(19) Országkód:

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

214 326 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 92 02023
(22) A bejelentés napja: 1992. 06. 17.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/717,773 1991. 06. 18. US

(51) Int. Cl.[6]

A 61 K 31/445

(40) A közzététel napja: 1993. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1998. 03. 02.

(72) Feltalálók:
Harrington, William Joseph, Miami, Florida (US)
Miller, Glenn Alvin, Miami, Florida (US)
Rabin, Mark Barry, Miami, Florida (US)

(73) Szabadalmas:
American Home Products Corp., Madison, New Jersey (US)

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

(54) **Eljárás felnőtt T-sejt leukémia/limfóma kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás hatóanyagként rapamicint tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, amelynél az ismert módon előállított rapamicint gyógyszerészeti vivő- vagy hordozóanyagokkal és adott esetben egyéb segédanyagokkal összekeverik és a keveréket emlősök, felnőtt T-sejt leukémia/limfóma (ATL) kezelésére alkalmas gyógyszerkészítménnyé alakítják.

HU 214 326 B

A találmány tárgya eljárás felnőtt T-sejt leukémia/limfóma kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására.

A felnőtt T-sejt leukémia/limfóma (ATL) agresszív hematológiai megbetegedés, amelyre jellemző a gyors, mindig végzetes kimenetel. Az ATL klinikai jellemzői közül megemlítjük a hiperkalcémiát, a csontvelőinfiltrációt, az általános nyirokcsomó-duzzanatot, leukémiát, bőrproblémákat, máj- és lépmegnagyobbodást és a lassan oldódó csontkárosodásokat.

Az ATL etiológiai hatóanyaga a humán T-limfotróp vírus 1 (HTLV-1). A HTLV-1 és az ATL közötti kapcsolatra számos bizonyíték van, többek között az ATL megbetegedések járványszerű felszaporodása olyan földrajzi vidékeken, amelyekre jellemző a HTLV-1 infekció [lásd Hinuma, Y., Proc. Natl. Acad. Sci. 78 : 6476 (1981); Watanabe, T., Virology 133 : 238 (1984); Catovsky, D. Lancet 1 : 639 (1982); Blattner, W.A., Int. J. Ca. 30 : 257 (1982)], az ATL-ben szenvedő betegek szérumában a specifikus antitestek gyakori előfordulása [lásd Hinuma, Y., Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 6476 (1981)], az ilyen betegségben szenvedő betegek leukémiás sejtjeiben a monoklonálisan integrált provírus szekvenciák kimutatása [lásd Yoshida M., Proc. Natl. Acad. Sci. 81 : 2534 (1984)], valamint a leukémiasejttenyészetekből a fertőző vírus izolálása [lásd Poiesz, B.J., Proc. Natl. Acad. Sci. 77 : 7415 (1980); Yoshida, M., Proc. Natl. Acad. Sci. 79 : 2031 (1982)].

A HTLV-1 vírussal átalakított T-sejtekre jellemző a kontrollálatlan burjánzás antigén stimuláció hiányában. Az IL-2től független növekedés ezen sejtekre utaló jel a tenyészetben. Ezeknek a sejteknek a sejtfelület fenotípusát uralja az IL-2 receptorok lényeges megnövekedése. A közelmúltban kimutatták, hogy ezek a receptorok nagyon nagy IL-2R affinitással rendelkeznek. A vizsgált fertőzött egyedekből izolált T-sejtek többsége azonban nem reagált az exogén úton hozzáadott IL-2-re [lásd Kodaka T., Jpn. J. Ca. Res. 81 : 902 (1990)].

A HTLV-1-rál ismert, hogy szexuális úton, anyától gyermekre szoptatással, az intravénás kábítószer-fogyasztók között (valószínűleg a fertőzött tűk egymás közötti használata révén) és vérátömlesztéssel terjed [lásd Hino, S., Gann 76: 474 (1985); Murphy, E.L., Ann. Int. Med. 111: 555 (1989); Sato, H., Int. J. Ca. 37: 395 (1986); Robert-Guroff, M., J.A.M.A., 255: 3133 (1986)]. Annak a veszélye, hogy a vírusfertőzés ATL betegséget okoz, egy életen át megközelítőleg 4% [lásd Murphy, E.L., Ann. Int. Med. 111: 555 (1989)].

