

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLmányi
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

210 901 A9

(21) A kérelem ügyszám: P/P 00162

(22) A bejelentés napja: 1995. 06. 02.

(30) Elsőbbségi adatok:

437 487 1989. 11. 13. US

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 47/48

Az alapul szolgáló szabadalom

száma: 0 428 486 országkódja: EP

Az alapul szolgáló külföldi szabadalomnak

az oltalmi idő számítása szempontjából

figyelembe veendő kezdő napja: 1990. 11. 13.

Az oltalom e naptól számított 20 évig tartható fenn.

A hazai oltalom kezdete: 1994. 07. 01.

(72) Feltalálók:

Handley, Dean Allen, Mountain Lakes,

New Jersey (US)

Lake, Philip, Parsippany, New Jersey (US)

(73) Szabadalmaz:

Sandoz AG., Bázél (CH)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi

Szabadalmi Iroda, Budapest

(54)

Polimixin konjugátumok

Az átmeneti oltalom az 1–27. és 29. igénypontokra vonatkozik.

A találmány tárgyát új polimixin konjugátumok, azok előállítási eljárásai és alkalmazásuk képezik.

Az endotoxinok vagy lipopoliszacharidok a Gram-negatív baktériumok sejtfalából származó szerkezeti molekulák. A véráramba jutva zavarják a test hőmérsékletszabályozását és lázat okoznak. Szív-, tüdő- és veseelégtelenséghez vezető toxikus hatások is van. Az intenzív osztályokon fekvő betegek között az endotoxinnal kapcsolatos betegségek képezik az egyik jelentős elhalálozási okot.

Az antibiotikumok között egyedülálló a polimixinnek, különösen a polimixin B (PMB) endotoxint semlegesítő képessége, amelyet az endotoxin molekula A lipídónájához való kötődéssel ér el. A *Bacillus polymyxa*-ból (*B. aerosporus*) származó polimixin B egy nagy elektromos töltéssel bíró amfilil ciklikus peptido-lipid. A polimixin a különböző gombás fertőzések leküzdésében is alkalmazható, különösen az csökkent immunképességű egyénekkel jelentkező esetekben.

Van azonban a PMB-nek néhány olyan tulajdonsága, amely kevésbé ideális antibiotikumá teszi. Először, a testben rövid felezési élettartamú, ezért ismételt adagok szükségesek a hatékonyság elérése céljából. Másodszor, a vesén áthaladva kiterjedt károsodásokat okozhat. Harmadszor, nagy adagok esetében neurotoxikus tulajdonságai vannak, amelyek légzésbénulást okoznak.

Korábban a kutatók a polimixint mozdulatlan vagy rögzített molekulákhoz kötötték. Lásd például Issekutz közlését [J. Immunol. Methods, 61, 275–281 (1983)] PMB-nek Sepharose-hoz való rögzítéséről. Míg ezek a rögzített molekulák alkalmazhatók a tisztítási technológiákban, nem alkalmasak az in vivo terápiás felhasználásra.

A farmakológiai aktivitás, a megnövelt tartózkodási idő vagy a csökkentett szervi toxicitás elérését szolgáló egyik megközelítés a gyógyszereknek nagy molekulatömegű makromolekulákhoz, például dextránhoz, polietilénlikolhoz vagy poli(vinil-pirrolidon)-hoz való kötődésével jár együtt. A polimerkötésnek ezen a területén azonban a kísérletek csak korlátozott sikerrel jártak. Például a prokain-amid (egy arhythmia ellenes szer) kötött formája kevésbé aktív, bizonyult, és rövidebb felezési élettartamot mutatott, mint a natív prokainamid [Schacht és munkatársai; Ann. NY Acad. Sci., 446, 199–211 (1985)]. Hasonlóan, egy prosztataglandin analóg, a B245, egy hordozóhoz kötve (néhány log nagyságrenddel) kevésbé volt hatékony, mint a natív molekula [Bamford és munkatársai; Biochem. Biophys. Acta, 886, 109–118 (1986)]. A biológiai potenciál csökkentését kövölték kallikrein, aprotinin, bradikinin kötött formáira [Oda és munkatársai; Biochem. Pharmacol., 27, 173–179 (1978)] és a tumorellenes gyógyszerekre, daunorubicinre [Hurwitz és munkatársai; J. Appl. Biochem., 2, 25–35 (1980)] és mitomycin C-re [Takakura munkatársai; Cancer Res., 44, 2505–2510 (1984)]. A kötött enzimek a térbeli gátlás és a csökkent szubsztát megközelíthetőség következtében is biológiai aktivitáscsökkenést szenvednek [Blomhoff és munkatársai; Biochem. Biophys. Acta, 757, 202–208

(1983); Marshall munkatársai, J. Biol. Chem., 251, 1081–1087 (1976); Foster; Experientia, 31, 772–3 (1975); Wileman és munkatársai, J. Pharm. Pharmacol., 35, 762–765 (1983)]. Van azonban néhány példa a keringési felezési élettartam megkötés utáni javulására [Wileman és munkatársai előbb idézett cikke; Kaneo, Chem. Pharm. Bull., 37, 218–220 (1989)].

