

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-2437**
(22) Přihlášeno: **12.01.1998**
(30) Právo přednosti: **10.01.1997 IL 1997/119989**
(40) Zveřejněno: **14.06.2000**
(**Věstník č. 6/2000**)
(47) Uděleno: **04.04.2007**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **16.05.2007**
(**Věstník č. 20/2007**)
(86) PCT číslo: **PCT/US1998/000375**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/030227**

(11) Číslo dokumentu:

297 983

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)
A61K 9/28 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 95/31990 A1.

(73) Majitel patentu:
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD, Rehovot, IL

(72) Původce:
Arnon Ruth, Rehovot, IL
Sela Michael, Rehovot, IL
Teitelbaum Dvora, Rehovot, IL
Gilbert Adrian, Kfar-Saba, IL
Linenberg Milka, Tel-Mond, IL
Riven-Kreitman Rivka, Kfar-Saba, IL

(74) Zástupce:
Dr. Karel Čermák, Národní 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:
**Entericky potažená farmaceutická kompozice
pro perorální podávání pro léčení roztroušené
sklerózy**

(57) Anotace:
Použití glatiramer acetátu v pevné formě a v množství 0,1 až 1000 mg pro výrobu entericky potažené kompozice pro perorální podávání pro léčení roztroušené sklerózy. Vzniklá farmaceutická kompozice.

CZ 297983 B6

Entericky potažená farmaceutická kompozice pro perorální podávání pro léčení roztroušené sklerózy

5 Oblast techniky

Vynález se týká entericky potažené farmaceutické kompozice pro perorální podávání pro léčení roztroušené sklerózy.

10

Dosavadní stav techniky

Kopolymer-1, který je také znám jako glatirameracetát a je prodáván pod ochrannou známkou Copaxone^(R), zahrnuje acetátové soli polypeptidů obsahujících L-glutamovou kyselinu, L-alanin, L-tyrosin a L-lysin. Průměrný molární zlomek je 0,141 pro L-glutamovou kyselinu, 0,427 pro L-alanin, 0,095 pro L-tyrosin a 0,338 pro L-lysin a průměrná molekulová hmotnost kopolymeru-1 je 4700 až 11 000 Dalton. Tato látka je ne-autoantigen, o němž bylo prokázáno, že potlačuje experimentální alergickou encefalomyelitis (EAE) indukovanou různými encefalitogeny, jako je například homogenát z myší míchy (MSCH, mouse spinal cord homogenate), který obsahuje všechny myelinové antigeny, jako myelinový základní protein (myelin basic protein, MBP) (Sela M. et al., Bull. Inst. Pasteur (1990), 88 303 až 314), proteolipidový protein (PLP) (Teitelbaum D. et al., J. Neuroimmunol. (1996), 64, 209 až 217) a myelinový oligodendrocytový glykoprotein (MOG) (Ben-Nun A. et al., J. Neurol. (1996) 243 (doplněk 1) S14-322) u různých druhů. EAE je přijímána jako model pro roztroušenou sklerózu.

25

Bylo prokázáno, že kopolymer-1 je účinný při injekčním, subkutánním, intraperitoneálním, intravenózním nebo intramuskulárním, podávání (D. Teitelbaum et al., Eur. J. Immunol. (1971) 1: 242 až 248; D. Teitelbaum et al., Eur. J. Immunol. (1973) 3: 273 až 279).

30

Ve fázi III klinických zkoušek bylo zjištěno, že denní subkutánní injekční podávání kopolymeru-1 zpomaluje progresivní postup invalidity a redukuje relapsní poměr u exacerbuující-remitující roztroušené sklerózy (K.P. Johnson, Neurology (1995), 1: 65 až 70). Léčení pomocí kopolymeru-1 je v současné době omezeno na denní subkutánní podávání.

35

V současné době všechny konkrétně schválené léčebné postupy u roztroušené sklerózy zahrnují autoinjekce účinné látky. V místech vpichu jsou často pozorovány problémy, jako je podráždění, přecitlivělost, zánět, bolest a dokonce nekróza (v případě léčení alespoň jedním interferonem β 1-B). Dalším faktorem je nízká compliance u pacientů. Je tedy žádoucí vyvinout nový způsob podávání.

40

V patentu EP 359 783 je popsán způsob léčení autoimunitních chorob orálním podáváním autoantigenů. V tomto patentu je popsáno orální podávání MBP za účelem léčení roztroušené sklerózy. Orální podávání autoantigenu bylo označeno jako „orální tolerance“.

45

PCT mezinárodní patentové přihlášky č. WO 91/12 816, WO 91/08 7690 a WO 92/06 704 popisují léčení dalších autoimunitních chorob za použití způsobu „orální tolerance“ s různými autoantigeny. V každém z těchto dokumentů však není popsáno léčení roztroušené sklerózy pomocí orálního podávání ne-autoantigenního kopolymeru-1. Všechny tyto dokumenty jsou zde citovány náhradou za přenesení celého jejího obsahu do tohoto textu.

50

Úkolem vynálezu je tedy poskytnout způsob léčení roztroušené sklerózy pomocí orálního podávání kopolymeru-1 požitím.

Podstata vynálezu

5 Předmětem vynálezu je použití glatiramer acetátu v pevná formě a v množství 0,1 až 1000 mg pro výhodu entericky potažené kompozice pro perorální podávání pro léčení roztroušené sklerózy.

Dále je předmětem vynálezu farmaceutická kompozice, která obsahuje glatiramer acetát v pevné formě v množství 0,1 až 1000 mg v entericky potažené kompozici.

10 Jak již bylo uvedeno výše, glatiramer acetát či kopolymer-1 obsahuje acetátové soli polypeptidů obsahujících L-glutamovou kyselinu, L-alanin, L-tyrosin a L-lysin. Průměrný molární zlomek je 0,141 pro L-glutamovou kyselinu, 0,427 pro L-alanin, 0,095 pro L-tyrosin a 0,338 pro L-lysin a průměrná molekulová hmotnost kopolymeru-1 je 4700 až 11 000 Dalton.

15 Tento vynález je založen na zjištění, že orální podání kopolymeru-1 je účinné při potlačování EAE, a má tedy terapeutickou hodnotu při léčbě roztroušené sklerózy.

20 Má se za to, že kopolymer-1 přichází do kontaktu s takovými lymfoidními tkáněmi v mukosální výstelce, které jsou považovány za primární zdroj senzitivizace imunitního systému. Mukosální výstelka se může nacházet (nikoliv však výhradně) v dutinách, průdušnici, bronchiálních pasážích (v tomto případě jsou známy jako BALT nebo lymfoidní tkáň spojené s průduškami) a gastrointestinální výstelce (známé jako GALT nebo lymfoidní tkáň spojené se střevem). V konkrétním případě vynálezu podávání kopolymeru-1 tedy zahrnuje postupy, při nichž se kopolymer-1 do
25 těla zavádí požitím nebo pomocí žaludeční sondy.

Podle jednoho příkladného provedení vynálezu se kopolymer podává orálně v množství od 0,1 do 1000 mg za den a tuto denní dávku lze podávat ve formě dávky jediné nebo několika dílčích dávek. Odborníku v tomto oboru je zřejmé, že terapeuticky účinná dávka je obecně funkcí
30 pacientova věku, pohlaví a fyzikálního stavu a dále též funkcí jiné souběžné léčby. Stanovení optimální terapeuticky účinné dávky léčby. Stanovení optimální terapeuticky účinné dávky spadá do rozsahu působnosti odborníka v tomto oboru.

Jelikož je kopolymer-1 podáván orálně, může být smísen s jinými potravinovými formami a konzumován v podobě pevných nebo polotuhých suspenzí nebo emulzí. Může být smísen s farmaceuticky vhodnými nosiči, jako je voda, suspenzními činidly, emulgačními činidly, modifikátory vůně a chuti apod. Podle vynálezu je kompozice opatřena enterickým povlakem. Použití enterických povlaků je v tomto oboru dobře známé. Tak například K. Lehman, Acrylic Coatings in Controlled Release Tablet Manufacturer, Manufacturing Chemist and Aerosol News, str. 39
40 (červen 1973) a K. Lehman, Programmed Drug Release From Oral Program Forms, Pharma, Int., sv. ISS 3, 1971, str. 34 až 41 popisují enterické povlaky, jako Eudragit S a Eudragit L. V Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2. vydání jsou také vysvětleny aplikace Eudragitu S a Eudragitu L. Jako jeden z produktů řady Eudragit je možno uvést Eudragit L30D55.

45 Kopolymer-1 v některé z výše uvedených forem je v širším kontextu rovněž možno podávat nazálně, inhalací výsledku trachey a bronchiálních pasážích je navíc možno použít inhalace ústy.

