

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

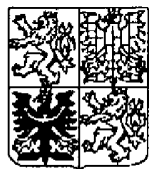
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

337-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01. 02. 99**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **04.02.98, 12.03.98**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **98/98101893, 98/98104416**

(33) Země priority: **EP, EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 08. 99**

(Věstník č. 8/99)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 47/48

A 61 K 9/16

A 61 K 38/17

(71) Přihlášovatel:

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH,
Mannheim, DE;

(72) Původce:

Lang Kurt, Penzberg, DE;
Papadimitriou Apollon, Bichl, DE;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Farmaceutická kompozice ježkovitých
proteinů a její použití

(57) Anotace:

Farmaceutická kompozice ježkovitého proteinu, která je vyznačena tím, že ježkovitý protein se váže k hydrofilnímu nosiči, který je biokompatibilní a biodegradovatelný, přičemž nosičem je polymer, který váže ježkovitý protein jako negativně nabitý nosič jako výsledek ionických interakcí, nedenaturuje ježkovitý protein když se váže na nosič, obsahuje alespoň 0,1 až 2 negativně nabitě zbytky na monomer za neutrálních podmínek, obsahuje náboj ve formě kyselých skupin, má průměrnou molekulovou hmotnost alespoň 50 000 Da a neobsahuje agarosu, reversibilně a účinně uvolňuje ježkovitý protein in vivo z nosiče zadržovaným způsobem.

CZ 337-99 A3

01-62-99-40

Farmaceutická kompozice ježkovitých proteinů a její použití

Oblast techniky

Vynález se týká farmaceutické kompozice ježkovitých proteinů a jejího použití zejména pro lokální uvolňování těchto proteinů na kostech a chrupavkách.

Dosavadní stav techniky

Ježkovité (hh) proteiny jsou míněny jako rodina vylučovaných signálních proteinů, které jsou odpovědné za tvorbu početných struktur při embryogenesi (J.C.Smith, Cell 76 (1994) 193-196, M.Perrimon, Cell 80 (1995) 517-520, C.Chiang a j., Nature 33 (1996) 407, M.J.Bitgood a j., Curr.Biol. 6 (1996) 296, A.Vortkamp a j., Science 273 (1996) 613, C.J.Lai a j., Development 121 (1995) 2349).

Během biosyntézy se získá 20 kD N-terminální doména a 25 kD C-terminální doména po štěpení signální sekvence a autokatalyckém štěpení. N-terminální doména se modifikuje ve své přirozené formě cholesterolem (J.A.Porter a j., Science 274 (1996) 255-259). U vyšších životních forem je hh rodina tvořena z alespoň tří členů, to je sonického, indického a pouštního hh (shh, ihh, dhh; M.Fietz a j., Development (Suppl.) (1994) 43-51). Rozdíly v aktivitě ježkovitých proteinů, které byly vytvořeny rekombinantně, byly zjištěny po produkci v prokaryontech a eukaryontech (M.Hynes a j., Neuron 15 (1995) 35-4 a T.Nakamura a j., Biochem.Biophys.Res.Comm. 237 (1977) 465-469).

Hynes a j. srovnávají aktivitu hh v supernatantu transformovaných lidských embryonálních ledvinových 293 buněk, (eukaryotické hh) s hh vytvořenými z E.coli a zjišťují 4x vyšší aktivitu hh ze supernatantů ledvinové buněčné linie.

Potenciální další přídatný faktor, který je pouze expresován v eukaryotických buňkách, posttranslační modifikace, rozdílný N-konec, protože hh izolované z *E.coli* obsahuje 50 % hh, které nesou dvě další N-terminální aminokyseliny (Gly-Ser) nebo jsou zkráceny o 5 až 6 aminokyselin nebo vyšší stav agregace například vazbou na niklagarosové perličky) byl diskutován jako důvod pro zvýšenou aktivitu.

Nakamura a j. srovnávají aktivitu shh v supernatantu transformovaných kuřecích embryonálních fibroplastů s shh fúzním proteinem izolovaným z *E.coli*, který má ještě N-terminální polyhistidinovou část. shh v supernatantu fibroplastů má 7 x vyšší aktivitu než vyčištěný *E.coli* protein pokud jde o stimulaci alkalické fosfatasy (AP) v C3H10T 1/2 buňkách. Molekuly jako jsou kostní morfogenetické proteiny (BMP) jsou diskutovány jako příčina pro zvýšenou aktivitu, která je jedi- ně přítomná v supernatantu eukaryotických buněk a vyvolává silnější indukci AP.

Kinto a j., FEBS Letters, 404 (1997) 319-323 popisují, že fibroplasty, které vylučují hh, indukují ektopickou tvorbu kosti při i.m. implantaci na kolagen. Ježkovité proteiny tudíž mají osteoinduktivní aktivitu.

Způsob pro vytvoření dodávacích systémů pro proteiny se zadržováním uvolňováním za pomoci alginatu je znám z WO 90/-/08551. Při tomto postupu se vytvoří dvoufázový systém, ve kterém první fáze obsahuje vysokou koncentraci proteinu (nasycaný roztok) a druhá fáze obsahuje alginat. Avšak takováto fázová separace je obtížná a komplikovaná na provádění, když se produkují farmaceutické kompozice ve velkých množstvích.

