



HU000228454B1

(19) **HU**(11) Lajstromszám: **228 454**(13) **B1****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 03730**(22) A bejelentés napja: **1998. 06. 24.**(40) A közzététel napja: **2001. 04. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 03. 28.**(51) Int. Cl.: **A61K 311/95** (2006.01)**A61P 29/00** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 98/13107

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 9858641

(30) Elsőbbségi adatok:

60/050,736 1997. 06. 25. US**60/084,183** 1998. 05. 04. US

(72) Feltaláló(k):

Schrier, Denis, Ann Arbor, Michigan (US)**jr. Taylor, Charles Price, Chelsea, Michigan (US)****Westlund-High, Karin Nanette, League City, Texas (US)**

(73) Jogosult(ak):

Board of Regents of the University of Texas**System, Austin, Texas (US)****Warner-Lambert Co., Morris Plains, New****Jersey (US)**

(74) Képviselő:

Derzsi Katalin, S.B.G. & K. Budapesti**Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest**(54) **GABA analógok alkalmazása gyulladásoos betegségek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására**

(57) Kivonat

A találmány gabapentin és pregabalin vagy ezek gyógyászatiilag elfogadható sói közül választott vegyületek alkalmazása gyulladásoos betegségek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények hatóanyagaként.

69.123/DE
P0003730
2008. szeptember

S. R. G. & K.
Szabadalmi Ügyvédi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000, Fax: 461-1099

2100

**GABA analógok alkalmazása gyulladásoos betegségek kezelésére
szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására**

NYOMDAPÉLDÁNY

A találmány tárgya gamma-amino-vaajsav (GABA) analógok, közelebbbről gabapentin és pregabalin alkalmazása gyulladásoos betegségek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására.

A gyulladásoos betegségeket olyan hisztológiai események komplex sorozatai jellemzik, amelyek magukban foglalják — egyebek mellett — például az arteriolák, a kapilláris erek és a venulák fokozott permeabilitással és véráramlással együtt járó dilatációját, fluidumok, köztük plazmaproteinek váladékozását, valamint a gyulladásoos helyre történő leukocyticus migrációt. A gyulladás számos formája a szövetek sérülése vagy leépülése által kiváltott lokalizált protektív válasz, ami a sérülést okozó szer és a sérült szövet elpusztítására, gyengítésére vagy leválasztására szolgál. A gyulladási válasz önmaga is okozhat patológias szövetkárosodást. Az általában idősebb embereket érintő arthritis különösen káros gyulladásoos betegség, amelyre az elsődlegesen az ízületekre korlátozódó gyulladásoos károsodások jellemzőek. A betegség jellegzetese tünetei közé tartozik a fájdalom, a láz, a kivörösödés, a duzzadás és a szövetkárosodás. A rheumatoid arthritis az ízületek krónikus szisztémás betegsége, amelyre a synovialis szövet és az articularis struktúrák gyulladásoos elváltozása, valamint a csontok atrophiaja és rarefactioja jellemző. A gyulladásoos betegség ezen formája általában deformitáshoz és ankylosishoz vezet.

MEGADÁS ALAPJÁUL
SZOLGÁLÓ VÁLTÓZAT

Számos gyulladáscsökkentő kezelési ismert, amelyek legtöbbször széles körben alkalmazzák. Leggyakrabban nemsteroid gyulladáscsökkentő hatóanyagokat használnak, amilyen — egyebek mellett — például a naproxen, a diflunizal, a mefenaminsav és a ketorolak trometamin. Ezeket a szereket általában a rövid ideig tartó, enyhe gyulladás és fájdalom kezelésére alkalmazzák. A súlyosabb gyulladásos betegségeket, amilyen például az arthritis, szteroid hormonokkal és glükokortikoidokkal, például prednizolonnal, hidrokortizon-acetáttal és betametazon-nátrium-foszfáttal kezelik.

