

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

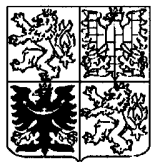
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1283-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23. 10. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **07.11.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/19541405**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 09. 98**
(Věstník č. 9/98)

(86) PCT číslo: **PCT/DE96/02009**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/17072**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 31/44

(71) Přihlašovatel:

ASTA MEDICA AKTIENGESELLSCHAFT,
Dresden, DE;

(72) Původce:

Pergande Gabriela, Offenbach, DE;
Müller Werner E. G., Wiesbaden, DE;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan JUDr. Ing., Národní 32, Praha
1, 10100;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití flupirtinu k profylaxi a terapii
onemocnění souvisejících s poškození-
m hematopoetického buněčného
systému**

(57) Anotace:

Použití flupirtinu nebo jeho soli k profylaxi a k
terapii onemocnění souvisejících s poškození-
m hematopoetického buněčného systému,
například lymfocytů. Zvláštní význam má pro
ošetřování pacientů infikovaných HIV.

CZ 1283-98 A3

01-705-98-Ho

Použití flupirtinu k profylaxi a terapii onemocnění souvisejících s poškozením hematopoetického buněčného systému

Oblast techniky

Vynález se týká použití flupirtinu nebo jeho solí jako léčiva k profylaxi a terapii onemocnění souvisejících s poškozením hematopoetického buněčného systému, například lymfocytů.

Dosavadní stav techniky

Flupirtin je známé zavedené, centrálně působící analgetikum neopiátového typu.

Analgetické účinky odvozuje flupirtin od jiných mechanismů: působení než opiátově-opioidní analgetika (Nickel B., Postgrad, Med. J. 63 (dod.3), str. 19, 1987; Szelenyi I., Nickel B., Borbe H.O., Brune K., Br. J. Pharmacol 143, str. 89 1989). Elektrofyzilogickými testy se prokázalo, že flupirtin zasahuje jak na supraspinální, tak na spinální rovině do nociceptivního dění (Carisson K.H, Jurna I., Eur. J. Pharmacol 143, str. 89 1987; Bleyer H., Carlsson K.H., Erkel H.J., Jurna I., Eur. J. Pharmacol 151, str. 259, 1988; Nickel B., Aledter A., Postgrad Med. J. 63 (dod.3) str.41, 1987).

Flupirtinu se používá také při akutně bolestivých stavech vyvolaných onemocněním pohybového ústrojí jako léčiva.

S úspěchem se také aplikuje flupirtin u pacientů s degenerativními nebo revmatickými nemocemi.

Vedle dobrých analgetických vlastností má flupirtin také

svalové relaxační účinky, takže se flupirtin může aplikovat k ošetřování svalového napětí nebo při onemocněních spočívajících na svalovém napětí (německý patentový spis DE 40 22 442).

Při zkoumání svalově relaxačního účinku flupirtinu také na kryších se také zjistilo, že účinek flupirtinu se může tlumit excitatorní aminokyselinou N-methyl-D-aspartát (NMDA). Na základě tohoto antagonistického účinku NMDA se flupirtin hodí také k ošetřování nemocí centrálního nervového systému, zprostředkovaných NMDA, jako například mozkové ischemie, neurodegenerativních onemocnění a epileptických záchvatů (německý patentový spis číslo DE 43 27 516).

Z chemického hlediska je flupirtin 2-amino-3-ethoxykarbonylamino-6-(p-fluorbenzylamino)pyridin. Syntéza flupirtinu a jeho farmaceuticky vhodných solí je popsána v německých patentových spisech číslo DE 17 95 858, DE 31 33 519 a DE 34 16 609.

S překvapením se nyní zjistilo, že flupirtin je schopen tlumit apoptotické vymírání buněk hematopoetického buněčného systému, například lymfocytů.

Tím se otevírá možnost aplikovat flupirtin k léčení onemocnění souvisejících s poškozováním hematopoetického buněčného systému.

