



(19) **UA** (11) **73 566** (13) **C2**
(51)МПК⁷ **A 61K 38/14, 31/711, A 61P**
35/00

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2002119177, 10.04.2001

(24) Дата начала действия патента: 15.08.2005

(30) Приоритет: 18.04.2000 EP 00830293.7

(46) Дата публикации: 15.08.2005

(86) Заявка РСТ:
РСТ/EP01/04105, 20010410

(72) Изобретатель:

Ферро Лаура, IT,
Порта Роберто, IT,
Лакобелли Массимо, IT,
Джанни Алессандро Массимо, IT,
Стелла Кармело Карло, IT

(73) Патентовладелец:

ДЖЕНТИУМ СПА, IT

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЕФИБРОТИДА И ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО ФАКТОРА ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, СПОСОБ ЕЕ ПРИГОТОВЛЕНИЯ

(57) Реферат:

Способ увеличения количества стволовых клеток и/или кроветворных клеток-предшественников в периферической крови млекопитающих включает в себя введение дефибротида в сочетании, как минимум, с одним гемопоэтическим фактором, преимущественно G-CSF (или же дефибротид и гемопоэтический фактор вводятся по отдельности с небольшим

временным интервалом).

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2005, N 8, 15.08.2005. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

У А 7 3 5 6 6 С 2

У А 7 3 5 6 6 С 2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 566** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61K 38/14, 31/711, A 61P**
35/00

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2002119177, 10.04.2001
(24) Effective date for property rights: 15.08.2005
(30) Priority: 18.04.2000 EP 00830293.7
(46) Publication date: 15.08.2005
(86) PCT application:
PCT/EP01/04105, 20010410

(72) Inventor:
FERRO LAURA, IT,
PORTA ROBERTO, IT,
IACOBELLI MASSIMO, IT,
GIANNI ALESSANDRO MASSIMO, IT,
STELLA CARMELO CARLO, IT
(73) Proprietor:
GENTIUM SPA, IT

(54) **COMPOSITION OF DEFIBROTIDE AND HAEMATOPOIETIC FACTOR USED FOR INCREASING AMOUNT OF STEM CELLS AND METHOD FOR ITS PREPARATION**

(57) Abstract:

A description is given of a method of increasing the amount of stem cells and progenitor cells in the peripheral blood of a mammal; the method is characterised by the administration of defibrotide in combination or in temporal proximity with at least one haematopoietic factor, (preferably G-CSF) having

the capacity to mobilise haematopoietic progenitors.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2005, N 8, 15.08.2005. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 7 3 5 6 6 C 2

U A 7 3 5 6 6 C 2



(19) **UA** (11) **73 566** (13) **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 38/14, 31/711, A 61P**
35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2002119177, 10.04.2001

(24) Дата набуття чинності: 15.08.2005

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької конвенції : 18.04.2000 EP 00830293.7

(46) Публікація відомостей про видачу патенту (деклараційного патенту): 15.08.2005

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки відповідно до договору РСТ:
PCT/EP01/04105, 20010410

(72) Винахідник(и):

Ферро Лаура , ІТ,
Порта Роберто , ІТ,
Лакобеллі Массімо , ІТ,
Джанні Алессандро Массімо, ІТ,
Стелла Кармело Карло, ІТ

(73) Власник(и):

ДЖЕНТІУМ СПА, ІТ

(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЕФІБРОТИДУ ТА ГЕМОПОЕТИЧНОГО ФАКТОРА ДЛЯ ЗБІЛЬШЕННЯ КІЛЬКОСТІ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН, СПОСІБ ЇЇ ПРИГОТУВАННЯ

(57) Реферат:

Спосіб збільшення кількості стовбурових клітин і/або гемопоетичних клітин-попередників у периферичній крові ссавців, який включає введення дефібротиду в комбінації чи в

безпосередній часовій близькості принаймні з одним гемопоетичним фактором (переважно G-CSF), що має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники.

U A 7 3 5 6 6 C 2

U A 7 3 5 6 6 C 2

Опис винаходу

Даний винахід відноситься до області медицини і, зокрема, композиції, здатної збільшувати кількість стовбурних клітин і клітин-попередників у циркуляції периферичної крові в ссавців. Запропонована композиція відрізняється тим, що вона містить дефібротид у комбінації принаймні з одним гемопоетичним фактором, що має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники, переважно G-CSF.

