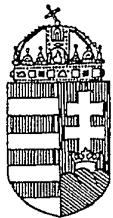


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 711 B

(21) A bejelentés száma: 202/90

(22) A bejelentés napja: 1990. 01. 19.

(30) Elsőbbségi adatok:
89/01346 1989. 02. 02. FR

(51) Int. Cl.⁵

A 61 K 37/66

(40) A közzététel napja: 1991. 02. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 02. 28. SZKV 92/02

(72) Feltalálók:

Brandely, Maud, Párizs (FR)

Lando, Danielle, Párizs (FR)

(73) Szabadalmas:

Roussel Uclaf, Párizs (FR)

**(54) Eljárás petefészekrák kezelésére szolgáló, gamma-interferont tartalmazó
gyógyszerkészítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás hatóanyagként 1×10^7 U/mg fajlagos aktivitású humán gamma-interferon hatású rekombináns polipeptidet tartalmazó intraperitoneális perfúzióval történő adagolásra alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására oly módon, hogy az önmagá-

ban ismert módon előállított hatóanyagot egy vagy több gyógyszerészeti célra alkalmas vivő- vagy hordozóanyaggal és adott esetben egyéb segédanyaggal összekeverik és a keveréket petefészekrák gyógyítására szolgáló gyógyszerkészítménnyé alakítják.

A találmány tárgya eljárás petefészekrák kezelésére szolgáló, gamma-interferont tartalmazó új gyógyszer-készítmények előállítására.

A gamma-interferon antivirális és víruszaporodást gátló tulajdonságain kívül jelentős immunomodulátor hatással is rendelkezik, és ez megkülönbözteti az α - és a β -interferontól. Stimulálja a fagocitasejteket, és ez lehetővé teszi bizonyos daganatos sejtek lebomlását. Több kutató is vizsgálta már a gamma-interferon toleranciát terminális stádiumban lévő rákos betegeknél, azonban ezeknek a rákoknak a javulását nem tudták megfigyelni. Például Vadhan-Raj S. és munkatársai: *J. Clin. Oncol.* 4(2), 137–146 (1986) intravénásan és intramuszkulárisan adagoltak 2×10^7 U/mg fajlagos aktivitású rekombináns gamma-interferont. Rákos betegek között petefészekrákban szenvedő nem volt. Számottevő javulást nem észleltek. Van Der Burg M. és munkatársai: *J. Biol. Resp. Mod.* 4, 264–272 (1985) intravénásan adagoltak 3×10^7 U/mg fajlagos aktivitású rekombináns gamma-interferont 20 betegnek, akikből kettő petefészekrákban szenvedett. A betegség súlyosbodását figyelték meg.

A WO 87/05518 számú nemzetközi szabadalmi bejelentésben ismertetik a gamma-interferon in vitro hatékonyságát különféle friss emberi rákos sejtekre, többek között a petefészek rákos sejttelepeire. A vizsgálatot Hamburger és munkatársai írták le, és „Human Tumor Cloning Assay (HTCA)” néven vált ismertté. A vizsgálat alapján a petefészekrák-sejttelepek mindössze 30%-a reagál az alkalmazott gamma-interferonra, amelynek sem a fajlagos aktivitását, sem az eredetét nem közlik. Az in vitro eredményekből következtetéseket kívánnak levonni arra vonatkozólag, hogy in vivo a betegek reagálnak vagy sem a gamma-interferon-adagolásra. Megállapítják, hogy az in vitro eredményekből következtetések vonhatók le ezzel kapcsolatban. Ezen megfigyelések következtében számos klinikai vizsgálatot végeztek, különösen petefészekrákban szenvedő betegeken. A gamma-interferon in vivo hatását azonban nem sikerült megfigyelni sem intravénás adagolással [Welander C. E. és munkatársai: *Am. J. Clin. Oncol.* 11(4), 465–469, (1988) $2,7 \times 10^4$ U/mg fajlagos aktivitású gamma-interferont adagoltak intravénásan petefészekrákban szenvedő betegeknél, azonban 14 betegből mindössze négyen reagáltak és ezeknél a betegeknél sem lehetett bizonyítani a hatékonyságot], sem intraperitoneális adagolással. D'Acquisto R. és munkatársai: *J. Clin. Oncol.* 6, 689–695, (1988) 2×10^6 U/mg fajlagos aktivitású rekombináns gamma-interferont adagoltak intraperitoneálisan különböző dózisokban legfeljebb 24 hétig. Semmilyen objektív reakciót nem tudtak megfigyelni a 24 értékelhető betegnél. Lásd a 694. oldalon 2. oszlopban. A szerzők az eredményekből azt a következtetés vonják le, hogy az objektív reakció hiánya az alkalmazott legnagyobb dózisoknál tapasztalható toxicitás, valamint a várható költségek miatt nem látszik kívánatosnak a dózis további növelése. A jövőben a gamma-interferon és más rákellenes szerek kombinált kipróbálása látszik kívánatosnak.

