

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **107829 A**
7(51) A 61 K 31/194, 31/225
A 61 P 1/04,
1/16, 9/00,
11/00, 13/12,
17/00, 19/02,
19/06, 31/00, 35/00

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 107829
(22) Заявено на 20.05.2003
(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 10101307 (32) 12.01.2001 (33) DE

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 12 на 31.12.2004
(45) Отпечатано на
(46) Публикувано в бюлетин №
на
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
FUMAPHARM AG, MURI (CH)

(72) Изобретател(и):
Rajendra Kumar Joshi, Zurich
Hans-Peter Strebler, Luzern (CH)
Peter Petzelbauer, Wien (AT)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Олга Русева Сиракова,
1113 София, ул."Ген. Щерю Атанасов" 5

(86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/EP2002/000108, 08.01.2002

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO2002/055067, 18.07.2002

(54) ПРОИЗВОДНИ НА ФУМАРОВАТА КИСЕЛИНА КАТО NF- χ B ИНХИБИТОР

(57) Изобретението се отнася до използването на едно или повече производни на фумаровата киселина като NF- χ B инхибитор и до прилагането на производните на фумаровата киселина за приготвяне на фармацевтичен състав за лечение на заболявания, които могат да бъдат повлияни от NF- χ B.

16 претенции

BG 107829 A

**Производни на фумаровата киселина като NF-капаВ
инхибитор**

Настоящото изобретение се отнася за използването на едно или повече производни на фумаровата киселина като NF-капаВ инхибитор. В същото време, настоящето изобретение се отнася за използването на производните на фумаровата киселина за приготвяне на фармацевтичен състав за лечение на заболявания, които могат да бъдат повлияни от NF-капаВ.

Известно е, че фармацевтични препарати, такива като фумаровата киселина, които при биологично разграждане след приложение навлизат в цикъла на лимонената киселина, или са производна част, водеща до нарастване терапевтичното значение, тъй като те могат да облекчат или да лекуват заболявания, причинени криптогенно. Освен това, фумаровата киселина инхибира растежа на асцитния тумор на Ehrlich при мишки, намалява токсичните ефекти на митомицин С и афлатоксин и проявява противопсориазна и антимикробна активност.

Най-важното практическо приложение е лечението на псориазис с различни производни на фумаровата киселина, които вече са описани в редица патенти, например EP 0 188 479, DE 25 30 372, DE 26 21 214 или EP 0 312 697.

Друго приложение на определени производни на фумаровата киселина, а именно на алкилводородните фумарати, е разкрито в DE 197 21 099.6 и DE 198 53 487.6, съгласно които тези специфични производни на фумаровата киселина са описани за лечение на автоимунни заболявания, такива като полиартрит, множествена склероза и реакция на отхвърляне на трансплантанта. Освен това, DE 198 53 487.6 и DE 198 39 566.3 предава приложението на алкилводородни фумарати и диалкилни фумарати в трансплантационната медицина. Въпреки че са

извършени индивидуални изследвания на механизма на действие на производни на фумаровата киселина при лечението на псориазис, не съществува специфична информация по този въпрос.

NF-капаВ (ядрен фактор капаВ) е фактор на транскрипция на еукариотни клетки. NF-капаВ принадлежи на фамилията на Rel белтъци, клас на фактори на транскрипция, характеризиращ се с така наречения Rel домен. Rel доменът е наречен на името на първия член, открит в пилешки вирус като онкоген. Специфични участъци на този хомоложен Rel домен (Rel хомоложен домен = RHD), който се състои от 300 аминокиселини, са отговорни за свързването на DNA към капаВ участъци, димеризацията с други белтъци на Rel фамилията и взаимодействието с I-капаВ.

Досега са известни пет члена на Rel фамилията при бозайници. Това са c-Rel, NF-капаВ1 (p105/p50), NF-капаВ2 (p100/p52) и RelB. На теория, тези пет члена на Rel белтъчната фамилия могат да се комбинират в различни форми на хомо и хетеродимери, макар че само няколко специфични комбинации са наблюдавани *in vivo*. Класическата и най-добре характеризирана NF-капаВ молекула е хетеродимер на p50/p65 подгрупи NF-капаВ1/RelA. Този хетеродимер е най-честия комплекс и е открит на практика във всички видове клетки.

След клетъчната активация и дисоциацията на I-капаВ, NF-капаВ хетеродимер p50/p65 мигрира в клетъчното ядро, където се свързва с установената последователност 5'-GGGRNNYYCC-3'. В този процес, p50 подгрупата първоначално служи като DNA-свързващата подгрупа, докато p65 подгрупата изпълнява трансактивираща функция.

В резултат на различните комбинации, всеки от тези хетеродимери проявява уникални качества, които се отнасят за

специфичността на типа клетка, с предпочитание по отношение на DNA-свързване, характерно взаимодействие с I-капаВ изоформи, изисквания за характерно активиране и кинетиката на активиране.

Бързото въвеждане на NF-капаВ се дължи на факта, че факторът съществува в цитоплазмата в неактивна форма, а именно в комплекс, свързан с NF-капаВ инхибитор I-капаВ. Поради това, не е необходим нов белтъчен синтез за активиране, а само разтвора на този комплекс с I-капаВ или разграждането на този инхибитор и последваща транслокация на вече активния NF-капаВ димер в ядрото.

