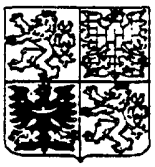
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

281 663

ČESKÁ REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1824-92**

(22) Přihlášeno: 15. 06. 92

(30) Právo přednosti:
18. 06. 91 US 91/717773

(40) Zveřejněno: 15. 12. 93

(47) Uděleno: 07. 10. 96

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11. 12. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[6]:
A 61 K 35/70
A 61 K 35/66

(73) Majitel patentu:
AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION, New York, NY, US;

(72) Původce vynálezu:
Miller Glenn Alvin, Miami, FL, US;
Rabin Mark Barry, Miami, FL, US;
Harrington William Joseph Jr., Miami, FL, US;

(54) Název vynálezu:
Farmaceutický prostředek pro léčení T-buněčné leukemie /lymfomu dospělých

(57) Anotace:
Řešení se týká farmaceutického prostředku pro léčení T-buněčné leukemie/lymfomu dospělých, který jako svou účinnou složku obsahuje antiproliferativní množství rapamycinu a mimoto obsahuje farmaceutický nosič. Prostředek je vhodný zejména pro zastavení progrese nebo vyvolání remise uvedeného onemocnění a je možno jej podávat perorálně i parenterálně.

CZ 281 663 B6

Farmaceutický prostředek pro léčení T-buněčné leukemie/lymfomu dospělých

Oblast techniky

Vynález se týká farmaceutického prostředku pro léčení T-buněčné leukemie/lymfomu dospělých. Prostředek obsahuje jako svou účinnou složku rapamycin.

Dosavadní stav techniky

T-buněčná leukemie/lymfom dospělých (dále ATL) je agresivní hematologické onemocnění, charakterizované rychlým neproměnným fatálním průběhem. Klinické projevy ATL zahrnují hyperkalcémii, infiltraci kostní dřeně, generalizovanou lymfadenopathii, leukemii, kožní projevy, hepatosplenomegalii a lytické kostní poškození.

Lidský T-lymfotropní virus 1 (dále HTLV-1) je etiologickým původcem ATL. Důkaz o spojení HTLV-1 s ATL zahrnuje epidemiologické seskupení ATL v zeměpisných oblastech s endemickým výskytem infekcí, způsobených HTLV-1, (Hinuma Y., Proc. Natl. Acad, Sci., 78:6476, 1981, Watanabe T., Virology 133:238, 1984, Catovsky D, Lancet 1:639, 1982, Blatter W. A., Int. J. Ca. 30:257, 1982), vysoká frekvence specifických protilátek v séru pacientů s ATL (Hinuma Y., Proc. Natl. Acad. Sci., 78:6476, 1981), detekce monoklonálních provirových sekvencí, zabudovaných v leukemických buňkách pacientů s tímto onemocněním (Yoshida M., Proc. Natl. Acad. Sci., 81:2534, 1984) a izolace infekčních virů z leukemických buněčných kultur. (Poiesz B. J., Proc. Natl. Acad. Sci., 77:7415, 1980, Yoskida M., Proc. Natl. Acad. Sci., 79:2031, 1982).

T-buňky transformované HTLV-1 jsou charakterizovány nekontrolovatelným růstem při absenci antigenní stimulace.

Nezávislý růst IL-2 je znakem těchto buněčných kultur. Povrchový fenotyp těchto buněk je určován významným růstem IL-2 receptorů. Nové důkazy ukazují, že tyto receptory mají vysokou afinitu k IL-2R. Většina T-buněk, izolovaných od infikovaných osob, nebyla testována, nicméně reagovala na zevní podání IL-2 (Kodaka T., Jpn. J. Ca. Res., 81:902, 1990).

Virus HTLV-1 byl označen za přenosný sexuálně, z matky na dítě kojením, mezi intravenózními narkomany (pravděpodobně sdílením nakažených jehel) a krevní transfuzí (Hino S., Gann 76:474, 1985, Murphy E. L., Ann. Int. Med., 111:555, 1989, Sato H., Int. J. Ca. 37:395, 1986, Robert-Guroff N., J.A.M.A., 255:3133, 1986). Infekce virem vyvolává asi ve 4 % případů nebezpečí rozvoje ATL (Murphy E. L., Ann. Int. Med., 111:555, 1989).

Výskyt viru HTLV-1 u obyvatel Spojených států se nově stal veřejnou zdravotní záležitostí. Epidemiologická studie, pořízená ve velkých městech Spojených států, odhalila průměrný výskyt u 0,025 % zdravých dárců krve. /Wiliams, A. E., Science, 240:643 -1988-/. Nejnovější epidemiologické údaje, uvádějící seropozitivitu u 4,4 % zdravé černé populace v Brooklynu, New Yorku ukazují, že seroprevalence velmi významně závisí na vzorku populace.

