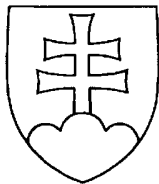


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ  
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

(11), (21) Číslo dokumentu:

**825-2003**

- (22) Dátum podania prihlášky: **8. 1. 2002**  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **101 01 307.8**  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **12. 1. 2001**  
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **DE**  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **2. 12. 2003**  
Vestník ÚPV SR č.: **12/2003**  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP02/00108**  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/055067**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> :

**A61K 31/194,  
A61K 31/225,  
A61P 1/04,  
A61P 1/16,  
A61P 9/00,  
A61P 11/00,  
A61P 13/12,  
A61P 17/00,  
A61P 19/02,  
A61P 19/06,  
A61P 31/00,  
A61P 35/00**

- (71) Prihlasovateľ: **FUMAPHARM AG, Muri, CH;**  
(72) Pôvodca: **Joshi Rajendra Kumar, Zürich, CH;  
Strebel Hans-Peter, Luzern, CH;  
Petzelbauer Peter, Wien, AT;**  
(74) Zástupca: **Bezák Marián, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Deriváty kyseliny fumarovej ako inhibítory NF-kappa B**

- (57) Anotácia:  
Opisuje sa použitie jedného alebo viacerých derivátov kyseliny fumarovej ako inhibítora NF-kappa B. Ďalej je opísané použitie derivátov kyseliny fumarovej na prípravu farmaceutického prostriedku na liečbu chorôb, ktoré sa môžu ovplyvniť NF-kappa B.

**SK 825-2003 A3**

## DERIVÁTY KYSELINY FUMAROVEJ AKO INHIBÍTORY NF-KAPPA B

### Oblasť techniky

Tento vynález sa týka použitia jedného alebo viacerých derivátov kyseliny fumarovej ako inhibítora NF-kappa B. Ďalej sa tento vynález týka použitia derivátov kyseliny fumarovej na prípravu farmaceutického prostriedku na liečbu chorôb, ktoré sa môžu ovplyvniť NF-kappa B.

### Doterajší stav techniky

Je známe, že farmaceutické prípravky, ako je kyselina fumarová, ktoré po podaní sa biologicky degradujú a vstupujú do citrátového cyklu alebo sú jeho súčasťou, získavajú na terapeutickom význame, hlavne pri podávaní vo vysokých dávkach, pretože môžu zmierniť alebo vyliečiť choroby spôsobené kryptogeneticky. Ďalej kyselina fumarová inhibuje rast Ehrlichovho ascitného nádoru u myší, znižuje toxické účinky mitomycínu C a aflatoxínu a vykazuje antilupienkovú a antimikrobiálnu aktivitu.

Najdôležitejším praktickým použitím je liečba lupienky rôznymi derivátmi kyseliny fumarovej, ktorá už bola popísaná v mnohých patentových spisoch, ako napríklad v EP 0 188 479, DE 25 30 372, DE 26 21 214 alebo EP 0 312 697.

Ďalšie použitie určitých derivátov kyseliny fumarovej, konkrétne alkylhydrogénfumarátov, je popísané v DE 19721099.6 a DE 19853487.7. V týchto publikáciách sa popisuje použitie týchto špecifických derivátov kyseliny fumarovej pri liečbe autoimunitných chorôb, ako je polyartritída, roztrúsená skleróza a reakcia štepu proti hostiteľovi. Ďalej v DE 19853487.6 a v DE 19839566.3 je popísané použitie alkylhydrogénfumarátov a dialkylfumarátov v transplantáčnej medicíne. Hoci sa skúmali jednotlivé mechanizmy pôsobenia derivátov kyseliny fumarovej pri liečbe lupienky, neexistujú žiadne špecifické informácie na túto tému.

NF-kappa B (jadrový faktor kappa B) je transkripčný faktor eukaryotických buniek. NF-kappa B patrí do skupiny Rel proteínov, triedy transkripčných faktorov, vyznačujúcich sa tzv. Rel doménou. Rel doména sa pomenovala po prvom členovi nájdenom vo vtáčom víruse, ktorý bol onkogénom. Špecifické miesta tejto homológnej Rel domény (Rel homológna doména = RHD), ktorá sa skladá z 300 aminokyselín, sú zodpovedné za väzbu DNA na miesta kappa B, za dimerizáciu s ďalšími proteínmi Rel skupiny a za interakciu s I-kappa B.

Doteraz je u cicavcov známych 5 členov skupiny Rel. Sú to c-Rel, NF-kappa B1 (p105/p50), NF-kappa B2 (p100/p52) a RelB. Teoreticky sa týchto päť členov skupiny Rel proteínov môže kombinovať do akejkoľvek formy homo- a heterodimérov, hoci in vivo sa pozorovalo len niekoľko špecifických kombinácií. Typická a najlepšie popísaná molekula NF-kappa B je heterodimér p50/p65 podjednotiek NF-kappa B1/RelA. Tento heterodimér je najbežnejším komplexom a nachádza sa prakticky vo všetkých typoch buniek.

Po bunkovej aktivácii a disociácii I-kappa B, NF-kappa B heterodimér p50/p65 migruje do bunkového jadra, kde sa viaže na zodpovedajúcu sekvenciu 5'GGGRNNYYCC-3'. V tomto procese podjednotka p50 predovšetkým slúži ako väzbová podjednotka DNA, zatiaľ čo podjednotka p65 má transaktivačnú funkciu.

V dôsledku týchto odlišných kombinácií každý z týchto heterodimérov vykazuje jedinečné charakteristické vlastnosti, pokiaľ ide o špecificitu bunkového typu, preferencie s ohľadom na DNA väzbu, rozdielnu interakciu s izoformami I-kappa B, rozdielne aktivačné požiadavky a kinetiku aktivácie.

K rýchlej indukovateľnosti NF-kappa B prispieva skutočnosť, že tento faktor je prítomný v cytoplazme v neaktívnej forme, totiž v komplexe naviazanom na inhibítor I-kappa B. Preto na aktiváciu nie je potrebná žiadna nová syntéza proteínu, ale len rozpustenie tohto komplexu s I-kappa B, alebo degradácia tohto inhibítora a následné premiestnenie práve aktívneho diméru NF-kappa B do jadra.

