



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **309705**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ A 61 K 38/30, A 61 P 25/02

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19944780	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1993.06.01, PCT/US93/05203
(22) Inng. dag	1994.12.09	(85) Videreføringdag	1994.12.09
(24) Løpedag	1993.06.01	(30) Prioritet	1992.06.12, US, 899070
(41) Alm. tilgj.	1994.12.09		1993.04.16, US, 51191
(45) Meddelt dato	2001.03.19		

(71) Patenthaver Cephalon Inc, 145 Brandywine Parkway, West Chester, PA 19380-4245, US
Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University,
1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461, US

(72) Oppfinner Michael E. Lewis, Landenberg, PA, US
Stuart C. Apfel, West Hempstead, NY, US
John A. Kessler, New Canaan, CT, US

(74) Fullmektig Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Anvendelse av insulin-liknende vekstfaktor for fremstilling av et medikament for redusering av perifer neuropati**

(56) Anførte publikasjoner US 4863902, US 5068224, WO A 89/05822, WO A 90/14838
ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, VOL. 692, 1992,
S. 201-208 SAMT S. 243-245

(57) Sammendrag **Oppfinnelsen angår en fremgangsmåte for anvendelse av insulin-liknende vekstfaktor I (IGF-I) eller insulin-liknende vekstfaktor III (IGF-III) for forebygging eller behandling av perifer neuropati hos et pattedyr.**

Denne oppfinnelse angår anvendelse av insulinliknende vekstfaktor for fremstilling av et medikament for redusering av perifer neuropati.

Insulinliknende vekstfaktor I (IGF-I; somatomedin C) er et medlem av en familie av strukturelt og funksjonelt beslektede polypeptider som også innbefatter insulin, og insulinliknende vekstfaktorer II (IGF-II) og III (IGF-III). Alle disse proteinfaktorer kan spille en rolle ved neuron-utvikling og -oppretholdelse (E. Recio-Pinto et al., 1988, *Neurochem. Int.* 12:397-414). Dessuten er det tegn på at nivåene av IGF-I og IGF-II øker vesentlig under regenerering etter isjiasnerve-transeksjon (H. A. Hansson et al., 1986, *Acta Physiol. Scand.*, 126:609-614). De er blitt vist å understøtte overlevelsen av dyrkede sensoriske og sympatiske neuroner (D.N. Ischii et al., 1987, i: *Insulin, IGFs and Their Receptors in the Central Nervous System*, red. M.K. Raizada et al., Plenum Press, NY, s. 315-348) og, når det gjelder IGF-I, å understøtte overlevelsen av kortikalneuroner (Y. Aizenman et al., 1987, *Brain Res.*, 406:32-42). Endelig har undersøkelser både in vitro og in vivo vist at IGF-I og IGF-II understøtter motorneuronoverlevelse og neurittutvekst (P. Caroni et al., 1990, *J. Cell Biol.*, 110:1307-1317).

Perifer neuropati angir generelt en forstyrrelse som påvirker de perifere nerver, som oftest tilkjennegitt som én, eller en kombinasjon av, motorisk, sensorisk, sensorimotorisk eller autonom neuraldysfunksjon. Den store mangfoldighet av morfologier som perifere neuropatier viser, kan hver entydig tilskrives en like stor mangfoldighet av årsaker. For eksempel kan perifere neuropatier erverves genetisk, de kan fremkomme ved en systemisk sykdom, eller de kan bevirkes ved et toksisk middel. En del toksiske midler som forårsaker neurotoksisiteter, er terapeutiske legemidler, antineoplastiske midler, forurensninger i matvarer eller medisiner, og miljømessige og industrielle forurensninger.

Spesielt innbefatter kjemoterapeutiske midler som er kjent for å forårsake sensoriske og/eller motoriske neuropatier, vincristin, et anti-neoplastisk legemiddel som anvendes til behandling av hematologiske ondartetheter og sarkomer. Neurotoksisiteten er dosetilknyttet og viser seg som redusert tarmbevegelighet og perifer neuropati, særlig i de distale muskler i hender og føtter, postural hypotensjon og slapphet av urinblæren. Liknende problemer er blitt dokumentert med taxol og cisplatin (J.E. Mollman, 1990, *New Engl. Jour Med.* 322:126-127), skjønt cisplatin-

tilknyttet neurotoksisitet kan lindres med nerve-vekstfaktor (NGF) (S.C.Apfel et al., 1992, *Annals of Neurology* 31:76-80). Skjønt neurotoksisiteten noen ganger er reversibel etter fjerning av det neurotoksiske middel, kan helbredelse være en meget langsom prosess (S. Legha, 1986, *Medical Toxicology* 1:421-427; Olesen et al., 5 1991, *Drug Safety* 6:302-314).

Det finnes en rekke arvelige perifere neuropatier, innbefattende: Refsums sykdom, Abetalipoproteinemi, Tangier- sykdom, Krabbes sykdom, metakromatisk leukodystrofi, Fabrys sykdom, Dejerine-Sottas syndrom, og andre. Blant alle de arvelige neuropatier, er den langt mest vanlige Charcot-Marie-Tooth-sykdom.

10 Charcot-Marie-Tooth-(CMT)-sykdom (også kjent som peroneal muskulær atrofi, eller arvelig motorisk-sensorisk neuropati (HMSN)) er den mest vanlige arvelige neurologiske forstyrrelse. Den er kjennetegnet ved svakhet og atrofi, hovedsakelig i leggmusklene, på grunn av segmentær demyelinering av perifere nerver og tilknyttet degenerering av aksoner og for-hornceller. Autosomal-dominant arvelighet 15 er vanlig, og tilknyttede degenerative CNS-forstyrrelser, så som Friedreichs ataksi, er alminnelig.

Det er to hovedformer av CMT-sykdom. Type I (70% av tilfellene) er blitt antatt å ha demyelinering som sin begynnende patofysiologi, men distal klinisk innblanding tyder på en primær akson-degenerering, som for type II. Type II (30% av tilfellene) 20 er hovedsakelig en akson-degenerering uten demyelinering, og er muligens ikke så alvorlig som type I. Svekkelse av nerveledning er ofte tilstede ved fødselen, skjønt dette ikke er noen forutsielse av den eventuelle alder for start eller alvorsgrad ved utviklingen. Det finnes også meget sjeldne former av type III og IV, som er resessivt koplet.

25 Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig anvendelse av insulinliknende vekstfaktor I (IGF-I) eller insulinliknende vekstfaktor III (IGF-III) for fremstilling av et medikament for redusering av perifer neuropati som ikke er forårsaket av et unormalt insulin-nivå i et pattedyr.

Pattedyret som kan behandles er et menneske, eller et landbruks- eller husdyr 30 som utvikler en neuropati, f.eks. som et resultat av behandling av en neoplasme med et kjemoterapeutisk middel. IGF-I eller IGF-III kan administreres på en måte som regnes for effektiv av en fagmann på området; foretrukkede administreringsmåter er intravenøs administrering og subkutan injeksjon.

Anvendt i det foreliggende angir "perifer neuropati" en forstyrrelse som påvirker et segment av det perifere nervesystem. IGF-I eller IGF-III, medlemmer av insulinfamilien av vekstfaktorer, kan anvendes for reduisering av en neurotoksisitet som ikke er tydelig eller direkte forårsaket av et unormalt insulin-nivå, innbefattende, men ikke begrenset til, distal sensorimotorisk neuropati, eller autonome neuropatier så som redusert bevegelighet av gastrointestinalsyste

5 met eller slapphet av urinblæren. Foretrukkede neuropatier som effektivt kan behandles med IGF-I eller IGF-III, innbefatter neuropatier som er forbundet med systemisk sykdom, f.eks. postpolio-syndrom; genetisk ervervede neuropatier, f.eks. Charcot-Marie-Tooth-sykdom; og neuropatier forårsaket av et toksisk middel, f.eks. et kjemoterapeutisk middel, fortrinnsvis vincristin.