Kopolymer-1 lze připravovat postupy známými odborníkům v tomto oboru, například způsobem opsaným v patentu US 3 849 550. Při tomto způsobu se N-karboxyanhydridy tyrosinu, alaninu, gama-benzylglutamátu a epsilon-N-trifluoracetyllysinu polymerují při teplotě místnosti v bezvodém dioxanu za použití diethylaminu jako iniciátoru. Odblokování gama-karboxyskupiny kyseliny glutamové se provádí za použití bromovodíku v ledové kyselině octové, načež se ze zbytků lysinu 1M piperidinem odstraní trifluoracetylové skupiny.

Jak je popsáno v přihlášce PCT publikované pod číslem WO 95/31 990, je kopolymer-1 s požadovanou průměrnou molekulovou hmotností 7 ± 2 kDa možno přednostně připravovat způsobem, při němž se chráněný kopolymer-1 nechá reagovat s kyselinou bromovodíkovou za vzniku trifluoracetylkopolymeru-1, na trifluoracetylkopolymer-1 se působí vodním roztokem piperidinu a výsledný kopolymer-1 se přečistí tak, aby se získal kopolymer-1 s požadovanou molekulovou hmotností.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 a 2 je znázorněn účinek kopolymeru-1 na imunitní odpověď na myelinový základní protein morčete (GPBP) u potkanů (obr. 1) a myši (obr. 2) stanovený pomocí proliferace slezinových buněk.

Na obr. 3 a 4 je znázorněn účinek kopolymeru-1 na uvolňování cytokinu.

Na obr. 5 je znázorněno potlačení EAE u myši orálním podáváním kopolymeru-1. Myši (SJL/JxBALB/C) F₁ se krmí PBS (plné čtverečky), 0,1mg dávkou kopolymeru-1 (prázdné čtverečky), 0,25mg dávkou kopolymeru-1 (plné trojúhelníčky) nebo 0,5mg dávkou kopolymeru-1 (prázdné trojúhelníčky). Každá dávka se podává sedmkrát, ve dny -7, -5, -3, 0, 2, 4 a 6. EAE se indukuje v den 0 injekcí MSCH.

Na obr. 6 je znázorněna proliferace a sekrece cytokinu linií T-buněk odvozenou z buněk sleziny potkanů kmených kopolymerem-1. Buňky se kultivují s médiem, kopolymerem-1 (50 µg/ml) nebo konkalinim A (Con A) (5 µg/ml). Jako odpověď na tyto antigeny se měří proliferace a sekrece cytokinu.

Na obr. 7 je znázorněna inhibice EAE linií T-buněk odvozenou z buněk sleziny potkanů kmených kopolymerem-1. Buňky (20×10^6 /potkan) se podají intraperitoneální injekcí 3 dny po stimulaci kopolymerem-1 následované indukci EAE.

Na obr. 8 je znázorněna inhibice EAE linií T-buněk odvozenou z buněk sleziny myši kmených kopolymerem-1. Buňky (15×10^6 /myš) se podají intravenózní injekcí 3 dny po stimulaci kopolymerem-1 následované indukci EAE.

Na obr. 9 je znázorněn graf, v němž jsou vyneseny výsledky klinického hodnocení proti době podávání kopolymeru-1 po indukci EAE ve dnech u tří makaků Rhesus.

Na obr. 10 je znázorněn graf, kde jsou vyneseny výsledky klinického hodnocení proti době podávání kopolymeru-1 po indukci EAE ve dnech u šesti makaků Rhesus při komparační zkoušce dávkovacích forem s enterickým povlakem a bez enterického povlaku. Počátek osy y byl posunut, aby bylo možno znázornit výsledky.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech. Tyto příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezují. Všechny díly, procentní údaje apod. jsou hmotnostní, pokud není uvedené jinak.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

5

Antigeny

Kopolymer-1 připravený způsobem popsaným v mezinárodní patentové přihlášce PCT/WO 95/31 990 byl získán od firmy Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Izrael. GPBP se připraví z míchy morčete extrakcí kyselinou a vysrážením síranem amonným, způsobem popsaným v Hirshfeld H. et al., Febs Lett. (1970) 7, 317 až 320.

10

Zvířata

Samice myši (PL/JxSJL/J) F1 o stáří 8 až 10 týdnů byly získány od firmy Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Samice potkana Lewis o stáří 8 až 12 týdnů byly získány od firmy Harlan-Olac (Bicester, Velká Británie).

15

Indukce a stanovení EAE

20

Myšim se injekčně podá 200 µg GPBP emulgovaného ve stejném objemu úplného Freundova adjuvans (CFA) obsahujícího 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA) (Difco Lab, Detroit, Mich., USA). Potkanům se do všech čtyř tlapek injekčně podá emulze o celkovém objemu 0,1 ml. Bezprostředně poté a po 24 hodinách se potkanům intravenózní injekcí podá toxin *Bordetella pertussis* (250 ng/myš) (Sigma).

25

Potkani se imunizují 25 µg GPBP emulgovaného v poměru 1 : 1 v CFA obsahujícím 4 mg/ml H37Ra. Potkanům se do dvou zadních tlapek injekčně podá emulze v celkovém objemu 0,1 ml.

Zvířata se denně po dobu 10 dní po indukci zkoušejí na přítomnost příznaků choroby. EAE se hodnotí následujícím způsobem: 0 – bez choroby, 1 – ochabnutí ocasu, 2 – paralýza zadních končetin, 3 – paralýza všech čtyř končetin, 4 – předsmrtný stav, 5 – smrt.

30

Indukce orální tolerance

35

Myši se ve dnech -7, -5, -3, 0, 2, 4 a 6 krmí 250 µg GPBP nebo kopolymerem-1 rozpuštěným ve fosfátem pufrovaném solném roztoku (PBS) pomocí intubace žaludku za použití sondy z nerezové oceli o velikosti 18 (Thomas). EAE se indukuje v den 0.

Potkani se krmí 1 mg GPBP nebo kopolymerem-1 rozpuštěným v PBS pomocí intubace žaludku za použití sterilní sondy (Uno Plast, Dánsko). Potkani se před indukci choroby krmí 5 x (celková dávka 5 mg) v intervalech 2 až 3 dnů. EAE se indukuje 2 dny po posledním krmení. Kontrolní myši a potkani se simulovaně krmí PBS.

40

Zkouška proliferace

45

Proliferační odpověď u buněk sleziny se zkouší 10 až 11 dnů po výše popsané indukce EAE. Buňky od 3 zvířat v každé skupině se spojí a ve trojím provedení kultivují (5×10^5 myších buněk a 2×10^5 potkaních buněk) v mikrotitrových plotnách s různými koncentracemi antigenu (GPBP) v konečném objemu 0,2 ml. Mikrotitrové plotny obsahují živné médium RPMI 1640 (dostupné od firmy Sigma Biochemicals, St. Louis, Missouri, USA) doplněné 1 % autologního séra. Po 72-hodinové inkubaci se buňky 18 hodin pulzují 1 µCi [3 H]-thymidinu, poté sklídí na filtračních papírech a počítá se radioaktivita.

50

Zkouška sekrece cytokinu

10 až 11 dnů po indukci EAE se odeberou sleziny a buňky od 3 myší z každé skupiny se vždy spojí. Buňky ($5 \times 10^6/\text{ml}$) se ve dvojím provedení kultivují ve 24jamkových plotnách v RPMI 1640 doplněném 10 % FCS (fetálního telecího séra) za přítomnosti nebo za nepřítomnosti anti-
 5 genu (GPBP 100 Fg/ml). Supernatanty se sklídí po 24 až 40hodinové kultivaci. Za použití párových monoklonálních protilátek specifických pro odpovídající cytokiny (Pharmigen, La Jolla, CA, USA) se podle pokynů výrobce provede kvantitativní stanovení ELISA pro IL-2, IFN-
 10 gamma, IL-4, IL-6 a IL-10.

Výsledky

Účinnost orálně podávaného kopolymeru-1 při prevenci klinických projevů EAE u Lewisových potkanů se porovná s účinností GPBP, přičemž zkouška se provádí za podmínek nedávno
 15 popsaných pro indukci potlačení pomocí orálního podávání GPBP (P.J. Higgins a H.L. Weiner, J. Immunol (1988), 140, 440 až 445). Výsledky, které jsou souhrnně uvedeny v tabulce 1, demonstrují, že kopolymer-1 je účinnější než GPBP a ve srovnání s výsledky u potkanů krmených PBS, kteří slouží jako kontrola, významně snižuje jak incidenci (54 % inhibice), tak i závažnost (57%
 20 inhibice) EAE.

