



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101339** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2010 06372	(72) Винахідник(и):	Маус Іоакім (DE), Селені Іштван (DE), Петцольд Урзула (DE)
(22) Дата подання заявки:	23.12.2008	(73) Власник(и):	МЕДА АБ, Pipers Vag 2, S-170 09 Solna, Sweden (SE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.03.2013	(74) Представник:	Дубинський Михайло Ілліч, реєстр. №70
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/006,459	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	SIDKY Y.A. ET AL. / INHIBITION OF MURINE TUMOR GROWTH BY AN INTERFERON- INDUCING IMIDAZOQUINOLINAMINE // CANCER RESEARCH. - vol. 52, no. 13. - 1992. -P.3528- 3533 PHILLIP R. FLESHNER ET AL. / Practice Parameters for Anal Squamous Neoplasms // DISEASES OF THE COLON & RECTUM, SPRINGER-VERLAG, NE. - 21.11.2007. - P.(S)2-9 LIPKA E. ET AL. / Evaluation of imiquimod and analogues with respect to their oral delivery potential // PROCEEDINGS OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY 1997 US. - no.24. - 1997. - P.337-338 CARRASCO DANIEL ET AL. / Treatment of anogenital warts with imiquimod 5% cream followed by surgical excision of residual lesions. // JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY. - OCT 2002. - vol. 47, no.4 Suppl. - P.S212-S216 DIAKOMANOLIS EMMANUEL ET AL. / Treatment of high-grade vaginal intraepithelial neoplasia with imiquimod cream. // THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. - vol.347, no.5. - 01.08.2002. - P. 374 PFENNINGER JOHN L ET AL. / Common anorectal conditions // OBSTETRICS AND GYNECOLOGY. - December 2001 (2001-12). - vol.98, no.6. - P.1130- 1139 UA a200712887 A, 25.02.2008
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15.01.2008		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.09.2010, Бюл.№ 17		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.03.2013, Бюл.№ 6		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2008/011088, 23.12.2008		

(54) ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ТОВСТОЇ КИШКИ АБО ЗАПОБІГАННЯ КАРЦИНОМИ ТОВСТОГО КИШЕЧНИКУ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМІДАЗОХІНОЛІНОВИХ ПОХІДНИХ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі медицини і стосується лікування захворювань товстого кишечника, таких як поліпи, передракові зміни, та запобігання й допоміжного лікування поліпів/поліпозу та новоутворень товстого кишечника шляхом місцевого застосування іміквімоду - (1-(2-метилпропіл)-1Н-імідазо[4,5-с]хінолін-4-амін).

UA 101339 C2

Даний винахід стосується лікування захворювань ободової і прямої кишок, таких як поліпи, передракових стадій та запобігання й допоміжного лікування новотворів товстого кишечника шляхом місцевого введення імуномодуючих лікарських препаратів родини імідазохіноліну, таких як іміквімод (1-(2-метилпропіл)-1Н-імідазо[4,5-с]хінолін-4-амін), ресиквімод (4-аміно- α,α -диметил-2-етоксиметил-1Н-імідазо[4,5-с]хінолін-1-етанол), сотиримод (2-метил-1-(2-метилпропіл)-1Н-імідазо[4,5-с][1,5]нафтиридин-4-амін).

Несподівано дані імуномодуючі імідазохінолінові похідні інгібують перетворення передракових клітин шлунково-кишкового тракту в клітини злоякісних новотворів товстого кишечника.

Застосування різних імідазохінолінових похідних може призвести в результаті до ефективнішого й безпечнішого лікування вищезгаданих захворювань ободової і прямої кишок.

