

bFGF (Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü) ve Formülasyonlarında Yeni Yaklaşımlar

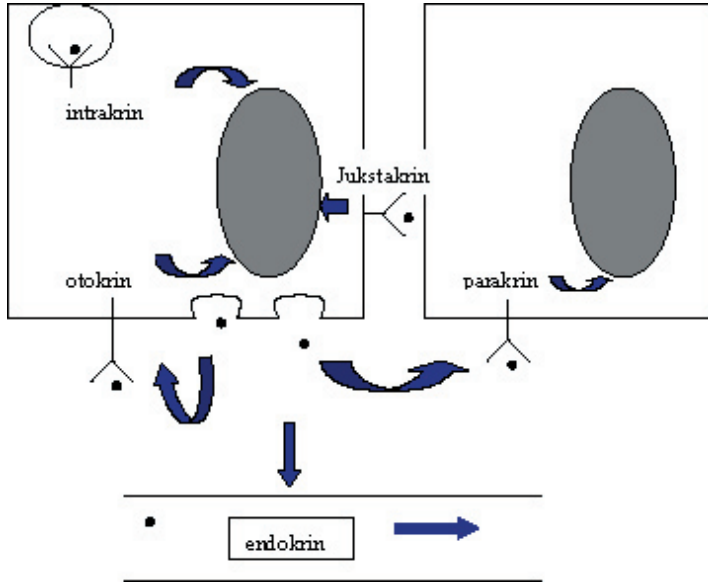
Geliş Tarihi : 17.11.2004
Düzeltilme Tarihi : 10.01.2005
Kabul Tarihi : 16.02.2005

Meltem ÇETİN*, Yılmaz ÇAPAN*

1. Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü

Gelişmenin olduğu büyüme ve farklılaşma evrelerinde çok sayıda faktör etkili olmakta, hücre büyümesi ve çoğalması olaylarının başlamasında ise büyüme faktörleri (growth factors) temel rolü oynamaktadır¹.

Büyüme faktörlerinin etki şekilleri Şekil 1'de gösterilmiştir². Jukstakrin etki mekanizmasında; büyüme faktörleri sentezlendikleri hücrelerin plazma membranına bağlanarak doğrudan bitişik hücreyi etkileyerek biyolojik aktivitelerini gösterebilirler¹. Jukstakrin kontrolün



Şekil 1

Büyüme faktörlerinin etki mekanizmaları. Büyüme faktörleri (•) spesifik reseptörler aracılığı ile üretildikleri hücrede (otokrin, intrakrin tarz) veya diğer hücreler üzerinde (parakrin, jukstakrin veya endokrin tarz) etki gösterirler².

* Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06100, Ankara-TÜRKİYE

bir şeklini de hücre dışı matriks için yüksek afiniteye sahip büyüme faktörleri göstermektedir. Bu etki şekline, heparin bağlayan büyüme faktörleri olan fibroblast büyüme faktörleri örnek verilebilir³.

Fibroblast büyüme faktörleri ("Fibroblast growth factors", FGFs), polipeptit büyüme faktörlerinin büyük bir ailesini oluşturmaktadır. FGFs değişik organizmalarda (hematodlardan insanlara kadar geniş bir yelpazede) bulunmaktadır⁴.

Fibroblast büyüme faktör ailesinin, en az 9-22 tane yapısal ve biyolojik aktiviteleri açısından benzerlik gösteren, 17-34 kDa aralığında molekül ağırlığına sahip olan üyeleri mevcuttur; bununla birlikte *Drosophila* türünde FGF molekül ağırlığı 84 kDa'dur^{5,6}. Omurgalılarda gen yapısı ve amino asit sırası (özellikle reseptöre bağlanma alanları) bakımından FGFs yüksek oranda korunmuşlardır⁴. FGFs çeşitli mezoderm ve nöroektoderm'den türeyen hücreler (fibroblastlar, osteoblastlar, düz kas hücreleri, endotel hücreler, kondrositler, melanositler gibi) için kuvvetli mitojenik aktiviteleri, nörotropik özellikleri ve heparin bağlama özellikleri ile karakterize edilmişlerdir⁷.

Çok bilinen iki FGFs izoelektrik noktalarının (pI) farklı olması nedeni ile birbirinden ayırt edilmiştir. Asidik FGF (aFGF, FGF-1; 15 kDa)'nin pI 4.5-6, bazik FGF (bFGF, FGF-2)'nin ise pI 9.6-9.8'dir. Bu iki büyüme faktörü % 55 sıra benzerliğine sahiptir^{6,8}.

Gospodarowicz, beyin ve hipofiz ekstrelerinin FGFs'yi içerdiğini bulmuştur⁹. Hipofiz mitojenik faktörlerin major sentez alanıdır. bFGF ilk defa sığır hipofiz ve daha sonra ise sığır beyin ekstrelerinden saflaştırılmıştır^{10,12}.

1.1. bFGF'nin Moleküler Yapısı ve Gen Yapısı

bFGF 1974 yılında karakterize edilmiştir¹³. Çeşitli uzunluklarda insan bFGF vardır; dokulardan ilk izole edilen baskın formu 146 amino asit dizisi (Pro¹-Ala-Leu.....-Ser¹⁴⁶) içeren ve N (azot) ucundan en az 11 amino asit dizisi (Gly-Thr-Met-Ala¹-Ala²-Gly³-Ser⁴-Ile⁵-Thr⁶-Thr⁷-Leu⁸) kadar uzatılabilen şeklidir⁸.

Genom taraması ile birçok Fgf geni bulunmuştur. İnsanda 22 tane Fgf geni tanımlanmıştır⁴. bFGF'yi kodlayan, Fgf 2 geni insanlarda; 4. kromozom, q26-q27 bandı üzerinde lokalize olmuştur^{4,14}.

bFGF'nin yapısı X- ışınları difraksiyonu yöntemi ile (1.6 Å-2.5 Å) belirlenmiştir. bFGF, 4 nm çapında hidrofobik dizilerin iç kısımda ve çok sayıda yüklü dizilerin ise yüzeyde yer aldığı globüler (küresel) bir proteindir. bFGF, β-bükülmeleri ile birbirine bağlı 12 antiparalel β-yaprak

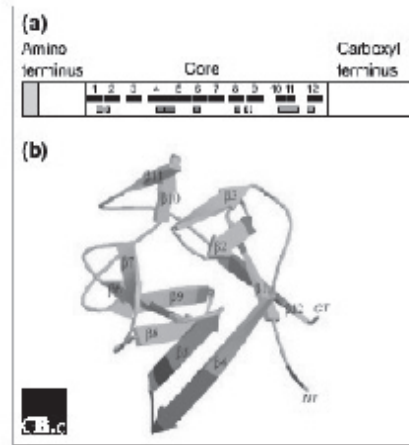
şeritlerinden oluşmaktadır^{4,8}. Bu yapı Şekil 2'de gösterilmiştir⁸.

bFGF salımı hala biyoloji alanında cevap bekleyen bir soru olarak karşımıza çıkmaktadır. bFGF klasik bir işaret sırasına sahip değildir ve bu nedenle işaret iletim yolu ile salınmaz^{6,15}. Hücrelerden bFGF'nin salımı ile ilgili bir görüş ise bFGF'nin hücre ölümü, yaralanma ve kimyasal yaralanma gibi pasif mekanizmalar sonucu salındığı görüşüdür¹⁵. Salınan bFGF ekstraselüler alanda heparan sülfat proteoglikanlara (HSPG) bağlı olarak depolanmaktadır¹⁶.