Zvláštní význam se přičítá léčení pacientů infikovaných HIV /pacientů s AIDS.

Podstata vynálezu

Použití účinné látky flupirtin nebo jeho farmaceuticky vhodných solí k přípravě léčiv k ošetřování nemocí souvisejících s poškozováním hematopoetického buněčného systému.

Vynález objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení pomocí přiložených obrázků.

Seznam obrázků

Na obr. 1 je znázorněna inkubace neinfikovaných (prázdné kolečko) a HIV-1-infikovaných (plné kolečko) buněk s různými koncentracemi Flupirtinu. Jsou udány střední hodnoty deseti paralelních pokusů; směrodatné odchylky nepřesahují 10 %. Na ose x je uvedena koncentrace drogy v $\mu\text{g/ml}$, na ose y koncentrace buněk v 10^{-3}ml .

Na obr. 2 je účinek flupirtinu na spontánní apoptosu lymfocytů získaných od zdravých jedinců (prázdné sloupce) a HIV-1-infikovaných pacientů (plné sloupce). Po jednom dni byly buňky analyzovány průtokovou cytometrií. Zkoumaly se lymfocyty dvanácti infikovaných pacientů a osmi zdravých jedinců. Udány jsou střední hodnoty a směrodatné odchylky. Na ose x je uvedena koncentrace drogy v $\mu\text{g/ml}$, na ose y spontánní apoptosis v procentech.

Na obr. 3 je snížení indukovaného apoptotického odumírání lymfocytů po ošetření flupirtinem. NMZ zdravých jedinců (prázdné sloupce) a HIV-1-infikovaných pacientů (plné sloupce) byly přivedeny systémem HX/XOD k apoptickému odumření. Flupirtin se přidával do buněk 6 hodin před systémem generujícím kyslíkový radikál. O den později byly buňky analyzovány průtokovou cytometrií. Zjistily se hodnoty celkové apoptosy; od nich se odečetly hodnoty spontánní apoptosy. Tím udávají uvedené hodnoty míru indukované apoptosy.

Na ose x je uvedena koncentrace drogy v $\mu\text{g/ml}$, na ose y indukovaná apoptosis v procentech. Hvězdička nad sloupci znamená p menší než 0,001

Příklady provedení vynálezu

Farmakologické zkoušky

Materiály

Flupirtin-maleát [2-amino-3-ethoxykarbonylamino-6-(p-fluor-benzylamino)pyridinmaleát],

k přípravě HIV-1-gp120 se použije virového kmene HIV-1 HTLBIIB (Popovic a kol. 1984). Získaný izolovaný prostředek gp120 má čistotu vyšší než 95% podle elektroforézy za použití polyakrylamidového gelu (Müller a kol, 1988).

Antiretrovirální zkušební ná sada

Metodologie pro ná sadu HIV-1 už byla dříve popsána (Sarin a kol., 1987). V mediu se suspendují buňky linie lidských T-lymfoblastů CEM (koncentrace 1×10^5 buněk/ml) a infikují se virem HIV-1 (kmen HTLVIII_B). K tomu se zvolí 50-násobek 50% infekční dávky do buněčné kultury [CCID₅₀]. CCID₅₀ je infekční dávka, při které je infikováno 50 % buněk v ml buněčné suspence. Jedno-mililitrové kultury se inkubují 5 dní. Dvě hodiny před infikováním se k buňkám přidá Flupirtin v různých koncentracích. Počet žijících buněk se stanoví pomocí kolorimetrického testovacího systému 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolinbromidu [MTT] (Scudiero a kol., 1988). Vyhodnocuje se čítačem ELISA, jak bylo publikováno (Müller a kol, 1991). Po inkubaci prodělaly neinfikované buňky CEM 2,15 a infikované buňky 0,13 dělení.

