

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036682**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.08

(51) Int. Cl. **A61K 31/138** (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201891911

(22) Дата подачи заявки
2017.04.03

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ТАМОКСИФЕНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КИСТОЗНОГО ФИБРОЗА У ПАЦИЕНТОВ ОБОИХ ПОЛОВ

(31) UA2016A002292

(32) 2016.04.05

(33) IT

(43) 2019.04.30

(86) PCT/EP2017/057895

(87) WO 2017/174529 2017.10.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГБ ФАРМА С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Бальдуцци Джорджо (IT)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A2-2009105234

HEIDI LEDFORD: "Tamoxifen takes on cystic fibrosis", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 15, no. 1, 1 January 2009 (2009-01-01), page 28, XP002665513, ISSN: 1078-8956, the whole document

RAY D. COAKLEY ET AL.: "17 beta-Estradiol inhibits Ca²⁺-dependent homeostasis of airway surface liquid volume in human cystic fibrosis airway epithelia", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 118, no. 12, 1 December 2008 (2008-12-01), pages 4025-4035, XP002665514, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI33893 [retrieved on 2008-11-20], abstract, page 8, left-hand column, paragraph 4 - page p, left-hand column, paragraph 2, figure 7

Achim D. Gruber ET AL: "Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland", American Journal of Physiology - Cell Physiology, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 1261-1270, XP055321637, UNITED STATES Retrieved from the Internet: URL: <http://ajpcell.physiology.org/content/276/6/C1261.full.pdf> [retrieved on 2016-11-22], abstract, page 1261, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 2, page 1266, right-hand column, paragraph 1 - page 1269, left-hand column, paragraph 2, figures 7, 8

(57) Описано применение тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли в качестве лекарственного средства с эстрогеннезависимым действием для лечения кистозного фиброза у пациентов обоих полов. Тамоксифен предпочтительно вводят ингаляционным способом.

B1

036682

036682

B1

Настоящее изобретение относится к применению тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли для лечения кистозного фиброза у пациентов обоих полов и, более конкретно, к применению тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли в качестве лекарственного средства с эстрогеннезависимым действием для лечения кистозного фиброза у пациентов обоих полов.

Кистозный фиброз представляет собой генетическое заболевание, которое поражает различные органы (легкие, поджелудочную железу, кишечник, печень, потовые железы). Поражение легких является наиболее частой причиной смерти, и медианная выживаемость составляет 39 лет.

Кистозный фиброз вызывается мутацией гена, кодирующего мембранный белок (регулятор трансмембранной проводимости при кистозном фиброзе - CFTR), который обеспечивает транспорт хлоридных ионов через клеточную мембрану. В легких это приводит к тому, что слизь становится более плотной, ее удаление затрудняется, и она накапливается в бронхиальном дереве, что способствует развитию повторной пневмонии, которая является причиной прогрессирующего и фатального ухудшения функции дыхательных путей.

Кистозный фиброз является редким заболеванием, в Европе насчитывается 0,7 случая на 10000 субъектов. На момент подачи заявки было известно примерно 1500 мутаций, которые кодируют аномальный CFTR. Наиболее распространенной является мутация F508del/F508del, которая имеется примерно у 70% субъектов, пораженных кистозным фиброзом. Мутация F508del/W1282X, которая имеется в клетках IB3-1, встречается по всему миру гораздо реже.

Для лечения кистозного фиброза в последние десятилетия было предложено множество активных ингредиентов даже с учетом того, что помимо генной терапии не известны способы лечения, которые могут восстанавливать нормальную функцию CFTR, что является ненормальным сточки зрения генетики. Несмотря на то, что исследования генной терапии кистозного фиброза проводятся уже несколько лет, эта важная задача до сих пор не была решена.

Большинство других фармацевтических средств, предложенных для лечения кистозного фиброза, фактически показаны для лечения специфических форм этой патологии, например, для действия на дыхательный аппарат или облегчения некоторых симптомов или уменьшения риска осложнений.