NF-капаВ може да бъде активен посредством различни физиологични и нефизиологични стимули. Те включват цитокини, митогени, вируси, вирусни продукти, кръстосаното свързване на антигенови рецептори върху Т- и В-лимфоцити, калциеви йонофори, форбол естери, УВ лъчи, окислителен стрес, фосфатазни инхибитори и други. Обсегът на многото NF-капаВ регулирани или активирани гени е просто като граница, транскрипцията на които се активира, индуцира или усилва чрез свързването на хетеродимера към последователността, както е описано по-горе. Като особено важни стимуланти могат да се споменат TNF-алфа, IL-1, IL-2 и липополизахариди.

Регулираните гени като цяло се състоят от гени, които въвличат имунната функция, възпалителния отговор, клетъчната адхезия, клетъчния растеж, но също така и клетъчната смърт. Гените на клетъчно адхезивните молекули, цитокини, цитокинови рецептори, острофазови белтъци, растежни фактори и вирусни гени трябва особено да бъдат споменати. Сред гените, индуцирани от NF-капаВ, специални са гените за интерферон- β , за леката верига на имуноглобулина, за Т-клетъчния рецептор, за

TNF- α и TNF- β и за тъканния фактор (CD 142), наричан по-рано тъканен тромбопластин или фактор III.

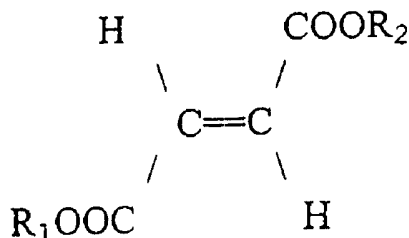
Вследствие своята централна роля в регулацията на имунните реакции и възпалителните отговори, показани по-горе, и своето въвличане в регулацията на тъканните фактори, цитокини и др., се прие, че предимства, подобни на известните вече от противовъзпалителните средства, могат да се очакват от развитието на селективни инхибитори за фактора NF- κ B на транскрипция. Като примери могат да бъдат дадени стероидни противовъзпалителни средства, интерферони или циклоспорин.

Неочаквано, сега бе установено, че индивидуални производни на фумаровата киселина или техни смеси имат NF- κ B инхибиращ ефект. Този ефект може да се използва за приготвяне на фармацевтичен състав, съдържащ тези производни на фумаровата киселина индивидуално или в добавка за лечение на заболявания, които могат да бъдат повлияни от NF- κ B. В частност, заболявания, които могат да бъдат повлияни от NF- κ B са прогресивна системна склеродермия, сифилистичен остеохондрит (болест на Wegener), мраморирана кожа (*livedo reticularis*), болест на Behcet, панартерит, язвен колит, васкулит, остеоартрит, подагра, атеросклероза, болест на Reiter, белодробна грануломатоза, видове енцефалит, ендотоксичен шок (септикотоксичен шок), сепсис, пневмония, енцефаломиелит, анорексия невроза, хепатит (остър хепатит, хроничен хепатит, токсичен хепатит, алкохолно предизвикан хепатит, вирусен хепатит, жълтеница, чернодробна недостатъчност и цитомегаловирусен хепатит), Rennert T-лимфоматоза, мезангиален нефрит, рестеноза след ангиопластика, синдром на реперфузия, цитомегаловирусна ретинопатия, аденовирусни заболявания такива като аденовирусни настинки, аденовирусна фарингоконюнктивална треска и аденовирусна офталмия, СПИН,

синдром на Guillain-Barre, невралгия след херпес или херпес зостер, възпалителна демиелинизираща полиневропатия, множествена мононевропатия, муковисцидоза, болест на Bechterew, езофаг на Barrett, EBV (Вирус на Epstein-Barr) инфекция, кардиално ремоделиране, интерстициален цистит, захарен диабет II тип, туморна радиосенсибилизация при човек, полирезистентност на туморни клетки към химиотерапевтичните средства (полилекарствена резистентност при химиотерапия), гранулома ануларе и рак, като рак на гърдата, рак на дебелото черво, меланом, първичен рак на чернодробните клетки, аденокарцином, сарком на Kaposi, карцином на простатата, левкемия, като остра костномозъчна левкемия, множествен миелом (миеломна болест), лимфом на Burkitt и тумор на Castleman.

Съгласно изобретението, едно или повече производни на фумаровата киселина, избрани от групата, съдържаща диалкилови естери на фумаровата киселина и моноалкилови естери на фумаровата киселина под формата на свободната киселина или под формата на соли и техни смеси, се използват предпочитано за NF-капаВ инхибиране и за приготвяне на фармацевтичния състав.

Диалкиловите естери на фумаровата киселина съответстват за предпочитане на формулата

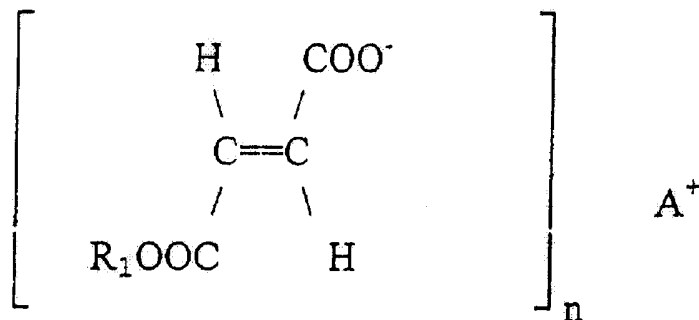


където R_1 и R_2 , които могат да бъдат еднакви или различни, независимо представят линеен, разклонен, цикличен, наситен или ненаситен C_{1-24} алкилов радикал или а C_{5-20} арилов радикал и тези

радикали са възможно заместени с халоген (F, Cl, Br, I), хидрокси, C₁₋₄ алкокси, нитро или циано.

