

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

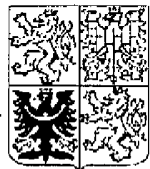
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**3721-97**

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24. 05. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.05.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/449436**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 03. 98**  
(Věstník č. 3/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/02256**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/37233**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**A 61 K 47/48**

(71) Přihlašovatel:

NOVARTIS AG, Basle, CH;

(72) Původce:

Kapa Prasad Koteswara, Parsippany, NJ, US;

Kardash Gleb, Rockaway, NJ, US;

KucEROVY Andrew, Flanders, NJ, US;

Lake Philip, Morris Plains, NJ, US;

Mattner Paul Gerard, Piscataway, NJ, US;

Petter Russell C., Rockaway, NJ, US;

Prashad Mahavir, Monteville, NJ, US;

Sharma Sushill, Budd Lake, NJ, US;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,  
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Konjugáty, způsob jejich přípravy a farmaceutické prostředky, které je obsahují**

(57) Anotace:

Ve vodě rozpustné konjugáty polymyxinu B a dextranu (nebo jejich soli) mají proti-endotoxinovou aktivitu větší než nekonjugovaný polymixin B. Mohou být připraveny reakcí polymyxinu B nebo jeho soli s detrexem ve vodném prostředí při pH od asi 9,3 do asi 10 a při teplotě od asi 30°C do asi 35°C.

CZ 3721-97 A3

175485/KB

Konjugáty, způsob jejich přípravy a farmaceutické prostředky které je obsahují.

#### Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy ve vodě rozpustných konjugátů (nebo jejich solí) polymyxinu B (PMB) nebo jeho solí a dextransu, přičemž se polymyxin B nebo jeho soli nechají reagovat s dextransem ve vodném prostředí při pH od asi 9,3 do asi 10, přednostně od asi pH 9,5 do asi pH 9,7, při teplotě od asi 30° do asi 35°C, přednostně okolo 32°C.

Výhodná varianta způsobu zahrnuje reakci síranu polymyxinu B s oxidovaným dextransem při teplotě asi 32°C, při které dojde k vytvoření kovalentní vazby mezi polymyxinem B a dextransem aminovou vazbou. Zlepšené konjugáty nebo jejich soli připravené způsobem podle vynálezu je možno snadno a reprodukovatelně připravit. Tyto konjugáty se vyznačují významně zlepšenými farmakologickými vlastnostmi, jako větší účinností a větší proti-endotoxinovou aktivitou ve srovnání s nekonjugovaným polymyxinem B.

Vynález se rovněž týká ve vodě rozpustných konjugátů nebo jejich solí, obsahujících polymyxin B nebo jeho sůl a dextrans, kteréžto konjugáty nebo jejich soli mají proti-endotoxinovou aktivitu větší než nekonjugovaný polymyxin B.

#### Dosavadní stav techniky

V lékařství je všeobecně uznávána potřeba účinné terapie syndromu multiorgánového zánětlivého selhání (SIRS) a septického šoku. Vysoký počet pacientů, přesahující 100 000 kritických případů syndromu multiorgánového zánětlivého selhání a septického šoku ve vyvinutých zemích vyžaduje

okamžitou terapii a téměř 1 milion pacientů, ohrožených vysokým rizikem sepse by mohlo mít z profylaxe užitek.

Na základě velkého počtu studií na lidech i na zvířatech je endotoxin považován za hlavní iniciátor/primární mediátor pathogenese syndromu multiorgánového zánětlivého selhání a dává vědecké zdůvodnění proti-endotoxinovému přístupu k sepsi. Endotoxiny nebo lipopolysacharidy jsou strukturní molekuly pocházející z buněčných stěn gram-negativních bakterií. Vneseny do krevního řečiště mohou být překážkou regulace tělesné teploty a způsobovat horečku. Jejich toxické účinky vedou k srdečním, plicním nebo ledvinovým selháním. Nemoci způsobené endotoxiny jsou hlavními příčinami úmrtí pacientů, umístěných na jednotkách intenzivní péče.

PMB je jediné antibiotikum, které je schopno neutralizovat endotoxin tak, že se naváže na lipidovou část A endotoxinové molekuly. PMB z Bacillus polymyxa (B.aerosporus) je vysoce nabitý amphiphilický cyklický peptidolipid. Je rovněž použitelný proti plísňovým infekcím, zvláště u pacientů se sníženou imunitou. Pro některé své vlastnosti však není PMB ideálním antibiotikem. Za prvé je to krátký poločas v organismu, který vyžaduje, má-li být antibiotikum účinné, opakované podávání. Za druhé při průchodu ledvinami může způsobit jejich rozsáhlé poškození. Za třetí, vysoké dávky mají neurotoxické vlastnosti způsobující zástavu dechu.