Одним из активных ингредиентов, предложенных для лечения кистозного фиброза, является тамоксифен. Тамоксифен представляет собой нестероидную молекулу, которая может селективно модулировать эстрогенный рецептор. Тамоксифен имеет смешанную активность агониста/антагониста и проявляет характеристики агониста или антагониста в зависимости от вида ткани, в которой осуществляет действие. Например, он действует как агонист в эндометрии и как антагонист в молочной железе.

Тамоксифен уже долгое время применяется в терапии в качестве противоопухолевого средства при лечении эстрогензависимых опухолей у млекопитающих.

Его эффективность при лечении кистозного фиброза у пациентов женского пола репродуктивного возраста была предложена Коукли с соавторами (Coakley et al.) в J. Clin. Investigation, 118(12), 2008, 1-11, и была подтверждена клиническими данными, приведенными в заявке на патент Италии RM2011A000231, поданной Заявителем 9 мая 2011 г.

В публикации WO 2009/105234 тамоксифен был упомянут в общих чертах без экспериментального подтверждения в длинном списке активных ингредиентов, для которых заявлено применение в лечении или облегчении нарушения, связанного с дефектом CFTR.

Кроме того, WO 2012/134965 относится к способу лечения или облегчения эффектов заболеваний, характеризующихся изменением сократительной способности клеток гладкой мускулатуры, путем введения комбинации ингибитора CaCC, такого как тамоксифен, и модулятора NKCC.

В литературе отсутствуют данные, подразумевающие возможность применения тамоксифена для лечения пациентов мужского пола, пораженных кистозным фиброзом, или указывающие на возможное эстрогеннезависимое действие тамоксифена у пациентов, пораженных кистозным фиброзом.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что тамоксифен также обладает прямым эстрогеннезависимым действием на Ca-зависимые хлоридные каналы, которое определяет увеличение плотности хлоридных токов, и, таким образом, подходит для лечения кистозного фиброза у пациентов обоих полов.

Таким образом, задачей настоящего изобретения является применение тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли в качестве лекарственного средства с эстрогеннезависимым действием у пациентов обоих полов для лечения кистозного фиброза.

Согласно особенно предпочтительному аспекту настоящего изобретения фармацевтически приемлемая соль тамоксифена представляет собой тамоксифена цитрат.

Тамоксифен можно вводить пероральным системным способом, в частности, в виде таблеток, которые уже применяются при противоопухолевой терапии. Реализуемые на рынке таблетки содержат тамоксифен в виде цитратной соли в дозах 10 или 20 мг.

Можно применять и другие фармацевтические формы, подходящие для перорального введения, такие как сиропы, эликсиры, капсулы, порошки и грануляты, суспензии.

Способы введения, отличные от перорального введения, также можно применять для реализации настоящего изобретения. Указанные способы введения могут представлять собой подъязычный, интраназальный или ингаляционный способы.

Ингаляционный способ является особенно предпочтительным.

При ингаляционном способе, как и для других парентеральных способов введения, также можно вводить один из активных метаболитов тамоксифена, в частности, 4-гидрокситамоксифен, N-десметил-4-гидрокситамоксифен и N-десметилтамоксифен.

Доза вводимого тамоксифена в общем случае составляет от 10 до 100 мг в составе одной или более доз. Особенно предпочтительными являются дозы 60 или 70 мг.

Составы содержат тамоксифен или его соли в смеси с подходящим фармацевтически приемлемым носителем.

Эффективность прямого эстрогеннезависимого действия тамоксифена на Ca-зависимые хлоридные каналы была подтверждена Заявителем в клетках бронхиального эпителия *in vitro*.

В клетках бронхиального эпителия помимо CFTR имеется еще один путь, который пусть и незначительно, но задействован в транспорте хлоридов (Lazarowski and Boucher, *Curr Opin Pharmacol* 2009, 9(3), 262-7). Этот путь опосредован рецепторами P2Y, которые в результате стимуляции АТФ, присутствующим в бронхиальном дереве, увеличивают внутриклеточный уровень свободного кальция (Ca^{2+}) (Lazarowski et al., *J Biol Chem* 2004, 279(35), 36855-64). В свою очередь, увеличение внутриклеточного уровня кальция активирует Ca-зависимые хлоридные каналы.

