(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

221 813 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 94 02830
(22) A bejelentés napja: 1993. 03. 25.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
9207437.6 1992. 04. 03. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/FI 93/00119
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 93/19746

(40) A közzététel napja: 1995. 11. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2003. 01. 28.

(51) Int. Cl.[7]

A 61 K 31/135
A 61 K 9/70
A 61 P 35/00

(72) Feltalálók:
Degregorio, Michael William, San Antonio, Texas (US)
Kurkela, Kauko Oiva Antero, Turku (FI)

(73) Szabadalmas:
Orion-Yhtymä Oy, Espoo (FI)

(74) Képviselő:
Baranyi Éva, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) Toremifent és metabolitjait tartalmazó transzdermális készítmény

KIVONAT

A találmány tárgya transzdermális készítmény, amely hatóanyagként toremifent vagy valamely metabolitját, N-demetil-toremifent {4-klór-1,2-difenil-[4-[2-(N-metil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy 4-hidroxi-toremifent {4-klór-1-(4-hidroxi-fenil)-2-fenil-1-[4-[2-(N,N-dimetil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy ezek valamely gyógyászatilag alkalmazható, nem toxikus sóját és egy vagy több gyógyászatilag alkalmazható vivőanyagot tartalmaz.

A készítmény bőrben lokalizált rák kezelésére, továbbá mellráknál adjuváns kezelésre és a ráksejtek citotoxikus hatóanyagokkal szembeni multidrog-rezisztenciája megfordítására használható.

HU 221 813 B1

A találmány transzdermális készítményekre vonatkozik, amelyek hatóanyagként toremifent vagy valamely metabolitját, N-demetil-toremifent {4-klór-1,2-difenil-[4-[2-(N-metil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy 4-hidroxi-toremifent {4-klór-1-(4-hidroxi-fenil)-2-fenil-1-[4-[2-(N,N-dimetil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy ezek valamely gyógyászatilag alkalmazható, nem toxikus sóját tartalmazzák. Ezeket a transzdermális készítményeket például bőrben található rák vagy a bőrtől kis távolságra található rák, például mellrák metasztázisos sebei kezelésére, ezenkívül mellrák adjuváns kezelésére, valamint a ráksejtek citotoxikus hatóanyagokkal szemben mutatott multidrog- (több hatóanyaggal szembeni) rezisztenciájának megfordítására lehet használni. A toremifen és metabolitjai transzdermális adagolása különösen jelentős melanoma, limfóma, Kaposi-szarkóma és fungoid mycosis kezelésére.

A találmány a toremifen és metabolitjai, valamint nem toxikus, gyógyászatilag alkalmazható sóinak alkalmazását is magában foglalja a fentiek szerinti gyógyszerkészítmények előállítására.

A toremifen ismert hatóanyag, előállítását lásd például a 4 696 949 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban.

A tamoxifen és toremifen trifenil-etilén antiösztrogén, amelyet ösztrogénreceptor-pozitív mellrák kezelésénél alkalmaznak. Ezeket a hatóanyagokat írják elő leggyakrabban endokrin hatóanyagként mellrák kezelésénél. A tamoxifen és a toremifen a tumor-ösztrogénreceptorok (ER) kompetitív antagonizmusa útján gátolja az ösztrogén által kiváltott növekedést. Az antiösztrogénterápia hatékony a betegségmentes állapot meghosszabbításában, és megnöveli a nők átlagos túlélési idejét is az elsődleges sebészi beavatkozást követően. Az antiösztrogénterápia késlelteti a visszaesést, és megnöveli a túlélési időt azon primer mellrákban szenvedő betegeknél, akik a mell eltávolítása után kiegészítő terápiában részesülnek. Az ösztrogénreceptor (ER)-pozitív metasztázisos rákban szenvedő betegek kb. kétharmad részénél átmeneti javulás figyelhető meg tamoxifen adagolására. Bár a tamoxifent általában viszonylag jóindulatú hatóanyagnak tekintik, a közelmúltban mégis olyan tapasztalatokat nyertek, amelyek szerint a tamoxifent, mint kiegészítő terápiát szedő nőknél valószínűleg megnövekszik a méhnyálkahártyadaganat-képződés kialakulásának veszélye (lásd Fornander T. és munkatársai, Lancet 1989, 21: 117–120). A szövettani vizsgálatok szerint ezek a daganatok beszűrődő méhnyálkahártya-daganatok, és nincsenek kapcsolatban a mellrákmetasztázissal. Egyelőre nem tudjuk megmagyarázni, melyek azok a tényezők, amelyek miatt ez a veszély megnövekszik. Számos tanulmány foglalkozik azonban a méhnyálkahártyarák és az ösztrogén hatású szerek közötti összefüggéssel (lásd Smith DC és munkatársai, N. England J. Med. 1975; 293: 1164–67).

Az egyik fő mechanizmus, amellyel a rák ellenáll a kemoterápiai hatóanyagoknak, főként az antraciklineknek és a vinka-alkaloidáknak, az úgynevezett multidrogrezisztencia (MDR) kialakulása. A klasszikus MDR kapcsolatba hozható egy mdr–1 gén felülexpresszálásával, amely egy plazmamembrán-P-glikoprotein (p170) kódolója. Feltételezések szerint az mdr–1 gén expresszálása kapcsolatban van a hatóanyag sejtben való felhalmozódásának csökkenésével egy hatóanyagfüggő elfolyómechanizmus révén.

Bár több hatóanyag, például a verapamil, a trifluoperizinek és a ciklosporinok in vitro multidrogrezisztencia-csökkentőnek mutatkoztak, a legtöbb szer esetén az in vitro koncentráció, amelynél még nem tapasztalható jelentős toxicitás a beteg számára, nem elég magas ahhoz, hogy visszafordítsa a multidrog-rezisztenciát. Ez különösen igaz a verapamin esetén, amelyről ismert, hogy jelentős kardiotoxicitása van.