Можливість одержання підвищеної кількості стовбурних клітин і клітин-попередників у циркуляції периферичної крові в ссавців, і, зокрема, у людини, протягом багатьох літ була предметом інтенсивних досліджень. Доступність стовбурних клітин і/чи клітин-попередників є дуже важливою в таких областях, як автогенна трансплантація циркулюючих клітин-попередників, алотрансплантація циркулюючих клітин-попередників і генна терапія циркулюючих гемопоетичних клітин.

Хоча після народження стовбурні клітини й клітини-попередники знаходяться майже винятково в кістковому мозку, проте, вони мають міграційні властивості; тобто іншими словами, у фізіологічних умовах вони мігрують через порожнини кісткового мозку й утягуються у циркуляцію. Цей процес, звичайно відомий як "активація", може бути посилений у ссавців за рахунок різних обробок, таких як, наприклад, введення цитокинів, і особливо фактора росту колоній гранулоцитів (G-CSF). Зворотний процес, відомий як "хоумінг", відбувається, наприклад, в опромінених реципієнтів після трансплантації гемопоетичних клітин. Однак механізм, що лежить в основі активації і хоумінгу, залишається ще неясним. [C.F. Craddock et al. "Antibodies to VLA4 Integrin Mobilize Long-Term Repopulating Cells and Augment Cytokine-Induced Mobilization in Primates and Mice", Blood, Vol. 90, № 12, 1997, pp. 4779-4788/ F. Prosper et al. Mobilization and , Homing of Peripheral Blood Progenitors in Related to Reversible Downregulation of A4B1 Integrin Expression and Function", J Clin. Invest., Vol. 101, № 11, 1998, pp. 2456-2467; M. Vermeulen et al., "Role of Adhesion Molecules in the Homing and Mobilization of Murine Hematopoietic Stem and Progenitor Cells", Blood, Vol. 92, № 3, 1998, pp. 894-900].

Фактор G-CSF [реєстраційний номер CAS 143011-2-7/Merck Index, 1996, стор. 4558] являє собою гемопоетичний фактор росту, що незамінний при проліферації й диференціації клітин-попередників гранулоцитів. Він є глікопротеїном із молекулярною масою 18-22 кД і звичайно утворюється у відповідь на специфічну стимуляцію під дією множини клітин, що включають моноцити, фібробласти та ендотеліальні клітини. Термін дефібротид (DEF) [реєстраційний номер CAS 83712-60-1] означає полідезоксирибонуклеотид, отриманий екстракцією [US 3770720 і US 3899481] тварин і/чи рослинних тканин. Звичайно, цей полідезоксирибонуклеотид застосовується у вигляді солі лужного металу, звичайно, натрію. Дефібротид звичайно використовують у зв'язку з його антитромботичною активністю [US 3829567], хоча його можна застосовувати й в інших, областях, наприклад, при лікуванні гострої ниркової недостатності [US 4694134] і гострої ішемічної хвороби міокарда [US 4693995]. Нарешті, у US 4985552 і US 5223609 описаний спосіб одержання дефібротиду, що забезпечує одержання продукту з постійними і добре визначеними фізико-хімічними властивостями, що не має будь-яких побічних ефектів.

У контексті цього винаходу термін дефібротид означає будь-який олігонуклеотид і/чи полінуклеотид, отриманий екстракцією тварин і/чи рослинних тканин, зокрема, органів ссавців. Переважно, дефібротид одержують у відповідності зі способами, описаними в зазначених вище патентах, які, таким чином, необхідно розглядати як складову частину цього винаходу. Ще більш переважно, дефібротид одержують відповідно до способів, описаних у патентах США №№ 4985552 і 5223609.

У даному винаході знезацька було виявлено, що активацію стовбурних клітин і клітин-попередників можна збільшити шляхом введення дефібротиду в комбінації і/чи в безпосередній часовій близькості з гемопоетичним фактором, що має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники.

Як можна буде оцінити з прикладів, введення дефібротиду в комбінації і/чи в безпосередній часовій близькості з гемопоетичним фактором, що має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники, дозволяє досягти набагато більш високого ступеня активації, ніж у випадку введення одного гемопоетичного фактора.

