SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 804

(21) Číslo prihlášky: **1824-92**

(22) Dátum podania: **15.06.92**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **7717 773**

(32) Dátum priority: **18.06.91**

(33) Krajina priority: **US**

(40) Dátum zverejnenia: **12.10.94**

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **13.04.99**

(86) Číslo PCT:

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl [6]:

A 61K 35/74
A 61K 35/66

(73) Majiteľ patentu: AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION, Madison, NJ, US;

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

(54) Názov vynálezu: **Farmaceutický prostriedok na liečenie T-bunkovej leukémie/lymfómu dospelých**

(57) Anotácia:
Farmaceutický prostriedok na liečenie T-bunkovej leukémie/lymfómu dospelých, ktorý ako svoju účinnú zložku obsahuje antiproliferatívne množstvo rapamycínu a okrem toho farmaceuticky prijateľný nosič.

Oblasť techniky

Vynález sa týka farmaceutického prostriedku na liečenie T-bunkovej leukémie/lymfómu dospelých. Prostriedok obsahuje ako svoju účinnú zložku rapamycín.

Doterajší stav techniky

T-bunková leukémia/lymfóm dopelých (ďalej ATL) je agresívne hematologické ochorenie charakteristické rýchlym nevratným fatálnym priebehom. Klinické prejavy ATL zahrnujú hyperkalcinémiu, infiltráciu kostnej drene, generalizovanú lymfadenopatiou, leukémiu, kožné prejavy, hepatosplenomegáliu a lytické poškodenie kostí.

Ľudský T-lymfotrópny vírus 1 (ďalej HTLV-1) je etiologickým pôvodcom ATL. Dôkaz o spojení HTLV-1 s ATL zahrnuje epidemiologické zoskupenie ATL v zemepisných oblastiach s endemickým výskytom infekcií spôsobených HTLV-1. (Hinuma Y., Proc. Natl. Acad, Sci., 78:6476, 1981, Watanabe T., Virology 133:238, 1984, Catovsky D, Lancet 1:639, 1982, Blatter W. A., Int. J. Ca. 30:257, 1982), vysoká frekvencia špecifických protilátok v sére pacientov s ATL (Hinuma Y., proc. Natl. Acad. Sci., 78:6476, 1981), detekcia monoklonálnych protivírusových sekvencií zabudovaných v leukemických bunkách pacientov s týmto ochorením (Yoshida M., Proc. Natl. Acad. Sci., 81:2534, 1984) a izolácia infekčných vírusov z leukemických bunkových kultúr. (Poiesz B. J., Proc. Natl. Sci., 79:2031, 1982).

T-bunky transformované HTLV-1 sú charakterizované nekontrolovateľným rastom pri absencii antigénnej stimulácie. Nezávislý rast IL-2 je znakom týchto bunkových kultúr. Povrchový fenotyp týchto buniek je určovaný významným rastom IL-2 receptorov. Nové dôkazy ukazujú, že tieto receptory majú vysokú afinitu k IL-2R. Väčšina T-buniek izolovaných od infikovaných osôb nebola testovaná, ale aj tak reagovala na vonkajšie podanie IL-2 (Kodaka T., Jpn. J. Ca. Res., 81:902, 1990).

Vírus HTLV-1 bol označený za prenosný sexuálne, z matky na dieťa, medzi intravenóznymi narkomanmi (pravdepodobne spoločným používaním nakazených ihiel) a krvnou transfúziou (Hino s., Gann 76:474, 1985, Murphy E. L., Ann. Int. Med., 111:555, 1989, Sato H., Int. J. Ca. 37:395, 1986, Robert-Guroff N., J.A.M.A., 255:3133, 1986). Infekcie vírusom vyvoláva asi v 4 % prípadov nebezpečenstvo rozvoja ATL (Murphy E. L., Ann. Int. Med., 111:555, 1989).