Поліпи товстого кишечника досить поширені серед дорослих середнього віку й людей похилого віку та часто не мають помітних симптомів. Приблизно 50% людей у віці старше 60 років мають поліпи в товстій кишці. Їхня потенційна можливість стати раковими робить важливим серйозне ставлення до них. Хоча переважна більшість поліпів є доброякісними (неканцерогенними), майже всі випадки раку товстої кишки розвиваються з доброякісних поліпів. Карциноми є причиною більш ніж 80% захворювань раком людини, причому шкіра, легеня, товста кишка, молочна залоза, простата й матка являють собою найпоширеніші області.

Поліпи товстої кишки значно відрізняються за розміром, формою й кількістю. Два основних типи являють собою гіперпластичний і аденоматозний. Гіперпластичні поліпи є найпоширенішими й, як правило, не стають раковими. Аденоматозні поліпи з більшою ймовірністю стають раковими.

Загалом, розвиток пухлини проходить три різні фази: стимуляція, активація й розвиток. Підходи до запобігання раку, серед інших, включають посилення механізмів захисту хазяїна від раку, хіміопрофілактику та інші. Незважаючи на вдосконалення в ранньому виявленні й лікуванні раку, загальні показники смертності не знижуються за останні 30 років.

Існує ряд можливостей знизити ризик ракового розвитку поліпа. Одна з можливостей запобігти розвитку поліпів товстої кишки в рак являє собою дієти з низьким вмістом жиру й високим вмістом волокон. Деякі вітаміни також захищають від раку товстої кишки, а саме: вітаміни С і Е. Нестероїдні протизапальні лікарські препарати, такі як аспірин, знижують рівень утворення поліпів, хоча нестероїдні протизапальні лікарські препарати не рекомендовані як засоби для запобігання поліпів товстої кишки.

Із трьох фаз розвитку пухлини фаза активації складається з експансії мутантних клітин з формуванням активно проліферуючого багатоклітинного передзлоякісного ураження. Дана фаза активації канцерогенезу може дати найпридатніші мішені для запобігання раку. Нова й спеціальна форма запобігання раку являє собою так звану хіміопрофілактику. Хіміопрофілактика, за визначенням, являє собою використання факторів з метою вповільнення розвитку, зворотного розвитку або інгібування канцерогенезу, знижуючи в такий спосіб ризик розвитку інвазивного або клінічно важливого захворювання.

Якщо встановлено пухлину, то можна використовувати декілька типів стандартного лікування. Вони включають хірургічне втручання, хіміотерапію, радіаційну терапію й біологічну терапію. Біологічна терапія являє собою лікування, при якому використовується імунна система пацієнта для боротьби з раком. Власні субстанції організму або лікарські препарати використовують для посилення або відновлення природного захисту організму проти раку. Даний тип лікування раку являє собою так звану біотерапію або імунотерапію.

Імідазохіноліни: Іміквімод являє собою імуномодуючу сполуку родини імідазохіноліну, що виявляє як антивірусний, так і протипухлинний ефекти (див. статті Diebold SS et al. Innate antiviral responses by means of toll-like receptor (TLR)-7-mediated recognition of single-stranded RNA. (Вроджені антивірусні відповіді за допомогою опосередкованого toll-подібним рецептором (TLR)-7 розпізнавання одноланцюгової РНК) Science 204; 303: 1529-1531; Bametson RS et al. Imiquimod induced regression of clinically diagnosed superficial basal cell carcinoma is associated with early infiltration by CD4 T cells and dendritic cells (Спричинювана іміквімодом регресія клінічно діагностованої поверхневої карциноми базальних клітин пов'язана з ранньою інфільтрацією Т-клітин CD4 і дендритних клітин), Clin. Exp. Dermatol 2004; 29: 639-643). Показано, що іміквімод виявляє свої ефекти в основному за допомогою TLR-7 (див. статтю Hemmi H et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR 7 My88-dependent signaling pathway. (Маленькі антивірусні сполуки активують імунні клітини за допомогою My88-залежного шляху передачі сигналу TLR 7), Nat. Immunol 2002; 3:196-200). Іміквімод ефективно пригнічує розвиток старечого кератозу (АК) в інвазивний рак шкіри, звичайно в карциному сквамозних клітин (SCC). Хоча іміквімод не виявляє якісь прямі протипухлинні активності (див. Schon M et al. Tumor-

selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. (Вибірною відносно пухлини індукція апоптозу й низькомолекулярний модифікатор імунної відповіді іміквімод), J Natl. Cancer Inst., 2003, 95: 1138-49), показано, що він має високу ефективність відносно ряду пухлин шкіри та інших пухлин. У мишей лікування пероральним введенням іміквімоду в істотному ступені пригнічує розвиток карциноми товстої кишки MC-26. Протипухлинні ефекти іміквімоду значно знижуються антисироваткою до мишачого α -інтерферону (ІФН), дозволяючи припустити, що протипухлинний ефект опосередкований в істотному ступені індукцією ІФН (див. статтю Sidky YA et al. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine. (Пригнічення росту мишачої пухлини імідазохінолінаміном, індуючим інтерферон), Cancer Res 1992;52:3528-33).

Точний механізм дії іміквімоду і споріднених сполук відносно ракових клітин є складним і ще невідомим.

Існують докази того, що іміквімод здатний стимулювати апоптоз різних злоякісних клітин шкіри (див. статтю Inglefield JR, et al. Apoptotic responses in squamous carcinoma and epithelial cells to small-molecule toll-like receptor agonists evaluated with automated cytometry. (Апоптотичні реакції в клітинах сквамозної карциноми й епітелію на маленькі молекули агоністів toll-подібного рецептора, оцінювані за допомогою автоматизованої цитометрії), J Biomol Screen 2006; 11 :575-85).

Імунотерапія: Опосередковані клітинами імунні відповіді являють собою важливий аспект взаємодій пухлина-хазяїн при новотворах товстої кишки. Розвиток із передракових (аденоматозних) поліпів товстої кишки в злоякісні новотвори товстого кишечника залежить від складного шляху, що включає активності активованих Т-лімфоцитів. Ініціація імунної відповіді відбувається, коли або клітини цитотоксичних Т-лімфоцитів CD8+, або клітини Т-хелперів CD4+ розпізнають антиген з ракової клітини людини. Опосередкована клітинами відповідь у значній мірі ініціюється й контролюється дією різних цитокінів, які виявляють сильні ефекти на проліферацію Т-клітин, міжклітинну адгезію, апоптоз і імунітет хазяїна. Існування імунної відповіді на рак товстої кишки підтримують дослідження імунологічних препаратів на людині й моделях трансплантованого мишачого раку у тварин. ІЛ-2 (інтерлейкін-2), ІЛ-12, ІФН- γ (інтерферон- γ), ФНП- α (фактор некрозу пухлини) і споріднений ФНП індуючий апоптоз ліганд (TRAIL) беруть участь у посиленні цитотоксичного й апоптотичного ефектів у відповідь на аденоми товстої кишки. Крім того, фактори росту, цитокіни й імуносупресивні фактори можуть відігравати важливу роль у рості й виживаності передзлоякісної тканини товстого кишечника.

Показано, що іміквімод ефективний при лікуванні старечого кератозу (АК), а також передракової стадії. Іміквімод ефективно очищує ураження АК і перешкоджає розвитку SCC та інших злоякісних пухлин шкіри.

Місцеве застосування імідазохінолінів відносно інших типів клітин, особливо відносно епітеліальних клітин шлунково-кишкового тракту, є новим підходом. Несподівано імуномодуючі лікарські препарати, наприклад, іміквімод, ресиквімод і сотириімод також інгібують апоптоз не тільки епідермальних клітин (наприклад, кератиноцитів), але також епітеліальних клітин шлунково-кишкового тракту, показуючи, що вони здатні пригнічувати раковий розвиток поліпа товстої кишки.