1.2. FGFs Reseptörleri

bFGF veya aFGF'ye cevap veren tüm hücre tipleri spesifik FGF hücre yüzey reseptörleri taşımaktadırlar. bFGF yüksek (FGFRs, tirozin kinaz (TK) aktiviteli FGF reseptörleri) ve düşük afiniteli reseptörlere (HSPG) bağlanmaktadır¹⁷.

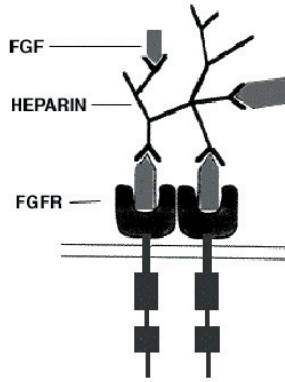
FGFs parakrin and otokrin faktörlerin çok önemli gruplarından birisidir^{13,18}. FGFs'nin reseptöre bağlanması ile reseptörler dimerize olmakta ve bunun sonucunda tirozin kinaz aktivitesi gerçekleşmektedir. Bu kinazlar birbirlerini fosforilleyerek sinyal iletimini başlatmaktadırlar^{19,20}.



Şekil 2

bFGF'nin üç boyutlu yapısı. bFGF'nin iç bölgesi korunmuş amino asit dizileri ve korunmuş yapısal motifler içermektedir. Heparin-bağlanma bölgesi 1. ve 2. β yaprakları arasındaki ilmik kısmında, 10. ve 11. β-yapraklardaki dizileri içerir; Reseptöre bağlanma alanları, reseptörün 2. Ig-benzeri bölgesi yeşil; 3. Ig-benzeri bölgesi mavi ve alternatif olarak birleştirilmiş 3. Ig-benzeri bölgesi kırmızı ile gösterilmiştir⁸.

Yapılan çalışmalarda bFGF'nin hücre içine alınması ve ilerlemesinde HSPG'lerin pekiştirici etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir^{6,16}. FGFs'nin reseptörüne bağlanması HSPG'lerin yardımı ile başarılmaktadır. HSPG'ler aynı ağ içinde birkaç FGF'yi bağlamaktadırlar. Bu ağ Şekil 3'de gösterilmiştir²⁰. bFGF'nin HSPG ile etkileşiminin fizyolojik önemi net değildir; Ancak *in vivo* olarak FGF molekülleri HSPG'ye bağlanarak korunmakta ve ekstraselüler matrikste FGF-HSPG kompleksi halinde saklanmaktadır²¹.



Şekil 3

Heparin tarafından artırılmış reseptör dimerizasyonu ve aktivasyonu²⁰.

1.3. bFGF Stabilitesi

bFGF yapısal ve fonksiyonel olarak önemli stabilite sorunlarına sahiptir²². bFGF metiyonin, aspartat ve asparagin dizilerine sahiptir ve bu diziler potansiyel degradasyon alanlarıdır²³. bFGF cam ve plastik yüzeylere büyük bir afinite ile yapışmaktadır. Bu durum saklama sırasında bFGF'nin fiziksel kaybına neden olmakta ve biyolojik aktivite kaybının nedenlerinden birini oluşturmaktadır. bFGF'nin plastik yüzeylere yapışmasını engellemek için değişik plastik tipleri ile çalışılmıştır. Polipropilen ve polistiren kaplar karşılaştırıldığında, bFGF'nin en az polietilen kaplara yapıştığı gözlenmiştir. bFGF'nin polietilen kaplara spesifik olmayan bağlanmasını engellemek amacı ile bu kaplar sıgır serum albumini (BSA) ile kaplanmıştır. BSA kaplı polietilen kaplar içinde bFGF'nin 4°C'de 4 hafta boyunca ilk aktivitesinin % 37.5'ini koruduğu tespit edilmiştir²².

Kimyasal ve fiziksel modifikasyonlar ürün stabilitesinde etkili olabilir. Metal iyonları protein oksidasyonunu katalize etmektedir²⁴. Foster ve ark., formülasyonlarda şelat yapıcı bir ajanın kullanılmasının metal iyonlarından kaynaklanan oksidasyona ve agregat oluşumuna karşı bFGF stabilitesini sağlamak açısından başarılı olduğunu rapor etmişlerdir²⁵. Yapılan başka bir çalışmada, 0.15 ve 0.1 mM EDTA kullanıldığında bFGF'nin sistein dizilerinin oksidasyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir⁸. Disülfid

bağ oluşumu sonucu oluşan konformasyonel değişimleri önlemek için Seno ve ark., bFGF'nin biyolojik aktivitesini değiştirmeden stabilitesini artırmak amacı ile sistein dizisini serin dizisi ile değiştirmişlerdir²⁶. Bu çalışmada, bFGF'nin başarılı bir şekilde modifiye edildiği ve disülfid bağ oluşumunun engellenmesi ile de stabilitesini koruduğu tespit edilmiştir.

Proteinler, çoklu elektrostatik etkileşimler sonucu polimerler tarafından stabilize edilmektedirler. Heparin bağlanma bölgesinde pozitif yüklü dizilerin sıkı bir şekilde paketlenmiş durumda bulunması yapısal enerjinin önemli bir miktarını oluşturmakta ve stabilize açısından olumsuz bir durum oluşturmaktadır. Heparin gibi polianyonlar bu bölge ile etkileşerek önemli bir stabilize edici etki oluşturmaktadır. Bu etki aFGF ve bFGF'yi proteaz hidrolizine, ısı ve pH etkisiyle gerçekleşebilecek denatürasyonlara karşı korur^{7,8}.

Şekerler ve polioller spesifik olmayan protein stabilize edicileri olarak kullanılmaktadırlar. Bu amaçla çoğunlukla sükroz ve trihaloz kullanılmaktadır²⁷. Wang ve ark. % 30 veya daha fazla (\geq % 30 sükroz) sükroz kullanıldığında bFGF'nin agregasyonunun inhibe edildiğini rapor etmişlerdir^{8,27}.

1.4. Biyolojik Aktiviteleri

bFGF; çok sayıda hücre, doku ve organ sistemlerinin fonksiyon ve gelişiminde etkili olan bir büyüme faktörüdür. Bu sistemler Tablo 1'de özetlenmiştir¹⁸. bFGF öncelikle fibroblastik hücreler için mitojenik bir faktör olarak tanımlanmıştır. bFGF dokuların rejenerasyonunda etkilidir¹⁸.

TABLO I

Farklı organ sistemleri üzerinde bFGF'nin fonksiyonları¹⁸.