Ca-зависимые хлоридные каналы обычно имеются у пациентов с кистозным фиброзом, но они являются относительно неактивными (уже упомянутые работы Лазаровски и Буше).

Описание фигур

Фиг. 1. Отношение плотности (d)-напряжения (V) тока, зарегистрированного через 40 мин в клетках CFBE (или IB3-1) в отсутствие (контроль) или в присутствии 5 мкМ тамоксифена в растворе гальванической ванны (n=6). Зарегистрированный ток (pA) нормировали по емкости клетки (которая прямо пропорциональна клеточной поверхности), чтобы сделать этот параметр независимым от размеров клетки (и тем самым сделать возможным сравнение различных клеток независимо от их поверхности).

Фиг. 2. Отношение плотности (d)-напряжения (V) тока, зарегистрированного через 24 ч в клетках IB3-1 в отсутствие (контроль) или в присутствии 5 мкМ тамоксифена в растворе гальванической ванны (n=6).

Фиг. 3. Отношение плотности (d)-напряжения (V) тока, зарегистрированного через 24 часа в клетках IB3-1 в присутствии 5 мкМ тамоксифена или тамоксифена+CFTRinh в растворе гальванической ванны (n=6).

Описание экспериментов и результаты

Были проведены эксперименты *in vitro* (которые являются наиболее надежными и позволяют оценивать действие лекарственного средства при лечении КФ) для определения возможного наличия прямого действия ТМХ на Ca-зависимые хлоридные каналы.

Эксперименты проводили в гомозиготных клетках CFBE, имеющих мутацию F508del/F508del, и клетках IB3-1 (иммортилизованная клеточная линия клеток кистозного фиброза бронхиального эпителия, которая имеет мутацию F508del/W1282X).

Хлоридные токи, проходящие по Ca-зависимым хлоридным каналам, измеряли способом локальной фиксации потенциала в конфигурации, включающей перфорацию цельных клеток. Конфигурация цельных клеток была обеспечена не за счет разрушения мембраны под электродом, но благодаря действию ионофора (грамицидин, 10 мкг/мл), который образует поры в мембране и тем самым гарантирует неразрывность электрического контакта между раствором для электрода и цитоплазмой при сохранении целостности клетки. Таким образом, компоненты цитоплазмы, которые могут быть важны для сохранения активности канала, не удаляются при диализе цитоплазмы раствором, содержащимся в электроде. В частности, грамицидин, делает клеточную мембрану проницаемой для одновалентных катионов (K^+ и Na^+), но не для двухвалентных катионов (таких как Ca^{2+} и Mg^{2+}) и анионов, таких как хлорид. Таким образом, внутриклеточная концентрация двухвалентных катионов и хлоридов не изменяется при диализе цитоплазмы.

Раствор для электрода содержал (мМ): 145 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7,25.

Раствор гальванической ванны, в который во время экспериментов вводили клетки, содержал (мМ): NMGCl 150, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10, глюкозу 10, маннит 30, pH 7,4. Раствор гальванической ванны был гипертоническим (измеренная осмолярность 337 мОсм) по сравнению с электродом, чтобы подавлять токи, активируемые набуханием, наблюдаемые в клетках, которые использовали также в условиях изоосмолярности с раствором гальванической ванны (что отмечали в проводившихся ранее экспериментах с цельными клетками).

Клетки (FCS или IB3-1) инкубировали в течение 40 минут совместно с 5 мкМ тамоксифена. После этого клетки растворялись всегда в присутствии 5 мкМ тамоксифена в условиях эксперимента.

Плотность тока, измеренная в указанных экспериментах, значительно увеличивалась по сравнению с контрольными условиями, тем самым, была подтверждена гипотеза о том, что тамоксифен напрямую действует на Ca-зависимые хлоридные каналы и увеличивает транспорт хлоридов (фиг. 1).

