmentuma,

Kiszerezési példa

FGF szemcseppet készítünk, amely az alábbi alkotórészekből áll:

2., anyag	2 μg
Dextrán-szulfát	600 μg
Injekció minőségű víz	10 ml

Ezt az oldatot liofilezhetjük, és 10 ml megfelelő steril hígító folyadékkal közvetlenül a felhasználás időpontjában állíthatjuk helyre.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Fibroblaszt növekedési faktor alkalmazása gyógyszerkészítmények előállítására azzal jellemezve, hogy burkolatos vírusok, mégpedig alfa típusú herpesz vírus - kivéve az 1. típusú Herpes simplex vírust (HSV₁)-, béta- vagy gamma típusú herpesz vírus, ortomixovírus vagy paramixovírus, valamely trópusi vírus vagy retrovírus, által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazzuk.
2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a fibroblaszt növekedési faktort alfa típusú herpesz vírus, mégpedig 2. típusú Herpes simplex vírus (HSV₂) által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazzuk.
3. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a fibroblaszt növekedési faktort alfa típusú herpesz vírus, mégpedig Herpes varicella/zoster által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazzuk.
4. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a fibroblaszt növekedési faktort béta vagy gamma típusú herpesz vírus, mégpedig citomegalovírus által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazzuk.

5. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a fibroblaszt növekedési faktort ortomixovírus, mégpedig influenza vírus által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazzuk.
6. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a fibroblaszt növekedési faktort paramixovírus, mégpedig humán légzőrendszeri szincitiális vírus (HRSV) által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazzuk.
7. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a fibroblaszt növekedési faktort valamely trópusi vírus, mégpedig Semliki Forest vírus (SFV) által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazzuk.
8. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a fibroblaszt növekedési faktort retrovírus, mégpedig HIV vírus által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazzuk.
9. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy a fibroblaszt növekedési faktort retrovírus, mégpedig Moloney szarkóma vírus (MSV) által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazzuk.

10. Az 1.-9. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy fibroblaszt növekedési faktorként bázisos fibroblaszt növekedési faktort (bFGF) alkalmazunk.
11. A 10. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy bázisos fibroblaszt növekedési faktorként humán bFGF-et alkalmazunk vagy ennek valamely analógját alkalmazzuk.
12. A 10. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy bázisos fibroblaszt növekedési faktorként szarvasmarha bFGF-et alkalmazunk vagy ennek valamely analógját alkalmazzuk.
13. Az 1.-9. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy fibroblaszt növekedési faktorként savas fibroblaszt növekedési faktort (aFGF) alkalmazunk.
14. A 13. igénypont szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy savas fibroblaszt növekedési faktorként humán aFGF-et alkalmazunk, vagy ennek valamely analógját alkalmazzuk.
15. A 11., 12., vagy 14. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás azzal jellemezve, hogy analóggként a teljes molekula valamely fragmentumát alkalmazzuk.
16. A 10.-15. igénypontok bármelyikében meghatározott fibroblaszt növekedési faktor azzal jellemezve, hogy az

1.-9. igénypontok bármelyikében meghatározott burkolatos vírusok által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére alkalmazzuk ezeket.

17. Eljárás az 1.-9. igénypontokban meghatározott burkolatos vírusok által okozott vírusfertőzések megelőzésére és kezelésére betegekben azzal jellemezve, hogy a betegnek a 10.-15. igénypontok bármelyike szerinti fibroblaszt növekedési faktor hatékony mennyiségét adjuk be.