Organ	Fonksiyonlar
Beyin	Sinir hücre farklılaşması ve yaşaması
Kan Damarı	Damar gelişimi (anjioenez), düz kas hücre çoğalması atheroenez, kan basınç kontrolü
Akciğer	Nefes yollarının morfojenezi, fibrozit
Kol ve bacaklar	Kol ve bacak gelişimi
Kas	Miyojenez
Kemik	Kemik iyileşmesi, kırık dokunun oluşumu
Hematopoez	Granülositlerin oluşum ve gelişimi, megakaryosit oluşumu ve kök hücre yaşamının uyarılması
Üreme sistemi	Spermatojenez
Göz	Fotoreseptör yaşamı
Deri	Melanoenez, doku tamiri, keratinosit morfojenezi

Endotel hücre çoğalması, göç etmesi ve yeni kan damarı oluşumunun uyarılması bFGF'nin en iyi karakterize edilen fonksiyonlarıdır^{15,28}.

bFGF'nin son zamanlarda nörodejeneratif hastalıkların tedavisi (Alzheimer, Parkinson, beyin iskemisi v.b.) üzerine etkisi yoğun bir şekilde çalışılmaktadır²⁹. bFGF; nöronlar, hipokampus, striatum, spinal kord, serebellum ve parasempatik gangliyonlar üzerinde tropik etkiye sahiptir. Mitoz sonrası farklılaşmış nöronların yaşamını artırır¹¹. Nöronları serbest radikallere, nitrik okside, hipoglisemiye, eksitatör aminoasitlere (glutamik asit) ve oksijensizliğe karşı korur³⁰. SSS yaralanmaları sonrasında sistemin rejenerasyonunda bFGF önemli bir rol oynamaktadır¹⁵. bFGF beyni geçici ve devamlı iskemiyeye karşı korur³⁰. Deneysel beyin iskemisinde, KBE'de bir dağılma varlığında, orta beyin arter oklüzyonu (arterin tıkanması) modelinde (middle cerebral artery occlusion (MCAO) model) sıçanlara i.v. olarak yüksek dozda (135 µg/kg) uygulandığında bFGF nöroprotektif etki göstermiştir^{31,32}.

bFGF'nin ve reseptörlerinin seviyesi nörodejeneratif hastalıklarda Parkinson hastalığında, substantia nigra nöronlarında bFGF kaybı söz konusudur. Claus ve ark. tarafından in vivo bFGF uygulanmasının dopaminerjik nöronları kurtardığı ve bu nedenle Parkinson hastalığının tedavisinde ümit verici olduğu bildirilmiştir³³. Alzheimer hastalığındaki amiloid plaklarda bFGF azalmıştır¹⁵. bFGF plakların ana yapıtaşı olan amiloid β proteininin nörodejeneratif etkilerini azalttığı gösterilmiştir³⁴.

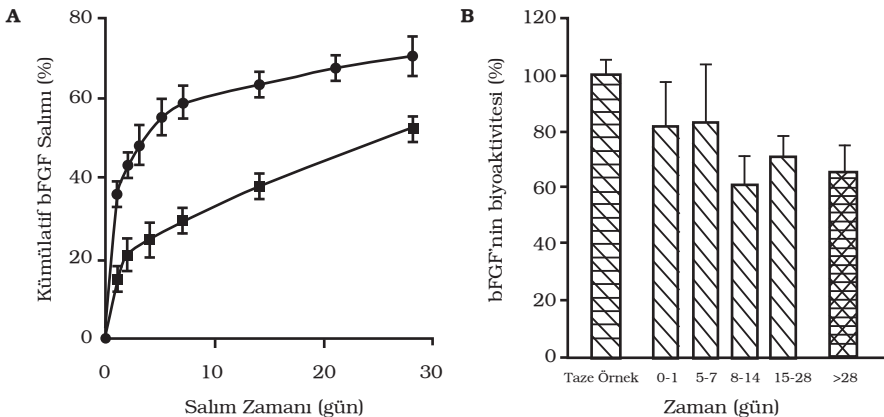
1.5. Formülasyonları

bFGF'nin jel, toz, sulu formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar genellikle topikal olarak deride damar gelişimini artırmak, dermal ve epidermal yara iyileşmesini kolaylaştırmak amacıyla kullanılmıştır^{8,35,36}.

Büyüme faktörlerinin biyolojik yarı ömürleri çok kısadır (bFGF ve PDGF, < 2-3 dak. v.b.). Bu faktörler, enjekte edildiklerinde hızlı bir şekilde kandan uzaklaştırılır ve doku bariyerlerinden özellikle kapiler duvarlardan yavaş bir şekilde penetre olurlar^{37,38}. Bu nedenlerden dolayı, sistemik uygulama sırasında farmakolojik etkinin oluşabilmesi için yüksek dozda ilaç kullanılmakta ve sonuçta istenmeyen yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Büyüme faktörlerinin in vivo etkinliğini artırmanın ve istenmeyen etkilerinin ortadan kaldırılmasının bir yolu biyoaktif molekülün bir polimerik taşıyıcı sistem içine hapsedilmesi ve belli bir zaman periyodu içinde uzun süreli salınmasının sağlanmasıdır³⁷. Kontrollü salım sistemleri, mikrogram veya daha küçük miktarlarda etkinlik gösteren büyüme faktörlerinin taşınmasında uygun sistemlerdir. Büyüme faktörleri bu sistemler içine hapsedilerek yapı ve aktivitelerini korumaları sağlanmakta ve uzun süreli olarak aktif formları halinde salınmaları gerçekleştirilmektedir^{5,39}.

Derlememizde, bFGF'nin taşıyıcı sistem içindeki stabilitesine yönelik yapılan iki çalışma^{40,41} ile bFGF'nin beyin iskemisi tedavisinde önemli bir potansiyele sahip olmasından dolayı reseptör aracılıklı olarak beyne taşınması ile ilgili olan iki çalışma^{42,43} üzerinde ayrıntılı bilgi verilecektir.

Zhu ve ark.⁴⁰ tarafından bFGF'nin stabilitesini sağlamak amacı ile milisilindir formülasyonu geliştirilmiştir. Bunun için PLGA polimeri kullanılmış ve öncelikle bFGF'nin stabil olmadığı durumlar belirlenmiştir. Daha sonra stabilizeyi artırmak için çeşitli ilave maddeler kullanılmıştır. bFGF stabilitesi için heparin (pH değişimine ve sıcaklık artışına karşı), EDTA (ortamdaki ağır metaller ile şelat yapması için), Mg(OH)₂/BSA kombinasyonu (asidik mikroçevreyi nötralize etmesi için) ve sükröz (bFGF'yi katı halde tutması için) kullanılmıştır. bFGF bu ek maddeler ile milisilindirler içine enkapsüle edilmiştir. bFGF salını fosfat salın tamponu (PBS) içinde izlenmiş ve salım çalışmasının 28. gününün sonunda bFGF'nin % 71'i milisilindir formülasyonundan salınmıştır (Şekil 4A). Ortama salınmış olan bFGF'nin yapısal bütünlüğü sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak incelenmiş ve bu çalışma sonucunda bFGF'nin yapısal bütünlüğünü koruduğu tespit edilmiştir. bFGF'nin biyolojik aktivitesini koruyup korumadığı ise BALB/c 3T3 hücre kültüründe mitojenik aktivitesinin incelenmesi ile gerçekleştirilmiş ve bu çalışma sonucunda bFGF'nin biyolojik aktivitesini koruduğu, enkapsülasyon metodunun bFGF'nin biyolojik aktivitesini etkilemediği saptanmıştır (Şekil 4B)⁴⁰.



