

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 243152 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433732**

(22) Data zgłoszenia: **2020.04.28**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.11.02 BUP 31/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.07.10 WUP 28/2023**

(51) MKP:

**A61K 31/444** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07D 401/04** (2006.01)

- (73) Uprawniony z patentu:  
**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,  
Lublin, PL**
- (72) Twórca(-y) wynalazku:  
**KATARZYNA WALCZAK, Lublin, PL  
MONIKA TURSKA, Lublin, PL  
KATARZYNA ŚWIĄDER, Lublin, PL  
TOMASZ PLECH, Lublin, PL  
JOLANTA PARADA-TURSKA, Lublin, PL**
- (74) Pełnomocnik:  
**Anna Bełz, Lublin, PL**

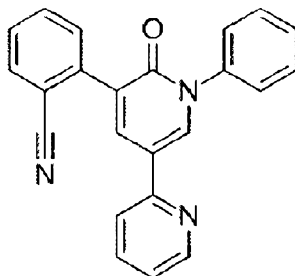
(54) Tytuł:

**Zastosowanie perampanelu w profilaktyce i leczeniu czerniaka oraz kompozycja farmaceutyczna**

**PL 243152 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowe zastosowanie perampanelu (wzór ogólny 1) oraz zawierająca go kompozycja farmaceutyczna, do zapobiegania powstawaniu lub leczenia czerniaka i jego przerzutów.



Wzór 1

Czerniak jest nowotworem wywodzącym się z komórek barwnikowych, melanocytów. Najczęściej powstaje w skórze, ale może występować w błonie śluzowej i w gałce ocznej. Jest to nowotwór złośliwy, który tworzy przerzuty do węzłów chłonnych oraz przerzuty odległe, najczęściej do płuc i mózgu. Leczenie czerniaka we wczesnym stadium rozwoju polega na usunięciu zmiany nowotworowej. Leczenie uzupełniające tj. chemioterapia, immunoterapia, radioterapia nie daje zadawalających wyników terapeutycznych. Jednym z zaleceń profilaktycznych jest unikanie ekspozycji na światło słoneczne i stosowanie filtrów chroniących przed promieniowaniem UVA i UVB.

Perampanel znany jest z opisu patentowego US6949571 wykazuje doskonale działanie hamujące receptor AMPA i/lub działanie hamujące kainian. Znany jest z opisu WO2015013520A1 sposób otrzymywania perampanelu. Z opisu patentowego US7759367 związek ten znany jest przy stosowaniu w zapobieganiu i leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, m.in. chorób demielinizacyjnych. Perampanel jest lekiem przeciwpadaczkowym zalecanym do stosowania w leczeniu napadów częściowych z uogólnionymi napadami wtórnymi lub bez, oraz napadów toniczno-klonicznych pierwotnych uogólnionych. Jego mechanizm działania polega na niekompetycyjnym blokowaniu glutaminianergicznych receptorów jonotropowych AMPA (kwas alfa-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izokszazolepropionowy) w mózgu.

Znana jest także z opisu WO2015153263 metoda leczenia uzależnień z zastosowaniem perampanelu lub telampanelu. W tym opisie wskazano sposoby podania substancji w celu uzyskania ich ogólnoustrojowego działania. W szczególności wskazano stałe postacie leku do podania doustnego, postacie o kontrolowanym uwalnianiu substancji działającej do podawania doustnego, postacie do podawania w formie iniekcji, wlewu lub implantacji, postacie o kontrolowanym uwalnianiu substancji działającej do podawania w formie iniekcji, wlewu lub implantacji.

Perampanel jest produkowany przez przemysł farmaceutyczny w postaci tabletek i zawiesiny doustnej (Zestawienie 1).

Zestawienie 1. Postacie leków, w których występuje perampanel

Nazwa handlowa	Postać leku	Ilość perampanelu
Fycompa	tabletki	2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg, 10 mg, 12 mg
Fycompa	zawiesina doustna	0,5 mg/ml

Na podstawie: European Medicines Agency, EMA/521229/2016; EMA/H/C/002434

Poniżej przedstawiono skład tabletki w zależności od zawartości perampanelu (Zestawienie 2).  
Zestawienie 2. Skład tabletek perampanelu.

Część tabletki	Składnik	Tabletka [mg perampanelu]					
		2	4	6	8	10	12
Rdzeń	Laktoza jednowodna	+	+	+	+	+	+
	Hydroksypropyloceluloza niskopodstawiona	+	+	+	+	+	+
	Powidon K-29/32	+	+	+	+	+	+
	Magnezu stearynian (E470b)	+	+	+	+	+	+
	Celuloza mikrokrystaliczna			+	+	+	+
Otoczka	Hypromeloza 2910	+	+	+	+	+	+
	Talk	+	+	+	+	+	+
	Makrogol 8000	+	+	+	+	+	+
	Tytanu dwutlenek (E171)	+	+	+	+	+	+
	Żelaza tlenek, żółty (E172)	+				+	
	Żelaza tlenek, czerwony (E172)	+	+	+	+		
	Żelaza tlenek, czarny (E172)				+		
	Indygokarmin, lak (E132) (FD&C Blue #2)					+	+

Na podstawie: Charakterystyka produktu leczniczego Fycompa.

Poniżej przedstawiono skład perampanelu w postaci zawiesiny (Zestawienie 3).  
Zestawienie 3. Skład zawiesiny perampanelu.

