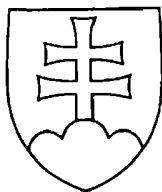


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **10. 4. 2001**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **00830293.7**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **18. 4. 2000**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **EP**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 6. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **6/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP01/04105**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/78761**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1489-2002

(13) Druh dokumentu: **A3**

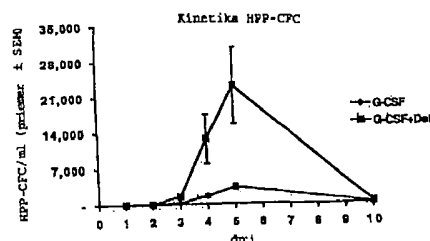
(51) Int. Cl.⁷:

A61K 38/19

- (71) Prihlasovateľ: **GENTIUM SPA, Villa Guardia, IT;**
(72) Pôvodca: **Ferro Laura, Milano, IT;**
Porta Roberto, Cernobbio, IT;
Iacobelli Massimo, Milano, IT;
Gianni Alessandro Masimo, Milano, IT;
Stella Carmelo Carlo, Milano, IT;
(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Prípravok majúci mobilizačnú aktivitu**

- (57) Anotácia:
Prípravok na zvýšenie množstva kmeňových buniek a progenitorových buniek v periférnej krvi cicavca, ktorý obsahuje defibrotid v kombinácii s aspoň jedným hematopoetickým faktorom (prednostne G-CSF) majúcim kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory.



Prípravok majúci mobilizačnú aktivitu

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka nového spôsobu zvýšenia množstva kmeňových buniek a progenitorových buniek v cirkulácii v periférnej krvi cicavca; prípravok je charakterizovaný podaním defibrotidu v kombinácii alebo časovej súvislosti s aspoň jedným hematopoetickým faktorom majúcim kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory, prednostne G-CSF.

Doterajší stav techniky

Možnosť získania zvýšeného množstva kmeňových buniek a progenitorových buniek v cirkulácii v periférnej krvi cicavca a obzvlášť ľudského jedinca bolo veľa rokov predmetom intenzívneho výskumu; dostupnosť kmeňových buniek a/alebo hematopoetických progenitorov je predovšetkým dôležitá v sektoroch, ako sú napríklad autológne transplantácie cirkulujúcich hematopoetických progenitorov, alotransplantácie cirkulujúcich hematopoetických progenitorov a program génovej terapie cirkulujúcich hematopoetických buniek.

Aj keď sú po narodení kmeňové bunky a progenitorové bunky lokalizované takmer výhradne v kostnej dreni, vykazujú jednako migračné vlastnosti, čo znamená, že za fyziologických podmienok migrujú cez dutiny kostnej drene a prechádzajú do cirkulácie. Tento postup bežne známy ako „mobilizácia“ môže byť cicavcom amplifikovaný rôznymi spôsobmi, ako sú napríklad podanie cytokínov a obzvlášť rastových faktorov

granulocytových kolónií (G-CSF); obrátený proces, známy ako „navrátenie“, sa vyskytuje napríklad pri ožiarených pacientoch po transplantácii hematopoetických buniek; mechanizmy, podľa ktorých mobilizácia a navrátenie prebiehajú, sú ale stále nejasné (C.F. Craddock et al., „Antibodies to VLA4 Integrin Mobilize in Primates and Mice“, Blood, zv. 90, č.12, 1997, str. 4779-4788; F Prosper et al., „Mobilization and Homing of Peripheral Blood Progenitors is Related to Reversible Downregulation of $\alpha 4\beta 1$ Integrin Expression and Function“ J.Clin. Invest., zv. 101, č.11, 1998, str. 2456-2467; M. Vermuelen et. al., „Role of Adhesion Molecules in the Homing and Mobilization of Murine Hematopoetic Stem and Progenitor Cells“, Blood, zv. 92, č. 3, 1998, str. 894-900).

G-CSF (CAS registračné číslo 143011-2-7/Merck Index, 1996, str.4558) je hematopoetický rastový faktor, ktorý je nepostrádateľný v proliferácii a diferenciácii progenitorových buniek granulocytov; je to 18-22 kDa glykoproteín normálne produkovaný v odpovedi na špecifickú stimuláciu celým radom buniek zahŕňajúcich monocyty, fibroblasty a endoteliálne bunky. Termín defibrotid (CAS registračné číslo 83712-60-1) normálne identifikuje polydeoxyribonukleotid získaný extrakciou (US 3770720 a US 3899481) zo živočíšneho a/alebo rastlinného tkaniva; tento polydeoxyribonukleotid je normálne použitý vo forme soli alkalického kovu, všeobecne sodíka. Defibrotid je používaný hlavne pre jeho antitrombotickú aktivitu (US 3829567), aj keď sa môže použiť v rôznych aplikáciách, ako sú napríklad liečba akútnej renálnej insuficiencie (US 4694134) a liečba akútnej ischémie myokardu (US 4693995). Patenty Spojených štátov US 4985552 a US 5223609 konečne opisujú postup výroby defibrotidu, ktorý umožňuje produktu, ktorý je získavaný, konštantné a dobre definované

fyzikálno chemické charakteristiky a je tiež bez akýchkoľvek nežiadúcich vedľajších účinkov.

