

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.01.2002**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.01.2001**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/10101307**  
(33) Země priority: **DE**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:  
**(Věstník č: 4/2004)**  
(86) PCT číslo: **PCT/EP2002/000108**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/055067**

(21) Číslo dokumentu:

**2003-1918**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> :  
A 61 K 31/194 A 61 P 19/02  
A 61 K 31/225 A 61 P 19/06  
A 61 P 1/04 A 61 P 31/00  
A 61 P 1/16 A 61 P 35/00  
A 61 P 9/00  
A 61 P 11/00  
A 61 P 13/12  
A 61 P 17/00

(71) Přihlašovatel:  
FUMAPHARM AG, Muri, CH  
(72) Původce:  
Joshi Kumar Rajendra, Zürich, CH  
Strebel Hans-Peter, Luzern, CH  
Petzelbauer Peter, Wien, AT  
(74) Zástupce:  
Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Deriváty kyseliny fumarové jako inhibitory NF-kappaB**

(57) Anotace:  
Použití jednoho nebo více derivátů kyseliny fumarové jako inhibitoru NF-kappaB a pro přípravu farmaceutického prostředku k léčbě nemocí, které mohou být ovlivněny NF-kappaB.

CZ 2003 - 1918 A3

Deriváty kyseliny fumarové jako inhibitory NF-kappaB.

#### Oblast techniky

Tento vynález se týká použití jednoho nebo více derivátů kyseliny fumarové jako inhibitoru NF-kappa B. Dále se tento vynález týká použití derivátů kyseliny fumarové pro přípravu farmaceutického prostředku k léčbě nemocí, které mohou být ovlivněny NF-kappaB.

#### Dosavadní stav techniky

Je známo, že farmaceutické přípravky, jako je kyselina fumarová, které po podání jsou biologicky degradovány a vstupují do citrátového cyklu nebo jsou jeho součástí, získávají na terapeutickém významu, zejména při podávání ve vysokých dávkách, protože mohou zmírnit nebo vyléčit nemocí způsobené kryptogeneticky. Dále kyselina fumarová inhibuje růst Ehrlichova ascitního nádoru u myši, snižuje toxické účinky mitomycinu C a aflatoxinu a vykazuje antilupénkovou a antimikrobiální aktivitu.

Nejdůležitějším praktickým použitím je léčba lupénky různými deriváty kyseliny fumarové, která již byla popsána v mnoha patentových spisech, jako například v EP 0 188 479, DE 25 30 372, DE 26 21 214 nebo EP 0 312 697.

Další použití určitých derivátů kyseliny fumarové, konkrétně alkyhydrogenfumarátů, je popsáno v DE 19721099.6 a DE 19853487.7. V těchto publikacích je popsáno použití těchto specifických derivátů kyseliny fumarové při léčbě autoimunitních nemocí, jako je polyartritida, roztroušená skleróza a reakce štěpu proti hostiteli. Dále v DE 19853487.6 a v DE 19839566.3 je popsáno použití alkyhydrogenfumarátů a dialkyfumarátů v transplantační

medicině. Ačkoliv byla provedena jednotlivá zkoumání mechanismu působení derivátů kyseliny fumarové při léčbě lupénky, neexistují žádné specifické informace na toto téma.

NF-kappaB (jaderný faktor kappaB) je transkripční faktor eukaryotických buněk. NF-kappaB patří do skupiny Rel proteinů, třídy transkripčních faktorů, vyznačujících se takzvanou Rel doménou. Rel doména byla pojmenována po prvním členu nalezeném v ptačím viru, který byl onkogenem. Specifická místa této homologní Rel domény (Rel homologní doména = RHD), která se skládá se z 300 aminokyselin, jsou zodpovědná za vazbu DNA na místa kappaB, za dimerizaci s dalšími proteiny Rel skupiny a za interakci s I-kappaB.

Doposud je u savců známo 5 členů skupiny Rel. Jsou to c-Rel, NF-kappaB1 (p105/p50), NF-kappaB2 (p100/p52) a RelB. Teoreticky těchto pět členů skupiny Rel proteinů může být kombinováno do jakékoliv formy homo- a heterodimerů, ačkoliv in vivo bylo pozorováno pouze několik specifických kombinací. Typická a nejlépe popsaná molekula NF-kappaB je heterodimer p50/p65 podjednotek NF-kappaB1/RelA. Tento heterodimer je nejběžnějším komplexem a nachází se prakticky ve všech typech buněk.

Po buněčné aktivaci a disociaci I-kappaB, NF-kappaB heterodimer p50/p65 migruje do buněčného jádra, kde se váže na odpovídající sekvenci 5'GGGRNNYYCC-3'. V tomto procesu podjednotka p50 především slouží jako vazebná podjednotka DNA, zatímco podjednotka p65 má transaktivační funkci.

V důsledku těchto odlišných kombinací každý z těchto heterodimerů vykazuje jedinečné charakteristické vlastnosti pokud jde o specificitu buněčného typu, preference s ohledem na DNA vazbu, rozdílnou interakci s izoformami I-kappaB, rozdílné aktivační požadavky a kinetiku aktivace.

K rychlé indukovatelnosti NF-kappaB přispívá skutečnost, že tento faktor je přítomen v cytoplazmě v neaktivní formě, totiž v komplexu navázaném na inhibitor I-kappa B. Proto pro aktivaci není potřeba žádná nová syntéza proteinu, ale pouze rozpuštění tohoto komplexu s I-kappaB nebo degradace tohoto inhibitoru a následné přemístění právě aktivního dimeru NF-kappaB do jádra.