Отже, предмет цього винаходу включає композицію, що містить як активні інгредієнти дефібротид у комбінації принаймні з одним гемопоетичним фактором, що має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники, переважно G-CSF. У кращому варіанті здійснення запропонована композиція являє собою водяний розчин для ін'єкції; альтернативно композиція може являти собою два різних розчини, один із яких містить дефібротид, а інший гемопоетичний фактор, що має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники. Тому композиція, згідно з даним винаходом, має форму об'єднаного препарату для одночасного, роздільного чи послідовного застосування зазначених вище активних інгредієнтів для збільшення кількості стовбурних клітин і/чи гемопоетичних клітин-попередників у циркуляції у периферичній крові ссавців.

Другий аспект даного винаходу включає застосування дефібротиду в комбінації принаймні з одним гемопоетичним

фактором, що має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники, для одержання композицій, здатних збільшити кількість стовбурних клітин і/чи гемопоетичних клітин-попередників у циркуляції у периферичній крові ссавців, зокрема, людину.

Нарешті, ще один предмет цього винаходу включає спосіб збільшення кількості стовбурних клітин і/чи гемопоетичних клітин-попередників у циркуляції у периферичній крові ссавців, що полягає у введенні дефібротиду в комбінації і/чи в безпосередній часовій близькості принаймні з одним гемопоетичним фактором, що має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники. У якості гемопоетичного фактора, використаного при розробці даного винаходу, був використаний G-CSF. Однак не виключено, що аналогічні

результати можуть бути отримані з гемопоетичними факторами, що відрізняються від G-CSF, які, однак, мають здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники, наприклад, такими як фактор росту колоній гранулоцитів і макрофагів (GM-CSF) , "Flt3 ліганд3 (FL)", "фактор стовбурних клітин" (SCF), тромбопоетин (TPO), інтерлейкін 8 (IL-8) і інші, що без сумніву ясно для фахівців у цій області техніки.

Як дефібротид, застосований у комбінації з G-CSF на першій експериментальній стадії, був використаний дефібротид, що випускається фірмою Crinos Spa під товарним знаком Proclicide™, одержаний відповідно до способу, описаному в US. 4985552 і US 5223609.

Що стосується способів введення цих двох активних компонентів, вони не обмежуються задачами даного винаходу. Іншими словами, дефібротид і гемопоетичний фактор, що має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники, можна вводити ссавцям (і, зокрема, людині) у відповідності зі способами та нозологією, що відомі в цій області техніки. Звичайно, їх уводять перорально, внутрішньом'язово, внутрішньочеревинно, підшкірно чи внутрішньовенно, причому останній спосіб є кращим.

Крім того, ці два активних інгредієнти можуть бути введені одночасно чи послідовно. Іншими словами, у першому випадку їх уводять у вигляді простої композиції, що містить - обох активних інгредієнтів і в яку необов'язково, але можна додати звичайні лікарські ексцепієнти і/чи ад'юванти, відомі в цій області. Альтернативно, обоє активних компонентів можна вводити послідовно, а саме у вигляді двох різних композицій, одна з яких містить гемопоетичний фактор, що має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники, переважно G-CSF, а інша містить дефібротид.

Звичайно, G-CSF уводять підшкірно в кількості від 5 до 24 мкг/кг, у той час як дефібротид (DEF) уводять шляхом безупинного уливання в кількості від 5 до 15 мг/кг у годину протягом 2-7 діб.

Як можна буде оцінити з наведених прикладів, які варто розглядати тільки як ілюстрації, що не обмежують цей винахід, введення G-CSF у комбінації з дефібротидом мишам, що є найбільш розповсюдженою експериментальною моделлю ссавців, і мавпам дозволяє досягти набагато більш високого ступеня активації, ніж у випадку введення одного G-CSF, із чіткими перевагами для всіх тих областей терапії, де бажаним є високий рівень активації.

Перелік фігур

На Фігурі 1 показана кінетика числа лейкоцитів (WBC). На Фігурі 2 показане число клітин, що утворюють колонії (CFC), у периферичній крові.

На Фігурі 3 показана частота клітин, що утворюють колонії (CFC), у периферичній крові.