10

Når IGF-I eller IGF-III anvendes for behandling av en neuropati som er bevirket av et toksisk middel, kan den administreres før, samtidig med eller etter utsettelse for det toksiske middel, eller før, under eller etter administrering av et kjemoterapeutisk middel. IGF-I og det kjemoterapeutiske middel administreres hvert fortrinnsvis med effektive tidsmellomrom, i løpet av et overlappende behandlingstidsrom. IGF-I eller IGF-III kan administreres til pattedyret etter at det er blitt utsatt for det neurotoksiske middel, eller etter kjemoterapi, for gjenopprettelse av i det minste en del av neurofunksjonen som er ødelagt av det neurotoksiske eller kjemoterapeutiske middel. Det kjemoterapeutiske middel kan være hvilket som helst kjemoterapeutisk middel som forårsaker neurotoksisitet, fortrinnsvis vincristin, taxol, dideoksyinosin eller cisplatin. Ved et foretrukket eksempel er vektforholdet mellom IGF-I eller IGF-III (des-(1-3)IGF-I) og vincristin mellom 1:400 og 75:1, fortrinnsvis mellom 1:40 og 8:1.

15

20

Når IGF-I og et kjemoterapeutisk middel administreres samtidig, anvendes en blanding som innbefatter en hovedsakelig ren IGF-I og et kjemoterapeutisk middel, i et vektforhold på mellom 1:400 og 75:1. Det kjemoterapeutiske middel er fortrinnsvis vincristin, cisplatin, dideoksyinosin eller taxol. Betegnelsen "hovedsakelig ren" som anvendt i det foreliggende angir IGF-I eller IGF-III som, før blanding med en annen komponent i blandingen, er minst 50% (på vektbasis) av proteinet som finnes i preparatet. Ved foretrukkede utførelsesformer er minst 75%, mer foretrukket minst 90% og mest foretrukket minst 99% (på vektbasis) av proteinet som finnes i preparatet, IGF-I eller IGF-III. Mest foretrukket er IGF-I eller IGF-III som anvendes i

25

30

blandingen ren ifølge bedømmelse ved sekvensanalyse av aminoterminale aminosyrer.

Med "toksisk middel" eller neurotoksisk middel menes en substans som ved sin kjemiske påvirkning skader, svekker eller inhiberer aktiviteten av en komponent i nervesystemet. Listen over neurotoksiske midler som forårsaker neuropatier, er lang, og innbefatter, men er ikke begrenset til, neoplastiske midler så som vincristin, vinblastin, cisplatin, taxol eller dideoksyforbindelser, f.eks. dideoksyinosin; alkohol; metaller; industrielle toksiner som inngår ved ervervs- eller miljøutsettelse; forurensninger i matvarer eller medisiner; eller overdoser av vitaminer eller terapeutiske legemidler, f.eks. antibiotika så som penicillan eller kloramfenikol, eller megadoser av vitaminene A, D eller B6. En omfattende, skjønt ikke fullstendig, liste over kjemiske forbindelser med neurotoksiske bivirkninger finnes i tabell 5. Andre toksiske midler kan forårsake neuropatier og kan karakteriseres ved hjelp av fremgangsmåter kjent for en fagmann på området. Med "utsettelse for et toksisk middel" menes at det toksiske middel er gjort tilgjengelig for eller kommer i kontakt med et pattedyr. Utsettelse for et toksisk middel kan finne sted ved direkte administrering, f.eks. ved inntak eller administrering av en matvare eller et medisinsk eller terapeutisk middel, f.eks. et kjemoterapeutisk middel, ved tilfeldig forurensing eller ved miljøutsettelse, f.eks. for luft eller vann.

Betegnelsene IGF-I og IGF-III innbefatter fragmenter eller analoger til disse som viser den biologiske aktivitet ifølge oppfinnelsen, d.v.s. evne til redusering av en neuropati bevirket ved et toksisk middel. Fremgangsmåter for bestemmelse av om hvorvidt et IGF-I- eller IGF-III-fragment eller analog har den biologiske aktivitet er beskrevet nedenfor. Generelt vil egnede analoger og fragmenter ha minst 65% homologi med naturlig forekommende IGF-I eller IGF-III. Fragment-polypeptidene av IGF-I eller IGF-III er under-sett av (henholdsvis) IGF-I- eller IGF-III-molekylene, inneholdende færre aminosyrerester enn de naturlige molekyler. Anvendt i det foreliggende kan et fragment av IGF-I eller IGF-III vanligvis være minst ca. 5 etter hverandre følgende aminosyrer og kan ha en lengde på minst ca. 30-40 aminosyrer, og fortrinnsvis en lengde på ca. 50-65 aminosyrer. Foretrukkede sekvenser er på 6-25 rester. En del av aminosyrene i fragmentet kan være substituert med konservative erstatninger eller utelukkelse som forbedrer produktpeptidenes kjemiske eller biologiske stabilitet. Fortrinnsvis er ikke mer enn 35%, og mer foretrukket ikke mer

enn 20%, av aminosyrerestene erstattet eller utelukket. Følgende angir eksempler på foretrukkede IGF-I-sekvenser:

1) IGF-I (55-70) (SEKV. ID NR: 1), beskrevet i en ko-overdradd patentsøknad av Lewis et al., US-patentsøknad 07/869 913; og

2) Lang R³ IGF-I, som er et koplingsprotein som består av human IGF-I med et forlengelsespeptid på 13 aminosyrer i den N-terminale ende, og substitusjon av Glu med Arg i stilling 3 (G.L. Francis et al. 1992. Art to Sci. In Tissue Culture. HyClone Laboratories, Inc. 11:3-7; GROPEP PTY. LTD. PCT-patentsøknad WO89/05822; US-patent nr. 5 164 370; PCT/AU90/00210).

"Homologi" anvendt i det foreliggende angir sekvenslikheten mellom to polypeptidmolekyler. Når en stilling i begge de to sammenliknede sekvenser er opptatt av den samme aminosyremonomer-underenhet, f.eks. hvis en stilling i hvert av to polypeptidmolekyler er opptatt av lysin, er molekylene homologe i denne stilling. Homologien mellom to sekvenser er en funksjon av antallet stillinger som passer til hverandre, eller homologe stillinger, som de to sekvenser har felles. Hvis for eksempel 6 av 10 av stillingene i de to sekvenser passer til hverandre eller er homologe, er de to sekvenser 60% homologe. Som eksempel har aminosyre-sekvensene LTVSFR og LPVSAT 50% homologi.

En analog til IGF-I eller IGF-III kan være forskjellig fra en naturlig forekommende IGF-I eller IGF-III ved forskjeller i konservativ aminosyresekvens eller ved modifikasjoner som ikke påvirker sekvensen, eller ved begge. Modifikasjoner innbefatter kjemisk derivatisering av polypeptider, f.eks. acetylering, karboksylering, glykosylering eller fosforylering; substituering eller utelukkelse av aminosyrerester som forandrer bindingsproteinaffiniteten, men som ikke i noen vesentlig grad forandrer reseptoraffiniteten og/eller forandrer den biologiske aktivitet av polypeptidet; eller kjemiske forandringer i polypeptidet som øket polypeptidets stabilitet.