Kíváncos lenne egy olyan polimixin forma kifejlesztése, amely hosszabb ideig tartózkodhatna a véráramban, és/vagy nem lenne neuro- vagy nefrotoxikus a terápiás adagoknál.

A találmány tárgyát olyan polimixin-hordozó konjugátumok képezik, amelyek vízben oldódnak, például polimixin A-, B- vagy E- hordozó konjugátumok, különösen a PMB-hordozó konjugátumok. Ezeket endotoxinok semlegesítésében való alkalmazásra javasoljuk, és javulást jelentenek a natív polimixin adagolásához képest, mert hatékonyabbak annál és kevésbé toxikusak.

A leírásban a következő definíciókat használjuk:

- 20 – LD₀ PBM-nek vagy konjugátumainak legnagyobb, nem toxikus adagja;
- LD₁₀₀ PBM-nek vagy rögzített formáinak az az adagja, amely normális kísérleti állatba injektálva 90–100%-os elhullást eredményez.
- 25 – PD₁₀₀ Polimixin B-nek vagy kötött formáinak az az adagja, amely túlérzékenyített kísérleti állatba injektálva legalább 95%-os túlélést eredményez.
- A terápiás indexet (TI) LD₁₀₀-nak PD₁₀₀-zal való osztásával számítjuk ki.
- 30 – A konjugátum az itt használt értelemben akkor oldható vízben, ha vízben való oldhatósága legalább 0,5 mg/ml 25 °C-on, előnyösen legalább 1 mg/ml 25 °C-on. Az ilyen konjugátumok vízben oldhatóak, és injektálhatóak, nem matrix kötéseket, kolloidok, nem keresztkötések, nem makromolekulárisak és/vagy nem makrorészecskék.

A polimixinhez társuló hordozót olyan molekulából választjuk ki, amelyek képesek vízben oldható konjugátumokat képezni, és amelyek egységesek, nem toxikusak, nem rákkeltők, nem irritálnak és nem immunogének. Ilyen normálisan egy biopolimer. Ilyen hordozók a poliszacharidok, például dextrán vagy (hidroxietil)-keményítő (HES), fehérjék, például albumin és polimerek, például poli(vinil-pirrolidon), polietilénlikol és poli(vinil-alkohol). A dextrán a legelőnyösebb.

A biopolimer résznek, azaz a konjugátum hordozórészének mérete változhat, és jellemzően 25 000–500 000 közötti, előnyösen 50 000–300 000 közötti, még előnyösebben 79 000–200 000 közötti molekulatömeg tartományban van. A választott biopolimer mérete jelentősen hozzájárulhat a konjugátum vérben való tényleges cirkulálási idejének hosszához. Így a biopolimer méretét beállíthatjuk úgy, hogy olyan konjugátumot eredményezzen, amelynek a testben való tartózkodási ideje megfelel egy előre meghatározott időtartamnak.

A találmány szerinti konjugátumokat hagyományos módon állíthatjuk elő.

Vegyük példaként a polimixin B-t. Ez öt, bakteriális endotoxinhoz kötődő γ-aminocsoportot tartalmaz. A PMB-nek a hordozóhoz való biztonságos kötődéséhez

legalább egy γ -aminocsoportot használhatunk, de nem használhatjuk fel erre a célra mind az öt helyet, mert a konjugátum híján lesz az endotoxint semlegesítő aktivitásnak. Polimixinnek ezekhez a hordozókhoz való kötésére különböző kémiai reakciókat használhatunk. Az egy polimer molekulában levő kötött PMB molekulák számát a reagáló alkotórészek arányának változtatásával befolyásolhatjuk a párosítási reakció alatt. Általában a konjugátum moláris alapon 1 PMB : 15 biopolimer és 200 PMB : 1 biopolimer közötti, még előnyösebben a konjugátum 1–10 PMB : 1 biopolimer és ennél is előnyösebben 1–3 PMB : 1 biopolimer arányt tartalmaz. Úgy tapasztaltuk, hogy a nagy PMB : biopolimer arányú konjugátumok nagyobb potenciállal rendelkeznek, mint a kisebb arányú konjugátumok.