Ismert, hogy a nem szteroid trifenil-etilén antiösztrogén hatású anyagok in vitro kémiai érzékenyítő hatásúak, amely valószínűleg független az antiösztrogén hatásuktól. A toremifen és metabolitjai, az N-demetil-toremifen és a 4-hidroxi-toremifen azon új trifenil-etilén-származékok közé tartozik, amelyek MDR-pozitív sejtekben kémiai érzékenyítő hatásúak, olyan koncentrációknál, amelyek az embernél lényeges toxicitás nélkül elérhetők. A toremifen egyedülinek tűnik abban, hogy az a koncentráció, amely in vitro képes a rezisztencia meggátlására (5 μmol) orális terápia után is elérhető lényeges toxicitás nélkül (lásd Wiebe VJ és munkatársai, Cancer Chemother. Pharmacol., 1990, 25: 247–251). A nagy orális dózis utáni toremifen- és N-demetil-toremifen-koncentráció a plazmában 10 μmol nagyságrendű. A plazmában lévő koncentráció azonban nem mindig jelenti a hatékony MDR elleni aktivitást a daganatban. Habár a nagy dózisú (400 mg/nap) toremifen szisztemikus toxicitása általában szédülésre, hányingerre és hőhullámra korlátozódik, az egyéb citotoxikus hatóanyagokkal alkalmazott kombinációs terápiával enyhíthető a szisztemikus toxicitás.

Ezért a toremifen vagy metabolitjai daganatban található koncentrációjának növelésére szolgáló módszerek a szisztemikus toxicitás egyidejű minimálisra szorításával javíthatják az ezen hatóanyagokkal elérhető MDR-ellenes terápia hatékonyságát.

Felismertük, hogy a toremifen és metabolitja transzdermálisan adagolva alkalmazhatók arra, hogy a daganatban nagyon magas helyi koncentrációkat érjünk el a szisztemikus toxicitás veszélyei nélkül. A toremifen és metabolitjai transzdermális készítményei felhasználhatók a bőrben vagy a bőrtől kis távolságra lévő rákok kezelésére, mint amilyenek például a melanoma, a limfóma, a Kaposi-szarkóma, a fungoid mycosis és a mellrák lokalizált metasztázisos sebei. Ezenkívül a transzdermális adagolás hatékony módszert is jelenthet a mellrák visszatértének megelőzésében erősen veszélyeztetett betegeknél, miközben a méhnyálkahártya-daganatok és a szisztemikus toxicitás veszélye minimálisra csökken.

A toremifen és metabolitja transzdermális adagolását két fő módon végezhetjük: i) úgy, hogy a gyógyhatású anyagot vagy nem toxikus gyógyászatilag alkalmazható sóját megfelelő gyógyszerészeti vivőanyagokkal és adott esetben penetrációt elősegítő anyagokkal összekeverjük és kenőcsöket, emulziókat, oldatokat,

krémeket, géleket vagy hasonló gyógyszerkészítményeket állítunk elő, és előnyösen ebből a készítményből egy bizonyos mennyiséget a bőr egy bizonyos részére felviszünk, vagy ii) úgy, hogy a gyógyhatású anyagot tapaszokba vagy transzdermális egyéb hatóanyag-leadó rendszerekbe dolgozzuk be ismert módon.

A megfelelő vivőanyagok közül példaként megemlítjük a topikális készítmények előállítására a gyógyszerészetben jól ismert anyagokat, például a DMSO-t, növényi vagy állati olajokat, nem illékony zsíralkoholokat, savakat, észtereket, például a cetosztearil-alkoholt és cetil-alkoholt; illékony alkoholokat, például az etanolt vagy az izopropanolt; glikolokat és glikolétereket, polietilénglikolt, polipropilénglikolt, glicerint és glicerin-étereket, a cellulózszármazékokat, például a metil-cellulózt vagy a karboxi-metil-cellulózt. Emulgeálószereket, például szorbitán-sztearátot vagy poliszorbát 60-at, valamint konzerválószereket és penetrációt elősegítő szereket, amelyek a szakirodalomból jól ismertek, ugyancsak alkalmazhatunk.

A toremifen és metabolitjai vizes közegben tapasztalható oldhatósági tulajdonságai lényegesen javíthatók, ha a hatóanyagot ciklodextrinnel komplexbe visszük. A ciklodextrinek (beleértve az α-, β- és gamma-ciklodextrint és származékaikat) ciklikus glükózoligomerek. A ciklodextrinek zárványos komplexeket alkothatnak a hatóanyagokkal, amelyekben a hatóanyagmolekula a ciklodextrinmolekula lipofil anyagokat befogadó üregeiben található. A ciklodextrin ezért hatékonyan szolubilizálja a lipofil hatóanyagokat a vizes közegben. A ciklodextrinek gyógyszeripari alkalmazása jól ismert (lásd például a Drug Development and Industrial Pharmacy, 17 (11), 1503–1549, 1991 irodalmi helyen).

A toremifen és metabolitjaiból alkalmazandó dózis a megelőző-kisegítő terápiához embernél 1–200 mg/nap/személy a hatóanyag biohasznosulása függvényében. Az előnyös dózis adjuváns terápia esetén orálisan 60 mg/nap, vagy heti egyszeri 300–500 mg/tapasz. Rövid ideig tartó, nagy dózisú toremifen- vagy toremifenmetabolit-terápia esetén a napi dózis 400–1000 mg, előnyösen 500–600 mg/nap.

Találmányunkat a következőkben példákkal illusztráljuk.

Az 1. kísérleti példában toremifen és metabolitjai szövetben való eloszlását vizsgáljuk rövid ideig tartó, nagy dózisú transzdermális, illetve intraperitoneális (ip.) adagolás esetén egerekkel, vizsgáljuk továbbá toremifen és metabolitjai egyszeri transzdermálisan, illetve ip. adagolással történő dózisa után az antiösztrogéndózis szöveti eloszlását.