NF-kappa B sa môže aktivovať celým radom fyziologických a nefyziologických stimulov. Medzi ne napríklad patria cytokíny, mitogény, vírusy, produkty vírusov, zosieťovanie receptorov antigénu na T- a B-lymfocytoch, iónofóry vápnika, estery forbolu, UV-žiarenie, oxidačný stres, inhibítory fosfatázy. Rozsah mnohých regulovaných alebo aktivovaných génov prostredníctvom NF-kappa B je tak široký, že jeho transkripcia sa aktivuje, vyvoláva a zosilňuje väzbou heterodiméru na zodpovedajúcu sekvenciu, ako je popísané vyššie. Ako dôležité stimulačné látky sa môžu uviesť hlavne TNF-alfa, IL-1, IL-2 a lipopolysacharidy. Tieto regulačné gény všeobecne obsahujú gény, ktoré sú zapojené do imunitnej funkcie, zápalovej odozvy, adhézie buniek, rastu buniek, ale i odumretia buniek. Najmä by sa mali uviesť gény molekúl adhézie buniek, cytokínov, receptorov cytokínov, proteínov akútnej fázy, rastových faktorov a vírusov. Špeciálne medzi gény indukované NF-kappa B patria gény pre interferón-beta, pre ľahký reťazec imunoglobulínu, pre receptor T-buniek, pre TNF-alfa a TNF-beta a pre tkanivový faktor (CD142), prv nazývaný tkanivový tromboplastín alebo faktor III.

Vďaka jeho centrálnej úlohe pri regulácii imunitných reakcií a zápalových reakcií uvedených vyššie a jeho zapojenia do regulácie tkanivových faktorov, cytokínov, atď. sa predpokladá, že pri vývoji selektívnych inhibítorov transkripcie faktoru NF-kappa B sa môžu čakať podobné výhody ako u už známych protizápalových činidiel. Ako príklady sa môžu menovať protizápalové steroidné činidlá, interferóny alebo cyklosporíny.

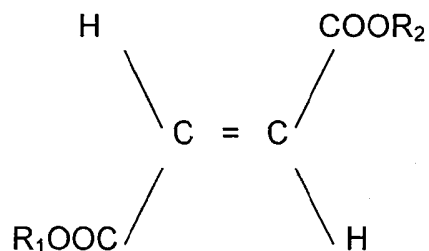
### **Podstata vynálezu**

S prekvapením sa v súčasnosti zistilo, že jednotlivé deriváty kyseliny fumarovej alebo ich zmesi majú inhibičný účinok voči NF-kappa B. Tento účinok sa môže výhodne využiť pri príprave farmaceutického prostriedku obsahujúceho tieto deriváty kyseliny fumarovej buď jednotlivo alebo v zmesi na liečbu chorôb, ktoré sa sprostredkujú alebo môžu byť ovplyvnené NF-kappa B. Medzi choroby, ktoré sa môžu ovplyvniť NF-kappa B, patrí hlavne progresívna generalizovaná sklerodermia, osteochondritída syfilitika (Wegenerova choroba),

cutis marmorata (livedo reticularis), Behcetova choroba, panarteritída, vredovitá kolitída, vaskulitída, osteoartritída, dna, arterioskleróza, Reiterova choroba, pľúcna granulomatóza, druhy encefalitídy, endotoxický šok (septicko – toxický šok), sepsia, pneumónia, encefalomyelitída, anorexia neurosis, hepatitída (akútna hepatitída, chronická hepatitída, toxická hepatitída, alkoholom vyvolaná hepatitída, epidemická hepatitída, žltáčka, zlyhanie činnosti pečene a cytomegalovírusová hepatitída), Rennertova T-lymfomatóza, mezangiálna nefritída, postangioplastická restenóza, reperfúzny syndróm, cytomegalovírusová retinopatia, adenovírusové ochorenia ako sú adenovírusové prechladnutia, faryngokonjunktiválna horúčka a adenovírusová oftalmia, AIDS, Guillian-Barrého syndróm, postherpetická a postzosterová neuralgia, zápalová demyelinizačná polyneuropatia, mononeuropatia multiplex, mukoviscidóza, Bechterewova choroba, Barrettov ezofagus, EBV infekcia (Epstein – Barrov vírus), zmeny srdca, intersticiálna cystitída, diabetes mellitus typu II, rádiosenzibilizácia ľudských nádorov, multirezistencia zhubných buniek k chemoterapeutickým činidlám (rezistencia pri chemoterapii voči viacerým liečivám), kožný granulóm a karcinómy, ako je karcinóm prsníka, karcinóm hrubého čreva, melanóm, karcinóm primárnych pečeneňových buniek, adenokarcinóm, Kaposiho sarkóm, karcinóm prostaty, leukémia ako je akútna myeloidná leukémia, zmnožený myelóm (plazmocytóm), Burkittov lymfóm a Castlemanov nádor.

Podľa tohto vynálezu jeden alebo viacero derivátov kyseliny fumarovej, vybraných zo skupiny pozostávajúcej z dialkylesterov kyseliny fumarovej a monoalkylesterov kyseliny fumarovej vo forme voľnej kyseliny alebo vo forme solí a ich zmesí, sa výhodne použije na inhibíciu NF-kappa B a na prípravu farmaceutického prostriedku.

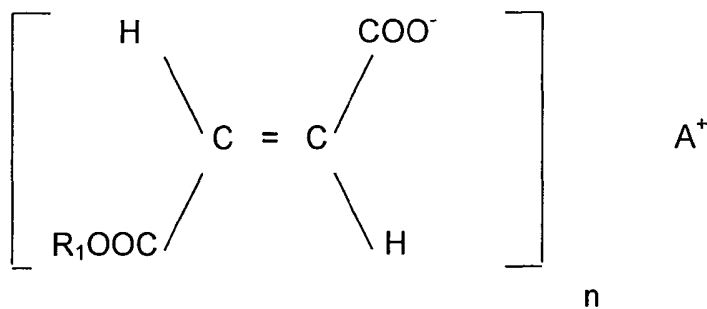
Dialkylestery kyseliny fumarovej výhodne zodpovedajú vzorcu:



kde  $R_1$  a  $R_2$ , ktoré môžu byť rovnaké alebo odlišné, sú nezávisle lineárny, vetvený, cyklický, nasýtený alebo nenasýtený  $C_{1-24}$  alkylový radikál alebo  $C_{5-20}$  arylový radikál a tieto radikály sú prípadne substituované halogénom (F, Cl, Br, I), hydroxyskupinou,  $C_{1-4}$  alkoxyskupinou, nitroskupinou alebo kyanoskupinou.

