

NÖVEKEDÉSI FAKTOROKAT ÉS POLIELEKTROLITOT TARTALMAZÓ
KOMBINÁCIÓ

Merck Patent Gesellschaft mit Beschränkter Haftung,

Darmstadt, Német Szövetségi Köztársaság

A bejelentés napja: 1992. 09. 25.

Elsőbbsége: 1991. 09. 26. (P4132005.0)

Német Szövetségi Köztársaság

K I V O N A T

A találmány olyan hatóanyag kombinációra vonatkozik, amely legalább egy fibroblaszt növekedési faktorok (FGF) biológiai hatásával rendelkező polipeptidet és legalább egy kationos polielektrolitot tartalmaz. A kombináció az FGF-hatású polipeptidek pontosabb adagolását teszi lehetővé.

30435

A 64479

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

3079/92 KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

NSZOG A 61 K 37/43
A 61 K 47/30

ELJÁRÁS NÖVEKEDÉSI FAKTOROKAT ÉS POLIELEKTROLITOT TARTALMAZÓ
KOMBINÁCIÓ (GYÓGYÁRTÁSI KÉSZÍTMÉNY ELŐÁLLÍTÁSÁRA)

Merck Patent Gesellschaft mit Beschränkter Haftung,
Darmstadt, Német Szövetségi Köztársaság

Feltaláló:

Dr. NIES Berthold, Darmstadt,

Német Szövetségi Köztársaság

A bejelentés napja: 1992. 09. 25.

Elsőbbsége: 1991. 09. 26. (P4132005.0)

Német Szövetségi Köztársaság

75330-903 SI

A találmány olyan kompozícióra vonatkozik, amely legalább egy a fibroblaszt növekedési faktorok (FGF) biológiai hatásával rendelkező polipeptid mellett legalább egy kationos polielektrolitot tartalmaz.

A testazonos peptid-növekedési faktorok osztályába tartozó fibroblaszt növekedési faktorokat (Fibroblast Growth Factors, FGF) eredetileg az agyban és a hipofízisben lévő anyagokként azonosították és ezekből izolálták. Az FGK-ek a fibroblasztok növekedését serkentő aktivitást mutattak. Az FGF-ek hatékony véredényképző faktorokként ismertek, amelyek sebgyógyulásakor, egyebek mellett az új érképződésért felelősek. Az FGF-ekről, beleértve bomlási termékeiket is, további részleteket, például izolálásukról, illetve előállításukról, szerkezetükről, biológiai aktivitásukról és annak mechanizmusáról, valamint gyógyászati alkalmazásukról terjedelmes szakirodalom számol be. Összefoglaló áttekintést ad például A. Baird and P. Böhlen, Fibroblast Growth Factors: Peptide Growth Factors and their Receptors I. című könyv [editors: M. B. Sporn and A. B. Roberts, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1990)].

A találmány szerint alkalmazható növekedési faktorok nemcsak a "klasszikus" FGF-ek, így a savas fibroblaszt növekedési faktor (acidic Fibroblast Growth Factors, aFGF) és a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (basic Fibroblast Growth Factors, bFGF) közül kerülnek ki, hanem megfelel valamennyi olyan peptid, amely lényegében FGF biológiai hatással rendelkezik.

Az FGF-ek szűkebb körébe tartoznak különös tekintet-

tel a szarvasmarha és a humán eredetű nativ FGF-ek, valamint a rekombináció útján előállított FGF-ek. Különösen előnyösek a rekombináció útján előállított humán aFGF és bFGF-ek. A rekombináció útján előállított szarvasmarha és a humán eredetű aFGF és bFGF-ekről részletesebb ismertetés található például az EP 0 228 449, EP 0 248 819, EP 0 259 953 és EP 0 275 204 számú szabadalmi leírásban. Az FGF-ek tágabb körébe tartoznak azok a muteinek (mutáns szekvenciák) is, amelyek az aFGF- és bFGF-ektől bizonyos mértékig az aminosavak számában és/vagy szekvenciájában térnek el anélkül, hogy ezzel lényeges hatásváltozás párosulna. Az FGF-ek fogalmi körébe tartoznak például a bFGF-ek különböző, hosszúságukban eltérő formái is. Ezek 146, 153, 154, illetve 157 aminosavmaradékot tartalmaznak. Az FGF-ek tágabb körébe tartoznak végül még a részben kifejezetten eltérő aminosavszekvenciájú rokon peptidek is, amelyek azonban FGF biológiai hatást mutatnak. Irodalmi utalásként az EP 0 148 922, EP 0 226 181, EP 0 281 822, EP 0 288 307, EP 0 319 052, EP 0 326 907 és WO 89-12645 számú szabadalmi leírásokat nevezzük meg. Az egyszerűség kedvéért a nevezett peptideket "FGF-hatású peptidek" néven foglaljuk össze.