Polimixin-hordozó konjugátum, még pontosabban PMB-dextrán konjugátum egyik előállítási módszere a karbamátkötéses eljárás (A eljárás). Úgy találtuk, hogy az így módon előállított (alább az 1. példában részletezett) PMB-dextrán konjugátumok megőrzik a natív PMB endotoxin ellenes aktivitását, és ezenkívül azt tapasztaltuk, hogy mentesek a natív PMB által mutatott akut neurotoxicitástól. A csökkent krónikus toxicitás következtében ezek a rögzített formák 2–5-szörösen jobb terápiás indexet mutatnak, mint a natív PMB.

Az összekapcsolt polimixin-dextrán előállításának második módszere az aminokötéses eljárás (B eljárás). Az így módon előállított (alább a 2. példában részletezett) PMB-dextrán konjugátumok ugyanolyan általános endotoxin ellenes aktivitásúak, mint a natív PMB, vagy aktívabbak. Ezek a rögzített formák teljesen mentesek a natív PMB-nél tapasztalható bármilyen akut neurotoxicitástól, és a csökkent krónikus toxicitás következtében 33-szorosan jobb terápiás indexet mutatnak, mint a natív PMB. Egy PMB-dextrán konjugátum különösen mentes a vizsgált adagolásoknál bármilyen mérhető toxicitástól, és megőrzi a jó endotoxin ellenes aktivitást, és ezáltal a terápiás indexben 80-szoros javulást eredményez.

Továbbá megfelelő módon azt tapasztaltuk, hogy az ezen eljárással előállított és „gyorsan tisztított” (rapidly purified) konjugátumok a TI-ben 60–120-szoros javulást mutatnak. A „gyorsan tisztított” kifejezés leírásbeli és szabadalmi igénypontokbeli alkalmazása szerint azt jelenti, hogy az anyagot a meg nem kötött PMB-től molekulaszűrési kromatográfia, sómentesítő gélek vagy Amicon[®]-os ultraszűrés alkalmazásával tisztítjuk meg, amelyet megközelítően 12–24 órán át, előnyösen megközelítően 18 órán át (ellentétben egy 7–10 napos hosszú dialízis idővel) folytatunk. Így az ezen eljárásokkal előállított és gyorsan tisztított konjugátumok a találmány másik és előnyös szempontját jelentik.

A fent körvonalazott két eljárás bármelyikéből kapott polimixin-hordozó konjugátumot azonban nehéz tisztítani. Kezdetben 10 napos, hosszú dialízist próbáltunk ki, azzal a céllal, hogy a natív PMB-t a konjugátumtól elválasszuk. Bár a dialízis zsákon belül a fehérjesszint egy aszimptótát ért el, és a gélpermeációs oszlopkromatográfia egyetlen nagy molekulatömegű

anyagféleséget mutatott ki, az anyag még tartalmazott meg nem kötött PMB-t. Még akkor is hasonló eredményeket kaptunk, amikor a hosszú dialízist nyomással végzett dialízises (Amicon[®]) szűrőssel helyettesítettük.

5 Az ilyen módon megtisztított konjugátumok azonos hatásúak a PMB-vel, de a PMB toxicitásának még 1/3–1/5-ét tartalmazzák. Nem szándékozzuk elmélet-
10 hez kötni, de úgy tűnik, hogy van némi kémiai asszociáció a „szabad” PMB és az elválasztást megnehezítő konjugátum között. Ha egy állatba „szabad” PMB-t injektálunk, a PMB disszociálódik, és mérgezési problémákat okoz.

A következő (alább a 4. példában részletezett) eljárás (C eljárás) elejét veszi a fenti nehézségeknek.
15 A polimixin-dextrán konjugátumokat, például PMB-dextrán konjugátumokat valamilyen rövid szénláncú alkoholban, előnyösen metanolban kicsapjuk, majd centrifugálással összegyűjtjük, és ultrahangos kezeléssel újraoldjuk. Ezt az eljárást rendszeresen háromszor,
20 és előnyösen 7–10-szer megismételjük, és az eredményként kapott anyagot értékeljük tisztaságára, például gélpermeációs kromatográfiával és fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC). Ha bármelyik módszerrel fehérjét észle-
25 lünk, megismételjük a kicsapásos-újraoldósos eljárást. Az ilyen módon megtisztított konjugátumot itt „ultra-tiszta” polimixin-konjugátumként említjük, és azzal jellemezzük, hogy 20 μ g-nál kevesebb konjugátum-
30 latlan polimixint tartalmaz 1 mg összfehérjében, és előnyösen kevesebb, mint 10 μ g konjugátumlatlan polimixint 1 g összfehérjében.