NF-kappaB může být aktivován celou řadou fyziologických a nefyziologických stimulů. Mezi ně například patří cytokiny, mitogeny, viry, produkty virů, zesílení receptorů antigenu na T- a B-lymfocytech, ionofory vápníku, estery forbolu, UV-záření, oxidační stres, inhibitory fosfatasy. Rozsah mnoha regulovaných nebo aktivovaných genů prostřednictvím NF-kappaB je tak široký, že jeho transkripce je aktivována, vyvolána a zesílena vazbou heterodimeru na odpovídající sekvenci, jak je popsáno výše. Jako důležité stimulační látky mohou být zmíněny zejména tNF-alfa, IL-1, IL-2 a lipopolysacharidy. Tyto regulační geny obecně obsahují geny, které jsou zapojeny do imunitní funkce, zánětlivé odezvy, adheze buněk, růstu buněk, ale i odumření buněk. Zejména by měly být zmíněny geny molekul adheze buněk, cytokinů, receptorů cytokinů, proteinů akutní fáze, růstových faktorů a virů. Speciálně mezi geny indukované NF-kappaB patří geny pro interferon- $\beta$ , pro lehký řetězec imunoglobulinu, pro receptor T-buněk, pro TNF- $\alpha$  a TNF- $\beta$  a pro tkáňový faktor (CD142), dříve nazývaný tkáňový tromboplastin nebo faktor III.

Díky jeho ústřední úloze při regulaci imunitních reakcí a zánětlivých reakcí uvedených výše a jeho zapojení do regulace tkáňových faktorů, cytokinů, atd. se předpokládá, že při vývoji selektivních inhibitorů transkripce faktoru NF-kappaB mohou být očekávány podobné

výhody jako u již známých protizánětlivých činidel. Jako příklady mohou být jmenovány protizánětlivá steroidní činidla, interferony nebo cyklosporiny.

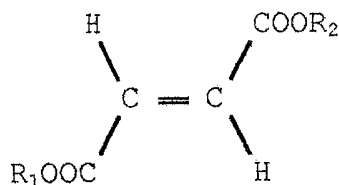
#### Podstata vynálezu

Překvapivě bylo nyní zjištěno, že jednotlivé deriváty kyseliny fumarové nebo jejich směsi mají inhibiční účinek vůči NF-kappaB. Tento účinek může být výhodně využit při přípravě farmaceutického prostředku obsahující tyto deriváty kyseliny fumarové buď jednotlivě nebo ve směsi pro léčbu nemocí, které jsou zprostředkovány nebo mohou být ovlivněny NF-kappaB. Mezi nemocí, které mohou být ovlivněny NF-kappaB, patří zejména progresivní generalizovaná sklerodermie, osteochondritida syfilitika (Wegenerova choroba), cutis marmorata (livedo reticularis), Behcetova choroba, panarteritida, vředovitá kolitida, vaskulitida, osteoartritida, dna, arterioskleróza, Reiterova choroba, plicní granulomatóza, druhy encefalitidy, endotoxický šok (septicko-toxický šok), sepse, pneumonie, encefalomyelitida, anorexia neurosis, hepatitida (akutní hepatitida, chronická hepatitida, toxická hepatitida, alkoholem vyvolaná hepatitida, epidemická hepatitida, žloutenka, selhání činnosti jater a cytomegalovirová hepatitida), Rennertova T-lymfomatóza, mesangiální nefritida, postangioplastická restenóza, reperfuční syndrom, cytomegalovirová retinopatie, adenovirová onemocnění jako jsou adenovirová nachlazení, faryngokonjunktivální horečka a adenovirová oftalmie, AIDS, Guillain-Barrého syndrom, postherpetická a postzosterová neuralgie, zánětlivá demyelinizační polyneuropatie, mononeuropathie multiplex, mukoviscidóza, Bechterewova choroba, Barrettův ezofagus, EBV infekce (Epstein-Barrův virus), srdeční přetvoření, intersticiální cystitida,

diabetes mellitus typu II, radiosenzibilizace lidských nádorů, multirezistence zhoubných buněk k chemoterapeutickým činidlům (rezistence při chemoterapii vůči více léčivům), kožní granulom a karcinomy, jako je karcinom prsu, karcinom tlustého střeva, melanom, karcinom primárních jaterních buněk, adenokarcinom, kaposi sarkom, karcinom prostaty, leukemii jako je akutní myeloidní leukémie, mnohočetný myelom (plazmocytom), Burkittův lymfom a Castlemanův nádor.

Podle tohoto vynálezu jeden nebo více derivátů kyseliny fumarové, vybraných ze skupiny sestávající z dialkylesterů kyseliny fumarové a monoalkylesterů kyseliny fumarové ve formě volné kyseliny nebo ve formě solí a jejich směsí, je výhodně použito pro inhibici NF-kappaB a pro přípravu farmaceutického prostředku.

Dialkylestery kyseliny fumarové výhodně odpovídají vzorci

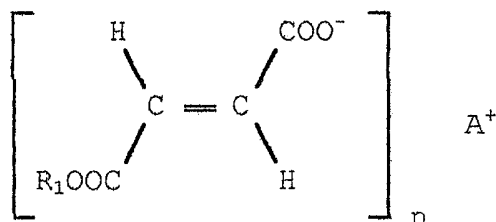


kde R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub>, které mohou být stejné nebo odlišné, jsou nezávisle lineárním, větveným, cyklickým, nasyceným nebo nenasyceným C<sub>1-24</sub> alkylovým radikálem nebo C<sub>5-20</sub> arylovým radikálem a tyto radikály jsou případně substituovány halogenem (F, Cl, Br, I), hydroxyskupinou, C<sub>1-4</sub> alkoxyskupinou, nitroskupinou nebo kyanoskupinou.

Radikály R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> jsou výhodně methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sek.butyl, terc.butyl, pentyl, cyklopentyl, 2-ethylhexyl, hexyl, cyklohexyl, heptyl, cykloheptyl, oktyl, vinyl, allyl, 2-hydroxyethyl, 2- nebo

3-hydroxypropyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2-methoxyethyl, methoxymethyl nebo 2- nebo 3-methoxypropyl.