A HTLV-1 fertőzés gyakorisága az Egyesült Államok lakói között a közelmúltban vált közegészségügyi problémává. Az Egyesült Államok nagyvárosaiban elvégzett járványügyi vizsgálat kimutatta, hogy egészséges véradók szérumában az átlagos elterjedési gyakoriság 0,025% [lásd Williams, A.E., Science, 240: 643 (1988)]. Újabb járványügyi adatok szerint Brooklinban, New Yorkban, egészséges négerek között 4,4%-os a szérum pozitív eredmény. Ez azt mutatja, hogy a szérumban az elterjedtség lényegesen változhat a vizsgált népesség függvényében [lásd Dosik, H., Proc. Am. soc. Clin. Oncol. 9: 2 (1990). Országos átlagban a prostituáltak között a fertőzöttség 6,7%os] [lásd Khabbaz J.A.M.A., 263 : 60 (1990)]. Ez az átlag a Nevadában talált 0% és a New Jersey állam-beli Newark-ban talált 25,4% közötti értékek átlaga. Ez azt jelzi, hogy még a legnagyobb veszélynek kitett csoportok között is igen nagy az eltérés.

Nemzetközi vonatkozásban a HTLV-1 a föld bizonyos területein az adott helyre jellemző arányban van jelen. Japán délnyugati szigeteiről régóta ismert, hogy az egy endémiás terület a HTLV-1 fertőzöttség szempontjából [lásd Jpn. J. Clin. Oncol. 15: 517 (1985)]. Így például Kiushu megye déli részén egészséges önkéntes véradók 8%-áról mutatták ki a szérumban a fertőzöttséget [lásd Maeda, Y., Int. J. Ca. 33 : 717 (1984)]. Jamaikában 30 éven felüli női felszolgálóknál a 9,2%-ukban találtak fertőzést [lásd Murphy, E.L., Ann. Int. Med. 111 : 555 (1989)]. Hasonló korú nőknél Jamaikában, egy szexuálisan fertőző betegségeket kezelő klinikán a szérumban a gyakoriság 14,1%-os. A vírussal való fertőzés rizikófaktorai megfelelnek a szexuálisan terjedő betegségek hasonló mutatóinak.

Annak ellenére, hogy a HTLV-1 fertőzés kimutatására ismertek bizonyos szerológiai és molekuláris genetikai vizsgálatok, az ATL korai diagnózisára jelenleg nem ismeretes módszer. Jelenleg nem ismeretes a késői stádiumú betegség hatékony gyógykezelése és ily módon a diagnózis utáni átlagos túlélési idő kevesebb mint 6 hónap. Számos sikertelen próbálkozás történt a betegség gyógyítására, így besugárzás, metotrexátos, leukovorinos, interferon SQ-val végzett, nagydózisú szteroidokkal és ciklofoszfamidot, adriamicint, onkovint és prednizont tartalmazó kombinációkkal és bleomicin terápiával végzett próbálkozások [lásd Harrington, J. Aids 4: 284 (1991)]. Az ATL eredményes kezeléséről számoltak be 5UN4800-zal (amely rekombináns gamma interferon) [lásd Ishihara, K.J. Invest. Dermatol. 93: 556 (1989)]. Tíz ATL-ben szenvedő beteg közül háromnál 90%-os javulást tapasztaltak anti-Tac segítségével, amely egy egér antitest a humán p55 IL-2 receptor peptiddel szemben (Tac; CD25). [Lásd Junghans, R., 37: 861A (1989)].

A rapamicinról, amely egy makrociklusos trién antibiotikum, amelyet a Streptomyces hydroscopicus állit elő [lásd 3,929,992. sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás], ismert, hogy megakadályozza az albumin allergiás behatásra adott válaszként a humorális (IgE-szerű) antitestek képződését [lásd Martel, R., Can. J. Physiol. Pharm. 55 : 48 (1977)], gátolja a patkány T-sejt aktiválást [lásd Strauch, M., FASEB 3: 3411 (1989)] és meghosszabbítja a hisztoinkompatibilis rágcsálókban a szervátültetések túlélési idejét [lásd Morris, R., Med. Sci. Res. 17: 877 (1989)].

A találmány tárgya eljárás hatóanyagként rapamicint tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, azzal jel-

lemezve, hogy az ismert módon előállított rapamicint gyógyszerészeti vivő- vagy hordozóanyagokkal és adott esetben egyéb segédanyagokkal összekeverjük és a keveréket emlősök, felnőtt T-sejt leukémia/limfóma (ATL) kezelésére alkalmas gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

Ismert módon a találmányunk elsőbbségi napjáig ismertté vált eljárásokat értjük.

