



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **263 234 A5**

(51) A 61 K 37/02
A 61 K 45/02
A 61 K 37/50
A 61 K 39/42

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP A 61 K / 302 781 5	(22)	14.05.87	(44)	28.12.88
(31)	06/892,531	(32)	31.07.86	(33)	US
(71)	siehe (73)				
(72)	Hing-Wah Wong, Grace, US				
(73)	Genentech, Inc., South San Francisco, California, US				
(74)	Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung oder Vorbeugung von retroviralen Infektionen				

(55) Verfahren, Arzneimittel, retrovirale Infektionen, Tumor-Nekrosefaktor, Interferon, Aids, ARC
 (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung oder Vorbeugung von retroviralen Infektionen. Ziel der Erfindung ist es, neue Arzneimittel zur Behandlung oder Vorbeugung von retroviralen Infektionen bereitzustellen. Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung oder Vorbeugung von retroviralen Infektionen bereitzustellen, insbesondere Aids und ARC. In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Tumor-Nekrosefaktor oder ein Tumor-Nekrosefaktor und ein Interferon mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und/oder Exzipienten und/oder Stabilisator vermischt.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung oder Vorbeugung von retroviralen Infektionen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einen Tumor-Nekrosefaktor oder einen Tumor-Nekrosefaktor und ein Interferon mit einem pharmazeutischen annehmbaren Träger und/oder Exzipienten und/oder Stabilisator vermischt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Tumor-Nekrosefaktor Tumor-Nekrosefaktor- α oder Tumor-Nekrosefaktor- β verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Interferon α -, β - oder γ -Interferon verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Interferon eine Mischung aus γ -Interferon plus α - oder β -Interferon verwendet.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zusätzlich eine physiologisch annehmbare Abfangsubstanz für freie Sauerstoffradikale zumischt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Abfangsubstanz ein peroxidativ aktives Enzym verwendet.
7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Enzym Katalase verwendet.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Human-Erythrozyten-Katalase verwendet.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zusätzlich eine Substanz zumischt, welche (a) die Replikation eines Retrovirus oder (b) die retrovirale Bindung an einen Zelloberflächen-Rezeptor verhindert.
10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Substanz, welche die retrovirale Bindung an einen Zelloberflächen-Rezeptor verhindert, einen gegen ein Hüllen-Polypeptid des Retrovirus gerichteten Antikörper verwendet.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Zusammensetzung in gefriergetrockneter Form oder in Form einer sterilen wäßrigen Lösung herstellt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Zusammensetzung in Form eines Präparats mit verzögerter Wirkstofffreigabe herstellt.

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Anwendung der vorliegenden Erfindung erfolgt auf dem Gebiet der Arzneimittel zur Bekämpfung von retroviralen Infektionen, insbesondere von derartigen Infektionen, die zu immunologischen Defekten führen. Zu diesen immunologischen Defekten gehören insbesondere solche, die für das angeborene Immundefizit (AIDS) verantwortlich sind.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

AIDS ist eine ansteckende Erkrankung, die mit einem Defekt der zellulären Immunität verbunden ist. Sie ist durch opportunistische Infektionen und bestimmte maligne Erkrankungen gekennzeichnet, insbesondere durch Pneumocystis carinii-Pneumonie und das Kaposi-Sarkom, und zwar bei Patienten, bei denen keine andere erkennbare Ursache für diese seltenen Erkrankungen vorliegen (1-3). AIDS manifestiert sich durch eine ausgeprägte Lymphopenie, eine allgemeine kutane Anergie und eine deutlich verringerte proliferative Reaktion auf Mitogene, Antigene und allogene Zellen, wobei diese Erscheinungen offensichtlich das Ergebnis einer Verminderung der OKT4⁺ T-Lymphozyten sind (4).

Während die humorale Immunität relativ unbeeinträchtigt ist, liegen zunehmende Anzeichen für eine hyperaktive B-Zellen-Proliferationsreaktion vor, die kausal mit dem häufigen Auftreten von B-Lymphomen bei AIDS-Patienten im Zusammenhang stehen können (5, 6). Neben dem voll entwickelten Syndrom ist epidemisch eine verwandte Erkrankung, der AIDS-verwandte Komplex (AIDS-related complex; ARC) aufgetreten, der durch eine allgemeine chronische Lymphadenopathie charakterisiert ist. Dieses Syndrom hat viele der epidemiologischen Merkmale und Immunabnormalitäten mit AIDS gemeinsam und ist häufig ein Vorläufer für das klinische Auftreten von AIDS.

