NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **309025** (13) B1

(51) Int Cl[7] A 61 K 31/7076, A 61 P 25/28

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19942765	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1993.02.18, PCT/US93/01467
(22) Inng. dag	1994.07.25	(85) Videreføringsdag	1994.07.25
(24) Løpedag	1993.02.18	(30) Prioritet	1992.02.19, US, 838546
(41) Alm. tilgj.	1994.09.13		
(45) Meddelt dato	2000.12.04		

(71) Patenthaver The Scripps Research Institute,
10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, US
(72) Oppfinner Ernest Beutler, La Jolla, CA, US
(74) Fullmektig Egil Lassen - Actio-Lassen AS, 5826 Bergen

(54) Benevnelse **Anvendelse av substituerte adeninderivater for fremstilling av preparater til behandling av multippel sklerose**

(56) Anførte publikasjoner DK B1 170629

(57) Sammendrag

Behandling av pasienter som har multippel sklerose med terapeutiske preparater inneholdende substituerte adeninderivater slik som 2-klor-2'-deoksyadenosin er vist markert å forbedre sykdomstilstanden.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelsen av substituerte adeninderivater for fremstilling av preparater til behandling av multippel sklerose.

Multippel sklerose (MS) er resultatet av demyelinisering i hjernen og ryggmargen (sentralnervesystemet). Symptomer som resulterer fra denne demyelinisering inkluderer svakhet, synssvekkelse, manglende koordinering og paresthesier (unormal kribling). Sykdomsforløpet er stort sett uforutsigbart, men fremskrider ofte gjennom en syklus av symptomeksacerbasjon fulgt av remisjon.

Konvensjonelle behandlinger benytter for tiden terapi med ACTH eller corticosteroider slik som prednison. Kontrollerte studier antyder at slike behandlinger induserer raskere frigjøring fra akutte symptomer og tegn, men etterlater sykdommens langsiktige resultat upåvirket. Langtids vedlikeholdsterapi med ACTH eller corticosteroider kontraindikeres. Opplysninger indikerer at immunhemmende midler ikke medfører noen langsiktig vinning. (Cecil, Textbook of Medicine, Beeson et al., eds., 15th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, (1979) s. 847).

Etiologien for multippel sklerose er ukjent men er forbundet med et utvalg genetiske og miljømessige faktorer. Både celleformidlet og humoral immunrespons som utløses av fremmed- eller autoantigener kan bidra til patogenesen av multippel sklerose. Visse immunresponsgener kan assosieres med en økt sårbarhet overfor sykdommen. Sykdommen kan formidles av T-celler som gjenkjenner et til nå uidentifisert autoantigen. Eksempelvis kan eksperimentell allergisk encephalomyelitis (EAE), en dyremodell for demyelerende sykdommer slik som multippel sklerose, induseres ved immunisering av mus med helt myelin eller spesifikke myelinkomponenter slik som myelingrunnprotein.

I humaner med multippel sklerose er eksacerbasjoner korrelert med høye nivåer av neopterin i blod og cerebrospinalveske. Neopterin er en faktor som frigjøres fra monocytter og makrofager i nærvær av aktiverte T-celler, hvilket peker på at disse celler kan være involvert i multippel sklerose-eksacerbasjoner. (Fredrickson et al. (1987), Acta Neurol. Scand., 75:352-355; Huber et al. (1984), J. Exp. Med., 160:310-316). På mikroskopisk nivå finnes monocyter, mikrogliale celler (aktiverte T-celler og sentralnervesystemets makrofager) innen

nervecellenes demyelineserte regioner under multippel sklerose-eksacerbasjoner (Cecil, Textbook of Medicine (1979), Beeson et al. (eds.), W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA).

Forskjellige konvensjonelle behandlingsmetodologier har vært benyttet for å lette symptomene ved multippel sklerose. Mange av disse er rettet mot anvendelse av palliative, anti-inflammatoriske midler. Ingen behandling til dato har hatt noen konsistent positiv effekt på sykdomsforløpet.

Nylig er det innen faget beskrevet anvendelse av spesifikke deoksyribosider som anti-inflammatoriske midler. Eksempelvis vedrører US-patent 4.481.197 anvendelse av usubstituerte 3-deaza-2'-deoksyadenosinderivater i behandling av inflammasjon. US-patent 4.381.344 vedrører en fremgangsmåte til syntese av deoksyribosider ved anvendelse av en bakteriell fosforylase.

Et deoksyribosidderivat, 2-klor-2'-deoksyadenosin (CdA) er funnet å være et effektivt middel til behandling av kronisk lymfocyttisk leukemi og noen T-celle-ondartetheter. (Carson et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:2232-2236; Piro et al. (1988), Blood 72:1069-1073). Pharmakokinetikken av oralt og subkutant administrert 2-klor-2'-deoksyadenosin ved behandling av kronisk lymfocyt leukemi har vært beskrevet og sammenliknet. (Liliemark et al. (1992) Journal of Clinical Oncology, 10, (10): 1514-1518; Juliusson et al. (1992) Blood, 80 (Suppl. 1): 1427). Kronisk lymfocyttisk leukemi er en ondartethet ved B-lymfocytter som bærer overflateantigenet Leu-1.

Leu-1 B-cellene representerer en mindre andel av det normale B-lymfosyttreservoir, vanligvis mindre enn 20 %. Leu-1 B-celler uttrykker overflatemarkører som typisk finnes på monocyter (Mac-I antigen) og T-lymphocytter (Leu-1-antigen). Omtrent 10 % av pasientene med kronisk lymfocyt-leukemi fremviser ledsagende autoimmunitet og nylig har Leu-1 B-celler vært trukket inn i autoimmunsykdommers patogenese.