Pre účely predkladaného vynálezu by sme mali teda pod termínom defibrotid rozumieť, že znamená akýkoľvek oligonukleotid a/alebo polynukleotid získaný extrakciou zo živočíšneho a/alebo rastlinného tkaniva, obzvlášť z cicavčích orgánov. Defibrotid je prednostne produkovaný v zhode so spôsobmi opísanými v patentoch uvedených hore, ktoré by mali byť teda považované za integrálnu časť predkladaného opisu; dokonca prednostnejšie je produkovaný v zhode so spôsobom opísaným v patentoch Spojených štátov US 4985552 a US 5223609.

Opis vynálezu

Prekvapivo sa teraz zistilo, že je možné zvýšiť mobilizáciu kmeňových buniek a hematopoetických progenitorov podaním defibrotidu v kombinácii a/alebo v tesnej časovej súvislosti s hematopoetickým faktorom majúcim kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory.

Ako bude ocenené z Príkladov uskutočnenia vynálezu, umožňuje podanie defibrotidu v kombinácii a/alebo tesnej časovej súvislosti s hematopoetickým faktorom majúcim kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory dosiahnutie hladín mobilizácie oveľa väčších, ako sú hladiny dosiahnuteľné podaním samotného hematopoetického faktora.

Cieľ predkladaného vynálezu je preto reprezentovaný prípravkom obsahujúcim ako „aktívne látky“ defibrotid v kombinácii s aspoň jedným hematopoetickým faktorom majúcim kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory, prednostne G-CSF. Vo svojej prednostnej forme je tento prípravok zložený

z injekčného vodného roztoku; alternatívne môže byť tento prípravok zložený z dvoch rôznych prípravkov, jedného obsahujúceho defibrotid a druhého obsahujúceho hematopoetický faktor majúci kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory. Prípravok podľa predkladaného vynálezu je preto vytvorený ako kombinovaný prípravok na simultánne, separátne, alebo sekvenčné použitie hore zmienených aktívnych zložiek za účelom zvýšenia množstva kmeňových buniek a/alebo hematopoetických progenitorov v cirkulácii v periférnej krvi cicavca.

Druhý cieľ predkladaného vynálezu je reprezentovaný použitím defibrotidu v kombinácii s aspoň jedným hematopoetickým faktorom majúcim kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory na prípravu prípravkov schopných zvýšiť množstvo kmeňových buniek a/alebo hematopoetických progenitorov v cirkulácii v periférnej krvi cicavca, prednostne ľudského jedinca.

Konečne ďalší cieľ predkladaného vynálezu je reprezentovaný spôsobom zvýšenia množstva kmeňových buniek a/alebo progenitorov v periférnej krvi cicavca, kde tento spôsob je charakterizovaný podaním defibrotidu cicavcovi v kombinácii alebo časovej súvislosti s aspoň jedným hematopoetickým faktorom majúcim kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory.

Hematopoetický faktor použitý na uskutočnenie experimentov, ktoré vedú k predkladanému vynálezu, je G-CSF; avšak, nemalo by sa vylúčiť, že podobné výsledky môžu byť získané s hematopoetickými faktormi, ktoré sú iné ako G-CSF, ale predovšetkým majú kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory, ako sú napríklad rastový faktor granulocytových a makrofágových kolónií (GM-CSF), „Glt3 ligand“ (FL), „faktor

kmeňových buniek" (SCF), trombopoetín (TPO), interleukín 8 (IL-8) a ďalšie, ktoré budú známe osobám pohybujúcim sa v odbore.

Defibrotid použitý v kombinácii s G-CSF v prvej experimentálnej fáze bol defibrotid v súčasnosti ponúkaný na trhu spoločnosťou Crinos Spa pod názvom Procyclide™ a produkovany v zhode s postupom opísaným v patentoch Spojených štátov US 4985552 a US 5223609.

Čo sa týka spôsobu podania dvoch aktívnych zložiek, tieto nie sú obmedzujúce pre účely vynálezu. Môžeme povedať, že defibrotid a hematopoetický faktor majúci kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory sa môžu podávať cicavcom (a obzvlášť ľudským jedincom) v zhode so spôsobmi a posológiou známymi v odbore; všeobecne sa môžu podávať perorálne, intramuskulárne, intraperitoneálne, subkutánne alebo intravenózne, kde posledný menovaný spôsob je spôsobom prednostným.