In jüngster Zeit konnte nachgewiesen werden, daß ein lymphozytotroper Retrovirus die Hauptursache für AIDS und den AIDS-verwandten Komplex darstellt. Der mit Lymphadenopathie assoziierte Virus (LAV) wurde zuerst aus gezüchteten Lymphknoten-T-Zellen von Patienten mit Lymphadenopathie und AIDS sowie von einem AIDS-Patienten und einem asymptomatischen Geschwister, beide mit Hämophilie B, isoliert (7-9). Ein ähnliches Virus mit der Bezeichnung human-T-lymphotropher Virus Typ III (HTLV-III) wurde aus Blutproben einer großen Zahl von AIDS- und ARC-Patienten durch Kokultivierung mit der permissiven T-Zelllinie H9 isoliert (10, 11). LAV und HTLV-III sowie verwandte Retroviren, die kürzlich von AIDS-Patienten isoliert wurden (12, 13) haben einige wichtige Eigenschaften gemeinsam.

Die virale Replikation erfolgt in vivo und in vitro in der OKT4⁺-T-Lymphozytenpopulation und ist mit einer beeinträchtigten Zellvermehrung und dem Auftreten von zytopathischen Effekten verbunden (8, 10, 14). Das Virus weist eine Mg²⁺-abhängige

reverse Transkriptase auf, besitzt eine dichte, zylindrische Kernmorphologie ähnlich den Retroviren vom Typ D (8, 13, 15) und wird von Antikörpern, die in Seren von praktisch sämtlichen AIDS- und ARC-Patienten auftreten, erkannt (8, 13, 16-21). Man nimmt nunmehr an, daß HTLV-III und LAV Stämme des gleichen Virus darstellen, der nunmehr die Bezeichnung Human-Immunmangel-Virus (HIV) erhalten hat.

Die Immunfunktion von Patienten, die von AIDS oder ARC betroffen sind, ist schwer beeinträchtigt. Die genaue Natur der durch HIV induzierten Abnormalitäten wird gegenwärtig noch untersucht. Von besonderem Interesse war die Wirkung der HIV-Infektion auf die Bildung von Lymphokinen durch die Immunzellen von derartigen Patienten sowie deren Reaktionen auf exogen verabreichte Lymphokine.

Von 16 AIDS-Patienten, die auf die Fähigkeit der T-Lymphozyten zur Sekretion von Makrophagen aktivierenden Produkten, einschließlich γ -Interferon, getestet wurden, kam es bei 14 nicht zur Bildung von aktiven Lymphokinen und bei 13-14 wurde überhaupt kein γ -Interferon ausgeschieden. Ferner wiesen die Makrophagen von AIDS-Patienten eine verstärkte antimikrobielle Aktivität bei der in vitro-Inkubation mit γ -Interferon auf, was auf die Möglichkeit schließen läßt, daß derartige Zellen möglicherweise in vivo auf exogen verabreichtes γ -Interferon reagieren (22, 24).

Es wurde auch berichtet, daß Lymphozyten von AIDS-Patienten einen Mangel in der Fähigkeit zur Bildung von Interleukin-2, einem Lymphokin, das eine Rolle bei der Vermehrung und Differenzierung von T-Lymphozyten spielt und das die γ -Interferonbildung stimuliert, aufweisen (23).

Schließlich wurde bekannt, daß γ -Interferon eine direkte antivirale Wirkung auf ein vesikuläres Stomatitisvirus (VSV) infizierte Zellen ausübt und die Wirkung eines Zytokins auf VSV-infizierte Zellen verstärkt (25). Dieses Zytokin wurde von diesen Autoren vorläufig als das Polypeptid identifiziert, das hier als Tumor-Nekrosefaktor- α bezeichnet wird; vgl. auch Eifel et al., Cell. Immun., Bd. 47 (1979), S. 197-203. Eine Immunergänzungstherapie für AIDS erschien daher als eine vielversprechende Möglichkeit, und klinische Untersuchungen an Patienten wurden eingeleitet.

Trotz der in die Lymphokin-Therapie von AIDS-Patienten gesetzten Erwartungen waren die in vivo-Ergebnisse enttäuschend. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der in vitro-Versuche ergab sich im längeren Verlauf einer intravenösen Behandlung mit rekombinantem γ -Interferon eher eine Hemmung als eine Verstärkung der Monozyten-Respirationsburstfunktion (26), und eine intravenöse Behandlung von AIDS-Patienten mit unterschiedlichen Dosen an Interleukin-2 oder γ -Interferon führte zu dem Schluß, daß eine in vivo-Lymphokintherapie nicht von signifikantem Wert bei der Behandlung von AIDS-Patienten ist (27).

Tatsächlich hatte sich zum Zeitpunkt der vorliegenden Anmeldung die Theorie entwickelt, daß die Möglichkeit der Immunstimulation oder -rekonstruktion bei der AIDS-Therapie „gefährlich“ sei, da man annahm, daß die Zellaktivierung durch Lymphokine zu einer Ausbreitung des Virus und einer Verarmung an T4-Zellen führen würde und somit der Krankheitsfortschritt beschleunigt würde (28). Im Juni 1986 offenbarten Yamamoto et al. (29), daß Human- α - und β -Interferone (nicht aber γ -Interferon) die in vitro-Replikation von HIV-Stämmen unterdrücken, daß jedoch beim Absetzen der Einwirkung der Interferone die virale Produktion von infizierten Zellen erhöht wurde. Dies stellte einen weiteren Hinweis dafür dar, daß die Immuntherapie von AIDS kontraindiziert sei.