Již dříve konjugovali výzkumníci PMB k immobilizovaným nebo fixovaným molekulám, viz na př. Issekutz, J. Immunol. Methods 61, (1983) 275-281, popisují immobilisace konjugací PMB na Sepharosu. Tyto konjugáty, ačkoliv jsou použitelné při purifikačních postupech, se nehodí k terapeutickému užití in vivo.

Způsob vedoucí k dosažení farmakologické aktivity, prodloužení působení nebo snížení orgánové toxicity zahrnuje konjugaci léčiv s vysokomolekulárními molekulami jako jsou dextran, polyethylenglykol nebo polyvinylpyrrolidin. Pokusy v tomto směru s konjugací s polymery se však potkaly s omezeným úspěchem. Na příklad, konjugovaná forma prokainamidu (antiarytmické léčivo) byla méně aktivní a vykazovala kratší poločas působení než nativní prokainamid (Schacht a spol., Ann N.Y., Acad.Sci. 416, (1985) 199-211). Podobně analog prostaglandinu B245 navázaný na nosič byl méně aktivní (o několik řádů) než nativní molekula (Bamford a spol., Bioch.Biophys.Acta 886, (1986) 109-118). Snížení biologické účinnosti bylo rovněž popsáno u konjugovaných forem

kallikreinu, aprotininu, bradykininu (Ody a spol., Biochem. Pharmacol. 27, (1978) 173-179), protinádorové léčivo daunorubicin (Hurwitz a spol., J.Appl.Biochem. 2, (1980) 25-35), a mitomycin C (Takakura a spol., Cancer Res. 44, (1984) 2505-2510). Konjugované enzymy mají také sníženou biologickou aktivitu způsobenou sterickou zábranou a sníženou dostupností substrátu (Blomhoff a spol., Biochem.Biophys.Acta 757, (1983) 202-208; Marshall a spol., J.Biol.Chem. 251, (4) (1976) 1081-1087, R.L.Foster, Experimentia 31, (7) (1975) 772-773, Wileman a spol., J.Pharm. Pharmacol. 35, (1983) 762-765). V několika příkladech však dochází po konjugaci ke zlepšení oběhového poločasu (Wileman, supra; Kaneo, Chem.Pharm.Bull. 37 (1) (1989) 218-220).

Bylo by žádoucí vyvinout formu PMB, která by zůstala déle v krevním řečišti a/nebo neměla v terapeutických dávkách neuro- a nefrotoxické účinky. USP 5 177 059 a jeho ekvivalenty v jiných zemích, jako EP 428 486 popisují konjugáty polymyxinu B s polysacharidy jako s dextranem nebo hydroxyetyl škrobem, bílkovinami jako je albumin, a polymery, jako je polyvinylpyrrolidon, polyethylenglykol a

polyvinylalkohol. Tento vynález popisuje specificky způsob chemické konjugace polymyxinu B s dextranem probíhající za teploty místnosti (t.j. asi 25°C nebo méně) a pH 8,5-9,0. Ve vynálezu popsané konjugáty jsou méně toxické než nekonjugovaný polymyxin a mají proti-endotoxinovou aktivitu, která není jasně definována, ale zdá se být menší nebo rovna vlastnostem nekonjugovaného polymyxinu B.

Způsob přípravy podle předloženém vynálezu zlepšuje způsoby popsané ve shora uvedených patentech a zajišťuje přípravu konjugátů nebo jejich solí polymyxinu B nebo jeho solí, mající překvapivě zlepšené charakteristiky ve srovnání se známými PMB-dextranovými konjugáty, zvláště větší proti-endotoxinovou aktivitu než nekonjugovaný polymyxin B, lepší účinnost, lepší reprodukovatelnost a lepší farmakologické vlastnosti. Zvláště překvapující je, že nové PMB-dextranové konjugáty nebo jejich soli, podle tohoto vynálezu mají srovnatelně a reprodukovatelně větší proti-endotoxinovou aktivitu než nekonjugovaný PMB. Důvody pro tyto neočekávané nové charakteristiky nejsou na molekulární úrovni jasně zřejmé, je však pravděpodobné, že za reakčních podmínek, které jsou v předkládaném vynálezu použity, změna pH mění distribuci protonů basických postranních řetězců. Při vyšším pH jedna nebo více aminoskupin se nejspíše stane lépe přístupnou navázání reduktivní aminací. Poněvadž každá z aminových skupin má charakteristickou hodnotu pKa, vyšší pH uvolňuje vždy stejný amin. Jestliže tento amin je obzvláště vhodný pro navázání (z pohledu účinku konjugátu) vznikne lepší forma konjugátu, protože výběrový způsob navázání se podílí na celkové struktuře. Struktura propůjčuje konjugátům srovnatelně dobře reprodukovatelnou hladinu aktivity, která je vyšší než hladina aktivity nativního PMB, t.zn. 125% nebo více aktivity než nativní PMB.