Monoalkylestery kyseliny fumarové výhodně odpovídají vzorci



kde  $R_1$  je definován výše, A je vodík, kation alkalického kovu nebo kovu alkalických zemín nebo fyziologicky kompatibilní kation přechodného kovu, výhodně 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 nebo 2 a odpovídá mocenství A.

Tento vynález výhodně používá jeden nebo více derivátů kyseliny fumarové, vybraných ze skupiny obsahující dimethylester kyseliny fumarové, diethylester kyseliny fumarové, methylethylester kyseliny fumarové, methylhydrogenfumarat, ethylhydrogenfumarat, methylfumarat hořečnatý, ethylfumarat hořečnatý, methylfumarat zinečnatý, ethylfumarat zinečnatý, methylfumarat železnatý a ethylfumarat železnatý, methylfumarat vápenatý a/nebo ethylfumarat vápenatý.

Podle tohoto vynálezu jsou deriváty kyseliny fumarové výhodně použity pro přípravu farmaceutického prostředku v takovém množství, že jedna dávkovací jednotka tohoto farmaceutického prostředku obsahuje množství derivátu/derivátů kyseliny fumarové odpovídající nebo ekvivalentní 1 až 500 mg, výhodně 10 až 300 mg a nejvýhodněji 10 až 200 mg kyseliny fumarové.

Výhodnými formami aplikace pro tento farmaceutický prostředek je orální, parenterální, rektální, transdermální, nazální, pulmonální (inhalační) nebo oftalmické podávání (ve formě očních kapek), výhodné je orální podávání. Potom bude tento prostředek přítomen ve vhodné formě pro každý typ podávání.

Při orálním podávání je tento farmaceutický prostředek přítomen ve formě jednotlivých tablet s jednotkovou dávkou, mikrotablet (tablety s vícejednotkovými dávkami) nebo minitablet, mikrokuliček nebo granulí (tyto mikrotablety, mikrokuličky nebo granule jsou případně zakapsulovány nebo plněny do obalů), kapslí nebo roztoků pro pití. Ve výhodném provedení tuhé dávkovací nebo aplikované formy jsou opatřeny enterosolventním povlakem. Takový povlak může také být nanesen na zakapsulované nebo plněné dávkovací formy.

V případě parenterálního podávání injekcí (intravenózně i. v., intramuskulárně i. m., subkutánně s. c., intraperitoneálně i. p.) je prostředek přítomen ve vhodné formě. Pro injekce mohou být použity všechny vhodné běžné kapalné nosiče.

Tento farmaceutický prostředek může výhodně obsahovat buď jednotlivě nebo ve směsi: 10 až 500 mg dialkylfumarátu, zejména dimethylfumarátu a/nebo diethylfumarátu; 10 až 500 mg alkylfumarátu vápenatého, zejména methylfumarátu vápenatého a/nebo ethylfumarátu vápenatého; 0 až 250 mg alkylfumarátu zinečnatého, zejména methylfumarátu zinečnatého a/nebo ethylfumarátu zinečnatého; 0 až 250 mg alkylhydrogenfumarátu, zejména methylhydrogenfumarátu a/nebo ethylhydrogenfumarátu; a 0 až 250 mg alkylfumarátu hořečnatého, zejména methylfumarátu hořečnatého a/nebo ethylfumarátu hořečnatého; souhrnná výše uvedená množství

odpovídají ekvivalentu 10 až 500 mg, výhodně 10 až 300 mg a nejvýhodněji 100 mg kyseliny fumarové.

Výhodné prostředky podle tohoto vynálezu obsahují pouze dimethylfumarat v množství 10 až 300 mg.

Ve zvláště výhodném provedení je tento prostředek přítomen ve formě mikrotablet nebo mikrokuliček. Ty výhodně mají velikost nebo střední průměr  $\leq 5\ 000\ \mu\text{m}$ , výhodněji velikost 300 až 2 500  $\mu\text{m}$ , zejména 300 až 1 000  $\mu\text{m}$  pro kuličky a 1 000 až 2 500  $\mu\text{m}$  pro mikrotablety. Při podávání derivátů kyseliny fumarové ve formě mikrotablet, což je výhodné provedení podle tohoto vynálezu, může být dále sníženo gastrointestinální dráždění a vedlejší účinky, které nemohou být vyloučeny při podávání běžných tablet s jednotlivou jednotkovou dávkou. To je pravděpodobně způsobeno skutečností, že mikrotablety, výhodně mikrotablety s enterosolventním povlakem, jsou již rozptýleny v žaludku a proto se dostávají do intestinálního traktu po částech, kde jsou aktivní složky uvolňovány místně v menších dávkách, zatímco celková dávka zůstává stejná. Toto naopak napomáhá se vyhnout místnímu dráždění epiteliálních intestinálních buněk, z čehož vyplývá zlepšená gastrointestinální tolerance mikrotablet ve srovnání s běžnými tabletami.

Deriváty kyseliny fumarové obsažené v prostředcích podle tohoto vynálezu jsou připraveny například způsobem popsaným v EP 0 312 679.

#### **Příprava vzorků**

Orální prostředky podle tohoto vynálezu ve formě tablet nebo mikrotablet mohou být připraveny klasickými tabletovacími pracovními postupy. Kromě těchto klasických tabletovacích pracovních postupů mohou být použity další

způsoby přípravy tablet, jako je přímé tabletování a rovněž i způsoby přípravy tuhých disperzí prostřednictvím tavení nebo sprejového sušení.

Tyto tablety mohou být opatřeny enterosolventním povlakem. Tento enterosolventní povlak může být nanášen v klasické potahovací pánvi nebo sprejově. Tento povlak může být také nanášen v Boegelově potahovacím zařízení. Dále tato tableta může být opatřena tenkým povlakem.