Výskyt vírusu HTLV-1 u obyvateľov Spojených štátov amerických sa stal verejnou zdravotnou záležitosťou. Epidemiologická štúdia urobená vo veľkých mestách Spojených štátoch amerických odhalila priemerný výskyt u 0,025 % zdravých darcov krvi. (Wiliams, A. E., Science, 240:643, 1988). Najnovšie epidemiologické údaje uvádzajú séropozitivitu u 4,4 % zdravej čiernej populácie v Brooklyne, New Yorku a ukazujú, že séropozitivita veľmi významne závisí od vzorky populácie (Dosik, H., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 9:2, 1990). Khabbaz (J. A. M. A. 263:60, 1990) označuje priemernú séroprevalenciu 6,7 medzi prostitútkami. Tieto údaje dosahujú rozmedzie od 0 % v Nevade až do 25,4 % v Newarku, NJ a označujú rôzne počty, dokonca medzi vysoko rizikovými skupinami.

Medzinárodne HTLV-1 je prítomný v endemickom výskyte v rôznych oblastiach sveta. Juhozápadné ostrovy Japonska boli dlho označované ako endemická oblasť výskytu infekcie HTLV-1 (Jpn. J. Clin. Oncol. 15:517, 1985). Napríklad séroprevalencia 8 % bola zistená u zdravých dobrovoľných darcov krvi v južných prefektúrach Kjúšú (Maeda, Y., Int. J. Ca. 33:717, 1984). Séro-prevalencia 9,2 % medzi inak zdravými pracovníčkami v potravinárstve vo veku nad 30 rokov bola hlásená na Jamajke (Murphy, E. L., Ann. Int. Med. 111:555, 1989). Séroprevalencia vzrástla na 14,1 % u žien v sobášnom veku videných na klinike sexuálne prenosných chorôb na Jamajke. Rizikové faktory vírusovej infekcie nasledujú očakávanú vzorku sexuálne prenosných ochorení.

Hoci sérologické a molekulárne genetické testy sú schopné zobraziť HTLV-1 infekciu, nie sú bežné prostriedky na diagnózu skorej ATL. Zároveň nie sú žiadne efektívne terapeutické prostriedky pre neskoré štádia choroby, to znamená prežitie menej ako 6 mesiacov po stanovení diagnózy. Neúspešné liečebné pokusy boli hlásené pri použití radiácie, metotrexatu, leukovirínu, interferonu SQ, vysokých dávok steroidov a pri kombináciách obsahujúcich cyklofosfamid, adriamycín, onkovin, prednisol a bleomycín (Harrington, J. Aids 4:284, 1991). Účinná liečba ATL bola hlásená pri použití SUN4800 (rekombinantný interferón gama) (Ishihara, K. J. Invest. Dermatol. 93:556, 1989). 90% reakcia bola hlásená u 3 z 10 ATL pacientov liečených anti-Tac, myšej protilátky proti ľudským p55 IL-2 peptidovým receptorom (Tac; CD25) (Junghans, R., 37:861A, 1989).

Rapamycín, makrocyklické antibiotikum produkované Streptomyces hygroscopicus (US patent č. 3 929 992), bolo ukázané ako schopné uchrániť útvary humorálnych protilátok (ako IgE) v odpovedi na albumínovú alergickú reakciu (Martel, R., Can. J. Physiol. Pharm. 55:48, 1977), zastaviť T-bunkovú aktiváciu (Strauch, M., FASEB 3:3411, 1989) a predĺžiť čas prežitia orgánových histokompatibilných schopností (Morris, R., Med. Sci. Res., 17:877, 1989).

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvorí farmaceutický prostriedok na liečenie T-bunkovej leukémie/lymfómu dospelých u cicavcov, ktorý obsahuje antiproliferatívne dávky rapamycínu a farmaceuticky prijateľný nosič. Je možné ho podávať parenterálne, intranazálne, intrabronchiálne, topicky, transdermálne alebo rektálne. Rapamycín je zvlášť užitočný v zastavení progresie a navodenia remisie ATL svojou schopnosťou inhibovať proliferáciu T-buniek transformovaných HTLV-1.