Кроме того, для оценки возможного долгосрочного действия тамоксифена на Ca-зависимые хлоридные токи были проведены эксперименты с использованием таких же клеток, которые инкубировали

совместно с 5 мкМ тамоксифена в течение 24 ч (фиг. 2).

Полученные данные указывают на то, что эффект тамоксифена практически не изменяется со временем (24 ч, фиг. 2).

Наконец, для оценки возможного действия тамоксифена на канал CFTR после определения I/V в клетках, обработанных тамоксифеном в течение 24 ч, проводили замену раствора на раствор, содержащий тамоксифен и CFTRinh (специфический ингибитор CFTR) (фиг. 3).

Полученные данные показывают, что эффект тамоксифена на хлоридные токи не изменялся в значительной степени в присутствии ингибитора CFTR, это указывает на то, что тамоксифен не действует на каналы CFTR (фиг. 3).

В заключении, в экспериментах было показано, что в клетках, имеющих мутации, ответственные за КФ, тамоксифен действует напрямую на Ca-зависимые хлоридные каналы, что приводит к увеличению плотности хлоридных токов и уравнивает тем самым захват натрия, не допуская его патологическое накопление в клетках и удаление воды из слизистых секретов, которые в этом случае становятся вязкими.

Это действие совершенно не зависит от антиэстрогенной активности тамоксифена (фиг. 1).

Кроме того, активность тамоксифена в отношении Ca-зависимых хлоридных каналов сохраняется со временем (фиг. 2) и не влияет на активность канала CFTR (фиг. 3).

Таким образом, тамоксифен может проявлять устойчивую активность ежедневно в течение года как у женщин, так и у мужчин.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли в качестве лекарственного средства, имеющего эстрогеннезависимое действие, у пациентов обоих полов для лечения кистозного фиброза.

2. Применение тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли по п.1, отличающееся тем, что указанное лекарственное средство представляет собой тамоксифена цитрат.

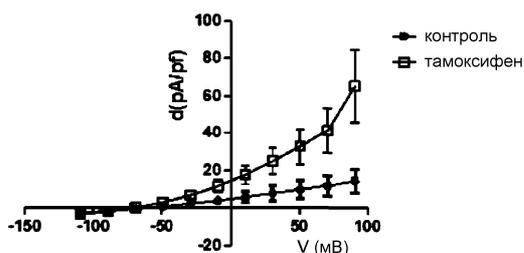
3. Применение тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанное лекарственное средство вводят пероральным способом.

4. Применение тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли по пп.1, 2 или 3, отличающееся тем, что указанное лекарственное средство вводят в виде таблеток.

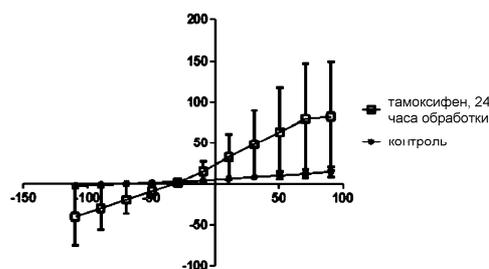
5. Применение тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли по п.1, отличающееся тем, что указанное лекарственное средство вводят ингаляционным способом.

6. Применение тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что указанное лекарственное средство вводят в дозах от 10 до 100 мг.

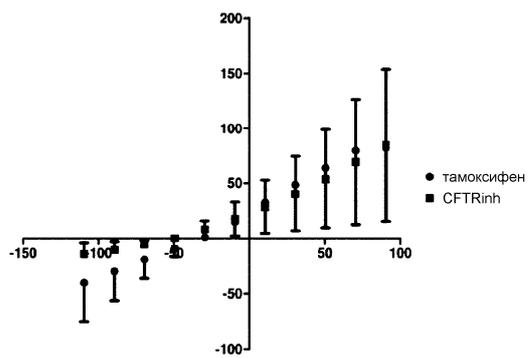
7. Применение тамоксифена или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что указанное лекарственное средство вводят ежедневно в дозах 60 или 70 мг.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3