Şekil 4 (A-B)

(A) bFGF'nin kontrollü salımı: (●): 3% Mg(OH)₂/0.0025% bFGF/0.0025% heparin/0.01% EDTA/0.6% sükröz/14.4% BSA yüklü PLGA milisilindirleri ve (■): 3% Mg(OH)₂/0.01% bFGF/0.01% heparin/0.01% EDTA/2.3% sükröz/12.7% BSA yüklü PLGA milisilindirleri (yavaş salım) (ortalama±SS, n=3). (B) Yavaş salımın görüldüğü milisilindirlerden salınan bFGF örneklerinin biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi. Biyoaktivite (%)=biyolojik tayin ile belirlenen konsantrasyon/ELISA ile belirlenen konsantrasyon x100⁴⁰.

bFGF'nin stabilitesine yönelik olarak bizim yaptığımız tez çalışmasında ise, bFGF-yüklü PLGA (50:50 Resomer RG 503H) mikroküreleri hazırlanmış ve in vitro karakterizasyon çalışmaları (partikül büyüklüğü, verim, ilaç yüklemesi, yüzey morfolojisi, yapısal bütünlük ve salım özellikleri) yapılmıştır. Daha sonra, bFGF'nin biyolojik aktivitesini koruyup korumadığını tespit etmek üzere BALB/c 3T3 fibroblast hücreleri kullanılarak hücre kültürü çalışmaları yapılmış ve bFGF-yüklü PLGA mikrokürelerinin fibroblast hücreleri üzerindeki çoğaltıcı etkisi MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] testi ile tespit edilmiştir. Hazırlanan mikrokürelerde, bFGF'nin yapı bütünlüğünü koruduğu, hücre kültürü çalışmalarında ise heparin varlığında bFGF'nin kontrol grubuna göre hücre çoğalmasında artış olduğu tespit edilmiştir⁴¹.

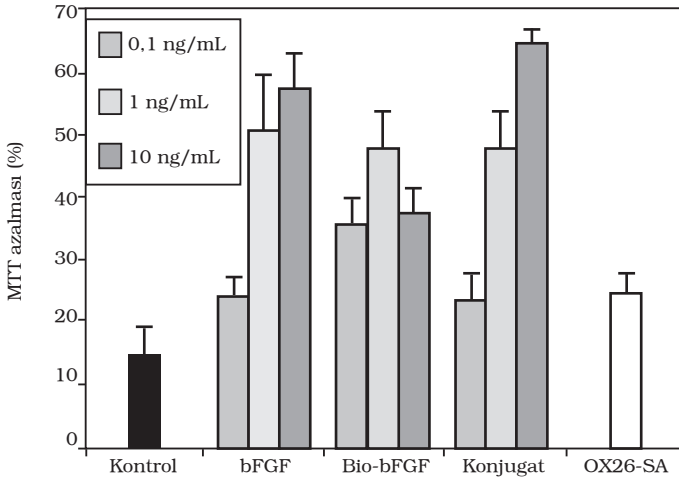
Nörolojik hastalıkların tedavisinde karşılaşılan en önemli problem, ilaçların beyne taşınması ve özellikle belirli bir bölgeye ulaştırılıp kontrollü veya sabit bir hızda salınmasıdır. Bu sorunun ortaya çıkmasında ve çoğu maddenin geçişinin engellenmesindeki en önemli faktör kan beyin engelidir. Kan beyin engelini (KBE) oluşturan endotel hücreler sürekli, tek tabaka halinde çok sıkı halde dizilmişlerdir. KBE, seçici, dinamik bir filtre görevi görerek peptit-proteinler de dahil olmak üzere çoğu suda çözünür maddelerin merkezi sinir sistemine geçişini engellemektedir. Bu maddeler beyne geçse bile beyindeki dağılımlarının kontrol edilmesinde belirsizlikler ortaya çıkmaktadır⁴⁴.

Yapılan çalışmalarda^{32,45}, intravenöz (i.v.) uygulanan bFGF'nin KBE'den geçişi, geçici beyin iskemisine karşı nöroprotektif etkisi ve terapötik penceresi incelenmiştir. Öncelikle işaretlenmiş bFGF hazırlanmış, i.v. olarak beyin iskemili sıçanlara uygulanmış ve daha sonra sıçan beyinleri çıkarılarak bFGF'nin beyne geçip geçmediği incelenmiştir. bFGF'nin zarar görmüş KBE'den geçebileceği fakat zarar görmemiş KBE'den geçemeyeceği gösterilmiştir^{32,45}.

Yapılan diğer çalışmalarda^{46,47} ise, bFGF'nin enfarktüs (bir organ ya da dokuyu besleyen kan akımının kesilmesi sonucu oluşan hücre ölümü) hacmini maksimum 150 µg/ml konsantrasyonda azalttığı gözlenmiştir. Ancak; sistemik uygulama sırasında istenmeyen yan etkilerin (hipotansiyon, taşikardi v.b.) meydana gelebileceği de ifade edilmiştir^{46,47}.

bFGF'nin kandan beyin içine geçişinin hızlandırılması yüksek dozda bFGF'nin uygulanmasını gerektirdiğinden insanlarda yapılan klinik denemelerde doza-bağımlı olarak yan etkilerin olduğu görülmüştür. Bu nedenlerden dolayı, bFGF'nin etkili bir ilaç olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen ortaya çıkan yan etkilerinden dolayı çalışmalar faz III aşamasında emniyet açısından durdurulmuştur⁴².

bFGF'nin, KBE'den daha hızlı taşınması, maksimum etkinin elde edilebilmesi ve yan etkilerin azaltılması amacıyla daha düşük dozlarda bFGF'nin kullanımını sağlayacak şekilde beyne hedeflendirilmesi düşünülerek reseptör aracılıklı taşınma ile KBE'den geçişi sağlanmıştır⁴². Yapılan bu çalışmada⁴², bFGF'nin transferrin reseptörü aracılığıyla KBE'den geçişini sağlamak amacıyla OX26 monoklonal antikoru (Ox26 MAb) kullanılmıştır. Bu çalışmada bFGF doğrudan biyotine bağlanmış ve daha sonra biyotin ve streptavidin (SA) arasındaki yüksek afiniteden faydalanılarak bFGF-biyotin konjugatı OX26/SA konjugatına bağlanmıştır. bFGF-biyotin konjugatının hazırlanması ise, NaHCO₃ içindeki bFGF biyotin-XX-NHS'in dimetil sülfoksitteki çözeltisine ilave edilerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürün daha sonra diyaliz edilmiştir. Biyotin-bFGF'nin son konsantrasyonu BCA (bicinchoninic acid assay) protein tayini kullanılarak belirlenmiştir. Biyotin-bFGF (Bio-bFGF) molar oranları ise 4'-hidroksiazobenzen-2-karboksilik asit tayini (HABA) kullanılarak 1:1 olarak bulunmuştur. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında bFGF-biyotin-SA/OX26 konjugatının in vitro koşullarda doza-bağımlı bir nöroprotektif etki gösterdiği tespit edilmiştir. bFGF-biyotin-SA/OX26 konjugatının yanısıra sadece OX26-SA konjugatı da uygulanmıştır. Elde edilen sonuç uygulama yapılmamış kültürler ile karşılaştırıldığında OX26-SA konjugatının önemli bir etkiye sahip olmadığı ve bFGF-biyotin-SA/OX26 konjugatı için etkili dozun 1 ng/ml olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5)⁴².