Efekt rapamycínu na ATL bol založený na in vitro uskutočnených štandardných farmakologických testoch s použitím ľudských bunkových kultúr transformovaných HTLV-1 získaných od ATL pacientov. Tieto bunkové rady sú v súčasnosti najlepším modelom ATL u ľudí. Cyklosporín A (CsA) bol použitý na porovnanie. Použité postupy a získané výsledky sú opísané.

ATL bunkového radu boli založené podľa postupov opísaných v literatúre. ATL5S, ATL31 a ATL1K boli založené podľa metódy opísanej Hoshinom (Proc. Natl. Acad. Sci., 80:6061, 1983). Bunkové rady 31008, 31009, 31016 a AT(EGG) boli získané z periférnej krvi osôb nakazených HTLV-1 kultiváciou cez krvné lymfocyty. Bunkový rad MALN bol izolovaný z lymfoidného tumorového tkaniva

ATL pacientov infikovaných HTLV-I liečených na Jackson Memorial/University Medical. Centru na Miami (Harrington, W. J., Jr., J. Acq. Imm. Def. Dis. 4:284, 1991). Primárne kultúry BL a GP boli získané z periférnej krvi ATL pacientov. MALM, BL a GP bunkové rady boli začaté bez spoločnej kultivácie.

Bunky boli upravené na koncentráciu 1 x 10^6 buniek/ml v RPMI 1640 s 15 % fetálneho bovinného séra a doplnené 50 U/ml penicilínu, 50 µg/ml streptomycínu a 2 mM glutamínu. Rapamycín a CsA boli zvlášť riedené na koncentráciu 1 mM v absolútnom etanole postupným riedením. Koncentrácia lieku stúpala od 1 µM do 100 fM. Kultúry boli inkubované pri 37 °C, 5 % CO_2 počas 24 hodín nasledovaných 4 hodinami značenia 0,5 µCi tymidínu. Inkorporácia tymidínu bola meraná kvapalinovou scintiláciou a výsledky boli vyjadrené v počte jednotiek za minútu (cpm). Výsledky získané zo 4 meraní každej koncentrácie boli porovnané s kontrolnými hodnotami na určenie percenta inhibície. Nasledujúci vzorec bol použitý na výpočet percenta inhibície:

$$\text{Percento inhibície} = \frac{\text{cpm (bez lieku)} - \text{cpm (liek)}}{\text{cpm (bez lieku)}} \times 100$$

Percento inhibície získané s rapamycínom je ukázané v nasledujúcej tabuľke.

Percento inhibície ATL bunkovej proliferácie

Koncentrácia rapamycínu	Bunkové rady									
	ATL31	ATL52	ATL1K	ATEGG	31008	31009	31018	MALN	GP	BL
1 µM	28	59	19	58	69	71	59	55	54	80
100 nM	17	58	32	60	68	70	56	54	46	79
10 nM	15	49	18	45	58	67	49	41	46	76
1 nM	18	48	26	53	64	68	48	43	42	73
100 pM	11	47	23	49	45	61	49	37	39	65
10 pM	6	38	12	44	31	47	47	26	14	55
1 pM	11	14	15	48	30	59	50	36	20	56
100 fM	7	38	15	44	29	60	44	36	23	51

Rapamycín inhiboval proliferáciu 8 z 10 ATL bunkových radov pri koncentrácii 100 nM a viac, s 50% redukciou proliferácie v 4 bunkových radoch pri koncentrácii 1 nM. Obe bunkové rady, pri ktorých proliferácia nebola rapamycínom zastavená, boli v kultúre viac ako 5 rokov bez reklonovania a ich areaktivita k rapamycínu môže byť zavinená ich ďalšou transformáciou na necitlivé kmene počas tohto obdobia. Na porovnanie, CsA nezastavil proliferáciu 7 z 10 hodnotených bunkových radov. V zvyšných 3 bunkových radoch (ATL31, ATL5S a 31009) bola proliferácia inhibovaná v 16 %, 23 %, prípadne v 22 %.