Így a találmány további tárgya egy eljárás olyan vízben oldható polimixin-dextrán konjugátum előállítására, amely a következő lépésekből áll:

- 35 a) polimixinnek dextránhoz való megfelelő hozzákapszolása vízben oldható polimixin dextrán konjugátum képzésére;
- b) az eredményként kapott konjugátum kicsapása egy rövid szénláncú alkoholban;
- 40 c) a konjugátum újra szuszpendálása; és
- d) b) és c) lépések ismétlése addig, amíg a konjugátum alapvetően megkötetlen polimixintől mentes nem lesz.

Itt a „megkötetlen polimixintől alapvetően mentes” kifejezést úgy határozzuk meg, mint moláris alapon legalább 95:1, előnyösen legalább 99:1 konjugátum kötetlen polimixin arányt. A rövid szénláncú alkohol például 1–10 szénatomos, előnyösen 1–4 szénatomos, például butanol vagy izopropil-alkohol, még előnyösebben metanol vagy etanol. A polimixin előnyösen PMB.

Az ultra-tiszta konjugátum gyakorlatilag nem toxikus, és ennek eredményeként LD₁₀₀ értéket nem lehet rá megállapítani. 100 mg/kg-os adagnál nem tapasztalható toxicitás. Nagyobb koncentrációkban az oldat túl nagy viszkozitású ahhoz, hogy injektáljuk. Ez eltér a natív PMB-től, amely 5 mg/kg intravénás (i. v.) LD₀ és 9,5 mg/kg i. v. LD₁₀₀ értékkel rendelkezik. Így a csökkent toxicitás következtében az ultra-tiszta PMB konjugátum terápiás indexe (TI) több, mint ezerszer
60 nagyobb a natív PMB TI-jénél.

A konjugátum natív polimixinnel szemben való alkalmazásának második előnye, hogy a konjugátum hosszabb aktív időtartamú, és így megelőzésként alkalmazható. Így a találmány egyik tárgya a bakteriális endotoxin jelenléte által okozott betegségek megelőzése az ilyen profilaktikus kezelést igénylő alanyok egy megelőzésként hatékony mennyiségű vízben oldható polimixin, előnyösen PMB és egy hordozó, előnyösen dextrán és egy gyógyszerészetiileg elfogadható további megfelelő hordozó vagy hígítószer, például egy inert oldat beadásával. Mivel a konjugátum gyakorlatilag nem toxikus, megelőzésképpen beadható olyan betegnek, akik hajlamosak lehetnek szepszis sokkra, mint például azok, akik hosszú ideig tartó táplálásnál folyékony élelmiszertől függenek.

A találmány tárgya egy vízben oldható polimixin-hordozó konjugátumot további gyógyszerészetiileg elfogadható megfelelő hordozókkal vagy hígítószerekkel, például egy inert oldattal együtt tartalmazó gyógyszerészeti készítmény is.

Szintén a találmány tárgya egy gyógyszerkészítmény előállítására szolgáló, vízben oldható polimixin-hordozó konjugátum további gyógyszerészetiileg elfogadható hordozókkal vagy hígítószerekkel, például egy inert oldattal való keveréséből álló eljárás.

Így javasoljuk a találmány alkalmazását bakteriális endotoxin jelenléte által okozott betegségek kezelésére, amely alkalmazás tartalmazza az ilyen kezelést igénylő alanyoknak egy endotoxint semlegesítő mennyiségű vízben oldható polimixin, előnyösen PMB és egy hordozó, előnyösen dextrán, és egy inert oldat beadását. Mivel a polimixin hatékony a bakteriális vagy gombás fertőzések leküzdésében is, a találmány alkalmazását javasoljuk bakteriális vagy gombás fertőzések kezelésében való alkalmazásra is, amely alkalmazás tartalmazza az ilyen kezelést igénylő alanyoknak baktericiden vagy fungiciden hatékony mennyiségű vízben oldható polimixin, előnyösen PMB és egy hordozó, előnyösen dextrán, és egy inert oldat beadását.

A találmány szerinti polimixin - hordozó konjugátumot ugyanolyan módon alkalmazhatjuk, mint magát a polimixint, azaz bakteriális vagy gombás fertőzéseknek alkalmazhatjuk önmagában, antibiotikumként, vagy más baktericid szerekkel és/vagy gyulladásgátló szerekkel kombináltan. Beadhatjuk például intramuszkulárisan, intravénásan, intratekálisan, szubkonjunktiválisan, vagy helyi kezelésként alkalmazhatjuk. Így az intramuszkuláris injekciók céljára szolgáló készítmények a hatékony mennyiségű PMB-konjugátumot steril vízben, fiziológiás sóoldatban vagy megközelítőleg 1%-os procain-HCl-oldatban tartalmazzák. Az intravénás készítmények jellemzően 5%-os glükóz-oldatban és steril vízben tartalmazzák a hatékony mennyiségű PMB-konjugátumot. Az intratekális készítmények jellemzően fiziológiás sóoldatban tartalmazzák a hatékony mennyiségű PMB-konjugátumot. Helyi szemészeti alkalmazásra egy hatékony mennyiséget összekeverhetünk vízzel vagy fiziológiás sóoldattal, és adott esetben glicerinnel, és