Podstata vynálezu

Podstata vynálezu spočívá ve zlepšené přípravě ve vodě rozpustných konjugátů nebo jejich solí polymyxinu B a dextranu, použitelných pro léčení plísňových a bakteriálních infekcí a zabraňujících vzniku onemocnění způsobených bakteriálními endotoxiny. Zejména se vynález týká přípravy ve vodě rozpustných konjugátů polymyxinu B a dextranu, nebo jejich solí, reakcí polymyxinu B nebo jeho solí s dextranem ve vodném prostředí při pH od asi 9,3 do asi 10 a teplotě od asi 30° do asi 35°C. PMB je peptidové antibiotikum a osvědčený farmaceutický prostředek s mírnou antibiotickou aktivitou. Je klinicky používán místně nebo parenterálně více než 40 let. Vznik bakteriální resistance k PMB je velmi řídký. PMB váže endotoxin silou asi  $10^{-6}$  M a je schopen zrušit biologické působení endotoxinů všech klinicky důležitých gram-negativních bakterií velkého počtu modelů in vitro a in vivo. In vitro je používán jako standard k neutralizaci endotoxinů. Navíc, in vivo, chrání PMB proti patologii bakteriálních sepsí na mnoha modelech při acidose, hypotensi a bakteriálních sepsích a zabraňuje úmrtím vlivem gram-negativní sepse u psů, králíků, krys a myší. Účinně také brání vzniku sepsí u lidí, jako jsou popálení pacienti.

PMB užitý pro přípravu konjugátů v předkládaném vynálezu je komerčně dostupný. PMB může být připraven fermentací Bacillus polymyxa (Prazmowski) Migula. PMB se skládá ze směsi několika příbuzných dekapeptidů. PMB nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli jsou ve vynálezu použity (jako síran polymyxinu B a podobné).

K přípravě látek uvedených v tomto vynálezu může být použit kterýkoliv farmaceuticky vhodný dextran. K dosažení kovalentní vazby peptidů je výhodné dextran chemicky modifikovat na př. oxidovat oxidačním činidlem na př.

jodistanem sodným. Průměrná molekulová hmotnost dextranu je výhodná od asi 25 000 do asi 500 000, přednostněji od asi 50 000 do asi 200 000, ještě přednostněji od asi 63 000 do asi 76 000. Molekulová hmotnost může být stanovena na př. gelovou permeační vysokotlakou kapalinovou chromatografií. Nejvhodnější dextran je připravován fermentací Leuconostoc mesenteroides (NRRL B-512). Obsahuje glukozové jednotky, které spojeny  $\alpha(1-6)$ -vazbami v dlouhé lineární řetězce s přibližně 5% větvením. 85% větvených řetězců obsahuje 1 až 2 glukozové jednotky, zbývajících 15% průměrně 33 jednotek.

Obecný způsob přípravy konjugátu PMB a dextranu ve vodném prostředí je popsán v USP 5 177 059 a je použit v předloženém vynálezu. Přednostně je v předloženém vynálezu použit částečně oxidovaný dextran, připravený působením oxidačního činidla, jako je jodistan sodný ( $\text{NaJO}_4$ ). Při tomto postupu vznikají oxidativním štěpením vicinálních diolů glukozových monomerů aldehydy. Reakcí částečně oxidovaných dextranů s PMB, nebo jeho solí, vznikají Schiffovy baze. Příprava konjugátů v tomto vynálezu vyžaduje pečlivou kontrolu pH po dobu reakce PMB a dextranu, zvláště během vzniku Schiffovy báze, od asi 9,3 do asi 10, přednostně od asi 9,5 do asi 10, ještě přednostněji od asi 9,5 do asi 9,7. Hodnotu pH je nejlépe udržovat borátovým pufrem, především obsahuje-li tetraboritan sodný. Teplota vodného prostředí po dobu reakce PMB a dextranu musí být udržována od asi 30° do asi 35°C, lépe asi 32°C. Následně vnesený borohydrid sodný ( $\text{NaBH}_4$ ) redukuje Schiffovy baze a zbýající aldehydy a vytváří stabilní kovalentní vazby, přednostně mezi jednou nebo více aminovými skupinami, mezi PMB a dextranem. Konjugáty jsou přednostně čistěny ultrafiltrací na př. použitím membrán zadržujících látky s molekulovou hmotností větší než 10 000, kdy se odstraní zbýající PMB, anorganické meziprodukty (na

př. boráty) a eventuelně nízkomolekulární degradační produkty. Před čistěním je lépe nastavit pH vodného media na hodnotu asi 5 až 7.