Krevní vrorky

Vzorky lidské periferní krve se odeberou (i) od dvanácti homosexuálních mužů infikovaných HIV-1 [střední věk 35 let, rozsah 22 až 43 let] a (ii) od osmi zdravých HIV-1-seronegativních mužů vystavených jinak témuž riziku přibližně stejné věkové skupiny (střední věk 30 let, rozsah 23 až 35 let). Pacienti se zařadí podle klasifikace "Centers of Disease Control (CDC)" (CDC, 1992). Testy se HIV-1-seropozitivními pacienty se

provedou se vzorky krve předpokládaných nosičů viru (CDC: A1, A2, střední počet buněk CD4 407/ μ l, rozsah: 209 až 698/ μ l). Žádný z pacientů nevykazuje známky nádorového onemocnění, symptomatické infekce nebo nebyl deset týdnů před odběrem krve podroben imunitu potlačujícímu ošetření například kortikosteroidy.

Přípravky buněk a jejich ošetření

Mononukleární buňky [MNZ] se získají a obohatí z heparinované krve odstředěním s gradientem hustoty Ficol-Hypaque (Rossol a kol. 1990). V kultivačním mediu se kultivuje $0,5 \times 10^6$ buněk v konečném objemu 500 μ l; jako medium se použije medium MEM, které bylo obohaceno 10 mM pufru HEPES, 2,6 % hydrogenuhličitanu sodného, 100 U/l penicillinu, 100 μ g/ml streptomycinu, 10 % zárodečného telecího séra [FKS] a 1 mM glutamátu. Kde je to uvedeno, byly buňky okamžitě po izolování ošetřeny chemickou látkou.

Vyvolání apoptosy reaktivním kyslíkem

Reaktivní kyslíkové radikály se připraví za použití systému hypoxanthinoxidázy [HX] a Xanthinoxidázy [XOD] (Bruck a kol., 1994).

MNZ se suspendují 24 hodin v celkovém objemu 500 μ l media MEM (jak shora popsáno). Tato násada se přidá k 0 až 80 mU/ml XOD a 1 mM HX. Při koncentraci 80 mU/ml XOD (Sigma, München, FRD) uhynulo více než 90 % lymfocytů apoptotickou smrtí.

Pokud není uvedeno jinak, použije se v následujících studiích 10 mU/ml enzymu XOD a 1 mM HX. Za těchto inkubačních podmínek prodělá asi 50 % buněk apoptosu. Je výhodné tento stupeň apoptosy dodržet, pokud se má zjistit, zda určitá sloučenina představuje potenciální inhibitor a/nebo stimulator apoptotického usmrcení buněk. Flupirtin se buňkám přidává 6 hodin před přísadou systému produkujícího kyslíkový radikál;

inkubace se po jednom dni ukončí.

Analýza buněk pomocí průtokové cytometrie

Apoptosa se měří při buzení paprskem argonového laseru v průtokovém cytometru FACScan (Becton-Dickinson) při vlnové délce 488 nm popsaným způsobem (Schmid a kol., 1994). Lymfocyty se oddělí optickými metodami a tím se charakterizují, k tomu dojde kombinací dopředného rozptylu světla jako míry pro velikost buněk [FSC] s pravoúhlým rozptylem světla jako míry pro stavu povrchu [SSC]. K zabarvení apoptotických buněk MNZ se buňky rozpustí se 20 $\mu\text{g/ml}$ 7-aminoaktinomycinu D [7-AAD] (Sigma) v PBS a inkubují se 20 minut při teplotě 4 °C při vypnutém světle. Nakonec se buňky analyzují průtokovým cytometrem v barvicím roztoku. Červená fluorescence vyvolaná 7-AAD se zachycuje filtrem s vlnovou délkou 650 nm. 7-AAD pronikne do apoptotických buněk na základě rozkladu buněčné membrány a v návaznosti na to zabarví DNA interkalačním postupem. Analýza dat proběhne programem LYSIS II. Střední kanálová čísla se přepočtou na střední intenzitu fluorescence, velikost buněk a stav povrchu.