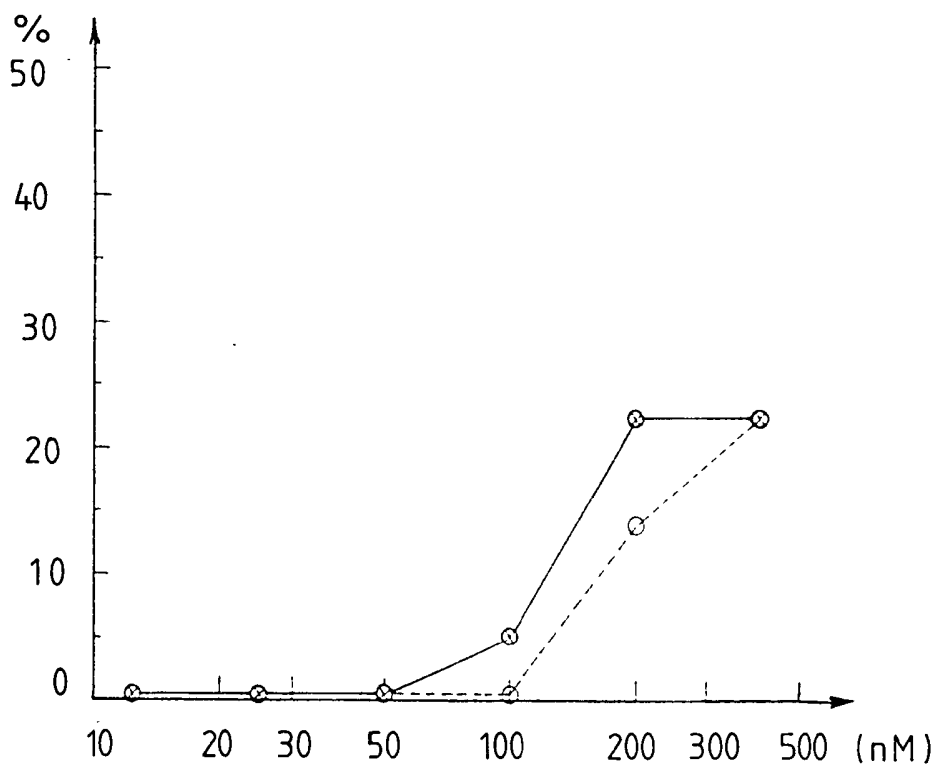
S.B.G.&K.
 Pályázati és Szabadalmi Iroda
 1061 Budapest
 Dalszínház u. 10.
 Telefon: 153-3733, 131-4200