Tabulka 1

Potlačení EAE u potkanů orálním podáváním kopolymeru-1

Podaný antigen	Incidence	Střední maximální hodnocení ± SD	Střední doba vypuknutí příznaků (dny)
PBS (kontrola)	27/28 (96 %)	1,8 ± 0,5	11,9
GPBP	10/17 (59 %) (p = 0,0026)	0,9 ± 0,5	11,4
Kopolymer-1	13/28 (46 %) (p = 0,00005)	0,78 ± 0,45	12,6

SD = směrodatná odchylka

Každá hodnota představuje kumulativní výsledek ze 3 až 5 nezávislých experimentů. Hodnota p představuje statistickou významnost rozdílu od kontrolní skupiny (Fischerův exaktní test). Střední maximální hodnocení bylo vypočteno pro celou skupinu.
 30

Účinek orálně podávaného antigenu na imunitní odpověď na GPBP

Účinek orálního podávání kopolymeru-1 GPBP na imunitní odpověď na chorobu indukovanou antigenem GPBP se zkouší na myších a potkanech. Výsledky, které jsou souhrnně znázorněny na obr. 1, ukazují, že každé orální podání sloučenin (kopolymeru-1 nebo GPBP) snížilo buněčnou proliferaci v suspenzi slezinných buněk potkana stimulovaných GPBP (obr. 2 znázorňuje podobné výsledky u myší). Je patrné, že orální podávání kopolymeru-1 u obou druhů zvířat vede k téměř úplné inhibici proliferativní odpovědi na GPBP. U obou těchto druhů je při inhibici odpovědi na GPBP kopolymer-1 účinnější než GPBP.
 40

Hladiny cytokinu se měří v supernatantech kultur buněk sleziny myšího původu (obr. 3 a 4). Kontrolní myši krmené PBS v odpovědi na GPBP vylučovaly IL-2, IFN-gama a IL-6 (není znázorněno). U myši krmených kopolymerem-1 nebo GPBP byla množství Th1 prozánětlivých cytokinů IL-2 a IFN-gamma produkovaná při odpovědi na stimulaci GPBP nižší než u kontrolních skupin, přičemž kopolymer-1 je účinnější supresantem. IL-4 a IL-10 nebyly detekovány u žádné skupiny.

Výsledky ukazují, že kopolymer-1, je-li podáván orálně, je při potlačování EAE účinný. Klinický ochranný účinek orálního podávání kopolymeru-1 je spojen s regulací směrem dolů imunitní odpovědi T buněk na GPBP, jako je proliferace a uvolňování prozánětlivých cytokinů (IL-2 a IFN-gama).

Příklad 2

Na myších a potkanech byly provedeny další zkoušky potlačování EAE pomocí orálního podávání kopolymeru-1. Při těchto studiích se stanoví optimální dávka pro léčení u každého druhu. Za účelem pochopení mechanismu, který je základem orálního potlačení EAE pomocí kopolymeru-1 se ze slezin zvířat krmených kopolymerem-1 izoluje linie T-buněk specifická vůči kopolymeru-1. Zkouší se in vitro reaktivita linií a jejich in vivo účinek na indukci choroby, která je předmětem zkoušky.

Materiály a postupy

Izolace kopolymer-1-specifických linií T-buněk

Potkani Lewis se krmí 5 x 1 mg kopolymeru-1 a myši (SJL/JxBALB/c)F₁ 7 x 250 µg kopolymeru-1, v intervalech 2 až 3 dnů. Čtyři až dvanáct dní po posledním krmení se zvířata usmrtí a vyjmou se jim sleziny.

Buňky sleziny od tří zvířat se spojí a inkubují (50×10^6 /miska) s kopolymerem-1 (500 µg) v médiu obsahujícím 1 % autologního séra po dobu 4 dnů. Každých 14 až 21 dnů se buňky ($4 \times 6 \times 10^6$ /miska) znovu stimulují třídenním vystavením kopolymeru-1 (500 µg) na syngenních ozářených (3000 rad) thymocytech potkana (100×10^6 /miska) nebo myších solenocytech (50×10^5 /miska). Po stimulaci následuje množení v 10% supernatantu normálních myších slezinných buněk aktivovaných konkalavinem Noc A, jako růstovým faktorem T-buněk (TCGF).

Zkouška proliferace

Linie T-buněk (1×10^4 buněk) se kultivují s ozářenými (3000 R) thymocyty (potkan 1×10^6) nebo splenocyty (myš – 5×10^5) a s uvedenými antigeny (10 µg kopolymeru-1, 1 µg Noc A) a mikrotitrových deskách v konečném objemu 0,2 ml. Na konci 48hodinové inkubace se kultury pulzují s ³H-thymidinem a po 6 až 12 hodinách sklídí.

Cytokinová zkouška

T-buňky potkaní linie ($0,5 \times 10^6$ /ml) se inkubují s ozářenými thymocyty (10×10^6) za přítomnosti nebo za nepřítomnosti uvedeného antigenu (50 µg kopolymeru-1, 5 µg Noc A). Buňky se kultivují 24 hodin v RPMI 1640 doplněném 10 % fetálního telecího séra – za účelem stanovení IL-2, TNFα, IL-4 a IL-10 a v médiu bez séra – DCM-1 (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Izrael) po dobu 72 hodin – za účelem stanovení TGFβ.

Hladiny cytokinu v supernatantech se měří pomocí kvantitativního stanovení ELISA za použití párů monoklonálních protilátek specifických pro odpovídající cytokiny.

Indukce EAE

- 5 Myšim (SJL/xBALB/c) F_1 se injekčně do všech čtyřech tlapek podají 2 mg homogenátu myší míchy (MSCH) emulgované v Detroit, Mich., USA). Bezprostředně poté a po 48 hodinách se potkanům intravenózní injekcí podá Toxin *Bordetella pertussis* (250 ng/myš) (Sigma).

Výsledky

- 10 1. Zkouška závislosti odpovědi na dávce na potkanech a myších

Potkani se krmí 5 x 0,5, 1 nebo 2 mg kopolymeru-1 podle výše uvedeného protokolu (viz materiály a postupy) a poté provokují za účelem indukce EAE. Výsledky, které jsou souhrnně uvedeny v tabulce 2, ukazují, že nejúčinnější dávkou je 1 mg kopolymeru-1. Dávky 0,5 mg nebo 2 mg kopolymeru-1 jsou při potlačování EAE účinné méně.

20 Myši (SJL/JxBAB/c) F_1 se krmí 7 x 0,1, 0,25 nebo 0,5 mg kopolymeru-1 ve dnech -7, -5, -3, 0, 2, 4 a 6 pomocí žaludeční sondy. EAE se indukuje v den 0 injekčním podáním MSCH. Výsledky, které jsou souhrnně znázorněny na obr. 5, ukazují, že orální podání kopolymeru-1 může potlačit tuto chorobu u myší. Nejúčinnější dávkou kopolymeru-1 je 0,1 mg. Dávka kopolymeru-1 0,25 mg je účinná méně a dávka 0,5 mg je zcela neúčinná. Výsledky získané na potkanech i myších ukazují, že křivka závislosti odpovědi na dávce u kopolymer-1 podávaného orálně má optimum a překročení účinné orální dávky vede k neúčinnému potlačení EAE.

- 25 2. Zkoušky s Ts-liniami specifickými vůči kopolymeru-1 získanými do zvířat krměných kopolymerem-1

30 Linie supresorových T-buněk specifická vzhledem ke kopolymeru-1 se izoluje ze slezin potkanů a myší, u nichž byla díky krmění kopolymerem-1 potlačena odpověď na EAE. Odpověď, vyjádřená pomocí proliferace a sekrece cytokinu, takové buněčné linie izolované z potkanů je demonstrována na obr. 6. Buňky této linie v odpovědi na kopolymer-1 proliferují a uvolňují IL-2, určité množství IL-10 a TGF β , ale neuvolňují TNF α nebo IL-4. Tento cytokinový profil je kompatibilní s buňkami typu Th3, o nichž se ukázalo, že jsou indukovány orálním podáním MBP (Chem et al., Science 265, 1237, 1994).

35 Zkouší se schopnost linií specifických vzhledem ke kopolymeru-1 zabránit EAE in vivo. Buněčné linie se podají injekčně 3 dny po in vivo stimulaci kopolymerem-1 (20×10^6 buněk/potkan, i.p. a 15×10^6 buněk/myš, i.v.). Ihned po přenosu buněk se zvířata provokují na indukci EAE. Výsledky, které jsou znázorněny na obr. 7 a 8, ukazují, že u recipientních zvířat byla choroba podstatně inhibována. Jak potkanní, tak myší linie T-buněk specifických vzhledem ke kopolymeru-1 přenášejí potlačení odpovědi na EAE indukovanou orálním podáním kopolymeru-1. Tyto buňky účinně snižují patologickou imunitní odpověď in vivo.