<b>Składnik</b>
Perampanel 0,5 mg/ml
Sorbitol (E420) płynny (krystalizujący)
Celuloza mikrokrystaliczna (E460)
Sodu karmeloza (E466)
Poloksamer 188
Emulsja symetykonu 30% zawierająca wodę oczyszczoną, olej silikonowy, polisorbat 65, metylocelulozę, żel krzemionkowy, makroglu stearynian, kwas sorbowy, kwas benzoowy oraz kwas siarkowy
Kwas cytrynowy, bezwodny (E330)
Sodu beznoesan (E211)
Woda oczyszczona

Na podstawie: Charakterystyka produktu leczniczego Fycompa.

Nieoczekiwanie, w wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że perampanel zmniejsza metabolizm komórek czerniaka, dzięki czemu może on znaleźć zastosowanie w medycynie.

Wynalazek dotyczy zastosowania perampanelu w zapobieganiu powstawaniu lub leczeniu czerniaka, przy podawaniu na powierzchnię skóry.

Korzystne jest zastosowanie perampanelu w zapobieganiu powstawaniu lub leczeniu przerzutów czerniaka.

Przedmiotem wynalazku jest także kompozycja farmaceutyczna, zawierająca jako substancję czynną perampanel w połączeniu z co najmniej jednym nośnikiem lub rozcieńczalnikiem do zastosowania w zapobieganiu powstawaniu lub leczeniu czerniaka, przy podawaniu na powierzchnię skóry, przy czym perampanel występuje w ilości od 0,5% – 10,0% wagowych.

Korzystnie perampanel występuje w ilości 0,5% – 2,0% wagowych.

Korzystnie kompozycja jest w postaci preparatów półstałych, korzystnie żelu, kremu.

Korzystnie kompozycja zawiera jako nośnik wodę, DMSO (dimetylosulfotlenek), glicerol, wazelinę, parafinę, karbomer.

Korzystnie kompozycja jako konserwanty zawiera parabeny.

Okazało się, że perampanel jako substancja aktywna może znaleźć zastosowanie do zapobiegania, powstawania lub do leczenia czerniaka i jego przerzutów. Substancja ta może być stosowana do wytwarzania preparatów farmaceutycznych.

Aktywność została potwierdzona następującymi wynikami badań.

Przykład 1.

Badania przeprowadzono na ludzkiej linii komórkowej melanoma A375 oraz SKMEL3 (ATCC). Linie komórkowe reprezentują kolejne stadia choroby nowotworowej: linia A375 została wyizolowana

z guza pierwotnego, natomiast linia SKMEL3, wyizolowana z przerzutu czerniaka do węzłów chłonnych, reprezentuje stadium przerzutującego czerniaka. Określono wpływ perampanelu na proliferację i aktywność metaboliczną komórek melanoma A375 oraz SKMEL3.

W badaniach zastosowano 2 modele eksperymentalne:

1. Komórki poddano działaniu perampanelu w podłożu hodowlanym z dodatkiem surowicy.
2. Komórki poddano działaniu perampanelu w płynie Hanksa (HBSS) przez 1 godzinę, a następnie komórki inkubowano z wybranymi stężeniami perampanelu w medium hodowlanym z dodatkiem surowicy.

#### Metoda

Perampanel (Selleckchem.com) rozpuszczono w DMSO (Merk, Sigma Aldrich) poprzez zawieszenie i worteksowanie przez 1–5 minut osiągając stężenie wyjściowe 50 mM. Następnie przygotowano stężenia perampanelu 100  $\mu$ M oraz 100 nM w DMSO poprzez dodawanie odpowiedniej ilości wyjściowego roztworu perampanelu do DMSO i worteksowanie przez 1–5 min. Komórki były poddane działaniu następujących stężeń perampanelu: 100 pM, 100 nM, 50  $\mu$ M i 100  $\mu$ M. Rozcieńczenia końcowe przygotowywano w HBSS lub podłożu hodowlanym z surowicą w zależności od zastosowanego modelu eksperymentalnego poprzez dodanie odpowiedniej ilości roztworu perampanelu do HBSS lub podłoża hodowlanego z FBS i worteksowanie przez 1–5 min. Całkowite stężenie DMSO w próbkach końcowych było niższe niż 0,2%.

#### Naświetlanie promieniowaniem UVB

Komórki linii A375 i SKMEL3 w wybranych modelach eksperymentu były poddane działaniu promieniowaniu UVB o długości fali 312 nm w dawce 25 mJ/cm<sup>2</sup> za pomocą systemu do naświetlania Bio-SUN firmy Vilber. Czas naświetlania nie przekraczał 1 min.

#### Hodowle komórkowe

Komórki linii melanoma A375 były hodowane w medium hodowlanym Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Merk, Sigma Aldrich) z 10% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (FBS) (Merk, Sigma Aldrich) i antybiotyków (penicylina 100 U/ml, streptomycyna 100  $\mu$ g/ml (Merk, Sigma Aldrich)) w 37°C w wilgotnej atmosferze 95% powietrza i 5% CO<sub>2</sub>. Komórki linii melanoma SKMEL3 były hodowane w medium hodowlanym McCoy's 5A (Merk, Sigma Aldrich) z 15% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej (FBS) i antybiotyków (penicylina 100 U/ml, streptomycyna 100  $\mu$ g/ml) w 37°C w wilgotnej atmosferze 95% powietrza i 5% CO<sub>2</sub>. Warunki hodowli były zgodne z zaleceniami dystrybutora linii komórkowych (ATCC). Komórki były pasażowane z częstotliwością zalecaną przez dystrybutora linii komórkowej.