Радикалите R₁ и R₂ са за предпочитане метил, етил, n-пропил, изопропил, n-бутил, втор-бутил, t-бутил, пентил, циклопентил, 2-етилхексил, хексил, циклохексил, хептил, циклохептил, октил, винил, алил, 2-хидроксиетил, 2- или 3-хидроксипропил, 2-метоксил, метоксиметил или 2- или 3-метоксипропил.

Моноалкиловите естери на фумаровата киселина съответстват за предпочитане на формулата



където R₁ е, както е определено по-горе, А е водород, алкален или алкалоземен метален катион или физиологично съвместим преходен метален катион, за предпочитане избран от Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ и Mn²⁺, и n е 1 или 2 и съответства на валентността на А.

Изобретението използва за предпочитане едно или повече производни на фумаровата киселина, избрано от групата, съдържаща диметиллов естер на фумаровата киселина, диетиллов естер на фумаровата киселина, метилетиллов естер на фумаровата киселина, киселинен метилфумарат, киселинен етилфумарат, магнезиев метилфумарат, магнезиев етилфумарат, цинков метилфумарат, цинков етилфумарат, железен метилфумарат, железен етилфумарат, калциев метилфумарат и/или калциев етилфумарат.

Съгласно изобретението, производните на фумаровата киселина за приготвяне на фармацевтичния състав се използват предпочитано в такова количество, че една дозирана единица от споменатия фармацевтичен състав съдържа количество на производно(и) на фумаровата киселина, съответстващо или еквивалентно на 1 до 500 mg, за предпочитане 10 до 300 mg и най-предпочитано 10 до 200 mg фумарова киселина.

Предпочитани форми на приложение за фармацевтичния състав са орална, парентерална, ректална, трансдермална, кожна, назална, пулмонална (инхалация) или офталмологична (под формата на капки за очи), като се предпочита оралната форма на приложение. Съставът тогава ще бъде представен в подходяща форма за всеки вид приложение.

В случай на орално приложение фармацевтичният състав на изобретението съществува под формата на дозирани таблетки, микротаблетки (множество дозирани таблетки) или минитаблетки, микропелети или гранулат (споменатите микротаблетки, микрогранули или гранулно вещество опционно капсулирано или напълнено в прахчета, капсули или разтвори за пиене. В предпочитан вариант на изпълнение, твърдите дозирани форми или форми за приложение са осигурени с покритие за чревна резорбция. Такова покритие може да се приложи и към капсулираните или напълнените дозирани форми.

В случай на парентерално приложение чрез инжектиране (венозно, мускулно, подкожно, интраперитонеално), съставът е представен в подходяща форма. Могат да бъдат използвани всички обичайни течни носители, подходящи за инжектиране.

Фармацевтичният състав може предпочитано да съдържа или индивидуално или в смес: 10 до 500 mg диалкилов фумарат,

особено диметилфумарат и/или диетилфумарат; 10 до 500 mg калциев алкилфумарат, особено калциев метилфумарат и/или калциев етилфумарат; 0 до 250 mg цинков алкилфумарат, особено цинков метилфумарат и/или цинков етилфумарат; 0 до 250 mg киселинен алкилфумарат, особено киселинен метилфумарат и/или киселинен етилфумарат; и 0 до 250 mg магнезиев алкилфумарат, особено магнезиев метилфумарат и/или магнезиев етилфумарат, сборът на гореспоменатите количества е еквивалентен на 10 до 500 mg, за предпочитане 10 до 300 mg и най-предпочитано 100 mg фумарова киселина.

Предпочитани състави на изобретението съдържат само диметилфумарат в количество от 10 до 300 mg.

Съгласно един особено предпочитан вариант на изпълнение, съставът е представен под формата на микротаблетки или микрогранули. Те имат за предпочитане размер или среден диаметър $< 5000 \mu\text{m}$, по-предпочитано 300 до $2500 \mu\text{m}$, особено 300 до $1000 \mu\text{m}$ за гранули и 1000 до $2500 \mu\text{m}$ за микротаблетки. Чрез прилагане на производните на фумаровата киселина под формата на микротаблетки, които се предпочитат съгласно изобретението, могат да бъдат още по-редуцирани стомашночревните реакции или страничните ефекти, които не могат да се управляват при прилагане на обичайните дозирани таблетки. Това се дължи, вероятно, на факта, че микротаблетките, за предпочитане микротаблетки с ентросолвентно покритие, са диспергирани вече в стомаха и поради това достигат чревния тракт като частици, при които активните съставки се освобождават локално в по-малки дози, докато цялостната доза остава същата. Това от своя страна, помага да се избегне локалното дразнене на епитела на чревните клетки, водещо до подобрен стомашночревен толеранс на микротаблетките в сравнение с конвенционалните таблетки.

Например, производни на фумаровата киселина, съдържащи се в състава на изобретението, се приготвят съгласно метода, описан в EP 0 312 679.

Примери на приготвяне

По принцип, оралните състави на изобретението под формата на таблетки или микротаблетки могат да бъдат приготвени по класическите методи за приготвяне на таблетки. Вместо такива класически методи за приготвяне на таблетки, могат да се използват други методи, такива като директно приготвяне на таблетки, както и процедури за приготвяне на твърди дисперсии, съгласно съгласно метода на топене или метода на шпрей изсушаване.

Таблетките могат да бъдат осигурени с ентérosолвентно покритие. Ентérosолвентното покритие може да се нанесе в класически покривен съд или се разпръсква отгоре. Покритието може също да се нанесе чрез покривен апарат на Voegel. Освен това, таблетката може да се осигури с филм покритие.