Általánosan elfogadottá vált az a nézet, hogy a gamma-

interferon rákellenes hatása csak egyéb gyógyhatású anyagokkal együtt történő adagolása esetén figyelhető meg, Saito T. és munkatársai: *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 19, 233–239, (1989) például in vitro vizsgálatban $2,8 \times 10^7$ U/mg fajlagos aktivitású gamma-interferon hatását vizsgálták önmagában és más citotikus szerekkel együtt. A kísérleteikből azt a következtetést vonják le, hogy az in vitro vizsgálat különösen abból a szempontból értékes, hogy ennek alapján ki lehet választani azokat a betegeket, akik a rákellenes szerekre in vivo valószínűleg nem reagálnak. Ugyanakkor kevésbé tartják valószínűnek, hogy a gamma-interferon önmagában alkalmas lenne petefészekrák kezelésére. Vizsgálataikat a fentebb már említett HTCA eljárással végezték.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a szakirodalmi publikációkból a gamma-interferon hatástalansága derül ki klinikai vizsgálatok alapján, mind $2,4 \times 10^7$ U/mg fajlagos aktivitásnál nagyobb fajlagos aktivitású interferon adagolásakor intravénás úton, mind 2×10^6 U/mg fajlagos aktivitású interferon adagolása esetén intraperitoneális úton. Ugyancsak nem várható a hatékonyság az in vitro kísérletek alapján. A szakirodalomból következik, hogy a gamma-interferont rákellenes kezelésre más rákellenes hatóanyagokkal kombinálva lehet használni.

Találmányunk azon a meglepő felismerésen alapul, hogy a fentiekkel ellentétben intraperitoneálisan adagolt, legalább 1×10^7 U/mg fajlagos aktivitású gamma-interferonok hatnak a petefészekrákra.

A találmány szerint egy ismert módon előállított rekombináns polipeptidből, amelynek humán gamma-interferon hatása van, gyógyászati készítményt állítunk elő, amely intraperitoneálisan perfúzióval adagolható, és amellyel a petefészekrák hatékonyan kezelhető. Az „ismert módon előállított” kifejezés a találmány elsőbbségi napja előtt publikált eljárásokat öleli fel. A találmány szerint felhasznált polipeptid olyan termék, amelynek fajlagos hatása legalább 1×10^7 U/mg. Az eredményeink ellentmondanak a D'Acquisto R. által publikált eredményeknek, amely szerint a rekombináns gamma-interferon intraperitoneálisan perfúzióval adagolva nem hatékony a makacs petefészekrákok kezelésében. A találmányunkban ismertetjük a humán gamma-interferon alkalmazását egy olyan kezelésben, amelynek a hatékonyságára jellemző egy 58%-os reagálás, intraperitoneális adagolás esetén perfúzióval olyan petefészekrákban szenvedő betegeknél, akiknek kimetszéses műtét és kemoterápiás kezelés után visszamaradó tumoros sérüléseik vannak. A találmány szerint alkalmazott rekombináns termékek fajlagos aktivitása legalább 1×10^7 U/mg a hagyományos módszerrel meghatározva úgy, hogy mérjük az antivirális aktivitást összehasonlítva egy NIH etalonmal a hólyagos szájgyulladás vírusával fertőzött Wish humán sejteken, és így hatékony dózist lehet adagolni, amely alacsonyabb a mg-termékben kifejezett legnagyobb tolerált dózisonál. A találmány szerint tehát olyan rekombináns polipeptideket használunk, amelyeknek gamma-interferon típusú hatásuk van, és amelyek igen nagy tisztaságúak.

A találmány szerint előállított gyógyászati készítmények előnyösen egy rekombináns humán gamma-interferont tartalmaznak, vagyis olyat, amelyet a rekombináns ADN technológiával állítunk elő, például Gray és munkatársai módszerével, amelyet a Nature, 295, 503–508 (1982) irodalmi helyen írt le, vagy amely a 77 670 számú európai szabadalmi leírásból ismert, vagy ezen termékek alléljait vagy származékait tartalmazzák, például a 161 504 számú európai szabadalmi leírás szerint. Ezután ismert tisztítási eljárásokat alkalmazunk [1. Kung és munkatársai: Methods in Enzymology 119, 204–210 (1986)], amelyekkel a nagy tisztaságú termékek előállíthatók. A gamma-interferont egy E. coli törzsből állítjuk elő, amely 143 a természetes gamma-interferon szekvenciának megfelelő aminosavat tartalmaz, plusz egy N-terminális metionint.

A találmány szerint előállított gyógyszerkészítményt, amely humán gamma-interferon típusú hatással rendelkező rekombináns polipeptidet, előnyösen gamma-interferont tartalmaz, $10\text{--}50 \times 10^6$ U/m², előnyösen 20×10^6 U/m² dózisban adagoljuk injekcióval.