Zawiesina melanoma A375 o gęstości 2 x 10<sup>4</sup> komórek/ml i zawiesina komórek SKMEL3 o gęstości 3 x 10<sup>4</sup> komórek/ml była wylewana na płytki 96-dołkowe. Następnego dnia medium hodowlane było zbierane a komórki poddawane działaniu świeżego medium hodowlanego (odpowiednio DMEM z 10% dodatkiem FBS dla A375 i McCoy's 5A z 15% dodatkiem FBS dla SKMEL3) jako kontrola lub odpowiednim rozcieńczeniem perampanelu w medium hodowlanym odpowiednim dla danej linii komórkowej z dodatkiem FBS (100 pM, 100 nM, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M). Komórki inkubowano w warunkach standardowych (37°C w wilgotnej atmosferze 95% powietrza i 5% CO<sub>2</sub>) przez 24, 48 lub 96 godzin. Jednocześnie przeprowadzono eksperyment, w którym po dodaniu świeżego medium hodowlanego lub medium z odpowiednimi rozcieńczeniami perampanelu, komórki były naświetlane promieniowaniem UVB w dawce 25 mJ/cm<sup>2</sup>, a następnie inkubowane w warunkach standardowych przez 24, 48 lub 96 godzin.

W drugim etapie badań komórki linii melanoma A375 oraz SKMEL3 były poddawane działaniu perampanelu w roztworze buforującym HBSS zawierającym m.in. glukozę oraz jony wapnia i magnezu. Zawiesina melanoma A375 o gęstości 2 x 10<sup>4</sup> komórek/ml i zawiesina komórek SKMEL3 o gęstości 3 x 10<sup>4</sup> komórek/ml była wylewana na płytki 96-dołkowe. Następnego dnia medium hodowlane było zbierane a komórki poddawane działaniu HBSS (kontrola) lub odpowiednich rozcieńczeń perampanelu w buforze HBSS przez 1 godzinę w warunkach standardowych. Jednocześnie przeprowadzono eksperyment, w którym po dodaniu buforu HBSS lub odpowiednich rozcieńczeń perampanelu w HBSS, komórki były naświetlane promieniowaniem UVB w dawce 25 mJ/cm<sup>2</sup>, a następnie inkubowane w warunkach standardowych przez 1 godzinę. W obu modelach po godzinie inkubacji bufor HBSS oraz rozcieńczenia perampanelu w HBSS były usuwane a komórki poddawane działaniu świeżego medium hodowlanego (odpowiednio DMEM z 10% dodatkiem FBS dla A375 i McCoy's 5A z 15% dodatkiem FBS dla SKMEL3) jako kontrola lub odpowiednim rozcieńczeniem perampanelu w świeżym medium hodowlanym z dodatkiem FBS i inkubowano w warunkach standardowych przez 24, 48 lub 96 godzin.

Po inkubacji określano wpływ substancji na metabolizm komórkowy przy pomocy testu MTT. Test MTT opiera się na reakcji barwnej i określa aktywność metaboliczną komórek, a pośrednio proliferację komórek. Po upływie czasu inkubacji do każdego dołka dodawano 15  $\mu$ l roztworu MTT (5 mg/ml w buforze PBS z jonami wapnia i magnezu). Po 3 godzinach inkubacji w warunkach standardowych, komórki poddawano lizie za pomocą 10% roztworu SDS w 10 mM HCl. Następnego dnia dokonywano odczytu absorbancji przy użyciu czytnika do mikroplatek przy długości fali 570 nm.

Wpływ perampanelu na indukcję śmierci komórkowej

Zawiesina melanoma A375 o gęstości  $2 \times 10^4$  komórek/ml była wylewana na płytki 96-dołkowe. Następnego dnia medium hodowlane było zbierane a komórki poddawane działaniu świeżego medium hodowlanego (MEM z 10% dodatkiem FBS) jako kontrola lub perampanelu w stężeniu 100  $\mu$ M w medium hodowlanym. Komórki inkubowano w warunkach standardowych (37°C w wilgotnej atmosferze 95% powietrza i 5% CO<sub>2</sub>) przez 24 godziny. Jednocześnie przeprowadzono eksperyment, w którym po dodaniu świeżego medium hodowlanego lub medium z perampanelem w stężeniu 100  $\mu$ M, komórki były naświetlane promieniowaniem UVB w dawce 25 mJ/cm<sup>2</sup>, a następnie inkubowane w warunkach standardowych przez 24 godziny. Po tym czasie badano wpływ substancji na indukcję apoptozy i nekrozy określono przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu ELISA Cell Death Detection ELISApplus (Roche Diagnostics). Test wykonano zgodnie ze wskazówkami producenta.

Wyniki

Tabela 1. Wpływ perampanelu na metabolizm i proliferację komórek melanoma A375 w medium hodowlanym DMEM z 10% dodatkiem FBS

Stężenie perampanelu	Czas trwania inkubacji		
	24 godz.	48 godz.	96 godz.
100 pM	98,19	95,26	97,99
100 nM	95,00	83,16 *	99,97
50 $\mu$ M	86,88 *	62,05 *	62,84 *
100 $\mu$ M	55,78 *	26,52 *	9,62 *

Wyniki podano jako % kontroli (N=8) \*poziom istotności  $p < 0,05$  (jednoczynnikowa analiza wariancji z testem post-hoc Tukey'a).

Stwierdzono, że perampanel w sposób zależny od stężenia zmniejsza metabolizm i proliferację ludzkich komórek melanoma linii A375 po 24 i 96 godzinnej inkubacji w stężeniach 50  $\mu$ M i 100  $\mu$ M (Tabela 1) oraz po 48 godzinnej inkubacji w stężeniach 100 nM – 100  $\mu$ M (Tabela 1).