Dve aktívne zložky sa môžu tiež podávať súčasne alebo postupne. Mali by sme povedať, že v prvom prípade sú podávané prostredníctvom jedného prípravku, ktorý obsahuje obidve aktívne zložky, a do ktorého boli voliteľne pridané obvyklé excipientné a/alebo koadjuvantné látky známe v odbore; alternatívne môžu byť dve aktívne zložky podané sekvenčne, predovšetkým pomocou dvoch rôznych prípravkov, jedného obsahujúceho hematopoetický faktor majúci kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory, prednostne G-CSF, a druhého obsahujúceho defibrotid.

G-CSF sa všeobecne podáva subkutánne v dávke 5 až 24 ug/kg, zatiaľ čo DEF sa podáva kontinuálnou infúziou v dávke 5 až 15 mg/kg/hodinu po dobu 2 - 7 dní.

Ako bude ocenené z Príkladov uskutočnenia vynálezu, ktoré sú zamýšľané len ako neobmedzujúca ilustrácia vynálezu, umožňuje kombinované podanie G-CSF a defibrotidu myšiam, ako najbežnejšiemu experimentálnemu myšaciemu modelu, a opiciam dosiahnutie hladín mobilizácie oveľa vyšších, ako sú hladiny dosiahnuteľné podaním G-CSF samotného s jasnými výhodami pre všetky terapeutické sektory, pre ktoré sú vysoké hladiny mobilizácie žiadúce.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Experiment sa uskutočnil za účelom vyhodnotenia účinku podávania G-CSF a/alebo defibrotidu (DEF) na množstvo bielych krviniek (WBC) prítomných v krvi myší. Myši BALB/c staré 6 až 8 týždňov a majúce váhu od 20 do 25 g boli podrobené intraperitoneálnym (IP) injekciám G-CSF (5 ug/myš/deň), DEF (1 mg/myš/deň) alebo kombinácii G-CSF (5 ug/myš/deň) a zvyšujúcim sa dávkam DEF (1, 10, 15 mg/myš/deň). Roztok soli pufrovaný na 0,1% myšacieho sérového albumínu (PBS/MSA) sa podával IP injekciou na kontrolu myší, ktorým sa nepodával G-CSF a/alebo DEF. Myši sa liečili 5 dní a usmrtili po 3 alebo 5 dňoch liečby, alebo 3 dni po ukončení liečby. Výsledky tohto experimentu sú uvedené na Obrázku 1. Použili sa nasledujúce symboly na reprezentáciu každej skupiny myší: G-CSF (■) (n = 24), DEF 1 (0) (n = 3), G-CSF+DEF 1 (♦) (n = 13), G-CSF + DEF 10 (▲) (n = 6), G-CSF + DEF 15 (●) (n = 23). Priemerný počet bielych krviniek v PBS/MSA v kontrolovaných myšiach bol $2,87 \pm 0,2 \times 10^6$ /ml krvi; údaje sú vyjadrené ako priemer \pm štandardná chyba priemeru (SEM).

Príklad 2

Mobilizačné kinetiky buniek tvoriace celkové kolónie (CFC) na mililiter krvi myši z Príkladu 1. Priemerný počet CFC v PBS/MSA kontrolných myši bol $39 \pm$ na ml krvi; údaje sú uvedené na Obrázku 2 a sú vyjadrené ako priemer \pm SEM odvodený z dubletov kultúr so vzorkami od každého zvieraťa v každom časovom bode.

Príklad 3

Zmeny vo frekvencii celkových CFC (CFU-GM + BFU-E + CFU-Mix + HPP-CFC) na 10^5 buniek periférnej krvi myši zmienených v Príklade uskutočnenia vynálezu 1. Priemerný počet CFC v PBS/MSA kontrolných myši bol $3,5 \pm 1$; údaje sú vyjadrené ako priemer \pm SEM odvodený z dubletov kultúr so vzorkami od každého zvieraťa v každom časovom bode.

Príklad 4

Celkové CFC (CFU-GM + BFU-E + CFU-Mix + HPP-CFC) na mililiter krvi 5 po dňovej liečbe myši z Príkladu uskutočnenia vynálezu 1; údaje sú uvedené na Obrázku 4 a sú vyjadrené ako priemer \pm SEM odvodený z dubletov kultúr so vzorkami od každého zvieraťa v každom časovom bode.

Príklad 5

Frekvencia celkových CFC (CFU-GM + BFU-E + CFU-Mix + HPP-CFC) na 10^5 buniek periférnej krvi myši zmienených v Príklade uskutočnenia vynálezu 1. Údaje sú uvedené na obrázku 5 a sú vyjadrené ako priemer \pm SEM odvodený z dubletov kultúr so vzorkami od každého zvieraťa v každom časovom bode.