A 2. kísérleti példában toremifen és metabolitjai hatékonyságát vizsgáljuk mellrák-tumornövekedés megakadályozására egereknél transzdermális adagolás után.

A 3. kísérleti példában nagy dózisú, transzdermálisan adagolt toremifen hatékonyságát vizsgáljuk doxorubicin citotoxicitásának erősítésére MDR-tumorokban egérnél.

A 4. kísérleti példában toremifen és metabolitjai hatékonyságát vizsgáljuk transzdermális adagolás után limfómanövekedés megakadályozására babuinnál.

Az 5. kísérleti példában toremifen szöveteloszlását vizsgáljuk transzdermális adagolás után *Monodelphis domestica*-nál és vizsgáljuk a toremifen citosztatikus hatását melanoma-sejtvonalakban.

Leírásunkhoz a következő rajzokat csatoljuk:

Az 1. ábrán a transzdermális és intraperitoneális toremifennel kezelt egerekből kivágott tumorokon végzett klónozási vizsgálatok eredményét mutatjuk be.

A 2. ábrán a transzdermális toremifennel kezelt és kezeletlen egérből kivágott tumorokon végzett klónozási vizsgálatok eredményét ábrázoljuk.

A 3a. ábrán a transzdermális toremifennel kezelt jobb oldali lágyéklimfómával kapott eredményeket, és

a 3b. ábrán a kezeletlen bal oldali lágyéklimfómával kapott eredményeket mutatjuk be babuinnál.

1. példa

16, nőnemű, csecsemőmirigy nélküli szőrtelen egérnek 20-as fecskendővel szubkután a bal lapockaterületre 5×10^6 MDA A–1 sejtet injektálunk. A daganatot 3 hétig hagyjuk növekedni a kezelés előtt.

Ip. adagoláshoz toremifen-citrátot szuszpendálunk földimogyoró-olajban. Három egérnek ip. 18-as fecskendővel 50 µl-t injektálunk 5 napon át, 1 mg/nap dózist alkalmazunk. Topikálisan a toremifent DMSO/EtOH/metil-cellulóz/víz 10:25:7:58 arányú elegyében adagoljuk 5 napig, 2,5 mg/állat/nap dózisban. Először a toremifen-citrátot DMSO-ban feloldjuk, majd az elegyet etil-alkohol, metil-cellulóz és víz keverékével hígítjuk. A kezelés 5. napján valamennyi egeret elöljük a végső dózis adagolása után 2 órával. Vérmintát gyűjtünk kapillárispipettával a hónalji véredények felszakítása után és a mintát heparines centrifugacsövekbe helyezzük. Az agyat, a májat és a méhet sebészeti úton távolítjuk el, ezeket külön kémcsövekbe tesszük.

Az egyszeri dózisban a toremifent ip. adagoljuk a fentiek szerint, vagy transzdermálisan DMSO/EtOH/metil-cellulóz/víz hígítószerekkel keverve. Az ip. vagy transzdermálisan adagolt toremifendózis 500 µg. A szövetmintákat a fentiek szerint készítjük el.

A vérmintákat 1000 g-vel centrifugáljuk. A plazmát összegyűjtjük, megmérjük térfogatát és átlátszó extrakciós kémcsövekbe helyezzük. A többi szövetmintát megmérjük, extrakciós csövekbe helyezzük és belső standarddal a nafoxidinnel együtt kromatográfiás eljárással vizsgáljuk. A szöveteket gondosan homogenizáljuk 6 ml extrakciós folyadék hozzáadása előtt. A mintát kinyerjük és a fentiek szerint megszárítjuk. Az egyes mintákat 200 µl metanollal együtt injektáljuk a HPLC-kolonnára. A mintákat UV-aktiváláshoz kvarcpipettába helyezzük. Az agymintákat eldobható fecskendőszűrőn le kell szűrni. A toremifenkoncentrációt minden mintánál a standardgörbéhez viszonyítva számítjuk.

A toremifent és metabolitjait nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással (HPLC) határozzuk meg.

A következő eredményeket kapjuk: Az 1. táblázatban feltüntetett eredményekből látható, hogy a transzdermálisan kezelt tumorokban a toremifenkoncentráció 150-szer nagyobb, és közben a szérumkoncentráció alacsonyabb, mint intraperitoneális adagolás esetén 2,5-szer nagyobb dózisnál. Ez azt jelzi, hogy a transzdermális adagolás farmakológiai szempontból lényegesen előnyösebb. Érdekes megjegyezni, hogy a transzdermális toremifenkezelésben részesült egereknél a méhben tapasztalt koncentráció egytizede az ip. toremifenkezelésben részesült egerekének. A transzdermálisan kezelt egerek májában is alacsonyabb toremifenkoncentrációt mértünk, amiből az következik, hogy kisebb a szisztemikus eloszlás. Az agyszövetekben összemérhető toremifenkoncentrációt kaptunk.

A 2. táblázatból látható, hogy a transzdermálisan kezelt tumorokban nagyobb az N-demetil-toremifenkoncentráció is, miközben a szérumkoncentráció alacsonyabb. Ez azt mutatja, hogy az MDA A–1 daganatsejtek a toremifen metabolizálására képesek. A májban nem tapasztaltunk lényeges eltérést az intraperitoneálisan és a transzdermálisan kezelt tumorok esetén. A transzdermálisan kezelt egerek agyában és májában szintén kisebb N-demetil-toremifen-koncentrációt mértünk, mint az intraperitoneálisan kezelt csoportnál.

A 3. táblázatból látható, hogy a transzdermálisan kezelt tumorokban a transz-4-hidroxi-toremifen-koncentráció nagyobb, mint az ip. kezeltben. Ez a metabolit a leghatékonyabb antiösztrogénmetabolit. A transzdermálisan kezelt tumoroknál a szérumkoncentráció alacsonyabb, míg az agyban a koncentrációk azonosak.