Pulsatilní uvolňování dextranu z kalciumalginatových komplexů je známo z Kikuchi A. a j., J.Controlled Release 47 (1997) 21-29.

Avšak sdružování ježkovitých proteinů do takovýchto komplexů není Kikuchim popsáno.

Robinson, C.J. a j. popisují v Trends in Biotechnology 14 (1996) 451-452 intraventrikulární implantaci alginatových mikrokuliček jako způsob pro lokální aplikaci NGF nebo NGF vylučujících buněk. Avšak aplikace pro ježkovité proteiny není popsána.

Downs, E.C. a j. popisují v J.Cell Physiol. 152 (1992) 422-429 aplikaci kalciumalginatových kuliček jako dodávací systém pro angiogenetické faktory. Avšak použití tohoto postupu nebo tento dodávací systém pro ježkovité proteiny není popsán.

Crey, C.J. a j. Dowsett popisují v Biotechnol. Bioeng. 31 (1988) 607-612 použití kalcium/zinek alginatových kuliček jako dodávací systém pro inzulin. Avšak použití tohoto postupu pro vytvoření dodávacích systémů pro ježkovité proteiny z toho není známo.

Z Yang a j., Development 124 (1997) 4393-4404 je známo, že vysoké lokální ježkovité koncentrace musí být udržovány po dobu alespoň 16 hodin v místě působení v těle pro farmaceuticky účinnou aktivitu in vivo. Nosný systém popsany Yangem a j. jako ježkovitě naplněné chromatografické medium Affigel CM, Ni-agarosa popsaná Marti a j. v Nature 375 (1995) 322-325 nebo Affigel Blue použitá Lopez-Martinezem a j. v Curr. Biol. 5 (1995) 791-796 nebo heparin-agarosové částice, které tam byly použity jsou nevhodné pro farmaceutickou aplikaci, protože jsou imunogenní a mohou vyvolat zánětlivé reakce.

Vynálezci zjistili, že biokompatibilní a biodegradovatelný nosný kolagen popsany Kinto a j. pro hh expresující buňky je také nevhodný pro optimální lokální farmaceutickou aplikaci ježkovitých proteinů pokud se tyto ježkovité proteiny vážou na nosič jen pomocí iontových interakcí.

Bylo zjištěno, že když se kolagenové nosiče naplní ježkovitými proteiny za fyziologických podmínek (pH asi 7) a ve slabých kyselinách (až do pH 4,5) většina aplikovaného ježkovitého proteinu se uvolní během minut z matrice. Podle zjištění vynálezců tato nedostatečná vazba je způsobena nedostatkem dostatečných iontových interakcí mezi ježkovitým proteinem a nosičem. V případě naplňování za kyselých podmínek (pod pH 4,5), se velké množství aplikovaného ježkovitého proteinu denaturuje a nevratně váže na nosič.

Tudíž cílem vynálezu je vytvořit farmaceutickou kompozici ježkovitého proteinu s biokompatibilním nosičem, kde nosič váže ježkovitý protein v jeho aktivní svinuté struktuře a může ho uvolnit in vivo v jeho aktivní formě zadržovaným způsobem. Takovéto formulace jsou zvláště vhodné pro nápravu kostních a chrupavkových defektů, ale mohou být také použity pro nápravu neuronových defektů nebo pro systemické dodávání.

Podstata vynálezu

Tohoto cíle se dosáhne farmaceutickou kompozicí ježkovitého proteinu, která je vyznačená tím, že ježkovitý protein se váže k hydrofilnímu nosiči, který je biokompatibilní přičemž nosič je polymer, který

- váže ježkovitý protein jako negativně nabitý nosič jako výsledek iontových interakcí,
- nedenaturuje ježkovitý protein, když ho váže na nosič,
- nosič obsahuje alespoň 0,1 až 1, výhodně 0,1 až 2 negativně nabitě zbytky na monomer za neutrálních podmínek,
- náboj je zprostředkován ve formě kyselých skupin jako jsou například sulfátové, karboxylové nebo fosfatové skupiny,
- a průměrná molekulová hmotnost nosiče je alespoň 50 000 Da.

Bylo překvapivě zjištěno, že ježkovité proteiny mohou být uvolňování reversibilně z nosiče in vivo v aktivní formě a zadržovaným způsobem bez vyvolání homogenních a/nebo zánětlivých reakcí in vivo, jestliže jsou vázány na negativně nabitou rozpustnou nebo nerozpustnou polymerní matici.

Výhodně lze použít hydrofilní nosná matrice a zvláště výhodně rozpustná nebo nerozpustná organická hydrofilní nosná matrice. Nosná matrice je zvláště výhodně vytvořena z aniontového polysacharidu jako je výhodně hyaluronová kyselina (stejně jako její chemicky zesíťené formy) chondroitinsulfat, polyvinylsulfat, keratinsulfat, dextransulfat, pektin, karagenany a jiné hydrokoloidy, sulfatovaný alginat, dermatansulfat, alginat výhodně kalciumalginat nebo kombinace alespoň dvou takovýchto aniontových polysacharidů nebo kombinace těchto nabitých polysacharidů s jinými polymery jako je například kolagen, kde hmotnostní procentáž polysacharidů je 10 až 50 %.