28 oldal
 + 4 ábroldal

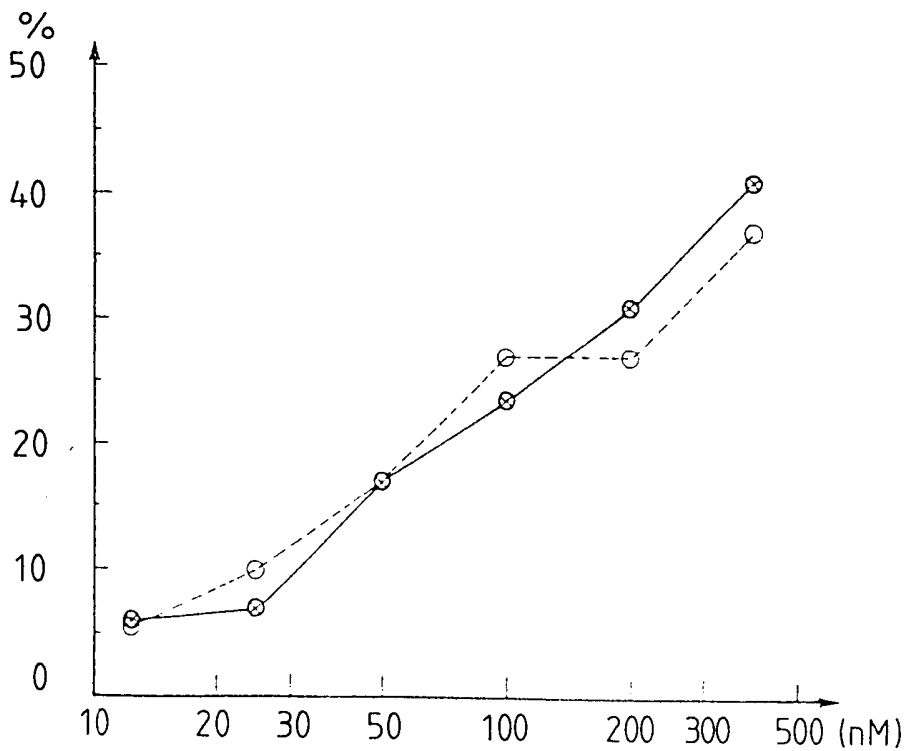
 35 oldal mell. ábra vírus

Juel

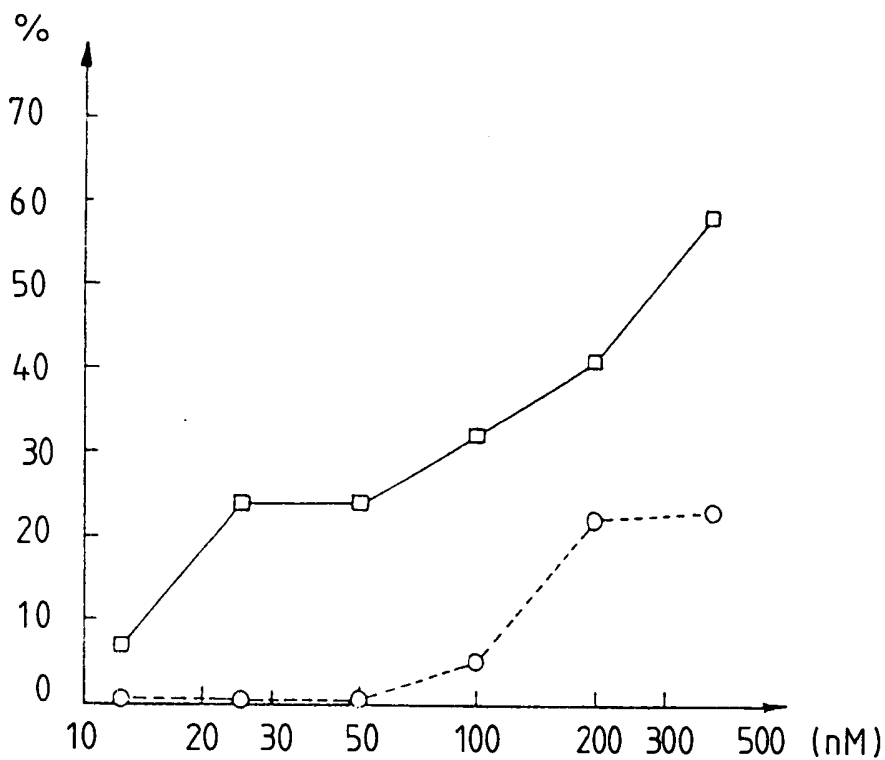
52197



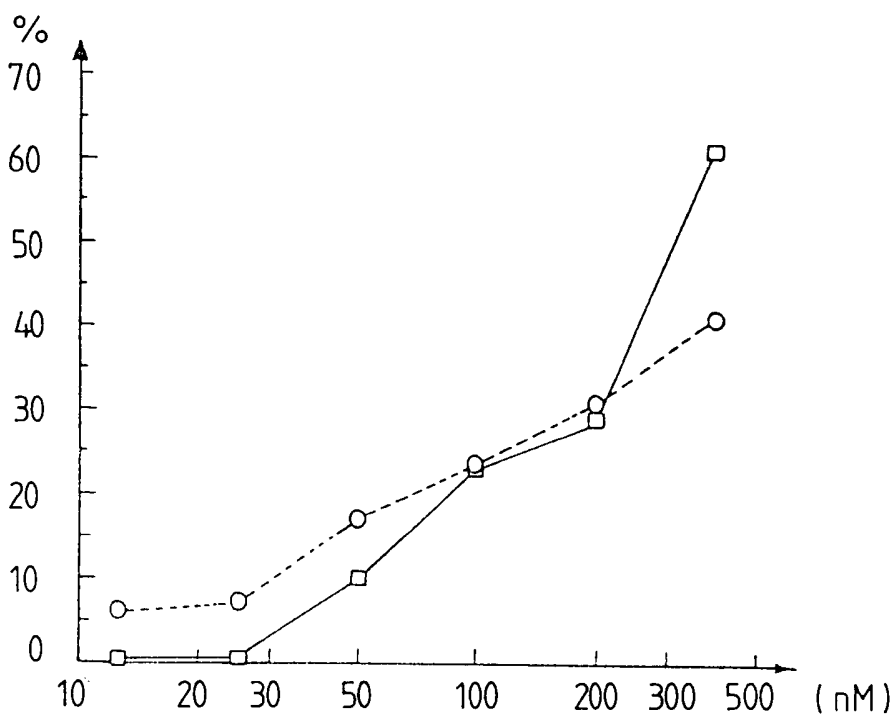