На Фігурі 4 показані рівні CFC на 5 добу терапії. На Фігурі 5 показана частка CFC на 5 добу терапії. На Фігурі 6 показана кінетика клітин, що стимулюють колонії з високою проліферативною активністю (HPP-CFC).

Відомості, що підтверджують можливість здійснення винаходу

Приклад 1

Цей експеримент проводять для того, щоб оцінити вплив введення G-CSF і/чи дефібротиду на число лейкоцитів (WBC) , що є присутніми у крові мишей. Мишам BALB/c у віці від 6 до 8 тижнів із масою тіла від 20 до 25г внутрішньочеревинно (IP) ін'єктувала C-CSF (5 мкг/миша в добу), дефібротид (1 мг/миша в добу) чи G-CSF (5 мкг/миша в добу) у комбінації зі зростаючими дозами дефібротиду (1, 10, 15 мг/миша в добу). Контрольній групі мишей, що не одержували G-CSF чи дефібротид, внутрішньочеревинно ін'єктували PBS, що містив до 1% мишачого сироваткового альбуміну (PBS/MSA). Мишей обробляють протягом 5 діб й умертвляють через 3 чи 5 діб обробки, чи через 3 доби після припинення терапії. Результати цього експерименту наведені на фіг.1. Для представлення кожної групи мишей використані наступні символи: G-CSF (3/4) (n= 24), дефібротид 1 (o) (n = 3), G-CSF+ дефібротид 1 (темний ромб) (n=13), G-CSF+дефібротид 10 (p) (n=σ), G-CSF+ дефібротид 15 (.) (n=23). Середнє число лейкоцитів для контрольної групи мишей (PBS/MSA) складало $2,87 \pm 0,2 * 10^6$ / мл крові; дані виражені як середня величина \pm стандартна помилка середнього (SEM).

Приклад 2

Кінетика активації клітин, що утворюють спільні колонії (CFC), у 1 мл крові мишей із приклада 1. Середнє число клітин CFC у PBS/MSA для контрольної групи мишей складало 39 ± 12 на 1 мл крові; дані наведені на фіг. 2 і виражені як середня величина \pm стандартна помилка середнього (SEM), що отримані з дубльованих культур на зразках для кожної тварини в даний момент часу.

Приклад 3

Зміни частоти сумарної кількості клітин, що утворюють спільні колонії (CFU-GM + BFU-E + CFU-Mix + HPP-CFC) на 10^5 клітин, покритих шаром кров'яного згустку периферичної крові, у мишей, згаданих у прикладі 1. Середнє число клітин CFC у - PBS/MSA для контрольної групи мишей складало $3,5 \pm 1$; дані наведені на фіг. 3 і виражені як середня величина \pm стандартна помилка середнього (SEM), що отримані з дубльованих культур на зразках із кожної тварини в даний момент часу.

Приклад 4

Сумарне число клітин, що утворюють спільні колонії (CFU-GM + BFU-E + CFU-Mix + HPP-CFC) на 1 мл крові через 5 діб обробки мишей із приклада 1; дані наведені на фіг. 4 і виражені як середня величина \pm стандартна помилка середнього (SEM), що отримані з дубльованих культур на зразках із кожної тварини.

Приклад 5

Частота сумарної кількості клітин, що утворюють спільні колонії (CFU-GM + BFU-E + CFU-Mix + HPP-CFC) для $Ю^5$ клітин, покритих шаром кров'яного згустку периферичної крові, у мишей, згаданих у прикладі 1/ дані наведені на фіг. 5 і виражені як середня величина \pm стандартна помилка середнього (SEM), що отримані з дубльованих культур на зразках із кожної тварини.