Radikálmi  $R_1$  a  $R_2$  sú výhodne metyl, etyl, n-propyl, izopropyl, n-butyl, sek.-butyl, terc.-butyl, pentyl, cyklopentyl, 2-etylhexyl, hexyl, cyklohexyl, heptyl, cykloheptyl, oktyl, vinyl, alyl, 2-hydroxyetyl, 2- alebo 3-hydroxypropyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2-metoxyetyl, metoxymetyl alebo 2- alebo 3-metoxypropyl.

Monoalkylestery kyseliny fumarovej výhodne zodpovedajú vzorcu:



kde  $R_1$  je definovaný vyššie, A je vodík, kation alkalického kovu alebo kovu alkalických zemín alebo fyziologicky kompatibilný kation prechodného kovu, výhodne vybraný z  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$ , a n je 1 alebo 2 a zodpovedá mocenstvu A.

Tento vynález výhodne používa jeden alebo viacero derivátov kyseliny fumarovej, vybraných zo skupiny obsahujúcej dimetyléster kyseliny fumarovej, dietyléster kyseliny fumarovej, metyletyléster kyseliny fumarovej, metylhydrogénfumarát, etylhydrogénfumarát, metylfumarát horečnatý, etylfumarát horečnatý, metylfumarát zinočnatý, etylfumarát zinočnatý, metylfumarát železnatý a etylfumarát železnatý, metylfumarát vápenatý a/alebo etylfumarát vápenatý.

Podľa tohto vynálezu sa deriváty kyseliny fumarovej výhodne použijú na prípravu farmaceutického prostriedku v takom množstve, že jedna dávkovacia jednotka tohto farmaceutického prostriedku obsahuje množstvo derivátu/derivátov kyseliny fumarovej zodpovedajúce alebo ekvivalentné 1 až 500 mg, výhodne 10 až 300 mg a najvýhodnejšie 10 až 200 mg kyseliny fumarovej.

Výhodnými formami aplikácie pre tento farmaceutický prostriedok je orálne, parenterálne, rektálne, transdermálne, nazálne, pulmonálne (inhalačné) alebo oftalmické podávanie (vo forme očných kvapiek), výhodné je orálne podávanie. Potom bude tento prostriedok prítomný vo vhodnej forme pre každý typ podávania.

Pri orálnom podávaní je tento farmaceutický prostriedok prítomný vo forme jednotlivých tabliet s jednotkovou dávkou, mikrotabliet (tablety s viacjednotkovými dávkami) alebo minitabliet, mikrogulôčok alebo granúl (tieto mikrotablety, mikrogulôčky alebo granule sú prípadne zakapsulované alebo plnené do obalov), kapsúl alebo roztokov na pitie. Vo výhodnom vyhotovení tuhé dávkovacie alebo aplikované formy sa opatria enterosolventným povlakom. Takýto povlak sa môže tiež naniesť na zakapsulované alebo plnené dávkovacie formy.

V prípade parenterálneho podávania injekcií (intravenózne i.v., intramuskulárne i.m., subkutánne s.c., intraperitoneálne i.p.) je prostriedok prítomný vo vhodnej forme. Na injekcie sa môžu použiť všetky vhodné bežné kvapalné nosiče.

Tento farmaceutický prostriedok môže výhodne obsahovať buď jednotlivo alebo v zmesi: 10 až 500 mg dialkylfumarátu, hlavne dimetylfumarátu a/alebo dietylfumarátu; 10 až 500 mg alkylfumarátu vápenatého, hlavne metylfumarátu vápenatého a/alebo etylfumarátu vápenatého; 0 až 250 mg alkylfumarátu zinočnatého, hlavne metylfumarátu zinočnatého a/alebo etylfumarátu zinočnatého; 0 až 250 mg alkylhydrogénfumarátu, hlavne metylhydrogénfumarátu a/alebo etylhydrogénfumarátu; a 0 až 250 mg alkylfumarátu horečnatého, hlavne metylfumarátu horečnatého a/alebo etylfumarátu horečnatého; súhrnné vyššie uvedené množstvá zodpovedajú ekvivalentu 10 až 500 mg, výhodne 10 až 300 mg a najvýhodnejšie 100 mg kyseliny fumarovej.

Výhodné prostriedky podľa tohto vynálezu obsahujú len dimetylfumarát v množstve 10 až 300 mg.

V obzvlášť výhodnom vyhotovení je tento prostriedok prítomný vo forme mikrotabliet alebo mikrogulôčok. Tieto výhodne majú veľkosť alebo stredný priemer  $\leq 5\ 000\ \mu\text{m}$ , výhodnejšie veľkosť 300 až 2 500  $\mu\text{m}$ , hlavne 300 až 1 000  $\mu\text{m}$  pre gulôčky a 1 000 až 2 500  $\mu\text{m}$  pre mikrotablety. Pri podávaní derivátov kyseliny fumarovej vo forme mikrotabliet, čo je výhodné vyhotovenie podľa tohto vynálezu, sa môže ďalej znížiť gastrointestinálne dráždenie a vedľajšie účinky, ktoré sa nemôžu vylúčiť pri podávaní bežných tabliet s jednotlivou jednotkovou dávkou. To je pravdepodobne spôsobené skutočnosťou, že mikrotablety, výhodne mikrotablety s enterosolventným povlakom, sa už rozptýlili v žalúdku, a preto sa dostávajú do intestinálneho traktu po častiach, kde sa aktívne zložky uvoľňujú miestne v menších dávkach, zatiaľ čo celková dávka zostáva rovnaká. Toto naopak pomáha sa vyhnúť miestnemu dráždeniu epitelových intestinálnych buniek, z čoho vyplýva zlepšená gastrointestinálna tolerancia mikrotabliet v porovnaní s bežnými tabletami.

Deriváty kyseliny fumarovej obsiahnuté v prostriedkoch podľa tohto vynálezu sa pripravujú napríklad spôsobom popísaným v EP 0 312 679.

## **Príprava vzoriek**

Orálne prostriedky podľa tohto vynálezu vo forme tabliet alebo mikrotabliet sa môžu pripraviť klasickými tabletovacími pracovnými postupmi. Okrem týchto klasických tabletovacích pracovných postupov sa môžu použiť ďalšie spôsoby prípravy tabliet, ako je priame tabletovanie a rovnako i spôsoby prípravy tuhých disperzií prostredníctvom tavenia alebo sprejového sušenia.