szemcseppekhez réz-szulfáttal, vagy elkészíthetjük kenőcsként vagy szuszpenzióként. A helyi alkalmazásokra, különösen égett területek kezelésére szolgáló krémek jellemzően a hatékony mennyiségű polimixin-konjugátumot alkotórészekből, például vazelinolajból, propilénlikolból, poli(oxi-etilén)-ből, poli(oxi-propilén)-ből és emulgeáló viaszból álló alapon tartalmazzák.

Az alkalmazandó polimixin-konjugátum mennyisége, egy konkrét betegnek (számításba véve olyan tényezőket, mint a kezelendő állapot és a beteg kora és testtömege) jellemzően előírható natív polimixin mennyiségen, és a használt speciális polimixin-konjugátum aktivitásán alapul. Gyakran 50%-ig terjedő adagcsökkentést érhetünk el a natív polimixinhez képest a polimixin konjugátum tényleges aktivitásnövekedése, csökkent toxicitása és megnövekedett aktivitási időtartama következtében.

A találmányt tájékoztatásul a következő nem-korlátozó példákkal szemlélhetjük. Az összes hőmérsékletet Celsius fokokban (°C) adjuk meg.

1. példa

PMB kémiai kötése dextránhoz

(A eljárás; karbamátkötés)

2 g dextránt [79 000 vagy 200 000 molekulatömeget (MW)] oldunk 20 ml vízben, 0 °C-ra hűtjük, hozzáadunk 5–300 mg 1-ciano-4-(dimetil-amino)-piridin-[tetrafluoroborát]-ot (CDAP), és 30 másodpercig keverjük. Erőteljes keverés mellett cseppenként trimetil-amint (0,2 M; 0,04 ml/5 mg CDAP) adunk hozzá, és az egész reakcióelegyet átöntjük 1 ml 10 M sósavoldattal tartalmazó 80 ml jéghideg abszolút etanolba. A dextrán kicsapódik, 1000×g-nél 5 percig 0 °C-on centrifugálva eltávolítjuk a csapadékot, és 20–50 ml 0,25 M nátrium-hidrogén-karbonát pufferben 9,0 pH-n újraközzük. Ehhez az elegyhez 600–1000 mg PMB-t (vagy poralakút vagy vízben előoldottat) adunk, és 24 órán át 8 °C-on keverjük. Azután a teljes reakcióelegyet 50 000 molekulatömegnél elválasztó dialíziscsőbe visszük át, és 0,05 M pirogénmentes foszfátpufferrel szemben 6–10 napig dializáljuk. A végső, dializált reakciókeveréket spektrofotometrián, 208 nm-es abszorpcióra vagy 595 nm-nél Bradford reagens használatával (Bio. Rad., Richmond, CA, USA) mérjük fehérjetartalomra.

A szabad aminosoportokat ninhidrin reakció alkalmazásával határozzuk meg natív PMB-t használva kontrollként. Az analízist nitrogén- és széntartalomra egy CHN elemanalízátor alkalmazásával végezzük.

Az 1. táblázatban a „mólarányt” a konjugációnál használt dextrán koncentrációjának (23,7 μmol) a végső, dialízis utáni, mol-ban kifejezett (a 208 nm-es analízisen alapuló) PMB-fehérje koncentrációval való osztásával határozzuk meg. A dextránt „dx”-nek rövidítjük. A „C:N” arány 450 vízmolekula/2 g dextránt feltételez. A „kötések/PMB” kifejezés azoknak a kötéseknek a ninhidrin reakció alapján becsült számát jelenti, amelyekkel a PMB a dextránhoz kapcsolódik. „ND” jelentése nem mért.