Şekil 5

Hipoksi (24 saat)/reoksijenasyona (4 saat) maruz bırakılan önbeyin kortikal hücre kültüründe MTT testi ile tespit edilmiş bFGF analoglarının nöroprotektif etkisi. Peptit ve konjugatlar için üç farklı doz çalışılmış ve elde edilen sonuç kontrol grubu (uygulama yapılmamış) ile karşılatırılmıştır. (Ortalama±SS, n=3, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001)⁴².

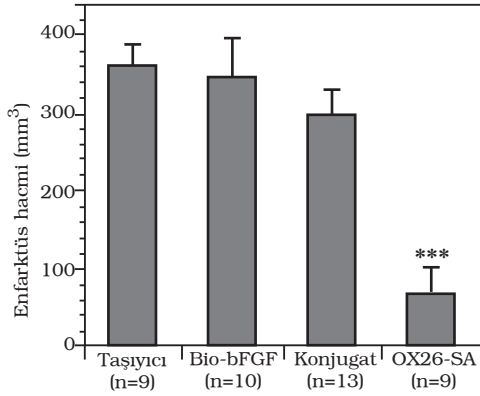
Sıçanlarda, MCAO modeli ile beyin iskemisi oluşturulduktan hemen sonra i.v. tek dozda uygulanan bFGF analoglarının enfarktüs hacmi üzerindeki etkisi Şekil 6'da gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında OX26-SA (150 µg/kg) konjugatının tek başına enfarktüs hacmi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı, Bio-bFGF'nin (25 µg/kg) enfarktüs hacminde % 16'lık bir azalma yaptığı ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Buna karşılık, bFGF-biyotin-SA/OX26 konjugatının (25 µg/kg bFGF'e eşdeğer) ise enfarktüs hacminde % 80 azalmaya neden olduğu saptanmıştır⁴².

Sıçanlarda, MCAO sonrası 2. ve 24. saatlerde uygulanan bFGF analoglarının nörolojik defekt üzerindeki etkileri Şekil 7'de gösterilmiştir. OX26-SA ve Bio-bFGF'nin nörolojik defekt üzerinde herhangi bir değişime neden olmadığı, bFGF-biyotin-SA/OX26 konjugatının ise nörolojik defekt üzerinde önemli bir düzelme sağladığı tespit edilmiştir⁴².

bFGF-biyotin-SA/OX26 konjugatı 5 µg/kg gibi düşük bir dozda, bunun yanısıra 1, 2, 3 saat gecikme (iskemi oluşumunda itibaren) ile 25 µg/kg dozda uygulanmış enfaktüs hacmi ve nörolojik defekt üzerine etkisi Tablo 2'de özetlenmiştir. 5 µg/kg doz uygulandığında, enfarktüs hacminde % 34'lük bir azalma, 1 saat gecikme ile 25 µg/kg doz uygulandığında ise enfarktüs hacminde % 66'lık bir azalma, 2.ve 24. saatlerde ise nörolojik defektte önemli bir düzelme olduğu tespit edilmiştir⁴².

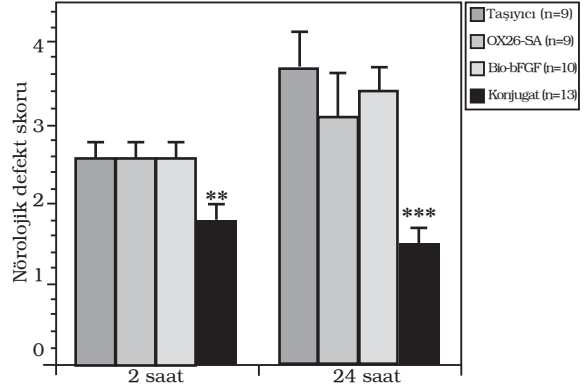
Bu çalışmada, iskemi sonrasında düşük sistemik (25 µg/kg) dozda bFGF-biyotin-SA/OX26 konjugatı hemen uygulandığında enfarktüs hacminde % 80'lik bir azalma olduğu, bu şekilde bFGF'nin reseptör aracılıklı olarak KBE'den beyne taşınması ile önemli bir nöroprotektif etki göstereceği tespit edilmiştir⁴².

Pardridge ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada, beyne hedeflendirilmiş biyotinlenmiş bFGF'nin farmakokinetiği ve beyin içine alınması incelenmiştir⁴³. [¹²⁵I]-bio-bFGF ve [¹²⁵I]-bio-bFGF/OX26-SA konjugatının plazma klerens ve metabolik stabilitelerinin zamana karşı değişimi Şekil 8'de gösterilmiştir. [¹²⁵I]-bio-bFGF ve [¹²⁵I]-bio-bFGF/OX26-



Şekil 6

Siçanlarda, orta beyin arter oklüzyonu (MCAO) modeli ile oluşturulan beyin iskemisi sonucu ortaya çıkan enfarktüs hacminin azalması. I. Grup: Taşıyıcı (1.2 ml/kg tampon, %1 BSA içeren); II. Grup: 150 µg/kg OX26-SA; III. Grup: 25 µg/kg bio-bFGF; IV. Grup: bio-bFGF/OX26-SA (25 µg/kg bFGF'e eşdeğer). (Ortalama±SS, taşıyıcı grup ile konjugat karşılaştırılmıştır. ***: p<0.01, ANOVA)⁴².



Şekil 7

Bio-bFGF/OX26-SA kullanılması ile nörolojik defekt skorunun düzelmesi. I. Grup: Taşıyıcı (1.2 ml/kg tampon, %1 BSA içeren); II. Grup: 150 µg/kg OX26-SA; III. Grup: 25 µg/kg bio-bFGF; IV. Grup: bio-bFGF/OX26-SA (25 µg/kg bFGF'e eşdeğer). (Ortalama±SS, taşıyıcı grup ile konjugat karşılaştırılmıştır. **: p<0.01, ***: p<0.001, ANOVA)⁴².

TABLO II

bFGF analoglarının enfarktüs hacmi ve nörolojik defekt üzerinde ki nöroprotektif etkisi (Ortalama± SS)⁴².