A találmány szerint előállított gyógyszerkészítménnyel az ilyen betegségben szenvedő emlősök felnőtt T-sejt leukémiáját/limfómáját (ATL) lehet kezelni, oly módon, hogy az emlősnek burjánzást gátló mennyiségben rapamicint adagolunk orálisan, parenterálisan, intranazálisan, intrabronchiálisan, topikálisan, transzdermálisan vagy rektálisan. A rapamicin azon képessége révén, hogy a HTLV-1-gyel átalakított T-sejtek burjánzását gátolja, képes megállítani az ATL kifejlődését és kiváltani a javulását.

A rapamicin ATL-re gyakorolt hatását egy in vitro farmakológiai vizsgálati eljárással állapítottuk meg, amelynél tíz humán HTLV-1-gyel átalakított T-sejt vonalat használtunk, amelyeket ATL-ben szenvedő betegekből tenyésztettünk. Ezek a sejtvonalak jelenleg embernél a legjobb ATL modellek. Összehasonlítás céljára a ciklosporin A-t (CsA) is értékeltük. Az alkalmazott eljárást és a kapott eredményeket a következőkben ismertetjük.

ATL sejtvonalakat hozunk létre ismert módon. ATLSS, ATL3I és ATLIK-t hozunk létre Hoshino eljárása szerint [lásd Proc. Natl. Acad. Sci, 80: 6061 (1983)]. A 31008, 31009, 310016 és AT(EGG) sejtvonalakat HTLV-i-gyel fertőzött egyének perifériás véréből készítettük, a velőből vett vérlimfocitákkal történő együttes tenyésztéssel. A MALN sejtvonalat egy HTLV-1-gyel fertőzött ATL beteg limfoid tumorszövetéből izoláltuk a Jackson Memorial/University of Miami Medical Center-ben [lásd Harrington, W.J., Jr., J. Acq. Imm. Def. Dis., 4: 284 (1991)]. A BL és GP primer kultúrákat ATL betegek perifériás véréből iniciáltuk. Az MALN, BL és GP sejtvonalakat együttes tenyésztés nélkül iniciáltuk.

A sejtek koncentrációját 1×10^6 sejt/ml-re állítottuk be RPMI 1640-ben 15% szarvasmarha magzati szérummal és 50 U/ml penicillinnel, 50 μg/ml sztreptomicinnel és 2 µmól glutaminnal egészítettük ki.

A rapamicin és CsA koncentrációt abszolút etanollal 1 mmólra hígítottuk, majd az ezt követő hígításokat tenyésztőközegben végeztük. Az értékelt hatóanyag-koncentráció-tartomány 1 µmól és 100 fM közötti volt. A tenyészeteket 37 °C-on 5% CO_2-vel 24 órán keresztül, majd 4 órán keresztül majd újabb 4 órán keresztül 0,5 µCi tríciummal jelzett timidinnel. A timidin-beépülést folyadékszcintillációs méréssel határoztuk meg, az eredményeket beütés/perc (cpm)-ben fejezzük ki. Az egyes koncentrációknál 4 értékelés átlagából kapott eredményeket a százalékos gátlás meghatározására összehasonlító értékekhez hasonlítjuk. A következő képletet használjuk a százalékos gátlás számítására:

$$\text{százalékos gátlás} = \frac{\text{cpm[hatóanyag nélkül]} - \text{cpm[hatóanyag]}}{\text{cpm[hatóanyag nélkül]}} \times 100$$

A rapamicinnel kapott százalékos gátlásokat az 1. táblázatban tüntetjük fel.

1. táblázat

ATL sejtburjánzás százalékos gátlása

Rapamin koncentráció	Sejtvonal ATL 3I	ATL 5S	AT-L1K	AT-EGG	31008	31009	31016	MALN	GP	BL
1µM	28	59	19	58	69	71	59	55	54	80
100 nM	17	58	32	60	68	70	56	54	46	79
10 nM	15	49	18	45	58	67	49	41	46	76
1 nM	18	48	26	53	54	68	48	43	42	73
100 pM	11	47	23	49	45	61	49	37	39	65
1 pM	11	14	15	48	30	59	50	36	20	56
100 fM	7	36	15	44	29	60	44	36	23	51