Nerozpustná matrice ve smyslu tohoto vynálezu znamená, že tato matrice se v podstatě nerozkládá nebo se viditelně nerozpouští v pufovaném roztoku in vitro během 10 až 20 hodin při teplotě místnosti. V tomto spojení je zvláště výhodné, aby nosič, použitý podle tohoto vynálezu obsahoval méně než 50 %, výhodně méně než 20 % a zvláště výhodně v podstatě žádné množství neutrálního polysacharidu. Hyaluronová kyselina s molekulovou hmotností alespoň 10^6 Dalton, zejména s molekulovou hmotností $4 \cdot 10^6$ Dalton, je zvláště vhodná jako nosná matrice.

Při dalším provedení bylo zjištěno, že hydrofilní nosiče založené na anorganickém nerozpustném fosforečnanu jako je hydroxylapatit a trikalciumfosfat jsou také vhodné podle tohoto vynálezu jako nerozpustná nosná matrice.

Zadržované uvolňování podle vynálezu se rozumí jako uvolňování ježkovitého proteinu ve farmakologicky účinné dávce

po definovanou dobu alespoň 14 hodin. Farmakologický účinek se rozumí jako neurologický účinek na nervové buňky, chondrogenesi a/nebo chondrogenesní indukci a výhodně osteogenesi a/nebo osteoindukci jak popsali Kinto a j., FEBS Letters, 404 (1997) 319-323 pro kostní indukci, Miao a j. v J. Neurosci. 17 (1997) 5891-5899 pro účinek na nervové buňky a Stott a j. v J. Cell Sci. 110 (1997) 2691-2701 pro buněčnou indukci chrupavky.

Enzymaticky degradovatelný nosič se výhodně použije jako nosič, který může být degradován vylučovanými enzymy (například proteasami) buněk, na kterých se provádí lokální aplikace in vivo. Avšak poločas nosiče by měl být alespoň 12 hodin, ale může být několik týdnů. Jestliže je nosič vytvořen z polysacharidu, tento nosič se výhodně degraduje glykosidasami a hydrolasami, které jsou přítomny v buňkách a vylučovány. Takováto biodegradabilita nosiče však není nutná v každém případě. Jestliže se uvolňování provádí pro léčení osteoporosy nebo neuronálních poruch, biodegradabilita není nutná. Avšak takovéto nosiče jsou výhodně špatně rozpustné za fyziologických podmínek a tudíž jsou absorbovány tělem po relativně dlouhou dobu (několik týdnů až měsíců).

Roztoky ježkovitých proteinů o vysokých koncentracích jsou nutné, aby se vytvořily nosné matrice, které jsou pokryty ježkovitými proteiny takovým způsobem, že vykazují odpovídající farmaceutickou účinnost, když se aplikují lokálně. Bylo zjištěno, že nosiče pokryté ježkovitým proteinem, které mohou být použity farmaceuticky, by měly výhodně obsahovat koncentraci ježkovitého proteinu 1 až 5 mg/ml, výhodně 3 mg/ml nosiče nebo více. Nosiče jsou zvláště výhodné, když obsahují ježkovité proteiny v koncentraci 10 mg/ml nebo více. Ježkovité proteiny jsou vnitřně špatně rozpustné.

Avšak bylo překvapivě zjištěno, že rozpustnost

ježkovitých proteinů drasticky vzrůstá v roztocích, které obsahují arginin nebo argininové ionty (výhodně argininiumsulfat). Tudiž dalším předmětem vynálezu jsou vodné roztoky ježkovitých proteinů v koncentraci 3 mg/ml a více, které obsahují arginin a argininové ionty a jsou výhodně pufrovány. Dalším předmětem vynálezu je způsob výroby nosné matrice pokryté ježkovitým proteinem, která je vyznačená tím, že se nosná matrice inkubuje roztokem ježkovitého proteinu v koncentraci 3 mg/ml který obsahuje arginin nebo argininové ionty a nosná matrice pokrytá tímto způsobem se izoluje.

Pro vytváření nosných matic jsou vhodné takové roztoky, které obsahují ježkovité proteiny ve farmaceuticky účinných koncentracích a jsou vhodné pro farmaceutickou aplikaci. Tudiž dalším předmětem vynálezu je nosná matrice, která obsahuje 3 mg ježkovitého proteinu nebo více, výhodně 10 mg nebo více na ml nosné matrice a arginin nebo argininové ionty. Koncentrace argininu je výhodně mezi 10 až 500 mmol/litr, výhodně při pH v rozmezí mezi 6 až 8. A

Aktivitou ve smyslu tohoto vynálezu se rozumí aktivita alkalické fosfatasy (stimulace exprese alkalické fosfatasy), kterou polypeptid může indukovat v savčích buňkách (aktivita při alkalické fosfatasové zkoušce). Pro toto se kultivuje myší mesenchymální buněčná linie v mediu, které obsahuje fetální telecí sérum. Poté se přidá sterilně zfiltrovaný vzorek, buňky se lýzují po dobu asi 5 dní a alkalická fosfatasa se určí v buněčném lyzátu pomocí štěpení chromogenního substrátu (pNP, p-nitrofenol) (J.Asahina, Exp.Cell.Res. 222 (1996) 38-47 a T.Nakamura (1997)).

