



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 6279/87

(51) Int.Cl.5

A 61 K 37/66

(22) Indleveringsdag: 30 nov 1987

/(A 61 K 37/66,

(41) Alm. tilgængelig: 03 jun 1988

A 61 K 31:505)

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 05 jul 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 02 dec 1986 GB 8628826

(73) Patenthaver: *Beecham Group p.l.c.; Beecham House; Great West Road; Brentford; Middlesex TW8 9BD, GB

(72) Opfinder: Martin *Cole; GB, Malcolm Richard *Boyd; GB, David *Sutton; GB

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

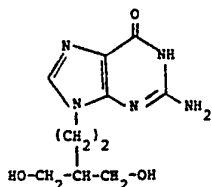
(54) Farmaceutiske produkt og anvendelse af dette til fremstilling af et kombinationspræparat til behandling af virusinfektioner

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

6279-87

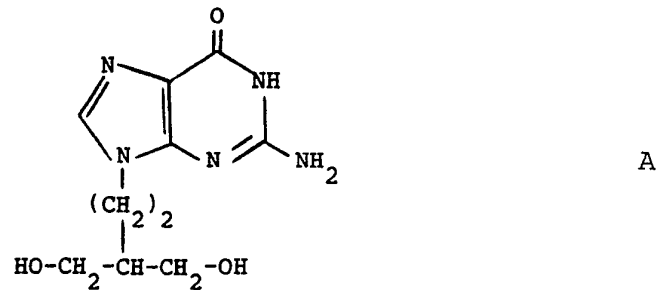
Et farmaceutisk produkt, som omfatter et interferon og en forbindelse med formlen A



eller et prodrug eller et farmaceutisk acceptabelt salt, phosphater og/eller acylderivat af hver af disse, kan benyttes som et kombinationspræparat til samtidig, separat eller successiv anvendelse ved antiviral terapi.

Den foreliggende opfindelse angår farmaceutiske produkter med anti-viral aktivitet.

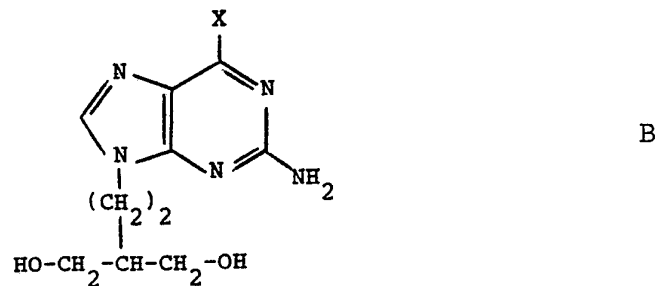
I EP 141927 beskrives en forbindelse med formlen A



5

og salte, phosphatestere og acylderivater deraf som antivirale midler.

Prodrugs af forbindelsen med formlen A har formlen B



10

og salte og derivater deraf som angivet under formel A, hvor X er C₁₋₆-alkoxy, NH₂ eller hydrogen. De forbindelser med formlen B, hvor X er C₁₋₆-alkoxy eller NH₂, er beskrevet i EP 141927, og den forbindelse med formlen B, hvor X er hydrogen, er beskrevet i EP 182024. Et særlig foretrukket eksempel på en forbindelse med formlen B er den, hvor X er hydrogen, og hvor de to OH-grupper er i form af acetylderivater, hvilket er beskrevet i eksempel 2 i EP 182024.

15

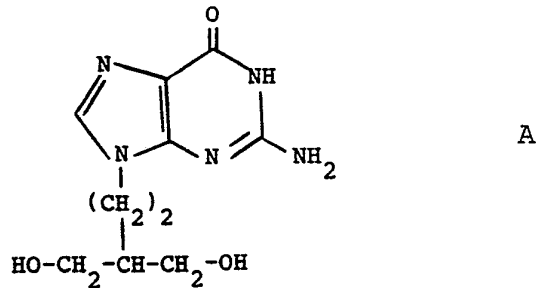
Interferoner er proteiner, der produceres af forskellige typer pattedyrceller eller ved genetiske manipulationsmetoder. Deres egenskaber, kemiske natur og fremgangsmåder til fremstilling og isolering deraf er i de senere år blevet grundigt undersøgt og dokumenteret på grund af deres potentielt værdifulde terapeutiske egenskaber (jfr. E. Knight Jr., "Purification and characterisation of Interferons" i

20

Interferon 2, 1980, red. I. Gressor, Academic Press, London; og Antiviral Research, 6 (1986) 1-17).