A rapamicin a tíz ATL sejtvonalból nyolcnál gátolta a burjánzást 100 nm vagy annál nagyobb koncentrációban, de négy esetben legalább 50%-ban csökkentette a burjánzást már 1 nm koncentrációban is. Mindkét olyan sejtvonal, amelyben a rapamicin nem gátolta a sejtburjánzást, már több mint 5 éve újraklónozás nélkül volt a tenyészetben. Az a tény, hogy ezek nem reagáltak a rapamicinre, magyarázható esetleg azzal, hogy ezek tovább alakultak ezalatt az idő alatt más érzéketlen klónokká. Összehasonlításul a CsA nem gátolta a sejtburjánzást a tíz vizsgált sejtvonal közül hét esetben. A többi három sejtvonal esetén (ATL3I, ATLSS és 31009) a burjánzást sorrendben 16, 23 és 22%-ban gátolta a CsA.

A fenti standard farmakológiai vizsgálati eljárásban kapott eredmények azt mutatják, hogy a rapamicin gátolja a HTLV-1-gyel átalakított T-sejtvonalak burjánzását, amelyek pillanatnyilag a humán ATL legjobb modelljei, tehát a rapamicin jól használható az ATL kezelésében.

Az ATL kezelésében történő felhasználáshoz a rapamicint alkalmazhatjuk önmagában vagy egy gyógyszerészeti hatóanyaggal kiszerelve az ATL-ben szenvedő emlősnek adagolva. A gyógyszerészeti vivőanyag lehet szilárd vagy folyékony.

A szilárd vivőanyagok között lehetnek olyan anyagok, amelyek egyúttal ízesítőanyagok, kenőanyagok, oldékonyságot elősegítő vagy szuszpendálást elősegítő szerek, töltőanyagok, csúszást elősegítő szerek, préselési segédanyagok, kötőanyagok vagy tablettaszétesést elősegítő szerek; lehetnek a vivőanyagok továbbá kapszulázóanyagok is. Porok esetén a vivőanyag finomeloszlású szilárd anyag, amely a finomeloszlású hatóanyaggal összekeverve alkalmazandó. Tabletták esetén a hatóanyagot megfelelő arányban összekeverjük a szükséges préselési tulajdonságokkal rendelkező vivőanyaggal és a keveréket a kívánt méretűre és alakra formáljuk. A megfelelő szilárd vivőanyagok közül példaként megemlítjük a következőket: kálcium-foszfát, magnézium-sztearát, talkum, cukrok, laktóz, dextrin, keményítő, zselatin, cellulóz, metil-cellulóz, nátrium-karboxi-metil-cellulóz, polivinil-pirrolidon, alacsony olvadáspontú viaszok és ioncserélő gyanták.

Folyékony vivőanyagot alkalmazunk, ha oldatokat, szuszpenziókat, emulziókat, szirupokat, elixíreket vagy aeroszol kiszerelésű készítményeket állítunk elő. A hatóanyagot feloldhatjuk vagy szuszpendálhatjuk egy gyógyszerészetileg alkalmas folyékony vivőanyagban, például vízben, szerves oldószerben, a kettő keverékében, vagy gyógyszerészetileg alkalmazható olajban vagy zsírban. A folyékony vivőanyag tartalmazhat egyéb gyógyszerészeti adalékokat, például oldékonyságot elősegítő és emulgeálószereket, puffereket, konzerválószereket, édesítőszereket, ízesítőanyagokat, szuszpendálást elősegítő szereket, sűrítőszereket, színezékeket, viszkozitásszabályozókat, stabilizátorokat vagy ozmoregulátorokat. Az orális és parenterális adagolásra alkalmas folyékony vivőanyagok közül példaként megemlítjük a következőket: víz (részben tartalmazhat valamely fent említett adalékanyagot, például cellulózszármazékot, előnyösen nátrium-karboxi-metil-
-cellulóz oldatot), alkoholok (többek között egyértékű vagy többértékű alkoholok, például glikolok) és származékaik, olajok, (például frakcionált kókuszdióolaj vagy mogyoróolaj). Parenterális adagoláskor a vivőanyag lehet olajos észter, például etil-oleát vagy izopropil-mirisztát is. A parenterális adagolásra alkalmas steril folyékony készítményekhez steril folyékony vivőanyagokat használunk. Az aeroszol készítményekhez a folyékony vivőanyag lehet például halogénezett szénhidrogén vagy más, gyógyszerészetileg alkalmas hajtógáz.