Ježkovitý protein se rozumí podle vynálezu jako vylučovaný signální protein, který je odpovědný za tvorbu početných struktur při embryogenesi. Sonický indický nebo pouštní hh se zvláště výhodně použije (Fietz M., a j. Development (Suppl.) (1994), 43-51). hh protein se sekvencí jak je popsána v EMBL

databázi pod číslem L38518 se výhodně použije.

Proteiny ježkovité rodiny vykazují významnou homologii v jejich aminokyselinové sekvenci, což je také výhodné pro expresi těchto nukleových kyselin, které kódují ježkovité proteiny, které jsou z 80 % nebo více homologní s výše zmíněnou sekvencí sonického ježkovitého proteinu.

Lidský sonický ježkovitý prekursorový protein je tvořen z aminokyselin 1-462 sekvence popsané v EMBL databázi pod číslem L38518. Aminokyseliny 1-23 představují signální peptid, aminokyseliny 24-197 představují zralou signální doménu, aminokyseliny 32-197 představují signální doménu zkrácenou o 8 aminokyselin a aminokyseliny 198-462 představují autoproteolytickou doménu po autoproteolytickém štěpení.

Farmaceutická kompozice podle vynálezu výhodně obsahuje další polymer, který v podstatě působí jako podpůrná strukturální látka, která má také výhodně adhesní funkci pro buňky, ale neváže se na ježkovité proteiny na základě iontových interakcí. Výhodně tato látka je biodegradovatelný protein nebo hydrolytický degradační produkt, který může být použit například ve formě intaktních proteinových vláken jako solubilizovaný protein nebo jako částečně hydrolyzovatelný protein. Takováto podpůrná strukturální látka je výhodně kolagen, gelatin, elastin nebo fibrin.

Podpůrná strukturální látka je výhodně přítomna v menším množství než je množství popsaného hydrofilního biokompatibilního nosiče podle vynálezu. Podíl podpůrné strukturální látky je výhodně 30 % nebo méně výhodně 10 % nebo méně. Avšak podpůrná strukturální látka může být také přítomna v přebytku ve vztahu k hydrofilnímu nosiči. Jenom je třeba zajistit v tomto spojení, aby množství hydrofilního nosiče ve farmaceutické kompozici podle vynálezu bylo dostatečně vysoké k zajištění toho, že terapeuticky účinné množství ježkovitého proteinu

je vázáno k hydrofilnímu nosiči. Je tudíž výhodné použít alespoň pětinašobný přebytek hydrofilního nosiče ve vztahu k ježkovitému proteinu. Navíc vázání ježkovitého proteinu k nosiči pro přípravu farmaceutické směsi by mělo být prováděno při pH 4,5 nebo vyšší. Jak je výše uvedeno, bylo zjištěno, že ježkovité proteiny při pH pod 4,5 denaturují a vážou se ireversibilně k proteinovému nosnému kolagenu. Tudíž vázání ježkovitého proteinu k nosiči by mělo být prováděno v neutrálním rozmezí pH.

Nosiče, které obsahují kromě hydrofilního nosiče další podpůrné strukturální sloučeniny, jsou například protein/polysacharid komplexy. Výhodné komplexy jsou popsány v US patentu 4 514 794.

Farmaceutická kompozice se připraví inkubací ježkovitého proteinu s hydrofilním nosičem při pH 4,5 nebo vyšším, výhodně pH v neutrálním rozmezí (pH 6 až 8), čímž se provádí vázání ježkovitého proteinu k nosiči. Inkubace se provádí výhodně v pufovaném roztoku. Když se použije jako nosič matrice, která navíc obsahuje biodegradovatelný protein jako je kolagen, inkubace při pH 4,5 nebo vyšší zajistí prevenci ireversibilního vázání ježkovitého proteinu (který je při nižších hodnotách pH denaturován) k biodegradovatelnému proteinu. Bylo zjištěno, že za těchto podmínek žádné vázání nebo jen zanedbatelné vázání ježkovitého proteinu k biodegradovatelnému proteinu se vyskytuje pokud ježkovitý protein neobsahuje hydrofobní modifikaci a tak biodegradovatelný protein pouze působí jako podpůrná strukturální látka.

Hydrofobně modifikované (lipofilizované) ježkovité proteiny jsou ježkovité proteiny, které vykazují ve vztahu k nemodifikovaným hh proteinům (například rekombinantně produkováných v prokaryotech) zvýšení povrchové hydrofobicity.

Stupeň lipofilizace proteinu se měří integrací v lipidové vrstvě podle Hageue, Z., a j., J.Agric.Food Chem.30 (1982), 481. Takto lipofilizované hh proteiny se vážou podle vynálezu k hydrofilnímu nosiči stejným způsobem jako nelipofilizované hh proteiny, ale vážou se navíc k biodegradovatelnému proteinu pomocí hydrofobních interakcí.