Megvizsgáltuk a toremifenkoncentrációt in vitro vizsgálatban is MCF–7 ER+ sejtekben, hatékony antiösztrogén hatóanyagdózisnál, és ezeknek a vizsgálatoknak az eredményeit összehasonlítottuk a fentiekben ismertetett in vivo eredményekkel. A sejteket 20 órán keresztül 6,6 μmol toremifennel inkubáltuk, majd mostuk, megszámoltuk, lemértük és HPLC-eljárással meghatároztuk a sejt-toremifen-koncentrációkat. A toremifenkoncentrációt μg/mg-ban a 4. táblázatban tüntetjük fel.

Ha összehasonlítjuk a toremifenkoncentrációkat a daganatban transzdermális és intraperitoneális adagolás után, akkor azt tapasztaljuk, hogy a legnagyobb koncentrációk topikális toremifenadagolás után figyelhetők meg. Transzdermális adagolás után a toremifenkoncentráció több mint 7-szerese az in vitro kísérletben kapott eredménynek, és több mint 150-szerese az intraperitoneális injektálás utáni koncentrációnak. Az eredményekből az következik, hogy a toremifenkoncentráció szubkután tumorok esetén könnyen elérhető transzdermális adagolással, míg intraperitoneális adagolás esetén a tapasztalt koncentráció az in vitro felvett mennyiség 1/20-ad része, ebből a transzdermális terápia további kinetikai előnyeire lehet következtetni.

Az 5. táblázatban tüntetjük fel az egyszeri 500 μg-os intraperitoneális és 500 μg-os transzdermális úton adagolt dózis esetén kapott toremifenkoncentrációkat. Hígítószerként DMSO-t és metil-cellulózt használtunk. A két transzdermális adagolás után hasonló koncentrációt kaptunk a daganatban, mint az intraperitoneális adagolás esetén, de itt sokkal kisebb volt a szisztemikus eloszlás. Ez mind a szérumban, mind az uterusban ilyen arányokat mutatott.

A fenti eredményeket a következőképpen értelmezzük:

A kísérletben igazoljuk, hogy a toremifen könnyen behatol a bőrön keresztül és a daganatban nagyon nagy koncentrációkat ér el, közben a szisztemikus úton csak kismértékben terjed. Érdekes, hogy miközben a toremifen transzdermális úton adagolva eljut a daganatokhoz, a szérumkoncentráció sokkal alacsonyabb. Ez a toremifen transzdermális adagolásának lényeges terápiás előnyét mutatja. Ezenkívül mindkét hatékony metabolit, az N-demetil- és a 4-hidroxi-toremifen-származék nagyobb koncentrációban található a daganatszövetben transzdermális adagolás után, mint intraperitoneálisan adagolva, ami azt jelzi, hogy ezen aktív metabolitok metabolizmusa a szövetekben is végbemehet, nem csak kizárólag a májban.

A méhben és májban sokkal alacsonyabb toremifenkoncentrációt tapasztaltunk transzdermális adagolás után, mint intraperitoneálisan adagolva, ez tovább igazolja az eredményt, hogy transzdermális terápiával kisebb a szisztemikus úton való hatóanyag-eloszlás. A méhben tapasztalt kisebb koncentráció jelentős klinikai előny, hiszen az antiösztrogének hatására fennáll a másodlagos tumorok keletkezésének veszélye. Hosszabb ideig tartó, tamoxifennel végzett adjuváns kezelés után méhnyálkahártyarendellenességekről, vérzésről, polipkialakulásról és daganatokról számoltak be (lásd Nuovo M. A. és munkatársai, Int. J. Gyn. Pathol. 1989; 8: 125–131). A tamoxifenterápiát követő, a méh szöveteiben jelen lévő tamoxifen metabolitok (biszfenol és E-metabolit) potenciálisan kapcsolatban állhat a másodlagos méhdaganatok kialakulásával (lásd Nuovo M. A. és munkatársai, Int. J. Gyn. Pathol. 1989; 21: 117–120). A toremifen transzdermális adagolásával ezen mellékhatások esélye csökkenthető.

2. példa

Ennél a vizsgálatnál 12 egérbe MCF–7 sejteket ültettünk át, majd hagytuk, hogy azok növekedjenek, míg valamennyi egérnél egy kisebb daganatot észleltünk (<1 mm^3). Ekkor az egereket három 4-es csoportba osztottuk. Az egyik csoportnak topikálisan csak a hígítószert adagoltuk (20 μl DMSO), a második csoportnak transzdermális úton 500 μg 4-OH-toremifent adtunk, a harmadiknak 500 mg/nap toremifent adagoltunk transzdermális úton. Valamennyi egér azonos mennyiségű hígítószert kapott naponta (20 μl). A vizsgálatot a kezelés után 15 nappal végeztük.

A következő eredményeket kaptuk: mind a négy összehasonlító egérnél kifejlődtek a daganatok (>6×8 mm). A többi csoportnál csak a 4-OH-toremifen-csoportba tartozó egyik egérnél találtunk egy kisméretű daganatot (<2×1 mm). Ebből a kísérletből világosan látszik, hogy a 4-OH-toremifen vagy toremifen transzdermálisan adagolva megakadályozta a tumornövekedést.

Az eredményeket a következőképpen értelmezzük:

A kísérlet világosan igazolja, hogy a transzdermálisan adagolt toremifen vagy metabolitjai adjuváns dózi-

saival megakadályozható a mellrák-tumornövekedés in vivo egerekkel végzett kísérletben. Ez az eredmény és a transzdermális adagolás kinetikai előnyei, amelyeket az 1. kísérletben igazoltunk, arra enged következtetni, hogy a transzdermális úton adagolt toremifennel a kívánt antiösztrogénhatás szisztemikus hatóanyageloszlás nélkül elérhető.