Det har nu vist sig, at en kombination af et interferon og en forbindelse med formlen A eller et prodrug eller et farmaceutisk acceptabelt salt og/eller derivat som defineret ovenfor, af hver af disse har god antiviral virkning. Virkningen af kombinationen er større end det, der kunne forventes på grundlag af de antivirale virkninger af bestanddelene hver for sig, og der frembringes tilsyneladende en synergistisk virkning.

10 Den foreliggende opfindelse angår således et farmaceutisk produkt, der omfatter et interferon og en forbindelse med formlen A



15 eller et prodrug eller et farmaceutisk acceptabelt salt, phosphates-ter og/eller acylderivat af hver af disse som et kombinationspræparat til samtidig, separat eller successiv anvendelse ved antiviral terapi. Saltet er fortrinsvis natriumsaltet.

I et foretrukket aspekt administreres de aktive bestanddele i produktet samtidig.

20 Den foreliggende opfindelse angår endvidere et farmaceutisk præparat, der omfatter et interferon og en forbindelse med formlen A eller et prodrug, salt og/eller derivat deraf sammen med en farmaceutisk acceptabel bærer.

25 Opfindelsen angår yderligere anvendelse af et interferon og en forbindelse med formlen A eller et prodrug eller et salt og/eller derivat deraf som angivet ovenfor til fremstilling af et kombinationspræ-

parat til samtidig, separat eller successiv anvendelse ved antiviral terapi.

Udtrykket "acylderivat" omfatter i nærværende beskrivelse og krav et hvilket som helst derivat af forbindelserne med formlen A, hvor én eller flere acylgrupper er til stede. Sådanne derivater er omfattet af definitionen som prodrugs af forbindelserne med formlen A ud over de derivater, som i sig selv er biologisk aktive.

Eksempler på prodrugs, farmaceutisk acceptable salte og derivater er som beskrevet i ovennævnte EP-patentskrifter, hvortil der henvises. Forbindelsen med formlen A kan også være i én af de former, der er beskrevet i EP 216459.

Det er kendt, at interferon findes i flere typer (α , β og γ). En hvilken som helst type interferon kan benyttes i produktet og præparatet ifølge opfindelsen. Interferonkoncentrationer udtrykkes almindeligvis som standard-"enheder", som er internationalt anerkendt og dokumenteret og angiver styrken af en given mængde interferon med hensyn til inhibering af virusreplikation under standardbetingelser.

Interferonet fremstilles fortrinsvis syntetisk, fx ved genetiske manipulationsmetoder, og er i farmaceutisk acceptabel form. "Farmaceutisk acceptabel form" betyder bl.a. med en farmaceutisk acceptabel renhedsgrad uden normale farmaceutiske additiver såsom diluenter og bærere og ikke omfattende materiale, der anses for toksisk i normale dosismængder. En farmaceutisk acceptabel renhedsgrad er generelt mindst 50% uden normale farmaceutiske additiver, fortrinsvis 75%, især 90% og navnlig 95%.

De ovenfor beskrevne produkter og præparater har antiviral virkning og er potentielt anvendelige ved behandling af infektioner, der er forårsaget af herpes-vira såsom herpes simplex type 1-virus, herpes simplex type 2-virus, varicella zoster-virus, Epstein-Barr-virus og cytomegalovirus.

Forbindelserne med formlen A, prodrugs, salte og derivater kan fremstilles som beskrevet i ovennævnte EP-patentskrifter.