1. táblázat
A konjugációs reakciók összefoglalása

Reakció	CDAP	mólarány	C:N arány	kötések/ PMB
A	21 µmol	1 dx : 0,23 PMB	ND	ND
B	106 µmol	1 dx : 1,62 PMB	1 dx : 1,52 PMB	3,0
BB	106 µmol	1 dx : 1,95 PMB	1 dx : 1,90 PMB	1,1
C	532 µmol	1 dx : 3,70 PMB	1 dx : 3,25 PMB	3,0
CC	532 µmol	1 dx : 4,99 PMB	1 dx : 5,00 PMB	2,2
D	1064 µmol	1 dx : 6,62 PMB	1 dx : 8,70 PMB	1,7
DD	1064 µmol	1 dx : 8,81 PMB	ND	1,3
E	2128 µmol	1 dx : 10,9 PMB	ND	2,1

2. példa

PMB kémiai kötése dextránhoz
(B eljárás; aminkötés)

1,25 g dextránt (79 000 vagy 200 000 MW) oldunk 20 ml desztillált vízben, és azután 0,071–0,71 g nátrium-perjodátot adunk hozzá. Egy óra 22 °C-on való reagáltatás után áttöltjük a reakcióelegyet egy DEAE A25 kationcserélő gyantát (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ, USA) tartalmazó oszlopba, és az elegyet egyesítjük, és egyetlen 20–25 ml-es frakcióba gyűjtjük. Az oxidált dextránt ezután összekeverjük 80–200 ml nátrium-hidrogén-karbonát vagy nátrium-borát pufferben (pH 8,5–9,0) oldott 2 g PMB-vel, és 60 perc múlva hozzáadunk 40 ml 0,05–25 nátrium-borohidridet vagy egyetlen vagy több adagban, az egyes adagolások 30 perctől 24 óráig tartanak. A reakció 30 percig tart, és azután 0,05 M pirogénmentes nátrium-foszfát pufferrel szemben 7–10 napig 8 °C-on dializáljuk. A végső dializált reakciókeveréket az 1. példában közölt módon analizáljuk fehérjetartalomra és szabad aminosoportokra.

A hosszú dialízissal végzett tisztításon kívül néhány reprezentatív mintát 18 órás gyorsdialízis alkalmazásával tisztítunk, majd egy G-100 Sephadex^R oszlopon (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ, USA) tisztítjuk, és a töményítést egy Amicon^R szűrőberendezésen egy YM-100 Amicon^R szűrő alkalmazásával végezzük.

A 2. táblázatban alant a „mólarányt” a konjugációnál használt dextrán mennyiségének (6,25 µmol) a végső, dialízis utáni (a 208 nm-es analízisen alapuló) PMB-fehérje µmol-lal való osztásával határozzuk meg. A nitrogén százalékot egy CHN elemanalizátor alkalmazásával határozzuk meg. A kötések/PMB értéket a ninhidrin reakcióval határozzuk meg:

2. táblázat
A konjugációs reakciók összefoglalása

Reakció	NaIO ₄ (g)	mólarány	% nitrogén	kötések/ PMB
1/50	0,014	1 dx : 3,64 PMB	0,21	3,6
1/10	0,071	1 dx : 12,9 PMB	1,05	2,9
1/5	0,142	1 dx : 26,8 PMB	1,71	2,6

Reakció	NaIO ₄ (g)	mólarány	% nitrogén	kötések/ PMB
1/4	0,178	1 dx : 29,8 PMB	2,76	3,0
1/2 ¹	0,355	1 dx : 39,6 PMB	3,74	2,2
keverék*	0,710	1 dx : 151 PMB	6,91	4,0

* A reakciókeverék zavaros, és dialízis után is az marad.

¹ Gyors dialízis alkalmazásával tisztítva.

3. példa

PMB-konjugátumok endotoxin-ellenes aktivitása
A. Endotoxin által kiváltott elhullás.

Ebben a kísérletben végig hím CB57BL/c egereket (18–22 g, Jackson Labs) alkalmazunk. Az állatoknak endotoxint (0111B₄-et a List Biologicals-tól, Palo Alto, CA, USA) és túlérzékenyítésükre galaktóz-amint adunk a Galanos és társai [Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 5939 (1979)] által közölt módon. Az endotoxint és galaktóz-amint (320 mg/kg) intraperitoneálisan injektáljuk állatonként 0,5 ml pirogénmentes izotóniás konyhasóoldatban 13:00 és 15:00 között a naponkénti változások elkerülésére. Az adag-reakció tanulmányból meghatározva a 0,01 mg/kg endotoxin 85–95%-os elhullást eredményez. Az injektálás után az állatokat 6 napig naponta megfigyeljük.

B. PMB (natív és konjugált formák) kiváltotta elhullás.

PMB-t (natív és kötött formákat) értékelünk a benne rejlő toxicitásra nem érzékenyített egérben. A vizsgálatban végig hím CBS7BL/c egereket (18–22 g, Jackson Labs) alkalmazunk. Az állatoknak intraperitoneális (i. p.) injektálással (0,5 ml/állat) vagy natív PMB-t vagy kötött PMB-t adunk be, és 7 napig megfigyeljük az elhullást. Az LD₁₀₀-at a 100%-os elhullást eredményező PMB (natív vagy kötött) adag változtatásával határozzuk meg. Az egyes adagokhoz 10–20 állatot alkalmazunk.