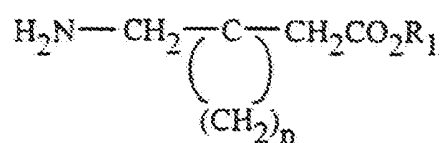
Mivel a gyulladáscsökkentő hatóanyagok legtöbbször csak rövid hatástartamú és gyakran súlyos mellékhatásokat okoz, szükség van új terápiás megoldások kidolgozására. Felismertük, hogy bizonyos vegyületek, amelyek a gamma-amino-vajsav (gamma aminobutyric acid, GABA) analógjai, felhasználhatók gyulladásos betegségek kezelésére. A gyulladásos betegségnek a találmány szerinti megoldással történő megelőzése vagy kezelése csak annyit igényel, hogy az ilyen kezelésre szoruló alanynak beadjuk egy GABA analóg gyulladáscsökkentő hatású mennyiségét.

Számos GABA analógot ismerünk. A ciklikus GABA analóg gabapentin ma már kereskedelmi termék, amit kiterjedten alkalmaznak az epilepszia és a neuropathiás fájdalom klinikai kezelésére. Ilyen vegyületeket ismertetnek a 4 024 175. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban. A GABA analógoknak egy másik sorozatát az 5 563 175. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik.

A jelen találmány tárgya eljárás gyulladásos betegségek

megelőzésére és kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására, amelynek során Gabapentin és pregabalin vagy ezek gyógyászatilag elfogadható sói közül választott vegyületet alkalmazunk gyulladássos betegségek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények hatóanyagaként.

GABA analógokként ismertek például az (I) általános képletű ciklikus aminosav-vegyületek



(I)

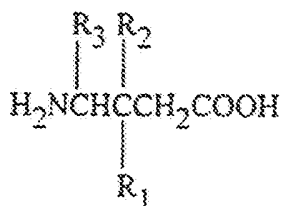
— amelynek képletében

R_1 jelentése hidrogénatom vagy rövid szénláncú alkilcsoport,
és

n értéke 4, 5 vagy 6 —.

A találmány szerinti egyik, különösen előnyös megoldásban egy olyan (I) általános képletű vegyületet vagy gyógyászatilag elfogadható sóját használjuk, amelynek képletében R_1 jelentése hidrogénatom, és n értéke 5. Ez a vegyület az [1-(amino-metil)-ciklohexil]-ecetsav, amelynek ismert generikus neve: gabapentin.

További ismert GABA analógok a (II) általános képletű vegyületek,



(II)

amelyek képletében

R₁ jelentése 1-6 szénatomos, egyenes vagy elágazó láncú alkilcsoport, fenilcsoport vagy 3-6 szénatomos cikloalkilcsoport;

R₂ jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport; és

R₃ jelentése hidrogénatom, metil- vagy karboxilcsoport.

A találmány szerinti alkalmazás egyik előnyös megoldása során 3-(amino-metil)-5-metil-hexánsavat, különösen (S)-3-(amino-metil)-5-metil-hexánsavat, ismert generikus nevén pregabalint, vagy gyógyászatilag elfogadható sóját alkalmazzuk. A pregabalinra ismert ezenkívül a "CI-1008" és az "S-(+)-3-IBG" jelölés is.

A (II) általános képletű vegyületek diasztereomerei és enantiomerei is felhasználhatók a találmány szerinti megoldásban.

Amint azt a fentiekben már jeleztük, a találmány szerinti eljárás során GABA analógokat alkalmazunk. GABA analógoknak tekintjük az olyan vegyületeket, amelyek egyrészt gamma-amino-vajsavból származnak vagy gamma-amino-vajsavon alapulnak, másrészt a találmánynak megfelelően gyulladáscsökkentő hatást váltanak ki. Az ilyen vegyületek könnyen hozzáférhetők, mivel a vegyületek vagy kereskedelmi termékek, vagy pedig a szerves kémia területén jártas szakember számára jól ismert szintetikus eljárásokkal egyszerűen előállítható származékok. Előnyös GABA analógok (I) általános képletű ciklikus aminosavak. Ilyen vegyületeket a 4 024 175. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetnek. A (II) általános képletű GABA analógokat az 5 563 175. számú amerikai egyesült államokbeli sza-

badalmi leírásban ismertetik.