С цел да се обясни Използването, съгласно изобретението, по-долу са дадени различни примери за приготвяне на предпочитани лекарства. Тези примери целят илюстриране, но не ограничаване обхвата на изобретението.

Пример 1

Приготвяне на филм таблетки с ентérosолвентно покритие, съдържащи 100.0 mg монометилфумарат-Са сол, което съответства на 78 mg фумарова киселина

Вземайки необходимите предпазни мерки (дихателна маска, ръкавици, защитно облекло и др.), се натрошават 10 kg монометилфумарат-Са сол, разбъркват се интензивно и се хомогенизират през сито 800. След това се приготвя носител със следния състав: 21 kg производно на скорбяла (STA-RX

20.05.03¹⁰

1500®), 2 kg микрокристална целулоза (Avicel PH 101®), 0.6 kg поливинилпиролон (PVP, Kollidon®25), 4 kg Primogel®, 0.3 kg колоидна силициева киселина (Aerosil®).

Активната съставка се прибавя към цялата прахообразна смес, смесва се, хомогенизира се през сито 200 и се обработва с 2% воден разтвор на поливинилпиролон (PVP, Kollidon® 25) по обичайния начин в свързващи гранули и след това се смесва с външната фаза в сухо състояние. Последното се състои от 2 kg от т.н. FST комплекс, съдържащ 80% талк, 10% силициева киселина и 10% магнезиев стеарат.

След това сместа се пресова в конвексни таблетки с тегло 400 mg и диаметър 10.0 mm по обичайния начин. Вместо тези класически методи на пресоване, могат да се използват и други методи за приготвяне на таблетки, такива като директно пресоване или твърди дисперсии, съгласно метода на топене и шпрей изсушаване.

Ентеросолвентно покритие:

Разтвор на 2.250 kg хидроксипропилметилцелулозен фталат (HPMCP, Pharmacoat HP® 50) се разтваря в смес от разтворители, съдържаща 2.50 литра деминерализирана вода, 13 литра ацетон Ph.Helv. VII и 13 литра етанол (94 тегл. %) и след това към разтвора се прибавят 0.240 kg рициново масло (Ph. Eur. II). Разтворът се излива или разпръсква на порции върху покритието на таблетките в покривния съд по обичайния начин или се нанася чрез апарат с кипящ слой за подходящата структура.

След изсушаване се нанася филм покритието. Даденото покритие се състои от разтвор на Eudragit E 12.5%® 4.8 kg, талк Ph.Eur.II 0.34 kg, титаниев(VI)оксид Cronus RN 56® 0.52 kg, цветен лак ZLT-2 син (Siegel) 0.21 kg и полиетиленгликол 6000 Ph.Helv. VII 0.12 kg в смес от разтворители на 8.2 kg 2-пропанол

Ph.Helv. VII, 0.06 kg глицеринтриацетат (Triacetin®) и 0.2 kg деминерализирана вода. След хомогенно разпределяне в покривния съд или кипящия слой, сместта се изсушава и се полира по обичайния начин.

Пример 2

Приготвяне на ентросолвентни капсули, съдържащи 86.5 mg моноетилфумарат-Са сол и 110.0 mg диметилфумарат, което съответства общо на 150 mg фумарова киселина

Вземайки необходимите предпазни мерки (дихателна маска, ръкавици, защитно облекло и др.), 8.65 kg моноетилфумарат-Са сол и 11 kg диметилетилфумарат се смесват интензивно със смес, състояща се от 15 kg скорбяла, 6 kg лактоза Ph.Helv.VII, 2 kg микрокристална целулоза (Avicel®), 1 kg поливинилпиролон (Kollidon®25) и 4 kg Primogel® и се хомогенизират през сито 800.

Заедно с 2% разтвор на поливинилпиролон (Kollidon®25) цялата прахообразна смес се подлага на обработка по обичайния начин в свързващ гранулат и се смесва с външната фаза в сухото състояние. Дадената външна фаза се състои от 0.35 kg колоидна силициева киселина (Aerosil®), 0.5 kg Mg стеарат и 1.5 kg талк Ph.Helv.VII. След това хомогенната смес се напълва на порции от 500.0 mg в подходящи капсули, които после се осигуряват с ентросолвентно (устойчиво на стомашната киселина) покритие, състоящо се от хидроксипропилетилцелулозен стеарат и рициново масло като омекотител по известен начин. Освен в твърдите желатинови капсули, сместа може да бъде напълнена също в подходящи устойчиви на стомашната киселина капсули, които се състоят от смес на целулозен ацетат фталат (CAP) и хидроксипропилетилцелулозен фталат (HPMCP).

Пример 3

Приготвяне на ентérosолвентно покрити микротаблетки в капсули, съдържащи 87.0 mg моноетилфумарат-Са сол, 120 mg диметилфумарат, 5.0 mg моноетилфумарат-Mg сол и 3.0 mg моноетилфумарат-Zn сол, което съответства общо на 164 mg фумарова киселина (“forte” таблетки)