Přednostní způsob přípravy v tomto vynálezu se vyznačuje tím, že zahrnuje;

- a) přípravu částečně oxidovaného dextranu reakcí dextranu jodistanem sodným;
- b) reakci polymyxinu B nebo jeho solí s připraveným částečně oxidovaným dextranem ve vodném prostředí při pH od asi 9,3 do asi 10 a teplotě od asi 30° do asi 35°C;
- c) přidání borohydridu sodného do výsledného vodného prostředí; a
- d) čištění vzniklého konjugátu polymyxin B-dextran.

Vynález se týká ve vodě rozpustných konjugátů nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí polymyxinu B nebo jeho farmaceuticky přijatelných solí a dextranu, konjugáty mající proti-endotoxinovou aktivitu větší než je proti-endotoxinová aktivita polymyxinu B, pro použití při prevenci a léčení syndromu multiorgánového zánětlivého selhání nebo septického šoku. Zahrnuje také takové konjugáty nebo jejich farmaceuticky přijatelné sole, připravené shora uvedeným způsobem a konjugáty a jejich farmaceuticky přijatelné sole získané během provádění uvedeného postupu, farmaceutické léčivé přípravky, obsahující ve vodě rozpustné konjugáty (nebo jejich farmaceuticky přijatelné sole) polymyxinu B nebo jeho farmaceuticky přijatelnou solí a dextran jak shora uvedeno; společně s nejméně jedním farmaceuticky přijatelným nosičem nebo přísadou a použití těchto konjugátů nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí pro přípravu léčiv použitelných k prevenci nebo léčení syndromu multiorgánového zánětlivého selhání a septického šoku.

Při způsobu přípravy podle tohoto vynálezu, stejně jako v konjugátech podle tohoto vynálezu připravených, je molekulový



poměr PMB nebo jeho solí k dextranu od asi 1:15 do asi 200:1, lépe od asi 1:2 do asi 1:5, nejlépe asi 1,5:5.

Sůl polymyxinu B je přednostně farmaceuticky přijatelná sůl PMB. Konjugát se považuje za ve vodě rozpustný, jestliže jeho rozpustnost je asi 25mg/ml nebo větší při 20°C; lépe 50mg/ml; nejlépe 65mg/ml nebo větší při 20°C.

Konjugáty PMB-dextran a jejich soli připravené podle vynálezu mohou být použity stejným způsobem jako PMB samotný, jmenovitě mohou být použity buď samostatně na př. jako antibiotikum při bakteriálních nebo plísňových infekcích nebo v kombinaci s jinými bakteriálními a /nebo protizánětlivými prostředky. Mohou být podávány v jakékoli formě, která je vhodná pro podávání nativního PMB na př. intramuskulárně intravenózně, intratekálně, subkonjunktiválně nebo místně. Složení pro intramuskulární injekční formu obsahuje typicky účinné množství PMB-dextranového konjugátu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli ve sterilní vodě, fyziologickém roztoku nebo přibližně 1% prokainu.HCl. Složení pro intravenózní injekční formu obsahuje typicky účinné množství konjugátu ve sterilní vodě. Složení pro intravenózní použití obsahuje typicky účinné množství konjugátu v 5% dextroze nebo vodě. Složení pro intratekální použití obsahuje typicky účinné množství konjugátu ve fyziologickém roztoku. Pro použití v očním lékařství je účinné množství konjugátu smícháno s vodou nebo fyziologickým roztokem a podle výběru s glycerinem nebo síranem měďnatým na oční kapky, nebo může být přidáno do masti nebo suspense. Krémy pro lokální použití, zvláště na spálená místa, obsahují typicky účinné množství konjugátu PMB-dextran nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli přidané do základu inaktivních ingrediencí jako parafinový olej, propylenglykol, polyoxypropylen, a emulsifikační vosk.