Tabulka 2

Zkouška závislosti odpovědi na dávce u potkanů při orálním podávání kopolymeru-1

5

Podaný antigen	Incidence	Střední maxi- mální hodno- cí ± SD	Střední doba vypuknutí příznaků	Potlačení* (%)
PBS (kontrola)	10/11	1,32±0,64	13,1	
Kopolymer-1 (0,5 mg)	9/11	0,95±0,57	13,5	28
Kopolymer-1 (1 mg)	7/11	0,64±0,50	15,1	51
Kopolymer-1 (2 mg)	8/11	0,91±0,70	13,1	31

* vypočteno jako střední hodnota

Každá z hodnot incidence představuje kumulativní výsledky ze 2 individuálních zkoušek. Střední maximum klinického hodnocení se vypočítá za celou skupinu.

10

Příklad 3

Zkouší se účinek orálně podávaného kopolymeru-1 na indukci EAE u makaků Rhesus.

15

Materiály

Kopolymer-1 pochází od firmy Teva Pharmaceutical Industries Ltd. a je ve formě tvrdých želatinových tobolek s enterickým povlakem, které obsahují dvě úrovně dávek: 1 mg kopolymeru-1 a 20 mg kopolymeru-1. Každá z nich byla připravena za použití mannitolu a opatřena povlakem z Eudragitu L30D55. Placebem, či kontrolními tobočkami, jsou tobolky obsahující 5 mg cukru.

20

Hovězí MPB pochází od firmy Life Technologies, Grands Island, New York, US. Tento materiál představuje vysoce purifikovaný přípravek, který při SDS-PAGE a Silverově barvení vykazuje jediný pás při 18,5 kD.

25

Režim krmení

Tři makakové rhesus se ošetří následujícím způsobem: jedna opice, která slouží jako kontrola, se krmí placebem (tobolky obsahující pouze 5 mg glukózy). Druhá opice se krmí tobočkami obsahujícími kopolymer-1 v dávce 1 mg/krmení a třetí opice se krmí tobočkami obsahujícími kopolymer-1 v dávce 20 mg/krmení. Zvířata se krmí každý další den, celkem desetkrát, z toho pětkrát před indukcí choroby (imunizace v den 0) a pětkrát po imunizaci.

30

Indukce choroby

Choroba se indukuje v den 0 intradermální injekcí 8 mg hovězího MBP a 3 mg *M. tuberculosis* H37Ra a FCA do zadních tlapek, přičemž celkový objem injekce na tlapku je 0,1 až 0,15 ml. U zvířat se sleduje klinická manifestace EAE, různé sérové a CSF imunologické markery a míšní a kraniální MRI.

Klinické hodnocení

Symptomy se hodnotí následujícím způsobem: 0 – normální neurologické vyšetření, 1 – ztráta hmotnosti, anorexie, zívání, pomalá odpověď na stimul, dráždivost nebo letargie, 2 – mírné neurologické příznaky, netečnost, slintání, nemotornost při používání končetin, třas, změněný křik a pohledové poruchy, 3 – středně těžké neurologické příznaky, slepota (pupily nereagují na světlo), akinese, ochabnutí končetin nebo paralýza, 4 – těžké neurologické příznaky, semikóma, kóma, kvadruplegie, 5 – smrt.

Proliferace lymfocytů indukovaná antigenem

Vzorky heparinizované krve se zředí v pomru 1 : 1 Hanksovým vyváženým solným roztokem (BSS) obsahujícím 5% teplotě inaktivované fetální telecí sérum (FCS) a rozdělí v gradientu Hypaque-Ficol. Centrifugací (2000 min⁻¹, 20 minut při teplotě místnosti) a izoluje zředěná plazma a lymfocyty se odstředí na rozhraní. Izolované lymfocyty se promyjí třikrát v Hankově BSS–5% FCS a resuspendují v RPMI 1640, úplném médiu obsahujícím médium RPMI 1640, 10% FCS a 1% následující činidla: neesenciální aminokyseliny, pyrohroznan sodný, L–glutamin, 2–merkapt ethanol a penicilin/streptomycin. Izolované lymfocyty se spočítají a resuspendují v konečné koncentraci 2 x 10⁶/ml. Kultury obsahující 100 µl buněčné suspenze a 100 µl MBP (20 µg/jamka), 100 µl kopolymeru–1 (10 µg/jamka) nebo 100 µl Noc A (1 µg/jamka) se navzorkují na desky s 96 jamkami s kulatým dnem. Kultury se udržují 6 dní při 37 °C v atmosféře 5% oxidu uhličitého. Pátý den kultivace se každá jamka pulzuje 1 µCi ³H–thymidinu po dobu 16 až 18 hodin. Šestý den se kultury sklídí za použití automatického zařízení pro sklizeň buněk a spočítají pomocí kapalinové scintilace. Stimulační index se stanoví pomocí následujícího vzorce

$$\text{Stimulační index} = \frac{\text{experimentální počet impulzů za minutu (cpm)} - \text{počet impulzů za minutu (cpm) pozadí}}{\text{počet impulzů za minutu (cpm) pozadí}}$$

Klinické hodnocení

Po dobu 24 dní žádné ze zvířat nevykazovalo klinické příznaky. U zvířete 18374, léčeného placebem, 25. den došlo k rozvinutí choroby. Vzhledem k závažné manifestaci EAE (hodnocení stupněm 4+ z pětistupňové stupnice) zvíře bylo 28. den usmrceno. Zvíře 18498, ošetřené vysokou dávkou (20 mg) kopolymeru–1, během šedesátidenního období pozorování nevykázalo žádné významné klinické symptomy. U zvířete 18497 ošetřeného nízkou dávkou kopolymeru–1 se 25. den začaly projevovat minimální symptomy. Na rozdíl od zvířete 18374, ošetřované placebem, zvíře 18497 vykazovalo pomalejší prohlubování klinických symptomů, které v době mezi 28. až 33. dnem ustálily na stupni hodnocení 2 až 3+. Poté byly zvířeti 18497 obden po dobu 10 dnů, celkem tedy pětkrát, podány 20mg tobolek. Jak je vidět na obr. 9, v průběhu 3 dnů klinické příznaky u zvířete poklesly na stupeň 0 a na tomto stupni zůstaly až do doby, kdy byla obě zvířata ošetřována kopolymerem–1, 18497 a 18498, usmrcena za účelem provedení histologických zkoušek (60. den).

Průtoková cytometrie

- 5 Pro analýzu lymfocytů a periferní krvi (PBL) a mozkomíšního moku (CSF) shromážděných od každé opice se použije průtokového cytometru Epics C. Červené krvinky se lyzují a zbývající bílé krvinky (WBC) se promyjí a barví vhodnými činidly za použití standardních postupů. V tabulkách 3 a 4 jsou uvedeny údaje v barvení PBL a CSF WBC získané od tří zvířat z tohoto příkladu.
- 10 Počet obarvených buněk (CD4+) byl u zvířat krmených kopolymerem-1, 18497 a 18498, mírně vyšší než u kontrolního zvířete 18374. Ukázalo se, že počet buněk CD4+, které byl zároveň CD45RA-, byl jak u kontrolního zvířete 18374, tak u zvířete 18497, ošetřovaného nízkou dávkou kopolymeru-1 zvýšený v době, kdy se u těchto zvířat objevily klinické symptomy (dny +27 až +34). Oproti tomu u zvířete 18498 ošetřovaného vysokou dávkou kopolymeru-1 zůstal tento
- 15 počet v podstatě konstantní. Počet obarvených buněk CD8+CD45RA+ se u kontrolního zvířete 18374 a zvířete ošetřovaného nízkou dávkou kopolymeru-1 18497 stále snižoval, avšak u zvířete krmeného vysokou dávkou kopolymeru-1 18498 se mírně zvyšoval (což ukazuje produkci nových buněk CD4+).
- 20 Počet buněk nalezených v CSF kontrolního zvířete 18374 se ode dne 20+ do dne 28+, kdy zvíře pošlo, stále zvyšoval. Analýza ukázala, že většina buněk CD4+ byla CD45RA-. Buněk shromážděných z CSF zvířete 18497 bylo příliš málo na to, aby je bylo možno spočítat nebo barvit. Buněk shromážděných od zvířete 18498 bylo příliš málo na to, aby je bylo možno spočítat nebo barvit, s výjimkou dne +27. Shromážděné buňky CD4+ byly v tomto případě převážně
- 25 CD45RA-.