Вземайки необходимите предпазни мерки (дихателна маска, ръкавици, защитно облекло и др.), 8.7 kg моноетилфумарат-Са сол и 12 kg диметилетилфумарат 0.5 kg моноетилфумарат-Mg сол и 0.3 kg моноетилфумарат-Zn сол се натрошават, интензивно се смесват и се хомогенизират през сито 800. След това се приготвя носител със следния състав: 18 kg производно на скорбяла (STA-RX 1500), 0.3 kg микрокристална целулоза (Avicel PH 101), 0.75 kg PVP (Kollidon 120), 4 kg Primogel, 0.25 kg колоидна силициева киселина (Aerosil). Цялата прахообразна смес се прибавя към сместа на активната съставка, хомогенизира се през сито 200 и се обработва по обичайния начин с 2% воден разтвор на поливинилпиролон (Kollidon K25) за получаване на свързващ гранулат и след това се смесва в сухо състояние с външната фаза, която се състои от 0.5 kg магнезиев стеарат и 1.5 kg талк. След това прахообразната смес се пресова по обичайния начин в конвексни таблетки с тегло 10.0 mg и диаметър 2.0 mm. Вместо тези класически методи на пресоване, могат да се използват и други методи за приготвяне на таблетки, такива като директно пресоване или твърди дисперсии съгласно метода на топене и шпрей изсушаване.

Устойчивото на стомашната киселина покритие може да се излее или разпръска на порции върху покритието на таблетките в класически покривен съд или се нанася чрез апарат с кипящ слой. С цел получаване на устойчивост към

стомашната киселина, порции от раствора от 2.250 kg хидроксипропилметилцелулозен фталат (HPMCP, Pharmacoat HP 50) се разтварят в смес от следните разтворители: ацетон 13 l, етанол 94 тегл.% денатурирани с 13.5 l 2% кетон и деминерализирана вода 2.5 l. Прибавят се 0.240 kg рициново масло като омекотител към крайния разтвор и се прилагат на порции към обвивката на таблетките по обичайния начин.

Филм покритие: След като изсушаването приключи, като филм покритие в същия апарат се прилага следния състав: талк 0.340 kg, титаниев (VI) оксид Cronus PN 56 0.4 kg, цветен лак L червен лак 86837 0.324 kg, Eudragit E 12.5% 4.8 kg и полиетиленгликол 6000 рН 11 XI 0.12 kg в смес на разтворител със следния състав: 2-пропанол 8.17 kg, *aqua demineralisata* 0.2 kg и глицеринов триацетат (Triacetin) 0.6 kg.

След това, устойчивите на стомашната киселина микроtabletки се напълват в твърди желатинови капсули със сухо тегло 500.0 mg и се запечатват.

Пример 4

Приготвяне на микроtabletки с ентeросолвентно покритие в капсули, съдържащи 120.0 mg диметилфумарат, което съответства на 96 mg фумарова киселина

Вземайки необходимите предпазни мерки (дихателна маска, ръкавици, защитно облекло и др.), 12 kg диметилфумарат се натрошават, интензивно се смесват и се хомогенизират през сито 800. След това се приготвя носител със следния състав: 17.5 kg производно на скорбяла (STA-RX 1500®), 0.30 kg микрокристална целулоза (Avicel PH 101®), 0.75 kg PVP (Kollidon® 120), 4 kg Primogel®, 0.25 kg колоидна силициева киселина (Aerosil®). Активната съставка се прибавя към цялата прахообразна смес, смесва се, хомогенизира се през

20.05.03

сито 200 и се обработва по обичайния начин с 2% воден разтвор на поливинилпиролидон (Kollidon® 25) за получаване на свързващ гранулат и след това се смесва в сухо състояние с външната фаза. Последната се състои от 0.5 kg магнезиев стеарат и 1.5 kg талк.

След това прахообразната смес се пресова по обичайния начин в конвексни таблетки с тегло 10.0 mg и диаметър 2.0 mm.

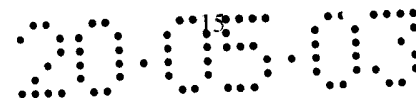
С цел получаване на устойчивост към стомашната киселина, разтвор на 2.25 kg хидроксипропилметилцелулозен фталат (HPMCP, Pharmacoat HP® 50) се разтваря в смес от следните разтворители: 13 l ацетон, 13.5 l етанол (94 тегл.% денатурирани с 2% кетон) и 1.5 l *aqua demineralisata*. След това се прибавя рициново масло (0.24 kg) към крайния разтвор като омекотител и се прилага към обвивката на таблетките по обичайния начин.

След като изсушаването приключи, като филм покритие в същия апарат се прилага следния състав: талк 0.34 kg, титаниев (VI) оксид Cronus PN 56® 0.4 kg, цветен лак L червен лак 86837 0.324 kg, Eudragit E 12.5%® 4.8 kg и полиетиленгликол 6000 рН 11 XI 0.12 kg в смес на разтворители със следния състав: 8.17 kg 2-пропанол, 0.2 kg деминерализирана вода и 0.6 kg глицеринов триацетат (Triacetin®).

Ентеросолвентно покритите микроtabletки се напълват в твърди желатинови капсули със сухо тегло 400 mg и се запечатват.

Пример 5

Приготвяне на микроtabletки с ентеросолвентно покритие в капсули, съдържащи 120.0 mg диметилфумарат, което съответства на 96 mg фумарова киселина



12 kg диметилфумарат се натрошават и се хомогенизират, както е описано по-горе. След това се приготвя носител със следния състав: 23.2 kg микрокристална целулоза (Avicel PH 200®), 3 kg натриева кроскармелоза (AC-Si-SOL-SD-711), 2.5 kg талк, 0.1 kg безводна силициева киселина (Aerosil® 200) и 1 kg Mg стеарат. След това прахообразната смес се пресова по обичайния начин в конвексни таблетки с тегло 10.0 mg и диаметър 2.0 mm.