Pro produkci farmaceutické kompozice je dále výhodné přidat pomocné látky jako jsou cukry, mannitol, sacharosa, laktosa, glukosa, trehalosa, výhodně 20 až 100 mg/ml) nebo aminokyseliny jako je glycin nebo arginin, stejně jako antioxidy danty jako je EDTA, citrat, polyethylenglykol (1-10 % hmotnostních), detergenty, výhodně neiontové detergenty (výhodně 0,005 až 1 % hmotnostní) jako jsou polysorbáty (Tween^R20 nebo Tween^R80) nebo polyoxyethyleny, protizánětlivé složky, lokální anestetika, antibiotika a/nebo stabilizátory jako jsou lipidy, mastné kyseliny a glycerol.

V dalším výhodném provedení farmaceutická kompozice ježkovitého proteinu podle vynálezu společně se suraminem je výhodná a to může být výhodně využito.

Farmaceutické kompozice mohou obsahovat další farmaceutické pomocné látky.

Ve výhodném provedení farmaceutická kompozice obsahuje ježkovitý protein v koncentraci 0,1 až 100 mg/ml.

Ve výhodném provedení farmaceutická kompozice dále obsahuje farmaceuticky akceptovatelný pufr, který je biokompatibilní, výhodně v rozmezí mezi pH 4 až pH 10, zvláště výhodně v rozmezí mezi pH 6 až 8, zejména při pH hodnotě asi 7. pH hodnota farmaceutické směsi by měla být účelně vyšší než pH 4, aby se zabránilo denaturaci a uvolnění zinku komplexně vázaného v ježkovitém proteinu.

Koncentrace pufru je výhodně 1 až 500 mmol/l, zejména 5 až 150 mmol/l a zvláště výhodně 10 až 100 mmol/l. Při vhodném provedení se použije jako pufr 20 mmol/l draselnofosfatového pufru, pH 7,2, nebo 100 mmol/l argininchloridu, pH 7,2.

Následující příklady publikace a výkresy dále vysvětlují vynález, jehož ochranný rozsah vyplývá z patentových nároků. Popsané způsoby jsou míněny jako příklady, které ještě dále popisují podstatu vynálezu dokonce za modifikacemi.

Stručný popis výkresů

- Obr. 1 uvolňování shh z kolagenové matrice in vitro
- obr. 2 uvolňování shh z alginatových pouzder in vitro
- obr. 3 uvolňování shh z gelů hyaluronové kyseliny in vitro
- obr. 4 uvolňování shh z alginat/kolagen matrice in vitro.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Produkce alginatového gelu obsahujícího hh protein

Alikvot roztoku hh proteinu (1 mg/ml shh roztoku v 50 mg/ml sacharosy, 50 mM fosforečnanu draselného, pH 7,2) se míchá se zásobním roztokem Na alginatu (Pronova, Biopolymer, NO) (ve vodě, více než 0,1 %) takovým způsobem, že se vytvoří želatinózní alginatproteinová směs. Tento gel může být buď použit přímo jako injektovatelná matrice nebo dále zpracován na kalciumalginatová pouzdra nebo může být uložen jako lyofilizát.

Příklad 2

Produkce směsi kolagenu obsahující hh protein (srovnávací příklad)

100 mikrol hh roztoku (1 mg/ml hh) v

- a) 20 mM fosforečnanu draselného, pH 7,4 nebo
- b) v 50 mM octanu sodného, pH 4,5 nebo
- c) v 0,1% trifuoroctové kyselině, pH 2,

se přidá po kapkách na kolagenové tampony (Helistat, Integra Life Science, USA) o rozměru 10x10x3 mm. Naplněné nosiče se pak zmrazí (-70 °C), lyofilizují a analyzují.

Pro to jsou naplněné tampony inkubovány při 37 °C ve vhodném objemu v pufru (10 mmol/l fosforečnanu draselného, 150 mmol/l NaCl, pH 7,2). Množství uvolněného hh se určuje pomocí RP-HPLC.

Příklad 3

3.1 Produkce Ca alginatových pouzder

Alginatový gel popsaný v příkladu 1, který obsahuje hh protein se přidá po kapkách do roztoku CaCl_2 (asi 1,5 %) kontinuálně za míchání. Ca alginatové komplexy se tvoří spontánně a obsahují protein. Rozměr pouzder, která jsou vytvořena, závisí na rozměru kapiček a může být podle potřeby měněn. Po 5 až 10 minutové inkubaci v CaCl_2 roztoku se pouzdra odfiltrují a promyjí v pufru (20 mmol/l fosforečnanu draselného, pH 7,2). Tato pouzdra mohou buď být použita přímo jako implantáty nebo mohou být dále zpracována lyofilizací.

3.2 Lyofilizace

Ca alginatová pouzdra se zmrazí při -70 °C a následně lyofilizují. Lyofilizace umožňuje stabilní uskladnění pouzder a dále usnadňuje implantaci, protože pouzdra jsou snadněji manipulovatelná v suchém stavu.