A találmány szerint előállított gyógyszerkészítményt, amely az alkalmazott polipeptidet, előnyösen a gamma-interferont tartalmazza, ismételtlen kell adagolni legalább a hét két egymást nem követő napján, legalább két hónapon keresztül, még előnyösebben három hónapig.

Az alkalmazott dózis, az injekció gyakorisága és a kezelés időtartama a beteg állapotának a függvénye. A találmány szerint előállított gyógyszerkészítmény, amely az alkalmazott humán gamma-interferon típusú hatással rendelkező rekombináns polipeptidet, előnyösen a gamma-interferont tartalmazza, előnyösen liofilizált 0,2–1 mg hatóanyagot tartalmazó dózisflakonokban, amelyet desztillált vízben oldunk fel injektlás előtt. A kapott oldatot azonnal hígítjuk egy olyan oldattal, amely biztosítja a hatóanyag injektlás alatti stabilitását, például 0,9 tömeg%-os nátrium-klorid oldattal.

A következőkben a találmányunkat példával is illusztráljuk.

Intraperitoneális injektlásra való készítményt állítunk elő a következő összetétellel:

gamma-interferon	1 mg
vivőanyag	50 mg
steril víz	4,1 ml
0,9 tömeg%-os nátrium-klorid oldat	250 ml.

5 Kung, H-F és munkatársai által a Methods of Enzymology 119, 204–210 (1986) irodalmi helyen leírt eljárással előállított és tisztított gamma-interferont alkalmazunk, amelynek fajlagos hatása 2×10^7 U/mg, a dózis 20×10^6 U/m², az injektlás gyakorisága hetenként kétszer, és az adagolás időtartama 4 hónap. Ez összesen azt jelenti, hogy 72×10^6 U/m² és 36 mg/m² gamma-interferont adagolunk összesen intraperitoneálisan a betegnek.

10 A következő eredmények illusztrálják a találmányunkat:

15 A vizsgálatot olyan betegeken végeztük, akiknek különböző méretű, a mikroszkopikustól a több mint 20 mm-es nagyságig visszamaradó tumoros sérüléseik voltak sebészki kimetszés és kemoterápiás kezelés után, amelynek hatékonyságát a teljes gyógyuláshoz viszonyítva 20%-ra becsültük egy második műtétkor elvégzett szövettani vizsgálat alapján.

20 A találmány szerint előállított gamma-interferon tartalmú készítményeket hetenként kétszer 2–4 hónapig injektlóval adagoljuk $20\text{--}10^6$ U/m², vagyis 1 mg/m² dózisban intraperitoneálisan ambuláns kezelésen.

25 A fent ismertetett készítményt alkalmazzuk, amely 1 mg hatóanyagot tartalmaz, és amelyet egy 2 órát meg nem haladó időtartamig perfúzióval juttatunk a betegbe, miután előzetes dialízis folyadékot adagoltunk perfúzióval a beteg állapota függvényében 1-2 liter mennyiségben. A dialízis folyadék Dianéal^R 137, amely 1,36 tömeg% glükózt tartalmaz, és a TRAVE-NOL terméke.

30 A betegek reagálását laparotómiával a korábban megtámadott helyekből vett biopsziák és a véletlenül vett biopsziák makroszkopikus és szövettani vizsgálatával határoztuk meg.

35 12 betegen végezve a vizsgálatot a következő reakciókat kaptuk.

Páciens	A sérülés mérete	A kezelés időtartama hónapban	Reakció (*)
201	≥20	4	S
301	mikro	3	P
503	mikro	4	RC
801	<5	4	P
803	<20	3	RP
1001	>20	4	S
1002	<20	3	RC
1004	<5	2,5	RC
1101	mikro	4	RC
1102	mikro	4	P

Páciens	A sérülés mérete	A kezelés időtartama hónapban	Reakció (*)
1901	mikro	4	RP
1902	mikro	4	RP

Megjegyzés:

(*)= S : stabilizáció

P : progresszió

RC : teljes reakció

RP : részleges reakció.

Az eredmények azt mutatják, hogy négy esetben teljes gyógyulás következett be, és három esetben részleges gyógyulás, vagyis a reagálás aránya 58 %-os.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hatóanyagként 1×10^7 U/mg fajlagos akti-

10 vitású humán gamma-interferon hatású rekombináns polipeptidet tartalmazó intraperitoneális perfúzióval történő adagolásra alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az önmagában ismert módon előállított hatóanyagot egy vagy több gyógyszerészeti célra alkalmas vivő- vagy hordozóanyaggal és adott esetben egyéb segédanyaggal összekeverjük és a keveréket petefészekrák gyógyítására szolgáló gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

15 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy polipeptidként gamma-interferont alkalmazunk.