Приклад 6

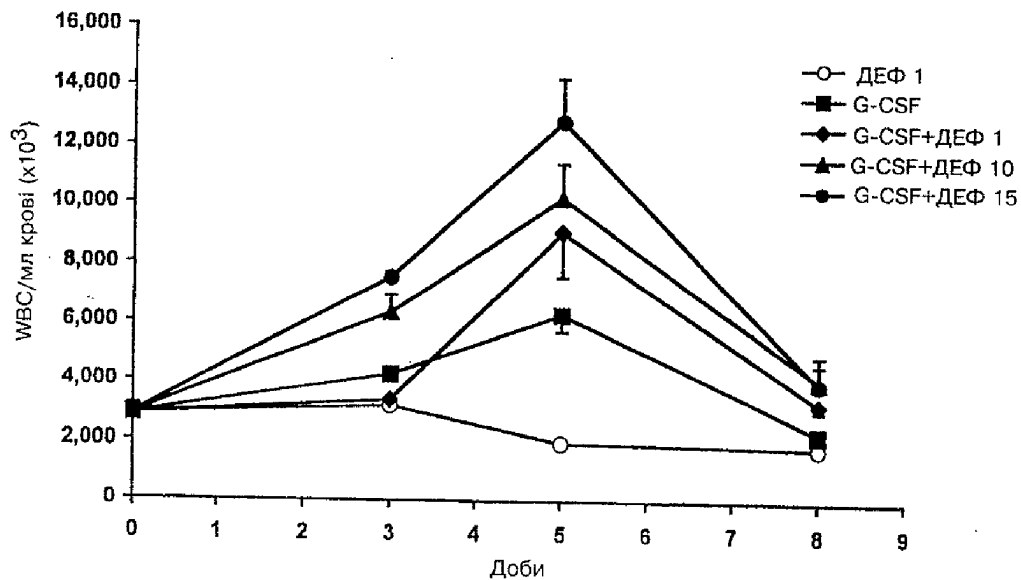
Цей експеримент проводять для того, щоб оцінити вплив від уведення G-CSF і/чи дефібротиду на кількість гемопоетичних клітин-попередників/стовбурних клітин (клітини, що стимулюють колонії з високою проліферативною активністю чи HPP-CFC) у циркуляції у периферичній крові мавп. Дослідження проводили на макаках-резусах (*Macaca mulatta*) у віці 4-6 років, що мають добре здоров'я і нормальні показники гематології і клінічної хімії. Фактор G-CSF вводили підшкірно, 100 мкг/кг, протягом 5 днів, у двох циклах. Дефібротид вводили зі швидкістю 15 мкг/кг у годину за допомогою системи безупинної інфузії протягом 5 днів, на другому циклі. Тварин піддавали анестезії для забору крові, уведення G-CSF і зміни пакета -ліків. Результати цього експерименту наведені на фігурі б, із якої можна оцінити, що введення G-CSF у комбінації з дефібротидом забезпечує рівень активації HPP-CFC у мавп, який приблизно в 8 разів вище у порівнянні з рівнем, що досягається при введенні одного G-CSF.