Příklad 4

Uvolňování shh in vitro

Analýza uvolňovací kinetiky in vitro ukazuje, že shh se uvolňuje zadržovaným způsobem z Ca alginatových pouzder po dobu alespoň 70 hodin (obr. 2), zatímco shh z kolagenové matrice se uvolní během několika až asi 20 minut (obr. 1). Lyofilizované alginatové kuličky obsahující shh byly inkubovány při 37 °C v 10 mM fosforečnanu draselného, 150 mM NaCl, pH 7,2 (Rotatherm). Po 5 minutách, 1 hodině, 5 hod, 10 hod, 1 dnu, 34 hodinách, 2 dnech, 3 dnech a 5 dnech byly odebírány vzorky a analyzovány na jejich obsah shh pomocí SDS polyakrylamidové elektroforézy (obr. 2). Kumulativní množství shh uvolněného z alginatových pouzder je vyneseno oproti času.

Zkouška uvolňovací kinetiky shh z 2,5%ních gelů kyseliny hyaluronové za použití druhů hyaluronové kyseliny s nízkou molekulovou hmotností (LMW, molekulová hmotnost asi $1,3 \times 10^6$ Da) nebo o vysoké molekulové hmotnosti (HMW, molekulová hmotnost asi 4×10^8 Da) je uvedena v obr. 3. Pro tyto gely hyaluronové kyseliny naplněné shh se provede naplnění do dialýzních trubic (separační rozměr 300 000 Da) a trubice se inkubují v PBS při teplotě 37 °C. Ve stanovených dobách se odebírají vzorky uvolňovacího média a analyzují na obsah shh pomocí reversně fázové HPLC. Je zřejmé, že část uloženého ježkovitého proteinu se uvolňuje zadržovaným způsobem. Další část proteinu zůstává vázaná k hyaluronové kyselině a mohla by být uvolněna in vivo degradací hyaluronové kyseliny.

Zkouška uvolňovací kinetiky shh z kolagenalginatové matrice (FibracolTM, viz US patent 4 614 794) je znázorněna v obr. 4. Pro tento účel Fibracolové tampony (1x1x0,3 cm) byly naplněny 0,2 mg shh v PBS. Naplněné tampony byly zmrazeny (-70 °C), lyofilizovány a inkubovány ve vhodném objemu PBS při teplotě 37 °C. Ve stanovených časech byly odebírány vzorky

uvolňovacího media a analyzovány na obsah shh pomocí reversně fázové HPLC. Je zřejmé, že pouze asi 10 až 20 % naplněných ježkovitých proteinů se uvolňuje do media a že hlavní část zůstává vázaná ke kolagenalginátové matici. Tato část může být uvolněna in vivo degraďací matrice.

Seznam odkazů

- Asahina, J., Exp.Cell.Res. 222 (1996) 38-47
Bitgood, M.J. a j., Curr. Biol. 6 (1996) 296
Chiang, C., a j., Nature 83 (1996) 407
Crey, C.J. a j., Biotechnol. Bioeng. 31 (1988) 607-612
Downs, E.C. a j., J. Cellular Physiology 152 (1992) 422-429
Fietz, M. a j., Development (Suppl) (1994) 43-51
Hague, Z. a j., J.Agric.Food Chem. 30 (1982) 481
Hynes, M. a j., Neuron 15 (1995) 35-44
Karablis a j., Genes and Development 8 (1994) 277-289
Kikuchi, A. a j., J. Controlled Release 47 (1997) 21-29
Kinto a j., FEBS Letters, 404 (1997) 319-323
Lai, C.J. a j., Development 121 (1995) 2349
Lopez-Martinez a j., Curr. Biol. 5 (1995) 791-796
Marti a j., Nature 375 (1995) 322-325
Miao a j., J. Neurosci. 17 (1997) 5891-5899
Nakamura, T. a j., Biochem.Biophys.Res.Comm.237(1997) 4465-4469
Perrimon, N., Cell 80 (1995) 517-520
Porter, J.A. a j., Science 274 (1996) 255-259
Robinson, C.J. a j. Trends in Biotechnology 14 (1996) 451-452
Smith, J.C., Cell 76 (1994) 193-196
Stott a j., J.Cell Sci. 110 (1997) 2691-2701
U.S. patent 4 614 794
Vortkamp, A. a j., Science 273 (1996) 613
WO 90/08551
Yang a j., Development 124 (1997) 4393-4404.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Farmaceutická kompozice ježkovitého proteinu vyznačená tím, že ježkovitý protein je vázán k hydrofilnímu nosiči, který je biokompatibilní, přičemž tento nosič je polymer, který váže ježkovitý protein jako negativně nabitý nosič jako výsledek iontových interakcí, nedochází k denaturaci ježkovitého proteinu, když se váže na nosič, obsahuje alespoň 0,1 až 2 negativně nabitě zbytky na monomer za neutrálních podmínek, obsahuje náboj ve formě kyselých skupin, má průměrnou molekulovou hmotnost alespoň 50 000 Da a je prost agarosy.
2. Farmaceutická kompozice podle nároku 1 vyznačená tím, že nosič je tvořen z organické hydrofilní nosné matrice nebo z anorganického nerozpustného fosforečnanu.
3. Farmaceutická kompozice podle nároku 1 nebo 2 vyznačená tím, že nosič je vytvořen z aniontového polysacharidu nebo anorganického nerozpustného fosforečnanu.
4. Farmaceutická kompozice podle nároků 1 až 3 vyznačená tím, že hydrofilním nosičem je hyaluronová kyselina.
5. Farmaceutická kompozice podle nároků 1 až 4 vyznačená tím, že obsahuje ježkovitý protein v koncentraci 0,1 až 100 mg/ml.
6. Farmaceutická kompozice podle nároků 1 až 5 vyznačená tím, že je pufována v rozmezí mezi pH 4 až 10.