Til tross for de meget uensartede morfologier og årsaker som tilskrives perifere neuropatier in vivo, har søkerne gått ut fra at IGF-I kan være et effektivt middel til forebygging eller behandling av slike neuropatier hos et pattedyr, til tross for det faktum at disse neuropatier ikke direkte eller sannsynlig kan knyttes til en mangel av, eller på annen måte unormalt nivå av, insulin. For å illustrere dette, har søkerne vist at administrering av IGF-I til dyr som har fått et legemiddel med neurotoksiske bivirkninger, d.v.s. anti-tumor-legemidlet vincristin, reduserer den

tilknyttede neurotoksisitet. Dette funn mildner ikke bare den neurotoksiske bivirkning, men kan også i vesentlig grad øke anvendelsen av vincristin som anti-tumormiddel. Anvendelse av vincristin, et kjemoterapeutisk middel som er effektivt på annen måte, har hittil vært begrenset på grunn av medfølgende neurotoksisitet.

5 Dette funn kan også på liknende måte øke anvendelsen av andre forbindelser som er begrenset på grunn av neurotoksisitetsproblemer. Samtidig administrering av IGF-I eller IGF-III kan minske forekomsten av disse ledsagende perifere neuropatier.

Andre trekk og fordeler ved oppfinnelsen vil fremgå av følgende beskrivelse av de foretrukne utførelsesformer og av kravene.

10 Tegningene vil først bli beskrevet.

Tegninger

Fig. 1 er et søylediagram som viser effekten av rhIGF-I på motorisk funksjon etter vincristinbehandling.

Fig. 2 er et søylediagram som viser effekten av rhIGF-I på tibialnervefunksjonen etter vincristinbehandling.

Fig. 3 er et søylediagram som viser effekten av rhIGF-I på halenervefunksjonen etter vincristinbehandling.

20 Fig. 4 er et søylediagram som viser effekten av taxol og rhIGF-I på latenstiden for haleslåing.

Fig. 5 er et søylediagram som viser effekten av taxol og rhIGF-I på varmeplate-latenstider.

25 Søkere kom på den tanke at IGF-I, så vel som IGF-I-tilknyttede proteiner og peptider, kan befordre funksjonen og/eller overlevelsen av neuroner som ellers er utsatt for å miste sin funksjon og/eller som er døende på grunn av utsettelse for toksiske midler. For spesifikk undersøkelse av denne tanke, har søkerne under-søkt om hvorvidt IGF-I-administrering kan forebygge den neurotoksisitet som er et resultat av administrering av anti-tumormidlet vincristin i en dyremodell. Klinisk er vincristins egnethet begrenset ved forekomst av polyneuropati med fremtredende motorisk dysfunksjon, så vel som sensoriske og autonome abnormiteter (S.S. Legha, som overfor). Inntil i dag har man intet effektivt middel til forebygging av denne neuropati, bortsett fra å begrense dosen av vincristin. Søkere har vist at IGF-I-

administrering kan forhindre denne svekkende og dosebegrensende bivirkning av vincristin.

Ved en annen test av denne idé har søkerne undersøkt om hvorvidt IGF-I-administrering kan forebygge den neurotoksisitet som fremkommer ved administrering av antitumor-midlet taxol i en dyremodell.

Forsøkseksempel: Vincristin

Metoder

Legemiddeladministreringer

Vincristinsulfat (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ble administrert i en dose på 2 mg/kg intraperitonealt to ganger i uken i seks etter hverandre følgende uker. Det var utformet i en konsentrasjon på 0,16 mg pr. ml normal saltløsning.

Rekombinant IGF-I (rhIGF-I) for forsøksanvendelse ble tilveiebrakt av Cephalon Inc. (West Chester, PA), og den er også kommersielt tilgjengelig fra RD Systems, Inc. (Minneapolis, MN), U.B.I. (Lake Placid, NY) og Kabi Pharmacia AS (Stockholm, Sverige). rhIGF-I ble utformet for høydosegruppen i en konsentrasjon på 1 mg/ml, og for lavdosegruppen i en konsentrasjon på 0,3 mg/ml, i en eddiksyrebufferløsning med en pH på 6,0. Høydose-gruppene (gruppene 4 og 6) fikk 1,0 mg/kg IGF-I tre ganger i uken subkutant i seks etter hverandre følgende uker. Gruppene som ble behandlet med lav dose (gruppe 3 og 5), fikk 0,3 mg/kg IGF-I tre ganger i uken subkutant i samme tidsrom. Grupper som ikke fikk IGF-I, fikk subkutane injeksjoner av eddiksyrebuffer-bærerstoffet i samme volum pr. vektmengde, og ifølge samme skjema, som dyrene som fikk IGF-I.

Dyr

CD1 hannmus som veide 15-20 gram ved starten, ble utvalgt for denne undersøkelse. De ble tilfeldig fordelt, 12 dyr til hver av følgende behandlingsgrupper:

Gruppe nr. 1: Kontroll, kun bærerstoffinjeksjoner.

Gruppe nr. 2: Vincristin pluss IGF-I-bærerstoff.

Gruppe nr. 3: Vincristin pluss lavdose-IGF-I.

Gruppe nr. 4: Vincristin pluss høydose-IGF-I.

Gruppe nr. 5: Lavdose-IGF-I alene.

Gruppe nr. 6: Høydose-IGF-I alene.

Adferdsundersøkelse

Helningstest: Etter 6 ukers behandling ble musene undersøkt ved en blindundersøkelse. For denne test ble hver mus anbrakt individuelt på en styroskumplate, som så ble hevet til vertikal stilling. Tiden ble målt med hensyn til hvor lenge dyrene kunne holde grepet på platen uten å falle. Testen ble stoppet vilkårlig etter 30 sekunder. Den beste tid av tre forsøk ble registrert.

Elektrofysiologisk undersøkelse

Etter adferdsundersøkelsen gjennomgikk musene elektrofysiologisk undersøkelse. Hver mus ble bedøvet med halotan før registrering. Forbindelsenes amplituder og distale latenstider ble målt i halenerven i halen. Halene ble utspent, og platina-iridium-nåloverflateelektroder ble anbrakt langs det distale snitt i halenerven. Den aktive registreringselektrode ble anbrakt i en fastsatt avstand på 40 mm distalt for den stimulerende katode. Korte pulser med konstant spenningsstimulering ble avgitt gjennom et anode-katode-par som befant seg over et proksimalsnitt av halenerven. Motoriske registreringer ble utført ortodromisk fra tibialnerven med elektrodeanbringelse over det distale innsnitt i gastrocnemiusmuskelen. Sensoriske registreringer ble utført ortodromisk fra suralnerven med en avstand på 10 mm mellom elektrodene. For hver registrering regnet man ut gjennomsnittet av 5-10 stimuli, og fremgangsmåten ble gjentatt. Latenstiden ble bestemt fra starten av begynnelses-depolariseringen og ble målt til det nærmeste 0,1 msek. Amplituden ble målt fra basislinjen til toppen og ble målt til det nærmeste 0,1 μ V. Rektum-temperaturen hos hver mus ble overvåket og holdt innenfor 0,5°C.

Statistikk

Dataene ble analysert under anvendelse av en varians-analyse (ANOVA) i alle tilfeller.

Resultater

Adferdsundersøkelse

5 Klinisk forårsaker vincristin en blandet sensorisk-motorisk neuropati, med distal motorisk svakhet som det mest fremtredende tidlige tegn. Vi gjorde derfor bruk av en enkel adferdsundersøkelse for å fastsette den motoriske styrke hos dyrene i hver gruppe. Dataene fra helningstesten er oppsummert i tabell 1 og på fig. 1. Dyrene som ble behandlet med vincristin alene, var i stand til å holde grepet bare 10 i halvparten av den maksimale tid. De andre undersøkte grupper var alle i stand til å holde grepet i omtrent hele det tillatte tidsrom på 30 sekunder. Gruppen som ble behandlet med vincristin alene, var forskjellig fra de andre grupper med en $p < 0,0001$ ifølge ANOVA.