/Dosik, H., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 9:2 -1990-/. Khabbaz /J.A.M.A. 263:60 -1990-/ označuje průměrnou seroprevalenci 6,7 % mezi prostitutkami. Tyto údaje dosahují od nízkého 0 % v Nevadě k vysokým 25,4 % v Newarku. NJ označuje různé počty dokonce mezi vysoce rizikovými skupinami.

Mezinárodně HTLV-1 je přítomen v endemickém výskytu v různých oblastech světa. Jihozápadní ostrovy Japonska byly dlouho označovány jako endemická oblast výskytu infekce HTLV-1. /Jpn. J. Clin. Oncol. 15:517 -1985-/. Například seroprevalence 8 % byla zjištěna u zdravých dobrovolných dárců krve v jižních prefekturách Kjúšú. /Maeda, Y., Int. J. Ca 33:717 -1984-/. Seroprevalence 9,2 % mezi jinak zdravými pracovníkemi v potravinářství ve věku nad 30 let byla hlášena na Jamaice. /Murphy, E. L., Ann. Int. Med. 111:555 -1989-/. Seroprevalence vzrostla na 14,1 % u žen ve sňatkovém věku, videných na klinice sexuálně přenosných nemocí na Jamaice. Rizikové faktory virové infekce následují očekávaný vzorek sexuálně přenosných nemocí.

Ačkoliv serologické a molekulárně genetické testy jsou schopny zobrazit HTLV-1 infekci, nejsou běžné prostředky k diagnóze časné ATL. Zároveň nejsou žádné efektivní terapeutické prostředky pro pozdní stadia nemocí, to znamená přežití méně než 6 měsíců po stanovení diagnózy. Neúspěšné léčebné pokusy byly hlášeny při užití radiace, methotrexatu, leukovirinu, interferonu SQ, vysokých dávek steroidů a kombinací, obsahujících cyklofosfamid, adriamycin, onkovin, prednison a bleomycin. /Harrington, J. Aids 4:284 -1991-/. Účinná léčba ATL byla hlášena při použití SUN4800 /rekombinantní interferon gamma/. /Ishihara, K., J. Invest. Dermatol. 93:556 -1989-/. 90 % reakce byla hlášena u 3 z 10 ATL pacientů, léčených anti-Tac myší protilátky proti lidským p55 IL-2 peptidovým receptorům. /Tac; CD25/. /Junghans, R., 37:861A -1989-/.

Rapamycin, makrocyklické antibiotikum, produkované Streptomyces hygroscopicus (US patent č. 3 929 992), bylo ukázáno jako schopné uchránit útvary humorálních protilátek (jako IgE) v odpovědi na albuminovou alergickou reakci (Martel R., Can. J. Physiol. Pharm. 55:48, 1977), zastavit T-buněčnou aktivaci (Strauch M., FASEB 3:3411, 1989) a prodloužit čas přežití orgánových histokompatibilních schopností (Morris R., Med. Sci. Res., 17:877, 1989).

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří farmaceutický prostředek pro léčení T-buněčné leukemie/lymfomu dospělých u savců, který obsahuje antiproliferativní dávky rapamycinu a farmaceuticky přijatelný nosič. Je možno jej podávat orálně, parenterálně, intranasálně, intrabronchiálně, topicky, transdermálně nebo rektálně. Zvláště je rapamycin užitečný v zastavení progrese a navození remise ATL svojí schopností inhibovat proliferaci T-buněk transformovaných HTLV-1.

Efekt rapamycinu na ATL byl založen na in vitro provedených standardních farmakologických testech při použití lidských T-buněčných kultur transformovaných HTLV-1, získaných od ATL pacientů. Tyto buněčné řady jsou v současné době nejlepším modelem

ATL u lidí. Cyklosporin A (CsA) byl použit pro porovnání. Použité postupy a získané výsledky jsou popsány níže.

Farmaceutické testy

ATL buněčné řady byly založeny podle postupů, popsaných v literatuře. ATL5S, ATL31 a ATL1K byly založeny podle metody, popsané Hoshinem (Proc. Natr. Acad. Sci., 80:6061, 1983). Buněčné řady 31008, 31009, 31016 a AT(ECG) byly získány z periferní krve osob, nakažených HTLV-1, kultivací přes krevní lymfocyty. Buněčná řada MALN byla izolována z lymfoidní tumorózní tkáně ATL pacientů, infikovaných HTLV-1, léčených na Jackson Memorial/University Medical Centru na Miami. (Harrington W. J., Jr., J. Acq. Imm. Def. Dis. 4:284, 1991). Primární kultury BL a GP byly získány z periferní krve ATL pacientů. MALM, BL a GP buněčné řady byly zahájeny bez společné kultivace.