Tabela 2. Wpływ perampanelu na metabolizm i proliferację komórek melanoma A375 w HBSS

Stężenie perampanelu	Czas trwania inkubacji		
	24 godz.	48 godz.	96 godz.
100 pM	86,19 *	74,76 *	99,34
100 nM	66,50 *	55,19 *	82,34 *
50 $\mu$ M	49,66 *	35,13 *	38,06 *
100 $\mu$ M	42,04 *	17,57 *	6,07 *

Wyniki podano jako % kontroli (N=8) \*poziom istotności  $p < 0,05$  (jednoczynnikowa analiza wariancji z testem post-hoc Tukey'a).

Stwierdzono, że perampanel w sposób zależny od stężenia zmniejsza metabolizm i proliferację ludzkich komórek melanoma linii A375 po 24 i 48 godzinnej inkubacji w stężeniach 100 pM – 100 μM (Tabela 2) oraz po 96 godzinnej inkubacji w stężeniach 100 nM – 100 μM (Tabela 2).

Tabela 3. Wpływ perampanelu i światła UV na metabolizm i proliferację komórek melanoma A375 w medium hodowlanym DMEM z 10% dodatkiem FBS.

Stężenie perampanelu	Czas trwania inkubacji		
	24 godz.	48 godz.	96 godz.
100 pM	102,51	97,55	96,59 *
100 nM	99,21	99,29	93,03 *
50 μM	96,84	62,56 *	38,77 *
100 μM	64,42 *	22,61 *	7,11 *

Wyniki podano jako % kontroli (N=8) \*poziom istotności  $p < 0,05$  (jednoczynnikowa analiza wariancji z testem post-hoc Tukey'a).

Stwierdzono, że perampanel zmniejsza metabolizm i proliferację ludzkich komórek melanoma linii A375 naświetlanych promieniami UVB po 24 godzinnej inkubacji w stężeniu 100 μM (Tabela 3); po 48 godzinnej inkubacji w stężeniach 50 i 100 μM (Tabela 3); po 96 godzinnej inkubacji w stężeniach 100 nM – 100 μM (Tabela 3). Wpływ naświetlania promieniami UVB na zmniejszenie metabolizmu i proliferacji ludzkich komórek melanoma przez perampanel nie jest jednoznaczny. Naświetlanie promieniami UVB komórek melanoma osłabia działanie perampanelu przy krótszej ekspozycji na perampanel (24 i 48 godzin) natomiast nasila działanie perampanelu przy dłuższej ekspozycji (96 godzin) (Tabela 1 i 3).

Wpływ perampanelu i światła UV na metabolizm i proliferację komórek melanoma A375 w HBSS

Tabela 4. Wpływ perampanelu i światła UV na metabolizm i proliferację komórek melanoma A375 w HBSS

Stężenie perampanelu	Czas trwania inkubacji		
	24 godz.	48 godz.	96 godz.
100 pM	80,39 *	81,56	71,75 *
100 nM	74,62 *	59,90 *	48,67 *
50 μM	66,18 *	37,62 *	67,65 *
100 μM	61,17 *	17,74 *	10,19 *

Wyniki podano jako % kontroli (N=8) \*poziom istotności  $p < 0,05$  (jednoczynnikowa analiza wariancji z testem post-hoc Tukey'a).

Stwierdzono, że perampanel zmniejsza metabolizm i proliferację ludzkich komórek melanoma linii A375 naświetlanych promieniami UVB po 24 i 96 godzinnej inkubacji w stężeniach 100 pM – 100 μM (Tabela 4) oraz po 48 godzinnej inkubacji w stężeniach 100 nM – 100 μM (Tabela 4). Wpływ naświetlania promieniami UVB na zmniejszenie metabolizmu i proliferacji ludzkich komórek melanoma przez perampanel nie jest jednoznaczny. Naświetlanie promieniami UVB komórek melanoma nie wpływa na działanie perampanelu przy krótszej ekspozycji na perampanel (24 i 48 godzin) natomiast nasila działanie perampanelu przy dłuższej ekspozycji (96 godzin) (Tabela 2 i 4).

Tabela 5. Wpływ perampanelu na metabolizm i proliferację komórek melanoma SKMEL3 (model przerzutu czerniaka) w medium hodowlanym McCoy's 5A z 15% dodatkiem FBS

Stężenie perampanelu	Czas trwania inkubacji		
	24 godz.	48 godz.	96 godz.
100 pM	100,5	105,0	100,2
100 nM	101,9	95,92	100,4
50 μM	90,75*	68,38*	108,3
100 μM	84,93*	37,65*	19,60*

Wyniki podano jako % kontroli (N ≥ 7) \*poziom istotności p < 0,05 (jednoczynnikowa analiza wariancji z testem post-hoc Tukey'a).

Stwierdzono, że perampanel w sposób zależny od stężenia zmniejsza metabolizm i proliferację ludzkich komórek melanoma linii SKMEL3 reprezentującej model przerzutu czerniaka po 24 i 48 godzinnej inkubacji w stężeniach 50 μM i 100 μM (Tabela 5) oraz po 96 godzinnej inkubacji w stężeniu 100 μM (Tabela 5).