15 Elektrofysiologiske resultater

 Det ble målt motorisk leding fra tibial-nerven, og resultatene er oppsummert i tabell 2 og på fig. 2. Gruppen som ble behandlet med vincristin alene, hadde forlenget latenstid og en betydelig redusert aksjonspotensial-amplitude sammenliknet med kontrollgruppen ($p < 0,02$ ifølge ANOVA). Gruppene som ble samtidig 20 behandlet med IGF-I, var ikke forskjellig fra kontrollgruppen i noen betydelig grad.

 Sammensatte registreringer ble utført fra halenerven i halen, og resultatene er oppsummert i tabell 3 og på fig. 3. Også her hadde gruppen som var blitt behandlet med vincristin alene, betydelig forlengede latenstider og reduserte amplituder (henholdsvis $p < 0,001$ og $p < 0,05$). I hvert tilfelle ble disse verdier delvis, skjønt 25 ikke fullstendig, forbedret ved IGF-I-administrering.

 Sensoriske registreringer ble utført fra suralnerven, og verdiene er oppsummert i tabell 4. Disse var ikke statistisk signifikante forskjeller mellom noen av gruppene, ifølge bestemmelse ved denne måling av ren sensorisk funksjon.

 De presenterte data viser at samtidig administrering av IGF-I og vincristin kan 30 forebygge tegnene på vincristin-neuropati som sees for denne dyremodell. Søkene har vist tilstedeværelse av neuropati under anvendelse av både adferds- og elektrofysiologiske målinger. Denne dyremodell av vincristin-neuropati ser ut til å samsvare godt med den kliniske tilstand hos mennesker ved at motorisk dysfunksjon er det mest fremtredende tegn. Hvor vincristin-administrering forringet funksjonen av den 35 perifere nerve, resulterte IGF-I-administrering i en betydelig forbedring.

Forsøks-eksempel: Taxol

For vurdering av om hvorvidt rhIGF-I kunne forebygge utvikling av en sensorisk neuropati forårsaket av taxol-administrering, ble CD-1-hannmus dosert daglig med taxol (21,6 mg/kg) administrert intraperitonealt i 6 dager i taxol-hjelpestoff (12% kromofor EL (Sigma, St. Louis MO), 76% fosfatbufret saltløsning, 12% etanol). rhIGF-I-hjelpestoff (100 mM eddiksyre, 50 mM NaCl, 1% humant serumalbumin) eller rhIGF-I (1 mg/kg) ble administrert subkutant i 10 dager, idet man begynte én dag før starten av taxol-injeksjonene. Siste dag for administrering av rhIGF-I-hjelpestoff eller rhIGF-I ble evnen hos musene til å føle og svare på et skadelig stimulus vurdert ved bestemmelse av varmeplate- (55°C) og haleslag-latenstider (D'Amour et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 72:74-79, 1941; Eddy et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 107:385-393, 1953; Vaught et al., Life Sci. 48:2233-2241, 1991). Varmeplate- og haleslag-latenstider ble bestemt to ganger for hver mus. Utelukkelsestiden for slikking av én bakpote eller rysting av en bakpote tre ganger ved varmeplate-analysen var 20 sekunder, og for bevegelse av halen fra en varmespiral i haleslag-analysen 10 sekunder. Betydelige forskjeller mellom bærerstoff- og taxol-behandlede grupper ble bestemt ved hjelp av Dunnetts t-test (Tallarida et al., Manual of Pharmacologic Calculation with Computer Programs, 2. utg., Springer-Verlag, NY, s. 145-148, 1987), og forskjeller mellom alle grupper ifølge en Newman-Keuls-test (Tallarida et al., som ovenfor, s. 121-125).

Bare musene som var behandlet med taxol/rhIGF-I-bærerstoff, hadde haleslag- og varmeplate-latenstider som var betydelig større enn for bærerstoff-behandlede mus. Taxol øket haleslag- og varmeplate-latenstidene i betydelig grad, med henholdsvis 43 og 37%. Haleslag- og varmeplate-latenstider for de taxol-behandlede mus var dessuten også betydelig større enn for mus som var behandlet med rhIGF-I eller taxol/rhIGF-I. Således forhindret rhIGF-I utviklingen av en sensorisk neuropati ifølge måling ved forandringer i haleslag- og varmeplate-latenstider.

Effekten av rhIGF-I-administrering på forebygging av taxol-bevirket neuropati er vist i tabell 6, på fig. 4 (haleslag-latenstider) og på fig. 5 (varmeplate-latenstider). Resultatene er vist som middel + S.E.M. Symbolet * angir at verdien er betydelig forskjellig fra både bærerstoffene rhIGF-I alene og taxol/rhIGF-I-behandlede grupper $p < 0,05$.

Behandling

Hvilket som helst av de IGF-I-neuropati-reduserende midler beskrevet i det foreliggende kan administreres til en pasient i en farmasøytisk akseptabel buffer (f.eks. fysiologisk saltløsning eller eddiksyrebuffer). Skjønt det kan være hensiktsmessig å administrere IGF-I eller IGF-III subkutant, oralt, nasalt eller topisk, f.eks. som væske eller spray, administreres det terapeutiske preparat i henhold til den tilstand som skal behandles. Det kan for eksempel være nødvendig å administrere IGF-I intravenøst eller kirurgisk til det hensiktsmessige vev, eller via kateter.

En hensiktsmessig dosering er en mengde av en insulinliknende vekstfaktor I, fragment eller analog som bevirker en reduksjon i omfanget av neuropati. IGF-I kan for eksempel administreres i doseringer på 0,03-10 mg pr. kg pr. enhetsdose, som éngangsdose eller ved infusjon, administrert enten daglig, med mellomrom eller i henhold til behov. Denne dosering svarer omtrent til et vektforhold mellom IGF-I og vincristin på mellom 1:400 og 75:1, fortrinnsvis 1:40 - 8:1. Doseringer av andre insulinliknende vekstfaktor I-forbindelser, fragmenter eller analoger, eller vektforholdet mellom dem i forhold til det aktuelle toksiske middel, kan bestemmes av en fagmann på området i henhold til metodene beskrevet i det foreliggende.

Effektiviteten av behandling av neuropatier med IGF-I kan vurderes ved hjelp av følgende tegn på helbredelse: 1) Gjenvinning av normal sensorisk funksjon, som kan vurderes ved hjelp av termisk følsomhet i ekstremitetene; 2) Gjenvinning av normal motorisk funksjon, som kan vurderes ved måling av muskelsvakhet, finmotorisk kontroll og reflekser i dype sener; og 3) Normalisering av nerveledningshastighet, som vurderes elektrofysiologisk. Metoder for vurdering av perifer neuropati er beskrevet av Asbury et al. (Asbury et al., 1992, i Diseases of the Nervous System, Clinical Neurobiology, red. Asbury et al. W.B. Saunders Inc., Philadelphia, PA. 1:252-269) og kan anvendes av fagfolk på området for bestemmelse av effektiviteten av en insulinliknende vekstfaktor I til lindring av neuropati.

Andre utførelsesformer

Andre utførelsesformer er innenfor de etterfølgende krav. Midler som er egnet til redusering av toksisk neuropati, kan for eksempel innbefatte hvilke som helst i familien av insulinliknende vekstfaktor I-forbindelser og beslektede neurotrofiner, nervevekstfaktor-forøkende molekyler, cilie-neutrofifaktor, IGF-I-avledede peptid-

fragmenter, analoger til en insulin-liknende vekstfaktor I, eller kombinasjoner av disse midler.

Skjønt vincristin-neurotoksisitet mest typisk tilkjennevis som en perifer neuropati, kan fremgangsmåten også anvendes til redusering av andre toksiske neuropatier, f.eks. neuropatier i det autonome eller kranie-nervesystemet og kan anvendes til lindring av virkningene av andre toksiske midler.