Buňky byly upraveny na koncentraci 1 x 10^6 buněk/ml v RPMI 1640 s 15 % fetálního bovinního séra a doplněny 50U/ml penicilinu 50 µg/ml streptomycinu a 2 mM glutaminu. Rapamycin a CsA byly zvlášť ředěny na koncentraci 1 mM v absolutním ethanolu postupným ředěním. Koncentrace léku stoupala od 1 µM do 100 fM. Kultury byly inkubovány při 37 °C, 5 % CO_2 po dobu 24 hodin, následovaných 4 hodinami značení 0.5 uCi thymidinu. Inkorporace thymidinu byla měřena tekutou scintilací a výsledky vyjádřeny v počtu jednotek za minutu /cpm/. Výsledky, získané ze 4 měření každé koncentrace, byly porovnány s kontrolními hodnotami k určení procenta inhibice. Následující vzorek byl použit k výpočtu procenta inhibice:

$$\text{procento inhibice} = \frac{\text{cpm /bez léku/} - \text{cpm /lék/}}{\text{cpm /bez léku/}} \times 100$$

Procento inhibice, získané s rapamycinem, je ukázáno v následující tabulce.

Procento inhibice ATL buněčné proliferace

Koncentrace rapamycinu	buněčné řady									
	ATL31	ATL52	ATL1K	ATECG	31008	31009	31016	MALN	GP	BL
1 uM	28	59	19	58	69	71	59	55	54	80
100 nM	17	58	32	60	68	70	56	54	46	79
10 nM	15	49	18	45	58	67	49	41	46	76
1 nM	18	48	26	53	54	68	48	43	42	73
100 pM	11	47	23	49	45	61	49	37	39	65
10 pM	6	38	12	44	31	47	47	26	14	55
1 pM	11	14	15	48	30	59	50	36	20	56
100 fM	7	36	15	44	29	60	44	36	23	51

Rapamycin inhiboval proliferaci 8 z 10 ATL buněčných řad při koncentraci 100 nM a více, s 50 % redukcí proliferace ve 4 buněčných řadách při koncentraci 1 nM. Obě buněčné řady u kterých proliferace nebyla rapamycinem zastavena, byly v kultuře více než 5 let bez reklonování a jejich areaktivita k rapamycinu může být zavinéna jejich další transformací v necitlivé kmeny během tohoto období. Pro srovnání, CsA nezastavil proliferaci u 7 z 10 hodnocených buněčných řad. Ve zbývajících 3 buněčných řadách /ATL31, ATL5S a 31009/ byla proliferace inhibována v 16 %, 23 %, případně ve 22 %.

Výsledky, získané těmito standardními farmakologickými testy, demonstrují, že rapamycin inhibuje proliferaci T-buněčných řad transformovaných HTLV-1, které jsou v současné době nejlepším modelem pro ATL u lidí, a tak, že rapamycin je užitečný pro léčbu ATL.

Pokud se rapamycin použije k léčbě ATL, může se podat volný nebo vázaný na farmakologický nosič. Farmakologický nosič může být tuhý nebo tekutý.

Tuhý nosič může obsahovat jednu nebo více substancí, které mohou také působit jako příchuť, mazadlo, rozpouštědlo, zpevňující složka, plnidlo, klouzadlo, stlačovadlo, tablety vázající nebo rozkládající látka, může to být také obalující složka. V pudrech je nosič jemně rozdělená složka, smíchaná s jemně rozdělenou aktivní částí. V tabletách je aktivní složka smíchaná s nosičem, který má stlačující vlastnosti ve vhodných proporcích a je složena v žádaném tvaru a množství. Vhodné pevné nosiče zahrnují např. kalcium fosfát, magnezium stearát, cukr, laktózu, dextrin, škrob, želatinu, celulózu, mastek, methyl celulózu, carboxymethyl celulózu, polyvinylpyrolidin, nízko rozpustné vosky a pryskyřice.