A találmány szerinti alkalmazással előállított gyógyszerkészítményeket a gyulladáscellenes kezelés gyakorlati megvalósításához csupán arra van szükség, hogy beadjuk egy GABA analógnak a gyulladáscellenes állapot megelőzésére vagy kezelésére elegendő mennyiségét. Az említett gyulladáscellenes mennyiség általában körülbelül 1 mg/testtömeg-kg és körülbelül 300 mg/testtömeg-kg közötti értékű. Átlagos testtömegű felnőttek esetén a jellegzetes napi dózisok körülbelül 10 mg és körülbelül 5000 mg közötti értékek.

A GABA analógok vagy sóik gyógyszerkészítményeit úgy állítjuk elő, hogy a hatóanyagot egy gyógyászatiilag elfogadható hordozóval egységdózisformává formáljuk. Az egységdózisformák példái közé tartoznak — egyebek mellett — a következők: tabletták, kapszulák, pirulák, porok, bizes vagy nemvizes orális oldatok és szuszpenziók, valamint parenteralis oldatok, amelyeket egyetlen vagy egyedi dózisokra osztható több dózisegységet tartalmazó tárolóedényekbe csomagolunk. A gyógyászatiilag elfogadható hordozók, köztük a gyógyászatiilag elfogadható hígítók példái közé tartoznak — egyebek mellett — a következők: zselatinkapszulák; cukrok, például laktóz és szacharóz; keményítők, például kukoricakeményítő és burgonyakeményítő, cellulóz-származékok, például nátrium-(karboxi-metil)-cellulóz, etil-cellulóz, metil-cellulóz és cellulóz-acetát-ftalát; zselatin; talkum; sztearinsav; magnézium-sztearát; növényi olajok, példáulogyoróolaj, gyapotmagolaj, szezámolaj, olívaolaj, kukoricaolaj és kakaócserje-olaj; propilénglikol, glicerin; szorbit;

polietilén-glikol; víz; agar; alginsav; izotóniás nátrium-klorid-oldat (fiziológiás sóoldat), foszfát-puffer-oldatok; valamint a gyógyszerkészítményekben szokásosan alkalmazott egyéb, kompatibilis anyagok. A találmány szerinti eljárásban alkalmazandó kompozíciók ezenkívül további olyan komponenseket is tartalmazhatnak, amelynek például a színezőanyagok, az ízesítőszeres és/vagy a konzervatívumok. Ezeket az anyagokat — ha jelen vannak a készítményekben — csak viszonylag mennyiségekben alkalmazzuk. A készítmények kívánt esetben a gyulladás kezelésére szokásosan alkalmazott egyéb hatóanyagokat is tartalmazhatnak, amelynek például az aszpirin, a naprozin és más hasonló gyulladáscsökkentő hatóanyag.

Az említett készítményekben a hatóanyagok koncentrációja széles határok között változhat, gyakorlati okok miatt azonban a hatóanyag-koncentráció szilárd készítményekben előnyösen legalább 10 tömeg%, és primer folyékony készítmények legalább 2 tömeg%. A legkielégítőbb eredményt azok a készítmények nyújtják, amelyekben a hatóanyag lényegesen nagyobb részarányban van jelen, például a hatóanyag-koncentráció akár 95 tömeg%-is növelhető.

A GABA analógokat vagy sóikat orális vagy parenterális úton adhatjuk be. Például egy alkalmas intravénás dózis 5-50 mg, illetve egy alkalmas orális dózis 20-800 mg közötti értékű. A dózis a gyulladásos betegségek, például az arthritis kezelésére alkalmazott dózishatárokon belüli értékű, illetve a dózist a beteg igényeinek alapján a kezelést végző orvos is meghatározhatja.