Produktet ifølge opfindelsen kan administreres ad oral vej til mennesker og kan formuleres som sirup, tabletter eller kapsler til enten separat, successiv eller samtidig administration. Når produktet eller den ene af de aktive bestanddele deraf er i form af en tablet, kan 5 der anvendes en hvilken som helst farmaceutisk bærer, der er egnet til formulering af sådanne faste præparater, fx magnesiumstearat, stivelse, lactose, glucose, rismel og kridt. Produktet eller den ene af de aktive bestanddele deraf kan også være i form af en slugbar kapsel, fx af gelatine, der indeholder forbindelsen eller forbindel- 10 serne, eller i form af en sirup, en opløsning eller en suspension. Hensigtsmæssige flydende farmaceutiske bærere omfatter ethylalkohol, glycerol, saltopløsning og vand, hvortil der kan være sat smags- eller farvestoffer til dannelselse af sirupper.

Til parenteral administration fremstilles flydende enhedsdosisformer, 15 der indeholder et produkt ifølge opfindelsen eller en aktiv bestanddel deraf og en steril bærer. Produktet eller bestanddelen kan afhængig af bæreren og koncentrationen enten være suspenderet eller opløst. Parenterale opløsninger fremstilles normalt ved at opløse produktet eller bestanddelen deraf i en bærer og filtersterilisere før 20 påfyldning i et hensigtsmæssigt hætteglas eller ampul og forsegling. Med fordel er der også adjuvanter såsom et lokalbedøvende middel, konserveringsmidler og pufningsmidler opløst i bæreren. For at forøge stabiliteten kan præparatet (enkelte bestanddele eller blandet) nedfryses efter påfyldning i hætteglasset, og vandet kan fjernes i vaku- 25 um.

Parenterale suspensioner fremstilles på i det væsentlige samme måde bortset fra, at produktet eller bestanddelen deraf suspenderes i bæreren i stedet for at blive opløst og steriliseres ved udsættelse for ethylenoxid før suspension i den sterile bærer. Med fordel er der 30 i præparatet inkorporeret et overfladeaktivt middel eller et befugtningsmiddel for at lette ensartet fordeling af forbindelsen ifølge opfindelsen.

Foretrukne parenterale formuleringer omfatter vandige formuleringer

under anvendelse af sterilt vand eller normalt saltvand ved en pH på omkring 7,4.

Som det er almindelig praksis, ledsages præparaterne sædvanligvis af skrevne eller trykte brugsanvisninger til den pågældende medicinske
5 behandling.

Præparatet kan også formuleres til topisk påføring på huden eller øjnene. Til topisk påføring på huden kan præparatet være i form af en creme, lotion eller salve. Disse formuleringer kan være konventionelle formuleringer, der er velkendte inden for området, fx som
10 beskrevet i standardværker om farmaceutika og kosmetika såsom Harry's Cosmeticology udgivet af Leonard Hill Books samt British Pharmacopoeia. En særlig fordelagtig formulering til topisk påføring på huden omfatter et detergent, natriumlaurylsulfat, som en yderligere bestanddel. Præparatet til påføring på øjnene kan være et konventionelt øjendråbepreparat, som er velkendt inden for området, eller
15 et yderligere salvepreparat.

Mængden af interferon udtrykkes som nævnt ovenfor almindeligvis i standardenheder. Generelt er præparater, der indeholder ca. 50-500.000 enheder interferon pr. mg af forbindelsen med formlen A eller
20 et prodrug eller et salt, en phosphatester, et acylderivat eller et prodrug deraf, virksomme. Foretrukne præparater er sådanne, der indeholder ca. 1.000-200.000 enheder interferon pr. mg af forbindelsen med formlen A eller et prodrug eller et salt, en phosphatester eller et acylderivat deraf.

25 Produktet ifølge opfindelsen er fortrinsvis i enhedsdosisform eller i en anden form, der kan administreres i en enkelt dosis. En hensigtsmæssig dosisenhed kan indeholde fra 50 mg til 1 g af de samlede aktive bestanddele, fx 100-500 mg. Sådanne doser kan administreres 1-4 gange daglig eller sædvanligvis 2 eller 3 gange daglig. Den virksomme
30 dosis af forbindelsen ligger generelt i området fra 0,2 til 40 mg af de samlede lægemidler pr. kg legemsvægt pr. dag eller sædvanligvis 10-20 mg/kg daglig.