Z důvodu vysvětlení použití tohoto vynálezu jsou dále uvedeny různé příklady přípravy výhodných léčiv. Tyto příklady objasňují, ale neomezují tento vynález.

### Příklady provedení vynálezu

#### **Příklad 1**

Příprava tenkých tablet s enterosolventním povlakem obsahujících 100,0 mg vápenaté soli monomethylfumarátu, což odpovídá 78 mg kyseliny fumarové

Za dodržení nezbytných bezpečnostních opatření (ochranná maska, rukavice, ochranný oděv atd.) bylo 10 kg vápenaté soli monomethylfumarátu rozdrceno, intenzivně promícháno a homogenizováno za použití síta 800. Potom byla připravena směs vehikula následujícího složení: 21 kg derivátu škrobu (STA-RX 1500<sup>®</sup>), 2 kg mikrokrystalické celulózy (Avicel PH 101<sup>®</sup>), 0,6 kg polyvinylpyrrolidonu (PVP, Kollidon<sup>®</sup> 25), 4 kg Primogel<sup>®</sup>, 0,3 kg koloidní kyseliny orthokřemičité (Aerosil<sup>®</sup>).

K úplné práškové směsi byla přidána aktivní složka, směs byla míchána, homogenizována za použití síta 200 a zpracována s 2% vodným roztokem polyvinylpyrrolidonu (PVP, Kollidon<sup>®</sup> 25) obvyklým způsobem do pojivových granulí,

které byly potom míchány s vnější fází v suchém stavu. Tato fáze sestávala z 2 kg takzvaného FST komplexu obsahujícího 80 % mastku, 10 % kyseliny orthokřemičité a 10 % stearatu hořečnatého.

Potom byla tato směs lisována obvyklým způsobem do vypouklých tablet o hmotnosti 400 mg a průměru 10,0 mm. Místo těchto klasických způsobů lisování mohou být také pro přípravu tablet použity další způsoby, jako je přímé lisování nebo příprava tuhých disperzí pomocí tavení a sprejového sušení.

### **Enterosolventní povlak**

Roztok 2,250 kg ftalatu hydroxypropylmethylcelulózy (HPMCP, Pharmacoat HP® 50) byl rozpuštěn v směsi rozpouštědel skládající se z 2,50 l demineralizované vody, 13 l acetonu Ph. Helv. VII a 13 l ethanolu (94 hmotn. procent), potom bylo k tomuto roztoku přidáno 0,240 kg ricinového oleje (Ph. Eur. II). Tento roztok byl nalit nebo rozprašován po částech na jádra tablet běžným způsobem v potahovací pánvi nebo nanášen v zařízení vhodné konstrukce s fluidní vrstvou.

Po sušení byl nanesen tenký povlak. Tento povlak se skládal z roztoku Eudragitu E 12,5%® 4,8 kg, mastku Ph.Eur. II 0,34 kg, oxidu titanového Cronus RN 56® 0,52 kg, barevného laku ZLT-2 blue (Siegle) 0,21 kg a polyethylenglykolu 6000 Ph.Helv. VII 0,12 kg ve směsi rozpouštědel skládající se z 8,2 kg 2-propanolu Ph. Helv. VII, 0,06 kg glyceroltriacetatu (Triacetin®) a 0,2 kg demineralizované vody. Po homogenní distribuci v potahovací pánvi nebo v fluidní vrstvě byla směs sušena a leštěna obvyklým způsobem.

### **Příklad 2**

Příprava enterosolventních kapslí obsahujících 86,5 mg vápenaté soli monoethylfumarátu a 110,0 mg dimethylfumarátu, což odpovídá celkovému množství 150 mg kyseliny fumarové

Za dodržení nezbytných bezpečnostních opatření (ochranná maska, rukavice, ochranný oděv atd.) bylo 8,65 kg vápenaté soli monomethylfumarátu a 11 kg dimethylfumarátu intenzivně smícháno se směsí skládající se z 15 kg škrobu, 6 kg laktózy Ph. Helv.VII, 2 kg mikrokrytalické celulózy (Avicel®), 1 kg polyvinylpyrrolidonu (Kollidon® 25) a 4 kg Primogel® a homogenizováno za použití síta 800.

Společně s 2% vodným roztokem polyvinylpyrrolidonu (Kollidon® 25) byla celá prášková směs zpracována obvyklým způsobem do pojivových granulí a smíchána s vnější fází v suchém stavu. Tato vnější fáze se skládala z 0,35 kg koloidní kyseliny orthokřemičité (Aerosil®), 0,5 kg stearátu hořečnatého, 1,5 kg mastku Ph.Helv.VII. Tato homogenní směs byla potom plněna v dávkách 500,0 mg do vhodných kapslí, které byly potom potaženy známým způsobem enterosolventním povlakem (odolným vůči žaludeční kyselině) skládajícím se z stearátu hydroxypropylethylcelulózy a ricinového oleje jako zvláčňovadla. Kromě tvrdých želatinových kapslí směs může být také plněna do vhodných kapslí odolných vůči žaludeční kyselině, které se skládají ze směsi acetatftalátu celulózy (CAP) a ftalátu hydroxypropylethylcelulózy (HPMCP).