Schließlich wurde die Auffassung vertreten, daß Lymphotoxin durch HIV-infizierte T-Zellen mittels viral induzierter Transaktivierung des endogenen Lymphotoxingens der T-Zellen gebildet wird, was zu einer Sekretion von autotoxischen Mengen des Lymphotoxins führt (35).

Tumor-Nekrosefaktoren sind Polypeptide, die von mitogenstimulierten Makrophagen (TNF- α) oder Lymphozyten (TNF- β) gebildet werden und zytotoxisch für bestimmte in maligner Weise transformierte Zellen sind. Es wurde die Auffassung vertreten, daß TNF- α für den Kräfteverfall und den schlechten Körperzustand von Patienten mit Krebs oder schweren Infektionen ist (34), und es wurde berichtet, daß eine passive Immunisierung gegen TNF- α Mäuse gegen die letale Wirkung von Endotoxin schützt (30). Von der Antitumorwirkung von TNF- α ist bekannt, daß sie synergistisch durch Interferone verstärkt wird, und die Antitumorwirkung von TNF- β wird in ähnlicher Weise durch Interferon- γ verstärkt. Für TNF- α und TNF- β im Gemisch ergibt sich jedoch nur eine additive Antitumorwirkung, ebenso wie bei der antiviralen Wirkung von α - und β -Interferon.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, neue pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung oder Vorbeugung von retroviralen Infektionen bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue pharmazeutische Zusammensetzungen zur Behandlung oder Vorbeugung von retroviralen Infektionen bereitzustellen, wobei eine erfolgreiche Immunotherapie von mit Retroviren, insbesondere lymphozytotropen Viren, wie HIV, infizierten Personen ermöglicht werden soll. Ferner soll mit den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen eine Behandlung von Personen möglich sein, bei denen das Risiko einer aktiven retroviralen Infektion besteht, z. B. bei Trägern von latenten Retroviren.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung oder Vorbeugung von retroviralen Infektionen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einen Tumor-Nekrosefaktor oder einen Tumor-Nekrosefaktor und ein Interferon mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und/oder Exzipienten und/oder Stabilisator vermischt.

Überraschenderweise wurde erfindungsgemäß festgestellt, daß durch Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge eines Tumor-Nekrosefaktors allein oder vorzugsweise in Kombination mit einem Interferon ein Schutz von Personen mit einem Risiko einer retroviralen Infektion erreicht wird und retroviral infizierte Zellen abgetötet werden. Während γ -Interferon allein nur eine geringe oder gar keine Schutzwirkung gegen retrovirale Infektionen aufweist und gegen retroviral infizierte Zellen nicht signifikant zytotoxisch wirkt und TNF allein in hohen Konzentrationen nur mäßig aktiv ist, bewirkt eine Kombination dieser zwei Wirkstoffe eine drastische Wirkungssteigerung. Diese Erscheinung läßt sich in vivo feststellen, obwohl der Zustand des Immunsystems von retroviral infizierten Patienten erheblich gestört ist. Dieses Ergebnis ist insbesondere deswegen überraschend, weil bei derartigen Patienten nichts von einem TNF-Mangel bekannt ist.

Fig. 1 ist die Darstellung eines Northern-Gels, das die drastische Verringerung an HIV-mRNA in HIV-infizierten HuT 78-Zellen nach Vorbehandlung mit TNF- α und IFN- γ im Vergleich mit nicht vorbehandelten Kontrollzellen zeigt.

Fig. 2 zeigt die antivirale Schutzwirkung von Katalase in Kombination mit TNF- α und/oder IFN- γ .

Retroviren sind als Viren definiert, die einzelsträngige oder doppelsträngige RNA enthalten. Die Replikation dieser Viren erfolgt unter Ausnutzung des Zellstoffwechsels von permissiven Wirten unter reverser Transkription des genetischen RNA-Materials des Virus. Die auf diese Weise gebildeten großen Mengen an DNA werden zu HIV-Protein und RNA für den Aufbau von Tochterviren translatiert. Beispiele für derartige Viren sind die sog. „langsamen“ oder Lentiviren und die T-Zell-Leukämieviren, wie HTLV-I und HTLV-II, vorzugsweise handelt es sich jedoch um mit AIDS assoziierte HIV-Stämme.