Neuropatier som er knyttet til systemiske sykdommer omfatter: uremi, kolestatisk leversykdom hos barn, kronisk respirasjons-insuffisiens, alkoholisk polyneuropati, multippel organsvikt, sepsis, hypoalbuminemi, eosinofil-myalgisyndrom, hepatitt, porfyri, hypoglykemi, vitaminmangel, kronisk leversykdom, primær galle-blærecirrhose, hyperlipidemi, spedalskhet, Lyme-sykdom, herpes zoster, Guillain-Barre-syndrom, kronisk inflammatorisk demyelinerende polyradiculo-neuropati, sensorisk perineuritt, ervervet immunmangelsyndrom-(AIDS)-tilknyttet neuropati, Sjøgrens syndrom, primær vaskulitt (så som polyarteritis nodosa), allergisk granulomatøs angiitt (Churg-Strauss), overfølsomhetsangiitt, Wegeners granulomatose, reumatoid artritt, systemisk lupus erytematose, blandet bindevevs-sykdom, skleroderm, sarkoidose, vaskulitt, systemiske vaskulittider, akutt inflammatorisk demyelinerende polyneuropati, post-poliosyndrom, håndrotstunnell-syndrom, pandysautonomi, primær systemisk amyloidose, hypotyreoidisme, kronisk obstruktiv lungesykdom, akromegali, malabsorpsjon, (sprue, cøliaki-sykdom), karsinomer (sensoriske, sensorimotoriske, sene og demyelinierende), lymfomer (innbefattende Hodkins), polycythemia vera, multippelt myelom (lytisk type, osteosklerotisk eller isolert plasmacytom), benign monoklonal gammopati, makroglobulinemi og cryoglobulinemi, som beskrevet av Asbury et al., som ovenfor, medtatt i det foreliggende som referanse.

Det kan også nevnes genetisk ervervede neuropatier: leggmuskelatrofi (Charcot-Marie-Tooth-sykdom, typer I, II og X), arvelige amyloide neuropatier, arvelig sensorisk neuropati (type I og type II), porfyrisk neuropati, arvelig tilbøyelighet til trykklammelse, Fabrys sykdom, adrenomyeloneuropati, Riley-Day-syndrom, Dejerine-Sottas neuropati (arvelig motorisk-sensorisk neuropati III), Refsums sykdom, ataksitelangiektasi, arvelig tyrosinemi, anafalipoproteinemi, abetalipo-proteinemi, kjempeakson-neuropati, metakromatisk leukodystrofi, globoidcelle-leukodystrofi og Friedrichs ataksi (Asbury et al., som ovenfor), mononeuropati multipleks, pleksopati og ren motorisk neuropati, som beskrevet av Asbury et al., som ovenfor.

TABELL 1

		HELNINGSTEST (SEK.)	
	Gruppe	Middelverdier	S.E.M.
5	KONTROLL	27,6	2,4
	VIN ALENE	15,4*	6,5
	VIN + IGF LAV	30	0
	VIN +IGF HØY	27,7	2,3
10	IGF LAV	30	0
	IGF HØY	27	3

Data fra helningstesten. Verdiene representerer det tidsrom hvor dyrene kunne forbli utspent ved en vertikal helning med maksimumsinnstilling på 30 sekunder.

* Angir at denne verdi var forskjellig fra de andre grupper med $p < 0,0001$

20

TABELL 2

		MOTORISK TIBIAL-NERVE			
	Gruppe	Latenstid (m.Sek.)		Amplitude (mV)	
		Middel	S.E.M.	Middel	S.E.M.
25	KONTROLL	1,21	0,03	22,98	1,06
	VIN ALENE	1,35	0,05	13,94*	2,11
	VIN + IGF LAV	1,38	0,05	17,12	1,53
30	VIN + IGF HØY	1,43	0,08	18,48	1,89
	IGF LAV	1,21	0,02	19,8	1,81
	IGF HØY	1,23	0,03	20,76	1,47

Elektrofysiologiske målinger fra tibial-nerven.

35

* Angir at denne gruppe var forskjellig fra kontrollen med $p < 0,02$.

TABELL 3

SAMMENSATT HALE-NERVE

5	Gruppe	Latenstid (m.sek.)		Amplitude (mV)	
		Middel	S.E.M.	Middel	S.E.M.
	KONTROLL	1,39	0,03	57,32	3,47
	VIN ALENE	1,74**	0,09	30,66*	8,56
	VIN + IGF LAV	1,55*	0,03	37,01*	2,59
10	VIN + IGF HØY	1,58*	0,03	36,05*	1,65
	IGF LAV	1,46	0,03	55,93	5,68
	IGF HØY	1,45	0,03	51,96	4,25

Elektrofysiologiske målinger fra halenerven.

15

* Angir at disse verdier var forskjellige fra kontrollen med $p < 0,05$.

** Angir at denne verdi var forskjellig fra kontrollen med $p < 0,001$.

20

TABELL 4

SENSORISK SURAL-NERVE

25	Gruppe	Latenstid (m.sek.)		Amplitude (mV)	
		Middel	S.E.M.	Middel	S.E.M.
	KONTROLL	0,54	0,01	35,29	3,55
	VIN ALENE	0,62	0,04	55,66	7,46
	VIN + IGF LAV	0,61	0,02	44,49	7,09
30	VIN + IGF HØY	0,57	0,03	37,27	5,4
	IGF LAV	0,55	0,02	30,52	3,34
	IGF HØY	0,5	0,02	43,06	7,73

35

Elektrofysiologiske målinger fra sural-nerven. Det var ingen statistisk signifikante forskjeller gruppene imellom.

TABELL 5

MIDLER SOM FORÅRSAKER PERIFER NEUROPATI

	Middel	Aktivitet
5	acetazolamid	diuretisk
	akrylamid	flokkulerings-, fyllmiddel
	adriamycin	antineoplastisk
10	alkohol (etanol)	løsningsmiddel, forfrisknings-legemiddel
	almitrin	respiratorisk stimulans
	amiodaron	antiarytmisk
	amfotericin	antimikrobielt
	arsenikk	herbucid, insekticid
15	aurotioglukose	antireumatisk
	barbiturater	antikrampemiddel, beroligende
	trollhegg	toksisk bær
	karbamater	insekticid
	karbondisulfid (CS ₂)	industrielt
20	kloramfenikol	antibakterielt
	klorokin	antimalaria-middel
	kolestyramin	antihyperlipoproteinemisk
	cisplatin	antineoplastisk
	clioquinol	amøbicid, antibakterielt
25	colestipol	antihyperlipoproteinemi
	colchicin	giktdempende
	colistin	antimikrobielt
	cycloserin	antibakterielt
	cytarabin	antineoplastisk
30	dapson	dermatologisk innbefattende lepra
	dideoksytytidin	antineoplastisk
	dideoksyinosin	antineoplastisk
	dideoksytymidin	antiviralt
	disulfiram	antialkohol
35	doksorubicin	antineoplastisk
	etambutol	antibakterielt
	etionamid	antibakterielt
	glutetimid	sedativt, søvngivende
	gull	antireumatisk
40	heksakarboner	løsningsmidler
	hormonelle befruktnings- hindrende midler	
	heksametylolmelamin	brannsikrende, antikrøll
	hydralazin	blodtrykkssenkende
45	hydroksylorokin	antireumatisk
	imipramin	antidepressivt
	indometacin	anti-inflammatorisk
	uorganisk bly	toksisk metall i maling o.s.v.
	isoniazid	tuberkulose-motvirkende

	litium	antidepressivt
	metylkvikksølv	andustrielt avfall
5	metformin	antidiabetikum
	metylhydrazin	syntetisk mellomprodukt
	metronidazol	antiprotozo-middel
	misonidazol	radiosensibilisator
10	nitrofurantoin	urinveis-antiseptisk
	nitrogensennepe	antineoplastisk, nervegass
	dinitrogenoksyd	bedøvende
	organofosfater	insekticider
	ospolot	krampestillende
	penicillin	antibakterielt
15	perheksilin	antiarytmisk
	perheksilin-maleat	antiarytmisk
	fenytoin	krampestillende
	platina	legemiddel-komponent
	primidon	krampestillende
20	prokarbazin	antineoplastisk
	pyridoksin	vitamin B6
	natriumcyanat	kvalmestillende
	streptomycin	antimikrobielt
	sulfonamider	antimikrobielt
25	suramin	antineoplastisk
	tamoksifen	antineoplastisk
	taxol	antineoplastisk
	talidomid	lepra-motvirkende
	thallium	rottegift
30	triamteren	diuretikum
	trimetyltinn	toksisk metall
	L-tryptofan	helsekost-additiv
	vincristin	antineoplastisk
	vinblastin	antineoplastisk
35	vindesin	antineoplastisk
	vitamin A	megadoser
	vitamin D	megadoser