Fase I kliniske forsøk på humane pasienter med kronisk lymfocyttisk leukemi indikerer at infusjon med økende doser 2-klor-2'-deoksyadenosin [0,1 - 0,5 mg pr. kg kroppsvekt pr. dag (mg/kg/dag)] gav økende plasmakonsentrasjoner av medikamentet [10 - 50 nanomolar (nM)]. Disse infusjoner indikerte at medikamentet ble tolerert godt og ikke induserte kvalme, oppkast eller feber. Den dosebegrensende giftighet var benmargsundertrykkelse, som

vanligvis forekom ved doser over ca. 0,2 mg/kg/dag eller ved plasmanivåer på over ca. 20 nM.

Andre studier, Montgomery et al. (1959) J. Am. Chem. Soc., 82:463-468, indikerte at 2-fluoradenosin fremviser en forholdsvis høy grad av cytotoksisitet. Disse arbeidere rapporterte at svarte C57-mus som var implantert med Adenocarcinoma 755 (Ad755) bare kunne tolerere ca. 1 mg pr. kg kroppsvekt. 2-fluoradenosin ble ved dette nivå funnet å være inaktivt overfor Ad755 såvel som leukemi L1210 og Erlich ascitestumor.

US-patentene 4.751.221 og 4.918.179 beskriver syntesen og anvendelsen av flere 2-substituerte-2'-deoksy-2'-fluorarabino-furanosyl-nukleosider inklusive adeninderivater. Disse forbindelser ble sagt å ha biologiske antitumor- og antitrypanosomale virkninger. Cytotoksisitetsdata som viser antitumorvirkning for 2-amino-6-tiopurin-, guanin- og thiopurine-derivater overfor murine og humane cellelinjer ble rapportert.

US-patent 5.034.518 anviser syntese av 2-substituerte-2'-deoksy-2'-fluoradenosiner. Disse forbindelser ble sagt å ha anticancer virkning, og data for forlengelse av levetiden for mus som var transplantert med P388-leukemiceller ble fremlagt.

Den biokjemiske virkning av 2-CdA i celler har vært gjennomgått av Ernest Beutler. (The Lancet (1992), 340:952-956 - som medtas heri under henvisning).

2',3'-dedeoksynukleosider fosforyleres ved 5'-stillingen i T-celler til dannelse av 5'-nukleotid trifosfat-derivater. Disse derivater er godt kjent for å være substrater for omvendt transkriptase-molekyler. (Ono et al. (1986) Biochem. Biophys. Res. Comm., 2:498-507).

Disse 2',3'-dideoksynukleosid-5'-trifosfater benyttes også av mammalsk beta og gamma DNA-polymeraser. (Waquar et al. (1984) J. Cell. Physiol., 121:402-408). De er imidlertid dårlige substrater for DNA-polymerase-alfa, det hovedenzym som er ansvarlig for både reparasjons- og replikativ DNA-syntese i humane lymfocytter. Disse egenskaper kan delvis forklare 2',3'-dideoksynukleosidenes selektive anti-HIV-virkning.

Chan et al. (1982) J. Cell Physiol., 111:28-32 studerte reaksjonsveiene for pyrimidin nukleotid-metabolisering i murine peritoneale makrofager og monocytter, og rapporterte

upåviselige nivåer av dioksycytidin kinase eller tymidin kinase i disse celler. Imidlertid ble det funnet høye nivåer av adenosin kinase.

Liknende høye nivåer av adenosin kinase har vært funnet i humane monocytter og humane moncyttavledede makrofager (MDM). MDM ble funnet å fremvise ca. 1/10 til ca. 1/4 av GEM T lymfoblasters (eks. ATCC CCL 119) nukleosid kinase-aktivitet overfor uridin, deoksycytidin og tymidin, og ca. 2/3 av GEM-cellers adenosin kinase-aktivitet. Dessuten var denne adenosin kinase-aktivitet for MDM-celler minst ca. 10 ganger høyere enn noen av de øvrige kinase-aktiviteter. Disse studier indikerte også forholdsvis lave nivåer av nukleosid fosforylering ved anvendelse av AZT, dideoksycytidin (ddC) og 2',3'-dideoksyadenosin (ddA) i intakte GEM T lymphoblaster og enda lavere nivåer med MDM.

Det er meldt om flere 2-substituerte adenosinderivater som ikke deamineres av adenosin deaminase. Eksempelvis rapporterte Coddington (1965) Biochim. Biophys. Acta, 99:442-451 at deoksyadenosin-1-N-oksid, såvel som 2-hydroksy-, 2-methyl-, 2-klor-, 2-acetamido-, og 2-methylthio-adenosiner hverken var substrater eller inhibitorer for adenosin deaminase. Montgomery, i Nucleosides, Nucleotides, and Their Biological Applications, Rideout et al. eds., Academic Press, New York, side 19 (1983) fremlegger en tabell for sammenliknende Km og Vmax-data for deaminering av adenosin, 2-halogen-adenosiner, 2-halogen-deoksyadenosiner og 2-fluor-arabinoadenosin som også indikerer at disse 2-halogen adeninderivater er svake substrater for enzymet sammenliknet med adenin i seg selv. Stoeckler et al. (1982) Biochem. Pharm., 31:1723-1728 rapporterte at 2'-deoksy-2'-azidoribosyl- og 2'-deoksy-2'-azidoarabinosyl-adeninderivater var substrater for human erythrocytisk adenosin deaminase, mens andres arbeid indikerte at 2-fluoroadenosin har neglisjerbar aktivitet med adenosin deaminase.