Fluorescenční značení in situ pomocí systému TdT a značení povrchu

K definování určité subpopulace buněk, která prodělala apoptotický pochod, se buňky ošetří systémem Terminal Transferrase [TdT]. Použije se způsobu Gorczyca a kol. (1993) s nepatrnými úpravami. Buňky v suspensi se dvakrát promyjí v PBS (Gibco) a nato se fixují 1% paraformaldehydem (Riedel a Haen) 10 minut při teplotě 4 °C. Nato se buňky promyjí dvakrát PBS [do kterého bylo přidáno 5 % séra AB a 0,5 % albuminu hovězího séra (BSA)]. Buňky se pak peletují a resuspendují se v 50 μl 2,5 mM roztoku chloridu kobaltu, který byl přidán do 0,5 mM Biotin-16-dUTP a 25 U TdT. Tato násada se pufruje 200 mM kakovým draselným, 25 mM Tris-HCl a 0,25 g/ml BSA; inkubace probíhá 30 minut při teplotě 37 °C podle údajů výrobce (Boeh-

ringer Mannheim, Mannheim, FRG). Buňky se pak dvakrát promyjí PBS [5% AB-serum a 0,50 BSA] a resuspendují se ve 100 μ l pufrovaného barevného roztoku, který obsahuje 5 μ g/ml fluoresceinisothiokyanátem [FITC] značeného avidinu [čistota pro buněčnou analysu]. K současnému značení povrchu se buňky dodatečně ošetří 20 μ g/ml monoklonální protilátkou CD3 značenou phycoretrinem (Becton-Dickinson). Fluorescence se kvantifikuje průtokovou cytometrií, kterou popsal Halliwell (1987).

Výsledky

Ošetření buněk CEM infikovaných HIV-1 Flupirtinem

Buňky CEM se předběžně ošetřují dvě hodiny flupirtinem a zůstanou návazně neinfikované nebo se infikují HIV-1 v paralelní násadě.

Po pěti dnech se buňky v uvedených násadách spočítají. Jak vyplývá z obr. 1, nezměnila se koncentrace buněk jak v neinfikovaných, tak v infikovaných kulturách v závislosti na ošetření flupirtinem podstatně. (P větší než 0,1).

Flupirtin se přidával do násad v konečných koncentracích 0,1 až 30 μ g/ml. Koncentrace buněk v neinfikovaných násadách obnášela 446880 $\pm$ 31020 buněk/ml, v HIV-1 infikovaných násadách 108420 $\pm$ 6710 buněk/ml.

Tyto výsledky ukazují, že flupirtin na buňky nepůsobí toxicky, jinak však nepůsobí také žádným účinkem na infekci HIV-1 in vitro za použitých inkubačních podmínek.

Nastavení systému hypoxanthinoxidáza/xanthinoxidáza

Koncentrace xanthinoxidázy [XID] se volí tak, aby se procentuelní podíl apoptotických buněk nastavil na přibližně 50 %.

Apoptotické buňky vykazují intenzitu fluorescence větší

než 10 arbitrárních kanálových počtů. Při 0 mU XOD bylo jen 6,6 $\pm$ 2,1 % nad touto "cut-off" hranicí větší než 10 arbitrárních kanálových počtů, bylo tedy 6,6 % apoptotických. Při rostoucí koncentraci XOD percentuelní podíl apoptotických buněk stoupá a dosahuje při 80 mU XOD hodnoty 93,2 $\pm$ 6,8 %. Při 10 mU XOD prochází apoptotickým procesem přibližně 50 % (přesně 54,6 $\pm$ 6,1) buněk.