Det foretrækkes at behandle infektionen med relativt store doser af kombinationsproduktet i begyndelsen for at begrænse risikoen for udvikling af modstandsdygtige virusstammer i infektionen.

5 Til topisk administration kan salver eller cremer formuleres på kendt måde i konventionelle inerte baser (fx vaseline, etc.). En mængde på ca. 0,10-10 vægtprocent samlede lægemidler, fortrinsvis ca. 0,5-5 vægtprocent samlede lægemidler, giver en hensigtsmæssig koncentration i en salve eller creme til topisk administration 1-4 gange daglig. Sådanne topisk påførte formuleringer holder på effektiv måde et re-
10 servoir af de aktive lægemidler mod det inficerede sted, således at koncentrationerne af lægemidler i formuleringerne ikke er kritiske, naturligvis under forudsætning af, at der ikke anvendes et dosis-niveau, der er skadeligt for omliggende hudområder.

15 Det er endvidere klart, at hver bestanddel i produktet ifølge opfindelsen kan administreres ad en anden vej. Fx kan forbindelsen med formlen A eller et prodrug administreres oralt og interferon intramuskulært.

Virksomheden af kombinationen ifølge opfindelsen belyses ved nedenstående biologiske testdata.

20 Biologiske testdata

Test for synergi mellem forbindelsen med formlen A og humant interferon mod herpes simplex-virus, type 1 og 2, ved plaquereduktionsassays i MRC-5-celler

25 MRC-5-celler blev dyrket til konfluens i multiskåle med 24 brønde (brønddiameter 1,5 cm). De drænedes cellemonolag blev hver inficeret med ca. 50-100 infektiøse partikler af herpes simplex-virus 1 eller 2 (HSV-1, stamme SC16; HSV-2, stamme MS) i 100 μ l fosfatpuffret saltopløsning. Viruset blev adsorberet i 1 time ved stuetemperatur. Efter adsorption blev resterende inokulum fjernet fra hver brønd og erstattet med 0,5 ml Eagles MEM indeholdende 5% nyfødt kalveserum og 0,9%
30 agarose (A37). Når agarosen var hårdet, tilsattes fortyndinger af testforbindelserne, som var fremstillet i Eagles MEM (indeholdende

5% nyfødt kalveserum), idet hver brønd modtog 0,25 ml af hver bestanddel, dvs. i alt 0,5 ml. Forbindelsen med formlen A blev fortyndet til følgende række af koncentrationer: 12, 4, 1,2, 0,4, 0,12 og 0,04 $\mu\text{g/ml}$; slutkoncentrationerne i assayet lå derfor mellem 3 $\mu\text{g/ml}$ og 0,01 $\mu\text{g/ml}$. Humant interferon blev fortyndet til følgende række af koncentrationer: 4000, 1200, 400, 120 og 40 IU/ml; slutkoncentrationerne i assayet lå derfor mellem 1000 og 10 IU/ml. De inficerede kulturer blev inkuberet ved 37°C i en fugtig atmosfære af 5% CO₂ i luft, indtil plaques var klart synlige (2-3 dage for HSV-1; sædvanligvis 1 dag for HSV-2). Kulturerne blev fikseret i formalsaltopløsning, agaroseoverlejringerne blev forsigtigt vasket af, og derefter blev cellemonolagene farvet med carbolfushsin. Et stereomikroskop blev anvendt til at tælle plaques. Under henvisning til antallet af plaques i viruskontrolmonolag (ubehandlede kulturer) blev den procentvise reduktion i plaquetallet for hver kombination beregnet.

Synergi mellem forbindelse A og humant interferon mod HSV-1 og HSV-2 i MRC-5-celler

a) Aktivitet mod HSV-1

IC ₅₀ * ($\mu\text{g/ml}$) af A i nærværelse af		100 IU/ml humant interferon (IFN)	
0	10	30	100 IU/ml humant interferon (IFN)
0,34	0,04	0,02	0,01 (for IFN α ; Wellferon**)
0,45	0,34	0,19	0,14 (for IFN β ; Fiblaferon 5***)
0,40	0,22	0,19	0,19 (for IFN γ ; Amgen Biologicals***)