1. A. ábra



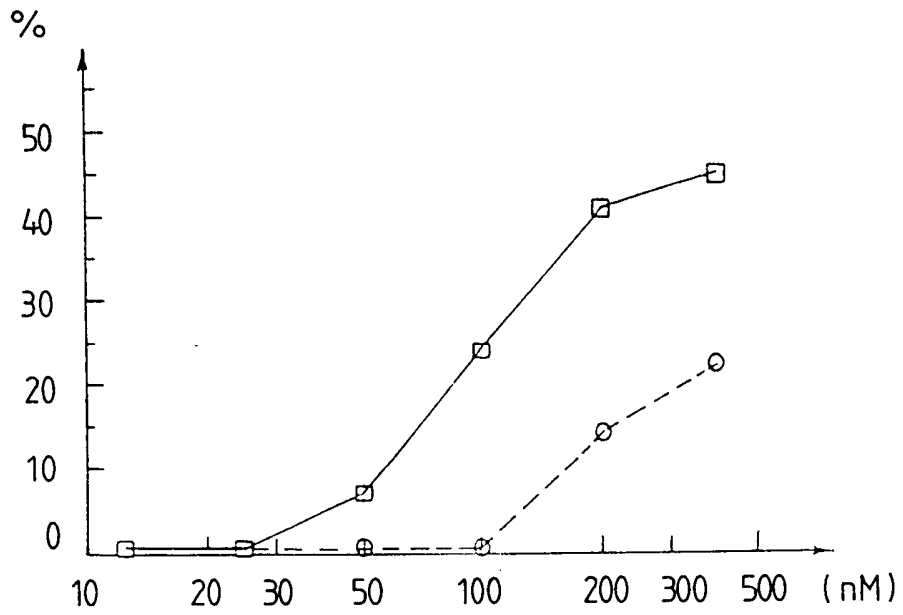
1. B. ábra



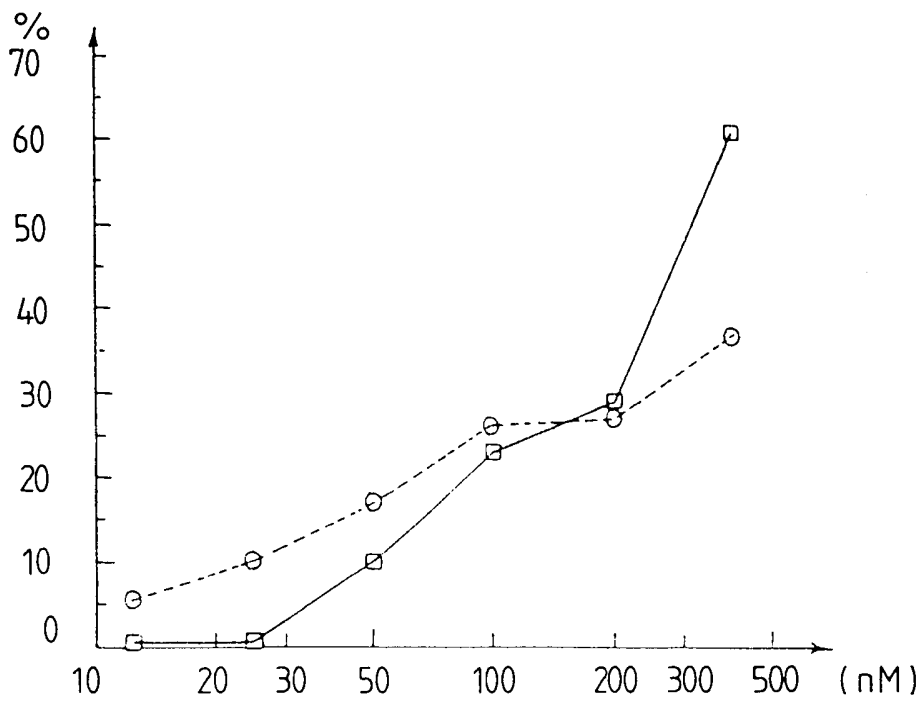
2.A. ábra



2.B. ábra