A találmány szerint az FGF-ek közé tartoznak továbbá ezeknek a peptideknek stabilizáló és/vagy aktivitásfokozó ágensekkel képzett származékai. Ezek az aFGF-ek és bFGF-ek savakkal szemben stabilizált formái, amelyek stabilizáló ágensként például glukózaminglukánt, így heparint, heparin fragmenseket, heparán-szulfátot és dermatán-szulfátot vagy glukán-szulfátot, dextrán-szulfátot és ciklodextrin-szul-

fátot tartalmaznak. Ilyen FGF-származékokat írnak le például az EP 251 806, EP 267 015, EP 312 208, EP 345 660, EP 406 856, EP 408 146, WO 89-12464, WO 90-01941 és WO 90-03797 számú szabadalmi leírásokban.

A találmány szerinti kombináció szempontjából előnyösek a humán eredetű FGF-ek és muteinjei, különösen előnyös a bFGF. A legelőnyösebb az EP 0 248 819 számú szabadalmi leírásban ismertetett, rekombináció útján előállított, humán bFGF alkalmazása.

Az FGF-hatású peptidek közös tulajdonsága, hogy azok a sejtmembrán FGF-receptoraihoz specifikusan kötődnek, majd kifejtik biológiai, például sebgyógyító hatásukat. Ezek a peptidek azonban nem specifikusan is kötődnek. Ez a kötés azt eredményezi, hogy például maga a bFGF az injektlálás után nem mutatható ki a szérumban. Például a bFGF bázikus proteinként ($IP=9,8$) kötődik egy anionos makromolekulához (például nukleinsavakhoz és az extracelluláris mátrix (ECM), így heparán-szulfát savas komponenseihez) - lásd például Moscatelli és munkatársai: Interaction of basic fibroblast growth factor with extracellular matrix and receptors előadási anyagában, amely "The Fibroblast Growth Factor Family" című a The New York Academy of Sciences szervezésében tartott konferencián hangzott el 1991-ben. Ezt a tulajdonságot az irodalomban leírták és többek között FGF-ek izolálására használták: a- és bFGF-ek tisztítása heparinnal kapcsolt hordozón végzett kromatografálással.

Az FGF-hatású peptidek nem specifikus kapcsolódása csökkenti a sejtek specifikus receptorait elérni képes FGF

mennyiségét. A nem specifikus kötések az FGF nagy, ugyanakkor ismeretlen részét abszorbeálják különösen régebbi (krónikus) sebek vagy égési sebek esetében, vagy ahol nagy mennyiségű nekrotizáló anyag van jelen. Emiatt nem lehet az FGF-hatású peptideket pontosan adagolni. A hatóanyagot szükségszerű túlادagolni. Az adagolás ráadásul megbízhatatlan, mert nem ismert, hogy a mindenkori sebben mennyi a nem specifikus kötéshely.

A bFGF stabilizálására végzett kísérletek, amelyek arra irányultak, hogy a nem specifikus kötéseket csökkentsék és a bFGF affinitását a specifikus kötéshelyekhez megnöveljék, eddig abból álltak, hogy a bFGF-et heparinnal vagy más szulfatált glukánnal (például dextrán-szulfáttal) vagy szukralfáttal kombinálták. Általában azonban a bFGF-et ilyen adalékok nélkül alkalmazzák. Csupán az eltarthatóságot és az alkalmazhatóságot javító segédanyagokat adnak hozzá.

A tiszta bFGF, valamint a nevezett kombinációk és származékok különböző dózisú adagolásának az a hátránya, hogy a hatóanyag szükségszerű túlادagolásához, az adagolás megbízhatatlanságához vezet, mert nem ismert, hogy a mindenkori sebben mennyi a nem specifikus kötéshely.

A találmány feladata olyan hatóanyag kombináció létrehozása, amelynek biológiai aktivitását az FGF-hatású peptidek nem specifikus kapcsolódása nem befolyásolja.