Výsledky získané týmito štandardnými farmakologickými testami demonštrujú, že rapamycín inhibuje proliferáciu T-bunkových radov transformovaných HTLV-1, ktoré sú v súčasnosti najlepším modelom pre ATL u ľudí, a preto je rapamycín užitočný na liečbu ATL.

Pokiaľ sa rapamycín použije na liečbu ATL, môže sa podať voľný alebo viazaný na farmakologický nosič. Farmakologický nosič môže byť tuhý alebo tekutý.

Tuhý nosič môže obsahovať jednu alebo viac substancií, ktoré môžu tiež pôsobiť ako príchuť, kĺzna látka, rozpúšťadlo, spevňujúca zložka, plnivo, lubrikant, stlačujúce činidlo, látka viažuca alebo rozkladajúca tablety, môže to tiež byť obaľujúca zložka. V púdroch je nosič jemne delená zložka zmiešaná s jemne delenou aktívnou časťou. V tabletách je aktívna zložka zmiešaná s nosičom, ktorý má stlačujúce vlastnosti vo vhodných proporciách a je zložená v žiadanom tvare a množstve. Vhodné tuhé nosiče zahrnujú napríklad fosforečnan vápenatý, stearan horečnatý, cukor, laktózu, dextrín, škrob, želatínu, celulózu, mastenec, metylcelulózu, karboxymetylcelulózu, polyvinylpyrolidín, nízko rozpustné vosky a živice.

Tekuté nosiče sú používané na prípravu roztokov, suspenzií, emulzií, sirupov, elixírov a prekvapkávaných zlúčenín. Aktívna látka môže byť rozpustená alebo suspendovaná vo farmakologicky vhodnom tekutom nosiči, ako je voda, organické zlúčeniny, zmesi oboch alebo farmaceutické oleje a tuky. Tekuté nosiče môžu obsahovať ďalšie farmaceutické prídavne látky, ako sú solubilizéry, emulzifikátory, nárazníky, ochranné látky, sladidlá, príchuti, spevňujúce látky, zosilňujúce látky, farbivá, regulátory viskozity, stabilizátory alebo osmoregulátory. Vhodné príklady tekutých nosičov na orálne alebo parenterálne podanie zahrnujú vodu (čiastočne obsahujúcu prídavné látky, ako je uvedené, napríklad deriváty celulózy, najlepšie sodný karbometoxycelulózový roztok), alkoholy (vrátane monohydrických alkoholov a polyhydrických alkoholov, napríklad glykoly) a ich deriváty a oleje (napríklad frakcionovaný kokosový olej). Na parenterálne podanie môžu byť nosiče aj estery olejov ako etyloleát a izopropylmyristát. Sterilné tekuté nosiče sú vhodné v sterilných roztokoch na parenterálne podanie. Tekuté nosiče na prekvapkávané kompozície môžu byť halogénové hydrokarbonylové zlúčeniny alebo iné farmaceuticky prijateľné látky.

Tekuté farmaceutické zložky, ktorými sú sterilné roztoky alebo suspenzie, môžu byť použité napríklad intramuskulárnou, intraperitoneálnou alebo subkutánnou injekciou. Sterilné roztoky môžu byť tiež podané intravenózne. Zložka musí byť podaná orálne tak v tekutej, ako aj v tuhej forme.