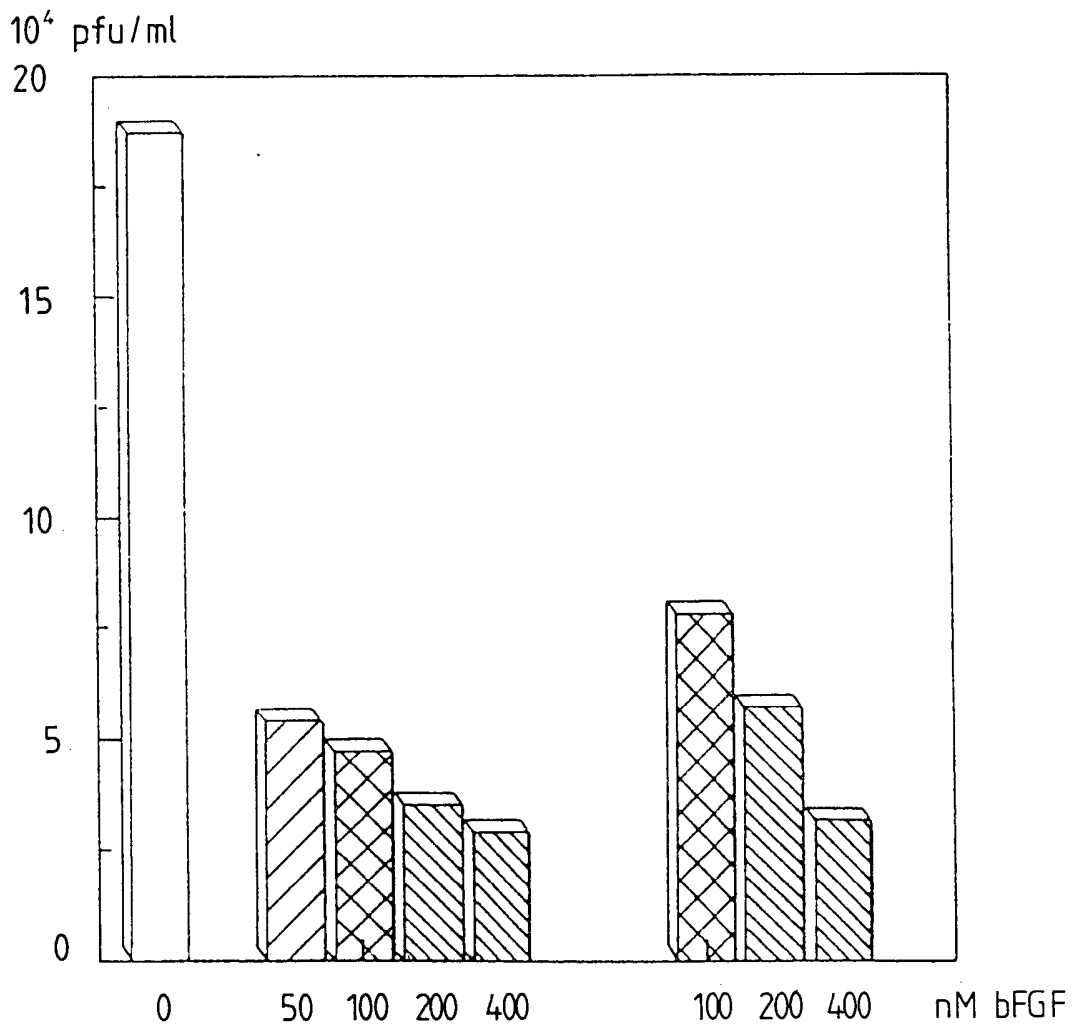


3.A. ábra



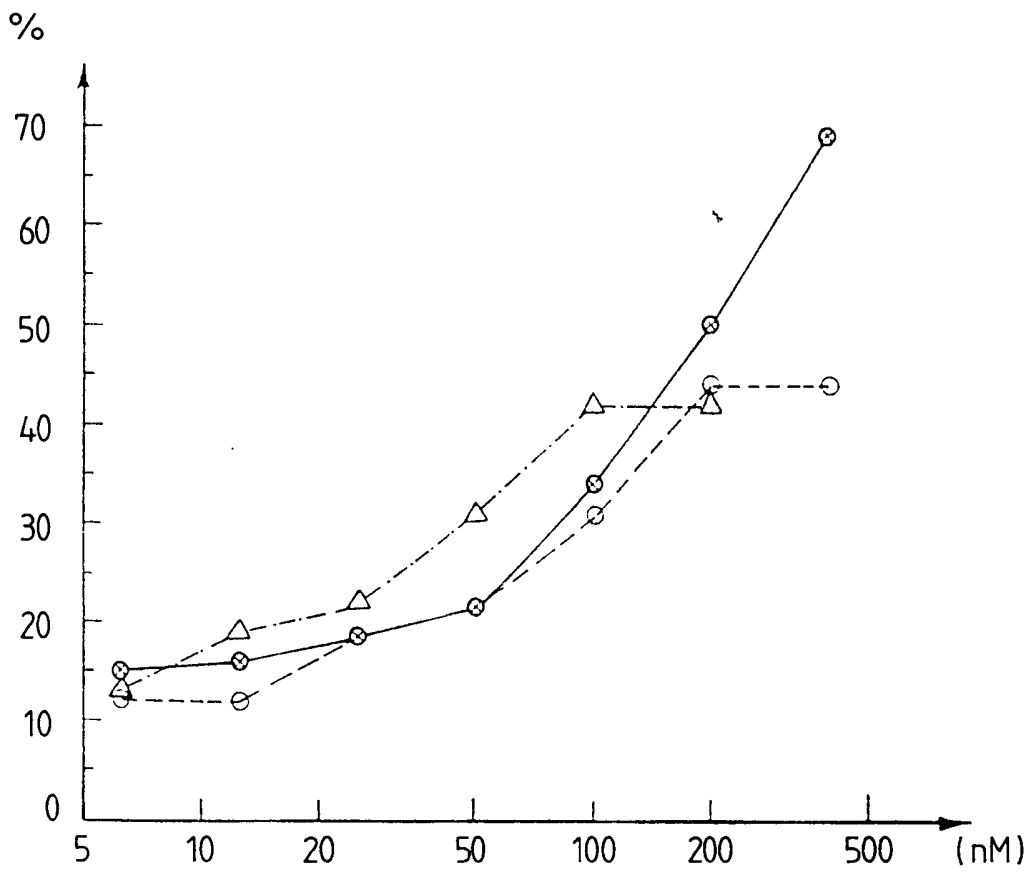
3.B. ábra

Ugyvédi és Szabadalmi Iroda
 1061 Budapest,
 Dalszínház u. 10.
 Telefon 153-3733, 151-4200