Tabela 6. Wpływ perampanelu na metabolizm i proliferację komórek melanoma SKMEL3 (model przerzutu czerniaka) w HBSS

Stężenie perampanelu	Czas trwania inkubacji		
	24 godz.	48 godz.	96 godz.
100 pM	87,68	105,0	78,06*
100 nM	106,5	95,92	87,71*
50 μM	81,47*	68,38*	69,97*
100 μM	59,03*	37,65*	14,89*

Wyniki podano jako % kontroli (N ≥ 6) \*poziom istotności p < 0,05 (jednoczynnikowa analiza wariancji z testem post-hoc Tukey'a).

Stwierdzono, że perampanel w sposób zależny od stężenia zmniejsza metabolizm i proliferację ludzkich komórek melanoma linii SKMEL3 reprezentującej model przerzutu czerniaka po 24 i 48 godzinnej inkubacji w stężeniach 50 i 100 μM (Tabela 6) oraz po 96 godzinnej inkubacji w stężeniach 100 pM – 100 μM (Tabela 6).

Tabela 7. Wpływ perampanelu i światła UV na metabolizm i proliferację komórek melanoma SKMEL3 (model przerzutu czerniaka) w medium hodowlanym McCoy's 5A z 15% dodatkiem FBS

Stężenie perampanelu	Czas trwania inkubacji		
	24 godz.	48 godz.	96 godz.
100 pM	98,03	100,7	91,07*
100 nM	97,64	101,8	91,95*
50 μM	90,20*	88,88*	92,20*
100 μM	81,24*	66,81*	17,45*

Wyniki podano jako % kontroli (N ≥ 6) \*poziom istotności p < 0,05 (jednoczynnikowa analiza wariancji z testem post-hoc Tukey'a).

Stwierdzono, że perampanel zmniejsza metabolizm i proliferację ludzkich komórek melanoma linii SKMEL3 reprezentującej model przerzutu czerniaka naświetlanych promieniami UVB po 24 i 48 godzinnej inkubacji w stężeniach 50 i 100  $\mu\text{M}$  (Tabela 7); po 96 godzinnej inkubacji w stężeniach 100 pM – 100  $\mu\text{M}$  (Tabela 7). Wpływ naświetlania promieniami UVB na zmniejszenie metabolizmu i proliferacji ludzkich komórek melanoma linii SKMEL3 reprezentującej model przerzutu czerniaka przez perampanel nie jest jednoznaczny. Naświetlanie promieniami UVB komórek melanoma linii SKMEL3 nie ma wpływu na działanie substancji po 24 i 48 godzinnej inkubacji, natomiast nasila działanie substancji po 96-godzinnej inkubacji (Tabela 5 i 7).

Tabela 8. Wpływ perampanelu i światła UV na metabolizm i proliferację komórek melanoma SKMEL3 (model przerzutu czerniaka) w HBSS

Stężenie perampanelu	Czas trwania inkubacji		
	24 godz.	48 godz.	96 godz.
100 pM	76,20*	98,91	68,80*
100 nM	106,30	101,90	70,97*
50 $\mu\text{M}$	96,70	81,68*	62,47 *
100 $\mu\text{M}$	70,73*	43,49*	12,28*

Wyniki podano jako % kontroli (N  $\geq$  6) \*poziom istotności p < 0,05 (jednoczynnikowa analiza wariancji z testem post-hoc Tukey'a).

Stwierdzono, że perampanel zmniejsza metabolizm i proliferację ludzkich komórek melanoma linii SKMEL3 reprezentującej model przerzutu czerniaka naświetlanych promieniami UVB po 24 godzinnej inkubacji w stężeniach 100 pM i 100  $\mu\text{M}$  (Tabela 8), po 48 godzinnej inkubacji w stężeniach 50 i 100  $\mu\text{M}$  (Tabela 8) oraz po 96 godzinnej inkubacji w stężeniach 100 pM – 100  $\mu\text{M}$  (Tabela 8). Naświetlanie promieniami UVB komórek melanoma linii SKMEL3 nie ma wpływu na działanie substancji po 24, 48 i 96godzinnej inkubacji (Tabela 6 i 8).

Tabela 9. Wpływ perampanelu na indukcję apoptozy w komórkach melanoma A375 w warunkach podstawowych i w warunkach promieniowania UVB

Apoptoza	Warunki podstawowe	Promieniowanie UVB
Kontrola	0,047	0,050
Perampanel 100 $\mu\text{M}$	0,117*	0,188*

Wyniki podano jako % kontroli (N  $\geq$  5) \*poziom istotności p < 0,05 (test t-Studenta dla prób niezależnych).

Stwierdzono, że perampanel w dawce 100  $\mu\text{M}$  indukuje apoptozę, programowaną śmierć komórkową, w komórkach melanoma A375 zarówno w warunkach podstawowych, jak również po naświetleniu promieniowaniem UVB w dawce 25 mJ/cm<sup>2</sup> (Tabela 9).

Tabela 10. Wpływ perampanelu na indukcję nekrozy w komórkach melanoma A375 w warunkach podstawowych i w warunkach promieniowania UVB

Nekroza	Warunki podstawowe	Promieniowanie UVB
Kontrola	0,053	0,041
Perampanel 100 $\mu\text{M}$	0,214*	0,325*

Wyniki podano jako % kontroli (N  $\geq$  5) \*poziom istotności p < 0,05 (test t-Studenta dla prób niezależnych).

Stwierdzono, że perampanel w dawce 100  $\mu\text{M}$  indukuje nekrozę w komórkach melanoma A375 zarówno w warunkach podstawowych, jak również po naświetleniu promieniowaniem UVB w dawce 25  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  (Tabela 10).