7. Farmaceutická kompozice podle nároků 1 až 6 vyznačená tím, že obsahuje arginin nebo argininové ionty.
8. Způsob výroby farmaceutické kompozice vyznačený tím, že zahrnuje ježkovitý protein, který je vázán k hydrofilnímu nosiči, který je biokompatibilní, přičemž nosič je polymer, který váže ježkovitý protein jako negativně nabitý nosič jako výsledek iontových interakcí, nedenaturuje ježkovitý protein když se váže k nosiči, obsahuje alespoň 0,1 až 2 negativně nabitě zbytky na monomer za neutrálních podmínek, obsahuje náboj ve formě kyselých skupin, má průměrnou molekulovou hmotnost alespoň 50 000 Da a je prost agarosy, přičemž ježkovitý protein ve farmaceuticky účinném množství se použije jako základní komponenta tohoto prostředku.
9. Způsob podle nároku 8 vyznačený tím, že ježkovitý protein se použije v koncentraci 0,1 až 100 mg/ml.
10. Způsob zadržovaného uvolňování ježkovitého proteinu v lidském těle vyznačený tím, že ježkovitý protein se aplikuje lokálně v lidském těle ve farmaceutické kompozici podle nároku 1 až 6.
11. Způsob podle nároku 10 vyznačený tím, že ježkovitý protein se aplikuje v koncentraci 0,1 až 100 mg/ml.
12. Způsob podle nároků 8 až 11 vyznačený tím, že hydrofilním nosičem je hyaluronová kyselina.
13. Způsob podle nároků 8 až 12 vyznačený tím, že vázání ježkovitého proteinu k hydrofilnímu nosiči se provádí inkubací při pH 4,5 nebo vyšším.

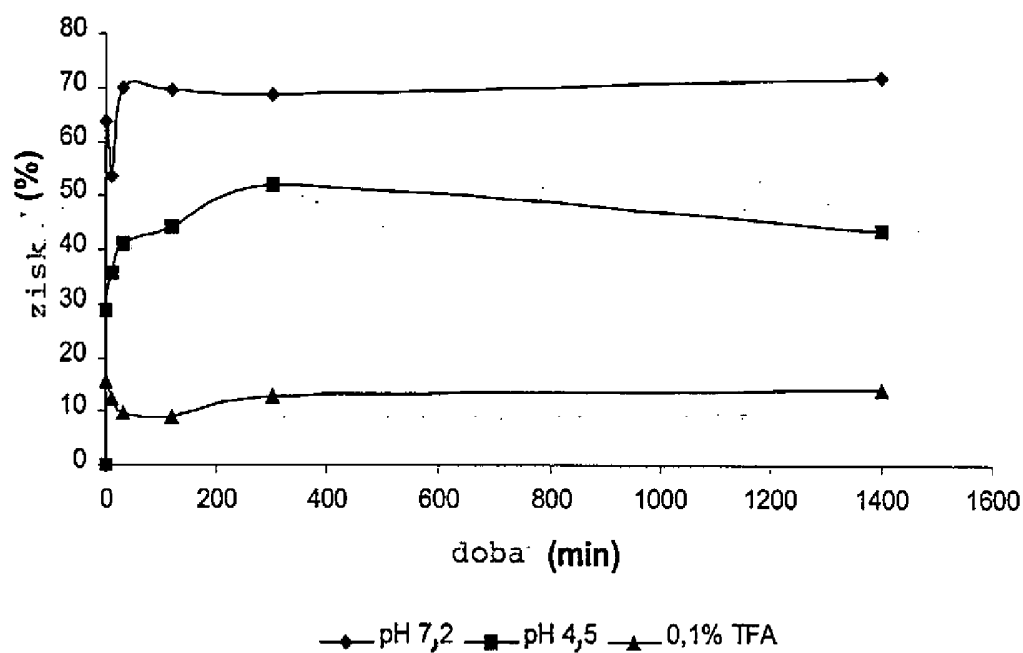
14. Nerozpustná nosná matrice vyznačená tím, že obsahuje alespoň 3 mg ježkovitého proteinu a alespoň 10 mmol na l argininu nebo argininových iontů na ml nosné matrice.

15. Způsob výroby nerozpustné nosné matrice, která obsahuje ježkovitý protein, vyznačený tím, že nosná matrice se inkubuje roztokem obsahujícím ježkovitý protein v koncentraci alespoň 3 mg/ml a arginin nebo argininové ionty v koncentraci alespoň 10 mmol/l a nosná matrice pokrytá tímto způsobem se izoluje.