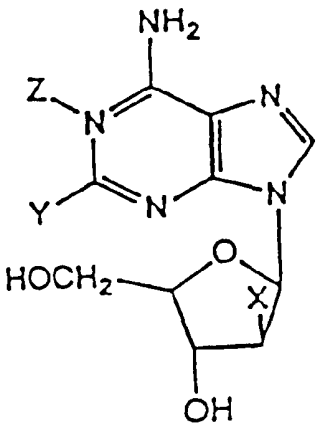
2-klor-2'-deoksyadenosin fosforyleres ved ikke-delende (normale) humant perifert blods lymfocytter og omdannes til 5'-trifosfater. Dette adeninderivat nedbrytes ikke signifikant av intakte humane celler eller celle-ekstrakter, og fosforyliseres effektivt av T-lymfocytter. (Carson et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:6865-6869).

Som diskutert tidligere er høye nivåer av adenosin kinase funnet i murine peritoneale makrofager og i humane monocytter. Adenosin kinase kan fosforylere 2'-deoksyadenosin

derivater, men gjør dette mindre effektivt enn deoksycytidin kinase. (Hershfield et al. (1982) J. Biol. Chem., 257:6380-6386).

Det beskrives i det følgende kjemoterapeutiske midler som kan benyttes som terapeutiske midler ved behandling av multippel sklerose.

Foretrukne substituerte adeninderivater som er egnet til behandling av multippel sklerose kan representeres av formel I som har en strukturformel svarende til:



- hvori Z er O eller fraværende,
- Y er et halogenatom, og
- X er et hydrogenatom.

Spesielt foretrukne forbindelser av formel I er frie for Z-gruppen, d.v.s. Z er fraværende, og de inneholder en halogen-gruppe i 2-posisjonen. Den mest foretrukne forbindelse er 2-klor-2'-deoksyadenosin .

Fremgangsmåte til syntetisering av alle de foranstående forbindelser er indikert i US-patent 5.106.837, som medtas heri under henvisning.

Den foreliggende oppfinnelse anviser at sykdomstilstanden for en pasient med multippel sklerose kan lettes ved administrering av en mengde av det i det foregående beskrevne preparat med en mengde av forbindelsen av formelen I som er tilstrekkelig til å frembringe en terapeutisk effektiv dose. Eksempelvise doseringer spenner fra ca. 0,04 til 1,0 mg/kg/dag, med doseringer på ca. 0,04 til 0,2 mg/kg/dag som de mest foretrukne. Typisk er mengden tilstrekkelig til å frembringe en konsentrasjon i pasientens plasma på ca. 0,5 nanomolar (nM) til ca. 50 nM, mer å foretrekke ca. 1 nM til 10 nM.

Med fordel tilsiktes det at det middel som benyttes i den foreliggende oppfinnelse er et 2-halogen-2'-deoksyadenosin (2-halogen-2'-deoksy-9,1'-beta-ribofuranosyladenin) , og mest å foretrekke er at halogengruppen er klor.

Et ytterligere aspekt som tilsiktes ved den foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelsen av subkutan injeksjon for administrering av en virksom mengde av den aktive bestanddel (middelet) ifølge oppfinnelsen til behandling av multippel sklerose.

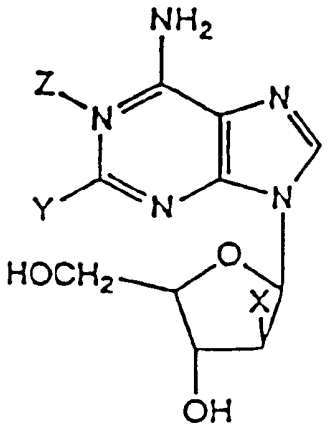
Et alternativt aspekt som tilsiktes den foreliggende oppfinnelse omfatter peroral administrering av en virksom mengde av den aktive bestanddel (middelet) ifølge oppfinnelsen i en fremgangsmåte til behandling av sykdom. Foretrukne forbindelser av formel I for oral administrering inkluderer forbindelser hvori X er fluor.

I hver av de i det foregående beskrevne fremgangsmåter blir det substituerte 2'-deoksyadenosinderivat administrert i en terapeutisk virksom mengde. Effekten av en forbindelse av formel I avhenger av administreringsveien og av tidspunkt og dosering. Dermed kan man skreddersy den dosering og varighet med hvilken en bestemt forbindelse administreres til sykdommens stadium og tilstanden for den pasient som behandles. Når stadiet av multippel sklerose er fremskredet eller livstruende, kan behandlingen være mer aggressiv, og en terapeutisk effektiv mengde er en mengde som er tilstrekkelig til å avlive minst 50 % av de foreliggende monocytter, men den er mindre enn den som i det vesentlige svekker benmargsfunksjonen slik den bestemmes ved vanlige prosedyrer under in vivo-administrering. Den monocytt-avlivende mengde av en forbindelse av formel I er et annet mål for en terapeutisk virksom dose og monocytt-død måles på et tidspunkt syv dager etter at administreringen begynner.

A. Forbindelser:

Den foreliggende oppfinnelse sikter mot anvendelsen av substituerte adeninderivater, d.v.s. substituert-2'-deoksy-arabinofuranosyladenin, til behandling av multippel sklerose.

Foretrukne substituerte adeninderivater har en struktur som representeres ved den følgende formel, d.v.s. formel I:



- hvori Z er et oksid-radikal (O) eller er fraværende,
- Y er et halogenatom , og
- X er et hydrogenatom .

Med fordel er Y klor.

Den foretrukne forbindelse som inkluderes i formel I er 2-klor-9,1'-beta-D-2'-deoksyribosyladenin, forøvrig kjent som 2-klordeoksyadenosin eller CdA.

Øvrige illustrerende forbindelser som inkluderes i formel I er:

2-brom-9,1'-beta-D-2'-deoksyribosyladenin;

2-fluor-9,1'-beta-D-2'-deoksyribosyladenin;

Ytterligere illustrasjoner på forbindelser av formel I inkluderer de følgende arabinofuranosyl-derivater av adenin:

2-fluor-9,1'-beta-D-2'-deoksyadenosin-1-oksid;

og

2-klor-9,1'-beta-D-2'-deoksyadenosin-1-oksid.