Die erfindungsgemäß geeigneten Tumor-Nekrosefaktoren umfassen TNF- α und TNF- β . Der erstgenannte Faktor ist in der US-Anmeldung 881 311 vom 2. Juli 1986 zusammen mit Verfahren zu seiner Herstellung in rekombinanten Zellkulturen beschrieben. Der letztgenannte Faktor (früher als Lymphotoxin bezeichnet) und geeignete rekombinante Syntheseverfahren sind in der US-Anmeldung 616 502 vom 31. 5. 1984 und der US-Anmeldung 732 312 vom 9. 5. 1985 beschrieben. Die in diesen Anmeldungen beschriebenen Faktoren TNF- α und TNF- β umfassen zytotoxische Aminosäuresequenz- und Glycosylierungsvarianten, die hier ebenfalls verwendet werden. Selbstverständlich sind auch TNF- α oder TNF- β aus nicht-rekombinanten Quellen für die erfindungsgemäße Anwendung geeignet.

TNF- α oder TNF- β werden alleine oder im Gemisch miteinander in empirisch so bestimmten Mengen angewandt, daß sich eine möglichst wirksame klinische Reaktion ergibt. TNF ist nicht für bestimmte Spezies spezifisch, so daß TNF-Produkte aus anderen tierischen Spezies, z. B. Schweinen oder Rindern, erfindungsgemäß geeignet sind. Als TNF wird reifes, humanes TNF- α aus rekombinanten mikrobiellen Zellkulturen bevorzugt. TNF weist im allgemeinen eine zytolytische Aktivität auf empfindliche L-929-Mäusezellen von mehr als etwa 1×10^6 Einheiten/mg auf, wobei eine Einheit gemäß den vorerwähnten Patentanmeldungen definiert ist, auf deren Offenbarung hier verwiesen wird.

Interferone sind bekannte Substanzen. In der Natur gehören dazu β -, γ -Interferon und etwa 20 verschiedene Untertypen von α -Interferon. Ihre wichtigste Eigenschaft für die erfindungsgemäßen Zwecke besteht darin, daß sie dazu in der Lage sind, Zellen in vitro und in vivo gegen virale Infektionen zu schützen. Bei den erfindungsgemäß verwendeten Interferonen handelt es sich typischerweise um α -, β - und/oder γ -Interferon. Interferone, die in rekombinanten Zellkulturen, aus natürlichen Isolaten oder durch stabile untransformierte Zelllinien gebildet sind, sind für die erfindungsgemäßen Zwecke geeignet, sowie Interferon-Aminosäuresequenz- oder Glycosylierungs-Varianten (unter Einschluß von unglycosylierten Formen), solange sie eine antivirale Aktivität besitzen. γ -Interferon soll aus der gleichen Tierspezies stammen, deren Behandlung beabsichtigt ist, da von γ -Interferon bekannt ist, daß es für bestimmte Spezies spezifisch ist. Die Interferone sind vorzugsweise im wesentlichen homogen und haben eine spezifische Aktivität von mehr als etwa 1×10^6 internationale Einheiten/mg.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen enthalten, wie bereits erwähnt, bei der therapeutischen Anwendung von Interferonen, TNF oder LT übliche pharmazeutisch annehmbare Träger, wie physiologische Kochsalzlösung oder 5%ige Dextroselösung, zusammen mit herkömmlichen Stabilisatoren und/oder Exzipientien, wie Humanserumalbumin oder Mannit. Die Zusammensetzungen werden in lyophilisierter Form oder in Form von sterilen wäßrigen Lösungen bereitgestellt.

Einige Variable werden vom Fachmann bei der Festlegung der Anteile von α -, β - oder γ -Interferon und von TNF- α oder TNF- β , des Nettoanteils von Interferon zu TNF, der Konzentration von Interferon und TNF in therapeutischen Zusammensetzungen und der auf kg-Basis verabreichten Dosen berücksichtigt. Zu den therapeutischen Variablen gehören auch die zu behandelnde Tierspezies, der Verabreichungsweg und der klinische Zustand des Patienten (einschließlich des Zustands und des Grads der retroviralen Infektion und/oder der ggf. zu Beginn der Behandlung zufällig vorhandenen Infektionen). Interferondosen von etwa 1 bis $50 \mu\text{g}/\text{m}^2$ stellen geeignete Anfangsdosen dar. Die tolerierte Dosis wird etwa $25 \mu\text{g}/\text{m}^2$ nicht überschreiten.

Die TNF- und Interferondosen werden zusammen oder getrennt verabreicht. Bei der letztgenannten Verabreichungsform soll das Interferon zuerst und das TNF innerhalb von 24 Stunden danach verabreicht werden. Es ist auch möglich, TNF und Interferon in mehrfachen Zyklen je nach der klinischen Reaktion des Patienten zu verabreichen. Diese Therapiemöglichkeit ist wirksam bei der Bekämpfung von latent infizierten Zellen, die in die aktive Phase der Infektion eintreten, was entweder auf exogen verabreichte T-Zellmitogene oder auf zufällige Infektionen, die zur T-Zellaktivierung führen, zurückzuführen ist.