C. PMB anti-endotoxin kiértékelések.

PMB-t (natív és kötött formákat) értékelünk endotoxint semlegesítő képességükre vagy az endotoxinnak 60 perccel az i. p. injektálás előtt a PMB-be való bekeverésével vagy az anyagok együttes beadásával, egyetlen i. p. injekcióban. Míg a PMB (natív és kötött formák) koncentrációja változik, az egyes injekciók térfogatát állandó 0,5 ml/állat értéken tartjuk. A kötött PMB általi védelmet a natív PMB-hez viszonyítjuk (mg fehérje/kg-ban kifejezve). Ellenőrző mintákat (endotoxin, galaktóz-amin és hordozóanyag) is beiktatunk minden egyes kísérletbe. Az egyes csoportok 10–17 állatot tartalmaznak.

A túlélés statisztikai analíziseit a csoportok között vagy az ellenőrző mintákra vonatkozóan egy Chi-négyzetes analízis alkalmazásával, a folytonosságra a Yate korrekció használatával végezzük.

D. A terápiás index (TI) meghatározása.

A terápiás indexet (TI) PMB-re (natív és kötött formákra) az LD₁₀₀-nak PD₁₀₀-zal való osztásával határozzuk meg. A 3. táblázatban a „kezelés” az 1. és 2. példákban előbb ismertetett konjugátumokkal végzett kezelésnek felel meg.

3. táblázat
Endotoxinellenes adatok

Kezelés	LD ₁₀₀ (mg/kg)	PD ₁₀₀ (mg/kg)	TI
Natív PMB ¹	25	2	12,5
Natív PMB ²	25	2	12,5
A	>30	1	>30
B	>28	>1	>14
C	ND	5	ND
D	140	2	70
1/5*	83	0,2	415
1/2* ¹	kb. 40–60	0,05	800–1200
keverék ²	>212	0,2	>1060
keverék ³	>212	20	>10,6

1 Gyorstisztított anyag

2 A PMB-t vagy konjugátumot i. p. injekcióval 60 percig reagálni hagyjuk az endotoxinra!

3 A PMB-t vagy a konjugátumot az endotoxinnak egyidejűleg injektáljuk

* A frakciók jelzik a konjugációs reakcióban használt nátriumperjodát mennyiségén alapuló reakciókörülményeket. Ha 710 mg-ot megszorozzuk a frakcióval, megkapjuk az egyes mintáknál alkalmazott nátriumperjodát mennyiséget (mg-ban).

4. példa

Ultra-tiszta PMB-dextrán konjugátum (C eljárás; alkoholos kicsapás)

1. Előállítás

PMB-dextrán konjugátumot, az „RXN 1/50” jelzésű konjugátum nyeréséhez alapvetően a fenti 2. példában közölték szerint állítjuk elő.

A konjugátumot, egy fehér pelyhet, 60%-os metanolban kicsapjuk, centrifugálással összegyűjtjük, és azután ultrahangos újraoldásnak vetjük alá. Ezt az eljárást hétszer megismételjük, és az eredményként kapott anyag tisztaságát gélikromatográfiával és fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) értékeljük. Bár gélikromatográfiával nem észleltünk szabad PMB-t, az RP-HPLC 48 g nem kötött PMB-t mutatott ki 1 mg összfehérjére. A konjugátumot azután 3 további kicsapásnak vetettük alá a nem kötött PMB eltávolítására.

2. Biológiai aktivitás

Az eredményként kapott ultra-tiszta PMB-dextrán konjugátumot egy endotoxin által indukált, a 3. példa C. pontjában közölt halálozási próbában összehasonlíttuk natív PMB-vel.

1 mg/kg-nál i. v. az ultra-tiszta PMB-dextrán konjugátum 70% védelmet nyújt LD₅₀ endotoxin adaggal szemben legalább 6 órán át. Ez a konjugátum

10 mg/kg-nál i. v. 1,5 órás terápiás védelmet nyújt az endotoxin beadása után. Ennélfogva a PMB-konjugátum alkalmas profilaktikus alkalmazásra.

Az ultra-tiszta PMB-konjugátum a natív PMB-hez képest meglehetősen csökkent toxicitású. A natív PMB 5 mg/kg-os i. v. LD₀-lal és 9,5 mg/kg i. v. LD₁₀₀-zal rendelkezik, amely feltételezi a toxicitás korai jelentkezését, és egy szűk terápiás tartományt. Az ultra-tiszta PMB-konjugátum 100 mg/kg LD₀-lal rendelkezik, és a benne rejlő nem-toxikus jelleg következtében nem lehetséges egy LD₁₀₀ érték megállapítása. Alább a 4. táblázatban összehasonlításokat végzünk a PMB (natív és kötött) legnagyobb nem-toxikus adagjai között.