A GABA analógnak a találmány szerint alkalmazandó egységdózisformája a gyulladássos betegségek gyógyítására alkalmas egyéb vegyületeket is tartalmazhat.

Az említett (I) illetve (II) általános képletű vegyületek körébe tartozó gabapentinnek és a pregabalinnak a találmány szerinti eljárásban történő alkalmazása több előnyt is biztosít, egyebek mellett például a vegyületek viszonylag nemtoxikus jellegűek, egyszerűen előállíthatók, a vegyületek jól tolerálhatók, valamint a hatóanyagok intravénás vagy orális úton könnyen beadhatók. Ezenkívül a hatóanyagok a testben nem metabolizálódnak.

A jelen leírásban alkalmazott "alany" vagy "beteg" kifeje-

zés emlősoket, köztük embereket jelöl.

A GABA analógoknak a gyulladáshoz kapcsolódó betegségek kezelésében történő találmány szerinti alkalmazhatóságát számos gyulladáshoz és arthritises állatmodellben igazoltuk.

Az ábrák rövid ismertetése

Az 1. ábra az akut arthritisz kialakulása előtti állapotban lévő állatokban a pregabalinnak [jelölése: S-(+)-3-IBG], a pregabalin megfelelő optikai (R)-enantiomerének, azaz az (R)-(-)-3-izobutil-GABA-nak [jelölése: R-(-)-3-IBG] és mesterséges cerebrospinalis folyadék (artificial cerebrospinal fluid; jelölése: aCSF) a térdízület körületére és a fájdalom mértékére gyakorolt hatását mutatja be.

A 2. ábra az akut arthritisz kialakulása után beadott 0,9 és 10 mg/ml dózisú pregabalinnak, R-(-)-3-IBG-nek és aCSF-nek a termikus láb visszahúzási latenciára gyakorolt hatását mutatja be.

A 3. ábra az akut arthritisz kialakulása után beadott 0,9 és 10 mg/ml dózisú pregabalinnak, R-(-)-3-IBG-nek és aCSF-nek az ízületduzzadásra gyakorolt hatását mutatja be.

A 4. ábra az akut arthritisz kialakulása után beadott 0,9 és 10 mg/ml dózisú pregabalinnak, R-(-)-3-IBG-nek és aCSF-nek a fájdalommal kapcsolatos viselkedésre gyakorolt hatását mutatja be.

Az alábbiakban részletes példákkal illusztráljuk a GABA analógok specifikus gyulladáshoz kapcsolódó ellenes aktivitását.

1. PÉLDA

A gabapentint egy streptococcalis sejtfal-indukált (SCW-indukált) láb ödéma modellben értékeltük. Nőstény Lewis patkányokat a 0. napon a jobb tibiotarsalis ízületben 6 µg/patkány SCW-vel szenzibilizáltunk. A 21. napon alkalmazott szisztémás SCW (100 µg/patkány) által kiváltott késleltetett típusú hiperszenzibilitási reakció megindítása előtt egy órával kezdődően és a 24. napig folytatva orálisan (10 ml/kg) vízóanyagot [0,5 % (hidroxi-propil)-metil-cellulóz/0,2 % Tween 20] vagy hatóanyagot [100 mg/kg, naponta kétszer (BID)] adtunk be az állatoknak. A hátsóláb-ödéma higany-pletizmometriás értékelését a 22-25. napon végeztük el.

A gabapentin szignifikáns mértékben, a 22. napon 58 %-kal, a 23. napon 77 %-kal, a 24. napon 83 %-kal és a 25. napon 81 %-kal gátolta a duzzadást.