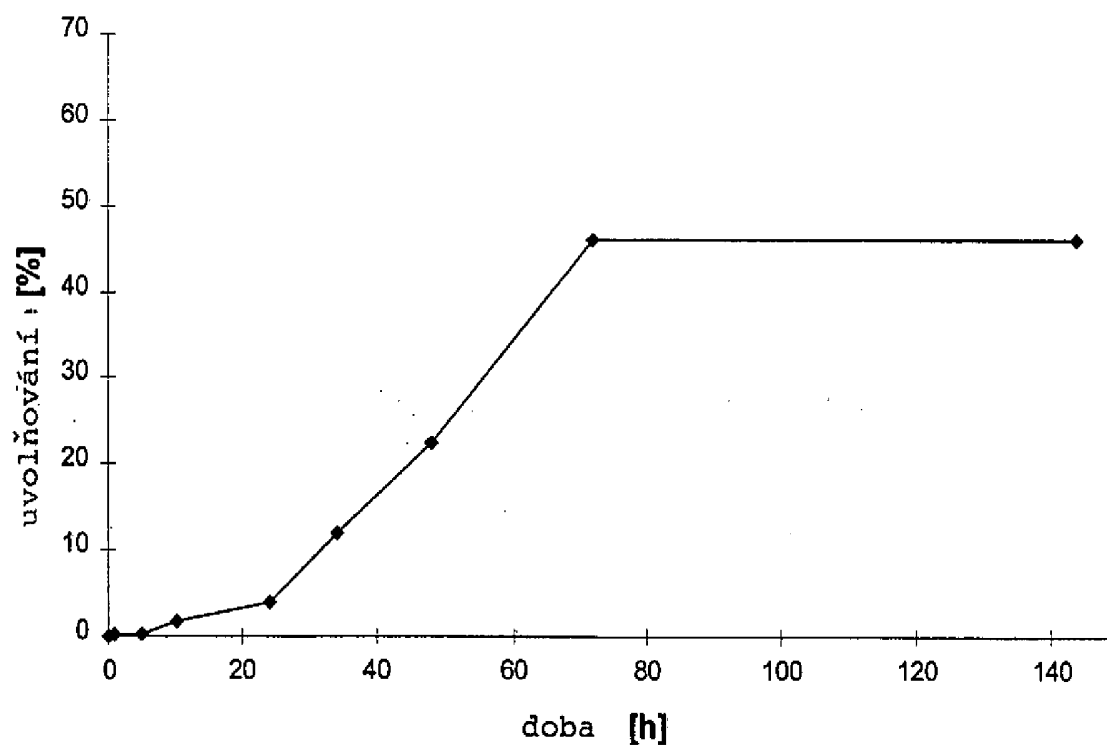
16. Způsob podle nároku 15 vyznačený tím, že vázání ježkovitého proteinu k hydrofilnímu nosiči se provádí inkubací při pH alespoň 4,5.

Zastupuje: JUDr. Ing. Milan Hořejš

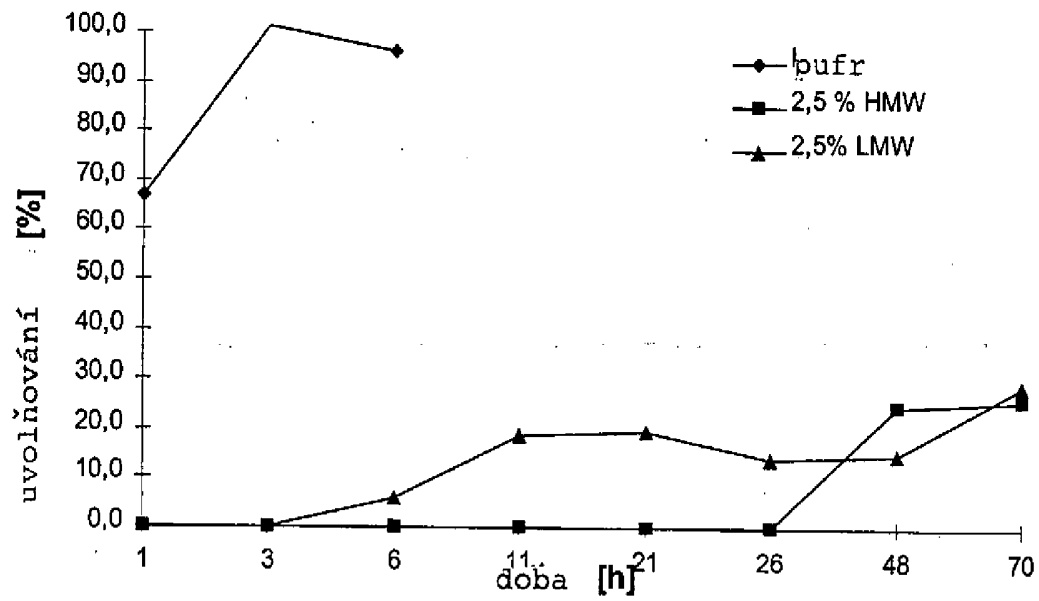
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