3. példa

A vizsgálatot úgy végezzük, hogy a transzdermális adagolásra szánt toremifen-citrátot 1,0 ml dimetil-szulfoxidban (DMSO) feloldjuk, és így 2,5 mg toremifen/60 µl koncentrációjú oldatot állítunk elő. A hatóanyagot cseppenként visszük fel közvetlenül a bőrfelületre a daganat körül. Az egyes cseppeket hagyjuk teljesen elpárologni. A kezelést naponta egyszer végezzük 5 napon keresztül, mindig ugyanabban az időben. A kezelés ötödik napján az utolsó dózis után 2 órával az egereket leöljük. A daganatokat steril úton kinyerjük és elvégezzük a klónozási vizsgálatot.

A toremifenadagolás után a tumorokat kivágjuk és minden tumorból egy részt extrahálunk HPLC-analízis céljára. A megmaradó daganatrészt klónozzuk, miután egy órán keresztül 1 µg/ml koncentrációjú doxorubicinnel elegyítjük. A százalékos gátlást 14 nap után határozzuk meg, az egyes tumoroknál felvesszük a toremifenkoncentráció függvényében a százalékosgátlás-görbét.

A következő eredményeket kaptuk:

Az 1. ábrán mutatjuk be a klónozási vizsgálat eredményeit, amelyeket a transzdermális és intraperitoneális úton toremifennel kezelt egerekből kivágott tumorokkal kaptunk. A görbén látható, hogy összefüggés tapasztalható a százalékos gátlás és a 14 nap utáni sejt-toremifen-koncentráció között ($r=0,77$). Ezenkívül megállapítható, hogy a három transzdermálisan kezelt tumor esetén a gátlás >30%, míg a három intraperitoneálisan kezelt tumor esetén a százalékos gátlás <30%.

A 2. ábrán tüntetjük fel a transzdermális toremifennel kezelt és kezeletlen egerekből kivágott tumorokkal végzett klónozási kísérletek eredményeit. A felső görbe toremifennel nem kezelt egérnél doxorubicinnel szemben ellenálló tumort mutat. A két alsó görbe toremifennel kezelt daganatokra vonatkozik. Látható, hogy a toremifen ezeket az MDR MDA A–1 tumorokat doxorubicinnel szemben érzékennyé teszi.

Az eredményeket a következőképpen értékeljük:

Az eredményekből arra következtetünk, hogy minél nagyobb in vivo a topikális toremifennel elérhető tumor-toremifen-koncentráció, annál nagyobb szinergetikus hatást tapasztalunk a doxorubicinnel szembeni szerzett hatóanyag-rezisztencia csökkentésénél.

4. példa

Spontán, nem-Hopkin's-limfómában szenvedő, 15 éves nőstény babuint transzdermális toremifennel kezelünk. Mindkét ágyékban 1–2 cm átmérőjű megnövekedett nyirokcsomók találhatók. A toremifent dimetil-szulfoxid, etanol és metil-cellulóz elegyében feloldjuk. Nyolc napig összesen 1,4 g toremifent adagolunk közvetlenül a jobb oldali daganatterületre. A transzdermális terápia kezdete után 15 nappal orális kezelést végzünk 1 g toremifennel a 15., 17., 19. és 23. napon összesen 4 g dózissal. A kezelés kezdete utáni 25. napon ismét topikális kezelést végzünk a jobb oldali ágyékon, és közben folytatjuk az orális kezelést is. Ez alatt az időszak alatt transzdermálisan összesen 1,4 g toremifent, orálisan 11 g toremifent adagolunk. A terápiára tapasztalható reakciót a daganatok két egymásra merőleges irányban való méretének a meghatározásával állapítjuk meg. A következő eredményeket kaptuk:

A terápiára adott reakciót a 3a. és 3b. ábrán mutatjuk be. A kezelt jobb oldali lágyéklimfómánál határozott reakciót figyelhetünk meg, míg a kezeletlen bal oldali limfómánál a transzdermális pikális kezelési periódus alatt a daganat mérete növekedett. Az orális toremifenterápia alatt a bal oldali lágyéklimfóma stabilizálódott, míg a jobb oldali újra növekedni kezdett. Ezért kezdtük újra alkalmazni a transzdermális toremifenterápiát erre a daganatra. A transzdermális terápiára tapasztalható kezdeti reakcióhoz hasonlóan a limfóma újra csökkenni kezdett, a daganat mérete 476 mm^2-ről 24 mm^2-re csökkent.

A nőstény babuin regionális T-sejt-limfóma kezelése azt mutatja, hogy a toremifen in vivo daganatellenes hatású.

5. példa

A toremifent toremifen-citrát alakjában először DMSO-ban feloldjuk, majd 3% metil-cellulózt tartalmazó etanolhoz adjuk, és így 1 mg/ml végső koncentrációjú oldatot készítünk.

Hat hímnemű Monodelphis domesticát transzdermálisan kezelünk toremifennel 5 napig. Három állatnál 0,5 mg/nap, három állatnál 1 mg/nap dózist alkalmazunk. A toremifent topikálisan visszük fel borotvált bőrre, 1 cm^2 felületre a deréktájon. Az ötödik napon az állatokat leöljük, és meghatározzuk a toremifen és metabolitjai koncentrációját a plazmában, a bőrön, a herében, a májban, a szemben, az agyban és a szívben.

Három humán melanoma-sejtvonalat (TD 36, TD 30A, és SK–MEL–31) és három kísérleti sejtvonalat (TD 1,4, TD 7,2 és TD 8), amelyek Monodelphis domestica UVB-indukált melanomasejtből származott, in vitro tenyésztettük, hogy meghatározzuk a toremifen citosztatikus IC_{50}-értékeit. Az SK–MEL–31 metasztázisos melanoma-sejtvonalat az American Type Culture Collectiontől (Rockville, MD) nyertük. Két másik humán sejtvonalat a sebészeti úton kivágott nagy átmérőjű felületen terjedő melanoma részéből származtattuk. A TD 1,4-et jóindulatú melanomából fejlesztettük, míg a TD 7,2-t és TD 8-at melanocitás hiperpláziából származtattuk. Az IC_{50}-értékeket a százalékos sejttúlélés kontra toremifen-citrát-koncentráció féllogaritmikus görbéjéből határoztuk meg.