Tieto tablety sa môžu opatriť enterosolventným povlakom. Tento enterosolventný povlak sa môže nanášať v klasickvej poťahovacej panvici alebo sprejovo. Tento povlak sa môže tiež nanášať v Boegelovom poťahovacom zariadení. Ďalej táto tableta sa môže opatriť tenkým povlakom.

Z dôvodu vysvetlenia použitia tohto vynálezu sú ďalej uvedené rôzne príklady prípravy výhodných liečiv. Tieto príklady objasňujú, ale neobmedzujú tento vynález.

## **Príklady uskutočnenia vynálezu**

### **Príklad 1**

Príprava tenkých tabliet s enterosolventným povlakom obsahujúcich 100,0 mg vápenatej soli monometylfumarátu, čo zodpovedá 78 mg kyseliny fumarovej

Za dodržania nevyhnutných bezpečnostných opatrení (ochranná maska, rukavice, ochranný odev, atď.) sa 10 kg vápenatej soli monometylfumarátu rozdrvilo, intenzívne premiešalo a homogenizovalo s použitím sita 800. Potom sa pripravila zmes vehikula s nasledujúcim zložením: 21 kg derivátu škrobu (STA-RX 1500®), 2 kg mikrokryštalickej celulózy (Avicel PH 101®), 0,6 kg polyvinylpyrolidónu (PVP, Kollidon® 25), 4 kg Primogel®, 0,3 kg koloidnej kyseliny ortokremičitej (Aerosil®).

K úplnej práškovej zmesi sa pridala aktívna zložka, zmes sa miešala, homogenizovala s použitím sita 200 a spracovala s 2 % vodným roztokom polyvinylpyrolidónu (PVP, Kollidon® 25) bežným spôsobom do spojivových granúl, ktoré sa potom miešali s vonkajšou fázou v suchom stave. Táto fáza pozostávala z 2 kg tzv. FST komplexu obsahujúceho 80 % mastenca, 10 % kyseliny ortokremičitej a 10 % stearátu horečnatého.

Potom sa táto zmes lisovala bežným spôsobom do vypuklých tabliet s hmotnosťou 400 mg a priemerom 10,0 mm. Namiesto týchto klasických spôsobov lisovania sa môžu tiež na prípravu tabliet použiť ďalšie spôsoby, ako je priame lisovanie alebo príprava tuhých disperzií pomocou tavenia a sprejového sušenia.

### **Enterosolventný povlak**

Roztok 2,250 kg ftalátu hydroxypropylmetylcelulózy (HPMCP, Pharmacoat HP® 50) sa rozpustil v zmesi rozpúšťadiel skladajúcej sa z 2,50 l demineralizovanej vody, 13 l acetónu Ph. Helv. VII a 13 l etanolu (94 hmotn. %), potom sa k tomuto roztoku pridalo 0,240 kg ricínového oleja (Ph. Eur. II). Tento roztok sa naliať alebo rozprašoval po častiach na jadrá tabliet bežným spôsobom v poťahovacej panvici alebo nanášal v zariadení s vhodnou konštrukciou s fluidnou vrstvou.

Po sušení sa naniesol tenký povlak. Tento povlak sa skladal z roztoku Eudragitu E 12,5 %, 4,8 kg, mastenca Ph. Eur. II 0,34 kg, oxidu titánového Cronus RN 56® 0,52 kg, farebného laku ZLT-2 blue (Siegle) 0,21 kg a polyetylén glykolu 6000 Ph. Helv. VII 0,12 kg v zmesi rozpúšťadiel skladajúcej sa z 8,2 kg 2-propanolu Ph. Helv. VII, 0,06 kg glyceroltriacetátu (Triacetín®) a 0,2 kg demineralizovanej vody. Po homogénnej distribúcii v poťahovacej panvici alebo vo fluidnej vrstve sa zmes sušila a leštila zvyčajným spôsobom.

## Príklad 2

Príprava enterosolventných kapsúl obsahujúcich 86,5 mg vápenatej soli monoetylfumarátu a 110,0 mg dimetylfumarátu, čo zodpovedá celkovému množstvu 150 mg kyseliny fumarovej

Za dodržania nevyhnutných bezpečnostných opatrení (ochranná maska, rukavice, ochranný odev, atď.) sa 8,65 kg vápenatej soli monometylfumarátu a 11 kg dimetylfumarátu intenzívne zmiešalo so zmesou skladajúcou sa z 15 kg škrobu, 6 kg laktózy Ph. Helv. VII, 2 kg mikrokryštalickej celulózy (Avicel®), 1 kg polyvinylpyrolidónu (Kollidon® 25) a 4 kg Primogel® a homogenizovalo za použitia sita 800.

Spoločne s 2 % vodným roztokom polyvinylpyrolidónu (Kollidon® 25) sa celá prášková zmes spracovala bežným spôsobom do spojivových granúl a zmiešala s vonkajšou fázou v suchom stave. Táto vonkajšia fáza sa skladala z 0,35 kg koloidnej kyseliny ortokremičitej (Aerosil®), 0,5 kg stearátu horečnatého, 1,5 kg mastenca Ph. Helv. VII. Táto homogénna zmes sa potom plnila v dávkach 500,0 mg do vhodných kapsúl, ktoré sa potom potiahli známym spôsobom enterosolventným povlakom (odolným voči žalúdočnej kyseline), skladajúcim sa zo stearátu hydroxypropyletylcelulózy a ricínového oleja ako zvláčňovadla. Okrem tvrdých želatínových kapsúl sa zmes môže tiež plniť do vhodných kapsúl odolných voči žalúdočnej kyseline, ktoré sa skladajú zo zmesi acetátftalátu celulózy (CAP) a ftalátu hydroxypropyletylcelulózy (HPMCP).