Príklad 6

Experiment sa uskutočnil za účelom vyhodnotenia účinku podávania G-CSF a/alebo defibrotidu (DEF) na množstvo hematopoetických progenitorov/kmeňových buniek (High-Proliferative Potentia-Colony Stimulating Cells, alebo HPP-CFC) v cirkulácii v periférnej krvi opíc. Štúdia bola uskutočnená na makakoch (*Macaca Mulatta*) starých 4 -6 rokov v dobrom zdravotnom stave, a ktoré mali normálne hodnoty hematologických aj biochemických testov. G-CSF sa dával subkutánne, 100 ug/kg, 5 dní na dva cykly; DEF sa dával 15 mg/kg/hodinu kontinuálnym infúznym systémom po dobu 5 dní v druhom cykle. Zvieratá boli po krvácaní, podávanie G-CSF a výmena liekového vrečka podrobená anestézii. Výsledky tohto experimentu sú uvedené na Obrázku 6, z ktorého je vidieť, že kombinované podávanie G-CSF a defibrotidu umožňuje mobilizáciu HPP-CFC opíc, ktorá je zhruba 8 krát vyššia ako mobilizácia dosiahnutá podávaním G-CSF samého.

Záver

Ako je veľmi dobre vidieť z údajov na Obrázku 1, vedie kombinované podávanie G-CSF a defibrotidu na významné zvýšenie množstva bielych krviniek v krvnej cirkulácii myší. Zvlášť musíme poznamenať, že podávanie defibrotidu samotného nemá pozitívny vplyv na množstvo bielych krviniek v cirkulácii; kombinácia G-CSF a defibrotidu preto produkuje prekvapivý na dávke závislý efekt zvýšenia počtu bielych krviniek, ktorý nie je čistým súčtom dvoch účinkov, ktoré sú na sebe nezávislé.

Obrázky 2 až 5 jasne ukazujú, že kombinované podávanie G-CSF a defibrotidu umožňuje hladiny mobilizácie dosiahnuteľné u myší, ktoré sú 10 až 100 krát vyššie ako mobilizácie

dosiahnuteľné podávaním G-CSF samotného. Konečne Obrázok 6 potvrdzuje, že kombinované podávanie G-CSF a defibrotidu umožňuje mobilizáciu kmeňových buniek opíc, ktorá je zhruba 8 krát vyššia ako mobilizácia dosiahnuteľná podaním G-CSF samotného.

Kombinovaný efekt dvoch aktívnych zložiek je závislý na dávke, pretože hladiny mobilizácie sa zvyšujú proporcionálne s množstvom podávaného defibrotidu; najvyšší mobilizačný vrchol je dosiahnutý vo všetkých prípadoch približne piaty deň po podaní.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Prípravok obsahujúci ako aktívne látky defibrotid a aspoň jeden hematopoetický faktor majúci kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory.

2. Prípravok podľa patentového nároku 1, v y z n a č u - j ú c i s a t ý m, že hematopoetický faktor majúci kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory je G-CSF.

3. Prípravok podľa patentového nároku 1, v y z n a č u - j ú c i s a t ý m, že sa jedná o vodný roztok.

4. Prípravok podľa patentového nároku 1 zložený z dvoch odlišných separátne podávaných prípravkov, jedného obsahujúceho hematopoetický faktor majúci kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory, a druhého obsahujúceho defibrotid.

5. Prípravok obsahujúci defibrotid a aspoň jeden hematopoetický faktor majúci kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory ako kombinovaný prípravok na simultánne, separátne, alebo sekvenčné použitie za účelom zvýšenia množstva kmeňových buniek a/alebo hematopoetických progenitorov v cirkulácii v periférnej krvi cicavca.

6. Prípravok podľa patentových nárokov 1 - 5 ďalej obsahujúci bežné excipientné a/alebo koadjuvantné látky.

7. Použitie defibrotidu v kombinácii s aspoň jedným hematopoetickým faktorom majúcim kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory na prípravu prípravkov schopných

zvýšiť množstvo kmeňových buniek a/alebo hematopoetických progenitorov v periférnej krvi cicavca.

8. Použitie podľa patentového nároku 7, v y z n a č u - j ú c e s a t ý m, že hematopoetický faktor majúci kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory je G-CSF.

9. Spôsob zvýšenia kmeňových buniek a hematopoetických progenitorov v cirkulácii v periférnej krvi cicavca v y z n a - č u j ú c i s a t ý m, že defibrotid je podávaný cicavcovi v kombinácii alebo časovej súvislosti s aspoň jedným hematopoetickým faktorom majúcim kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory.