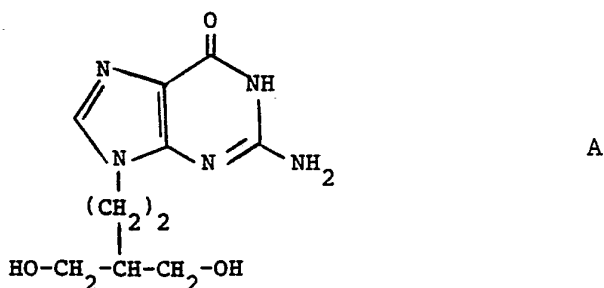
b) Aktivitet mod HSV-2

IC ₅₀ * ($\mu\text{g/ml}$) af A i nærværelse af		100 IU/ml humant interferon (IFN)	
0	10	30	100 IU/ml humant interferon (IFN)
0,62	0,29	0,21	0,09 (for IFN α ; Wellferon***)
0,64	0,62	0,39	0,41 (for IFN β ; Fiblaferon 5***)
0,44	0,34	0,29	0,27 (for IFN γ ; Amgen Biologicals***)

- * IC₅₀ er den koncentration, der er nødvendig for at reducere kontrolplaquetallet (ubehandlet) med 50%.
- ** IFN α testet med 100 IU/ml i fravær af forbindelse A mod HSV-1 reducerede plaquetallet med 18% i forhold til kontrollen.
- 5 *** IFN testet med 100 IU/ml i fravær af forbindelse A gav ingen virkning på plaquetallet.

PATENTKRAV

1. Farmaceutisk produkt,
k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter en synergistisk
10 kombination af et interferon og en forbindelse med formelen A

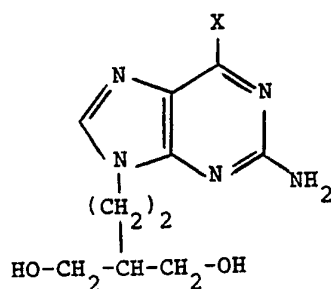


- 15 eller et prodrug eller et farmaceutisk acceptabelt salt, phosphates-
ter og/eller acylderivat af hver af disse som et kombinationspræparat
til samtidig, separat eller successiv anvendelse ved antiviral tera-
pi.

2. Produkt ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at produktet omfatter et interferon og
20 en forbindelse med formelen A som angivet i krav 1 eller et natrium-
salt deraf.

3. Produkt ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at produktet omfatter et interferon og et
prodrug af forbindelsen med formelen A, hvilket prodrug har formelen B

9



hvor X er hydrogen, eller et farmaceutisk acceptabelt salt, phosphat-ester eller acylderivat deraf.

4. Produkt ifølge krav 3,
 5 k e n d e t e g n e t ved, at forbindelsen med formlen B er den, hvor X er hydrogen, og hvor de to OH-grupper er i form af acetylderivater.
5. Produkt ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4,
 k e n d e t e g n e t ved, at interferonet er fremstillet syntetisk.
- 10 6. Farmaceutisk præparat,
 k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter et interferon og en forbindelse med formlen A som angivet i krav 1 eller et prodrug, et farmaceutisk acceptabelt salt og/eller derivat deraf som angivet i et hvilket som helst af kravene 1-4 sammen med en farmaceutisk acceptabel bærer.
- 15 7. Præparat ifølge krav 6,
 k e n d e t e g n e t ved, at præparatet er formuleret til topisk påføring på huden og omfatter natriumlaurylsulfat som yderligere bestanddel.
- 20 8. Præparat ifølge krav 6 eller 7,
 k e n d e t e g n e t ved, at præparatet indeholder 1.000-200.000 enheder interferon pr. mg af forbindelsen med formlen A eller et prodrug eller et farmaceutisk acceptabelt salt og/eller derivat deraf som angivet i et hvilket som helst af kravene 1-4.
- 25 9. Anvendelse af et produkt eller et farmaceutisk præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1-8 til fremstilling af et kombinations-

præparat til samtidig, separat eller successiv anvendelse ved anti-viral terapi.

10. Produkt eller farmaceutisk præparat ifølge et hvilket som helst af kravene 1-8 til anvendelse ved behandling af virusinfektioner.