## Príklad 3

Príprava mikrotabliet s enterosolventným povlakom v kapsulách obsahujúcich 87,0 mg vápenatej soli monoetylfumarátu, 120 mg dimetylfumarátu, 5,0 mg horečnatej soli monoetylfumarátu a 3,0 mg zinočnatej soli monoetylfumarátu, čo zodpovedá celkovo 164 mg kyseliny fumarovej („forte„ tablety)

Za dodržania nevyhnutných bezpečnostných opatrení (ochranná maska, rukavice, ochranný odev, atď.) sa rozdrvilo 8,7 kg vápenatej soli monoetylfumarátu, 12 kg dimetylfumarátu, 0,5 kg horečnatej soli monoetylfumarátu a 0,3 kg zinočnatej soli monoetylfumarátu, zmes sa potom následne intenzívne premiešala a homogenizovala s použitím sita 800. Potom sa pripravila zmes vehikula s nasledujúcim zložením: 18 kg derivátu škrobu (STA-RX 1500), 0,3 kg mikrokryštalickej celulózy (Avicel PH 101), 0,75 kg PVP (Kollidon 120), 4 kg Primogel, 0,25 kg koloidnej kyseliny ortokremičitej (Aerosil). K úplnej práškovej zmesi sa pridala aktívna zložka zmesi, zmes sa homogenizovala s použitím sita 200 a spracovala bežným spôsobom s 2 % vodným roztokom polyvinylpyrolidónu (Kollidon K25) za vzniku spojivových granúl, ktoré sa potom miešali v suchom stave s vonkajšou fázou, ktorá sa skladala z 0,5 kg stearátu horečnatého a 1,5 kg mastenca. Potom sa táto prášková zmes lisovala bežným spôsobom do vypuklých mikrotabliet s celkovou hmotnosťou 10 mg a priemerom 2,0 mm. Namiesto týchto klasických spôsobov lisovania sa môžu tiež na prípravu tabliet použiť ďalšie spôsoby, ako je priame lisovanie alebo príprava tuhých disperzií pomocou tavenia a sprejového sušenia.

Povlak odolný voči žalúdočnej kyseline sa môže naliať alebo rozprašovať v klasickej poťahovacej panvici alebo nanášať v zariadení s fluidnou vrstvou. Z dôvodu dosiahnutia odolnosti voči žalúdočnej kyseline sa podiely roztoku ftalátu hydroxypropylmetylcelulózy (HPMCP, Pharmacoat HP50, celkovo 2,250 kg) rozpustili v zmesi nasledujúcich rozpúšťadiel: 13 l acetónu, 13,5 l etanolu (94 hmotn. %, denaturovaný 2 % ketónom), 2,5 l demineralizovanej vody. Kvôli konečnej úprave roztoku sa pridalo 0,240 kg ricínového oleja ako zvláčňovadla a roztok sa po častiach nanášal bežným spôsobom na jadrá tabliet.

Tenký povlak: Po skončení sušenia sa suspenzia nasledujúceho zloženia nanášala ako tenký povlak v rovnakom zariadení: 0,340 kg mastenca, 0,4 kg oxidu titánového Cronus RN56, 0,324 kg farebného laku červený lak 86837, 4,8 kg 12,5 % Eudragitu E a 0,12 kg polyetylén glykolu 6000 pH 11 XI v zmesi rozpúšťadiel nasledujúceho zloženia: 8,17 kg 2-propanolu, 0,2 kg demineralizovanej vody a 0,6 kg glyceroltriacetátu (Triacetín).

Mikrotablety odolné voči žalúdočnej kyseline sa potom plnili do tvrdých želatínových kapsúl s hmotnosťou obsahu 500,0 mg a uzatvorili.

#### **Príklad 4**

Príprava mikrotableti s enterosolventným povlakom v kapsulách obsahujúcich 120,0 mg dimetylfumarátu, čo zodpovedá 96 mg kyseliny fumarovej

Za dodržania nevyhnutných bezpečnostných opatrení (ochranná maska, rukavice, ochranný odev, atď.) sa 12 kg dimetylfumarátu rozdrvilo a homogenizovalo s použitím sita 800. Potom sa pripravila zmes vehikula s nasledujúcim zložením: 17,5 kg derivátu škrobu (STA-RX 1500®), 0,30 kg mikrokryštalickej celulózy (Avicel PH 101®), 0,75 kg PVP (Kollidon® 120), 4 kg Primogel®, 0,25 kg koloidnej kyseliny ortokremičitej (Aerosil®). K úplnej práškovej zmesi sa pridala aktívna zložka, zmes sa miešala, homogenizovala s použitím sita 200 a spracovala bežným spôsobom s 2 % vodným roztokom polyvinylpyrolidónu (Kollidon® 25) za vzniku spojivových granúl, ktoré sa potom miešali s vonkajšou fázou v suchom stave. Vonkajšia fáza sa skladala z 0,5 kg stearátu horečnatého a 1,5 kg mastenca.

Potom sa táto prášková zmes lisovala bežným spôsobom do vypuklých mikrotableti s celkovou hmotnosťou 10 mg a priemerom 2,0 mm.

Kvôli dosiahnutiu odolnosti voči žalúdočnej kyseline sa roztok ftalátu hydroxypropylmetylcelulózy (HPMCP, Pharmacoat HP® 50, celkovo 2,250 kg) rozpustil v zmesi nasledujúcich rozpúšťadiel: 13 l acetónu, 13,5 l etanolu (94 hmotn. %, denaturovaný 2 % ketónom), 1,5 l demineralizovanej vody. Kvôli konečnej úprave roztoku sa pridalo 0,24 kg ricínového oleja ako zvláčňovadla a roztok sa po častiach nanášal bežným spôsobom na jadrá tableti.

Po sušení sa v rovnakom zariadení naniesol tenký povlak suspenzie nasledujúceho zloženia: 0,34 kg mastenca, 0,4 kg oxidu titaničitého Cronus RN 56®, 0,324 kg farebného laku L-red 86837, 4,8 kg Eudragit® E 12,5 % a 0,12 kg polyetylénglykolu 6000 pH 11 XI v zmesi rozpúšťadiel nasledujúceho zloženia: 8,17 kg 2-propanolu, 0,2 kg demineralizovanej vody a 0,06 kg glyceroltriacetátu (Triacetin®).

Mikrotablety s enterosolventným povlakom sa potom plnili do tvrdých želatínových kapsúl s hmotnosťou obsahu 400,0 mg a uzatvorili.