Da die Behandlung mit TNF und Interferon zur Lysis von viral infizierten Zellen führt und die Freisetzung von infektiösen Viren verursachen kann, ist es vorteilhaft, im Verlauf der Therapie Substanzen zu verabreichen, die zur Neutralisation von weiterer viraler Infektiosität fähig ist. Dies kann durch verschiedene Verfahren erreicht werden. Ein Verfahren besteht darin, im Verlauf der Therapie Antikörper, z. B. monoklonale oder polyklonale anti-retrovirale Antikörper, vorzugsweise gleichzeitig mit TNF zu verabreichen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, immunologisch geeignete Patienten gegen Retroviren zu impfen, um aktiv neutralisierende Antikörper zu induzieren. Ein geeigneter Impfstoff für diesen Zweck enthält HIV gp 120 env und ist in der US-Anmeldung 861 016 vom 8. 5. 1986 beschrieben. Es wird offenbart, daß dieser Impfstoff HIV-neutralisierende Antikörper induziert, die wiederum bei der vorstehend erwähnten passiven Immunisierungsstrategie verwendet werden können. Andere Mittel, die der potentiellen Infektiosität von freigesetzten Viren entgegenwirken, können ebenfalls zusammen mit TNF verabreicht werden, z. B. gp 120 env oder Fragmente davon, die eine Bindung mit den Zelloberflächenrezeptoren, die normalerweise durch die in Frage stehenden Retroviren erkannt werden (im Fall von HIV der an T-Helferzellen vorhandene OKT 4⁺-Zelloberflächenmarker), eingehen und somit kompetitiv die virale Haftung an den Oberflächen der Zielzellen hemmen.

Die synergistische Antivirus- und Antitumor-Aktivität von TNF und/oder einem Interferon wird weiter gesteigert, indem man den Zusammensetzungen eine therapeutisch wirksame Menge einer Abfangsubstanz für freie Sauerstoffradikale (unter Einschluß von einem Schutz gegen Sauerstoff bewirkenden Enzymen und peroxidativ wirksamen Substanzen) einverleibt. Derartige Substanzen, einschließlich Katalase Superoxid-dismutase, Peroxidase oder Chlorperoxidase hemmen in starkem Umfang die Aktivität von TNF und Interferon.

Es ist bekannt, daß derartige Enzyme den Abbau von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff oder die Reaktion $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HO-R-OH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O-R-O}$ katalysieren, wenngleich gegenwärtig die Mechanismen, gemäß denen diese Mittel die Wirkung von TNF und Interferon steigern, unbekannt sind. Katalase ist ein Handelsprodukt und kann aus Humangewebe, wie roten Blutkörperchen, gewonnen werden. Peroxidase kann leicht aus Meerrettich gewonnen werden. Das Mengenverhältnis der peroxidativ wirksamen Substanz zu TNF und Interferon beträgt vorzugsweise etwa 1000:1:0,1 bis 100:50:25, wobei aber die Dosen und Mengenverhältnisse je nach Bedarf unter Berücksichtigung des klinischen Zustands des Patienten und des Verabreichungswegs sowie unter Berücksichtigung anderer, dem Fachmann geläufiger Variablen eingestellt werden.

TNF und Interferone werden auf gleichen oder unterschiedlichen Verabreichungswegen verabfolgt, beispielsweise durch intravenöse, intranasale oder intramuskuläre Verabreichung. Einer oder beide Bestandteile können in Form von Zusammensetzungen mit verzögerter Wirkstofffreigabe verabreicht werden, z. B. als Polylactid- oder Polyhydroxybutyrat-Implantate oder Liposomen, gemäß EP-A-172 007 oder durch kontinuierliche Infusion. Gegenwärtig ist es bevorzugt, TNF und Interferon in den vorerwähnten Dosen durch intravenöse Infusion zu verabreichen.

Um bei der Anwendung von hohen Dosen die Nebenwirkungen der kombinierten Therapie zu vermeiden, können TNF und Interferon in Form einer extrakorporalen Behandlung, die bisher als adoptive Immunotherapie bezeichnet worden ist (US-Anmeldungen 763 657 und 743 570 vom 8. 8. 1985 bzw. 11. 6. 1985), angewandt werden. Bei diesen Verfahren werden mononukleare oder lymphozytische Zellen des peripheren Bluts aus dem Blut in einem extrakorporalen Plasmapheresesyklus abgetrennt, mit Interleukin-2 oder Interferon behandelt und wieder in den Patienten infundiert. Die Immunreaktionen des Patienten gegen maligne Erkrankungen werden durch dieses Verfahren stimuliert. Für die Behandlung von retroviralen Infektionen wird das gleiche allgemeine Verfahren angewandt, mit der Ausnahme, daß die peripheren Monozyten und/oder Lymphozyten in Gegenwart von TNF oder TNF und Interferon inkubiert werden. Viral infizierte Zellen werden durch TNF oder durch die Wirkstoffkombination abgetötet. Die extrakorporalen Zellen können auch mit einem Killerzellen-Aktivierungsmittel, z. B. einem Lymphzellenmitogen (wie Phytohämagglutinin) und/oder Interleukin-2 inkubiert werden. Die Zellen werden sodann gewaschen, in einem Infusionsmedium resuspendiert und dem gleichen Patienten, aus dem die Zellen gewonnen worden sind, wieder infundiert. Die Reinfusion kann sich eine Verabreichung von TNF und Interferon, wie sie erfindungsgemäß vorgesehen ist, anschließen. Die optimalen Mengen an TNF oder TNF und Interferon und die optimalen Bedingungen für die extrakorporale Behandlung der Lymphzellen der Patienten werden routinemäßig festgelegt, indem man den viralen Titer der Patienten bestimmt und die Verbesserungen im klinischen Zustand der Patienten ermittelt.