Porównanie stężeń efektywnych perampanelu ze stężeniem perampanelu w ludzkiej krwi

Tabela 11. Stężenie perampanelu we krwi zdrowych ochotników po jednorazowym podaniu perampanelu drogą doustną

Podanie jednorazowe Dawka perampanelu [mg]	Stężenie perampanelu		Piśmiennictwo
	[ng/mL]	[nM]	
1	36,8	105	Badanie CPMS-2007-2011-002
2	60,7	174	
4	123	352	
8	222	636	
12	336	963	

Piśmiennictwo do tabeli 11: Badanie CPMS-2007-2011-002: wyniki w Clinical Pharmacology Review, NDA 202834; (<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/UCM332052.pdf>)

Jak wskazują wyniki dostępne w piśmiennictwie (Tabela 11) stężenie perampanelu uzyskiwane we krwi po podaniu doustnym tej substancji są porównywalne do najmniejszych stężeń efektywnie zmniejszających metabolizm i proliferację ludzkich komórek melanoma w warunkach *in vitro* (Tabela 1–8). To porównanie wskazuje na możliwość zastosowania perampanelu podawanego doustnie w dawkach stosowanych w leczeniu padaczki w profilaktyce i leczeniu czerniaka i jego przerzutów.

Ponadto istnieje możliwość podania perampanelu w iniekcji, np. dożylnie we wlewie 30-minutowym (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03754582>). W terapii przeciwnowotworowej podanie leku dożylnie jest jedną z podstawowych dróg podania ponieważ umożliwia uzyskanie odpowiednio dużego stężenia leku i osiągnięcie optymalnego efektu terapeutycznego.

Istotnie statystyczne zmniejszenie proliferacji komórek melanoma uzyskiwane jest w warunkach *in vitro* w stężeniach nieznacznie wyższych niż stężenia stosowane w leczeniu padaczki, ale możliwych do uzyskania po podaniu doustnym lub innym ogólnoustrojowym. Porównanie stężeń efektywnych perampanelu ze stężeniem perampanelu w zawieszynie. Ponieważ perampanel jest słabo rozpuszczalny w wodzie 0,0056  $\text{mg}/\text{mL}$  (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB08883>) do wytworzenia postaci do stosowania zewnętrznego należy użyć odpowiedniego nośnika.

Analiza składu zawieszyny do stosowania doustnego (Zestawienie 3) wskazuje, że możliwe jest uzyskanie zawieszyny perampanelu przez użycie odpowiednich składników. Stężenie perampanelu w zawieszynie wynosi 0,5  $\text{mg}/\text{ml}$ , co odpowiada stężeniu 1,4  $\text{mM}$ . Stężenie perampanelu w zawieszynie jest ponad 10-krotnie wyższe niż najwyższe stosowane w Przykładzie 1, które powodowały duże zmniejszenie metabolizmu i proliferacji komórek melanoma *in vitro*. Wyniki wskazują, że mimo iż perampanel jest praktycznie nierozpuszczalny w wodzie, jest możliwe uzyskanie zawieszyny perampanelu w stężeniach znacznie przewyższających stężenia efektywne w warunkach *in vitro*.

W przeprowadzonych badaniach perampanel zawieszano w DMSO i worteksomano przez 5 min. Najwyższe stężenie perampanelu osiągnięte w eksperymencie wynosiło 50  $\text{mM}$ . Poprzez dodanie odpowiedniej ilości roztworu wyjściowego perampanelu do DMSO i worteksomowanie przez 1–5 min uzyskano kolejne stężenia: 100  $\text{nM}$  oraz 100  $\mu\text{M}$ . Rozcieńczenia końcowe (100  $\text{pM}$ , 100  $\text{nM}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) przygotowywano w HBSS lub podłożu hodowlanym z surowicą w zależności od zastosowanego modelu eksperymentalnego poprzez dodanie odpowiedniej ilości roztworu wyjściowego perampanelu do HBSS lub podłoża hodowlanego z FBS i worteksomowaniu przez 1–5 min, a całkowite stężenie DMSO w próbkach końcowych było niższe niż 0,2%.

W farmakoterapii, zewnętrzne zastosowanie leku bezpośrednio na powierzchnię skóry pozwala na uzyskanie wysokich miejscowych stężeń leku. Można wnioskować, że zewnętrzne zastosowanie perampanelu na powierzchnię skóry pozwoli na uzyskanie wysokich miejscowych stężeń perampanelu, takich, które zmniejszają metabolizm i proliferację komórek czerniaka *in vitro*, co wykazano w Przykładzie 1 (Tabela 1–8).

Przedmiotem wynalazku jest także kompozycja farmaceutyczna w postaci półstałych preparatów zawierająca perampanel lub jego pochodne w połączeniu z co najmniej jednym nośnikiem lub rozcieńczalnikiem farmaceutycznym, gdzie stężenie terapeutyczne perampanelu wynosi od 0,5% – 10,0% wagowych, korzystnie od 0,5% – 2,0%.

Jako nieograniczający przykład dopuszczalnym nośnikiem może być woda, DMSO, glicerol, glikol propylenowy, wazelina, karbomer.

Kompozycja farmaceutyczna w postaci preparatów półstałych może zawierać emulgatory, promotory wchłaniania (substancje poprawiające wchłanianie substancji aktywnej), substancje zwiększające rozpuszczalność, środki nawilżające, witaminy, konserwanty, p/utleniacze i inne składniki.

Przykłady dopuszczalnych substancji pomocniczych, ale nie są do nich ograniczone, np.:

Do promotorów wchłaniania mogą należeć sulfotlenki (np. DMSO), glikole (np. glikol propylenowy), alkohole tłuszczowe (np. alkohol laurylowy), alkohol (np. etanol), kwas oleinowy.