Активната съставка се прибавя към цялата прахообразна смес, смесва се, хомогенизира се през сито 200 и се обработва по обичайния начин с 2% воден разтвор на поливинилпиролон (Kollidon® 25) за получаване на свързващ гранулат и след това се смесва в сухо състояние с външната фаза. Последната се състои от 0.5 kg магнезиев стеарат и 1.5 kg талк.

След това се приготвя разтвор на 0.94 kg Eudragit® L в изопропанол, който допълнително съдържа 0.07 kg дибутилфталат. Този разтвор се разпръсква върху обвивките на таблетките. След това се приготвя дисперсия от 17.32 kg Eudragit® L D-55 и смес от 2.8 kg микроталк, 2 kg Macrogol 6000 и 0.07 kg диметикон във вода и се разпръсква върху обвивките.

След това, ентеросолвентно покритите микротаблетки се напълват в твърди желатинови капсули със сухо тегло 650 mg и се запечатват.

Пример 6

NF-капаВ транслокация в клетъчното ядро

NF-капаВ (p65) се въвежда във вектора pEGFP-C 1, който съдържа EGFP (зелено флуоресцентен белтък), свързан с цитомегаловирусен промотор (Clontech). Това води до експресията на флуоресцентен NF-капаВ. HUVEC клетки се

поставят между третия и четвъртия пасаж в плочки с култура, покрита с желатин, имащи 12 гнезда (Costar) и се отглеждат, съответно, до 80 или 90 % сливане. След това, тези клетки се подлагат на трансфекция, използвайки метода на преципитиране на калциев фосфат. Специфично, тези клетки се обработват с Dulbecco модифицирана среда на Eagles (DMEM), след 24 часа се прибавя преципитата, съдържащ 1 μg DNA на гнездо и клетките се инкубират за още четири часа. След измиване с HBSS (балансиран солеви разтвор на Hanks), се прибавя среда на културата и клетките се отглеждат в продължение на още 18 часа преди те да бъдат стимулирани.

За опитите клетките се поставят с 40 μM /l диметилфумарат, паралелно предварително приготвени без ДНК, служещи като контрола. Два часа след началото на обработване на клетките, те се стимулират с 10 ng/ml TNF- α за времето, изложено в таблица 1.

След това, клетките се подлагат на лизиране, супернатантът се отделя и клетъчните ядра се събират в Dounce буфер с протеазен инхибитор (10 mM трис-HCl, pH 7.6, 0.5 mM MgCl, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ левпептин, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ аprotинин, 1 mM фенилметилсулфонил флуорид, 1.8 mg/ml йодацетамид). След 10 минутно центрофугиране при 1200 g, 4°C, клетъчните ядра се анализират на FACSканпоточен цитометър (Becton Dickinson).

Таблица 1

Брой на NF-капаВ (p65) положителни ядра

(процентно основани върху всички клетки, подложени
на трансфекция с NF-капаВ)

Продължителност на стимулирането	Контрола	DMF (40 μ M/1, n = 3)
0 min	30 \pm 3	29 \pm 5
10min	61 \pm 5	20 \pm 4
30 min	50 \pm 6	25 \pm 6
60 min	55 \pm 10	24 \pm 9

Тази таблица показва, че диметилфумарат в концентрация 40 μ M/1 инхибира TNF-индуцираната транслокация на NF-капаВ в клетъчното ядро.

Пример 7

Инхибиране на NF-капаВ стимулирана транскрипция

Тройно повторение на AP-1 последователния участък (свързващ участък) (48bp, 3 x TGTGA-TGACTCAGGTT) и тройно повторение на NF-капаВ последователния участък (60 bp, 3 x AATCGTGGAAATTCCTCTGA), ограничен от Spel свързващи участъци (не са показани), се въвежда в Spel участъка на рТК-UBT-luc вектора (de Martin, Gene 124, 137 - 138, 1993). 1.3 kb конструкция на E-селектиновия промотор, простираща се от bp -1285 до bp +482, се въвежда в NdeI участъка на рMAM Neo-luc вектор (Clontech).

HUVES клетки се подлагат на трансфекция с получените по този начин конструкции, както е описано в пример 6. За

споменатата трансфекция се прибавят 2.5 μg на гнездо от конструкцията на уместния промотор. С цел верифициране ефикасността на трансфекция, се извършват ко-трансфекции с 500 ng pSV-бета галактозидазен контролен вектор (Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.) като контрола във всеки опит. Два дни след трансфекцията клетките се стимулират в продължение на 2 часа с 10 ng/ml TNF-алфа със и без прибавяне на 6 $\mu\text{g/ml}$ диметилфумарат (DMF). След това клетките се събират чрез обработване с трипсин, гранулират се, измиват се и се ресуспендират в 200 μl "репортерен буфер на лизирането" (Promega) в продължение на 15 min, както е описано от производителя.

Луциферазната активност се измерва с помощта на луминометър на Berthold AutoLumat LB9507, използвайки луциферазната тестова система (Promega). Бета-галактозидазната активност се определя, използвайки Promega бета-галактозидазна ензимна тестова система. Луциферазните дейности, получени с уместните конструкции на промотора, се нормализират до бета-галактозидазна активност. Различната широчина на бета-галактозидазната активност в индивидуалните опити е под 10 %. Таблица 2 показва индивидуалните резултати x-пъти vis-à-vis на основната линия.