### **Příklad 3**

Příprava mikrotablet s enterosolventním povlakem v kapslích obsahujících 87,0 mg vápenaté soli monoethylfumarátu, 120 mg dimethylfumarátu, 5,0 mg hořečnaté soli

monoethylfumaratu a 3,0 mg zinečnaté soli monoethylfumaratu, což odpovídá celkově 164 mg kyseliny fumarové ("forte" tablety)

Za dodržení nezbytných bezpečnostních opatření (ochranná maska, rukavice, ochranný oděv atd.) bylo rozmělněno 8,7 kg vápenaté soli monoethylfumaratu, 12 kg dimethylfumaratu, 0,5 kg hořečnaté soli monoethylfumaratu a 0,3 kg zinečnaté soli monoethylfumaratu, směs byla potom následně intenzivně promíchána a homogenizována za použití síta 800. Potom byla připravena směs vehikula následujícího složení: 18 kg derivátu škrobu (STA-RX 1500), 0,3 kg mikrokrytalické celulózy (Avicel PH 101), 0,75 kg PVP (Kollidon 120), 4 kg Primogelu, 0,25 kg koloidní kyseliny orthokřemičité (Aerosil). K úplné práškové směsi byla přidána aktivní složka směsi, směs byla homogenizována za použití síta 200 a zpracována obvyklým způsobem s 2% vodným roztokem polyvinylpyrrolidonu (Kollidon K25) za vzniku pojivových granulí, které byly potom míchány v suchém stavu s vnější fází skládající se z 0,5 kg stearatu hořečnatého a 1,5 kg mastku. Potom byla tato prášková směs lisována běžným způsobem do vypouklých mikrotablet o celkové hmotnosti 10 mg a průměru 2,0 mm. Místo těchto klasických způsobů lisování mohou být také pro přípravu tablet použity další způsoby, jako je přímé lisování nebo příprava tuhých disperzí pomocí tavení a sprejového sušení.

Povlak odolný vůči žaludeční kyselině může být nalit nebo rozprašován v klasické potahovací pánvi nebo nanášen v zařízení s fluidní vrstvou. Z důvodu dosažení odolnosti vůči žaludeční kyselině byly podíly roztoku ftalatu hydroxypropylmethylcelulózy (HPMCP, Pharmacoat HP50, celkově 2,250 kg) rozpuštěny v směsi následujících rozpouštědel: 13 l acetonu, 13,5 l ethanolu (94 hmotn. procent, denaturovaný 2% ketonem), 2,5 l demineralizované vody. Ke konečné úpravě roztoku bylo přidáno 0,240 kg

ricinového oleje jako zvláčňovadla a roztok byl po částech nanášen obvyklým způsobem na jádra tablet.

Tenký povlak: Po ukončení sušení byla suspenze následujícího složení nanášena jako tenký povlak ve stejném zařízení: 0,340 kg mastku, 0,4 kg oxidu titanového Cronus RN56, 0,324 kg barevného laku L červený lak 86837, 4,8 kg 12,5% Eudragitu E a 0,12 kg polyethylenglykolu 6000 pH 11 XI ve směsi rozpouštědel následujícího složení: 8,17 kg 2-propanolu, 0,2 kg demineralizované vody a 0,6 kg glyceroltriacetatu (Triacetin).

Mikrotablety odolné vůči žaludeční kyselině byly potom plněny do tvrdých želatinových kapslí o hmotnosti obsahu 500,0 mg a uzavřeny.

#### **Příklad 4**

Příprava mikrotablet s enterosolventním povlakem v kapslích obsahujících 120,0 mg dimethylfumarátu, což odpovídá 96 mg kyseliny fumarové

Za dodržení nezbytných bezpečnostních opatření (ochranná maska, rukavice, ochranný oděv atd.) bylo 12 kg dimethylfumarátu rozmělněno a homogenizováno za použití síta 800. Potom byla připravena směs vehikula následujícího složení: 17,5 kg derivátu škrobu (STA-RX 1500<sup>®</sup>), 0,30 kg mikrokrystalické celulózy (Avicel PH 101<sup>®</sup>), 0,75 kg PVP (Kollidon<sup>®</sup> 120), 4 kg Primogel<sup>®</sup>, 0,25 kg koloidní kyseliny orthokřemičité (Aerosil<sup>®</sup>). K úplné práškové směsi byla přidána aktivní složka, směs byla míchána, homogenizována za použití síta 200 a zpracována obvyklým způsobem s 2% vodným roztokem polyvinylpyrrolidonu (Kollidon<sup>®</sup> 25) za vzniku pojivových granulí, které byly potom míchány s vnější fází v suchém stavu. Vnější fáze se skládala z 0,5 kg stearátu hořečnatého a 1,5 kg mastku.

Potom byla tato prášková směs lisována běžným způsobem do vypouklých tablet o celkové hmotnosti 10 mg a průměru 2,0 mm.

K dosažení odolnosti vůči žaludeční kyselině byl roztok ftalatu hydroxypropylmethylcelulózy (HPMCP, Pharmacoat HP<sup>®</sup>50 celkově 2,250 kg) rozpuštěn ve směsi následujících rozpouštědel: 13 l acetonu, 13,5 l ethanolu (94 hmotn. procent, denaturovaný 2% ketonem), 1,5 l demineralizované vody. Ke konečné úpravě roztoku bylo přidáno 0,24 kg ricinového oleje jako zvláčňovadla a roztok byl po částech nanášen obvyklým způsobem na jádra tablet.

Po sušení byl ve stejném zařízení nanesen tenký povlak suspenze následujícího složení: 0,34 kg mastku, 0,4 kg oxidu titaničitého Cronus RN 56<sup>®</sup>, 0,324 kg barevného laku L-red 86837, 4,8 kg Eudragit E 12,5%<sup>®</sup> a 0,12 kg polyethylenglykolu 6000 pH 11 XI ve směsi rozpouštědel následujícího složení: 8,17 kg 2-propanolu, 0,2 kg demineralizované vody a 0,06 kg glyceroltriacetatu (Triacetin<sup>®</sup>).

Mikrotablety s enterosolventním povlakem byly potom plněny do tvrdých želatinových kapslí o hmotnosti obsahu 400,0 mg a uzavřeny.

