

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

265224

(11) (B2)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00
C 12 N 5/02

(22) Přihlášeno 08 10 86
(21) PV 7292-86.Y
(30) Právo přednosti od 08 10 85 GB (8524807)

(40) Zveřejněno 12 01 89

(45) Vydáno 15 12 89

(72) Autor vynálezu HENDRY NEIL GEDDES CLARKSON, SKENE (GB)

(73) Majitel patentu BIOCURE LIMITED, SKENE (GB)

(54) Způsob výroby přípravku pro regulaci růstu tkáně

(57) Způsob výroby přípravku pro regulaci růstu tkáně, při kterém se připraví roztok obsahující N-acetyl-D-glukosamin nebo jeho oligomer nebo jeho deacetylovaný derivát, biotin a dvojmocný kation vybraný ze skupiny zahrnující Mg^{2+} , Ca^{2+} a Mn^{2+} spolu s farmaceuticky vhodným aniontem, připravený roztok se udržuje při zvýšené teplotě 50 až 80 °C po dobu tří dnů a pak se kapalina suší vy-mražováním.

Vynález se týká způsobu přípravy přípravku pro řízení růstu tkání u lidí a zvířat. Především se vynález týká způsobu přípravy skupiny fyziologicky účinných přípravků, jejichž alespoň jedna složka promotuje, zatímco jiná složka inhibuje růst jak normálních, tak abnormálních tkání. Přípravky, připravené způsobem podle vynálezu, tak (a) podporují růst normální tkáně k urychlení normálních regeneračních funkcí a (b) potlačují nežádoucí růst tkání jak benigních, jako při fibroze spojené s nadbytečným vytvářením jizev, tak chybných například při rakovinových nebo jiných maligních změnách.

Bylo vynaloženo mnoho úsilí na omezení růstu rostlin, nic z toho však není použitelné pro živočišné tkáně. Výzkumy požadavků pro růst buněk živočišného původu (včetně lidských buněk) se zaměřují v principu na růst tkáně technikou usnadňující studium růstu buněk izolovaných za laboratorních podmínek. Použilo se různých "růstových faktorů" k podpoře proliferace buněk běžně za použití extraktů poměrně surové povahy odebraných z celých orgánů například z myši slinné žlázy nebo z krysích jater. Takové růstové faktory nemají použitelnost pro systemické použití v nedotčených živočišných nebo v případě nedotčených lidí. Například riboflavin se považuje za růstový faktor pro krysy, lipoidní kyselina slouží jako růstový faktor pro určité mikroorganismy a biotin slouží jako růstový faktor pro kvasinky a pro určité bakterie. Glycyl-histidyl-lysin a růstový hormon podvěsku mozkového jsou dvě chemicky charakterizované čisté látky se vlivem na růst, přičemž glycyl-histidyl-lysin ovlivňuje růst v kultuře izolovaných jaterních buněk a růstový hormon podvěsku mozkového ovlivňuje růst těla jako celku. Žádný z těchto "růstových faktorů" nebyl označen jako užitečný pro opravu a regeneraci tkáně a zcela se liší od přípravků, připravovaných způsobem podle vynálezu.

U špatně živěných pacientů systémové podávání aminokyselin má, jak známo, podpůrný význam při hojení ran avšak pouze při léčení zjištěného nedostatku aminokyselin.

Fyzikální a fyzikálně chemické způsoby jako používání magnetického pole nebo pulsačních elektrických proudů pro lokalizačnou stimulaci ran má toliko současný módní význam.

Inhibice pozmeněných nebo maligních buněk chemickými prostředky je nyní běžnou praxí a je účinná, přičemž je příznivý poměr citlivosti mezi maligními buňkami nádoru a normálními buňkami postiženého; za chybění jakéhokoliv selektivnějšího způsobu řízení jsou tyto cytotoxické látky v současné době široce používány; avšak jejich toxicita a následný vysoký výskyt vedlejších účinků vedou k mimořádné potřebě vyvinout zlepšenou fyziologickou nebo chemickou kontrolu nežádoucích buněk.

Kortison a jeho deriváty jsou účinné při omezování nadměrného vytváření tkáně, ke kterému může docházet při některých typech poškození, v mnoha případech popálenin a po některých zánětlivých onemocnění kloubů. Avšak používání kortisonu zahrnuje značné nebezpečí vedlejších účinků.