Експериментальна частина

Вплив іміквімоду на апоптотичні зміни досліджують, використовуючи епітеліальні клітини товстої кишки. Клітинну лінію Caco-2 широко використовують в аналізах *in vitro* для передбачення швидкості всмоктування потенційних лікарських сполук через бар'єр клітин кишкового епітелію. Внаслідок цього, дану клітинну лінію використовують для дослідження ефектів іміквімоду на експресію p53. p53 являє собою фактор транскрипції, який регулює клітинний цикл і, отже, функції, в якості супресора пухлини. Даний ген супресора пухлини є дуже важливим елементом у багатостадійному розвитку від доброякісної гіперпроліферації до злоякісного захворювання.

Супресор пухлини p53, очевидно, є основним у плані запобігання росту й виживаності ушкоджених і патологічних клітин. Білок p53 є супресором пухлини, кодованим геном, порушення якого асоційоване із приблизно 50 - 55% захворювань раком у людини. Білок p53 діє як контрольна точка у клітинному циклі, або перешкоджаючи, або ініціюючи запрограмовану загибель клітини. Інакше кажучи, p53 являє собою вбудований супресор пухлини. Молекулу p53 можна інактивувати кількома шляхами: i) у деяких родинах мутації p53 є спадковими; ii) віруси пухлинної ДНК, такі як людський аденовірус і вірус папіломи людини, можуть зв'язувати й інактивувати функцію білка p53, змінюючи клітини й ініціюючи ріст пухлини. Існують різниці в експресії p53 у різних тканинах. Аналогічно регуляція гена p53 є різною в різних людських

моноцитах і лімфоцитах. Отже, зміни в шкірі відрізняються від змін, що спостерігаються в інших тканинах.

Способи

Іміквімод розчиняють у диметилсульфоксиді (ДМСО). Вихідна концентрація становить 10 мг/мл. З даних вихідних розчинів готують послідовні розведення. Кінцеві концентрації, використовувані для всіх сполук, знаходяться в інтервалі від 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл. Кінцева концентрація ДМСО становить 0,1 %.

Клітинну лінію аденокарциноми товстого кишечника Caco-2 одержують із ATCC (Американська колекція типових культур), Wesel, Germany. Клітини поміщають в 24-лункові планшети (BD Bioscience, Heidelberg, Germany). Клітини культивують у середовищі Ігла в модифікації Дульбекко (DMEM) з додаванням 10% інактивованої нагріванням сироватки телячих ембріонів і 10% ненезамінних амінокислот у зволоженої атмосфері, яка містить 5% CO₂ при 37°C. При досягненні конфлюентності клітини промивають і ресуспендують у безсироватковій DMEM при концентрації 10⁶ клітин мл⁻¹. Клітини (1 × 10⁶ клітин/мл) інкубують з різними концентраціями тест-субстанцій.

РНК одержують із заморожених лізатів, використовуючи набір RNeasy, Qiagen (Hilden, Germany). Полімеразну ланцюгову реакцію за участю зворотної транскриптази (ЗТ-ПЛР) в одній пробірці проводять із використанням набору зондів для ЗТ-ПЛР для кількісного визначення (Quantitect Probe RT-PCR Kit) фірми QIAGEN (Hilden, Germany). Експресію p53 визначають відносно β-актину за допомогою ЗТ-ПЛР у режимі реального часу при використанні аналізів SYBR Green на приладі ABI Prism 7900. Набори для аналізів придбавають у фірмі QIAGEN, Hilden, Germany (p53:QT00060235). Кількість мРНК розраховують, використовуючи спосіб ΔΔC_t. Для кожної ЗТ-ПЛР встановлюють граничний цикл (C_t), що визначається як цикл, на якому рівень флуоресценції в 10 разів перевищує стандартне відхилення від середньої вихідної емісії для циклів 3-10. β-актин використовують у якості «гена домашнього господарства» для нормалізації рівнів мРНК: C_t(Параметр) - C_t(β-актин) = ΔC_t(Параметр). Дане значення встановлюють відносно контролю з носієм, який являє собою рівні мРНК неопрацьованих стимульованих клітин: ΔC_t(Параметр стимульований) - ΔC_t(Параметр носій) = ΔΔC_t(Параметр). Потім відносний рівень мРНК для сполуки X розраховують як 2^{-ΔΔC_t} * 100%, ґрунтуючись на результатах контрольних експериментів з ефективністю реакції ПЛР приблизно 100% (згідно PE Applied Biosystems User Bulletin #2; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, 1997). Статистичний аналіз проводять із використанням програми GraphPad Prism Version 5 і односторонній тест ANOVA з подальшим апостеріорним аналізом за Даннетом.