Čistěné konjugáty PMB-dextranu nebo jeho farmaceuticky použitelných solí podle tohoto vynálezu jsou v zásadě

nejedovaté. Množství konjugátu podle tohoto vynálezu, které má být použito lze stanovit podle množství PMB, které by bylo použito pro uvažovaného pacienta, s ohledem na stav pacienta, jeho věk, hmotnost a aktivitu příslušného konjugátu. Vzhledem ke zvýšené účinnosti konjugátů, menší toxicitě a prodloužené době působení je možné snížení dávky na polovinu nebo méně v porovnání s nativním PMB.

Molekulární hmotnosti konjugátů podle vynálezu mohou být stanoveny na př. vysokotlakou gelovou permeační chromatografií (SEC-HPLC, TSK-GEL G4000 Pwx1, eluce 40mM fosfátovým pufrém PH 4,4 a detekovány laserovým rozptylem při malých úhlech) a srovnáním s referenčním vzorkem dextranu majícím průměrnou molekulovou hmotnost 79 800. Konjugáty podle tohoto vynálezu mají mít přednostně průměrnou molekulovou hmotnost od asi 55 000 do asi 80 000, přednostněji od asi 80 000 nejlépe od asi 63 000 do asi 76 000.

Zlepšené konjugáty podle tohoto vynálezu jsou lépe reprodukovatelné, než konjugáty připravované dříve a mají větší proti-endotoxinovou aktivitu než nekonjugovaný polymyxin B. Konjugáty podle tohoto vynálezu mají zlepšenou proti-endotoxinovou aktivitu, zejména poměr  $IC_{50}$  nekonjugovaného polymyxinu B k  $IC_{50}$  konjugátů je větší než 1,0; přednostně větší než asi 1,25 nebo 1,3; přednostněji větší než asi 1,4. Použití  $IC_{50}$  zde znamená koncentraci polymyxinu B, měřenou stanovením metodou s použitím karbocyaninovým barvivem, které ruší 50% posun absorbance karbocyaninového barviva při 450 nm za přítomnosti 0,05mg endotoxinu z E.coli. Aktivita (v %) je definována:

$$\frac{IC_{50} \text{ nekonjugovaného polymyxinu B}}{IC_{50} \text{ konjugátu polymyxin B/dextran}} \times 100$$

Stanovení karbocyaninovým barvivem je biochemické stanovení používané in vitro ke stanovování proti-endotoxinových vlastností polymyxinu B a konjugátů připravených podle tohoto vynálezu. Toto stanovení je modifikací dříve publikovaných sdělení (Ogawa a Kanoh, Microbiol.Immunol.28, (1973) 1313-1323; Zey a Jackson, Applied.Microbiol.26, (1973) 129-133) a bylo optimalizováno pro použití mikrotitračních destiček. Při tomto stanovení konjugát nebo nekonjugovaný PMB (pozitivní kontrola) konkuruje karbocyaninovému barvivu (malá kladně nabitá molekula, která mění spektrofotometrickou absorbanci při vazbě na endotoxin) ve vazbě s endotoxinem.

Příprava roztoků pro stanovení pomocí karbocyaninového  
barviva;

- 1) Připraví se roztoky 0,15 M octanu sodného a 0,15 M kyselina octové. Smísením obou se získá 0,03 M octanový pufr (40,2 ml 0,15 M octanu sodného a 159,8 ml 0,15 M kyseliny octové).
- 2) 8,0 mg karbocyaninového barviva se rozpustí ve 12,5 ml ethylalkoholu. Tento roztok se zředí 37,5 ml octanového pufru. Výsledný roztok je 25% etanolický roztok s obsahem barviva 160µg/ml, který musí být uchováván v ledové lázni ve tmě a smíchán nejméně 30 minut.
- 3) seriové ředění PMB a každého konjugátu se připravovuje ve 40mM fosfátovém pufru (pH=7,4). Každé ředění je 6x větší než konečná stanovovaná koncentrace.
- 4) po sonikaci, E.coli 0111:B<sub>4</sub> je endotoxin zředěn na 0.5mg/ml fyziologickým roztokem, z dříve připraveného, zamraženého zásobního roztoku o koncentraci 1.0mg /ml fyziologického roztoku.

Stanovení na destičkách se provádí následujícím způsobem tak, že do prohlubní se nanáší vzorek nebo pufr jako první;

- a) blank: 100  $\mu$ l fyziologického roztoku a 50  $\mu$ l 40 mM fosfátového pufru (pH=7,4), 3x paralelně;
- b) pozitivní kontrola: 100  $\mu$ l endotoxinu a 50  $\mu$ l 40nM fosfátového pufru (pH=7,4), 3x paralelně;
- c) PMB vzorky: 100  $\mu$ l endotoxinu a 50  $\mu$ l vzorků PMB, 3x paralelně;
- d) negativní kontroly: 100  $\mu$ l fyziologického roztoku a 50  $\mu$ l vzorků konjugátů, 3x paralelně;
- e) stanovení: 100  $\mu$ l endotoxinu a 50  $\mu$ l vzorků konjugátů, 3x paralelně.