TABELL 6

EFFEKT AV TAXOL OG rhIGF-I PÅ HALESLAG-
OG VARMEPLATE-LATENSTIDER

5	Behandling ^{a,b}	Haleslag-latenstid (sek.)	Varmeplate-latenstid (sek.)
	rhIGF-I-bærerstoff	3,49 ± 0,15	8,72 ± 0,40
	Taxol-bærerstoff	3,70 ± 0,30	7,34 ± 0,44
10	rhIGF-I (1 mg/kg)	3,43 ± 0,14	8,10 ± 0,39
	Taxol/rhIGF-I- bærerstoff	4,99 ± 0,15 [*]	11,96 ± 0,54 [*]
	Taxol/rhIGF-I	3,70 ± 0,19	7,74 ± 0,61

15 ^{*} Betydelig forskjellig fra bærerstoff-, rhIGF-I- eller Taxol/rhIGF-I-behandlede grupper p < 0,05.

^a rhIGF-I-bærerstoff: Bærerstoffet anvendt for rhIGF-I ble administrert til én gruppe dyr som skulle tjene som kontrollgruppe, uten rhIGF-I selv.

20 Taxol-bærerstoff: Bærerstoffet anvendt for Taxol ble administrert til én gruppe dyr som skulle tjene som kontroll- gruppe, uten Taxol selv.

rhIGF-I (1 mg/kg): rhIGF-I i sitt bærerstoff ble administrert som beskrevet.

Taxol/rhIGF-I-bærerstoff: Taxol i sitt bærerstoff ble administrert til én gruppe dyr samtidig med bærerstoffet for rhIGF-I, men uten rhIGF-I selv.

25 Taxol/rhIGF-I: Både taxol i sitt bærerstoff og rhIGF-I i sitt bærerstoff ble administrert som beskrevet.

^b Bærerstoff-kontrollgrupper anvendes rutinemessig for å sikre at bærerstoffet som bærer midlet som skal utprøves, ikke har noen effekt i seg selv.

30

SEKVENSLISTE

(a) GENERELL INFORMASJON:

(i) SØKER: Cephalon, Inc.
Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University

35

(ii) OPPFINNELSENS TITTEL: FOREBYGGING OG BEHANDLING
AV PERIFER NEUROPATI

(iii) ANTALL SEKVENSER: 1

(iv) KORRESPONDANSE-ADRESSE:

(A) **ADRESSAT:** Fish & Richardson
 (B) **GATE:** 225 Franklin Street
 (C) **BY:** Boston
 (D) **STAT:** Massachusetts
 (E) **LAND:** U.S.A.
 (F) **ZIP:** 02110-2804

(v) COMPUTER-LESBAR FRA:

(A) **MEDIUM-TYPE:** 3,5" diskett, 1,44 Mb
 (B) **COMPUTER:** IBM PS/2 modell 50Z eller 55SX
 (C) **OPERATIVSYSTEM:** IBM P.C. DOS (versjon 3,30)
 (D) **PROGRAMVARE:** WordPerfect (versjon 5,0)

(vii) PRIORITETSSØKNADS-DATA:

(A) **SØKNADSNUMMER:** 07/899,070
 (B) **INNGIVELSESDATO:** 12. juni 1992

(viii) FULLMEKTIG/AGENT-INFORMASJON:

(A) **NAVN:** Paul T. Clark
 (B) **REGISTRERINGSNR.:** 30,162
 (C) **REFERANSE/DOKUMENTNR.:** 02655/026001

(ix) TELEKOMMUNIKASJONS-INFORMASJON:

(A) **TELEFON:** (617) 542-5070
 (B) **TELEFAX:** (617) 542-8906
 (C) **TELEX:** 200154

(2) INFORMASJON MED HENSYN TIL

SEKVENSI-IDENTIFISERINGSNUMMER: 1:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) **LENGDE:** 16
 (B) **TYPE:** aminosyre
 (C) **KJEDETYPE:**
 (D) **TOPOLOGI:** lineær

(ii) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKVI. ID NR.: 1:

Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys

Ser

Ala

P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av insulin-liknende vekstfaktor I (IGF-I) eller insulin-liknende vekstfaktor III (IGF-III) for fremstilling av et medikament for redusering av perifer neuropati som ikke er forårsaket av et unormalt insulin-nivå i et pattedyr.
5
2. Anvendelse ifølge krav 1, hvori medikamentet er tilpasset for å bli administrert intravenøst eller subkutant.
- 10 3. Anvendelse ifølge krav 1 eller krav 2, hvori neuropatien er assosiert med en systemisk sykdom, eller er et post-poliosyndrom, arvelig neuropati, Charcot-Marie-Tooth sykdom, eller er forårsaket av et toksisk middel så som et kjemoterapeutisk middel, alkohol, et metall, et industrielt toksin, et medikament, et vitamin, en kontaminant i en matvare eller en kontaminant i et medikament.
15
4. Anvendelse ifølge krav 3, hvori neuropatien er assosiert med et kjemoterapeutisk middel valgt fra vincristin, cisplatin, taxol eller dideoksyinosin.
5. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori det kjemoterapeutiske middel blir anvendt samtidig i en kombinert preparering.
20
6. Anvendelse ifølge krav 5, hvori IGF-I eller IGF-III og det kjemoterapeutiske middel er i et forhold på mellom 1:400 og 75:1 v/v.
- 25 7. Anvendelse ifølge krav 6, hvori det kjemoterapeutiske middel er vincristin.
8. Anvendelse ifølge krav 7, hvori forholdet er på mellom 1:40 og 8:1 v/v.
9. Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvori insulin-liknende vekstfaktor er IGF-I.
30