### **Příklad 5**

Príprava mikrotableti s enterosolventným povlakom v kapsulách obsahujúcich 120,0 mg dimetylfumarátu, čo zodpovedá 96 mg kyseliny fumarovej

12 kg dimetylfumarátu sa rozdrvilo a homogenizovalo, ako je popísané vyššie. Potom sa pripravila zmes vehikula nasledujúceho zloženia: 23,2 kg mikrokryštalickej celulózy (Avicel PH 200®), 3 kg natriumkroskarmelózy (AC-Si-SOL-SD-711), 2,5 kg mastenca, 0,1 kg bezvodéj kyseliny ortokremičitej (Aerosil® 200) a 1 kg stearátu horečnatého. Potom sa táto prášková zmes lisovala bežným spôsobom do vypuklých tableti majúcich celkovú hmotnosť 100 mg a priemer 2,0 mm.

Následne sa pripravil roztok 0,94 kg Eudragit® L v 2-propanole, pričom tento roztok ďalej obsahoval 0,07 kg dibutylftalátu. Tento roztok sa sprejovo nanášal na jadrá tableti. Následne sa pripravila disperzia 17,32 kg Eudragit® L D-55 a zmes 2,8 kg mikročasticového mastenca, 2,0 kg Makrogol 6000 a 0,07 kg dimetikónu vo vode. Táto zmes sa nanášala na jadrá tableti.

Mikrotablety s enterosolventným povlakom sa potom plnili do tvrdých želatínových kapsúl s hmotnosťou obsahu 650 mg a uzatvorili.

## Príklad 6

### Translokácia NF-kappa B do bunkového jadra

NF-kappa B (p65) sa vložil do vektoru pEGFP-C1, ktorý obsahoval EGFP (zelený fluoreskujúci proteín) spojený s promótorom cytomegalovírusu (Clontech). To vedie k expresii fluoreskujúceho NF-kappa B. HUVEC bunky sa preniesli na kultivačné dosky (Costar) s 12 jamkami potiahnutými želatínou medzi 3. až 5. pasážou a kultivovali sa do súvislého nárastu z 80 alebo 90 %. Potom sa tieto bunky vystavili transfekcii s použitím precipitačnej metódy s fosforečnanom vápenatým. Konkrétne sa tieto bunky kondicionovali v Dulbekovom modifikovanom Eaglesovom médiu (DMEM), po 24 hodinách sa pridal precipitát do každej jamky s obsahom 1  $\mu$ g DNA a bunky sa inkubovali ďalšie 4 hodiny. Po premytí HBSS (Hankovým vyváženým soľným roztokom) sa k bunkám pridalo kultivačné médium a bunky sa kultivovali ďalších 18 hodín pred ich stimuláciou.

Kvôli experimentom sa bunky kondicionovali so 40  $\mu$ M/dimetylfumarátom, súčasne sa ako kontroly inkubovali preparáty bez DNA. 2 hodiny po zahájení kondicionovania sa bunky stimulovali 10 ng/ml TNF-alfa po dobu uvedenú v tabuľke 1.

Potom sa bunky lyzovali, supernatant sa odstránil a bunkové jadrá sa zhromažďovali v Dounceovom pufre s inhibítorom proteínázy (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ g/ml leupeptín, 10  $\mu$ g/ml aprotinín, 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid, 1,8 mg/ml jódacetamid). Po 10 minútach odstredenia pri 1200 G a teplote 4 °C sa bunkové jadrá analyzovali na cytometri FACscanflow (Becton Dickinson).

Tabuľka 1 Počet pozitívnych jadier NF-kappa B (p65) (percento všetkých buniek vystavených transfekcii s NF-kappa B)

Doba stimulácie	Kontrola	DMF (40 $\mu$ M/l, n = 3)
0 min.	30 $\pm$ 3	29 $\pm$ 5
10 min.	61 $\pm$ 5	20 $\pm$ 4
30 min.	50 $\pm$ 6	25 $\pm$ 6
60 min.	55 $\pm$ 10	24 $\pm$ 9

Výsledky uvedené v tabuľke 1 ukazujú, že dimetylfumarát pri koncentrácii 40  $\mu$ M/l inhiboval TNF-vyvolanú translokáciu NF-kappa B do bunkového jadra.

### Príklad 7

#### Inhibícia transkripcie stimulovanej NF-kappa B

Trojnásobné opakovanie AP-1 konvenčného miesta (väzbového miesta) (48 bp, 3 x TGTGA-TGACTCAGGTT) a trojnásobné opakovanie NF-kappa B konvenčného miesta (60 bp, 3 x AATCGTGAATTCCTCTGA), ohraničené Spel väzbovými miestami (neznázornené) sa vložili do Spel miesta pTK-UBT-luc vektoru (de Martin, Gene, 124, 137 – 138, 1993). Konštrukt 1,3 kb promotóra E-selektínu v rozsahu od bp - 1285 do bp + 482 sa vložil do NdeI miesta pMAN Neo-luc vektoru (Clontech).

HUVEC bunky sa podrobili transfekcii s konštruktmi získanými spôsobom popísaným v príklade 6. Pre túto transfekciu sa pridalo do každej jamky 2,5  $\mu$ g príslušného promotórového konštrukt. Z dôvodu overenia účinnosti transfekcie sa vykonávali súčasne transfekcie s 500 ng pSV-beta kontrolného vektoru galaktozidázy (Promega Corp., Madison, WI, USA) ako kontrola ku každému

experimentu. Dva dni po transfekcii sa bunky stimulovali po dobu 2 hodiny s 10 ng/ml TNF-alfa s a bez prídavku 6  $\mu$ g/ml dimetylfumarátu (DMF). Bunky sa zozbierali trypsináciou, peletizovali, premyli a resuspendovali v 200  $\mu$ l pufra („reporter lysis buffer,“) (Promega) po dobu 15 minút, ako uvádza výrobca.

Luciferázová aktivita sa merala pomocou luminometra Berthold AutoLumat LB9507 s použitím testovacieho systému pre luciferázu (Promega). Beta-galaktosidázová aktivita sa stanovila s použitím enzymatického testovacieho systému pre beta-galaktosidázu Promega. Luciferázové aktivity získané s príslušnými promótorovými konštruktmi sa normalizovali na beta-galaktosidázovú aktivitu. Variantná šírka beta-galaktosidázovej aktivity u jednotlivých pokusov bola nižšia ako 10 %. Tabuľka 2 ukazuje jednotlivé výsledky ako x-násobky oproti základnej línii.