Destičkami je několik minut otáčeno. 150  $\mu$ l barviva se přidá do každé prohlubně, destičky jsou zabalí do folie a ponechají na ledu ve tmě 60 minut. Obsah prohlubní se promíchá multikanálovou pipetou a ihned se stanovení absorbce při 450 nm na zařízení vyhodnocujícím mikrotitrační destičky. Výpočet  $IC_{50}$  se provede Reed-Muenchovou metodou.

Vynález je ilustrován následujícími příklady bez omezení. Všechny teploty jsou uvedeny ve stupních Celsia.

#### Příklady provedení vynálezu.

##### Příklad 1

##### A) Oxidace dextranu

5 litrová, 4-hrdlá baňka s kulatým dnem se naplní 2,3 litry vody pro injekční použití a 150 g dextranu. Směs se míchá do rozpuštění při 21°-24° přibližně 140 otáčkami/min. Přidá se roztok 3,9 g jodistanu sodného rozpuštěného v 60 ml vody pro injekční použití (mírně exotermní, přibližně 1°). Nálevka, kterou se přidávalo se spláchne 30 ml vody pro injekční použití. Výsledná směs se ponechá 1 hodinu při 21°-

24°. Pomocí vakua se roztok přefiltruje přes 0,22  $\mu\text{m}$  acetylcelulosovou filtrační membránu Corning, zahřeje na 30°-32° a udržuje při této teplotě.

#### B) Příprava síranu polymyxinu B/borátový pufr

Tento postup se začíná 45 minut před dokončením oxidace dextranu, filtrace a zahřátí viz A) nahoře. 12 litrová 4-hrdlá baňka s kulatým dnem se naplní 3,00 l borátového pufru pH 9,7, teplota pufru se upraví na 32°. Dále se přidá 45 g síranu polymyxinu B a vzniklá suspence se míchá při 32° 45 minut. Změří se pH směsi (na začátku 9,4) a upraví se na 9,7 při 32° přidavkem 30 ml 5 N NaOH.

~~Příprava borátového pufru: do vypálené 5 litrové 4-hrdlé~~ baňky s kulatým dnem se vnese 114,3 g tetraboritanu sodného dekahydrátu a 2,906 litrů (2,9 kg) vody pro injekční použití. Roztok se zahřeje na 32°C a pH se upraví na 9,7 (původně 9,3) přidavkem 37 ml 5 N NaOH. Roztok se pomocí vakua sfiltruje přes sterilní acetylcelulosový membránový filtr 0,22  $\mu\text{m}$  Corning o průměru 90 mm a skladuje.

#### C) Reakce sulfátu polymyxinu B s oxidovaným dextranem

Předeřhřátý (30°-32°) roztok oxidovaného dextranu (podle část A) se přidá co nejrychleji do míchané směsi roztoku polymyxinu v borátovém pufru o teplotě 32° (z části B). Po přidání se změří pH (původní 9,5) a upraví na 9,7 přidavkem 18 ml 5 N NaOH. Směs se míchá při 32° 1 hodinu. Do heterogenní směsi se přidá roztok 3,6 g borohydridu sodného v 50 ml vody pro injekční účely. Směs se míchá 2 hodiny při 32°. Ke směsi se přidá roztok 3,6 g borohydridu sodného v 50 ml vody. Přeruší se zahřívání a reakční směs se nechá za stálého míchání ochladit na teplotu místnosti během 14 hodin. pH reakční směsi se změří (10,0) a nastaví na 5,7 přidavkem

1,27 litru 1 N HCl. Výsledná směs se míchá po okyselení 10 minut, pomocí vakua se sfiltruje sterilním 0,22 $\mu$ m acetylcelulosovým membránovým filtrem Corning; získá se 6,8 litru roztoku konjugátu polymyxin B - dextran, který se použije pro čištění.

#### D) Čištění ultrafiltrací

Roztok konjugátu polymyxin B-dextran (z části C) se čistí s použitím předem upravené ultrafiltrační jednotky CH2PRS firmy Amicon s membránovou patronou S1Y10. Vyčištěný produkt se vyjme z ultrafiltrační jednotky a skladuje zmrazený na - 25°.