Tabulka 3

- 30 Analýza lymfocytů v periferní krvi (PBL) získaných od makaků rhesus imunizovaných MBP

Opice	Den zkoušky	CD4+	CD8+	Poměr	CD4+ CD45RA+	CD8+ CD45RA+
18374 (kontrolní)	(-1)	24	47	0,51	15	45
	(+6)	24	42	0,57	15	40
	(+13)	23	40	0,58	12	38
	+20	22	45	0,49	10	45
	+27	24	27	0,89	10	23
	+28	24	24	1,0	10	21

Tabulka 3 - pokračování

Opice	Den zkoušky	CD4+	CD8+	Poměr	CD4+ CD45RA+	CD8+ CD45RA+
18497	-1	35	36	0,97	21	33
(1 mg kopo-	+6	39	31	1,26	24	29
lymeru-1/ dávka)	+13	37	34	1,09	16	29
	+20	41	32	1,28	18	25
	+27	35	27	1,3	12	18
	+34	ND	ND	ND	ND	ND
18498	-1	37	40	0,93	23	32
(20 mg kopo-	+6	37	42	0,88	23	32
lymeru-1/ dávka)	+13	41	46	0,89	24	37
	+20	27	57	0,47	12	41
	+27	37	52	0,71	22	41
	+34	ND	ND	ND	ND	ND

ND = nestanoveno

5

Tabulka 4

Analýza mozkomíšního moku makaků rhesus imunizovaných MBP

Opice	Den zkoušky	Buňky (μ l)	CD4+	CD8+	Poměr CD4+/ CD8+	CD4+ CD45RA+	CD8+ CD45RA+
18374	0	ND	**				
	+14	28	**				
	+20	100	61	18	2,18	2	4
	+28	294	35	35	0,94	4	8

10

Tabulka 4 - pokračování

Opice	Den zkoušky	Buňky (μ l)	CD4+	CD8+	Poměr CD4+/ CD8+	CD4+ CD45RA+	CD8+ CD45RA+
18497	0	**					
	+14	**					
	+20	**					
	+27	**					
	+34	**					
18498	0	**					
	+14	**					
	+20	**					
	+27	29,7	47	ND		8	ND
	+34	**					
	+41	**					

** = příliš málo buněk

ND = nestanovení

5

Analýza induktoru faktoru antigen-specifických supresorových T-buněk (Tscfi)

Údaje z analýzy na MBP-specifický Tsfí v plazmě tří opic z tohoto příkladu jsou uvedeny dále v tabulkách 5 a 6. Do dne +13 po indukci EAE pomocí MBP žádné ze zvířat neprodukovalo MBP-specifický Tsfí. Kontrolní zvíře 18374 neprodukovalo žádný Tsfí do dne +20 a od tohoto dne byla produkovaná hladina těsně nad pozadím. Zvířata krmená kopolymerem-1 18497 a 18498 ode dne +13 shodně produkovala významné hladiny Tsfí až do dne +41, krátce před ukončením zkoušky.

V tabulce 6 jsou uvedeny údaje ze vzorků plazmy, které neobsahovaly Tsfí a nereagovaly s protilátkou anti-TGF-beta. Plazma, která vykazuje MBP vazbu s protilátkou 3C9 (anti-Tsfí), rovněž reaguje s protilátkou anti-TGF-beta. Rekombinantní lidský TGF-beta reaguje s protilátkou anti-TGF-beta, ale nikoliv s protilátkou 3C9.

20

Tabulka 5

Analýza induktoru faktoru MBP-specifických supresorových T-buněk (Tcsfi)^a

Zvíře číslo	-13	-1	+6	+13	+20	+27	+34	+41
18374	žádný	žádný	ND	ND	0,17	0,21	smrt	
18497	žádný	žádný	žádný	0,60	0,61	0,56	0,66	0,76
18498	žádný	žádný	žádný	0,32	0,32	0,42	0,40	0,40

^a Údaje představují optickou hustotu OD při 405 nm
vzorků plazmy při zředění 1 : 20

ND = nestanoveno

5

Tabulka 6

10 Spojitost mezi MBP-specifickým Tsfi a TGF-beta v plazmě makaků rhesus

Zvíře číslo	Den zkoušky	anti-Tsfi ^a (protilátka 3C9)	anti-TGF-beta ^b
18374	-1	žádná	žádná
	+27	0,21	žádná
18497	+6	žádná	žádná
	+13	0,60	0,71
	+27	0,56	0,65
	+41	0,76	0,85
18498	+6	žádná	žádná
	+13	0,32	0,35
	+27	0,42	0,47
	+41	0,40	0,45
	rekombinantní lidský TGF-beta ^c	-	0,72

15 ^a Představuje optickou hustotu OD při 405 nm látky, která se vážala k MBP (2,5 µg proteinu) a reaguje s anti-humánní Tsfi (3C9) protilátkou.

^b Představuje optickou hustotu OD při 405 nm látky, která se vážala k MBP a reaguje s anti-humánní TGF-beta protilátkou.

- b Představuje optickou hustotu OD při 405 nm látky, která se vázala k MBP a reaguje s anti-humánní TGF-beta protilátkou.
- c Představuje jamku potaženou 100 ng rekombinantního lidského TGF-beta

5

Příklad 4

Šest opic se ošetří a provede se analýza za použití v podstatě stejného postupu, jaký je popsán výše v příkladu 3.

10

Kontrolní zvíře krmené placebem 18746 se krmí tobolkami obsahujícími glukózu. Zvíře 18586 se krmí 1 mg kopolymeru-1 v tobolkách s prasklým enterickým povlakem. Zvíře 18639 se krmí 20 mg kopolymeru-1 v tobolkách s prasklým enterickým povlakem. Zvíře 18724 se krmí 1 mg kopolymeru-1 v tobolkách s neporušeným enterickým povlakem. Zvíře 18810 se krmí 10 mg kopolymeru-1 v tobolkách s neporušeným enterickým povlakem. Zvíře 18962 se krmí 20 mg kopolymeru-1 v tobolkách s neporušeným enterickým povlakem.

15

Režim krmení, indukce choroby a sledování dalšího průběhu jsou stejné jako v příkladu 3.

20

Výsledky

Jak je zřejmé, z obr. 10, u kontrolní opice 18746 se rozvinula akutní choroba počínaje dnem +21 a opice uhynula v den +23 na projevy této choroby. Zvířata 18586 a 18639, jimž byly podány tobolky s prasklým enterickým povlakem, které se v žaludku otevřely (při obou dávkách) před chorobou nebyla chráněna a uhynula v průběhu 2 až 3 dnů na projevy choroby. Všechny opice krmené kopolymerem-1 v tobolkách s enterickým povlakem byly plně chráněny před chorobou a až do 60. dne, kdy byly usmrceny za účelem provedení histologických zkoušek, se u nich ne-
rozvinuly žádné příznaky EAE.