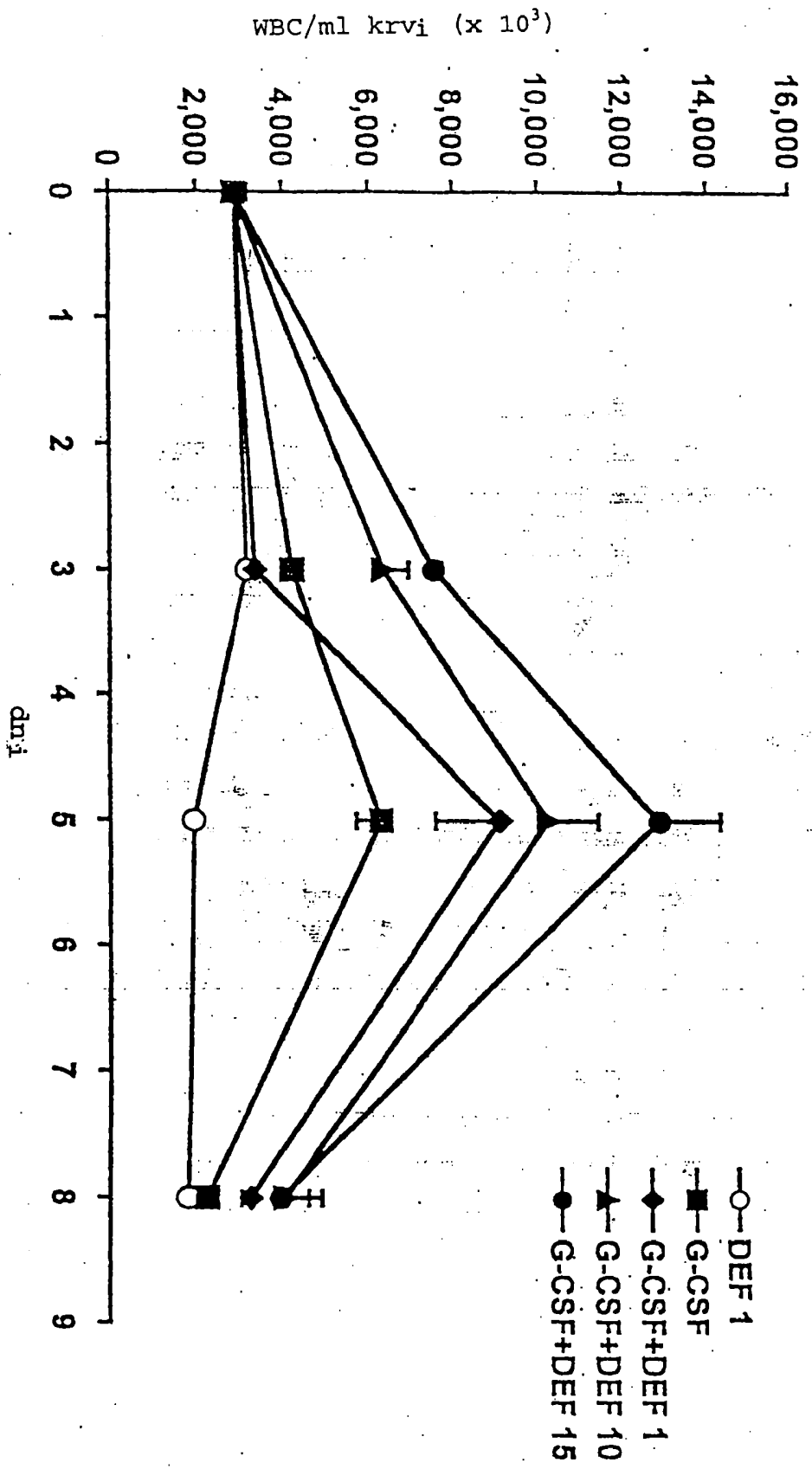
10 . Spôsob podľa patentového nároku 9, v y z n a č u - j ú c i s a t ý m, že hematopoetický faktor majúci kapacitu mobilizovať hematopoetické progenitory je G-CSF.

11. Spôsob podľa patentového nároku 10, v y z n a č u - j ú c i s a t ý m, že G-CSF je podávaný v dávke 5 až 24 ug/kg a defibrotid je podávaný v dávke 5 až 15 mg/kg/hodinu.

12. Spôsob podľa patentového nároku 11, v y z n a č u - j ú c i s a t ý m, že G-CSF a defibrotid sú podávané po dobu 2 - 7 dní.