Podle analýzy má získaný konjugát následující charakteristiky:

$IC_{50}$  = 16,8  $\mu$ g/ml

aktivita = 124,7 %

obsah dextranu = 65,37 mg/ml

celkový obsah polymyxinu B = 2,47 mg/ml

obsah volného polymyxinu B = 0,65 %

poměr PMB:dextran = 37,71 mg PMB/g dextranu

Ukázalo se, že aktivita produktu získaného při reakční teplotě 32° a pH 9,5 je asi 125 % aktivity nekonjugovaného PMB.

#### Příklad 2

Příprava uvedená v příkladu 1 je opakována a získaný konjugát polymyxin B-dextran má následující charakteristiky:

$IC_{50}$  = 16,4  $\mu$ g/ml

aktivita = 125,8 %

obsah dextranu = 65,30 mg/ml

celkový obsah polymyxinu B = 2,49 mg/ml

obsah volného polymyxinu = 0,67 %

poměr PMB:dextran = 38,06 mg PMB/g dextransu

Konjugát získaný při reakční teplotě 32° a pH 9,5 vykazuje 126 % aktivity nekonjugovaného PMB.

### Příklad 3

Konjugáty polymyxin B/dextran byly připraveny postupem uvedeným v příkladu 1 (výjimky jsou označeny) za účelem stanovení vlivu teploty na reakci mezi PMB a dextransu při pH 9,7. Bylo stanoveno užitečné zatížení (mg PMB/g dextransu), průměrná  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), a aktivita (%). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1:

Tabulka 1: Vliv teploty při pH 9,7

(10 mg PMB; 0,65 g  $\text{NaIO}_4$ ; 50 g dextransu)

| Vzorek č. | Teplota | Užitečné zatížení<br>mg PMB/g dextransu | Průměrné<br>$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Aktivita<br>(%) |
|-----------|---------|-----------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|
| 3a        | 35°     | 15,87                                   | 25,18                                      | 99,7            |
| 3b        | 35°     | 19,81                                   | 26,07                                      | 91,1            |
| 3c        | 35°     | 18,58                                   | 27,67                                      | 85,0            |
| 3d        | 10°     | 49,53                                   | 143,83                                     | 23,6            |
| 3e        | 10°     | 54,95                                   | 187,87                                     | 9,5             |
| 3f        | 10°     | 56,03                                   | 195,7                                      | 10,8            |

Z příkladu 3 je zřejmé, že snížením reakční teploty na 10°, při pH 9,7, se získá produkt s nižší aktivitou.

### Příklad 4:

Konjugáty polymyxin B/dextran byly připraveny postupem uvedeným v příkladu 1 (výjimky jsou označeny) za účelem stanovení vlivu pH na reakci mezi PMB a dextranem. Bylo stanoveno užitečné zatížení (mg PMB/g dextranu), průměrná hodnota  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) a aktivita (%) a výsledky jsou uvedeny v tabulce 2:

Tabulka 2: Vliv pH při teplotě 32°

| Příklad č. | pH reakce          | Užitečné zatížení (mg PMB/g dextranu) | Průměr $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Aktivita (%) |
|------------|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------|
| 4a         | 4,0 <sup>a)</sup>  | 2,36                                  | ND                                    | ND           |
| 4b         | 5,0 <sup>a)</sup>  | 14,34                                 | ND                                    | ND           |
| 4c         | 7,0 <sup>b)</sup>  | 15,26                                 | ND                                    | ND           |
| 4d         | 7,0 <sup>b)</sup>  | 16,09                                 | 164,4                                 | 11,0         |
| 4e         | 8,0 <sup>b)</sup>  | 32,03                                 | 107,7                                 | 17,8         |
| 4f         | 8,0 <sup>b)</sup>  | 29,51                                 | 139,4                                 | 13,8         |
| 4g         | 8,5 <sup>c)</sup>  | 69,94                                 | 74,5                                  | 24,0         |
| 4h         | 9,0 <sup>c)</sup>  | 50,99                                 | 22,6                                  | 95,3         |
| 4i         | 9,0 <sup>c)</sup>  | 50,16                                 | 22,5                                  | 88,6         |
| 4j         | 9,3 <sup>c)</sup>  | 43,33                                 | 19,4                                  | 94,0         |
| 4k         | 9,3 <sup>c)</sup>  | 39,96                                 | 19,0                                  | 95,8         |
| 4l         | 9,5 <sup>c)</sup>  | 38,22                                 | 17,5                                  | 100,5        |
| 4m         | 9,5 <sup>c)</sup>  | 39,9                                  | 17,8                                  | 98,1         |
| 4n         | 9,7 <sup>c)</sup>  | 36,74                                 | 15,8                                  | 133,2        |
| 4o         | 9,7 <sup>c)</sup>  | 34,99                                 | 14,9                                  | 148,9        |
| 4p         | 10,0 <sup>c)</sup> | 31,89                                 | 18,7                                  | 97,3         |

a) octanový pufr; b) fosfátový pufr; c) borátový pufr;

ND: nestanoveno (vzorky jsou příliš zředěny, nelze stanovit)

Hodnoty v tabulce 2. ukazují, že snížení reakční teploty na 32° při pH mezi 9,5 a 9,7 umožňuje připravit konjugáty



jejichž aktivita je lepší než aktivita nenavázaného PMB (příklady 4l, 4n a 4o), zatím co další zvýšení pH na 10,0 není výhodné (příklad 4p).