EFFEKT AV rhIGF-I PÅ MOTORISK FUNKSJON
ETTER VINCRISTIN-BEHANDLING

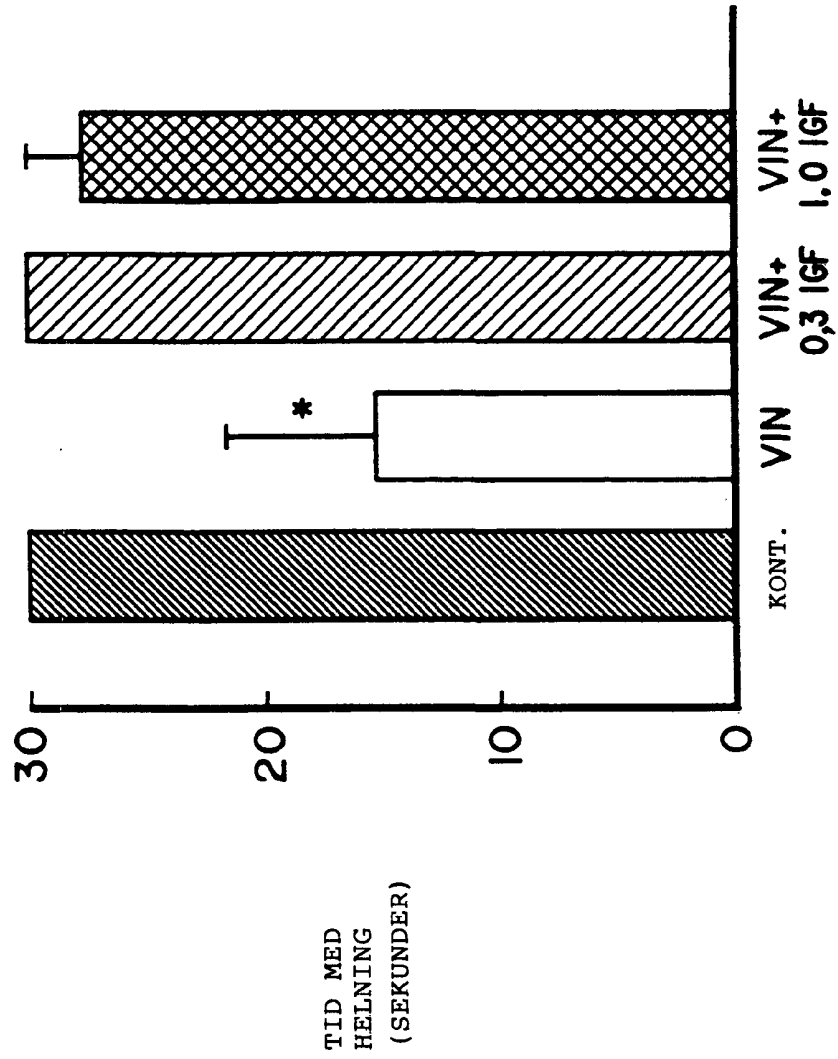


FIG. 1

EFFEKT AV rhIGF-I PÅ TIBIALNERVE-FUNKSJON
ETTER VINCRISTIN-BEHANDLING

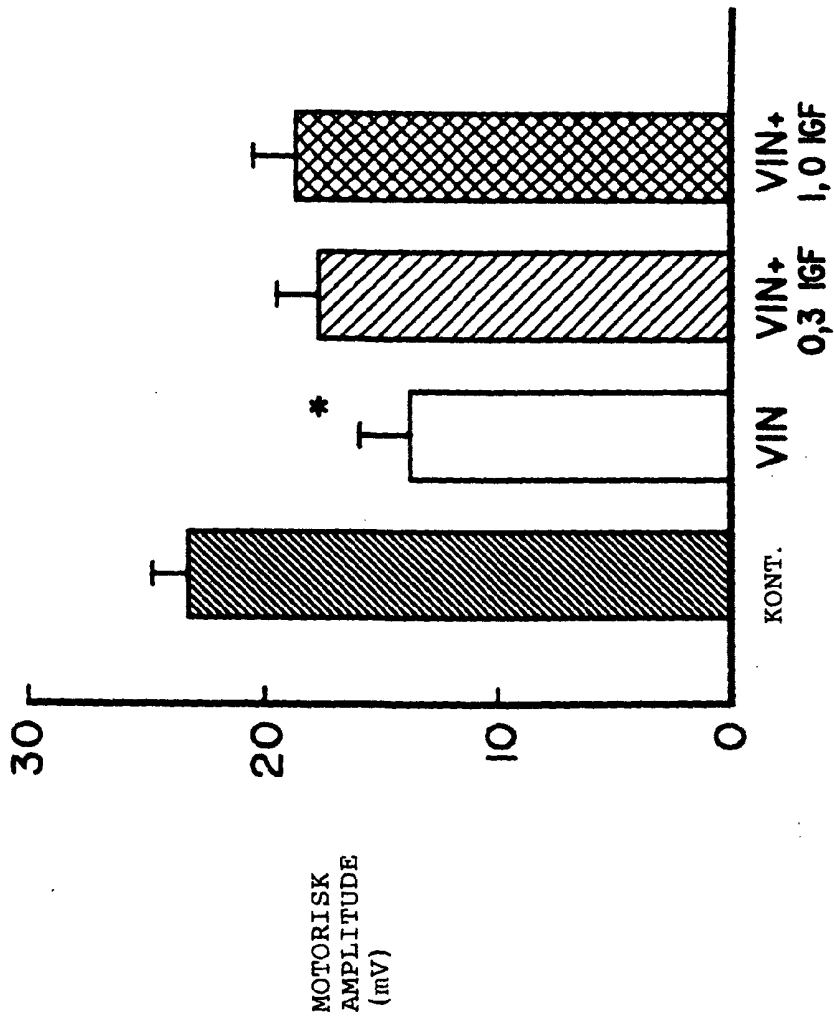