Det skal bemerkes at når X er hydrogen kan sukkerringen benevnes som et 2'-deoksyribosyl- eller 2'-deoksyarabinofuranosylradikal. Begge nomenklaturer benyttes heri. Når den forbindelsesklasse som omfattes av formel I diskuteres, betraktes alle forbindelsene heri som arabinosederivater. Når imidlertid spesifikke forbindelser av den underklasse hvor X = H diskuteres, benyttes den mer velkjente deoksyribose nomenklatur, slik som i deoksyadenosin. Disse forbindelser blir også heri på en enklere måte henvist til som adeninderivater.

I de ovenstående formler og i alle øvrige formler som vises heri blir de hydrogenatomer på purin- og furanosidylringer som ikke behøves for å vise oppbygningen rundt en bestemt binding ikke vist. Altså vises ikke adeninhydrogenet i 8-stillingen.

Det skal også bemerkes at D-isomerene av formlenes forbindelser er de tilsiktede isomerer. Det skal videre bemerkes at betegnelsen "halogen" som benyttes heri menes å skulle inkludere fluor-, klor- og bromderivater, og å ekskludere jod-derivater, hvilke er ustabile og dekomponerer, samt astatderivater som er radioaktive. Når det menes spesifikke halogenderivater er disse forbindelser spesifikt navngitt.

Ved anvendelse heri inkluderer "en substituent som er fri fra netto ioneladning" både ladede og uladede radikaler, og når substituent radikalet er ladet, foreligger det et internt amfotært ladningspar som resulterer i fraværet av en netto ioneladning for molekylet ved fysiologiske pH-verdier. N-oksid forbindelser er eksempler på slike substituenter.

De farmakologisk akseptable salter av en forbindelse av den ovenstående formel benyttes også. Uttrykket "farmakologisk akseptable salter" henviser ved anvendelse heri til ugiftige sure addisjonssalter som generelt fremstilles ved omsetning av en forbindelse med en egnet organisk eller uorganisk syre. Representative salter inkluderer saltsyrer, hydrobromid, sulfat, fosfat, sitrat, acetat, maleat og liknende.

B. <u>Preparater</u>:

En forbindelse av formel I som er oppløst eller dispergert i eller sammen med en farmakologisk akseptabel bærer utgjør et preparat ifølge den foreliggende oppfinnelse.

En forbindelse av formel I og dens farmakologisk akseptable salter benyttes i både kortsiktig og langsiktig behandling.
Selv om en forbindelse av formel I og dens farmakologisk akseptable salter kan administreres som det rene kjemikalium, foretrekkes det at det administreres som et farmasøytisk preparat. I alle fall administreres det i en mengde som er tilstrekkelig til å frembringe en terapeutisk virksom dose, noe som diskuteres i det følgende.

Altså benytter den foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk preparat som omfatter en terapeutisk virksom dose av en forbindelse av formel I eller et farmakologik akseptabelt salt derav, i det følgende henvist til som den "aktive bestanddel" eller "middelet", oppløst eller dispergert i en farmakologisk akseptabel bærer eller et fortynningsmiddel.

Et farmasøytisk preparat fremstilles ved en av de fremgangsmåter som er velkjente innen faget farmasy idet alle disse involverer at den aktive forbindelse og bæreren derav føres i forbindelse med hverandre. Til terapeutisk anvendelse kan en forbindelse som benyttes i den foreliggende oppfinnelse administreres i form av konvensjonelle farmasøytiske preparater. Slike preparater kan formuleres slik at de er egnet for oral, subkutan eller parenteral administrering, eller som suppositorier. I disse preparater blir middelet typisk oppløst eller dispergert i en fysiologisk tolererbar bærer.

En bærer eller et fortynningsmiddel er et materiale som er egnet for administrering av den aktive forbindelse og den/det må være "farmakologisk akseptabel" i betydningen av å være kompatibel(t) med preparatets øvrige bestanddeler og uskadelig overfor mottakeren derav. Ved anvendelse heri blir altså uttrykkene "fysiologisk tolererbar" og "farmakologisk akseptabel" benyttet om hverandre og henviser til molekylære enheter og preparater som ikke frembringer en allergisk eller liknende ubekvem reaksjon, slik som urolig mage, svimmelhet og liknende ved administrering til et pattedyr. Den fysiologisk tolererbare bærer kan ha et bredt utvalg former avhengig av den preparatform som ønskes for administrering og den tilsiktede administreringsvei.

Som et eksempel på et egnet preparat kan en forbindelse av formel I benyttes i væskepreparater slik som sterile suspensjoner eller løsninger, eller som isotoniske preparater inneholdende egnede konserveringsmidler. Spesielt velegnet til de foreliggende formål er injiserbare medier som utgjøres av vandige injiserbare isotoniske og sterile salt- eller

glukoseløsninger. Ytterligere væskeformer hvori disse forbindelse kan inkorporeres for administrering inkluderer smaksatte emulsjoner med spiselige oljer slik som bomullsførolje, sesamolje, kokosnøttolje, jordnøttolje og liknende, så vel som eliksirer og liknende farmasøytiske bærere.

Midlene kan også administreres i form av liposomer, slik det er velkjent innen faget, stammer liposomer generelt fra fosfolipider eller andre lipidsubstanser. Liposomer dannes ved mono- eller multilamellære hydratiserte væskekrystaller som er dispergert i et vandig medium. Et ugiftig, fysiologisk akseptabelt og metaboliserbart lipid som er i stand til å danne liposomer kan benyttes. De foreliggende preparater i liposomform kan inneholde stabilisatorer, konserveringsmidler, eksipienter og liknende i tillegg til middelet. De foretrukne lipider er fosfolipidene og fosfatidylkolinene (lecitinene), både naturlige og syntetiske.