Bár az EP 0 312 208 számú szabadalmi leírásban diffúzió szabályozással végzett javított adagolást javasolnak, amikor is gélképzőt alkalmaznak a növekedési faktorral, előnyösen az epidermális növekedési faktorral együtt. Ezzel

az intézkedéssel azonban a növekedési faktor adagolással kapcsolatos alapvető, így a változó nem specifikus kapcsolódásokból származó problémákat nem oldják meg.

Azt tapasztaltuk, hogy az adagolási probléma megoldható, ha FGF-hatású peptidek alkalmazásakor legalább egy kationos polielektrolitot is alkalmazunk. Meglepő, hogy míg a kationos polielektrolitok a nem specifikus kapcsolódási helyeket, például az EMC-ben blokkolják, addig az FGF-hatású peptidek képesek elérni a sejtmembránban lévő specifikus receptorokat és így nem változik az FGF biológiai hatása.

A találmány szerint számos ismert kationos elektrolit alkalmazható. Közös tulajdonságuk, hogy fiziológiás körülmények között az FGF-fel nem specifikusan kapcsolódó sejtszerkezetekkel irreverzibilis komplexet képeznek. Alkalmas kationos polielektrolitok például a poliamidok és -iminek, valamint ezek kvaterner származékai. Megfelelnek továbbá a poliguanidinek, valamint bázikus aminosavakat tartalmazó polipeptidek; például polilizin, poliornitin, poliarginin. Ilyen polipeptidek több aminosav keverékét is tartalmazhatják. A találmány szerint használt peptidek lehetnek racém vagy tiszta D- vagy L-formájú aminosavak. Alkalmasak továbbá a bázikus csoportokat tartalmazó poliszacharidok is. Különösen előnyösek a kitozánok és származékai, például az N-karboxi-butyl-kitozán, vagy a metil-pirrolidon-kitozán, mert ezek biológiailag lebonthatók és a bomlástermékek azonosak a normális anyagcsere (glukózamin és N-acetil-glukózamin) komponenseivel.

A találmány szerint a kationos elektrolitok alkal-

mazhatók szabad bázis vagy fiziológiailag elfogadható szerves vagy szervesetlen savakkal képzett sóik formájában. Fiziológiailag elfogadható szerves savak például a glutaminsav, ecetsav és tejsav. Fiziológiailag elfogadható szervesetlen savként példaként a sósavat említjük. Ismert fiziológiailag elfogadható savak továbbá a galenuszi szerek.

Ezeket az anyagokat az FGF-hatású peptidekre vonatkoztatva főleg, a peptidekkel egyidejűleg alkalmazzuk. Lehetséges a kationos elektrolitok előzetes alkalmazása is. Ekkor az FGF-ek akadálytalanul diffundálhatnak a specifikus receptorokhoz és azon megkötődhetnek. Elképzelhető a találmány szerinti alkalmazás során a kationos polielektrolitok utólagos alkalmazása is annak érdekében, hogy azok az FGF-eket a nem specifikus kapcsolódási helyekről kiszorítsák. Ennek az eljárásnak minden esetben az az előnye, hogy az FGF-hatású peptideket viszonylag alacsony dózisban adagolhatjuk, aminek következtében a terápiás index megfelelően nő. Ezenkívül lényegesen megbízhatóbb adagolás érhető el, mert az FGF-ek még erősen nekrotizálódó sebek esetében is a célzott helyre juthatnak. Ilyen esetekben gyakran többszöri alkalmazás indokolt.

A találmány olyan kombinációkra is vonatkozik, amelyek legalább egy FGF-hatású polipeptidet és legalább egy kationos polielektrolitot tartalmaznak.

A találmány szerinti kombinációk előnyösen vizes oldatok lehetnek, amelyek a legalább egy FGF-hatású polipeptid és a legalább egy kationos polielektrolit mellett szokásos adalékanyagokat, így puffereket vagy az ozmózisnyomás szabá-

lyozására szolgáló sókat vagy töltőanyagokat tartalmaznak. Az oldatban az FGF-hatású polipeptid 0,1 ng/ml és 500 μ g/ml, előnyösen 0,5 ng/ml és 300 μ g/ml közötti koncentrációjú, a kationos polielektrolit 1 μ g/ml és 300 mg/ml, előnyösen 0,01 mg/ml és 200 mg/ml közötti koncentrációjú. Ezeket az oldatokat gélképzők hozzáadásával ismert módon hidrogélekké alakíthatjuk. Az adott esetben töltőanyagokat tartalmazó oldatokat vagy a hidrogéleket szövés nélküli kelme, fólia, por, granulátum vagy szál formájúra szárítjuk vagy liofilizáljuk. Az így kapott szálakat szövetté vagy hálóvá dolgozhatjuk fel. Mód van arra is, hogy ezeket az oldatokat sebgezre vagy sebfedő fóliára abszorbeáljuk, majd megszáritsuk. A szárított alkalmazási formákat folyadékkal a seb ellátására alkalmas vizes oldattá, géllé vagy hidrogéllé alakíthatjuk vissza. Végül a találmány szerinti kombináció lehet reagens (KIT) formájú is, amikor is a komponensek (FGF-hatású peptid és kationos polielektrolit) egymástól elkülönítve, de meghatározott mennyiségben vannak jelen a kombinációban.