#### Příklad 5:

Byly připraveny konjugáty Polymyxin/dextran jako v příkladě 1 (výjimky jsou uvedeny) a byla měřena jejich proti-endotoxinová aktivita. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3:

Tabulka 3: Vliv množství PMB

(1,3 g NaIO<sub>4</sub>: pH 9,7; 32°)

| Příklad č. | Podmínky | Užitečné zatížení<br>mg PMB/g dextransu | Průměr IC <sub>50</sub><br>(μg/ml) | Aktivita<br>(%) |
|------------|----------|-----------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| 5a         | 15 g PMB | 36,74                                   | 15,8                               | 133,2           |
| 5b         | 15 g PMB | 34,99                                   | 14,9                               | 148,9           |
| 5c         | 15 g PMB | 33,81                                   | 17,6                               | 109,0           |
| 5d         | 20 g PMB | 46,06                                   | 19,7                               | 121,5           |
| 5e         | 20 g PMB | 44,63                                   | 19,5                               | 115,5           |

Výsledky uvedené v tabulce 3 dále potvrzují, že optimální reakční podmínky jsou teplota asi 32° a pH od asi 9,5 do asi 9,7.

Shrnuto, výsledky uvedené v příkladech 1 až 5 ukazují, že při použití reakční teploty od asi 30° do asi 35° přednostně 32°, a pH od asi 9,3 do asi 10, přednostně asi 9,5 do asi 9,7, je možno připravit zlepšené konjugáty podle předloženého vynálezu.

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Ve vodě rozpustný konjugát nebo jeho sůl, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se skládá z polymyxinu B nebo jeho soli dextranu a má proti-endotoxinovou aktivitu větší než je proti-endotoxinová aktivita nekonjugovaného polymyxinu B, tedy poměr  $IC_{50}$  nekonjugovaného polymyxinu B k  $IC_{50}$  konjugátu je větší než 1,0.
2. Konjugát nebo jeho sůl podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že molekulový poměr polymyxinu B nebo jeho soli k dextranu je od asi 1 : 15 do asi 200 : 1.
3. Konjugát nebo jeho sůl podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje dextran o průměrné molekulové hmotnosti od asi 25 000 do asi 500 000.
4. Konjugát nebo jeho sůl podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje dextran o průměrné molekulové hmotnosti od asi 63 000 do asi 76 000.
5. Konjugát nebo jeho sůl podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že má průměrnou molekulovou hmotnost od asi 63 000 do asi 76 000.
6. Způsob přípravy ve vodě rozpustných konjugátů nebo jejich solí polymyxinu B nebo jeho soli a dextranu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že polymyxin B nebo jeho sůl se nechá reagovat s dextranem ve vodném prostředí při pH od asi 9,3 do asi 10 a při teplotě od asi 30° do asi 35°C.
7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že jako soli polymyxinu B se použije síran polymyxinu B.

SUBSTITUTE SHEET

8. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že průměrná molekulová hmotnost dextransu je od asi 63 000 do asi 76 000.

9. Způsob podle nároku 6, pro přípravu ve vodě rozpustného konjugátu (nebo jeho soli) polymyxinu B nebo jeho soli a dextransu v y z n a č u j í c í s e t í m, že se

- a) připraví částečně oxidovaný dextran reakcí dextransu s jodistanem sodným;
- b) polymyxin B nebo jeho soli se nechají reagovat s částečně oxidovaným dextransem ve vodném prostředí při pH od asi 9,3 do asi 10 a při teplotě od asi 30° do asi 35°C, načež se
- c) přidá borohydrid sodný do vzniklého vodného prostředí a
- d) získaný konjugát se vyčistí.

10. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje ve vodě rozpustný konjugát, nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, polymyxinu B nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli a dextransu, přičemž tento konjugát má proti-endotoxinovou aktivitu definovanou v nároku 1, spolu s nejméně jedním farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

SUBSTITUTE SHEET