Personen, die als Kandidaten für die Behandlung mit den erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen in Frage kommen, sind solche, bei denen das Risiko einer Belastung mit retroviralen Infektionen besteht, oder die bereits Anzeichen einer derartigen Infektion zeigen. Hierzu gehören auch die Personengruppen mit hohem Risiko, wie Homosexuelle, Empfänger von intravenös zu verabreichenden Arzneimitteln und Drogen und Personen, die Transfusionen oder andere aus Blut hergestellte Produkte erhalten haben, wobei das Blut nicht auf HIV-Antikörper untersucht worden ist. Zu den Anzeichen für eine Belastung mit Retroviren gehören die Serokonversion mit Antikörpern gegen HIV, positive Serumtests auf HIV, mit dem AIDS-Komplex (ARC) verbundene Symptome und AIDS selbst. Bei AIDS-Patienten kann ggf. eine Diagnose für das Kaposi-Sarkom oder andere maligne Erkrankungen, zufällige mikrobielle Infektionen, wie Pneumocystis carinii oder „Thrush“, neurale Störungen oder Kachexie (Kräfteverfall), gestellt sein.

Im nachstehenden Ausführungsbeispiel handelt es sich bei den Interferonen um Produkte von rekombinanten bakteriellen Zellkulturen, die auf eine spezifische Aktivität von etwa 10^8 Einheiten/mg gereinigt worden sind. TNF- α und TNF- β sind ebenfalls rekombinante Produkte mit einer spezifischen Aktivität von etwa 5×10^7 Einheiten/mg. Auf den Offenbarungsgehalt sämtlicher Literaturzitate wird ausdrücklich hingewiesen.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

Prophylaxe gegen HIV-Infektion

Die OKT4⁺-positiven Human-T-Zell-Leukämie-Zelllinien H9, HuT78 und U937 wurden in Suspension mit RPMI-1640-Medium bei 37°C gezüchtet. Die Kulturen wurden zur Abtrennung der Zellen vom Medium zentrifugiert, und die Zellen wurden in frischem RPMI-1640 mit einer Dichte von 1×10^6 /ml resuspendiert. Eine ausreichende Menge an TNF- α und γ -Interferon wurde zu der resuspendierten Kultur zugesetzt, um 0,1 μ g/ml TNF- α und 0,1 μ g/ml γ -Interferon zu erreichen. Die Kombination aus TNF- α und γ -Interferon war gegenüber nicht infizierten HuT78- und H9-Zellen nicht toxisch. Die Kultur wurde sodann 24 Stunden bei 37°C inkubiert, wonach 1×10^6 cpm-Einheiten an H. v./ml zugesetzt wurden. Die cpm-Einheiten wurden durch die reverse Transkriptase-Aktivität bestimmt (31); jede Einheit ist so kalibriert, daß sie die reverse Transkriptase-Aktivität von einem Virion darstellt. Nach weiterer 3tägiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch indirekte Immunofluoreszenz einem Screening auf virale Antigene unterworfen, wobei ein monoklonaler Mäuse-Antikörper gegen p24 (Kern)-Protein von HIV und markiertes Ziegen-anti-Mäuse-Immunglobulin verwendet wurde (32). Die Ergebnisse von Replikaversuchen werden nachstehend als prozentuale Anteile der Zellen, die HIV-Kernprotein enthalten, angegeben.

Tabelle I

Mittel	% infizierte Zellen					
	HuT78		H9		U937	
	1	2	1	2	1	2
Kontrolle	54	68	48	36	11	14
TNF- α	27	34	32	18	7	8
γ -Interferon	63	51	42	41	12	11
TNF- α und γ -Interferon	1	8	4	3	2	1

Die Ergebnisse zeigen, daß die Kombinationstherapie mit TNF und Interferon sehr wirksam in bezug auf eine Verhinderung einer HIV-Infektion bei ansonsten empfindlichen T-Zellen ist.