ВИСНОВКИ

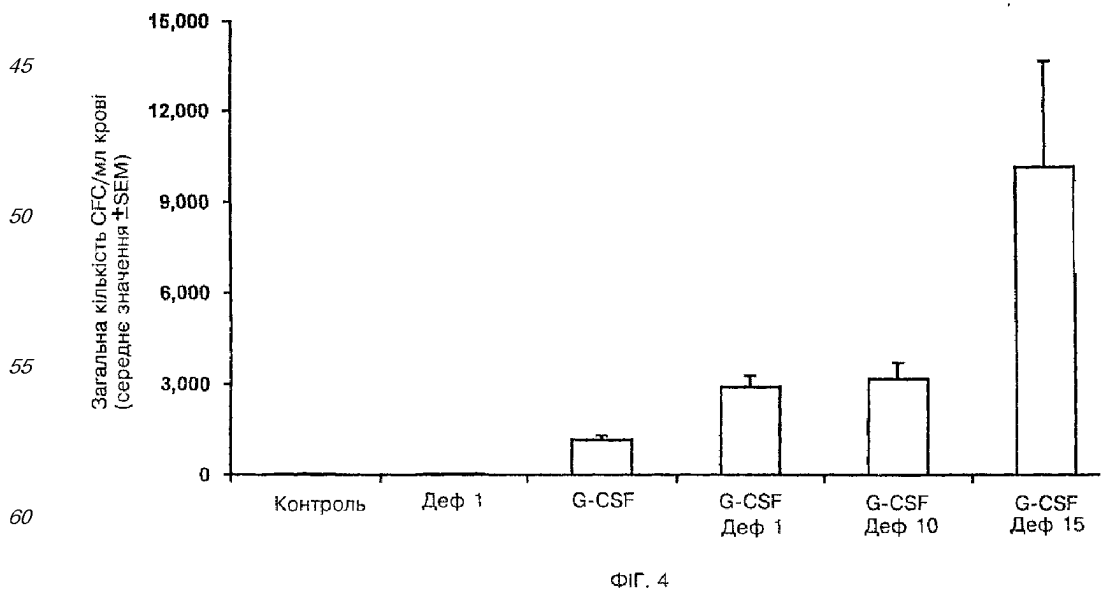
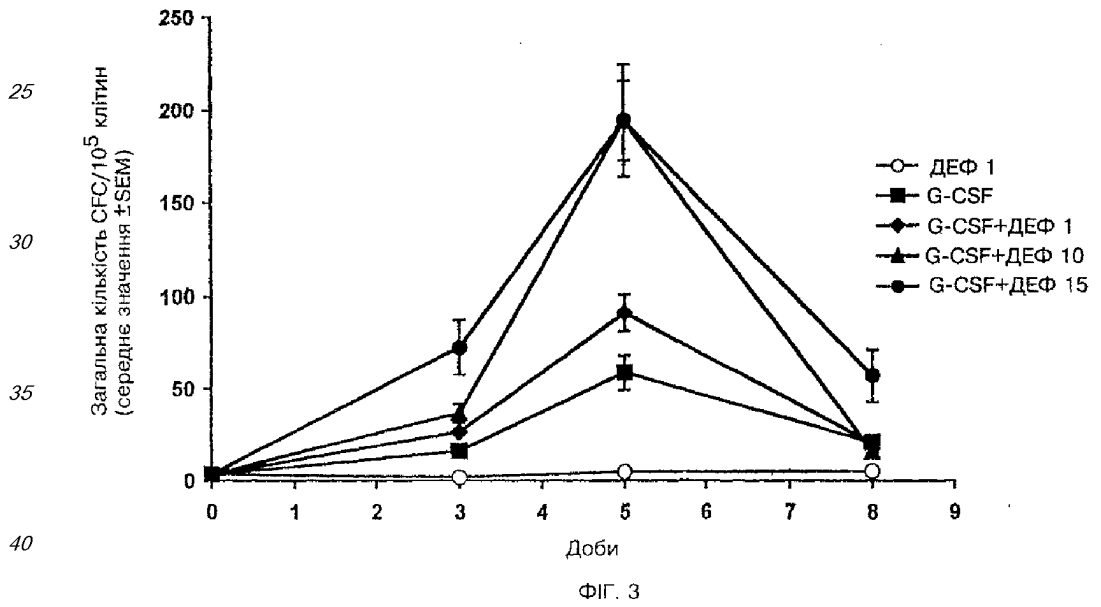
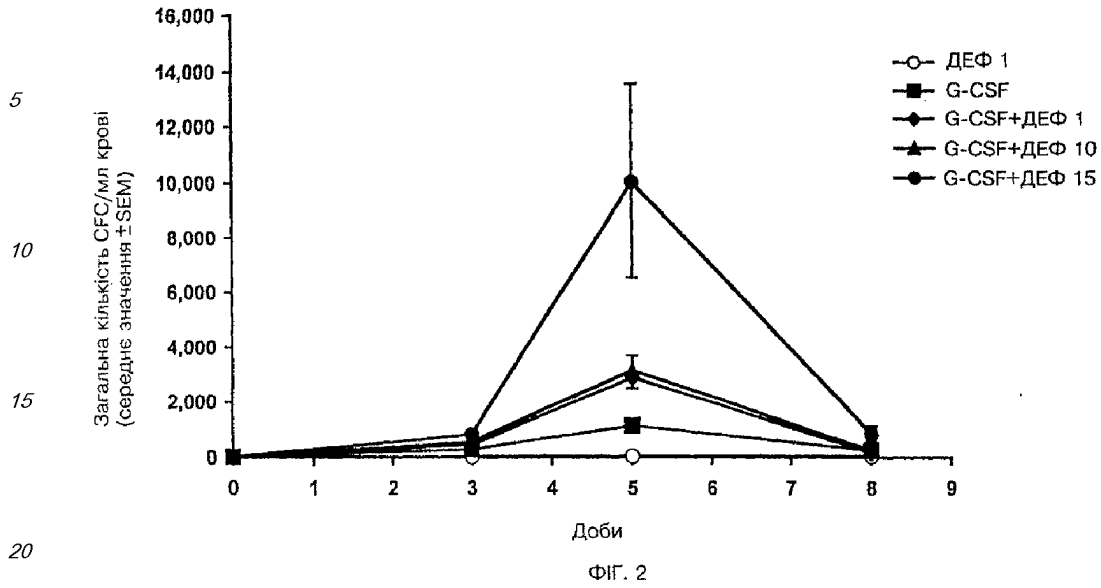
З даних, наведених на фіг.1, випливає, що введення G-CSF у комбінації з дефібротидом приводить до істотного збільшення кількості лейкоцитів у циркулюючій крові мишей. Зокрема, слід зазначити, що введення одного дефібротиду не впливає на кількість лейкоцитів у циркуляції крові. Отже, комбінація G-CSF і дефібротиду має несподіваний ефект (який залежить від дози) - приводить до збільшення числа лейкоцитів, причому цей ефект не є простою сумою двох відгуків, що не залежать друг від друга.