Metoder til dannelse av liposomer er kjent innen faget. Se eksempelvis Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), side 33 et seq.

Et middel av formel I kan også benyttes i preparater slik som tabletter eller piller, fortrinnsvis inneholdende en doseenhet av forbindelsen. Til dette formål blandes middelet (den aktive bestanddel) med konvensjonelle tabletteringsbestanddeler slik som maisstivelse, laktose, sukrose, sorbitol, talkum, stearinsyre, magnesiumstearat, dikalsium-fosfat, gummier eller liknende materialer som ugiftige fysiologisk tolererbare bærere. Tablettene eller pillene kan lamineres eller på annen måte bygges opp til frembringelse av enhetsdoseringsformler som tilbyr forlenget eller forsinket virkning.

Det skal bemerkes at i tillegg til de førnevnte bærerbestanddeler kan den farmasøytiske formulering som beskrives heri etter som det passer inkludere en eller flere ytterligere bærerbestanddeler slik som fortynningsmidler, buffere, smaksstoffer, bindemidler, overflateaktive midler, tykningsmidler, smøremidler, konserveringsmidler (inklusive antioksidanter) og liknende, og stoffer som inkluderes med det formål å gjøre formuleringen isotonisk med den tilsiktede mottakers blod.

Tablettene eller pillene kan også være forsynt med et enterisk lag i form av et omslag som tjener til å motstå desintegrering i magen og tillater at den aktive bestanddel kan passere intakt inn i duodenum eller få en forsinket frigjøring. Et utvalg materialer som benyttes til

slike enteriske lag eller belegg, inklusive polymere syrer eller blandinger av slike syrer med slike materialer som skjellakk, skjellakk og cetyl-alkohol, celluloseacetat-ftalat og liknende. Et spesielt velegnet enterisk belegg omfatter en styren/maleinsyre kopolymer sammen med kjente materialer som bidrar til beleggets enteriske egenskaper. Metoder for produksjon av enterisk belagte tabletter er beskrevet i US-patent 4.079.125, som medtas heri under henvisning.

Betegnelsen "doseenhet" henviser ved anvendelse heri til fysisk diskrete enheter som er egnet som enhetsvise doseringer for administrering til pasienter, idet hver slik enhet inneholder en forutbestemt mengde av middelet som er beregnet å skulle frembringe den ønskede terapeutiske effekt i samband med det farmasøytisk akseptable fortynningsmiddel. Eksempler på egnede enhetsdoseringsformer i overensstemmelse med den foreliggende oppfinnelse er tabletter, kapsler, piller, pulverpakker, granuler, vafler, pulverkapsler, teskjeporsjoner, dråpetellerporsjoner, ampuller, flasker, segregerte multipler av en hvilken som helst av de foregående, og liknende.

Administrering av forbindelsen ved subkutan injeksjon er en spesielt attraktiv administreringsmodus p.g.a. denne administreringsmodus gunstige farmakokinetikk.

Oral administrering er også en attraktiv administreringsmodus. En ulempe som vanligvis følger med oral administrering av biologisk aktive nukleosidforbindelser er imidlertid deres potensielle dekomponering i magens sure betingelser. D.v.s. glukosidbindingen tenderer til å hydrolisere under sure betingelser.

Når det ønskes oral administrering benyttes imidlertid substitusjoner på 2-stillingen i adeninringen på forbindelsen av formel I sammen med en 2'-fluor-substituert arabinofuranosidylring.

Marquez et al. (1987) Biochem. Pharm., 36:2719-2722 meldte om fremstilling av 2'-fluor-2',3'dideoksyribose- og 2'-fluor-2',3'-dideoksyarabinose-derivativer av adenin. Deres funn fastslo at begge derivater var stabile ved en pH-verdi på 1 ved 37 °C, mens dedeoksyadenosin hadde en halveringstid på 35 sekunder under disse betingelser.

Et adeninderivats evnet til å være eller ikke være et substrat for adenosindeaminase er mer en funksjon av 2-substituenten eller mangel derav på molekylets adeninparti enn en funksjon av substituenter på det forbundne sukkerringparti, i det minste så lenge det gjelder substituentene på begge ringer heri.

C. **Behandling med preparat ifølge oppfinnelsen:**

Som tidligere bemerket siktes det heri til anvendelse av substituerte adeninderivater for fremstilling av preparater til behandling av multippel sklerose. I denne behandling blir en pasient som har multippel sklerose grovt sett behandlet med et preparat inneholdende en farmakologisk akseptabel bærer som oppløst eller dispergert deri, som aktiv bestanddel har et substituert adeninderivat (substituert 2'-deoksy-adenosin) hvis struktur svarer til den for den tidligere diskuterte formel I. Det substituerte adeninderivat foreligger i preparatet i en mengde som er tilstrekkelig til å frembringe en terapeutisk virksom dose i løpet av kontaktperioden. Behandlingen i det foregående gjentas typisk periodisk slik som ukentlig eller månedlig i løpet av et tidsrom på flere måneder inntil ca. et år.

Den mengde av en forbindelse av formel I som foreligger i et preparat og benyttes i en fremgangsmåte som beskrevet i det foregående er en funksjon av flere variable. Blant disse variabler er administreringsfremgangsmåten. Eksempelvise konsentrasjoner for forskjellige administreringsmodi illustreres i det følgende.

Når administreringen skjer in vivo, er den mengde som administreres mindre enn den som vesentlig svekker benmargsfunksjoner slik disse bestemmes ved hjelp av vanlige prosedyrer. En mengde som er tilstrekkelig til å avlive minst ca. 50 % av de monocytter som opprinnelig foreligger mens de ikke i det vesentlige svekker benmargsfunksjonen i løpet av middelets administreringsforløp er en måte å definere en terapeutisk dose.