FIG. 2

EFFEKT AV rhIFG-1 PÅ HALENERVEFUNKSJON
ETTER VINCRISTIN-BEHANDLING

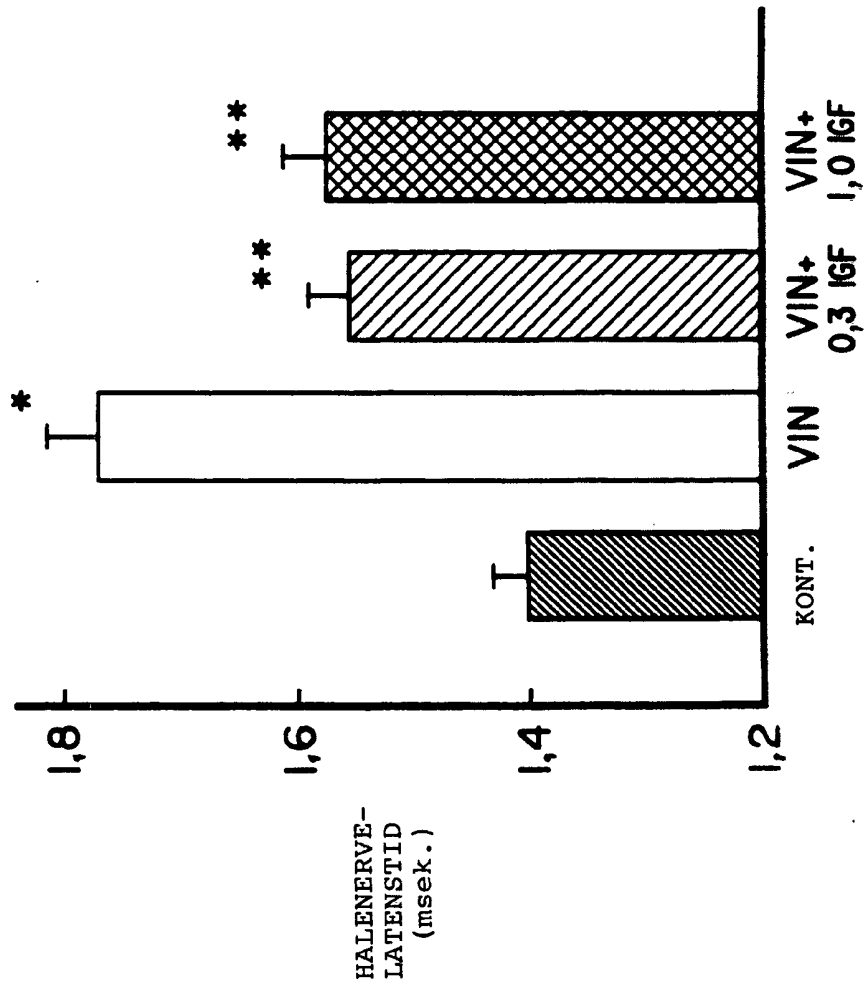


FIG. 3

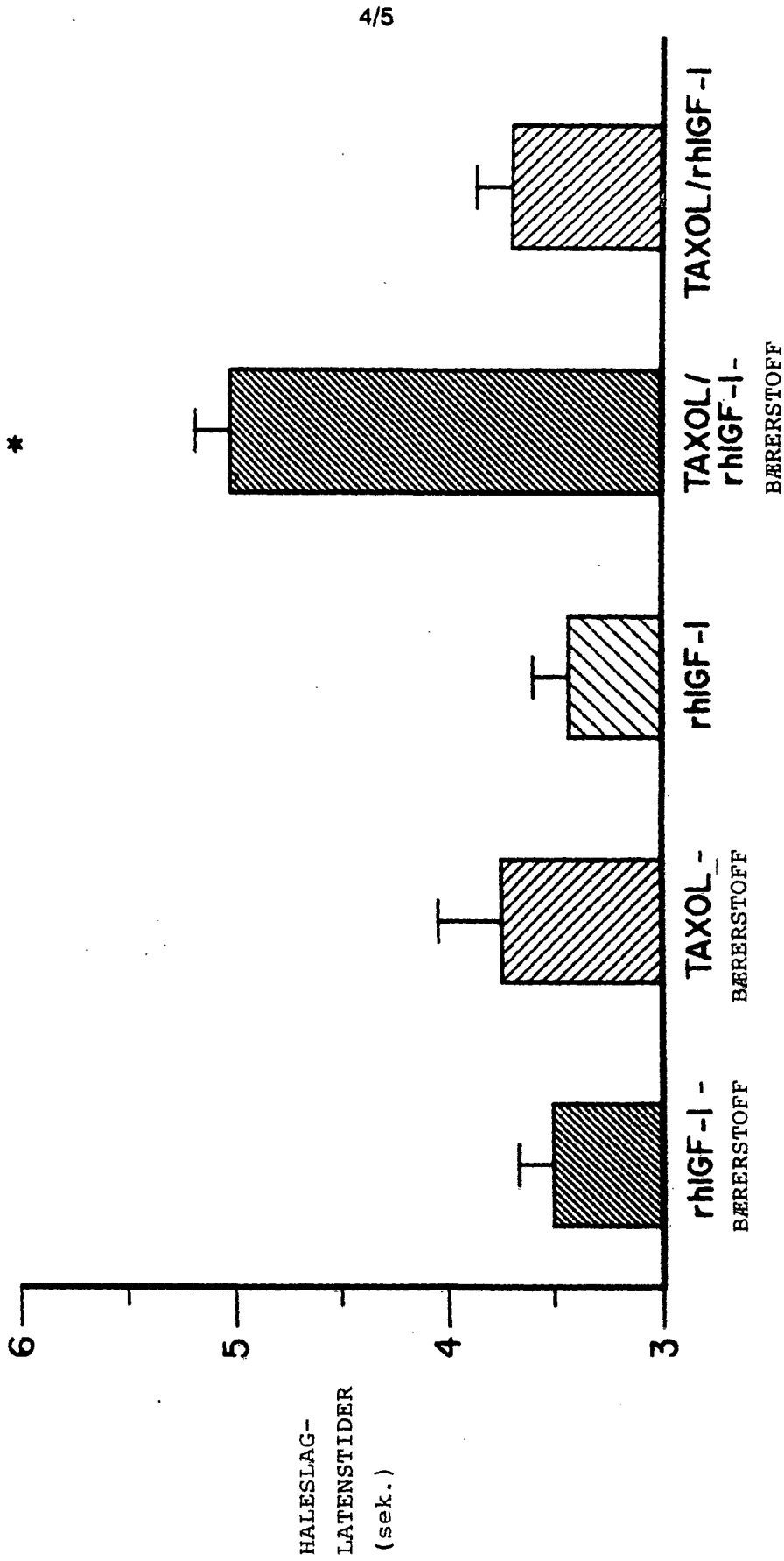


FIG. 4

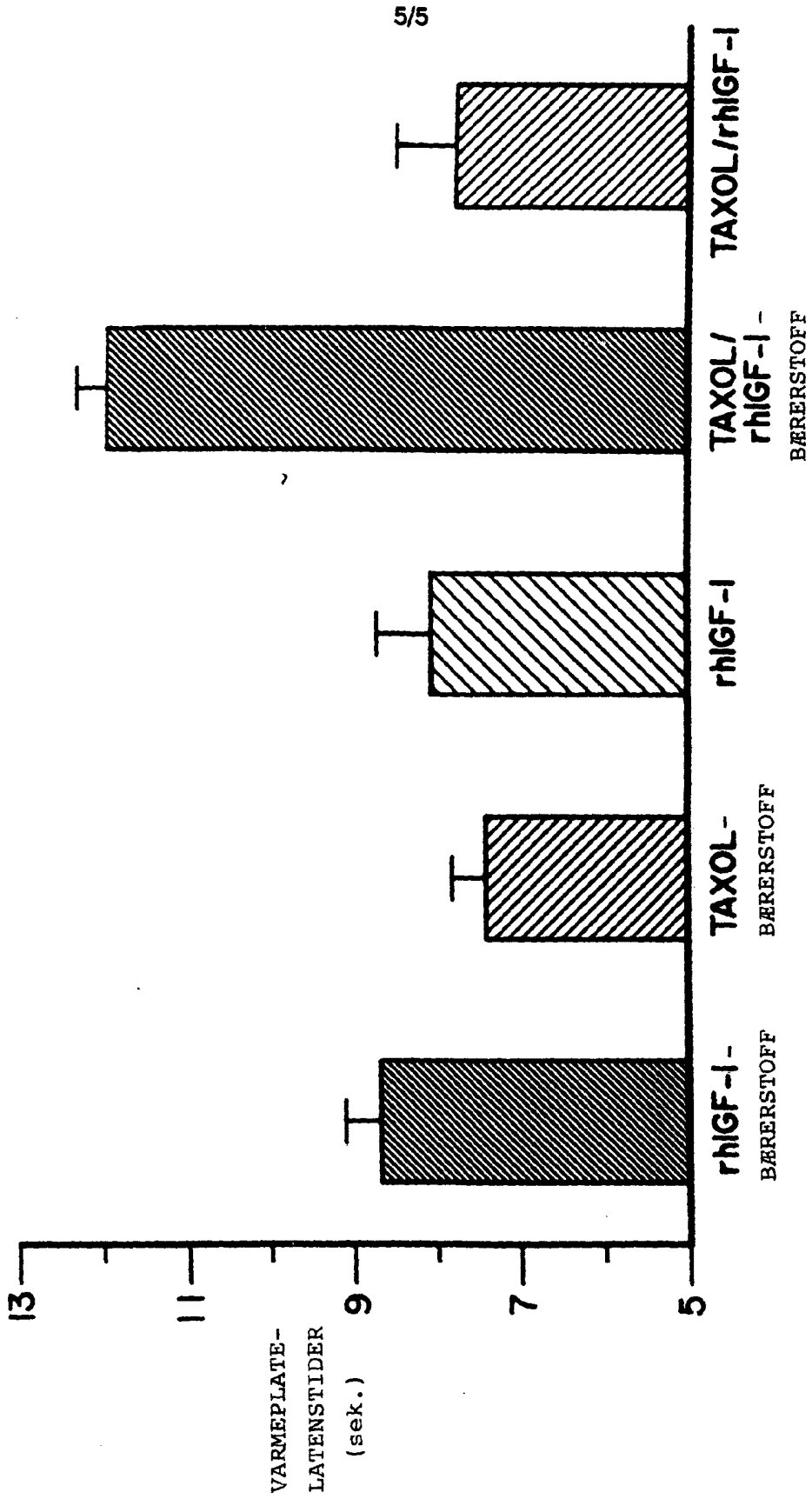


FIG. 5