Beispiel 2**Behandlung von HIV-infizierten Zellen**

1×10^5 H9- und RPMI-1788-Lymphoblastoidzellen/ml RPMI-1640-Medium wurden mit 1×10^3 cpm HIV/ml in Gegenwart von $1 \mu\text{g/ml}$ Polybrene zur Verstärkung des prozentualen Anteils an mit HIV infizierten Zellen versetzt. Diese Zellen wurden etwa 30 Tage gezüchtet, wobei jeweils nach 3 bis 5 Tagen das Kulturmedium ersetzt wurde und Zellen etwa 1 mal pro Woche einer Subkultur unterworfen wurden. Ausreichende Mengen an TNF- α und γ -Interferon wurden im wesentlichen gleichzeitig zu den Kulturen mit einem Gehalt an 1×10^6 Zellen/ml zugegeben, um die in Tabelle II angegebenen Konzentrationen zu erreichen. Kombinationen von TNF- α und γ -Interferon in diesen Konzentrationen waren gegen nichtinfizierte H9- und RPMI-1788-Zellen nicht zytotoxisch. Die Kulturen wurden 3 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend zur Bestimmung des prozentualen Anteils an lebensfähigen Zellen durch Färbung mit Trypanblau getestet. Die Ergebnisse von Replikaversuchen sind in Tabelle II zusammengestellt (ND = nicht durchgeführt).

Tabelle II

Mittel	Konzentration	% lebensfähige Zellen			
		H9		1788	
		1	2	1	2
Kontrolle		89	76	95	86
TNF- α	1,0 ng/ml	ND	ND	90	81
	0,1 $\mu\text{g/ml}$	85	74	81	76
γ -Interferon	1,0 ng/ml	ND	ND	83	84
	0,1 $\mu\text{g/ml}$	85	74	80	82
TNF- α und	1,0 ng/ml	ND	ND	68	72
γ -Interferon	0,1 $\mu\text{g/ml}$	50	42	34	53

Diese Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige, synergistische Abtötung von viral infizierten Zellen durch Kombinationen aus TNF und Interferon und in einem geringeren Umfang durch TNF- α allein. Dies beweist in Kombination mit der bei nichtinfizierten Zellen erzielten Schutzwirkung durch Verabreichung von TNF oder von Kombinationspräparaten den Wert der TNF-Präparate oder Kombinationspräparate bei der Therapie von retroviralen Infektionen.

Beispiel 3**Verringerung der HIV-Replikation durch TNF- und Kombinationspräparate**

HuT78-Zellen wurden jeweils mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ TNF- α und γ -Interferon behandelt und sodann gemäß Beispiel 1 mit HIV infiziert. Nach 2-tägiger Inkubation bei 37°C wurde das gesamte RNA aus den HIV-infizierten Zellen auf folgende Weise extrahiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in $0,35 \text{ ml}$ TSM-Puffer (10 millimolar Tris, pH-Wert 7,5, $0,15 \text{ M}$ NaCl, 2 millimolar MgCl_2) mit einem Gehalt an $0,5\%$ NP-40 und $17 \mu\text{l}$ VRC (BRL) von etwa 0°C resuspendiert. Nach 3 bis 5 Minuten wurden die Nuclei durch Zentrifugation von den lysierten Zellen abgetrennt. Der mRNA enthaltende Überstand wurde mit $0,35 \text{ ml}$ TSE-Puffer (10 millimolar Tris, pH-Wert 7,5, $0,15 \text{ M}$ NaCl, 5 millimolar EDTA) mit einem Gehalt an 1% SDS versetzt und 3 mal mit $0,7 \text{ ml}$ Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1) extrahiert. Das Phenol wurde mit Wasser und $0,1\%$ β -OH-Chinolin äquilibriert. RNA wurde aus der wäßrigen Phase mit Äthanol und Natriumacetat gefällt. Poly(A)-RNA wurde durch Oligo(dT)-Celluloseelektrophorese hergestellt (36). Eine Northern-Hybridisierung unter Verwendung von $1 \mu\text{g}$ RNA/Bahn wurde gemäß (37) durchgeführt. Die in Fig. 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die TNF- α -Vorbehandlung dazu in der Lage war, das Auftreten von HIV-RNA in Wirtszellen zu unterdrücken, daß aber weitaus weniger RNA auftrat, wenn TNF und Interferon zusammen verwendet wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit den in Tabelle I enthaltenen Infektiositätsdaten überein. Keine Veränderung in Actin-mRNA (ein Strukturprotein) wurde mit oder ohne TNF und Interferonbehandlung beobachtet, was zeigt, daß die Wirkung von TNF- α und Interferon mehr auf den Virus und nicht auf das Zellwachstum im allgemeinen ausgerichtet ist.