4. táblázat
Biológiai aktivitás

Kezelés	LD ₀ (mg/kg) ¹	PD ₁₀₀ (mg/kg) ²	TI
PMB	5	0,1	50
ultra-tiszta konjugátum	>100	0,1	>1000

1 I. v. injekcióval beadott PMB (natív vagy konjugátum) és a 7 napon át megfigyelt elhullás.

2 I. v. injekcióval 1–3 perccel LD₅₀ E. coli 0111B4 endotoxin (0,5 g/kg) i. p. injekcióval beadott PMB (natív vagy konjugátum).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy polimixin és egy hordozó vízben oldható konjugátuma, ahol a konjugátum olyan méretű, amely megfelelő a nagyvérkörben való alkalmazásra, azzal a fenntartással, hogy amennyiben a polimixin polimixin E, akkor a hordozó egy fehérje hordozótól eltérő.

2. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a hordozó egy poliszacharid, például dextrán vagy (hidroxietil)-keményítő vagy egy polimer, például poli(vinil-pirrolidon), polietilénlikol vagy poli(vinil-alkohol), ahol, ha a polimixin polimixin E-től eltérő, akkor a hordozó lehet egy fehérje hordozó, például albumin is.

3. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a polimixin polimixin B (PMB).

4. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a polimixin B (PMB) molaránya a hordozóhoz 1:15-től 200:1-ig terjedő.

5. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a polimixin B (PMB) molaránya a hordozóhoz 1:1-től 10:1-ig terjedő.

6. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a polimixin B (PMB) molaránya a hordozóhoz 1:1-től 3:1-ig terjedő.

7. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelynek vízben való oldhatósága legalább 1 mg/ml 25 °C-on.

8. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amely injektálható.

9. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amely nem-mátrix jellegű.

10. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amely kolloid.

11. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amely nem keresztökítéses.

12. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amely nem makromolekuláris.

13. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amely nem makrorészecske jellegű.

14. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a hordozó egyenmő, nem toxikus, nem karcinogén, nem irritáló és nem immunogén.

15. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a hordozó 25 000-től 500 000-ig terjedő molekulatömegű.

16. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a hordozó 50 000-től 300 000-ig terjedő molekulatömegű.

17. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a hordozó 79 000-től 200 000-ig terjedő molekulatömegű.

18. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amely endotoxint semlegesítő aktivitással rendelkezik.

19. Egy 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a konjugátum molaránya a nem kötött polimixin-hez legalább 99:1.

20. Egy 2. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a hordozó dextrán.

21. Egy 3. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a hordozó dextrán.

22. Egy 21. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a polimixin B (PMB) karbamátkötésen keresztül kapcsolódik.

23. Egy 21. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a polimixin B (PMB) aminkötéseken keresztül kapcsolódik.

24. Polimixin B és egy hordozó endotoxin ellenes

aktivitással rendelkező vízzoldható konjugátuma, amelyben a hordozó a nagyvérkörben való alkalmazásra megfelelő méretű, ahol a polimixin B molaránya a hordozóhoz 1:15-től 200:1-ig terjedő.

25. Egy 24. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a hordozó mérete a véráramba való bevitelre és a véráramban való keringésre megfelelő.

26. Az 1–25. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum gyógyszerként való alkalmazásra.

27. Egy 26. igénypont szerinti konjugátum endotoxin aktivitás semlegesítésére való alkalmazásra.

28. Eljárás egy 20. igénypont szerinti polimixindextrán konjugátum előállítására, amely eljárás a következő lépésekből áll:

a) polimixinnek dextránhoz való megfelelő konjugálása a nagyvérkörben való keringetésre alkalmas méretű, vízben oldható polimixin-dextrán konjugátum készítésére;

b) a kapott konjugátum kicsapása egy rövid szénláncú alkoholban;

c) a konjugátum újrászuszpendálása; és

d), b) és c) lépések ismétlése addig, amíg a konjugátum lényegében kötetlen polimixintől mentes lesz.

29. Egy 1–25. igénypontok bármelyike szerinti konjugátumot további gyógyszerészetiileg elfogadható hordozókkal vagy hígítókkal együtt tartalmazó gyógyszerkészítmény.

30. Egy 1–25. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum alkalmazása endotoxint semlegesítő szerként profilaktikus vagy kuratív terápiás alkalmazásra szolgáló gyógyszer gyártására.

31. A 30. igénypont szerinti, gombásodás elleni szerként való alkalmazás.

32. A 30. igénypont szerinti, baktériumellenes szerként való alkalmazás.