13. Spôsob podľa patentového nároku 9, v y z n a č u - j ú c i s a t ý m, že cicavcom je ľudský jedinec.

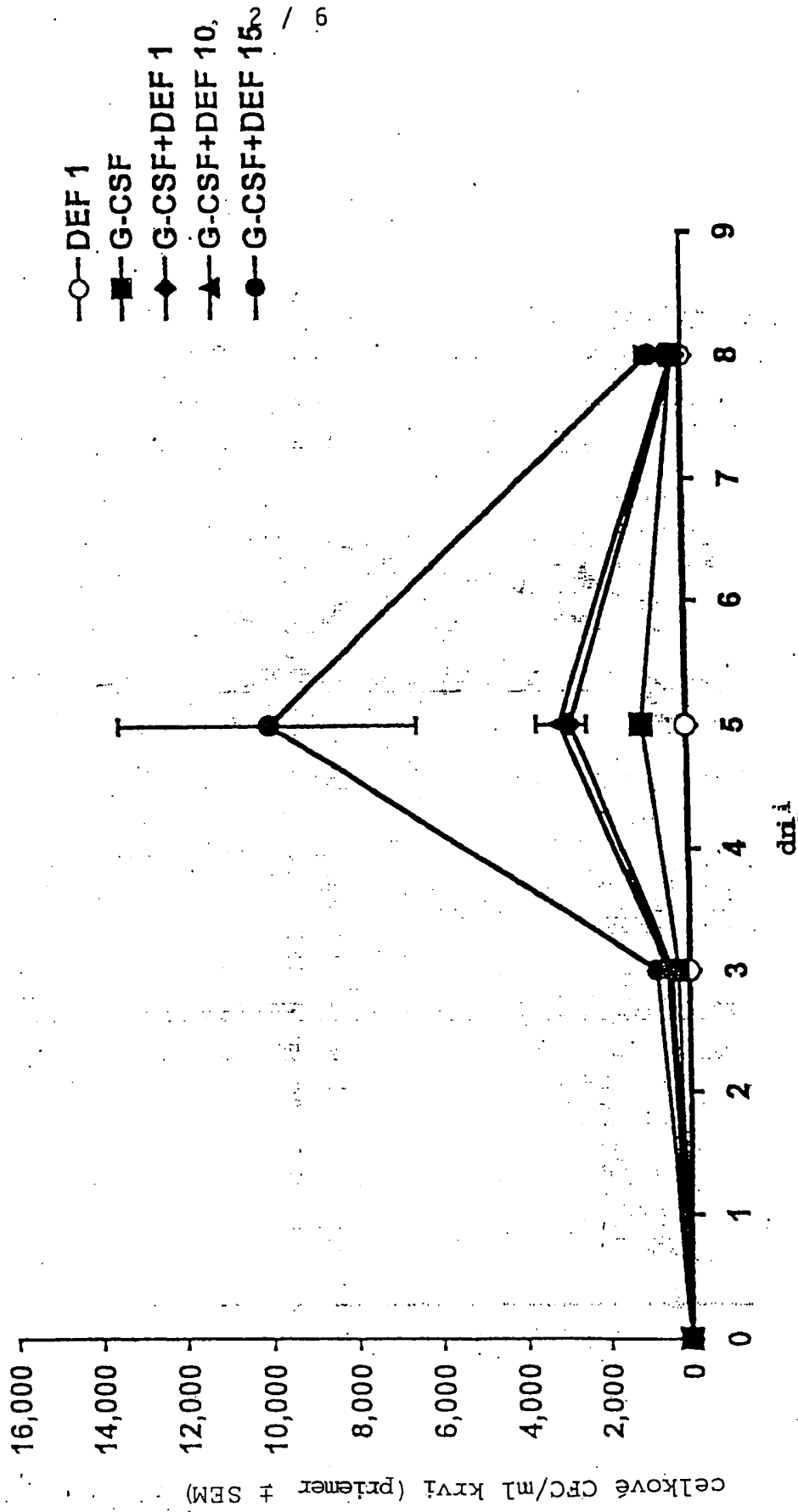
Kinetika HPP-CFC



Obrazok 1

Obrázok 2

Kolónie tvoriace bunky periférnej krvi



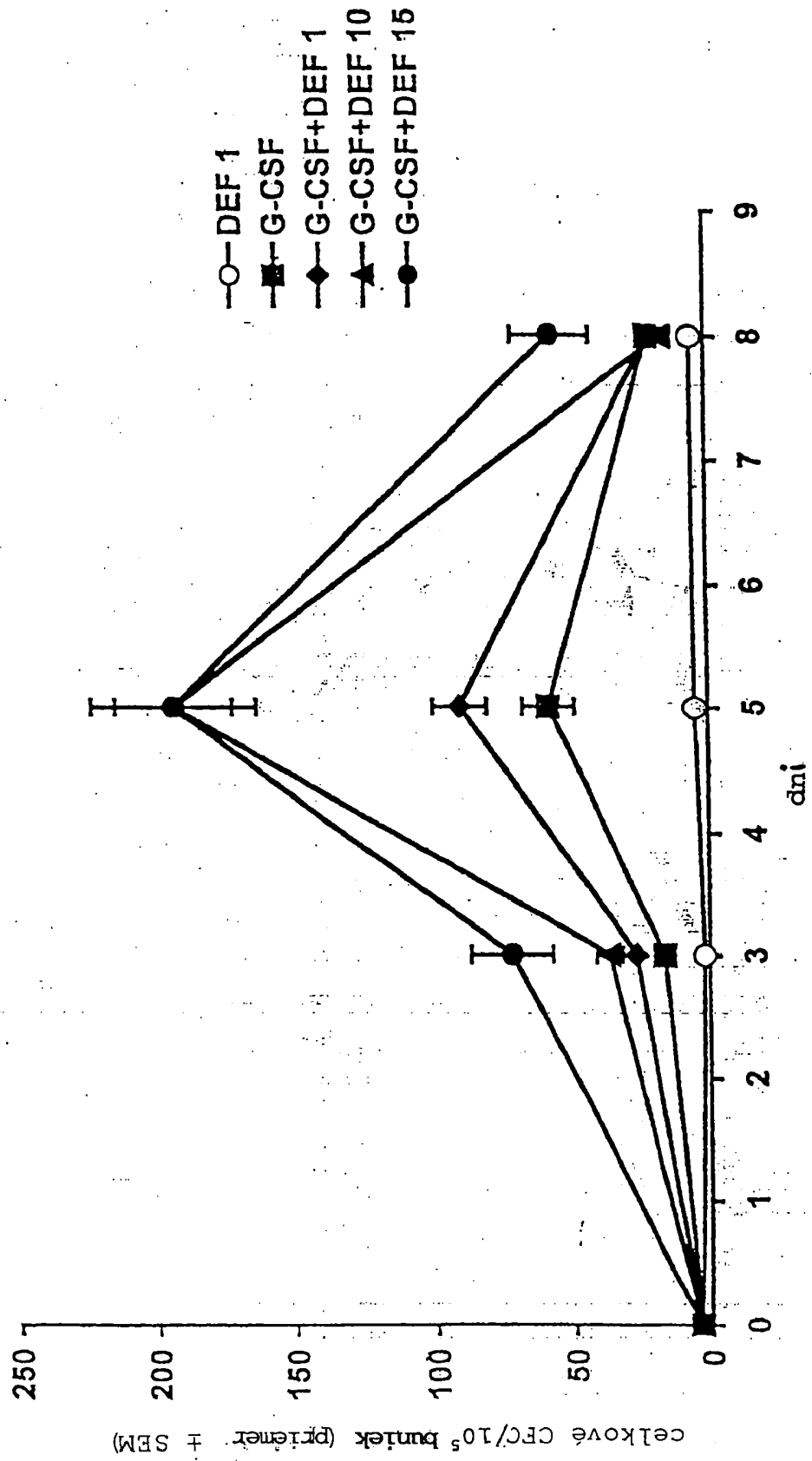
celkové CFC/ml krvi (priemer ± SEM)