A következő eredményeket kaptuk:

A toremifen átlagos plazma- és szövetkoncentrációja a hat állatnál 5 napig 0,5 és 1 mg/nap dózisban végzett transzdermális kezelés után a 6. táblázatból látható. A toremifenkoncentráció a bőrben több mint 500-szor akkora, mint az egyéb szövetekben mért koncentráció.

ban látható. A toremifen növekedésgátló hatása mind a hat melanocitaeredetű sejtvonalban nagyon hasonló. Az IC_{50}-értékek 5,8 és 9,6 μmol közöttiek.

A fenti eredményeket a következőképpen értékeljük:

A kísérletben kimutattuk, hogy a toremifennek határozottan citosztatikus hatása van in vitro humán és kísérleti melanoma-sejtvonalakra. Habár valamennyi sejtvonal esetén citosztatikus hatást figyeltünk meg, ennek a hatásnak az eléréséhez szükséges koncentráció viszonylag magas. A toremifen transzdermális adagolásával azonban ezen in vitro koncentrációknál lényegesen magasabb koncentrációk érhetők el a bőrben, amiből az következik, hogy in vivo bőrmelanoma esetén határozott citosztatikus hatás érhető el.

1. táblázat

Toremifenkoncentráció 5 napos ip. kezelés, illetve transzdermális kezelés után

Szövet	IP	Transzdermális	Transzdermális/IP
Tumor (μg/g)	7,08 (3,55–11,86)	1087,34 (23,47–1924,77)	153,58
Szérum (μg/g)	4,37 (0,1–12,79)	1,00 (0,46–1,84)	0,23
Agy (μg/g)	1,85 (1,17–2,20)	1,45 (1,29–1,61)	0,78
Méh (μg/g)	29,97 (26,47–35,90)	2,94 (2,33–3,53)	0,10
Máj (μg/g)	14,25 (11,2–18,6)	4,21 (3,46–5,62)	0,30

2. táblázat

N-Demetil-toremifen-koncentráció ip., illetve transzdermális kezelés után

Szövet	IP	Transzdermális	Transzdermális/IP
Tumor (μg/g)	1,27 (0,88–1,74)	8,43 (1,15–13,86)	6,64
Szérum (μg/g)	0,18 (0,10–0,30)	0,08 (0,06–0,09)	0,44
Agy (μg/g)	0,49 (0,26–0,73)	0,29 (0,0–0,49)	0,59
Méh (μg/g)	1,18 (1,02–1,51)	0,56 (0,38–0,76)	0,47
Máj (μg/g)	0,94 (0,92–0,98)	0,92 (0,80–1,10)	0,98

3. táblázat

transz-4-Hidroxi-toremifen-koncentráció ip. transzdermális kezelés után

Szövet	IP	Transzdermális	Transzdermális/IP
Tumor (μg/g)	0,88 (0,64–1,06)	2,33 (0,82–3,26)	2,65
Szérum (μg/g)	0,16 (0,12–0,20)	0,10 (0,04–0,17)	0,63
Agy (μg/g)	0,35 (0,26–0,73)	0,35 (0,31–0,40)	1,00
Méh (μg/g)	0,83 (0,46–1,05)	0,70 (0,50–0,80)	0,84
Máj (μg/g)	0,60 (0,56–0,66)	0,98 (0,51–1,43)	1,63

4. táblázat

Toremifen sejtkoncentrációinak összehasonlítása in vitro mérés, intraperitoneális injekció és transzdermális adagolás után

Minta	Adagolás módja	Toremifenkoncentráció
In vitro (sejtpelletek)	közvetlen alkalmazás	0,149 μg/mg
In vivo (tumor)	intraperitoniális injekció	0,007 μg/mg
In vivo (tumor)	transzdermális alkalmazás	1,087 μg/mg

A koncentrációkat három mérés átlagából számítottuk.

5. táblázat

Toremifenkoncentráció egyetlen ip. adagolás után, illetve transzdermális toremifenkezelés (500 μg) DMSO-ban vagy metil-cellulózban (MC)

Szövet	IP	DMSO	MC	DMSO/IP	MC/IP
Tumor (μg/g)	2,57 (1,64–4,46)	4,65 (3,41–6,96)	1,80 (0,95–3,10)	1,81	0,70
Szérum (μg/g)	0,09 (0,04–0,14)	0,03 (0,004–0,04)	0,02 (0,00–0,04)	0,33	0,22
Méh (μg/g)	23,60 (13,58–40,17)	0,92 (0,66–1,35)	1,10 (0,64–1,92)	0,04	0,05

6. táblázat

Toremifen átlagos koncentrációja a plazmában (nmol/ml) és különböző szövetekben (nmol/g) 5 napig hímnemű Monodelphi domesticánál 0,5, illetve 1 mg/nap dózissal végzett transzdermális toremifenkezelés után

	0,5 mg/nap	1 mg/nap
Plazma	0	0
Bőr	1296,40±1003,93	1237,35±768,90
Máj	1,07±0,69	3,60±2,23
Here	1,52±2,13	0,52±0,05
Agy	0,82±0,99	0,82±0,62
Szem	0	0,17±0,05
Szív	0	0,21±0,16

7. táblázat

IC_{50}-értékek humán és kísérleti melanoma-sejtvonalakban toremifen esetén

	Sejtvonal	IC_{50} (μM)
Humán	TD 36 TD 30 A SD-MEL-31	5,8 7,7 8,1
Kísérleti	TD 8 TD 1,4 TD 7,2	7,7 9,3 9,6

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Transzdermális készítmény, amely hatóanyagként toremifent vagy valamely metabolitját, N-demetil-toremifent {4-klór-1,2-difenil-[4-[2-(N-metil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy 4-hidroxi-toremifent {4-klór-1-(4-hidroxi-fenil)-2-fenil-1-[4-[2-(N,N-dimetil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy ezek valamely gyógyászatilag alkalmazható, nem toxikus sóját és egy vagy több gyógyászatilag alkalmazható vivőanyagot tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amely kenőcs, emulzió, oldat, gél vagy krém alakú.

3. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amely tapasz alakú transzdermális hatóanyag-leadó rendszer.

4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti készítmény, amely a hatóanyagot ciklodextrin vagy ciklodextrinszármazékkal alkotott komplex formában tartalmazza.

5. Az 1–4. igénypontok bármelyike szerinti készítmény, amelyben a hatóanyag toremifen vagy gyógyszerészetileg alkalmazható sója.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti transzdermális készítmény mellrák kezelésére.

7. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti transzdermális készítmény mellrák adjuváns kezelésénél történő alkalmazásra.

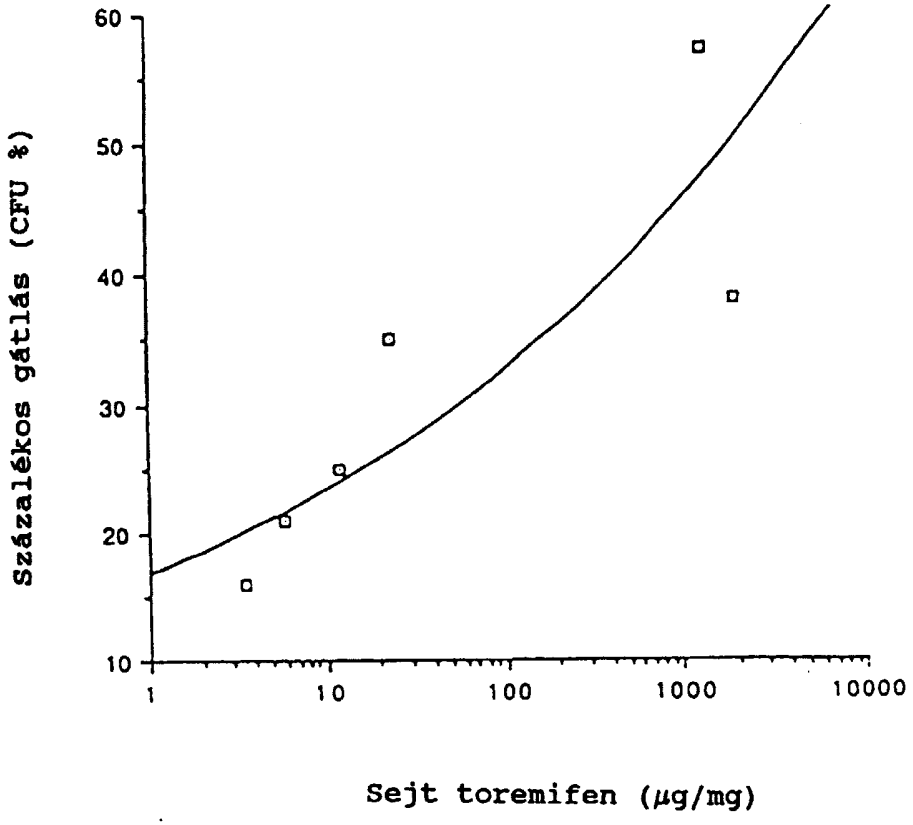
8. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti transzdermális készítmény ráksejtek citotoxikus hatóanyagokkal szembeni multidrog-rezisztenciájának megfordítására.

9. Az 1–5. vagy 8. igénypontok bármelyike szerinti topikális készítmény melanoma, limfóma, Kaposi-szarkóma vagy fungoid mycosis kezelésére.

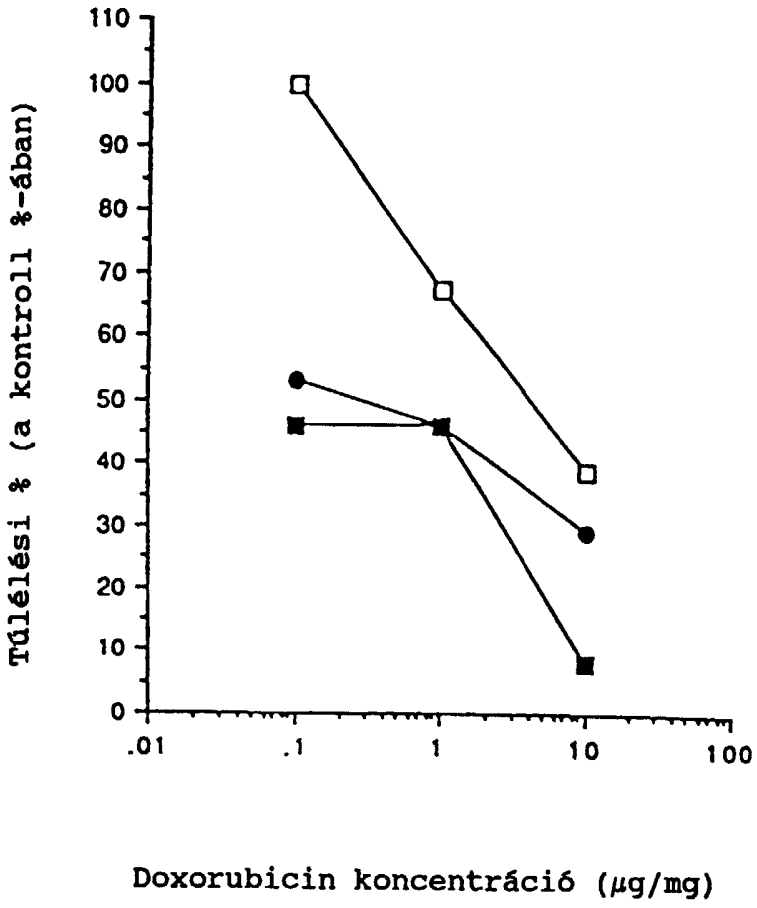
10. Toremifen vagy valamely metabolitja, N-demetil-toremifen {4-klór-1,2-difenil-[4-[2-(N-metil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy 4-hidroxi-toremifen {4-klór-1-(4-hidroxi-fenil)-2-fenil-1-[4-[2-(N,N-dimetil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy ezek valamely gyógyászatilag alkalmazható, nem toxikus sója alkalmazása mellrák kezelésére szolgáló transzdermális gyógyszerkészítmény előállítására.