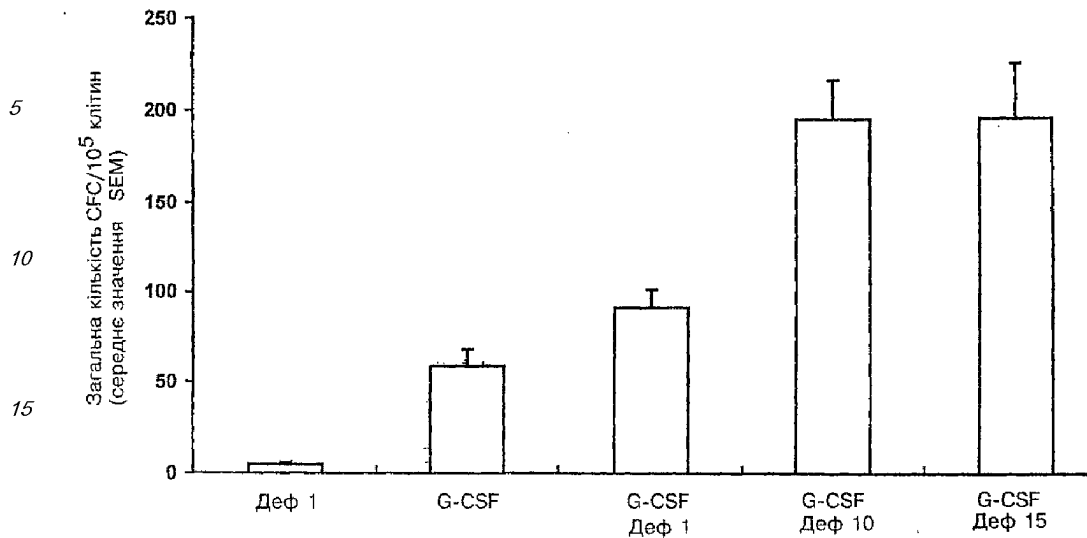
Фігури 2-5 ясно демонструють, що введення G-CSF у комбінації з дефібротидом забезпечує рівень активації у мишей, який набагато вище (від 10 до 100 разів), ніж рівень активації, отриманий при введенні одного G-CSF. Нарешті, фіг. б підтверджує, що введення G-CSF у комбінації з дефібротидом забезпечує рівень активації стовбурних клітин (HPP-CFC) у мавп, який приблизно в 8 разів вище у порівнянні з рівнем, що досягається при введенні одного G-CSF.

Ефект спільного введення двох активних інгредієнтів залежить від дози, оскільки рівень активації зростає пропорційно кількості введеного дефібротиду; у всіх випадках пік найвищої активації досягається приблизно на п'яту добу після введення.