Дозозалежний ефект іміквімоду на експресію p53 у клітинах Caco-2 оцінюють за допомогою кількісної ЗТ-ПЛР у режимі реального часу (див. Фіг. 1).

Іміквімод у концентраціях до 100 мкМ підвищує експресію мРНК p53 дозозалежним чином. При концентраціях іміквімоду 10 і 100 мкМ підвищення рівнів мРНК p53 досягає статистичної вірогідності.

У порівнянні з p16^{INK4a} іміквімод не впливає рівною мірою на p53. У хворих старечим кератозом не виявлено ніяких різниць в експресії гена p53 при лікуванні іміквімодом.

Отже, не можна було б очікувати того, що імідазохінолінові похідні, такі як іміквімод, можуть підвищувати експресію супресора пухлини p53 у клітинах шлунково-кишкового тракту, показуючи позитивний ефект при лікуванні передракових / ракових станів.

Дані факти показують, що іміквімод впливає на рівень експресії гена супресора пухлини в клітинах шлунково-кишкового тракту. Даний ефект іміквімоду, можливо, є важливим для лікування поліпозу товстого кишечника / поліпів товстої кишки, запобігання карциноми товстого кишечника й допоміжного лікування новотворів товстого кишечника разом із прийнятим лікуванням, наприклад, хірургічним втручанням.

Приклади

Лікування, що передбачається даним винаходом, включає введення іміквімоду або інших імідазохінолінових похідних, таких як ресиквімод, сотиримод, з метою лікування наявного патологічного стану, поліпів товстої кишки / поліпозу, для того, щоб зменшити ймовірність ракового перетворення, уповільнити розвиток захворювання.

Сполуки можна вводити місцево (ректально або безпосередньо на тканину під час хірургічного втручання) у формі розчину, крему, клізми або піни. Сполуки можна використовувати профілактично або після появи симптомів або допоміжно до прийнятого лікування, такого як хірургічне втручання, або допоміжно до видалення поліпа товстого кишечника під час колоноскопії.

Препарати, що містять активний лікарський препарат, призначені для застосування 1 - 7 разів, оптимально 1 - 5 разів на тиждень протягом декількох тижнів.