Den foregående mengde av et 2'-deoksyadenin-derivat av formel I eller dets farmakologisk akseptable salt som foreligger i preparatet er også en mengde som er tilstrekkelig til å frembringe ca. 0,04 til 1,0 mg/kg kroppsvekt for det behandlede vertsdyr pr. dag, med større fordel ca. 0,04 til 0,20 mg/kg/dag, med enda større fordel ca. 0,05 til 0,15 mg/kg/dag og med størst fordel ca. 0,1 mg/kg/dag, når det gis in vivo. Denne mengde er en annen måte å definere en terapeutisk effektiv dose og den er spesielt velegnet når en forbindelse av formel I administreres ved infusjon.

Den molare plasmakonsentrasjon av forbindelsen av formel I eller de farmakologisk akseptable salter derav i løpet av behandlingen er med fordel i området ca. 1 nanomolar (nM) til ca. 100 nM, spesielt ca. 5 nM til ca. 50 nM, og med større fordel ca. 10 nM til ca. 20 nM. Molariteten av 2'-deoksyadeninderivatet i plasma av den pasient som behandles eller som det administreres til frembringer således nok et annet mål for en terapeutisk virksom dose hvorfra mengden i et preparat kan beregnes.

Det skal bemerkes at de terapeutisk virksomme doseringer i det foregående ikke behøver å være resultatet av en enkelt administrering, og de er vanligvis resultatet av administreringen av et antall doseenheter. Disse doseenheter kan i sin tur omfatte porsjoner av en daglig eller ukentlig dosering, og således bestemmes den terapeutisk virksomme dose i løpet av behandlingstiden (kontakttiden).

Oral administrering og subkutan injisering er foretrukne administreringsmodi, som allerede bemerket. For å oppnå den ønskede plasmakonsentrasjon av middelet, kan det benyttes en rekke doser som avhenger av den spesifikke administreringsmodus, den bestemte behandlings formål, den bestemte forbindelse som benyttes og liknende betraktninger.

Eksempelvis kan den daglige dose for oral administrering være ca. 0,04 til 1,0 mg/kg kroppsvekt, med større fordel ca. 0,04 til 0,20 mg/kg/dag, med enda større fordel ca. 0,05 til 0,15 mg/kg/dag, og med størst fordel ca. 0,1 mg/kg kroppsvekt. Generelt kan mengden virksom substituert adeninderivat som administreres variere over et forholdsvis bredt område til oppnåelse og med fordel opprettholdelse av den ønskede plasmakonsentrasjon.

Enhetsdoseringsformel av adeninderivatet kan inneholde ca. 0,1 til 15 mg derav. En foretrukken enhetsdoseringsform inneholder ca. 0,1 til 1 mg middel og kan administreres 2 til 5 ganger pr. dag. Imidlertid skal det bemerkes at kontinuerlig infusjon ved en hastighet som er utformet for å skulle opprettholde den i det foregående beskrevne plasmakonsentrasjon også tilsiktes.

Varigheten av en bestemt behandling kan også variere, avhengig av sykdommens alvorlighetsgrad, hvorvidt behandlingen er ment for en akutt manifestasjon eller for profylaktiske formål og liknende betraktninger. Typisk administrering varer i et tidsrom på ca.

5 til 14 dager, hvor et tidsforløp på 7 dager er vanlig. Administreringsforløp (-sykler) kan også gjentas med månedlige intervaller, eller parenterale enhetsdoseringer kan tilføres med ukentlige intervaller. Orale enhetsdoseringer kan administreres med intervaller på en til flere dager til frembringelse av den bestemte terapeutisk virksomme dose. Altså frembringer in vivo-administrering av en i det foregående diskutert dosering i løpet av et tidsrom på ca. 5 til 14 dager eller ved ukentlige eller daglige intervaller en mengde som er tilstrekkelig til å avlive minst ca. 50 % av de opprinnelig tilstedeværende monocytter.

Denne behandlingsfremgangsmåte frembringer en minskning i moncyttnivået i blodet p.g.a. giftigheten av de anvendte forbindelser av formel I overfor monocytter. Denne fremgangsmåte kan benyttes for å redusere det antall monocytter som sirkulerer i et behandlet pattedyrs blodstrøm med ca. 90 % av det antall som foreligger forut for behandlingen i løpet av en 7 dagers behandlingsperiode hvor nivået av sirkulerende monocytter vender tilbake til nivåene før behandling ca. to uker etter at behandlingen stoppes. Denne eksempelvise studie illustreres i det følgende.

Et mindre aggressivt behandlingsregime tilsiktes derfor også. Her benyttes igjen en tidligere beskrevet dosering, d.v.s. plasmakonsentrasjon, men i løpet av et kortere kontakttidsrom slik at monocyttfunksjonen svekkes, men monocyttene i det vesentlige ikke avlives, slik resultatet er av det tidligere diskuterte behandlingsregimet. Svekkelse av monocyttfunksjonen defineres heri som en reduksjon av minst ca. 25 % i den spontane sekresjon av interleukin-6 (IL-6) av monocytter som dyrkes i nærvær av en forbindelse av formel I i løpet av et tidsrom på 72 timer. Et egnet assay for monocyttsvekkelse diskuteres i det følgende.