V nepřítomnosti XOD vykazují buňky následující obrazec rozdělení FSC/SSC:

Velikost buněk 349 $\pm$ 27 (arbitrální počet kanálů) vůči stavu povrchu 112 $\pm$ 15. Při koncentraci enzymů 80 mU velikost buněk klesá a dosahuje hodnoty 256 $\pm$ 22, zatímco stupeň stavu povrchu narůstá na 180 $\pm$ 29. Takové změny naznačují charakteristickou apoptosu podmíněnou morfologickou změnou buněk. Při 10 mU XOD vykazují buňky obrazec rozdělení, který je přibližně uprostřed těchto prve ukázaných extrémních hodnot. Pokud není uvedeno jinak, nasazovalo se 10 mU na enzym.

Vliv Flupirtinu na spontánní míru apoptosy u lidských lymfocytů

Vzorky periferní krve zdravých jedinců i pacientů infikovaných HIV-1 se zkoumají z hlediska spontánní apoptosy. Buňky se analyzují jeden den po odebrání krve. Jak vyplývá z obr. 2, vykazují buňky MNZ kontrolních skupin neinfikovaných jedinců 6,32 $\pm$ 7,84 % buněk po tomto časovém období apoptosy, zatímco 28,42 $\pm$ 7,84 % buněk pacientů infikovaných HIV-1 prodělává apoptosu. MNZ obou skupin se ošetří po 24 hodin Flupirtinem v koncentracích 0,1 až 30 $\mu\text{g/ml}$. Jak obr. 2 ukazuje, míra spontánní apoptosy lymfocytů se působením Flupirtinu významně nemění (P větší než 0,1). To platí pro buňky jak zdravých jedinců tak HIV-1-infikovaných pacientů.

Snižování indukované apoptosy v mononukleárních buňkách půso-

bením flupirtinu

NMZ zdravých jedinců a HIV-1-infikovaných pacientů se zpravovávají systémem HX/XOD (vytváření kyslíkových radikálů) k indukci apoptosy. Flupirtin se přidává buněčným násadám 6 hodin před vystavením účinku induktoru v různých koncentracích. Jak ukazuje obr. 3, nezpůsobuje flupirtin při koncentracích 0,1 až 3,0 $\mu\text{g/ml}$ významné snížení apoptotického zániku buněk (P menší než 0,001). Při koncentraci flupirtinu 10 $\mu\text{g/ml}$ je protektivní účinek ještě jenom při zkoušce s lymfocyty infikovaných pacientů významný. Při koncentracích 0,3 až 3,0 $\mu\text{g/ml}$ je ochranný účinek léčiva nejvýraznější a tlumí indukční apoptosu nejsilněji.

Snížení indukované apoptosy v násadách s lymfocyty zdravých jedinců je přibližně 40% a u infikovaných pacientů přibližně 60%.

Apoptosa v lymfocytech byla také prokázána metodou fragmentace DNA. Po inkubaci buněk systémem HX/XOD se DNA z buněk extrahuje, v agarovém gelu se rozdělí podle velikosti a přenesou se na blot.

DNA se rozpadla na žebříku podobný vzor fragmentů se 180 párů bází a jejich násobky. Takový vzor fragmentů je charakteristický pro rozrušení DNA, ke kterému dochází při apoptotických procesech (Wyllie, 1980). Buňky, které byly ošetřeny Flupirtinem nevykazují na rozdíl od toho žádnou fragmentaci DNA.

Representativní dot-bloty, které ukazují účinek flupirtinu na buňky, které prodělávají jak spontánní, tak indukovanou apoptosu jsou rovněž k dispozici.

K provedení této série pokusů byla v MNZ pomocí HX/20 mU systému XOD apoptosa snížena. Za těchto podmínek se stalo

- v přítomnosti Flupirtinu- 64,2 ± 7,9 % buněk apoptotických.

Jestliže však byly tyto buňky ošetřovány 24 hodin Flupir-
tinem, klesl počet apoptotických buněk významně na 18,3 ± 5,8
%.

Tyto výsledky jasně dokládají, že flupirtin je mnohoslib-
ným léčivem například k ošetřování indukovaného apoptotického
buněčného odumírání lymfocytů u pacientů s AIDS.