11. Toremifen vagy valamely metabolitja, N-demetil-toremifen {4-klór-1,2-difenil-[4-[2-(N-metil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy 4-hidroxi-toremifen {4-klór-1-(4-hidroxi-fenil)-2-fenil-1-[4-[2-(N,N-dimetil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy ezek valamely gyógyászatilag alkalmazható, nem toxikus sója alkalmazása ráksejtek citotoxikus hatóanyagokkal szembeni multidrog-rezisztenciája megfordítására szolgáló transzdermális gyógyszerkészítmény előállítására.

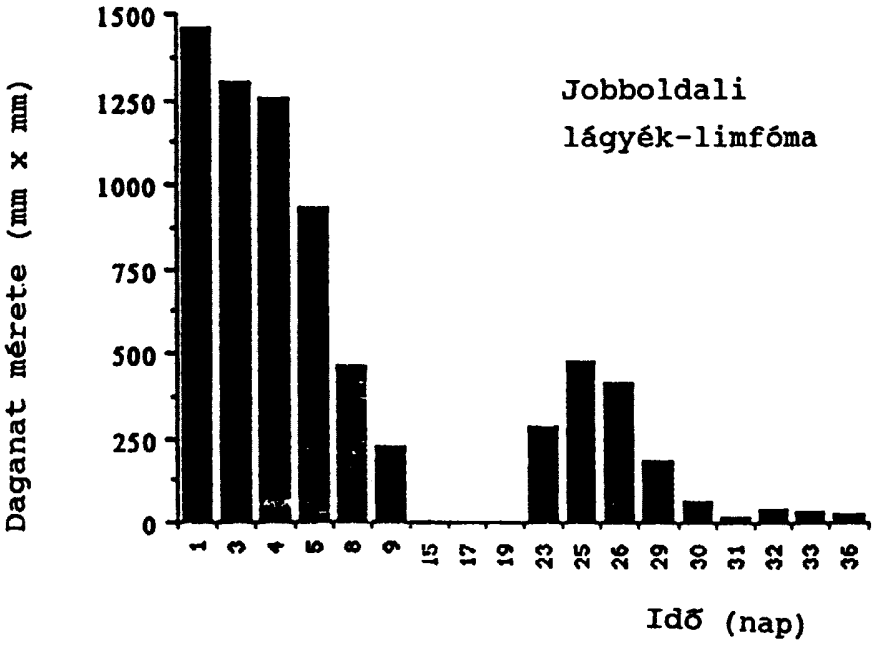
12. Toremifen vagy valamely metabolitja, N-demetil-toremifen {4-klór-1,2-difenil-[4-[2-(N-metil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy 4-hidroxi-toremifen {4-klór-1-(4-hidroxi-fenil)-2-fenil-1-[4-[2-(N,N-dimetil-amino)-etoxi]-fenil]-1-butén} vagy ezek valamely gyógyászatilag alkalmazható, nem toxikus sója alkalmazása melanoma, limfóma, Kaposi-szarkóma vagy fungoid mycosis kezelésére szolgáló transzdermális gyógyszerkészítmény előállítására.


Százalékos gátlás (CFU %)
60
50
40
30
20
10
1
10
100
1000
10000
Sejt toremifen (μg/mg)

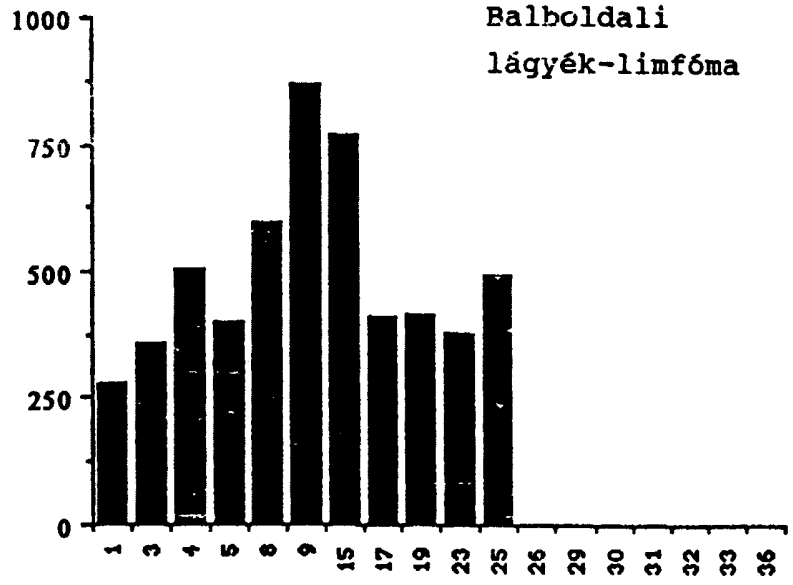
1. ábra


110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
.01
.1
1
10
100
Túlélési % (a kontroll %-ában)
Doxorubicin koncentráció (μg/mg)

2. ábra



3a. ábra



3b. ábra