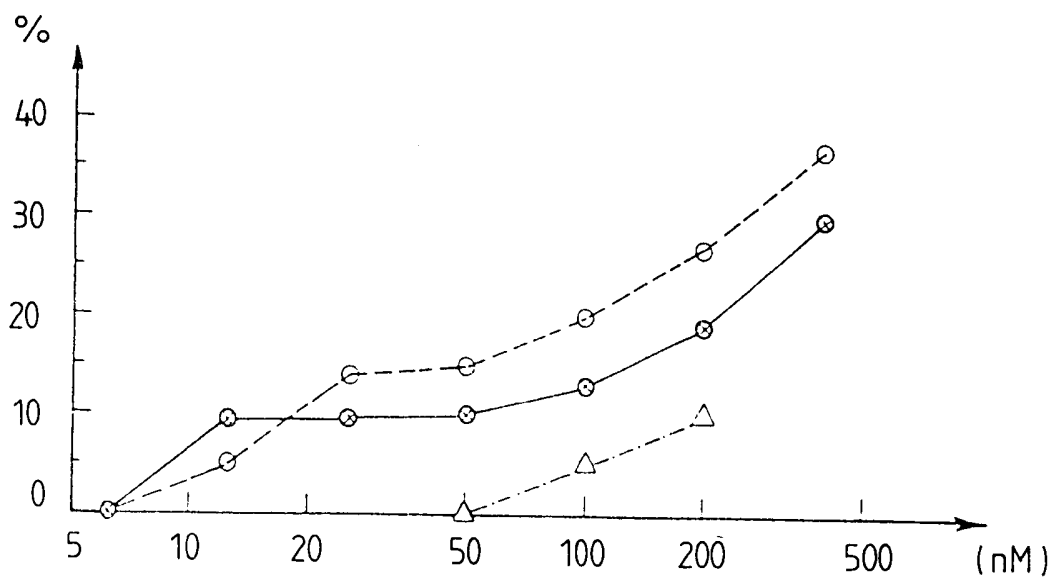


4. ábra

Magyarországi
 Szegedi és Szabadalmi Iroda
 1061 Budapest,
 Dózsázház u. 10.
 Telefon 183-3733, 131-4200