Таблица 2

Нарастване на транскрипцията

Относително нарастване на луциферазната активност
(измерено като x-пъти нарастване vis-a-vis на основната линия)

след TNF стимулиране (10 ng/ml)

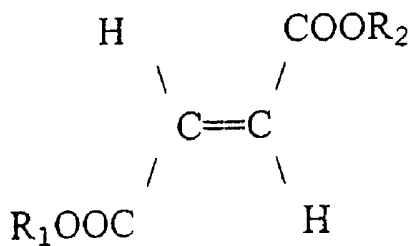
със или без 40 $\mu\text{M/l}$ диметилфумарат (DMF), n = 6

Условия	NF-капаВ	AP-1
TNF	2 \pm 3	2.2 \pm 0.5
TNF + DMF	2 \pm 1	2 \pm 0.1

Таблица 2 показва, че диметилфумарат инхибира TNF индуцираната транскрипция на NF-капаВ зависимия ген, но не транскрипцията на AP-1 зависимия ген. Поради това, диметилфумаратното инхибиране е NF-капаВ-специфично.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Използването на едно или повече производни на фумаровата киселина за приготвяне на фармацевтичен състав за лечението на заболявания, които могат да бъдат повлияни от NF-капаВ.
2. Използването, съгласно патентна претенция 1, характеризиращо се с това, че производното на фумаровата киселина е избрано от групата, съдържаща диалкилови естери на фумаровата киселина и моноалкилови естери на фумаровата киселина, които могат да бъдат опционно заместени, под формата на свободната киселина или под формата на соли и производни смеси.
3. Използването, съгласно патентна претенция 2, където диалкиловият естер на фумаровата киселина, съответства на формулата

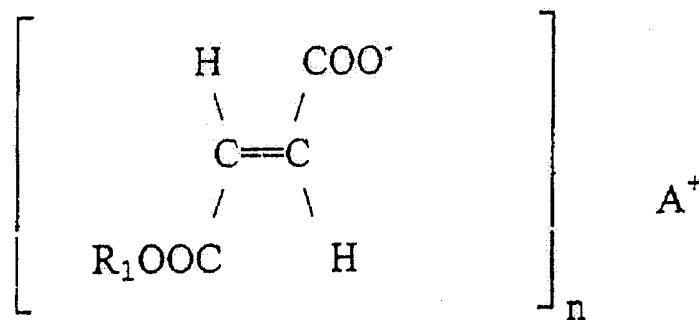


при което R_1 и R_2 , които могат да бъдат еднакви или различни, независимо представят линеен, разклонен, цикличен, наситен или ненаситен C_{1-24} алкилов радикал или а C_{5-20} арилов радикал и тези радикали са възможно заместени с халоген (F, Cl, Br, I), хидрокси, C_{1-4} алкокси, нитро или циано.

4. Използването, съгласно една от патентните претенции 2 и 3, характеризиращо се с това, че радикалите R_1 и R_2 са метил, етил, n-пропил, изопропил, n-бутил, втор-бутил, t-бутил, пентил, циклопентил, 2-етилхексил, хексил,

циклохексил, хептил, циклохептил, октил, винил, алил, 2-хидроксиетил, 2- или 3-хидроксипропил, 2,3-дихидроксипропил, 2-метоксиетил, метоксиметил или 2- или 3-метоксипропил.

5. Използването, съгласно патентна претенция 2, където моноалкиловите естери на фумаровата киселина съответстват на формулата



при което

-R₁ е, както е определено в патентни претенции 3 и 4

-A е водород, алкален или алкалоземен метален катион или физиологично съвместим преходен метален катион, за предпочитане избран от Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ и Mn²⁺, и

-n е 1 или 2 и съответства на валентността на A.

6. Използването, съгласно някои от предишните патентни претенции, характеризиращо се с това, че производното на фумаровата киселина е едно или повече, избрано от групата, съдържаща диметил естер на фумаровата киселина, диетилов естер на фумаровата киселина, метилетил естер на фумаровата киселина, киселинен метилфумарат, киселинен етилфумарат, калциев метилфумарат, калциев етилфумарат, магнезиев метилфумарат, магнезиев етилфумарат, цинков метилфумарат, цинков етилфумарат, железен

метилфумарат и железен етилфумарат и производни смеси.

7. Използването, съгласно патентна претенция 6, характеризиращо се с това, че производното на фумаровата киселина е диметил естер на фумаровата киселина (диметилфумарат).

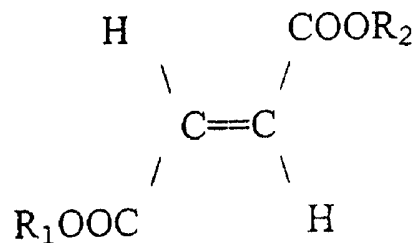
8. Използването на едно или повече производни на фумаровата киселина за приготвяне на фармацевтичен състав за лечението на заболявания, които могат да бъдат повлияни от NP-капаВ, избрани от групата, включваща:

прогресивна системна склеродермия, сифилистичен остеохондрит (болест на Wegener), мраморирана кожа (*livedo reticularis*), болест на Behcet, панартерит, язвен колит, васкулит, остеоартрит, подагра, атеросклероза, болест на Reiter, белодробна грануломатоза, видове енцефалит, ендотоксичен шок (септикотоксичен шок), сепсис, пневмония, енцефаломиелит, анорексия невроза, хепатит (остър хепатит, хроничен хепатит, токсичен хепатит, алкохолно предизвикан хепатит, вирусен хепатит, жълтеница, чернодробна недостатъчност и цитомегаловирусен хепатит), Rennert Т-лимфоматоза, мезангиален нефрит, рестеноза след ангиопластика, синдром на реперфузия, цитомегаловирусна ретинопатия, аденовирусни заболявания такива като аденовирусни настинки, аденовирусна фарингоконюнктивална треска и аденовирусна офталмия, СПИН, синдром на Guillain-Barre, невралгия след херпес или херпес зостер, възпалителна демиелинизираща полиневропатия, множествена мононевропатия, муковисцидоза, болест на Bechterew, езофаг на Barrett, EBV (Вирус на Epstein-Barr) инфекция, кардиално ремоделиране, интерстициален цистит, захарен диабет II тип, туморна радиосенсибилизация при човек, полирезистентност на туморни клетки към химиотерапевтичните