V německé zveřejněné přihlášce vynálezu číslo DE-OS
43 27 516 je popsán neuroprotektivní účinek flupirtinu, napří-
klad u mozkové ischemie, Alzheimerově a Parkinsonově nemoci,
infekčních indukovaných neurodegenerativních onemocněních, jako
je AIDS-encefalopatie nebo Jakob-Creuzfeldovo onemocnění.

Indikace AIDS-encefalopatie s pokročilou demencí předsta-
vuje neurologickou komplikací onemocnění AIDS. Za příčinu pro
vznik AIDS-encefalopatie se kromě jiného považuje HIV (gp
120) indukované uvolňování NMDA-agonisticky působících neuro-
toxinů jako je kyselina chinolinová z infikovaných makrofágů,
které nakonec vede k odumírání nervových buněk.

AIDS-encefalopatie a onemocnění AIDS (získaný syndrom
imunitní nedostatečnosti) jsou onemocnění postihující různé
systémy orgánů. Při prvním onemocnění jde, jak bylo prokázáno,
o neurologickou komplikaci onemocnění AIDS (apoptosu nervových
buněk), zatímco druhé onemocnění představuje "získanou imunitní
nedostatečnost", která spočívá v poruše buněčného imunitního
systému s výrazným zmenšením T-pomocných buněk (apoptosa sou-
části hematopoetického buněčného systému).

Vynalezený účinek flupirtinu, tlumení indukované apoptosy
buněk hematopoetického buněčného systému, například lymfocytů,
byl o to překvapivější, že existence receptorů NMDA mimo cen-

trální nervový systém nebyla dosud prokázána. V důsledku toho nebylo také pro pracovníky v oboru možné usuzovat z ochrany nervových buněk Flupirtinem na ochranu buněk hematopoetického buněčného systému.

Jako další onemocnění, která mohou být profylakticky a terapeuticky ošetřována na základě působení flupirtinu podle vynálezu lze například jmenovat:

- neutropenie/lymfozytopenie vyvolané léčivý (jako cytostatiky, kortikosteroidy), jedy, zářením a jinými nemocemi
- léčivý nebo infekcemi (například HIV) vyvolané thrombozytopenie.

Flupirtin může být k profylaxi a léčení podáván o sobě známým způsobem ve formách, jako jsou tablety, tablety povlečené filmem, tvrdé želatinové kapsle, měkké želatinové kapsle, pelety, granuláty, drážky, čípky, mikrokapsle, vodné nebo olejové suspence, olejové roztoky, injekční roztoky k intramuskulární aplikaci, injekční roztoky k intravenózní aplikaci.

Vhodnými solemi pro výrobu léčiv jsou všechny fyziologicky vhodné soli flupirtinu. V úvahu připadají například hydrochlorid, maleát, sulfát a glukonát flupirtinu.

Obsah flupirtinu ve farmaceutických prostředcích podle vynálezu je 0,1 mg až 3000 mg, s výhodou 10 mg až 500 mg. Jednotlivé dávky léčiv mohou být podávány denně 1 až 5x, s výhodou 1 až 3x.

Dávkové údaje se vztahují vždy k flupirtinu jako základu. Použijí-li se soli flupirtinu, musejí se přepočítat na molové hmotnosti.

Farmaceuticky a galenicky se se sloučeninami podle

27.04.99

- 12 -

vynálezu zachází obvyklými o sobě známými způsoby. Například se Flupirtin a nosiče a pomocné látky mísením dobře zhomogenizují, přičemž se s výhodou pracuje při teplotách 20 až 80 °C s výhodou 20 až 50 °C. Zkoumaly se lymfocyty dvanácti infikovaných pacientů a osmi zdravých jedinců. Udány jsou střední hodnoty a směrodatné odchylky.