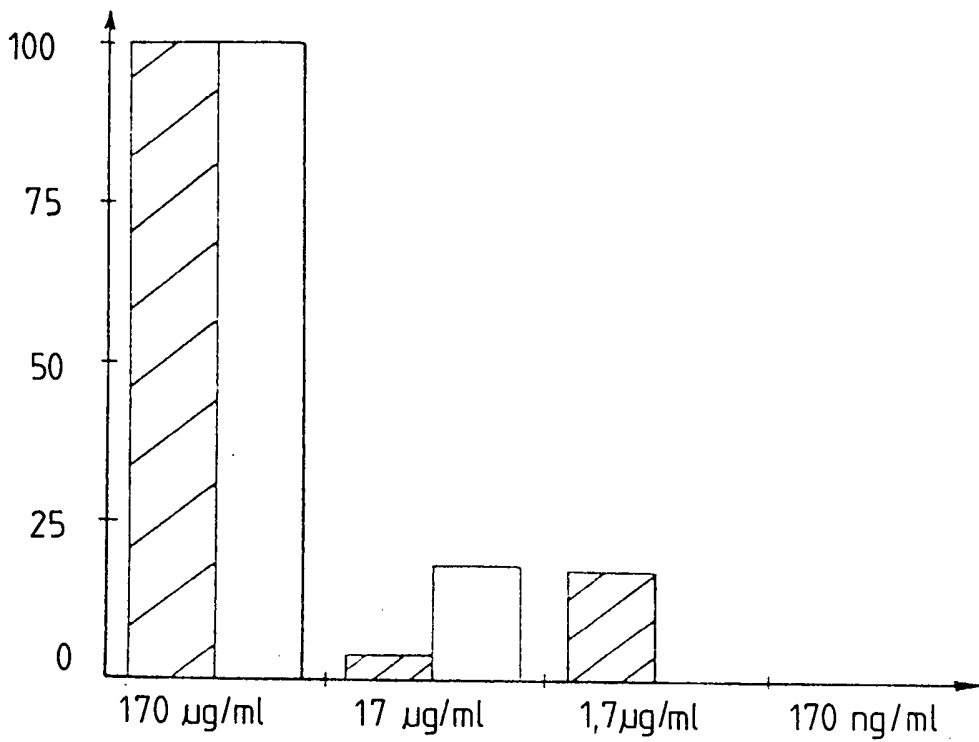


5. ábra

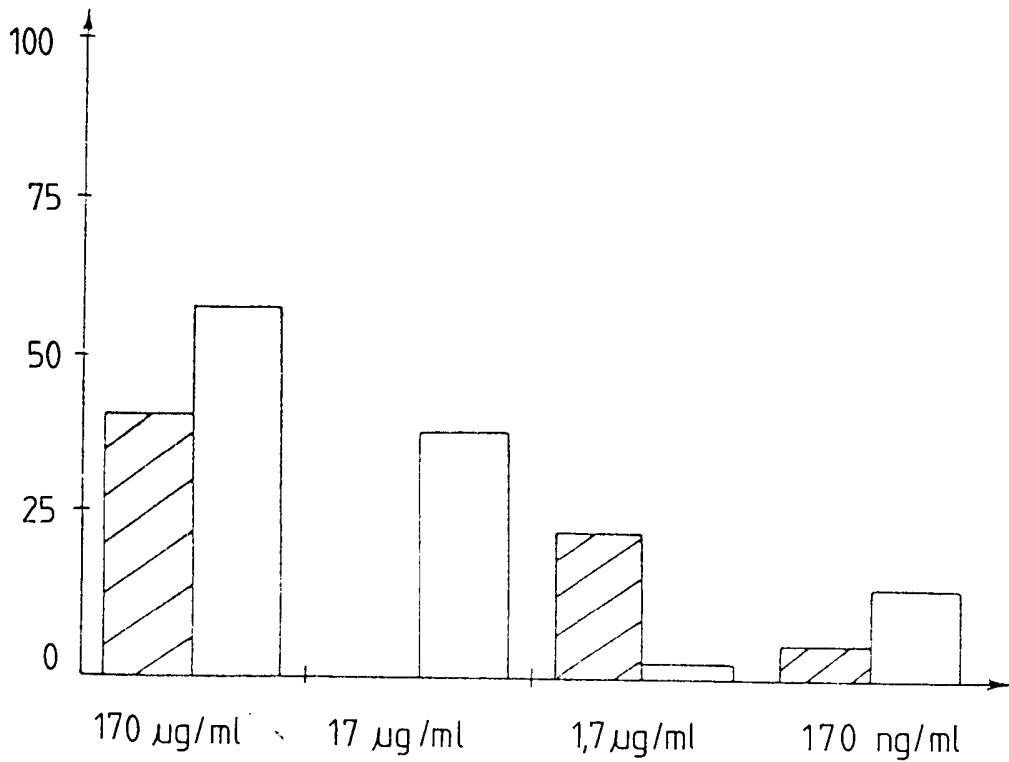


6. ábra

Magyarországi Szabadalmi Iroda
 1061 Budapest,
 Dalszínház u. 10.
 Telefon 153-3733, 131-4200