Do emulgatorów mogą należeć monostearynian glicerolu, poloksamer, alkohol laurylowy, stearynian glicerolu, polisorbaty (np. Tween 20, 40, 60, 80), mirystynian metylu, mirystynian izopropylu, karbomer, alkohol laurylowy.

Do składników fazy wodnej mogą należeć woda, pochodne celulozy (np. metyloceluloza, hydroksyetyloceluloza), glikol polietylenowy (np., PEG 200-PEG 6000) i ich mieszaniny.

Do środków nawilżających mogą należeć glicerol, sorbitol, glikol propylenowy.

Do przeciwutleniaczy mogą należeć wit E, betahydroksytoluen (BHT), betahydroksyanizol (BHA), pirosiarczyn sodu, kwas askorbowy.

Do środków konserwujących mogą należeć gliceryna (20%), sorbinian potasu, parabeny (Nipagina M, Nipagina P), kwas benzoesowy, kwas sorbowy, fenoksyetanol, alkohol benzylowy, chlorek benzalkoniowy, cetrimid.

Do środków regulujących pH mogą należeć dopuszczalne kwasy (np. HCl, kwas mlekowy, fosforowy), zasady (np. trietanolamina, NaOH), bufory (np. bufor fosforanowy, cytrynianowy).

Do środków chelatujących można zaliczyć wersenian disodowy (EDTA), kwas cytrynowy, cytrynian sodu.

W farmakoterapii, zewnętrzne zastosowanie leku bezpośrednio na powierzchnię skóry pozwala na uzyskanie wysokich miejscowych stężeń leku. Miejscowe podanie leku bywa stosowane w leczeniu czerniaka (Erickson C, Miller SJ. Treatment options in melanoma in situ: topical and radiation therapy, excision and Mohs surgery. *Int J Dermatol.* 2010;49(5):482-91. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04423.x).

Przeprowadzona analiza pozwala wnioskować, że zewnętrzne zastosowanie perampanelu na powierzchnię skóry pozwoli na uzyskanie wysokich miejscowych stężeń perampanelu, takich, które zmniejszają metabolizm i proliferację komórek melanoma *in vitro*, co wykazano w badaniach Przykład 1 (Tabela 1– 8).

Przykłady, które objaśniają wynalazek nie ograniczając jego zakresu.

Przykład 2. Żel zawierający perampanel

*Składniki % (w/w)*

Perampanel	0,5%
DMSO	30,0%
Propylenoglikol	10,0%
PEG 400	15,0%
Carbopol 934	1,5%
Wodorotlenek sodu do pH 6,5	85%
Glicerol	do 100,0%

Wykonanie

Kompozycję farmaceutyczną według niniejszego przykładu otrzymano w następujący sposób.

Propylenoglikol połączono z glikolem polietylenowym 400 i mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego. Do mieszaniny dodano część glicerolu, Carbopol 934 i dalej mieszano do całkowitego

rozproszenia. Mieszaninę zneutralizowano za pomocą roztworu wodorotlenku sodu do pH ok. 6,5 powodując żelowanie kompozycji. Następnie dodano perampanel uprzednio rozpuszczony w DMSO i pozostałą częścią glicerolu uzupełniono do 100 g.

Przykład 3. Maść zawierająca perampanel

*Składniki % (w/w)*

Perampanel	0,5%
Alkohol cetylostearylowy	18,0 %
Parafina ciekła	21,0%
Wazelina biała	21,0%
DMSO	30,0%
Hydroksybenzoesan metylu	0,1%
Woda oczyszczona	do 100,0 %

Kompozycje farmaceutyczną według niniejszego przykładu otrzymano w następujący sposób.

Alkohol cetylostearylowy, parafinę ciekłą oraz wazelinę białą stopiono w parownicy na łaźni wodnej. Perampanel i hydroksybenzoesan metylu rozpuszczono w DMSO, powoli dodano do fazy olejowej, następnie dodano przy ciągłym mieszaniu na mieszadle magnetycznym wodę oczyszczoną.

Przedstawione przykłady wskazują, że perampanel może być użyty do wytworzenia leku stosowanego do zapobiegania powstawaniu lub leczenia chorób skóry polegających na nadmiernym łuszczeniu się naskórka, ponieważ zmniejsza metabolizm i proliferację komórek czerniaka. Zmniejszenie zdolności proliferacyjnej komórek czerniaka jest jednym z celów terapeutycznych w leczeniu czerniaka lub zapobieganiu przerzutom czerniaka.

Przedstawione przykłady wskazują, że perampanel może być wytworzony w postaci leków do podawania wszystkimi dostępnymi drogami podawania leków, w tym: drogą parenteralną (dożylnie, podskórną, domięśniowo, do jam ciała), drogą alimentarną (doustnie, dożołądkowo, dojelitowo, doodbytniczo), drogą wziewną, drogą przezskórną oraz zewnętrzną. Postać leku sporządza się znanymi w przemyśle farmaceutycznym sposobami. Postać farmaceutycznie dopuszczalną kompozycji w rozumieniu niniejszego opisu stanowi dowolna jej postaci nie powodująca działań niepożądanych.

Przedstawione przykłady wskazują, że perampanel mogą być użyte do wytworzenia leku stosowanego do zapobiegania powstawaniu lub leczenia czerniaka i jego przerzutów, ponieważ zmniejsza metabolizm i proliferację komórek czerniaka zarówno wyizolowanych z guza pierwotnego, jak też przerzutów czerniaka. Zmniejszenie zdolności proliferacyjnej komórek nowotworowych jest jednym z celów terapeutycznych w leczeniu chorób nowotworowych. Ponadto, przykłady pokazują, że perampanel indukuje śmierć komórkową: apoptozę i nekrozę w komórkach czerniaka zarówno w warunkach podstawowych, jak również w warunkach promieniowania UVB.