Uygulama	Enfarktüs hacmi (mm ³)	Nörolojik defekt skoru 2. saat	Nörolojik defekt skoru 24. saat
Taşıyıcı (n=9)	361±29	2.6±0.2	3.7±0.4
Bio-bFGF/OX26-SA, 5 µg/kg (n=9)	238±39**	2.3±0.2	3.2±0.6
Bio-bFGF/OX26-SA, 1 saat gecikme ile, 25 µg/kg (n=10)	122±36*	2.1±0.2	1.5±0.2
Bio-bFGF/OX26-SA, 2 saat gecikme ile, 25 µg/kg (n=3)	358±30	2.7±0.3	3.0±1.0
Bio-bFGF/OX26-SA, 3 saat gecikme ile, 25 µg/kg (n=3)	356±32	2.7±0.6	3.0±1.0

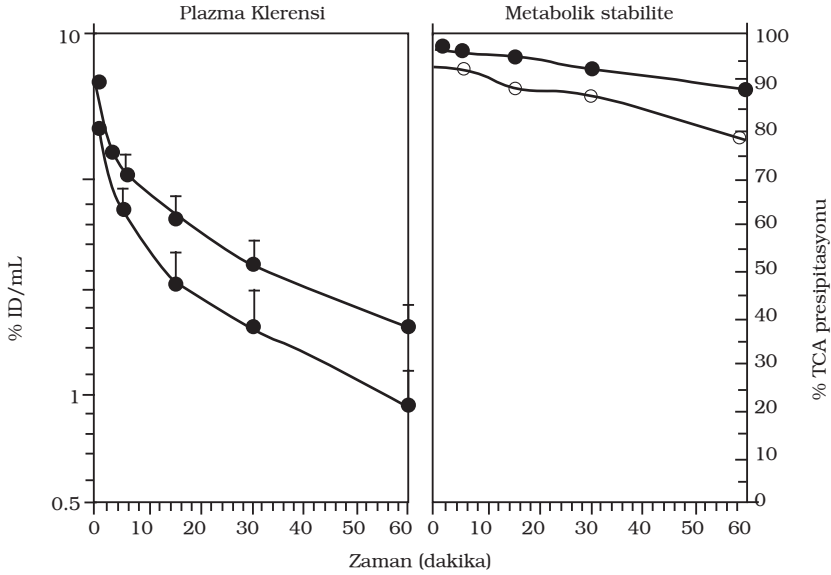
* : p<0.01; **: p<0.05; ANOVA (F değeri=12.4, serbestlik derecesi=5)

SA konjugatının farmakokinetik parametreleri ise Tablo 3'de verilmiştir (43).^[125I]-bio-bFGF ve ^[125I]-bio-bFGF/OX26-SA konjugatının trikloroasetik asit (trichloroacetic acid, TCA) presipitasyonu 60. dakika sonunda sırası ile % 79±1 ve % 89 ±2'dir. ^[125I]-bio-bFGF/OX26-SA konjugatının AUC değeri (161±19, % injekte edilen doz (% ID) dak./ml), ^[125I]-bio-bFGF'nin AUC değeri (111±26, % ID dak./ml) ile karşılaştırıldığında 60. dakika sonunda % 50 oranında yükselmiştir. ^[125I]-bio-bFGF i.v. uygulama sonrası karaciğer ve böbrekler tarafından alımı fazla iken kalp, akciğerler gibi diğer organlar tarafından daha az alınır. Oysa konjugasyon (^[125I]-bio-bFGF/OX26-SA) ile ^[125I]-bio-bFGF'nin periferel dokular tarafından alımı azaltılmakta ve bunun sonucunda plazma AUC değerinde bir yükselme elde edilmektedir (Şekil 9). ^[125I]-bio-bFGF'nin beyin dağılım hacminin (Vd) beyin plazma hacminden önemli bir farklılık göstermediği ve bu nedenle KBE permeabilite yüzey alanının hesaplanamadığı ifade

TABLO III

Sıçanlara, ^[125I]-bio-bFGF ve ^[125I]-bio-bFGF/OX26-SA konjugatının i.v. uygulanımını takiben 60. dakikada beyne alımı ve farmakokinetik parametreleri⁴³.

Parametre	Bio-bFGF	bio-bFGF/OX26-SA
A ₁ (%ID/ml)	7.99±1.47	4.07±0.21
A ₂ (%ID/ml)	3.14±0.87	4.16±0.46
K ₁ (dak. ⁻¹)	2.29±1.13	1.00±0.19
K ₂ (dak. ⁻¹)	0.0212±0.0025	0.0172±0.0013
t ¹ _{1/2} (dak.)	0.53±0.27	0.75±0.14
t ² _{1/2} (dak.)	34±4	41±3
AUC ₀₋₆₀ (%ID/ml)	111±26	161±19
AUC _{0-∞} (%ID/ml)	155±37	249±34
V _c (ml/kg)	35±8	46±5
V _{ss} (ml/kg)	119±28	9±13
CL _{ss} (ml/dak./kg)	2.63±0.73	1.57±0.31
MRT (dak.)	46±6	58±4
Beyin PS (µl/g/dak.)	<0.08	0.264±0.019



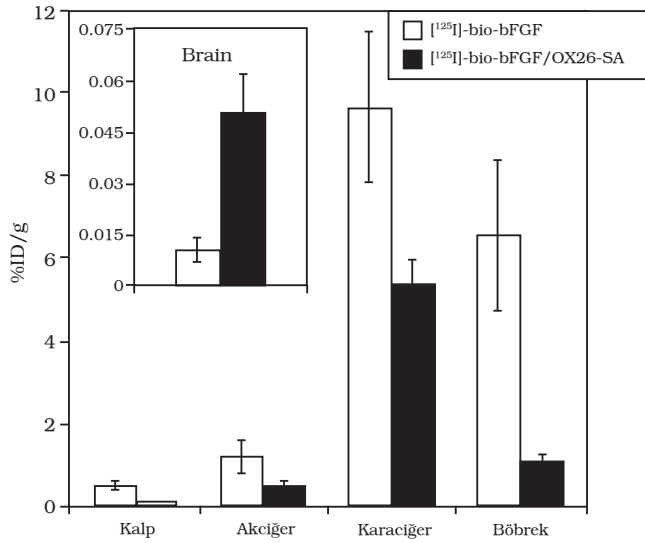
Şekil 8

Sol pano; Sıçanlara i.v uygulanan (o): $[^{125}\text{I}]$ -bio-bFGF ve (•): $[^{125}\text{I}]$ -bio-bFGF/OX26-SA konjugatının plazmadan klerensi. Sağ pano; Sıçanlara i.v. uygulanan $[^{125}\text{I}]$ -bio-bFGF ve $[^{125}\text{I}]$ -bio-bFGF/OX26-SA konjugatının TCA ile presipitasyona uğratan plazma radyoaktivitesi⁴³.

edilmiştir. $[^{125}\text{I}]$ -bio-bFGF/OX26-SA konjugatının beyne alımı (% ID/g) $[^{125}\text{I}]$ -bio-bFGF'den 5 kat daha fazladır (Şekil 10)⁴³.