Průmyslová využitelnost

Flupirtin nebo jeho soli pro výrobu farmaceutických prostředků k profylaxi a k terapii onemocnění souvisejících s poškozením hematopoetického buněčného systému, například lymfocytů zvláště v případě pacientů infikovaných HIV.

h

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití účinné látky flupirtinu nebo jeho farmaceuticky použitelných solí k přípravě léčiv k ošetřování nemocí souvisejících s poškozením hematopoetického buněčného systému.

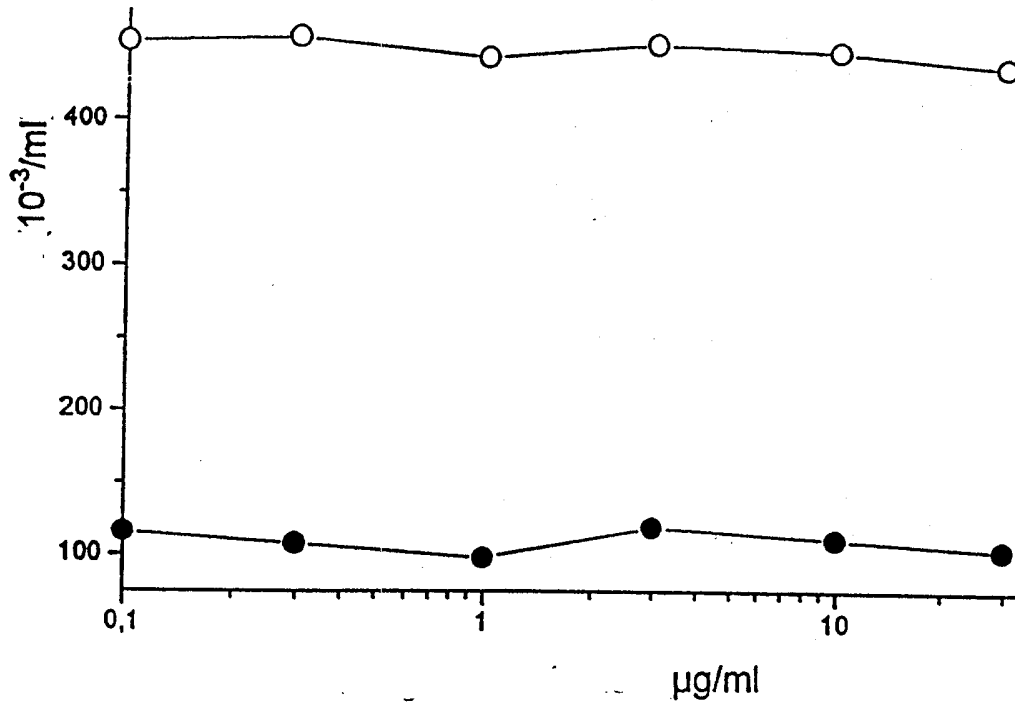
2. Použití účinné látky flupirtinu nebo jeho farmaceuticky použitelných solí podle nároku 1, k ošetřování pacientů infikovaných HIV /AIDS.

3. Použití podle nároku 1, v y z n a ě u j í c í s e t í m, že se flupirtin nebo jeho soli kombinují pro příslušné formy použití s farmaceuticky vhodnými nosiči a/nebo s pomocnými látkami.