A steril oldatok vagy szuszpenziók formájában elkészített folyékony gyógyszerkészítményeket használhatjuk például intramuszkuláris, intraperitoneális vagy szubkután injekció formájában. A steril oldatok adagolhatók intravénásan is. A vegyület adagolható orálisan is, akár folyékony, akár szilárd készítmény formájában.

A rapamicint adagolhatjuk rektálisan is, hagyományos kúp formájában. Intranazális vagy intrabronchiális belélegzés vagy befújás formájában történő adagoláshoz a rapamicint vizes vagy részlegesen vizes oldat formájában szerelhetjük ki, amelyet azután aeroszol formájában lehet alkalmazni. A rapamicin adagolható transzdermálisan is, transzdermális tapasz formájában, amely a hatóanyagot és egy olyan vivőanyagot tartalmaz, amely a hatóanyaggal nem reagál, a bőrre nem mérgező és lehetővé teszi a hatóanyag-leadást a bőrön keresztül a vérbe történő szisztemikus abszorpció útján. A vivőanyag bármilyen formájú lehet, például krém, kenőcs, paszta, gél vagy hatóanyag-leadó szerkezet. A krémek és kenőcsök lehetnek viszkózus folyadékok vagy akár olaj-a-vízben akár víz-az-olajban típusú félszilárd emulziók. Pasztát készíthetünk például úgy, hogy abszorptív porokat a hatóanyagot tartalmazó petróleumban vagy hidrofil petróleumban diszpergálunk. Számos hatóanyag-leadó szerkezet alkalmazható arra a célra, hogy a hatóanyagot a véráramba adja le, ilyenek például a féligáteresztő hártyák, amelyek egy a hatóanyagot tartalmazó tartályt fednek le, a tartályban a hatóanyag lehet önmagában vagy vivőanyaggal együtt, vagy például a hatóanyag-tartalmú mátrixok. Egyéb hatóanyag-leadó szerkezetek is ismertek a szakirodalomból.

A rapamicint adagolhatjuk topikálisan, oldat, krém formájában, gyógyszerészetileg alkalmazható vivőanyagokkal kiszerelve 0,1–5, előnyösen 2 tömeg% hatóanyag-tartalommal.

A szükséges dózis függ az adott alkalmazott készítménytől, az adagolás módjától, a mutatkozó tünetek súlyosságától és a kezelendő egyéntől. A standard farmakológiai vizsgálat során kapott eredmények alapján a tervezett parenterális napi dózis 0,01 μg/kg-tól 10 mg/kg, előnyösen 0,1 μg/kg-tól 2 μg/kg-ig. Ha a rapamicint parenterálisan adagoljuk, akkor előnyös az intravénás adagolási mód. Orális adagolás esetén a tervezett napi dózis 1 μg/kg – 15 mg/kg, előnyösen 0,01 mg/kg – 10 mg/kg. A kezelést általában a vegyület optimális dózisánál alacsonyabb kis dózissal kezdjük.

A dózis ezután növelhető, amíg a körülmények által meghatározott optimális hatást elérjük; az orális, parenterális, nazális vagy intrabronchiális adagolás pontos dózisát az orvos határozza meg a kezelendő egyénnel kapott tapasztalatok alapján. Általában a rapamicint kívánatos olyan koncentrációban adagolni, amely általában hatékony eredményt ad, káros mellékhatások nélkül. A rapamicin adagolható egyetlen adagolásra alkalmas kiszerelési egységben, vagy kívánt esetben a dózis több egységre osztható, amelyet megfelelő számú alkalommal a nap során adagolunk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hatóanyagként rapamicint tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az ismert módon előállított rapamicint gyógyszerészeti vivő- vagy hordozóanyagokkal és adott esetben egyéb segédanyagokkal összekeverjük és a keveréket emlősök, felnőtt T-sejt leukémia/limfóma (ATL) kezelésére alkalmas gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a keveréket parenterális adagolásra alkalmas készítménnyé készítjük ki.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a keveréket intravénás adagolásra alkalmas készítménnyé készítjük ki.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a keveréket orális adagolásra alkalmas készítmény formájában készítjük ki.

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Gyurcsekné Philipp Clarisse osztályvezető
Állami Nyomda Rt. ✆ 260-0451 Fax: 260-3632
E-mail: allami.nyomda@lang.hu – Internet: http://www.lang.hu/allami.nyomda