Tekuté nosiče jsou používány pro přípravu roztoků, suspenzí, emulzí, sirupů, elixírů a překapávaných sloučenin. Aktivní látka může být rozpuštěna nebo suspendována ve farmakologicky vhodném tekutém nosiči, jako je voda, organické sloučeniny, směsi obou nebo farmaceutiky vhodné oleje a tuky. Tekuté nosiče mohou obsahovat další vhodné farmaceutické dodatky, jako solubilizéry, emulsifikátory, nárazníky, ochranné látky, sladidla, příchutě, zpevňující látky, zesilující látky, barviva, regulátory viskozity, stabilizátory nebo osmoregulátory. Vhodné příklady tekutých nosičů pro orální nebo parenterální podání zahrnují vodu /částečně obsahující přídatné látky jako nahoře, např. deriváty celulózy, nejlépe sodný carboxymethylcelulózový roztok/, alkoholy /včetně monohydrických alkoholů a polyhydrických alkoholů, např. glykoly/ a jejich deriváty a oleje /např. frakcionovaný kokosový olej/. Pro parenterální podání mohou být nosiči také estery olejů, jako ethyl oleát a isopropyl myristát. Sterilní tekuté nosiče jsou vhodné ve sterilních roztocích pro parenterální podání. Tekuté nosiče pro překapávané kompozice mohou být halogenované hydrokarbony nebo jiné farmaceuticky přijatelné látky.

Tekuté farmaceutické složky, kterými jsou sterilní roztoky nebo suspenze, mohou být utilizovány například intramuskulární, intraperitoneální nebo subkutání injekcí. Sterilní roztoky mohou být také podány intravenózně. Složka může být podána orálně jak v tekuté, tak v tuhé formě.

Rapamycin může být podán rektálně ve formě běžných čípků. Pro intranasální nebo intrabronchiální inhalaci nebo insuflaci může být rapamycin podán ve vodním nebo částečně vodním roztoku, může být pak utilizován ve formě aerosolu. Rapamycin může být také podán transdermálně při použití transdermální náplasti, obsahující aktivní složku a nosič, který je inertní k aktivní složce a je netoxický pro kůži a zároveň dovoluje látce průnik do krevního řečiště přes kůži. Nosič může mít řadu forem od krémů přes masti, pasty, gely a okluzivní prostředky. Krémy a masti mohou být viskózní tekutiny nebo semisolidní emulze typu olej/voda nebo voda/olej. Pasty se skládají z absorptivních pudrů v benzinu nebo hydrofilním benzinu, který obsahuje aktivní složku. Řada okluzivních prostředků může být použita k realizaci přenosu aktivní složky do krevního oběhu, jako např. semipermeabilní membrána, kryjící aktivní složku s nebo bez nosiče. Ostatní okluzivní prostředky jsou popsány v literatuře.

Rapamycin může být podán topicky jako roztok, krém nebo lotio formulací s vhodným farmaceutickým prostředkem, který obsahuje 0.1 - 5 procent, nejlépe 2 % aktivní složky.

Nároky na dávku se mění podle způsobu podání, podle vážnosti přítomných symptomů a zvláště podle léčeného subjektu. Podle výsledků, získaných standardními farmakologickými testy, by se měla denní dávka při parenterálním podání pohybovat od 0.01 ug/kg do 10 mg/kg, nejlépe 0.1 ug/kg do 2 mg/kg. Nejvhodnější parenterální podání rapamycinu je intravenózní. Navrhovaná denní dávka při orálním podání od 1 ug/kg do 15 mg/kg, nejlépe 0.01 mg/kg - 10 mg/kg. Léčba se má zahajovat dávkami nižšími než je dávka optimální. Postupně se dávka zvyšuje do získání optimálního efektu, přesná dávka je určena zkušeností lékaře, získané během léčby. Nejvhodnější dávkování rapamycinu je takové, které dosáhne léčebný efekt bez škodlivých vedlejších účinků a může být zvoleno podání jedné denní dávky nebo rozdělení dávky do několika dílů ve vhodných časových intervalech.

Pro léčbu ATL je zamýšleno podání rapamycinu spolu s ostatními chemoterapeutickými léky, jako je methotrexat, leukovirin, cyklofosfamid, adriamycin, oncovin, prednison, bleomycin a podobné, může být podán s vysokými dávkami steroidů, kombinován s radioterapií, léčbou cytokiny, jako je interferon, monoklonální protilátkovou terapií a ostatními typy léčby neoplastických onemocnění.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prostředek pro léčení T-buněčné leukemie/lymfomu dospělých, vyznačující se tím, že jako svou účinnou složku obsahuje antiproliferativní množství rapamycinu a mimoto farmaceuticky přijatelný nosič.

2. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, vyznačující se tím, že je určen pro parenterální podání.

3. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, vyznačující se tím, že je určen pro perorální podání.

4. Farmaceutický prostředek pro zastavení progrese nebo vyvolání remise T-buněčné leukemie/lymfomu dospělých, vyznačující se tím, že obsahuje antiproliferativní množství rapamycinu a farmaceutický nosič.

Konec dokumentu