Dřívější práce autorů vynálezu (Nature, 199, str. 4 991; 392; 1963) doložily, že výše účinnosti enzymu N-acetyl-D-glukosaminidazy je v úzkém vztahu, který se může označit jako "reaktivita" k různým chorobným procesům. Tento vztah existuje za tak širokého okruhu podmínek, že se usuzuje na jeho mnohem významnější úlohu, než jaká je známa pro N-acetyl-D-glukosamin (NAG) a snad pro další N-acetyl-D-glukosaminy. N-acetyl-D-glukosaminové (2-acetamido-2-deoxy-D-glukozové) zbytky jsou šířeji přítomny ve vázané formě v přírodě než D-galaktosamin.

V práci "Processes in Pathology" (Procesy v patologii) (Taussig M. J.) publikované v roce 1979 v publikaci Blaskwell Scientific Publications na str. 267 až 270 se v diskusi především zaměřené na aktivitu lektinů odkazuje na N-acetyl-D-glukosamin při studiu růstu buněk. Připomínají se pokusy vztahující se na použití N-acetyl-D-glukosaminu při studiu růstu buněk. V jednom případě se N-acetyl-D-glukosaminu používá ve formě jeho dimeru di-N-acetylchitobiosy vázané na proteinový nosič se záměrem preimunizace myši proti lethálnímu vlivu transplantovaného tumoru s omezeným úspěchem. Při jiné inhibici růstu nádorových buněk

ošetřením monovalentním lektinem k pokrytí povrchu agglutinační místa /N-acetyl-D-glukosaminové zbytky) osvědčily reverzibilitu přidáním nadbytku volného N-acetyl-D-glykosaminu.

Na tomto poli pracovali aktivně také jiní pracovníci; například v začátku šedesátých let Levvy a kolektiv ve výzkumném ústavu Rowett Research Institute doložili, že konverze na laktón glykosidu, který tvoří substrát pro glykosidasu, by mohla specificky inhibovat uvažovanou glykosidasu. Na neštěstí jsou tyto laktóny stále toliko za přísně kontrolovaných laboratorních podmínek. Pokusy pro jejich terapeutické použití se proto nesledovaly.

Nyní se podle vynálezu s překvapením zjistilo, že N-acetyl-D-glukosaminy a jejich oligomery a deriváty obou tříd sloučeniny mohou mít důležitý a dosud nepoznaný podíl na procesech léčení a hojení a invaze a proliferace maligních buněk. Koncept inhibice N-acetyl-D-glukosaminidas a N-acetyl-D-glukosaminidas specificky za fyziologických podmínek otvírá nové možnosti, jak pro řízení léčení a hojení tak pro omezování rakovinného růstu.

Podle vynálezu se přípravek pro regulaci růstu tkání vyrábí tak, že se připraví roztok obsahující N-acetyl-D-glukosamin nebo jeho oligomer nebo jeho deacetylovaný derivát, biotin a dvojmocný kovový kation vybraný ze skupiny zahrnující Mg^{2+} , Ca^{2+} a Mn^{2+} , s výhodou Mg^{2+} , spolu s farmaceuticky vhodným aniontem, připravený roztok se udržuje při zvýšené teplotě 50 až 80 °C po dobu tří dnů a pak se kapalina suší vymrazováním.

Roztok může obsahovat pufrovací soli. Jakožto roztok je přípravek vhodný pro parenterální nebo pro orální podávání.

Přípravek podle vynálezu se může připravovat v pevné formě pro orální nebo rektální podávání; v tomto případě se formuluje jako tablety, kosočtverečné pastilky nebo čípky. Nebo se může vyrábět ve formě prášku nebo jako zapouzdřené roztoky nebo emulze pro orální podávání nebo pro použití pro další zpracování na přípravky a pro podávání jako vstříkovací roztok. Dále se mohou používat pro místní nanášení ve vhodných neutrálních masťových základech.