Rapamycín môže byť podaný rektálne vo forme bežných čapíkov. Na intranazálnu alebo intrabronchiálnu inhaláciu alebo insulfáciu môže byť rapamycín podaný vo vodnom alebo čiastočne vodnom roztoku, môže byť použitý vo forme aerosólu. Rapamycín môže byť tiež podaný transdermálne pri použití transdermálnej náplasti, obsahujúcej aktívnu zložku a nosič, ktorý je inertný k aktívnej zložke a je netoxický pre kožu a zároveň dovoľuje látke prienik do krvného riečišťa cez kožu. Nosič môže mať rad foriem od krému cez masti, pasty, gély a okluzívne prostriedky. Krémy a masti môžu byť viskózne tekutiny alebo polotuhé emulzie typu olej/voda alebo voda/olej. Pasty sa skladajú z absorpčných púdrov v benzíne alebo hydrofilnom benzíne, ktorý obsahuje aktívnu zložku. Rad okluzívnych prostriedkov môže byť použitý na realizáciu prenosu aktívnej zložky do krvného obehu, ako je napríklad semipermeabilná membrána, kryjúca aktívnu zložku s alebo bez nosiča. Ostatné okluzívne prostriedky sú opísané v literatúre.

Rapamycín môže byť podaný topicky ako roztok, krém alebo lotio formulácia s vhodným farmaceutickým prostriedkom, ktorý obsahuje 0,1 až 5 %, výhodne 2 % aktívnej zložky.

Nároky na dávku sa menia na spôsobe podania, podľa závažnosti prítomných symptómov a najmä podľa liečeného subjektu. Podľa výsledkov získaných štandardnými farmakologickými testami by sa mala denná dávka pri parenterálnom podaní pohybovať od 0,01 µg/kg do 10 mg/kg, výhodne, 0,1µg/kg do 2 mg/kg. Najvýhodnejšie parenterálne podanie rapamycínu je intravenózne. Navrhovaná denná dávka pri orálnom podaní je od 1 µg/kg do 15 mg/kg, výhodne 0,01 mg/kg do 10 mg/kg. Liečba sa má

začať dávkami nižšími, ako je dávka optimálna. Postupne sa dávka zvyšuje až do získania optimálneho efektu, presná dávka je určená skúsenosťou lekára získanej počas liečby. Najvýhodnejšie dávkovanie rapamycínu je také, ktoré dosiahne liečebný efekt bez škodlivých vedľajších účinkov a môže byť zvolené podanie jednej dennej dávky alebo rozdelených dávok na niekoľko dielov vo vhodných časových intervaloch.

Na liečbu ATL je zamýšľané podanie rapamycínu spolu s ostatnými chemoterapeutickými liekmi, ako je metoxotrexát, leukovirin, cyklofosfamid, adriamycín, oncovin, prednisol, bleomycín a podobné, môže byť podaný s vysokými dávkami steroidov, kombinovaný s rádioterapiou, liečbou cytokínmi, ako je interferón, monoklonálnou protilátkovou terapiou a ostatnými typmi liečby neoplastických ochorení.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prostriedok na liečenie T-bunkovej leukémie/lymfómu dospelých, **vyznačujúci sa tým**, že ako svoju účinnú zložku obsahuje antiproliferatívne množstvo rapamycínu a okrem toho farmaceuticky prijateľný nosič.

2. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že je určený na parenterálne podanie.

3. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 2, **vyznačujúci sa tým**, že množstvo rapamycínu je v rozmedzí 0,01 μg/kg až 10 mg/kg.

4. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 2, **vyznačujúci sa tým**, že množstvo rapamycínu je v rozmedzí 0,1 μg/kg až 1 mg/kg.

5. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že je určený na perorálne podanie.

6. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 5, **vyznačujúci sa tým**, že množstvo rapamycínu je 1 μg/kg až 15 mg/kg.

7. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 5, **vyznačujúci sa tým**, že množstvo rapamycínu je 0,01 mg/kg až 10 mg/kg.

8. Farmaceutický prostriedok na zastavenie progresie alebo vyvolania remisie T-bunkovej leukémie/lymfómu dospelých, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje antiproliferatívne množstvo rapamycínu a farmaceutický nosič.

Koniec dokumentu