Friss tiszta sebek esetében elegendő a maszkírozáshoz a kationos polielektrolit csekély fölöslege, azaz az FGF-hatású peptidek mennyiségére vonatkoztatva mintegy ötszörös mennyisége. A seb állapotától függően azonban ezt a felesleget jelentősen meg lehet növelni, hogy a nem specifikus kötési helyeket blokkoljuk. Így a találmány szerint a kationos polielektrolitok mennyisége az FGF-hatású peptid mennyiségének tízezerszereséig terjedhet. A kationos polielektrolit és az FGF-hatású peptid tömegének aránya elő-

nyösen 100 és 2000 közötti.

A találmány tárgyát képezi továbbá legalább egy kationos polielektrolit adalék alkalmazása legalább egy FGF-hatású peptidet tartalmazó készítményhez annak érdekében, hogy az FGF-hatású peptid nem specifikus kapcsolódási helyeit blokkoljuk.

A találmány tárgya továbbá eljárás legalább egy FGF-hatású peptidet és kiegészítésképpen legalább egy kationos polielektrolitot tartalmazó kombináció előállítására, amelyben a komponensek előnyösen vizes oldatban vannak jelen, továbbá amelyek szokásos adalékanyagokat, így puffereket vagy az ozmózisnyomás szabályozására szolgáló sókat vagy töltőanyagokat tartalmazhatnak. Ezeket az oldatokat sterilizálhatjuk is. Mód van arra is, hogy ezeket az oldatokat félig szilárd vagy szilárd készítményformákká, például hidrogélekké, szövés nélküli kelmévé, szálakká, szövetekké, granulátumokká, porokká vagy átitatott anyagokká alakítsuk.

A találmány tárgya még eljárás gyógyászati készítmény előállítására is, amelynek során legalább egy FGF-hatású peptidet és kiegészítésképpen legalább egy kationos polielektrolitot tartalmazó kombinációt legalább egy szilárd, folyékony vagy félig folyékony hordozó- vagy segédanyaggal alkalmas adagolási formájúvá alakítjuk.

A találmány tárgyát képezik olyan gyógyászati készítmények is, amelyek legalább egy FGF-hatású peptidből és kiegészítésképpen legalább egy kationos polielektrolitból álló kombinációt tartalmaznak.

A találmány tárgya továbbá legalább egy FGF-hatású

peptidet és kiegészítésképpen legalább egy kationos polielektrolidot tartalmazó kombináció alkalmazása betegségek leküzdésére.

A találmány tárgya továbbá legalább egy FGF-hatású peptidet és kiegészítésképpen legalább egy kationos polielektrolidot tartalmazó kombináció alkalmazása gyógyszer előállítására.

A találmány szerinti kombinációt előnyösen FGF-terápiás indikációjú sebek gyógyítására használhatjuk, különösen akkor, ha ezeknek a sebeknek vagy defekteknek a gyógyulását szabad granuláció előzi meg.

A találmány szerinti kombináció fontos alkalmazási területe a bőrfekély (például felfekvéses fekély, diabetikus gangréna, artériás és vénás pangások), továbbá az égési sebek, a nyálkahártya fekélye és -léziója, bőrátültetéskor a donor eltávolított bőrnek a helye, a bőr- és a lágy részek átültetési helyei (a sebalap előkészítése) és az operációs sebek (különösen korlátozott gyógyulási funkciók esetén). Valamenynyi itt felsorolt alkalmazási terület kezelése FGF-hatású peptidekből és megfelelő polikationokból álló kombinációval különösen akkor fontos, ha a betegnek csökkent a sebgyógyulási képessége (például a kora, az alapbetegsége vagy a gyógyászati kezelések miatt).