Způsob výroby ovlivňuje vlastnosti přípravku. Například se směsi mohou aktivovat jejich podrobováním po různou dobu a za různých podmínek zahřívání a sušení nebo částečnému sušení vedoucím k bezprostřednímu získání krystalického a doprovodného materiálu nerozpustného přičemž ostatní materiály zůstávají v roztoku nebo v sirupovité formě. Materiály, doprovodící biotin na jedné straně a materiály zůstávající v roztoku po takovém vysrážení a pak izolované ve formě sirupu nebo ve vysušené formě na druhé straně, mají oddělené biologické aktivity, jak bude dále uvedeno. Biologické účinnosti se může také dosáhnout, jestliže koncentrace biotinu a periody a podmínky zahřívání a sušení nebo parciálního sušení jsou voleny tak, aby se předešlo shora uvedenému vysrážení. Aktivita je pak spojena s materiálem buď zbylým v roztoku nebo produkováným v sirupu nebo ve vysušené formě z takového roztoku. Tyto různé materiály ovlivňují účinnost N-acetyl-D-glukosaminidas a jejich dvou hlavních enzymů A a B. V závislosti na přesném způsobu přípravy materiálů se může podporovat nebo inhibovat enzym jako celek nebo jeho A a B isozymy jednotlivě nebo zároveň. Inhibice se může provádět aby byla buď konkurenční nebo nekonkurenční. Proto způsob přípravy může ovlivňovat celkovou hladinu N-acetyl-D-glukosaminidasové aktivity v těle a rovněž měnit proporcionální působení na dva hlavní isoenzymy. Tím, že je tomu tak, přípravek se jeví jako napodobující reakce těla na četné chorobné procesy, například v odezvě na odmítání cizích tkání, na zánět a na malignanci.

Pro usnadnění pochopení se vynález nyní popisuje se zřetelem na jeden glykosamin, N-acetyl-D-glukosamin, pracovníkům v oboru bude však zřejmé, že způsoby přípravy jsou použitelné pro analogické sloučeniny a získané biologické působení se bude měnit v závislosti na enzymu nebo na buněčném systému zkoumaném nebo na terapii.

N-acetyl-D-glukosamin sám má stimulační působení na chránící buňky v těle a zdá se, že přípravek, připravovaný způsobem podle vynálezu, představuje nové a selektivní prostředky

k ovlivnění tělového imunního mechanismu. Účinné složky se mohou podávat ústy nebo vstřikováním buď samotné nebo včleněné do fyziologicky vhodných tekutin nebo pevných látek nebo do jakýchkoliv jiných farmaceuticky vhodných nosičů nebo adjuvantů. Jakkoliv není záměrem vázat působení prostředku na jakoukoliv teorii, úlohou aktivních složek může být selektivní blokování nebo neblokování aktivních míst v účasti enzymů na růstu tkání nebo buněk. Tak může docházet k působení na místa povrchu buněk zodpovědná pro funkce takových buněčných specifit nebo pro transport živin a hormonů. Je známo, že taková místa abnormálně fungují v rakovinových buňkách a jsou rovněž ovlivňována viry a snad jinými infekcemi.

Přípravek, připravený způsobem podle vynálezu, je použitelný (a) pro omezení proliferace, růstu a agresivnosti maligních buněk; (b) pro regulaci hladiny aktivity buněk zahrnuté v opravě tkání po poškození nebo zánětu s podporou uzdravování, přičemž zároveň kontroluje jakýkoliv sklon jednoho hlediska hojení k potlačení jiného, například kontroluje nadprodukcí kolagenu fibroblasty vedoucí k vytváření hypertrofní jizvy s následujícím kosmetickým nebo funkčním poškozením a (c) stimuluje hojení, kde je netečný, jako například v pokročilém věku v případech trpících velmi vážnou infekcí.

Vynález nyní blíže objasňuje následující příklady a hodnoty naznačující výhodné způsoby přípravy a biologické působení pozorované u přípravků připravených způsobem podle vynálezu.

P ř í k l a d 1

Způsob přípravy (a) přípravku pro použití při stimulaci hojení a (b) přípravku pro omezování maligních buněk

(a) Rozpustí se ve vodě 3,23 g N-acetyl-D-glukosaminu, 200 mg biotinu, 375 mg kaliumdihydrogenfosfátu a 1,8 g sulfátu hořečnatého k získání 100 ml roztoku, který se udržuje na teplotě 55 °C v uzavřené nádobě po dobu 72 hodin. Obsah se pak ochladí a udržuje se právě nad teplotou tuhnutí. V průběhu dalších 24 hodin se oddělí hlavní krystalický nános. Odstraní se odstředěním a pevný podíl se promyje vodou nebo ethanolem. Pevný podíl nemá žádné významné inhibiční působení na N-acetyl-D-glukosaminidasy, výrazně však ovlivňuje, podporuje působení na jeho B-isoenzym. Pevný podíl je nerozpustný ve vodě, je však rozpustný v lipidech. Po ošetření pacientů s oblastmi odolávajícími hojení pevným podílem se pozoruje rychlá regenerace pokožkových buněk. Shora uvedeným postupem se tedy získají prostředky stimulující hojení.