I et eksempelvis behandlingsregime administreres en forbindelse av formel I i en mengde på ca. 0,04 til 1,0 mg/kg/dag, med fordel ca. 0,04 til 0,20 mg/kg/dag, med enda større fordel ca. 0,05 til 0,15 mg/kg/dag og med størst fordel ca. 0,1 mg/kg/dag. Slike behandlinger frembringer typisk en plasmakonsentrasjon på ca. 0,5 nM til 50 μM, og med større fordel ca. 10 nM til 10 μM. Denne enkeltstående administrering gjentas periodisk slik som ukentlig i løpet av et tidsrom på flere måneder, eksempelvis ca. tre til ni måneder. I vanlig praksis administreres behandlingene i løpet av en periode på ca. fem til syv dager og de gjentas med ca. tre til fire ukers intervaller i flere måneder, eksempelvis ca. tre til ni måneder.

En slik administrering kan utføres på utpasientbasis for humaner ved anvendelse av en intravenøs infusjon som varer ca. 2 til 4 timer, på et legekontor. Som sådan er behandlingen betydelig mindre påtrengende enn en kontinuerlig infusjon i løpet av en periode på flere dager, hvilket vanligvis krever et sykehusopphold for vertsdyret, d.v.s. den humane pasient. En mindre påtrengende kontinuerlig infusjonsmetode som benytter en pumpe tilknyttet et kateter som automatisk infuserer en forutbestemt dose tillater at pasienten er ambulerende under infusjonen.

En av de tidligere diskuterte fremgangsmåter kan utføres mens pasienten fortsetter terapi med et tidligere medikament eller tidligere medikamenter, eller etter avslutning av slik tidligere behandling. Når en pasient fjernes fra en tidligere, endog delvis effektiv behandling, opptrer det noen ganger en oppblussing (eksacerbasjon) av symptomer, noe som typisk avtar etter flere måneder. Dessuten, når et tidligere behandlingsregime stoppes opp mens en fremgangsmåte som i det foregående praktiseres, kan denne tidligere behandling fortsettes etter avslutning av en fremgangsmåte som i det foregående, ofte med ganske positive resultater.

Doseringsplaner og -protokoller for administrering av 2-klordeoksyadenosin for behandling av pasienter med sykdomstilstander utover multippel sklerose har vært gjennomgått i litteraturen. (Ernest Beutler (1992), The Lancet, 340:952-956). I en første tilnærmelse er farmakokinetikken for 2-klordeoksyadenosin og dens effekt på monocyttnivåer uavhengig av den sykdomstilstand som behandles.

D. Forbindelsessyntese:

En anvendbar forbindelse heri hvor Z er fraværende kan fremstilles ved å kondensere et egnet substituert adenin direkte med en egnet substituert sukkerring, som ved de teknikker som er beskrevet i Montgomery et al., (1986) J. Med. Chem., 29:2389-2392, ved den metode som er anvist i US-patent 4.082.911, eller som beskrevet i henvisningen Herdewijn et al. (1987) J. Med. Chem., 30:2131-2137, hvis beskrivelse medtas heri under henvisning. Et egnet substituert adenin kan fremstilles ved å følge rapporterte litteratursynteser eller analoge synteser. Videre fremstilte Wright et al. (1987) J. Org. Chem., 35:4617-4618 nylig 2-klor- og 2-brom-2'-deoksyadenosiner ved direkte kontakt mellom det egnede 2,6-dihalogenpurin med et 3',5'-beskyttet-alfa-1-kloribose ved anvendelse av natriumhydrid i acetonitril, fulgt av behandling med metanolisk ammoniakk ved 60 °C til avbeskyttelse av de resulterende 3',5'-

hydroksyler og danne det endelig produserte adenosins 6-amino-gruppe. Fukukawa et al. (1983) Chem. Pharm. Bull., 31(5):1582-1592 meldte også syntese av 2'-deoksy-2'-arahalogen-substituerte adenosinderivater.

Adenosin-1-N-oksid-gruppen av forbindelser, d.v.s. hvor Z foreligger, er av spesiell interesse siden disse materialer i seg selv ikke tenderer til å inkorporeres i en voksende polynukleotid-kjede fordi tilstedeværelsen av N-oksid-gruppen trolig interfererer med hydrogenbindingen i løpet av denne syntese. Derimot antas det at N-oksid-forbindelser reduseres ved en endogen reduktase forut for deres inkorporering i og terminering av den voksende kjede.

Ikke desto mindre kan N-oksid-forbindelsene, idet de mangler en netto ioneladning, men innehar et internt amfotært ladningspar, trenge gjennom cellemembraner. Disse forbindelser er også noe mer vannløselige enn de tilsvarende ikke-oksyderte forbindelser.

Uten ønske om å være bundet av en teori, antas det ikke desto mindre at N-oksid-forbindelsene kommer inn i cellen og fosforyleres, idet rapporten om slik fosforylering i Lindberg et al. (1967) J. Biol. Chem., 242:350-356 tas i betraktning. Et reservoar av slike derivater opprettholdes infracellulært inntil det tidspunkt hvor N-oksid-funksjonen reduseres og nukleotidet inkorporeres for å terminere den egnede, voksende polynukleotid-kjeden.

1-N-oksid-forbindelsene fremstilles enkelt ved metoden til Klenow et al. (1961) Biochim. Biophys. Acta, 52:386-389, med lett modifikasjon som diskutert i det følgende.

Eksempel 1

Behandling av multippel sklerose med CdA

En studie av fire pasienter med kronisk multippel sklerose ble iverksatt. Hver pasient ble først undersøkt med hensyn på normale hepatitiske, renale og benmargsfunksjoner for å etablere basislinjeverdier. Hver av pasientene ble deretter behandlet med CdA oppløst i sterilt isotonisk saltvann uten konserveringsmiddel. CdA ble administrert intravenøst med en dose på 0,1 mg/kg hver dag i totalt syv dager. Hver pasient mottok seks forløp med intravenøst terapi, ett pr. måned i totalt seks måneder. Pasientene ble undersøkt daglig under sykehusopphold. I løpet av dette tidsrom ble det utført daglige blodtellinger og

blodkjemiundersøkelser to ganger ukentlig for hver pasient. CdA-nivåer ble også målt i blod og spinalvæske.