#### **Příklad 5**

Příprava mikrotablet s enterosolventním povlakem v kapslích obsahujících 120,0 mg dimethylfumaratu, což odpovídá 96 mg kyseliny fumarové

12 kg dimethylfumaratu bylo rozmělněno a homogenizováno, jak je popsáno výše. Potom byla připravena směs vehikula následujícího složení: 23,2 kg mikrokrytalické celulózy (Avicel PH 200<sup>®</sup>), 3 kg

natriumkroskarmelosy (AC-Si-SOL-SD-711), 2,5 kg mastku, 0,1 kg bezvodé kyseliny orthokřemičité (Aerosil® 200) a 1 kg stearatu hořečnatého. Potom byla tato prášková směs lisována obvyklým způsobem do vypouklých tablet majících celkovou hmotnost 10,0 mg a průměr 2,0 mm.

Následně byl připraven roztok 0,94 kg Eudragit® L v 2-propanolu, přičemž tento roztok dále obsahoval 0,07 kg dibutylftalatu. Tento roztok byl sprejově nanášen na jádra tablet. Následně byla připravena disperze 17,32 kg Eudragit® L D-55 a směs 2,8 kg mikročasticového mastku, 2,0 kg Makrogol 6000 a 0,07 kg dimetikonu ve vodě. Tato směs byla nanášena na jádra tablet.

Mikrotablety s enterosolventním povlakem byly potom plněny do tvrdých želatinových kapslí o hmotnosti obsahu 650 mg a uzavřeny.

#### **Příklad 6**

Translokace NF-kappaB do buněčného jádra

NF-kappaB (p65) byl vložen do vektoru pEGFP-C1, který obsahoval EGFP (zelený fluoreskující protein) spojený s promotorem cytomegaloviru (Clontech). To vede k expresi fluoreskujícího NF-kappaB. HUVEC buňky byly přeneseny na kultivační desky (Costar) s 12 jamkami potaženými želatinou mezi 3. až 5. pasáží a byly kultivovány do souvislého nárůstu z 80 nebo 90 %. Potom tyto buňky vystaveny transfekci za použití precipitační metody s fosforečnanem vápenatým. Konkrétně tyto buňky byly kondicionovány v Dulbekově modifikovaném Eaglesově mediu (DMEM), po 24 hodinách je přidán precipitát do každé jamky s obsahem 1 µg DNA a buňky byly inkubovány další 4 hodiny. Po promytí HBSS (Hanksovým vyváženým solným roztokem) bylo k buňkám přidáno

kultivační medium a buňky byly kultivovány dalších 18 hodin před jejich stimulací.

Pro experimenty byly buňky kondicionovány s 40  $\mu\text{M}/\text{l}$  dimethylfumaratem, současně byly jako kontroly inkubovány preparáty bez DNA. 2 hodiny po zahájení kondicionování byly buňky stimulovány 10 ng/ml TNF- $\alpha$  po dobu uvedenou v tabulce 1.

Potom byly buňky lyzovány, supernatant byl odstraněn a buněčná jádra byla shromažďována v Dounceově pufru s inhibitorem proteinázy (10 mM tris-HCl, pH 7,6, 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 1 mM fenylmethylsulfonylfluorid, 1,8 mg/ml jodacetamid). Po 10 minutách odstředění při 1200 G a teplotě 4  $^\circ\text{C}$  byla buněčná jádra analyzována na cytometru FACScanflow (Becton Dickinson).

### Tabulka 1

Počet pozitivních jader NF-kappaB (P65)

(procento všech buněk vystavených transfekci s NF-kappaB)

Doba stimulace	Kontrola	DMF (40 $\mu\text{M}/\text{l}$ , 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 tabulce 1 ukazují, že dimethylfumarat při koncentraci 40  $\mu\text{M}/\text{l}$  inhiboval TNF-vyvolanou translokaci NF-kappaB do buněčného jádra.

### **Příklad 7**

Inhibice transkripce stimulované NF-kappaB

Trojnásobné opakování AP-1 konvenčního místa (vazebného místa) (48 bp, 3 x TGTGA-TGACTCAGGTT) a trojnásobné opakování NF-kappaB konvenčního místa (60bp, 3 x AATCGTGGAAATTCCTCTGA), ohraničené Spel vazebnými místy (neznázorněno) byla vložena do Spel místa pTK-UBT-luc vektoru (de Martin, Gene 124, 137 - 138, 1993). Konstrukt 1,3 kb promotoru E-selektinu v rozsahu od bp -1285 do bp +482 byl vložen do NdeI místa pMAN Neo-luc vektoru (Clontech).

HUVEC buňky byly podrobeny transfekci s konstrukty získanými způsobem popsaným v příkladu 6. Pro tuto transfekci bylo přidáno do každé jamky 2,5 µg příslušného promotorového konstruktů. Z důvodu ověření účinnosti transfekce byly prováděny současně transfekce s 500 ng pSV-beta kontrolního vektoru galaktosidázy (Promega Corp., Madison, WI, USA.) jako kontrola ke každému experimentu. Dva dny po transfekci byly buňky stimulovány po dobu 2 hodin s 10 ng/ml TNF- $\alpha$  s a bez přidavku 6 µg/ml dimethylfumarátu (DMF). Buňky byly sklizeny trypsinací, peletizovány, promyty a resuspendovány v 200 µl pufru („reporter lysis buffer“) (Promega) po dobu 15 min., jak uvádí výrobce.

Luciferasová aktivita byla měřena pomocí luminometru Berthold AutoLumat LB9507 za použití testovacího systému pro luciferasu (Promega). Beta-galaktosidasová aktivita byla stanovena za použití enzymatického testovacího systému pro beta-galaktosidasu Promega. Luciferasové aktivity získané s příslušnými promotorovými konstrukty byly normalizovány na beta-galaktosidasovou aktivitu. Variační šířka beta-galaktosidasové aktivity u jednotlivých pokusů byla nižší než 10 %. Tabulka 2 ukazuje jednotlivé výsledky jako x-násobky oproti základní linii.