(b) Supernatant, zbylý po oddělení pevného materiálu, jak shora popsáno, se vrátí do uzavřené nádoby a inkubuje se. Pak se usuší vymrazováním. Vzniklý materiál vykazuje specificky nekonkurenční typ inhibice jak A tak B izozymů N-acetyl-D-glukosaminidasy. Jestliže se přidá do tkáňových kultur maligních buněk, jako Landschutzových buněk nebo Hela buněk, produkuje řadu jevů závislých na dávce, včetně destrukce buněčného normálního antiadhezivního mechanismu a inhibice růstu. Vede rovněž k fragmentaci buněk a tak ke vzniku mnoha neživých subcelulárních fragmentů. Při podání pacientům s terminální malignancí omezuje agresivitu maligního procesu a zvyšuje přežití bez jiné terapie mající prognózu danou normálními způsoby.

P ř í k l a d 2

Způsob přípravy přípravku pro regulaci hladiny aktivity buněk zahrnutých do obnovy tkáně po poškození nebo zánětu

Ve vodě se rozpustí 3,2 g N-acetyl-D-glukosaminu, 10 mg biotinu, 375 mg kaliumdihydrogenfosfátu a 1,8 g sulfátu hořečnatého k získání 100 ml roztoku, který se vnese do uzavřené nádoby a udržuje se na teplotě 70 až 80 °C po dobu 72 hodin. Vzniklý roztok se ochladí a suší se vymrazováním. Získaný materiál vykazuje nekonkurenční specifickou inhibici A izozymu N-acetyl-D-glukosaminidasy a různý stupeň konkurenční inhibice toliko B izozymu.

Přidání materiálu do kultur fibroblastů vyvolává na velikosti dávky závislou přibližně 50 % inhibici fibroblastové proliferace bez usmrcení buněk. Při podání závodním koním s čerstvou ránou vede ke snížení otoku a usnadňuje návrat do zdravého stavu. Při studiu dlouhodobé terapie se prostředek podával ve 47 případech 35 koním trpícím hlavně poškozením flexorové šlachy přední nohy, což vede často k trvalé neschopnosti, někdy do takové míry, že je nutná porážka. Všechny 35 koní se vrátilo na závodníště, obvykle ve zdravotním stavu jako před zraněním.

Systémové použití u lidí se může očekávat, jsou však třeba další doklady netoxičnosti. Avšak topické použití účinné látky v neutrálním masťovém základu za kontroly konzultanta plastické chirurgie vykazalo schopnost řídit nadměrné vytváření jizvové tkáně.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby přípravku pro regulaci růstu tkáně, vyznačený tím, že se připraví roztok obsahující N-acetyl-D-glukosamin nebo jeho oligomer nebo jeho deacetylovaný derivát, biotin a dvojmocný kovový kation vybraný ze skupiny zahrnující Mg^{2+} , Ca^{2+} a Mn^{2+} spolu s farmaceuticky vhodným aniontem, připravený roztok se udržuje při zvýšené teplotě 50 až 80 °C po dobu tří dnů a pak se kapalina suší vymrazováním.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se roztok před sušením vymrazováním ochladí na teplotu právě nad teplotou tuhnutí roztoku a vytvořený krystalický podíl se oddělí jakožto další účinná látka pro regulaci růstu tkání.
3. Způsob podle bodu 2, vyznačený tím, že se kapalina zbylá po oddělení krystalického podílu inkubuje před vymrazovacím sušením pro získání prostředku k regulaci růstu tkání.
4. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se roztok udržuje na teplotě 50 až 60 °C.
5. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se roztok udržuje na teplotě 70 až 80 °C.
6. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se ochlazený roztok odstředí po stání v ochlazeném stavu po dobu až 24 hodin k získání krystalického podílu.
7. způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že roztok obsahuje jako dvojmocný kovový kation Mg^{2+} .