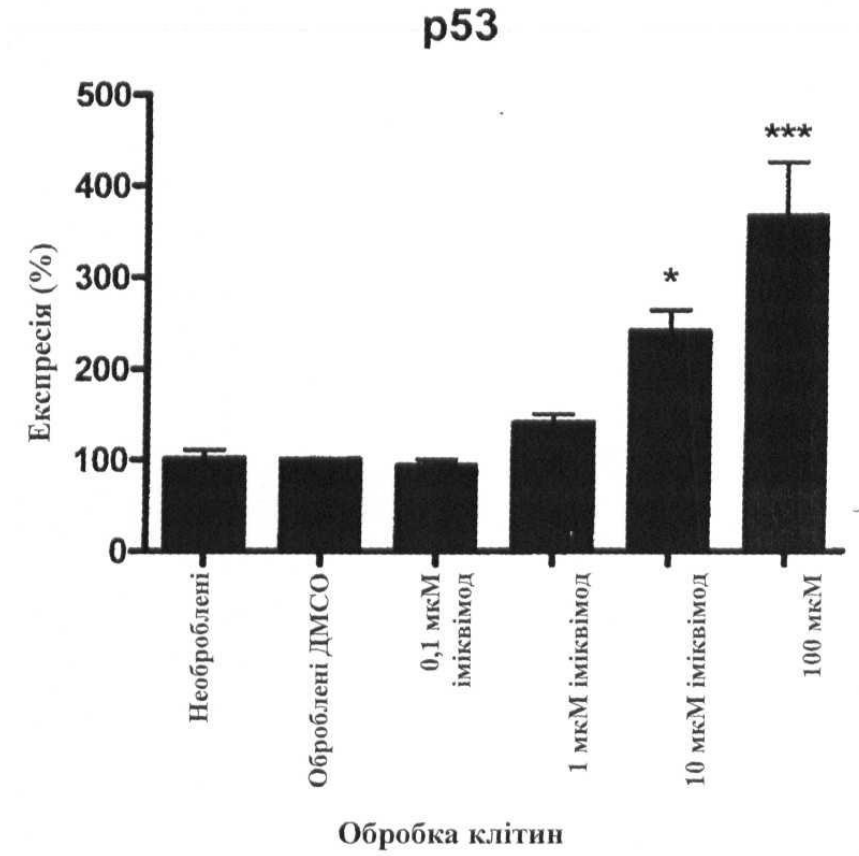
Оптимальна доза становить від 1 мг до 1000 мг іміквімоду, оптимальніше 10 - 100 мг 3 рази на тиждень протягом 16 тижнів.

Загальна кількість іміквімоду може становити принаймні 0,1 мас.% і не більше, ніж 9 мас.%. У ряді варіантів втілення загальна кількість іміквімоду може становити принаймні 0,5 мас.% і не більше, ніж 9 мас.%, ґрунтуючись на загальній масі композиції (поки не зазначено інакше, всі відсотки, наведені в даному контексті, являють собою мас/мас, відносно загальної маси композиції), хоча в деяких варіантах втілення композиція може містити кількість іміквімоду, яка виходить за рамки даного інтервалу. Наприклад, композиція може включати іміквімод у концентрації 0,1%, 0,5% 1 %, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% або 9%.

Загальна кількість сотиримоду або ресиквімоду може становити принаймні 0,001 мас.% і не більше, ніж 9 мас.%. У ряді варіантів втілення загальна кількість сотиримоду або ресиквімоду може становити принаймні 0,1 мас.% і не більше, ніж 9 мас.%, оптимально принаймні 0,5 мас.% і не більше, ніж 9 мас.%, ґрунтуючись на загальній масі композиції (поки не зазначено інакше, всі відсотки, наведені в даному контексті, являють собою мас/мас, відносно загальної маси композиції), хоча в деяких варіантах втілення композиція може містити кількість сотиримоду або ресиквімоду, яка виходить за рамки даного інтервалу. Наприклад, композиція може включати сотиримод або ресиквімод у концентрації 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5% 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% або 9%.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Спосіб лікування поліпів/поліпозу товстого кишечника за допомогою застосування іміквімоду.
2. Спосіб лікування передракових змін товстого кишечника, переважно в слизовій оболонці, за допомогою застосування іміквімоду.
3. Спосіб запобігання карциноми товстої кишки за допомогою застосування іміквімоду.
4. Спосіб запобігання перетворення поліпів/поліпозу товстого кишечника на карциному товстого кишечника за допомогою застосування іміквімоду.
5. Спосіб допоміжного лікування поліпів/поліпозу товстого кишечника за допомогою застосування іміквімоду.
6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, у якому іміквімод застосовують місцево у формі розчину, крему або піни.
7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, у якому іміквімод вводять 1-7, оптимально 1-5 разів на тиждень протягом декількох тижнів.



ФІГ. 1

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601