Tabuľka 2 Zvýšenie transkripcie; Relatívne zvýšenie luciferázovej aktivity (merané ako x-násobok zvýšenia oproti základnej línii) po stimulácii TNF (10 ng/ml) s alebo bez 40  $\mu$ M/l dimetylfumarátu (DMF), n = 6

Podmienky	NF-kappa B	AP-1
TNF	2 $\pm$ 3	2,2 $\pm$ 0,5
TNF + DMF	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0,1

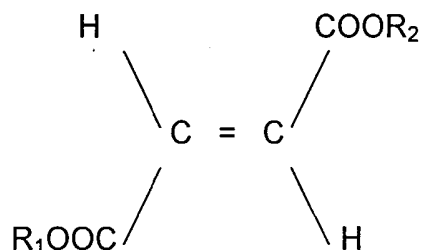
Výsledky v tabuľke 2 ukazujú, že dimetylfumarát inhiboval TNF indukovanú transkripciu NF-kappa B dependentného génu, ale nie transkripciu AP-1 dependentného génu. Preto inhibícia dimetylfumarátom je špecifická pre NF-kappa B.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie jedného alebo viacerých derivátov kyseliny fumarovej na prípravu farmaceutického prostriedku na liečbu ochorení, ktoré sa môžu ovplyvniť NF-kappa B.

2. Použitie podľa nároku 1, **vyznačujúce sa tým**, že derivát kyseliny fumarovej je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z dialkylesterov kyseliny fumarovej a monoalkylesterov kyseliny fumarovej, ktoré môžu byť prípadne substituované, vo forme voľnej kyseliny alebo jej solí a jej zmesí.

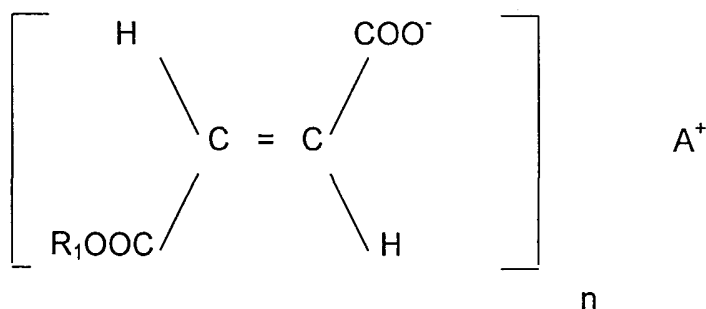
3. Použitie podľa nároku 2, kde dialkylester kyseliny fumarovej zodpovedá vzorcu:



kde  $R_1$  a  $R_2$ , ktoré môžu byť rovnaké alebo odlišné, sú nezávisle lineárny, vetvený, cyklický, nasýtený alebo nenasýtený  $C_{1-24}$  alkylový radikál alebo  $C_{5-20}$  arylový radikál a tieto radikály sú prípadne substituované halogénom (F, Cl, Br, I), hydroxyskupinou,  $C_{1-4}$  alkoxyskupinou, nitroskupinou alebo kyanoskupinou.

4. Použitie podľa niektorého z nárokov 2 a 3, **vyznačujúce sa tým**, že radikálmi  $R_1$  a  $R_2$  sú metyl, etyl, n-propyl, izopropyl, n-butyl, sek.-butyl, terc.-butyl, pentyl, cyklopentyl, 2-ethylhexyl, hexyl, cyklohexyl, heptyl, cykloheptyl, oktyl, vinyl, alyl, 2-hydroxyetyl, 2- alebo 3-hydroxypropyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2-metoxyetyl, metoxymetyl alebo 2- alebo 3-metoxypropyl.

5. Použitie podľa nároku 2, kde monoalkylester kyseliny fumarovej zodpovedá vzorcu:



kde:

$R_1$  je definovaný rovnako ako v nárokoch 3 alebo 4,

A je vodík, kation alkalického kovu alebo kovu alkalických zemín alebo fyziologicky kompatibilný kation prechodného kovu, výhodne vybraný z  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$ , a

n je 1 alebo 2 a zodpovedá mocenstvu A.

6. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, **vyznačujúce sa tým**, že derivátom kyseliny fumarovej je jedna alebo viacero zlúčenín vybraných zo skupiny obsahujúcej dimetylester kyseliny fumarovej, dietylester kyseliny fumarovej, metyletylester kyseliny fumarovej, metylhydrogénfumarát, etylhydrogénfumarát, metylfumarát vápenatý, etylfumarát vápenatý, metylfumarát horečnatý, etylfumarát horečnatý, metylfumarát zinočnatý, etylfumarát zinočnatý, metylfumarát železnatý a etylfumarát železnatý a ich zmesi.

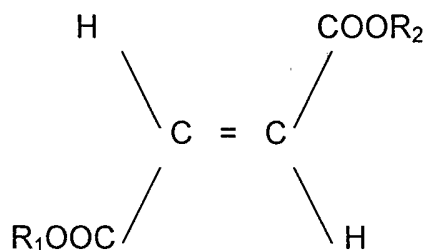
7. Použitie podľa nároku 6, **vyznačujúce sa tým**, že derivátom kyseliny fumarovej je dimetylester kyseliny fumarovej (dimetylfumarát).

8. Použitie jedného alebo viacerých derivátov kyseliny fumarovej na prípravu farmaceutického prostriedku na liečbu chorôb, ktoré sa môžu ovplyvniť NF-kappa B, vybraných zo skupiny zahrňujúcej:

progresívnu generalizovanú sklerodermiu, osteochondritídu syfilitika (Wegenerova choroba), cutis marmorata (livedo reticularis), Behcetovu chorobu, panarteritídu, vredovitú kolitídu, vaskulitídu, osteoartritídu, dnu, arteriosklerózu, Reiterovu chorobu, pľúcnu granulomatózu, druhy encefalitídy, endotoxický šok (septicko – toxický šok), sepsiu, pneumóniu, encefalomyelitídu, anorexiu neurosis, hepatitídu (akútnu hepatitídu, chronickú hepatitídu, toxickú hepatitídu, alkoholom vyvolanú hepatitídu, epidemickú hepatitídu, žltacku, zlyhanie činnosti pečene a cytomegalovírusovú hepatitídu), Rennertovu T-lymfomatózu, mezangiálnu nefritídu, postangioplastickú restenózu, reperfúzny syndróm, cytomegalovírusovú retinopatiu, adenovírusové ochorenia ako sú adenovírusové prechladnutia, adenovírusová faryngokonjunktiválna horúčka a adenovírusová oftalmia, AIDS, Guillain-Barrého syndróm, postherpetickú a postzosterovú neuralgiu, zápalovú demyelinizačnú polyneuropatiu, mononeuropatiu multiplex, mukoviscidózu, Bechterewovu chorobu, Barrettov ezofagus, EBV infekcie (Epstein – Barrov vírus), zmeny srdca, intersticiálnu cystitídu, diabetes mellitus typu II, rádiosenzibilizáciu ľudských nádorov, multirezistenciu zhubných buniek k chemoterapeutickým činidlám (rezistencia pri chemoterapii voči viacerým liečivám), kožný granulóm a karcinómy, ako je karcinóm prsníka, karcinóm hrubého čreva, melanóm, karcinóm primárnych pečňových buniek, adenokarcinóm, Kaposiho sarkóm, karcinóm prostaty, leukémiu ako je akútna myeloidná leukémia, zmnožený myelóm (plazmocytóm), Burkittov lymfóm a Castlemanov nádor.