средства (полилекарствена резистентност при химиотерапия), гранулома ануларе и рак, като рак на гърдата, рак на дебелото черво, меланом, първичен рак на чернодробните клетки, аденокарцином, сарком на Kaposi, карцином на простатата, левкемия, като остра костномозъчна левкемия, множествен миелом (миеломна болест), лимфом на Burkitt и тумор на Castleman.

9. Използването, съгласно патентна претенция 8, характеризиращо се с това, че производното на фумаровата киселина е избрано от групата, съдържаща диалкилови естери на фумаровата киселина и моноалкилови естери на фумаровата киселина под формата на свободната киселина или сол или производни смеси.

10. Използването, съгласно патентна претенция 9, където диалкиловият естер на фумаровата киселина съответства на формулата

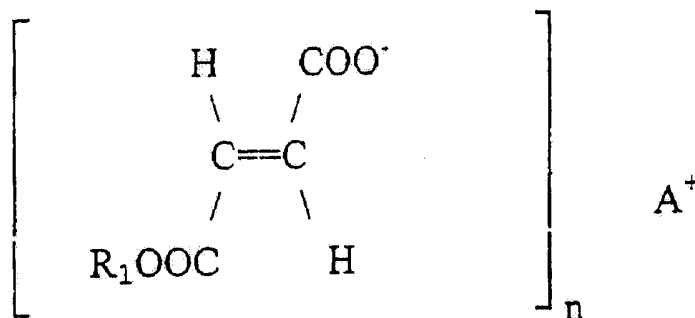


при което R_1 и R_2 , които могат да бъдат еднакви или различни, независимо представят линеен, разклонен, цикличен, наситен или ненаситен C_{1-24} алкилов радикал или а C_{5-20} арилов радикал и тези радикали са възможно заместени с халоген (F, Cl, Br, I), хидрокси, C_{1-4} алкокси, нитро или циано.

11. Използването, съгласно една от претенции 9 и 10, характеризиращо се с това, че радикалите R_1 и R_2 са метил, етил, n-пропил, изопропил, n-бутил, втор-бутил, t-бутил, пентил, циклопентил, 2-етилхексил, хексил, циклохексил, хептил, циклохептил, октил, винил, алил, 2-хидроксиетил, 2- или 3-

хидроксипропил, 2-метоксиетл, метоксиметил или 2- или 3-метоксипропил.

12. Използването, съгласно патентна претенция 9, където моноалкиловите естери на фумаровата киселина съответстват на формулата



където

-R₁ е, както е определено в патентни претенции 3 или 4

-A е водород, алкален или алкалоземен метален катион или физиологично съвместим преходен метален катион, за предпочитане избран от Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ и Mn²⁺, и

-n е 1 или 2 и съответства на валентността на A.

13. Използването, съгласно която и да е патентна претенция от 8 до 12, характеризиращо се с това, че една дозирана единица от фармацевтичния състав съдържа количество на производно(и) на фумаровата киселина, съответстващо на 1 до 500 mg, за предпочитане 10 до 300 mg и най-предпочитано 10 до 200 mg фумарова киселина.

14. Използването, съгласно която и да е от предшестващите патентни претенции от 8 до 13 за приготвяне на фармацевтичен състав са орална, парентерална, ректална, трансдермална, кожна, назална, пулмонална (инхалация) или офталмологична, за предпочитане орална форма на приложение.

15. Използването, съгласно патентна претенция 14, където фармацевтичният състав за орално приложение съществува под формата на дозирани таблетки, микротаблетки, микропелети или гранулат (споменатите микротаблетки, микрогранули или гранулно вещество опционно капсулирано или напълнено в прахчета), капсули или разтвори за пиене.

16. Използването, съгласно патентна претенция 15, характеризиращо се с това, че твърдите дозирани форми са осигурени с покритие за чревна резорбция.

17. Използването, съгласно патентна претенция 8, характеризиращо се с това, че дозираните единици на фармацевтичния състав предпочитано съдържат или индивидуално или в смес:

10 до 500 mg диалкилов фумарат, особено диметилфумарат и/ или диетилфумарат;

10 до 500 mg калциев алкилфумарат, особено калциев метилфумарат и/или калциев етилфумарат;

0 до 250 mg цинков алкилфумарат, особено цинков метилфумарат и/или цинков етилфумарат;

0 до 250 mg киселинен алкилфумарат, особено киселинен метилфумарат и/или киселинен етилфумарат; и

0 до 250 mg магнезиев алкилфумарат, особено магнезиев метилфумарат и/или магнезиев етилфумарат,

сборът на гореспоменатите количества е еквивалентен на 10 до 500 mg, за предпочитане 10 до 300 mg и най-предпочитано 100 mg фумарова киселина.

18. Използването, съгласно една от претенциите 15 или 16, характеризиращо се с това, че съставът е представен под формата на микротаблетки или микропелети с размер $\leq 5000 \mu\text{m}$,

25
2003

предпочитано от 300 до 1000 μm за гранули и 1000 до 2500 μm за
микротаблетки.