Hver av disse pasienters nevrologiske funksjon ble målt ved anvendelse av den ekspanderte Krutzke sykdomsstatusskala (EDSS), og Scripps nevrologiske bedømmelsesskala (SNRS).

Det forekom ingen indikasjon på signifikante giftige bivirkninger. Ingen av de fire pasienter fremviste noen kvalme, oppkast, hudutslett, eller hepatitisk eller renal dysfunksjon. Hver av pasientene utviklet lymfopeni (reduksjon i lymfocyttnivået i blodet), med absolutte lymfocytt-tall redusert med 0,5 til ca. 10 % i mer enn et år.

Monocyttnivåene sank etter hver behandling. Eksempelvis falt monocyttnivået i en pasient 40 % etter den første behandling, og de var i det vesentlige fraværende etter hver av de gjenstående fire behandlinger. For en annen pasient ble monocyttene fraværende etter to behandlinger, og ble utslettet med 85, 50, 40 og 73 % etter de øvrige fire behandlinger.

I noen tilfeller forekom leukopeni (reduksjon i nivået av samlede hvite blodceller). Det var også en beskjeden makrocytose i alle pasienter og denne varte i seks til åtte måneder etter avslutning av behandlingen. Imidlertid forble alle fire pasienters blodplatetall innen det normale området. I det vesentlige var det intet tegn på giftighet i disse fire pasienter med normale benmargs-, hepatitiske og renale funksjoner. Likeledes var bivirkninger av CdA upåviselige i disse fire pasienter.

Måling av nevrologisk funksjon ved anvendelse av EDSS- og SNRS-skalaene frembrakte indikasjoner på forbedring i alle fire pasienter i løpet av behandling av CdA. Cerebrospinalvæskestudier (CSF) viste en markert senkning i lymfocyttall og, ganske bemerkelsesverdig, fullstendig bortfall av IgG-oligoclonale bindinger i alle tilfeller. Det fantes ingen signifikant endring i total CFS IgG.

Spesielt demonstrerte SNRS-data mellom 5 og 50 % forbedring fra basislinjeverdier før behandling i alle pasienter. En av de fire pasienter var fullstendig sengeliggende ved begynnelsen av behandlingen, og denne pasient var i stand til å gå ved hjelp av en gåstol ved avslutningen av behandlingen. Alle pasienter meldte om subjektive følelser av forbedret energi og utholdenhet.

Eksempel 2

Behandling av multippel sklerose med CdA

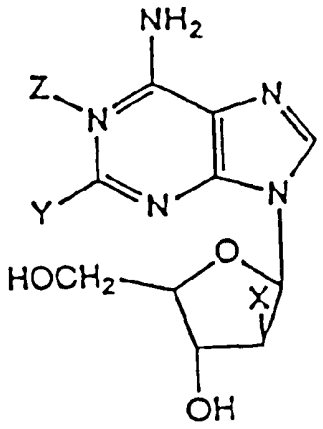
Den i eksempel 1 i det foregående indikerte studie som involverte fire pasienter ble deretter forstørret. En dobbelt blind placebostudie som involverte 50 pasienter ble utført for ytterligere å demostrere effektiviteten av 2-CdA for behandling av multippel sklerose. Doseringsplanene og -protokollene for denne andre studie liknet eller var i det vesentlige de samme som de doseringsplaner og -protokoller som ble benyttet i eksempel 1. De samme to nevrologiske bedømmelsesskalaer ble benyttet, d.v.s SNRS-skalaen og EDSS-skalaen. 28 pasienter ble testet med SNRS-skalaen, 23 pasienter ble testet med EDSS-skalaen. SNRS-skalaen er i det vesentlige mer følsom en EDSS-skalaen. De nyeste tilgjengelige dato indikerer at en høy grad signifikant forbedring (p=0,0004) ble observert i pasienter som ble behandlet med 2-CdA sammenliknet med placebo i de 28 pasienter som ble testet med hensyn på endringer i SNRS-skalaen.

Tabell I			
Endringer i SNRS			
	Absolutt		Relativ
CdA	4,83 ± 5,71		0,076 ± 0,089 (N=14)
Placebo	-4,40 ± 5,14		-0,062 ± 0,071 (N=14)
	p=0,0004		p=0,0005
Endringer i EDSS			
CdA	-0,018 ± 0,222		-0,011 ± 0,081 (N=12)
Placebo	0,038 ± 0,9233		0,039 ± 0,240 (N=11)
	p=0,84		p=0,50
SNRS	0	100	
EDSS	10	1	
	Verst	Best	

PATENTKRAV

* * ** * ** * *

1. Anvendelse av substituert adeninderivat med formelen:



eller et farmakologisk akseptabelt salt derav hvor Z er O eller fraværende, Y er et halogenatom, og X er et hydrogenatom, for fremstilling av et farmasøytisk preparat for behandling av multippel sklerose.

2. Anvendelse i samsvar med krav 1, hvori Z er fraværende og Y er en halogenatom.

3. Anvendelse i samsvar med krav 1, hvori det substituerte adenin er 2-klor-2'-deoksyadenosin.

4. Anvendelse ifølge kravene 1 til 3, hvori medikamentet er i form av subkutant injiserbart medium.

5. Anvendelse ifølge kravene 1 til 3, hvori medikamentet er i form av intravenøs infusjon.

6. Anvendelse ifølge kravene 1 til 3, hvori medikamentet er i form av kapsler, pulver eller granulat, i form av tabletter eller piller som kan forsynes med et enterisk skikt. i

form av stikkpiller, i form av oppløsninger, suspensjon eller eliksir i form av fettstoffer.