A találmány szerinti kombináció előállítását és alkalmazását az alábbi példák szemléltetik anélkül, hogy a találmány tárgyát a példákban leírtakra korlátoznánk. A technika állásából ismert FGF-tartalmú készítményekkel szemben mutatkozó előnyöket az alkalmazási példák illusztrálják.

1. példa1a. példa**Kitozán oldat**

100 mg kitozán-glutamátot 10 ml Ringer oldatban oldunk.

1b. példa**bFGF oldat**

100 μ g rekombináció útján előállított humán FGF-et 10 ml pH 5 értékű, 20 mmólos citrát-pufferben oldunk.

1c. példa**Kombinált kitozán-bFGF oldat**

Az 1a. és az 1b. példa szerinti oldat 10-10 ml-ét összekeverjük. A bFGF koncentrációja 5 μ g/ml.

2. példa2a. példa**Kitozán oldat**

100 mg metil-pirrolidon-kitozánt 10 ml vizes konyhasóoldatban (9 g/l) oldunk.

2b. példa**bFGF oldat**

50 μ g rekombináció útján előállított humán FGF-et 10 ml pH 5 értékű, 20 mmólos citrát-pufferben oldunk.

2c. példa**Kombinált kitozán-bFGF oldat**

A 2a. és a 2b. példa szerinti oldat 10-10 ml-ét összekeverjük. A bFGF koncentrációja 2,5 μ g/ml.

3. példa

Az 1c. példa szerinti oldatot előállítás után 2-5 mm

rétegvastagságban liofilizálunk. Hatóanyagot tartalmazó, a seb lefedésére alkalmas szövés nélküli kelme (Vlies) keletkezik.

4. példa

A kereskedelembe kapható sebgézt itatunk át a 2c. példa szerinti oldattal ($2 \text{ ml}/5 \text{ cm}^2$), majd megszárítjuk. A hatóanyagot tartalmazó géz alkalmas a seb lefedésére.

Alkalmazási példák

A. példa

Az 1c. példa szerinti viszkózus oldatot egyenletesen felvisszük a kezelendő sebre körülbelül $1 \text{ ml}/5 \text{ cm}^2$ sebfelület mennyiségben.

B. példa

A sebet először az 1a. példa szerinti kitozán oldattal kezeljük (körülbelül $1 \text{ ml}/5 \text{ cm}^2$ sebfelületet). Körülbelül 30 perc múlva a felesleges oldatot és a sebváladékot felitatjuk. Végül az 1b. példa szerinti bFGF oldattal kezeljük a sebet ($1 \text{ ml}/5 \text{ cm}^2$ sebfelület).

C. példa

A sebet először az 1a. példa szerinti kitozán oldattal kezeljük (körülbelül $1 \text{ ml}/5 \text{ cm}^2$ sebfelület). Körülbelül 30 perc múlva a felesleges oldatot és a sebváladékot felitatjuk. Végül az 1c. példa szerinti oldattal (kitozán és bFGF kombinációja) kezeljük a sebet ($1 \text{ ml}/5 \text{ cm}^2$ sebfelület).

Ennek a módszernek az az előnye, hogy a bFGF-ből és kitozánból álló kombináció felvitelével újra a sebterületre kiválasztódott bFGF-et kötő anyagokat abszorbeálunk.

Szabadalmi igénypontok

1. Legalább egy FGF-hatású polipeptidet és kiegészítésképpen legalább egy kationos polielektrolitot tartalmazó kombináció.

2. Eljárás az 1. igénypont szerinti kombináció előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy legalább egy FGF-hatású peptid vizes oldatát legalább egy kationos polielektrolit vizes oldatával összekeverjük.

3. Eljárás gyógyászati készítmény előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az 1. igénypont szerinti kombinációt legalább egy szilárd, folyékony vagy félig folyékony hordozó- vagy segédanyaggal alkalmas adagolási formájúvá alakítjuk.

4. Gyógyászati készítmény, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az 1. igénypont szerinti kombináció legalább egyikét tartalmazza.

5. Az 1. igénypont szerinti kombináció betegségek leküzdésére.

6. Az 1. igénypont szerinti kombináció alkalmazása gyógyszer előállítására.

7. Az 1. igénypont szerinti kombináció alkalmazása betegségek leküzdésére.

8. A 7. igénypont szerinti alkalmazás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy először a kationos polielektrolitot tartalmazó komponenst, majd az FGF-hatású peptid második komponenst engedjük hatni.

A meghatalmazott:

megküldi
Gralda

DANUGIA
Szabadalmi és védjegy iroda Kft.
6.