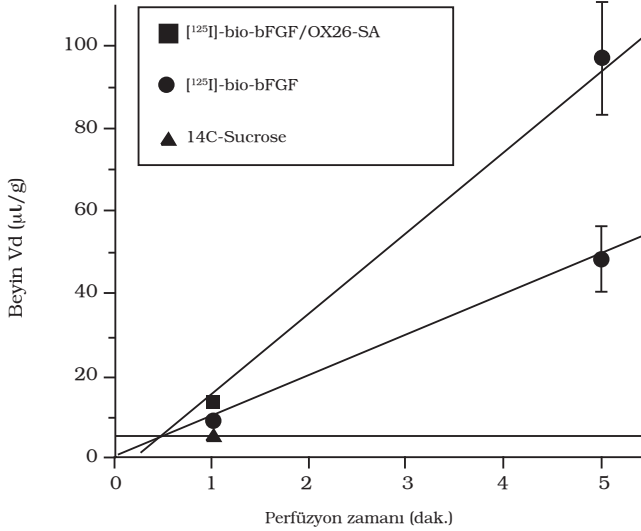
Sonuç olarak bu çalışmada; taşıyıcı vektörün, bFGF'nin reseptörüne olan afinitesinde minimum düzeyde bir azalma meydana getirdiği, bununla birlikte bFGF'nin periferdeki organlar tarafından alınmasının azaldığı ve beyin içine alınmasında bir artış olduğu ve bFGF'nin reseptör aracılıklı olarak KBE'den beyne taşınmasının nöroprotektif ajan olarak bFGF'nin terapötik etkisini artırdığı tespit edilmiştir (43).

bFGF, nörolojik hastalıkların özellikle beyin iskemisinin tedavisinde önemli bir potansiyele sahiptir. bFGF'nin stabilitesini ve biyolojik aktivitesini kaybetmeden etki yerine taşınacak istenen etkiyi göstermesi için uygun taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve etki yerine taşınarak istenen etkiyi göstermesi için uygun taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve etki yerine hedeflendirilmesi çok önemlidir. Bu alanda bFGF'nin beyne hedeflendirilmesi için reseptör aracılıklı taşınma ile KBE'den geçerek beyne taşınması ileride bFGF'nin beyin iskemisi ve diğer nörolojik hastalıkların tedavisinde etkin olarak kullanılmasına olanak sağlayabilir.



Şekil 9

[¹²⁵I]-bio-bFGF ve [¹²⁵I]-bio-bFGF/OX26-SA konjugatının sıçanlara i.v. uygulanımı sonrasında organlar tarafından alımı (gram organ başına injekte edilen dozun yüzdesi (%ID/g) olarak ifade edilir)⁴³.



Şekil 10

Sıçanlarda, [¹²⁵I]-bio-bFGF ve [¹²⁵I]-bio-bFGF/OX26-SA konjugatının internal karotid arter perfüzyonunu takiben beyin dağılım hacmi, [¹⁴C]-sükroz (beyin vasküler hacim marker)'ün beyin dağılım hacmi (Vd), (ortalama±SS)⁴³.

Özet

Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'nin de dahil olduğu peptit büyüme faktörlerinin terapötik potansiyeli, nörodejeneratif hastalıkları da içeren çeşitli hastalıkların tedavisi için yoğun bir inceleme altındadır. Büyüme faktörleri, sadece sinirsel gelişimin değil aynı zamanda sinirsel dejenerasyonun önlenmesinde de gerekli ajanlar olarak öne çıkmaktadır. bFGF, nöronları çok sayıda toksin ve iskemik nöronal yaralanmalar gibi oluşumlara karşı korur. Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi nöropeptitler santral sinir sistemi (SSS) hastalıklarının tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesinde en önemli problem, enkapsüle edilen bFGF'nin fizyolojik koşullar altında aylarca yapı ve biyolojik aktivitesini devam ettirmesi gerekliliğidir. Beyin iskemisinin tedavisi için bFGF avidin-biyotin teknolojisi kullanılarak OX26 MAb'ye konjugasyonu sağlanarak beyine taşınmaktadır.

Anahtar Kelimeler: bFGF; SSS; OX26 MAb; KBE

Summary

bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) and A Novel Approach To Its Formulations

The therapeutic potential of peptide growth factors, such as basic fibroblast growth factor (bFGF) is currently under intense scrutiny in a wide variety of diseases, including neurodegenerative illnesses. Growth factors have gained increasing prominence as agents necessary not only for the promotion of neuronal development but also for the prevention of neuronal degeneration. bFGF protects neurons against a number of toxins and insults including ischemic neuronal injury. bFGF play an important role in the treatment of central nervous system (CNS) diseases. A major problem to development of controlled release systems is the need to retain the structure and biological activity of encapsulated bFGF during months of incubation under physiological conditions. bFGF deliver to the brain by conjugating it to OX26 MAb using the avidin-biotin technology for the treatment of brain ischemia.

Keywords: bFGF; CNS; OX26 MAb; BBB

KAYNAKLAR

1. Burçak, G.C. "Hormonların genel özellikleri" Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. Y. (derleyenler), İnsan Biyokimyası, Ankara, Palme Yayıncılık, (2002), s. 437.
2. McKay, I. A. "Types of growth factor activity: detection and characterization of new growth factor activities" McKay, I., Leigh, I. (derleyenler), Growth factors; A practical Approach, New York, Oxford University Press, (1993), s. 1.
3. Russell, W.E., Van, J. J . "Peptide growth factors" Degroot, L J., Besser, M., Burger, H.G., Jameson, J. L., Loriaux, D.L., Marshall, J.C., Odell, W. D., Potts, J.T., Rubenstein, A. H. (derleyenler), Endocrinology. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 3. Baskı, (1996), s. 2590.
4. Ornitz, D.M., Itoh, N. Fibroblast growth factors, Genome Biol., 2, 3005.1-3005.12 (2001).
5. Nimni, M.E. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems, Biomaterials, 18, 1201 (1997).
6. Nugent, M.N., Iozzo, R.V. Fibroblast growth factor-2, IJBCB, 32, 115-120 (2000).
7. Vemuri, S., Beylin, I., Sluzky, V., Stratton, P., Eberlein, G., and Wang, Y.J., The stability of bFGF against thermal denaturation, J. Pharm. Pharmacol., 46, 481-486 (1994).
8. Wang, Y. J., Shahrokh, Z., Vemuri, S., Eberlein, G., Beylin, I., Busch, M., "Characterization, stability, and formulations of basic fibroblast growth factor" Pearlman, R., Wang Y. J. (derleyenler), Formulation and characterization, and stability of protein drugs, New York, London, Plenum Press, (1996), s.141-180.
9. Gospodarowicz, D., Moran, J.S. Stimulation of division of sparse and confluent 3T3 cell populations by a fibroblast growth factor, dexamethasone and insulin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 71, 4584-4588 (1974).
10. Gospodarowicz, D. Isolation and characterization of acidic and basic fibroblast growth factor, Methods Enzymol., 147, 106-119 (1987).
11. Baird, A., Walicke, P.A. Fibroblast growth factors, Br. Med. Bull., 45, 438-452 (1989).
12. Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G.M., Baird, A., Bohlen, P. Isolation by heparin-sepharose affinity chromatography of brain fibroblast growth factor: Identity with pituitary fibroblast growth factor, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 81, 6963-69671 (1984).
13. Delrieu, I. The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism, FEBS Letters, 468, 6-10 (2000).
14. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology, FGF-2 fibroblast growth factor 2 (basic), www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes_gc/GC_FGF2.html (2003).
15. Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Rifkin, D.B. Biological roles of fibroblast growth factor-2, Endocrine Rev., 18, 26-45 (1997).
16. Sperinde, G.V., Nugent, M.A. Heparin sulfate proteoglycans control bFGF processing in vascular smooth muscle cells, Biochemistry, 37, 13153-13164 (1998).
17. Mohammadi, M., Froum, S., Hamby, J.M., Schroeder, M.C., Panek, R.L., Lu G.H., Eliseenkova, A.V., Green, D., Schlessinger, J., Hubbard, S.R. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain, EMBO J., 17(10), 5896-5904 (1998).