**Tabulka 2**

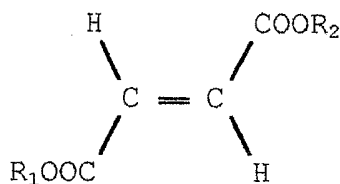
Zvýšení transkripce  
Relativní zvýšení luciferasové aktivity  
(měřeno jako x-násobek zvýšení oproti základní linii)  
po stimulaci TNF (10 ng/ml)  
s nebo bez 40  $\mu$ M/l dimethylfumarátu (DMF), n=6

Podmínky	NF-kappaB	AP-1
TNF	2 $\pm$ 3	2,2 $\pm$ 0,5
TNF + DMF	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0,1

Výsledky v tabulce 2 ukazují, že dimethylfumarat inhiboval TNF indukovanou transkripci NF-kappaB dependentního genu, ale ne transkripci AP-1 dependentního genu. Proto inhibice dimethylfumaratem je specifická pro NF-kappaB.

P A T E N T O V É      N Á R O K Y

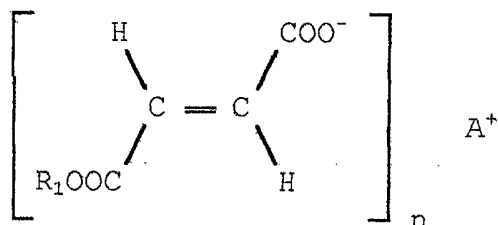
1. Použití jednoho nebo více derivátů kyseliny fumarové pro přípravu farmaceutického prostředku k léčbě onemocnění, která mohou být ovlivněny NF-kappaB.
2. Použití podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že derivát kyseliny fumarové je vybrán ze skupiny sestávající z dialkylesterů kyseliny fumarové a monoalkylesterů kyseliny fumarové, které mohou být případně substituovány, ve formě volné kyseliny nebo jejich solí a jejich směsí.
3. Použití podle nároku 2, kde dialkylester kyseliny fumarové odpovídá vzorci



kde  $R_1$  a  $R_2$ , které mohou být totožné nebo odlišné, jsou nezávisle lineárním, větveným, cyklickým, nasyceným nebo nenasyceným  $C_{1-24}$  alkylovým radikálem nebo  $C_{5-20}$  arylovým radikálem a tyto radikály jsou případně substituovány halogenem (F, Cl, Br, I), hydroxyskupinou,  $C_{1-4}$  alkoxyskupinou, nitroskupinou nebo kyanoskupinou.

4. Použití podle některého z nároků 2 a 3, **vyznačující se tím**, že radikály  $R_1$  a  $R_2$  jsou methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sek-butyl, terc-butyl, pentyl, cyklopentyl, 2-ethylhexyl, hexyl, cyklohexyl, heptyl, cykloheptyl, oktyl, vinyl, allyl, 2-hydroxyethyl, 2- nebo 3-hydroxypropyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2-methoxyethyl, methoxymethyl nebo 2- nebo 3-methoxypropyl.

5. Použití podle nároku 2, kde monoalkylester kyseliny fumarové odpovídá vzorci



kde

- R<sub>1</sub> je definován stejně jako v nárocích 3 nebo 4
- A je vodík, kation alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin nebo fyziologicky kompatibilní kation přechodného kovu, výhodně vybraný z Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> a Mn<sup>2+</sup>, a
- n je 1 nebo 2 a odpovídá mocenství A.

6. Použití podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že derivátem kyseliny fumarové je jedna nebo více sloučenin vybraných ze skupiny obsahující dimethylester kyseliny fumarové, diethylester kyseliny fumarové, methylethylester kyseliny fumarové, methylhydrogenfumarat, ethylhydrogenfumarat, methylfumarat vápenatý, ethylfumarat vápenatý, methylfumarat hořečnatý, ethylfumarat hořečnatý, methylfumarat zinečnatý, ethylfumarat zinečnatý, methylfumarat železnatý a ethylfumarat železnatý a jejich směsi.

7. Použití podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že derivátem kyseliny fumarové je dimethylester kyseliny fumarové (dimethylfumarat).

8. Použití jednoho nebo více derivátů kyseliny fumarové pro přípravu farmaceutického prostředku k léčbě nemocí, které

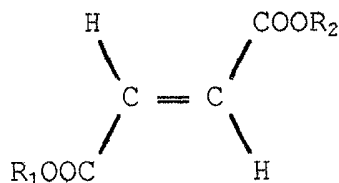
mohou být ovlivněny NP-kappaB, vybraných ze skupiny zahrnující:

progresivní generalizovanou sklerodermii, osteochondritidu syfilitika (Wegenerova choroba), cutis marmorata (livedo reticularis), Behcetovu chorobu, panarteritidu, vředovitou kolitidu, vaskulitidu, osteoartritidu, dnu, arteriosklerózu, Reiterovu chorobu, plicní granulomatózu, druhy encefalitidy, endotoxický šok (septicko-toxický šok), sepsi, pneumonii, encefalomyelitidu, anorexii nervosa, hepatitidu (akutní hepatitidu, chronickou hepatitidu, toxickou hepatitidu, alkoholem vyvolanou hepatitidu, epidemickou hepatitidu, žloutenku, selhání činnosti jater a cytomegalovirovou hepatitidu), Rennertovu T-lymfomatózu, mesangiální nefritidu, postangioplastikou restenózu, reperfuční syndrom, cytomegalovirovou retinopatii, adenovirová onemocnění, jako jsou adenovirová nachlazení, adenovirová faryngokonjunktivální horečka a adenovirová oftalmie, AIDS, Guillain-Barrého syndrom, postherpetickou nebo postzosterovou neuralgii, zánětlivou demyelinizační polyneuropatii, mononeuropathii multiplex, mukoviscidózu, Bechterewovu chorobu, Barrettův ezofagus, EBV infekce (Epstein-Barrův virus), srdeční přetvoření, intersticiální cystitidu, diabetes mellitus typu II, radiosenzibilizací lidských nádorů, multirezistenci zhoubných buněk k chemoterapeutickým činidlům (rezistence při chemoterapii vůči více léčivům), kožní granulom a karcinomy, jako je karcinom prsu, karcinom tlustého střeva, melanom, karcinom primárních jaterních buněk, adenokarcinom, kaposi sarkom, karcinom prostaty, leukemii, jako je akutní myeloidní leukémie, mnohočetný myelom (plazmocytom), Burkittův lymfom a Castlemanův nádor.