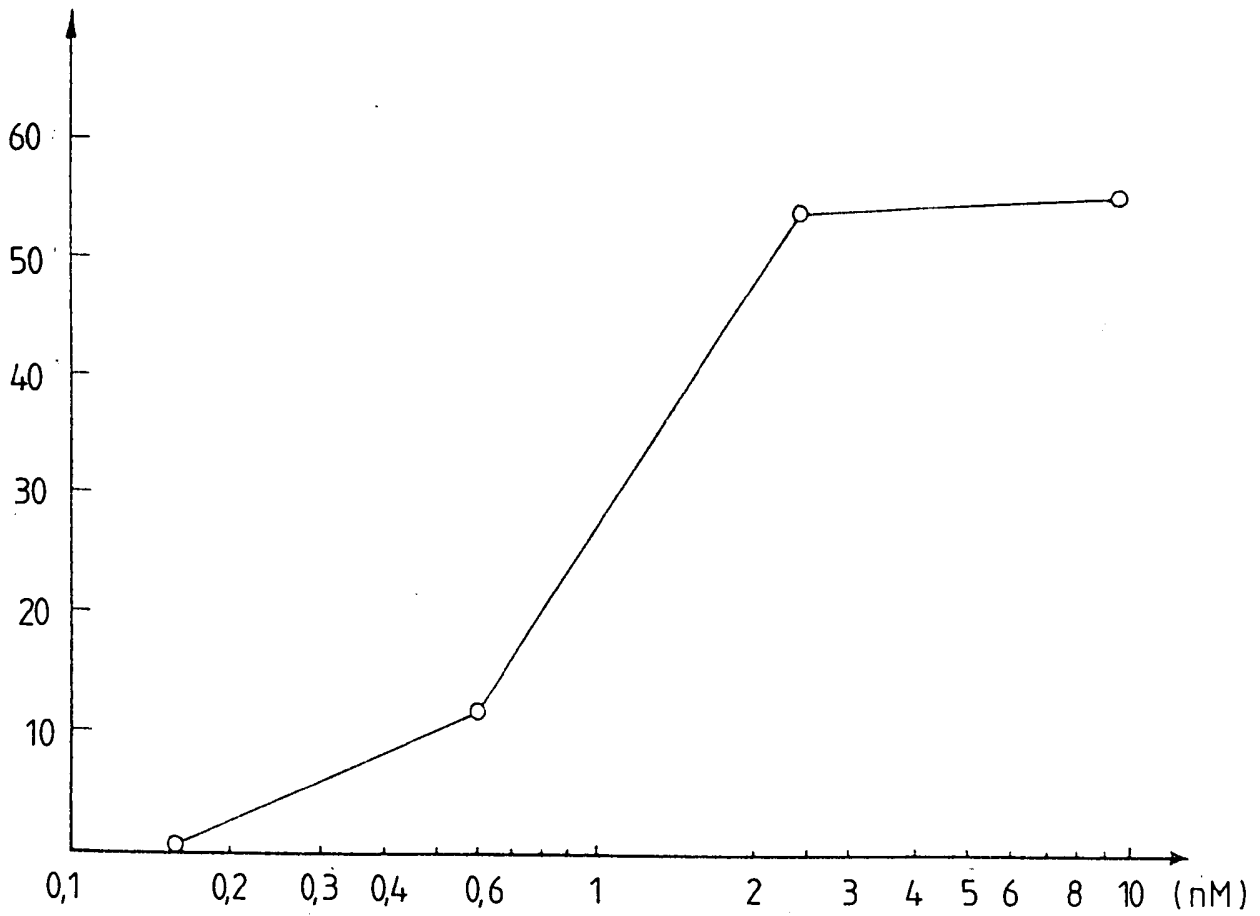


7. ábra



8. ábra

S.B.G.&K.
 ügyvédi és Szabadalmi Iroda
 1061 Budapest,
 Dáskonyház u. 10.
 Telefon 183-3733, 131-4400



9. ábra

Magyarországi
 Szabadalmi és Brevetiroda
 1061 Budapest,
 Dalszínház u. 10.
 Telefon 153-3733, 131-4200