11

PV 1283-98
27.04.98

- 1/3 -

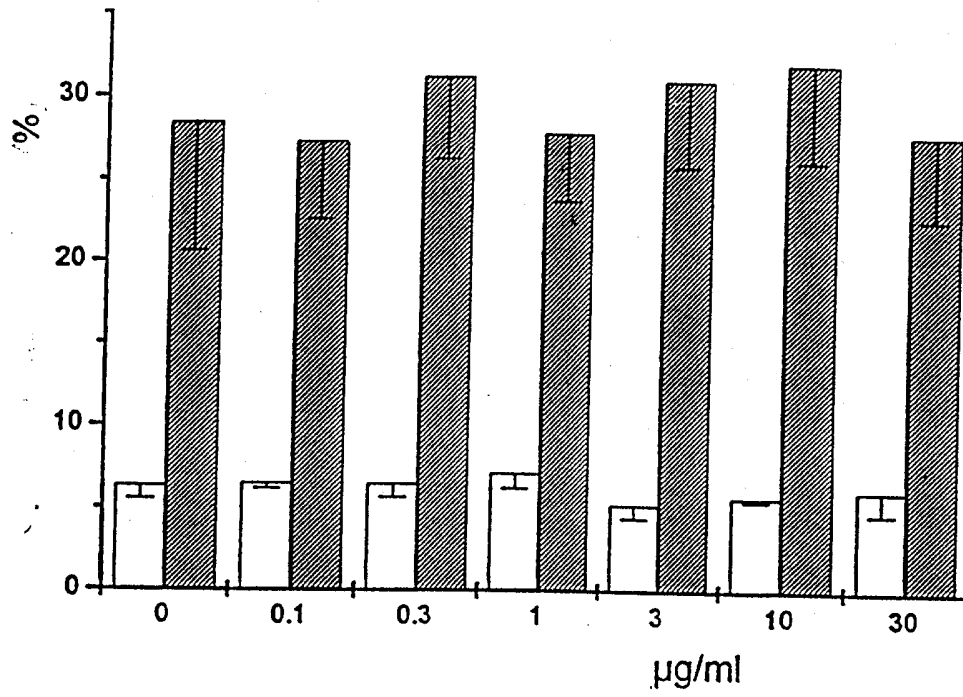


OBR. 1

lh

22.04.98

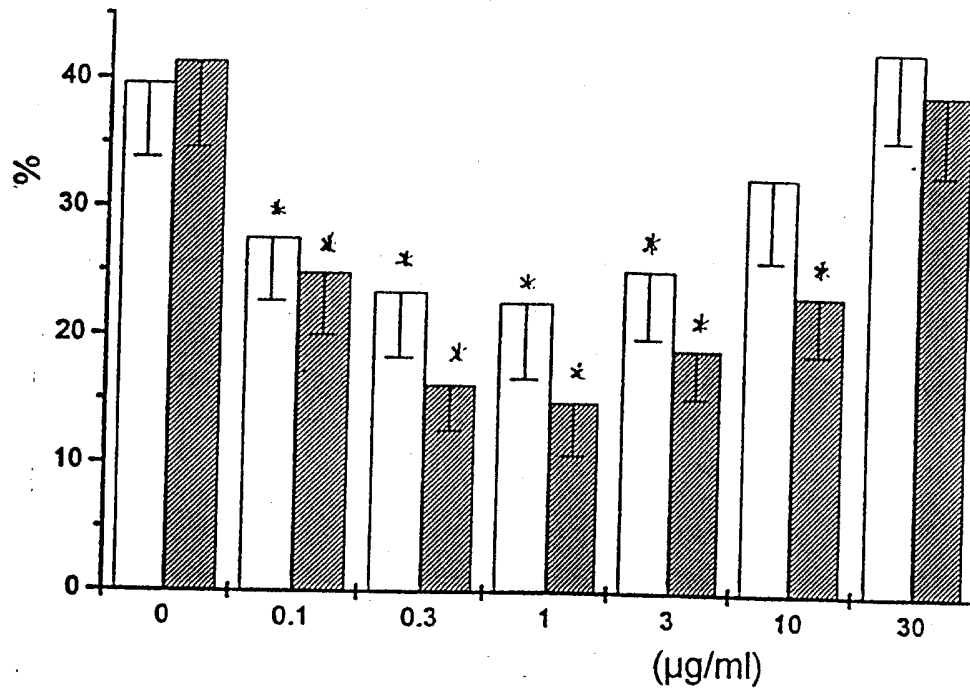
- 2/3 -



OBR. 2

11

- 3/3 -



OBR. 3

h