30

PATENTOVÉ NÁROKY

35

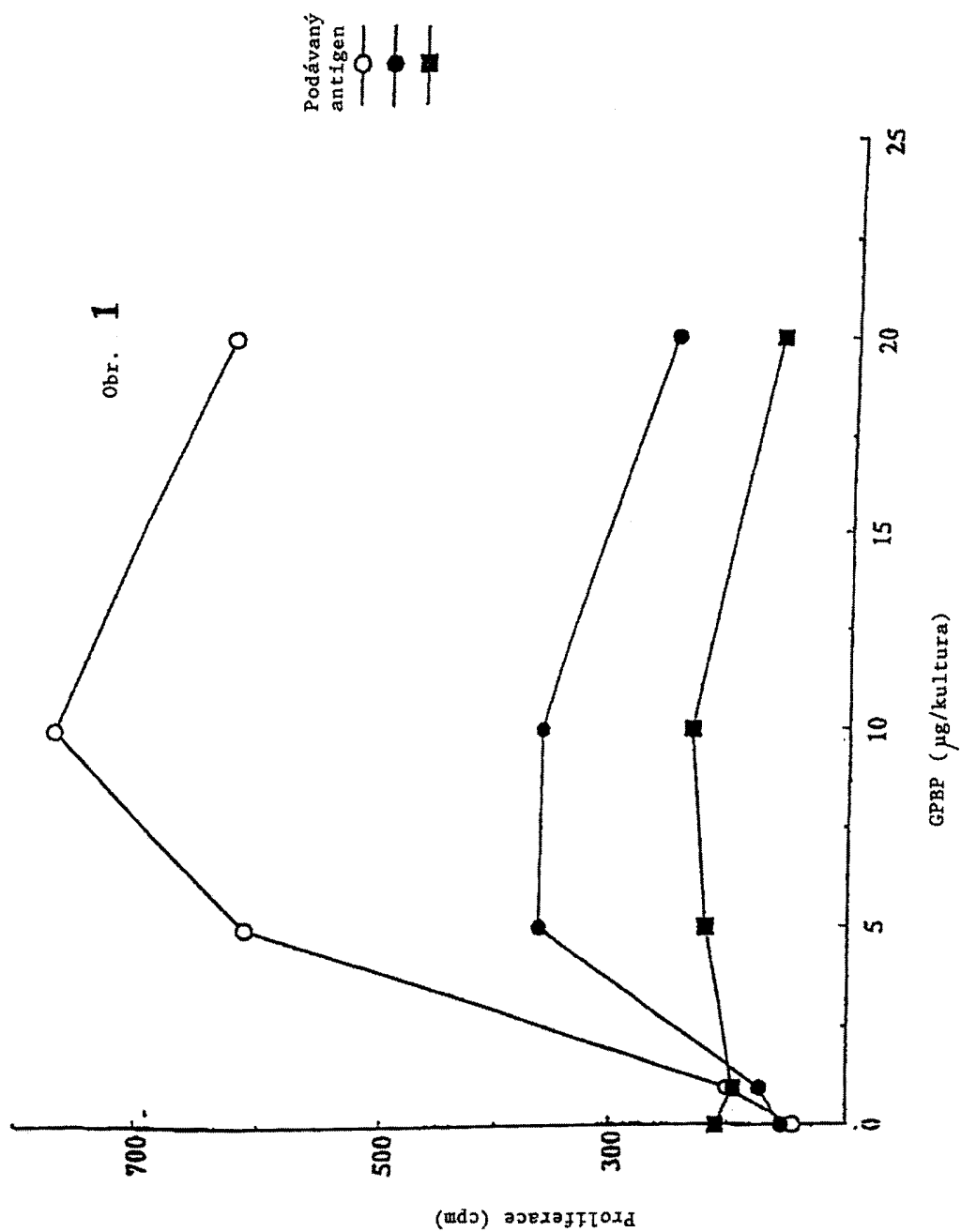
1. Použití glatiramer acetátu v pevné formě a v množství 0,1 až 1000 mg pro výrobu entericky potažené kompozice pro perorální podávání pro léčení roztroušené sklerózy.
- 40 2. Použití podle nároku 1, kde entericky potaženou kompozicí je entericky potažená tobolka.
3. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde množství je 1 mg, 10 mg nebo 20 mg.
4. Farmaceutická kompozice, **vyznačující se tím**, že obsahuje glatiramer acetát v pevné formě v množství 0,1 až 1000 mg v entericky potažené kompozici.
- 45 5. Farmaceutická kompozice podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že entericky potaženou kompozicí je entericky potažená tobolka.
- 50 6. Farmaceutická kompozice podle nároku 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že enterický potah obsahuje Eudragit S.

7. Farmaceutická kompozice podle nároku 4 nebo 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že enterický potah obsahuje Eudragit L.

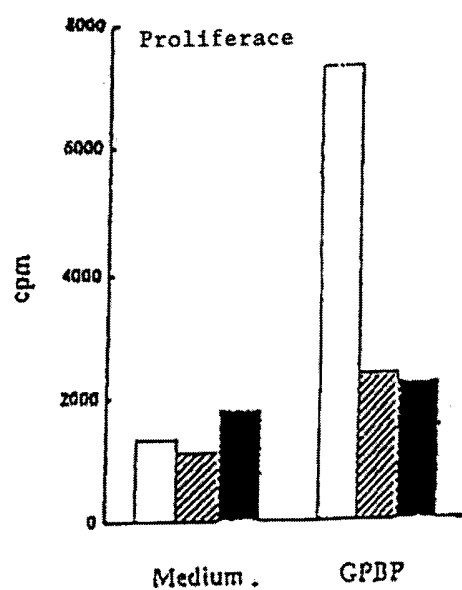
5 8. Farmaceutická kompozice podle nároku 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že Eudragit L je L30D55.

10

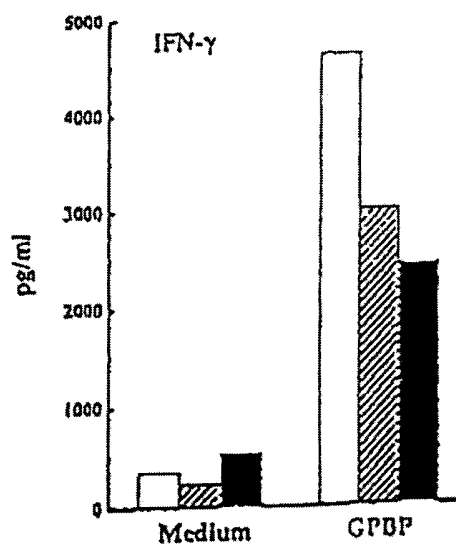
8 výkresů



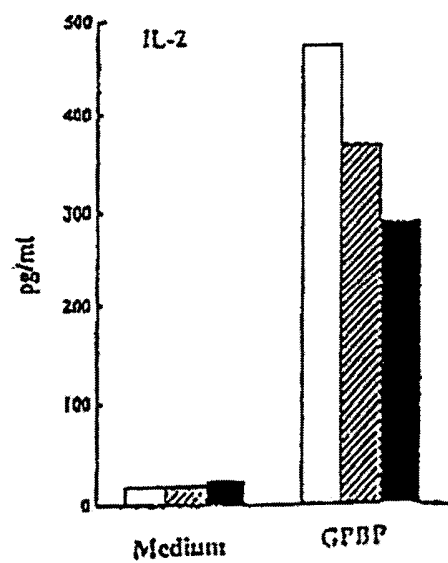
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