Beispiel 4**Bericht über die Therapie von AIDS- und ARC-Patienten**

Männliche Patienten, die auf HIV-Antikörper seropositiv waren und deren Blut in vitro zellkulturpositiv auf einen nachweisbaren HIV-Titer war, waren an der Untersuchung beteiligt. Diese Patienten wiesen im allgemeinen eine Symptomatologie auf, die mit AIDS oder ARC übereinstimmte, und zeigten eine Serokonversion in bezug auf HIV-Antikörper. Die Behandlungsgruppe wurde in 3 Untergruppen auf der Grundlage der folgenden Behandlungsvariablen eingeteilt:

1. Gleichzeitige oder sequentielle TNF- und Interferonbehandlung.
2. Intravenöse oder intramuskuläre Injektion und im Fall der intravenösen Injektion durch einen Bolus oder durch kontinuierliche Infusion (1, 2, 5 und 10 Tage).
3. Dosierung über Stunden, beginnend mit $1 \mu\text{g/m}^2$ TNF und $1 \mu\text{g/m}^2$ Interferon, ansteigend auf 5, 10, 25, 50 ... $\mu\text{g/m}^2$ der einzelnen Mittel, je nach Verträglichkeit.
4. Verhältnisse von TNF zu Interferon: 1:100 bis 100:1.
5. Wiederholung von Behandlungszyklen: 1–5 mit dazwischenliegenden Behandlungspausen von 1, 2, 5 oder 10 Tagen.
6. Auswahl und Anteile der Interferontypen: α und γ = 1:10 bis 10:1 β und γ = 1:10 bis 10:1; γ - α oder β allein 1:1 bis 10:1 bis 1:5 bis 5:1.

Ein geeignetes Dosierungsschema umfaßt die Behandlung von ARC-Patienten mit einer Kombination von TNF- α , γ -Interferon und α -Interferon. Die Kombination wurde durch kontinuierliche Infusion unter Anwendung einer intravenösen Infusionspumpe, die so kalibriert war, daß eine Dosierung von 1 bis 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ TNF- α , 1 bis 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ γ -Interferon und 1 bis 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ α -Interferon abgegeben wurden, verabreicht. Die Patienten konnten je nach Verträglichkeit auf höhere Dosen gebracht werden. Diese Infusion wurde 1 Woche fortgesetzt. Anschließend blieben die Patienten 1 Woche unbehandelt, wonach die Infusion wiederholt wurde. Nebenwirkungen, wie Fieber, Schüttelfrost und dgl. wurden durch herkömmliche Maßnahmen oder durch Verringerung der Dosis behandelt. Bei Verwendung von anti-HIV-Antikörper oder gp 120 env als antivirale Mittel in Kombination mit den vorerwähnten Präparaten, waren der Antikörper oder das env-Polypeptid in einer Dosis vorhanden, die so berechnet war, daß sie zur Bekämpfung der durch die kombinierte Therapie freigesetzten Virionen in der Lage war. Dies hängt von der Affinität des Antikörpers für die Virionen sowie vom Neutralisationstiter und dem viralen Titer des Patienten ab. Die Festlegung geeigneter Dosen liegt innerhalb des Könnens des Fachmanns. Der klinische Zustand und die viralen Infektionstiter der Patienten wurden während und nach der Behandlung aufgezeichnet. In Übereinstimmung mit den in vitro-Untersuchungen der Beispiele 1 bis 3 wurden die Immunsituation und der virale Titer eines statistisch signifikanten Anteils der Patienten durch die Behandlung verbessert.

Beispiel 5

Steigerung der antiviralen Aktivität von γ -Interferon und/oder TNF- α durch Katalase

A549-Zellen wurden in Muldentabletts mit 96 Mulden (Falcon Plastics) in einer Menge von 2×10^4 Zellen/Mulde 24 h vor der Inkubation mit den Testproben gebracht. Die Testproben entsprachen den Angaben von Fig. 2 („CAT“ bedeutet Katalase). Die Proben enthielten ansonsten Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium (DME), das mit 5% hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FCS), Glutamin (2 millimolar), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ergänzt war. Nach 18stündiger Inkubation bei 37°C wurde der Kulturiüberstand jeweils durch frisches DME-Medium, das frei von Interferon, TNF oder Katalase war, aber jeweils 2% fötales Kälberserum und EMC-Virus mit einem Infektionsfaktor („MOI“ ist das Verhältnis von infektiösem Virus/Zelle) von 1 enthielt, ersetzt. Der zytopathische Effekt (CPE) wurde bestimmt, indem die lebensfähigen Zellen mit Kristallviolett angefärbt wurden, und der Titer wurde quantitativ unter Verwendung eines selbsttätigen Mikroelisa-Ablesegeräts (MR 580, Dynatech) festgehalten und ferner visuell bestätigt. Der antivirale CPE-Titer wurde als der reziproke Wert der ermittelten Verdünnung, bei der 50% der zytopathischen Vorgänge in der Zelle gehemmt wurden, ausgedrückt und gegen den internationalen Vergleichsstandard von γ -Humaninterferon (Nr. Gg 23-901-530) standardisiert. Wie aus Fig. 2 hervorgeht, wurde durch Katalase die antivirale Wirkung von γ -Interferon und TNF- α drastisch und synergistisch verstärkt. Diese Wirkung ist nicht auf den EMC-Virus allein beschränkt. Sie wurde bei einer Reihe von permissiven Zellen und Viren beobachtet.

2 6 3 2 3 4

Fig. 1.



Fig. 2.