dni

3 / 6

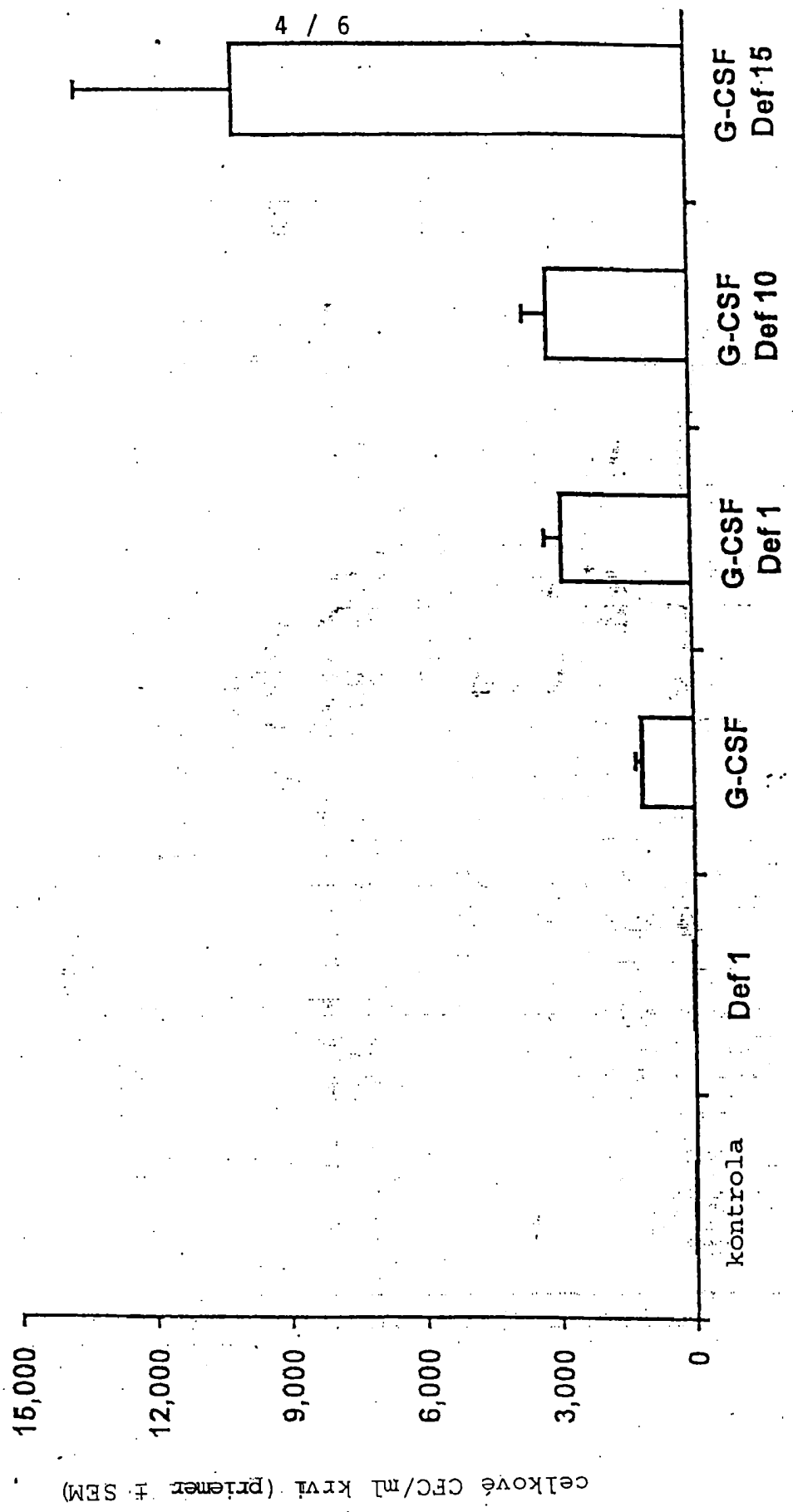
Obrázok 3

Početnosť CFC periférnej krvi



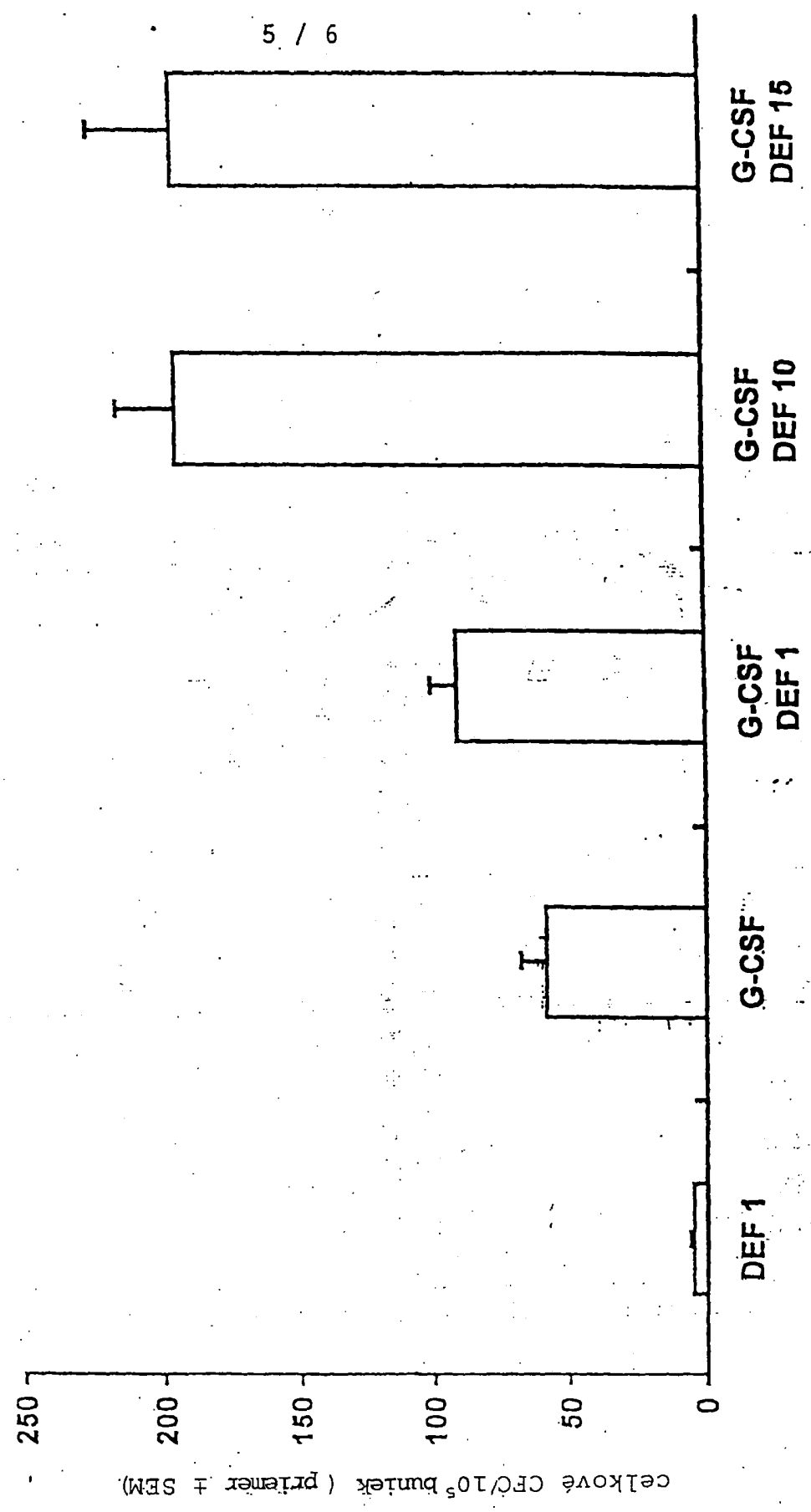
Obrázok 4

Hladiny CFC 5. deň liečby



Obrázok 5

Výskyt CFC 5. deň liečby



Obrázok 6

Kinetika HPP-CFC