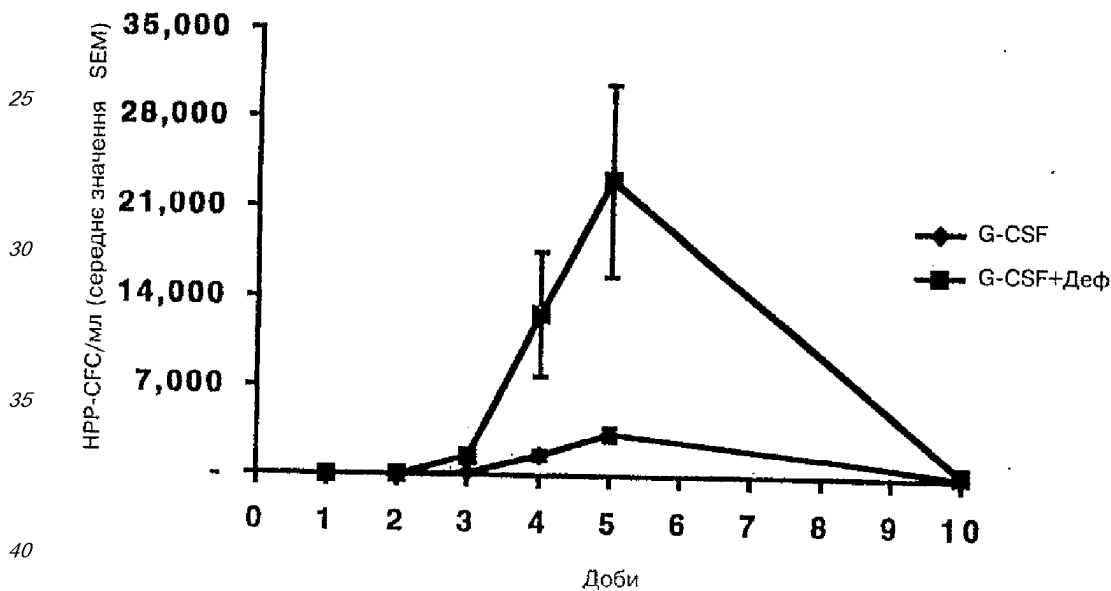


ФІГ. 1





ФІГ. 5



ФІГ. 6

Формула винаходу

1. Лікарська форма, що містить як активні інгредієнти дефібротид і принаймні один гемопоетичний фактор, який має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники.
2. Лікарська форма за п. 1, яка відрізняється тим, що гемопоетичний фактор, який має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники, являє собою G-CSF.
3. Лікарська форма за п. 1, яка відрізняється тим, що вона являє собою водний розчин.
4. Лікарська форма за п. 1, яка відрізняється тим, що вона складається з двох різних композицій, що вводяться роздільно, причому одна містить гемопоетичний фактор, який має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники, а інша містить дефібротид.
5. Лікарська форма за п. 1, яка відрізняється тим, що являє собою об'єднаний препарат для одночасного, роздільного чи послідовного застосування зазначених вище активних інгредієнтів для збільшення кількості стовбурових клітин і/чи гемопоетичних клітин-попередників у циркуляції в периферичній крові ссавців, і тим, що згаданий гемопоетичний фактор переважно є G-CSF.
6. Лікарська форма за будь-яким з пп. 1-5, яка додатково містить звичайні лікарські експіцієнти і/чи ад'юванти.
7. Спосіб одержання лікарської форми, здатної збільшити кількість стовбурових клітин і/чи гемопоетичних клітин-попередників у циркуляції в периферичній крові ссавців, який відрізняється тим, що в лікарську форму вводять дефібротид у комбінації принаймні з одним гемопоетичним фактором, який має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники.
8. Спосіб за п. 7, який відрізняється тим, що як гемопоетичний фактор, який має здатність активувати

гемопоетичні клітини-попередники, в композицію вводять G-CSF.

9. Спосіб збільшення кількості стовбурових клітин і/чи гемопоетичних клітин-попередників у циркуляції в периферичній крові ссавців, який відрізняється тим, що ссавцю вводять дефібротид у комбінації і/чи в безпосередній часовій близькості принаймні з одним гемопоетичним фактором, який має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники.

10. Спосіб за п. 9, який відрізняється тим, що гемопоетичний фактор, який має здатність активувати гемопоетичні клітини-попередники, являє собою G-CSF.

11. Спосіб за п. 10, який відрізняється тим, що G-CSF вводять у кількості від 5 до 24 мкг/кг, а дефібротид вводять у кількості від 5 до 15 мг/кг на годину.

12. Спосіб за п. 11, який відрізняється тим, що G-CSF і дефібротид вводять протягом 2-7 діб.

13. Спосіб за п. 9, який відрізняється тим, що ссавець являє собою людину.

Офіційний бюлетень "Промислоава власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2005, N 8, 15.08.2005. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.