9. Použitie podľa nároku 8, **vyznačujúce sa tým**, že derivát kyseliny fumarovej je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z dialkylesterov kyseliny fumarovej a monoalkylesterov kyseliny fumarovej vo forme voľnej kyseliny alebo soli alebo jej zmesí.

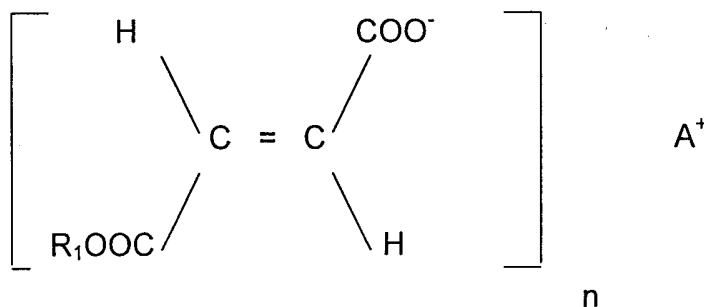
10. Použitie podľa nároku 9, kde dialkylester kyseliny fumarovej zodpovedá vzorcu:



kde  $R_1$  a  $R_2$ , ktoré môžu byť rovnaké alebo odlišné, sú nezávisle lineárny, vetvený, cyklický, nasýtený alebo nenasýtený  $C_{1-24}$  alkylový radikál alebo  $C_{5-20}$  aryllový radikál a tieto radikály sú prípadne substituované halogénom (F, Cl, Br, I), hydroxyskupinou,  $C_{1-4}$  alkoxyskupinou, nitroskupinou alebo kyanoskupinou.

11. Použitie podľa niektorého z nárokov 9 a 10, **vyznačujúce sa tým**, že radikálmi  $R_1$  a  $R_2$  sú metyl, etyl, n-propyl, izopropyl, n-butyl, sek.-butyl, terc.-butyl, pentyl, cyklopentyl, 2-etylhexyl, hexyl, cyklohexyl, heptyl, cykloheptyl, oktyl, vinyl, alyl, 2-hydroxyetyl, 2- alebo 3-hydroxypropyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2-metoxyetyl, metoxymetyl alebo 2- alebo 3-metoxypropyl.

12. Použitie podľa nároku 9, kde monoalkylester kyseliny fumarovej zodpovedá vzorcu:



kde:

$R_1$  je definovaný rovnako ako v nárokoch 3 alebo 4,

A je vodík, kation alkalického kovu alebo kovu alkalických zemín alebo fyziologicky kompatibilný kation prechodného kovu, výhodne vybraný z  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  a  $Mn^{2+}$ , a

n je 1 alebo 2 a zodpovedá mocenstvu A.

13. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 8 až 12, **vyznačujúce sa tým**, že jedna dávkovacia jednotka farmaceutického prostriedku obsahuje množstvo derivátu/ derivátov kyseliny fumarovej zodpovedajúce 1 až 500 mg, výhodne 10 až 300 mg a najvýhodnejšie 10 až 200 mg kyseliny fumarovej.

14. Použitie podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov 8 až 13 na prípravu farmaceutického prostriedku na orálne, parenterálne, rektálne, transdermálne, dermálne, nazálne, pulmonálne (inhalačné) alebo oftalmické podávanie, výhodne na orálne podávanie.

15. Použitie podľa nároku 14, kde farmaceutický prostriedok na orálne podávanie je prítomný vo forme tabliet s jednotkovou dávkou, mikrotabliet, mikrogulôčok alebo granulátu (tieto mikrotablety, mikrogulôčky alebo granuláty sú prípadne zakapsulované alebo plnené do obalov), kapsúl alebo roztokov na pitie.

16. Použitie podľa nároku 15, **vyznačujúce sa tým**, že tuhé dávkovacie formy sa opatria enterosolventným povlakom.

17. Použitie podľa nároku 8, **vyznačujúce sa tým**, že dávkovacie jednotky farmaceutického prostriedku výhodne obsahujú buď jednotlivo alebo v prímеси:

10 až 500 mg dialkylfumarátu, hlavne dimetylfumarátu a/alebo dietylfumarátu;

10 až 500 mg alkylfumarátu vápenatého, hlavne metylfumarátu vápenatého a/alebo etylfumarátu vápenatého;

0 až 250 mg alkylfumarátu zinočnatého, hlavne metylfumarátu zinočnatého a/alebo etylfumarátu zinočnatého;

0 až 250 mg alkylhydrogénfumarátu, hlavne metylhydrogénfumarátu a/alebo etylhydrogénfumarátu; a

0 až 250 mg alkylfumarátu horečnatého, hlavne metylfumarátu horečnatého a/alebo etylfumarátu horečnatého,

súhrnné vyššie uvedené množstvá zodpovedajú ekvivalentu 10 až 500 mg, výhodne 10 až 300 mg a najvýhodnejšie 100 mg kyseliny fumarovej.

18. Použitie podľa niektorého z nárokov 15 alebo 16, **vyznačujúce sa tým**, že prostriedok je prítomný vo forme mikrotabliet alebo mikrogulôčok majúcich veľkosť  $\leq 5\ 000\ \mu\text{m}$ , výhodne veľkosť 300 až  $1\ 000\ \mu\text{m}$  pre gulôčky a 1 000 až  $2\ 500\ \mu\text{m}$  pre mikrotablety.