9. Použití podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že derivát kyseliny fumarové je vybrán ze skupiny sestávající z

dialkylesterů kyseliny fumarové a monoalkylesterů kyseliny fumarové ve formě volné kyseliny nebo soli nebo jejich směsí.

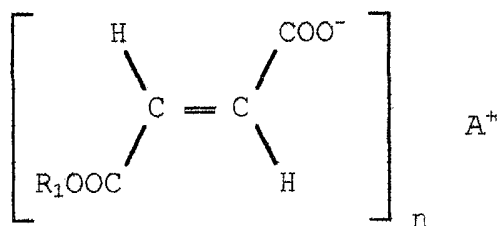
10. Použití podle nároku 9, kde dialkylester kyseliny fumarové odpovídá vzorci



kde  $R_1$  a  $R_2$ , které mohou být totožné nebo odlišné, jsou nezávisle lineárním, větveným, cyklickým, nasyceným nebo nenasyceným  $C_{1-24}$  alkylovým radikálem nebo  $C_{5-20}$  arylovým radikálem a tyto radikály jsou případně substituovány halogenem (F, Cl, Br, I), hydroxyskupinou,  $C_{1-4}$  alkoxyskupinou, nitroskupinou nebo kyanoskupinou.

11. Použití podle některého z nároků 9 a 10, **vyznačující se tím**, že radikály  $R_1$  a  $R_2$  jsou methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sek-butyl, terc-butyl, pentyl, cyklopentyl, 2-ethylhexyl, hexyl, cyklohexyl, heptyl, cykloheptyl, oktýl, vinyl, allyl, 2-hydroxyethyl, 2- nebo 3-hydroxypropyl, 2,3-dihydroxypropyl, 2-methoxyethyl, methoxymethyl nebo 2- nebo 3-methoxypropyl.

12. Použití podle nároku 9, kde monoalkylester kyseliny odpovídá vzorci,



kde

- $R_1$  je definován stejně jako v nárocích 3 nebo 4
- A je vodík, kation alkalického kovu nebo kovu alkalických zemin nebo fyziologicky kompatibilní kation přechodného kovu, výhodně vybraný z  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  a  $Mn^{2+}$ , a
- n je 1 nebo 2 a odpovídá mocenství A.

**13.** Použití podle kteréhokoliv z nároků 8 až 12, **vyznačující se tím**, že jedna dávkovací jednotka farmaceutického prostředku obsahuje množství derivátu/derivátů kyseliny fumarové odpovídající 1 až 500 mg, výhodně 10 až 300 mg a nejvýhodněji 10 až 200 mg kyseliny fumarové.

**14.** Použití podle kteréhokoliv z předchozích nároků 8 až 13 pro přípravu farmaceutického prostředku k orálnímu, parenterálnímu, rektálnímu, transdermálnímu, dermálnímu, nazálnímu, pulmonálnímu (inhalačnímu) nebo oftalmickému podáváníí, výhodně k orálnímu podáváníí.

**15.** Použití podle nároku 14, kde farmaceutický prostředek pro orální podáváníí je přítomen ve formě tablet s jednotkovou dávkou, mikrotablet, mikrokuliček nebo granulátu (tyto mikrotablety, mikrokuličky nebo granuláty jsou popřípadě zakapsulovány nebo plněny do obalů), kapslí nebo roztoků pro pití.

**16.** Použití podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že tuhé dávkovací formy jsou opatřeny enterosolventním povlakem.

**17.** Použití podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že dávkovací jednotky farmaceutického prostředku výhodně obsahují buď jednotlivě nebo v příměsi:

- 10 až 500 mg dialkylfumarátu, zejména dimethylfumarátu a/nebo diethylfumarátu;
- 10 až 500 mg alkylfumarátu vápenatého, zejména methylfumarátu vápenatého a/nebo ethylfumarátu vápenatého;
- 0 až 250 mg alkylfumarátu zinečnatého, zejména methylfumarátu zinečnatého a/nebo ethylfumarátu zinečnatého;
- 0 až 250 mg alkylhydrogenfumarátu, zejména methylhydrogenfumarátu a/nebo ethylhydrogenfumarátu; a
- 0 až 250 mg alkylfumarátu hořečnatého, zejména methylfumarátu hořečnatého a/nebo ethylfumarátu hořečnatého;

souhrnná výše uvedená množství odpovídají ekvivalentu 10 až 500 mg, výhodně 10 až 300 mg a nejvýhodněji 100 mg kyseliny fumarové.

**18.** Použití podle některého z nároků 15 nebo 16, **vyznačující se tím**, že prostředek je přítomen ve formě mikrotablet nebo mikrokuliček majících velikost  $\leq 5\ 000\ \mu\text{m}$ , výhodně velikost 300 až 1 000  $\mu\text{m}$  pro kuličky a 1 000 až 2 500  $\mu\text{m}$  pro mikrotablety.