18. Okada-Ban, M., Thiery, J.P., Jouanneau, J. Fibroblast growth factor-2, *IJBCB*, 32, 263-267 (2000).
19. Moroni, E., Dell’Era, P., Rusnati, M., Presta, M. Fibroblast growth factors and their receptors in hematopoiesis and hematological tumors, *J. Hematother. & Stem Cell Res.*, 11, 19-32 (2002).
20. www.devbio.com/chap14/link1406.shtml. Specific functions of fibroblast growth factor receptors, (2003) 21. Nissen, N.N., Shankar, R., Gamelli, R.L., Singh, A., DiPietro, L.A. Heparin and heparan sulphate protect basic fibroblast growth factor from non-enzymic glycosylation, *Biochem. J.*, 338, 637-642 (1999).
21. Edelman, E.R., Mathiowitz, E., Langer R., Klagsbrun, M. Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor, *Biomaterials*, 12, 619-626 (1991).
22. Shahrokh, Z., Eberlein, G., Buckley, D., Paranandi, M.V., Aswad, D.W., Stratton, P., Mischak, R., Wang, Y.J. Major degradation products of basic fibroblast growth factor: Detection of succinimide and iso-aspartate in place of aspartate, *Pharm. Res.*, 11 (7), 936-944 (1994).
23. Sommer, A., Rifkin, D.B. Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor: protection of the angiogenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan, *J. Cell Physiol.*, 138, 215-220 (1989).
24. Foster, L.C., Thompson, S.A., Tarnowski, S.J. Methods and formulations for stabilizing fibroblast growth factor. International Patent Number WO91/15509.
25. Seno, M., Sasada, R., Iwane, M., Sudo, K., Kurokawa, T., Ito, K., Igarashi, K. Stabilizing basic fibroblast growth factor using protein engineering, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151, 701-708 (1988).
26. Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.*, 185, 129-188 (1999).
27. Baird, A., Böhlen, P. "Fibroblast growth factors" Sporn, M. B., Roberts, A. B. (derley-enler), Peptide growth factors and their receptors I, Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (1990), s. 369-418.
28. Claus, P., Werner, S., Timmer, M., Grothe, C. Expression of the fibroblast growth factor-2 isoforms and the FGF receptor 1-4 transcripts in the rat model system of Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 360(3),117-20 (2004).
29. Ma, J., Qiu, J., Hirt, L., Dalkara, T., Moskowitz, M.A. Synergistic protective effect of caspase inhibitors and bFGF against brain injury induced by transient focal ischemia, *Br. J. Pharmacol.*, 133, 345-350 (2001).
30. Fisher, M., Meadows, M.E., Do, T., Weise, J., Trubetsky, V., Charette, M., Finklestein, S.P. Delayed treatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 15, 953-959 (1995).
31. Cuevas, P., Carceller, F., Muñoz-Willery, I., Giménez-Gallego, G. Intravenous fibroblast growth factor penetrates the blood-brain barrier and protects hippocampal neurons against ischemia-reperfusion injury, *Surg. Neurol.*, 49, 77-84 (1998).
32. Claus, P., Werner, Stefan, Timmer, M., Grothe, C., Expression of the fibroblast growth factor-2 isoforms and the FGF receptor 1-4 transcripts in the rat model system of Parkinson's disease, *Neurosci. Let.*, 260, 117-120 (2004).

33. Mattson, M.P., Tomaselli, K.J., Rydel, R.E. Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated β -amyloid peptide are attenuated by bFGF, *Brain Res.*, 621, 35-49, (1993).
34. Kajio, T., Kawahara, K., Kato, K. Stabilization of basic fibroblast growth factor with dextran sulphate, *Fed. Europ. Biochem. Soc.*, 306, 243 (1992).
35. Akiyama, Y., Yoshioka, M., Kitamori, N. Stabilized FGF composition and production thereof, U.S. Patent 5189148 (1993).
36. Babensee, J.E., McIntire, L.V., Mikos, A.G. Growth factor delivery for tissue engineering, *Pharm. Res.*, 17(5), 497 (2000).
37. Haller, M. F., Saltzman, W. M. Nerve growth factor delivery systems, *J. Control. Rel.*, 53, 531-536 (1998).
38. Tabata, Y., Nagano, A., Ikada, Y. Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor, *Tissue Eng.*, 5, 127-138 (1999).
39. Zhu, G., Mallery, S.R., Schwendeman, S.P. Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide-co-glycolide), *Nat. Biotechnol.*, 18, 52-57 (2000).
40. Çetin M. Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) taşıyan mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ve karakterizasyonu, yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Ankara-2003
41. Song, B.W., Vinters, H.V., Wu, D., Pardridge, W.M. Enhanced neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor in regional brain ischemia after conjugation to a blood-brain barrier delivery vector, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 301, 605-610 (2002).
42. Wu, D., Song, B.W., Vinters, H.V., Pardridge, W.M. Pharmacokinetics and brain uptake of biotinylated basic fibroblast growth factor conjugated to a blood-brain barrier drug delivery system, *J. Drug Target.* 10(3), 239-245 (2002).
43. Pardridge, W. M. "Drug delivery to the brain" *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 17, 713-731 (1997).
44. Ren, J., Finklestein, S. P. Time window of infarct reduction by intravenous basic fibroblast growth factor in focal cerebral ischemia, *Eur. J. Pharm.*, 327, 11-16 (1997)
45. Sugimori, H., Speller, H., Finklestein, S.P. Intravenous basic fibroblast growth factor produces a persistent reduction in infarct volume following permanent focal ischemia in rats, *Neurosci. Lett.*, 300, 13-16 (2001)
46. Deguchi, Y., Naito T., Yuge, Takuro, Furukawa A., Yamada, S., Pardridge, W. M., Kimura, R. Blood-Brain Barrier transport of I-labeled basic fibroblast growth factor, *Pharm. Res.*, 17 (1), 63-69 (2000).