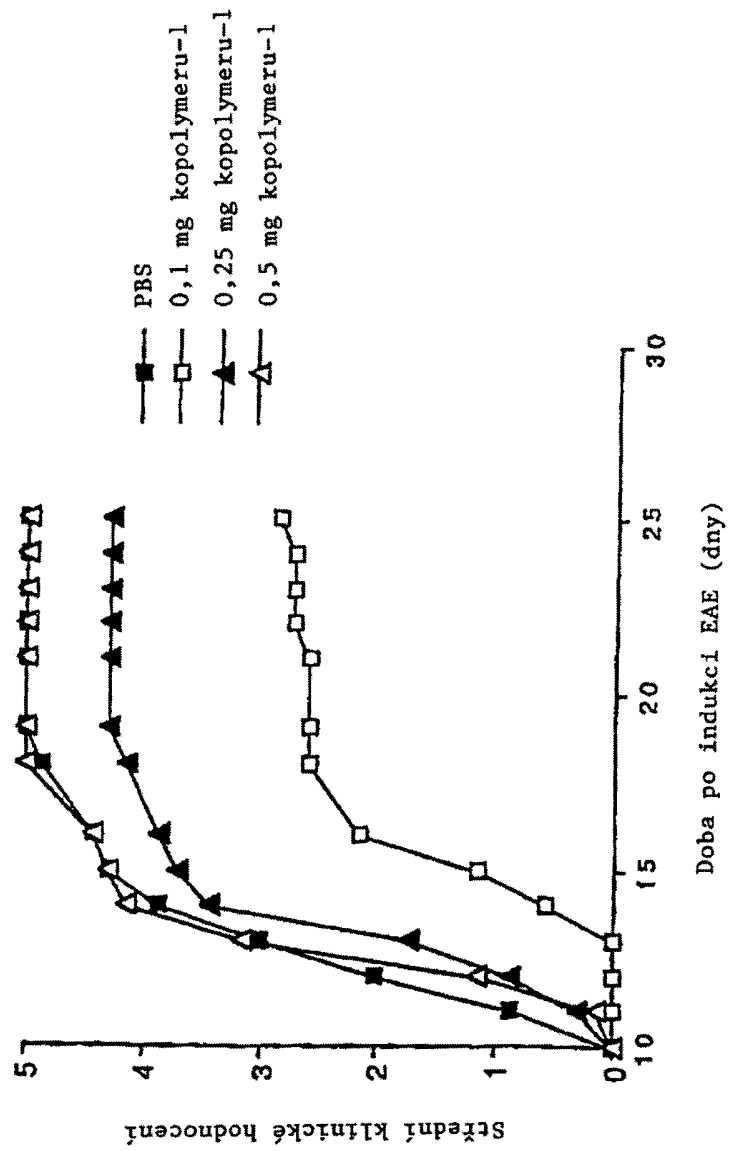
Podávaný
antigen

□ PDS

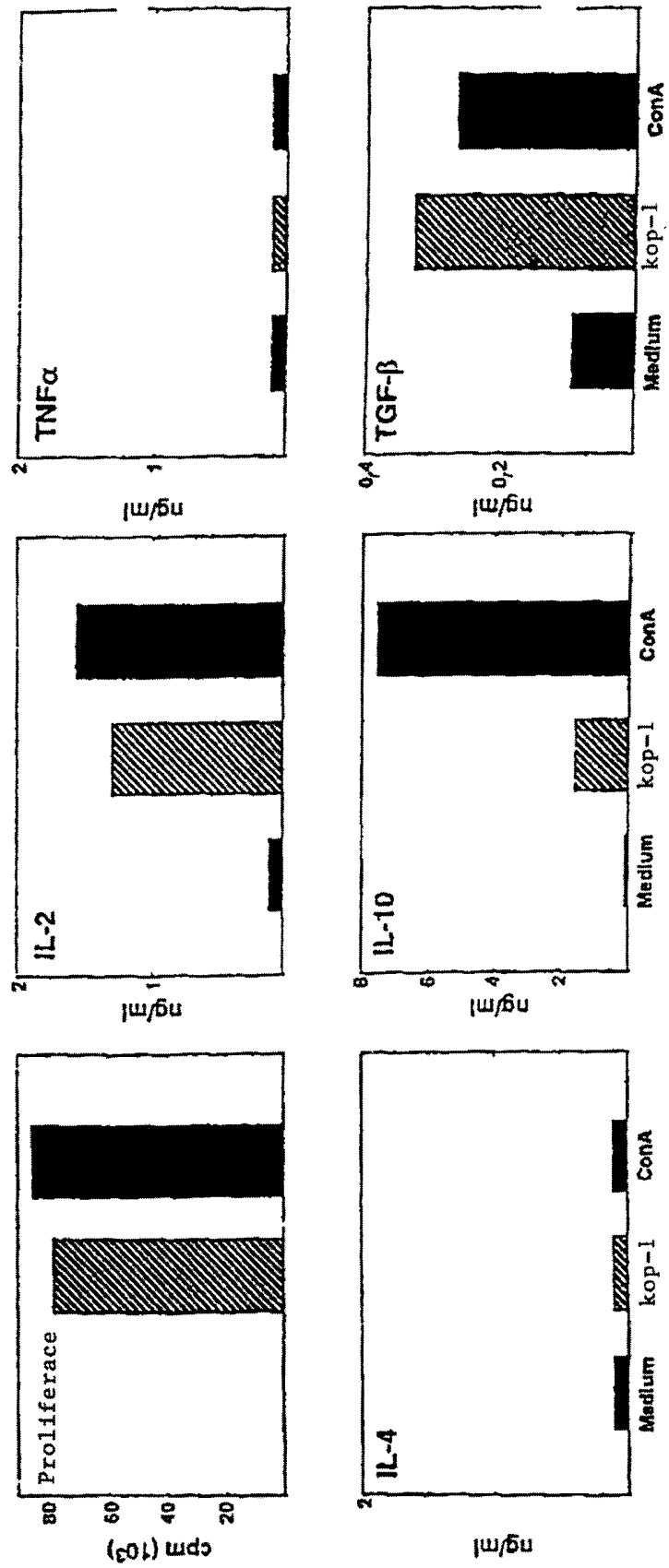
▨ GPBP

■ kopolymer-1

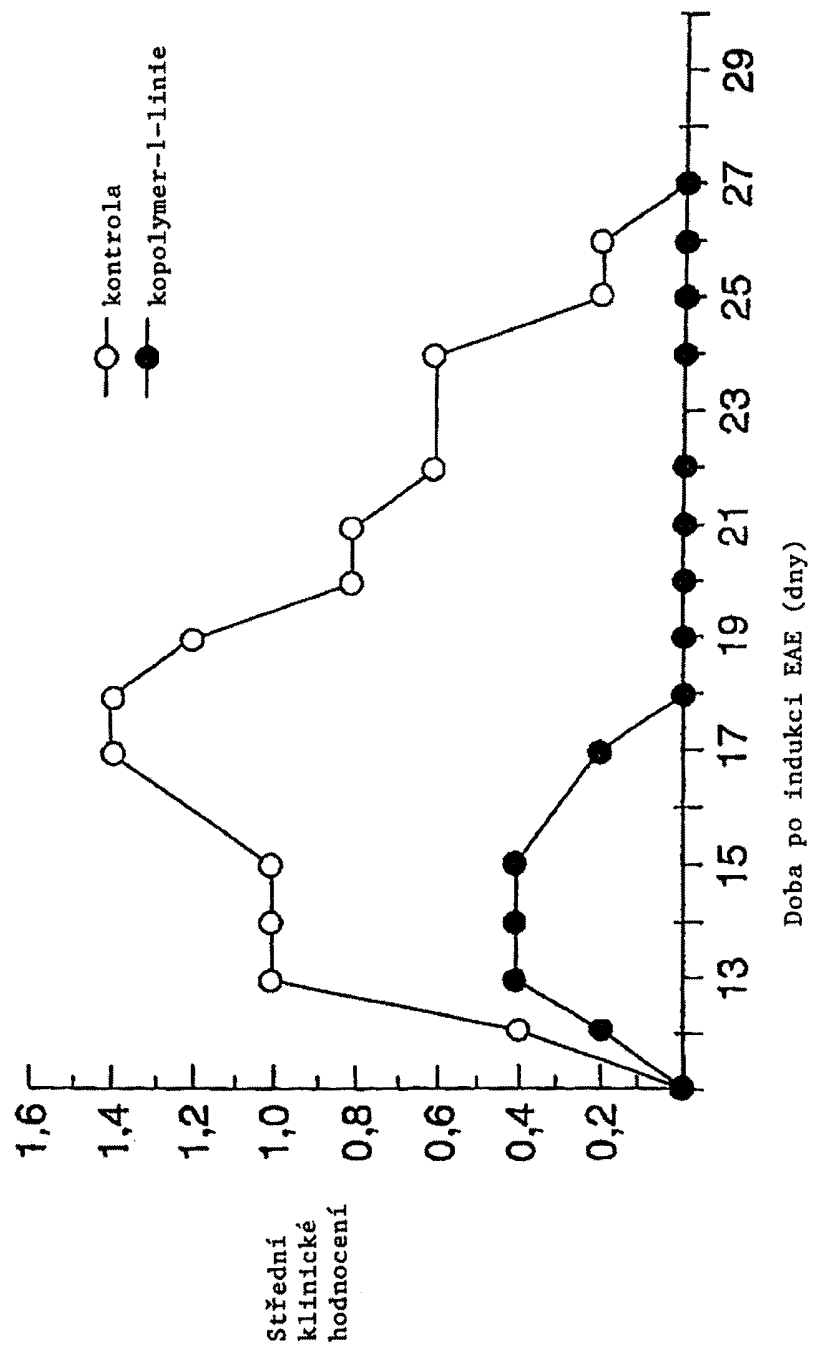
Obr. 5