Zaletą perampanelu jest możliwość jego stosowania doustnie przez długi okres czasu, co umożliwia jego bezpieczne stosowanie w profilaktyce nawrotu czerniaka np. po jego usunięciu i zapobieganiu tworzenia przerzutów. Perampanel jest stosowany jako lek przeciwpadaczkowy. Istotą farmakologicznego leczenia padaczki jest stosowanie leków w sposób ciągły, niekiedy przez całe życie chorego. Z tego powodu leki przeciwpadaczkowe muszą cechować się niską toksycznością i wywoływaniem tylko umiarkowanych działań niepożądanych, które są dobrze tolerowane przez chorych nawet przy regularnym długotrwałym ich stosowaniu. Perampanel spełnia te wymogi, a w przykładach wykazano, że stosując dawki zalecane w leczeniu padaczki we krwi jest osiągnięte stężenie perampanelu, które zmniejsza metabolizm i proliferację komórek czerniaka.

Dodatkową zaletą perampanelu jest brak interakcji ze światłem UVB. Światło jest czynnikiem sprzyjającym rozwojowi czerniaka i dlatego chorym jest zalecane unikanie nasłonecznienia. Wykazana w przykładach interakcja perampanelu ze światłem umożliwia jego stosowanie bez znacznego ograniczenia codziennej aktywności chorego na czerniaka związanej z przebywaniem w miejscach nasłonecznionych.

Przedstawione przykłady wskazują, że perampanel może być podawany wszystkimi dostępnymi drogami podawania leków, w tym: drogą parenteralną (dożylnie, podskórną, domięśniowo, do jam ciała), drogą alimentarną (doustnie, dożołądkowo, dojelitowo, doodbytniczo), drogą wziewną, drogą przezskórną oraz zewnętrzną. Postać leku sporządza się znanymi w przemyśle farmaceutycznym sposobami. Preparat zawiera perampanel oraz co najmniej jeden nośnik lub rozcieńczalnik farmaceutyczny. W rozumieniu niniejszego opisu postać farmaceutycznie dopuszczalną stanowi dowolna z jej postaci nie powodująca działań niepożądanych.

Proponowane zastosowanie perampanelu w zapobieganiu i leczeniu czerniaka i jego przerzutów stanowi nową opcję terapeutyczną. Obecne leczenie czerniaka polega na postępowaniu chirurgicznym: radykalnym usunięciu ogniska pierwotnego czerniaka z odpowiednim marginesem zdrowej tkanki, a w razie konieczności na usunięciu regionalnych węzłów chłonnych, wznowy miejscowej i przerzutów. W przypadku wystąpienia zmian mnogich, nieresekcyjnych może być zastosowane leczenie miejscowe (metody ablacyjne, radioterapia, krioterapia), immunoterapia doguzowa lub miejscowa, elektrochemioterapia lub leczenie systemowe. Obecne leczenie farmakologiczne opiera się na stosowaniu leków wpływających na układ immunologiczny (immunoterapia), stosowaniu chemioterapeutyków głównie o działaniu cytotoksycznym i stosowaniu leków o działaniu ukierunkowanym molekularnie (Rutkowski P, Wysocki PJ, Nasierowska-Guttmejer A i wsp. Cutaneous melanomas. *Oncol Clin Pract* 2017; 13: 241-258. DOI: 10.5603/OCP.2017.0038). Ujawnione działanie perampanelu nie zawiera się w żadnej z wymienionych kategorii leków stosowanych w leczeniu czerniaka i jego przerzutów. Ponadto, obecnie nie ma metody farmakologicznej profilaktyki czerniaka i jego przerzutów. Ze względu na unikalny mechanizm działania perampanelu i akceptowalne potencjalne działania niepożądane związane z jego długotrwałym stosowaniem, stosowanie ogólnoustrojowe lub miejscowe perampanelu i innych antagonistów AMPA może znaleźć zastosowanie w profilaktyce czerniaka i profilaktyce powstawania przerzutów czerniaka.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Perampanel do zastosowania w zapobieganiu powstawaniu lub leczeniu czerniaka przy podawaniu na powierzchnię skóry.
2. Perampanel do zastosowania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jest stosowany u osób narażonych na ekspozycję na światło słoneczne.
3. Perampanel do zastosowania według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jest stosowany w zapobieganiu powstawaniu lub leczeniu przerzutów czerniaka.
4. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca jako substancję czynną perampanel w połączeniu z co najmniej jednym nośnikiem lub rozcieńczalnikiem farmaceutycznym do zastosowania w zapobieganiu powstawaniu lub leczeniu czerniaka, przy podawaniu na powierzchnię skóry, przy czym perampanel występuje w ilości od 0,5% – 10,0% wagowych, korzystnie od 0,5% – 2,0% wagowych.
5. Kompozycja do zastosowania według zastrz. 4 **znamienna tym**, że jest w postaci preparatów półstałych, korzystnie żelu, kremu.
6. Kompozycja do zastosowania według zastrz. 4 **znamienna tym**, że zawiera jako nośnik wodę i/lub DMSO i/lub glicerol i/lub wazelinę i/lub parafinę i/lub karbomer.
7. Kompozycja do zastosowania według zastrz. 4 **znamienna tym**, że zawiera konserwanty, korzystnie parabeny.