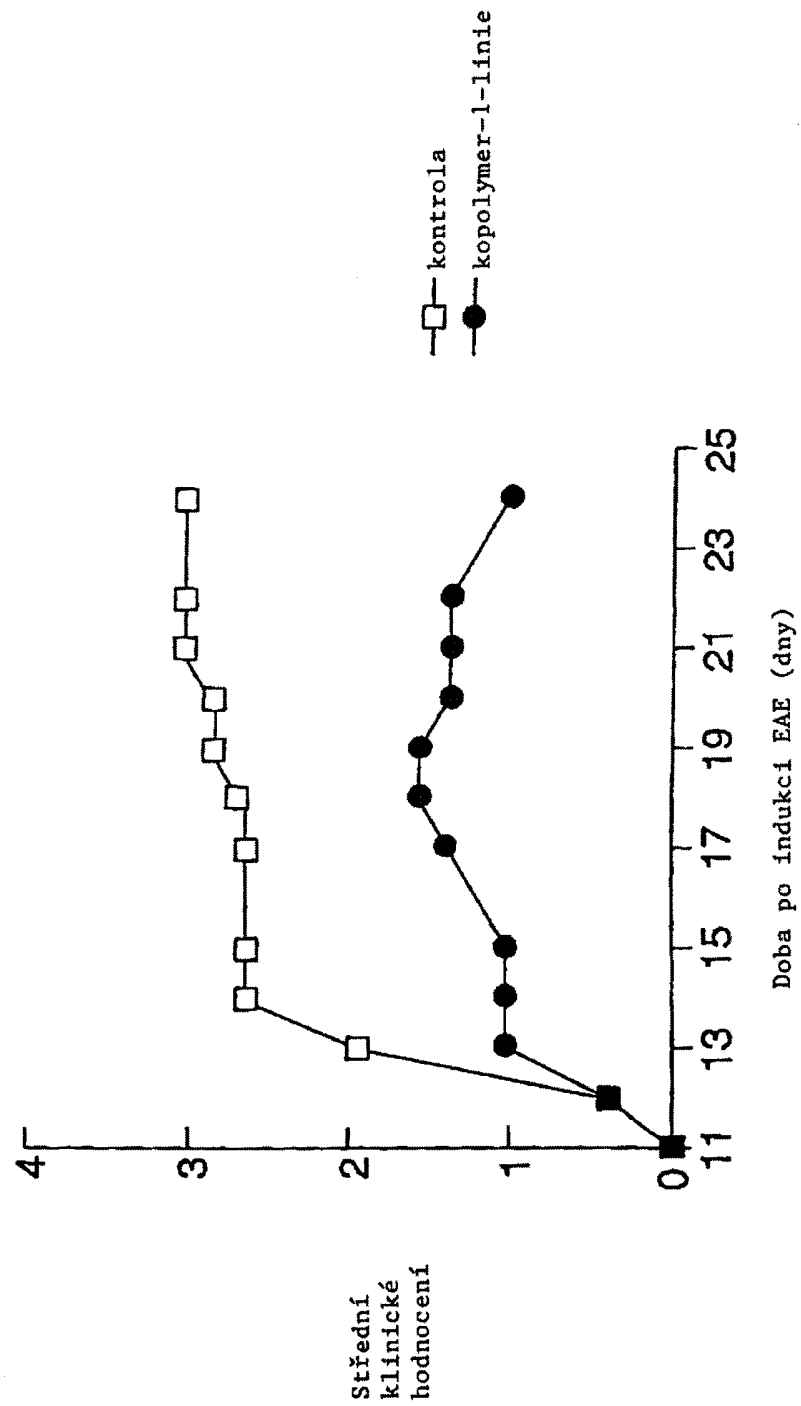
Obr. 6



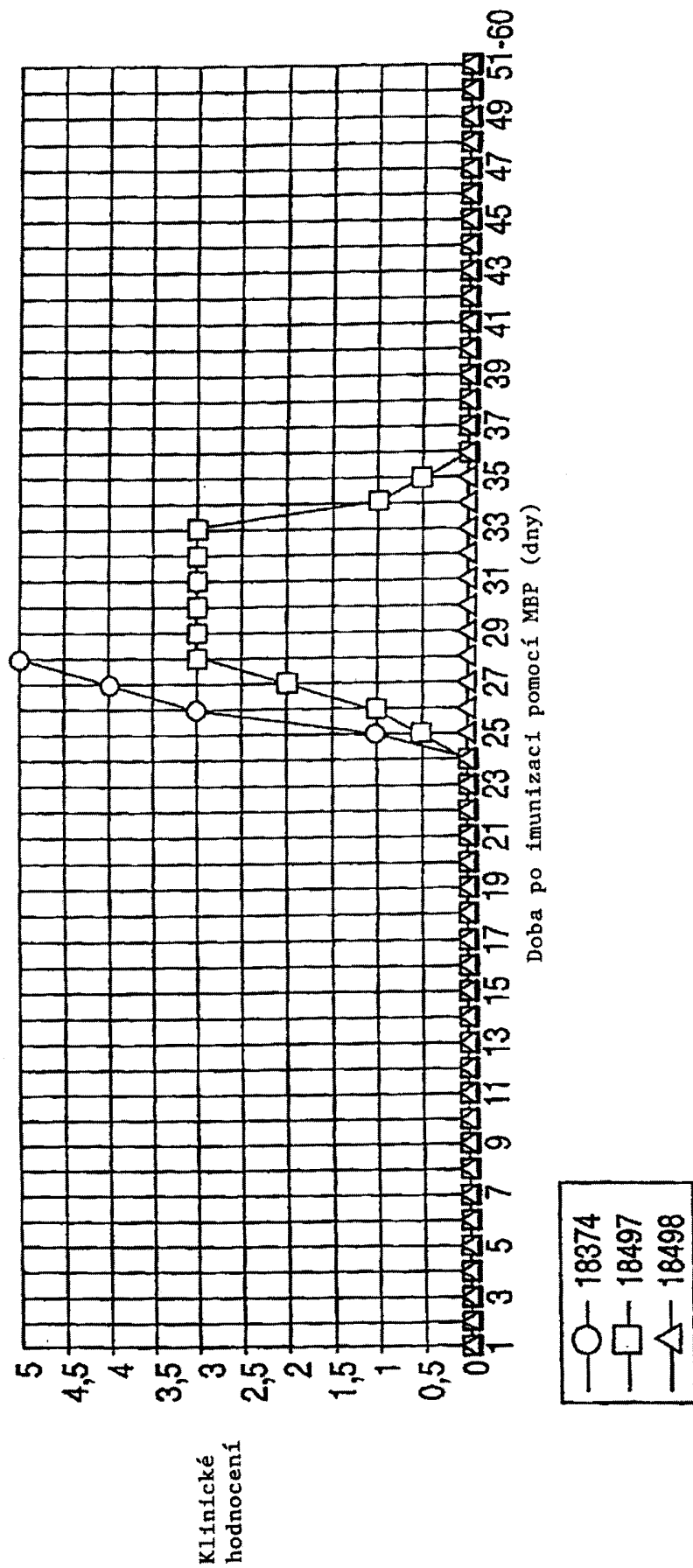
Obr. 7



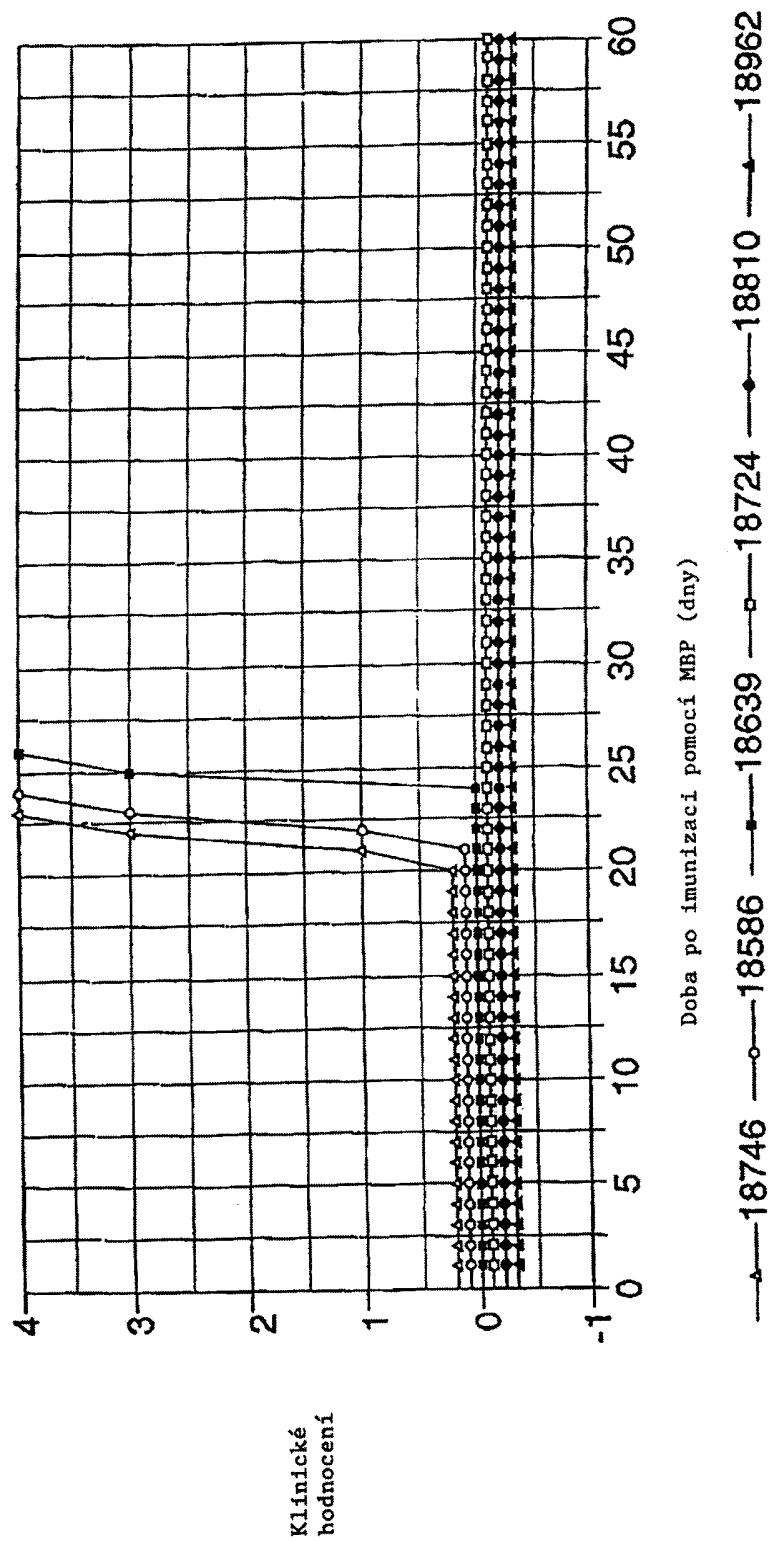
Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10



Konec dokumentu