2. PÉLDA

Hasonló vizsgálatban értékeltük a pregabalint. A vegyület drámai mértékű gyulladáscellenes aktivitást mutatott. A vizsgálat egy SCW-indukált reaktivációs arthritis vizsgálat. Nőstény Lewis patkányokba intraarticularis úton foszfát-pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS-ben) szuszpendált 10 µl 100 p frakciójú peptidoglikán-poliszacharidot (PG-PS) injekcióztunk. A kontralaterális ízületekbe kontrollként PBS-t injekcióztunk. A kezdeti inokuláció után 21 nappal a farokvénán keresztül beadott 100 µg PG-PS-sel szisztémás provokációt végeztünk. Az állatoknak orális úton 72 órán keresztül naponta három alkalommal 3, 10 és

30 mg/kg pregabalint adtunk be. Az első dózist a szisztémás provokáció előtt egy órával adtuk be.

Az előzetesen SCW-vel szenzibilizált állatoknak a 21. napon végzett szisztémás provokációja a szenzibilizált bokaizület akut duzzadását eredményezte. A bokaizületek térfogata 72 órán belül körülbelül 0,5 ml-rel nagyobb lett. A 10 és 30 mg/kg mennyiségben beadott pregabalin a megfigyelés 72 órás időtartama alatt esetenként dóziszfüggő módon akár 40 %-kal is csökkentette az ödéma növekedését. Az eredményeket az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

A pregabalinnak a bokaizület duzzadására kifejtett hatása
(0-20. nap: szenzibilizációs periódus)

	21. nap	22. nap	23. nap	24. nap	
	PG-PS provok.				
Duzzadás (delta ödéma, ml)	0	0,20	0,45	0,50	0 (n = 6)
	0	0,12	0,38	0,50	3,0 (n = 6)
	0	0,04	0,25	0,31	10,0 (n = 4)
	0	0,06	0,20	0,21	30,0 (n = 6)
					Pregabalin (p.o. mg/kg)

Az előbbi vizsgálat bizonyítja, hogy az olyan GABA analógok, amilyen például a gabapentin és a pregabalin, hatásos gyulladáscsökkentő szerek, amelyek az arthritiszben szenvedő betegekben csökkentik az ilyen típusú duzzadást.

3. PÉLDA

A pregabalint [*S*-izomer; más néven: CI-1008, illetve *S*--(+)-3-IBG] a megfelelő *R*-izomer, azaz az (*R*)-3-(amino-metil)-5-metil-hexánsav [más néven: *R*-(-)-3-IBG] mellett az alábbi gyulladáscsökkentő tesztben is értékeltük. Patkányok térdízületébe kaclint és carrageenint injekciózva akut kísérleti arthritist indukáltunk. A gyulladást okozó szer, azaz a carrageenin neuropeptidok és egyéb gyulladási mediátorok felszabadítása után az ízületi üregbe történő plazma extravasációt és ödémát okoz. Az ízületi szövet sérülésével együtt perifériális és centrális szenzibilizáció is történik, ami a tudatánál lévő patkányban fokozott fájdalomérzet formájában manifesztálódik. Ezt a hyperalgesiát a sugárzó hőforrástól történő lábvisszahúzási latenciák csökkenésének mérésével kvantitatív formában is könnyen meghatározhatjuk. A pregabalint és *R*-sztereoisomerét [*R*-(-)-3-IBG] a gyulladás kiváltása előtt és a gyulladás kialakulása után adtuk be.

Harminchat 235-380 g testtömegű Sprague-Dawley him patkányt nátrium-pentobarbitállal (Nembutal; 50 mg/kg i.p.) anesztetizáltunk. Mikrodialízis szálakat (200 µm o.d., 45000 MW Cut-off, Hospal AN69) egy 2 mm-es szakasz kivételével epoxigyantával vontunk be. Az utolsó borda magasságában a hátoldalon egy

kis középilonali bemetszést végeztünk. Ezt követően a T₁₂ csigolya körüli izmot eltávolítottuk és mindkét oldalon egy-egy lyukat fúrtunk. Az L₄-L₆ lumbalis szegmensek közötti gerincvelő dorsalis gerincvelőszarván keresztül harántirányban beillesztettük a mikrodialízis szálát, mégpedig oly módon, hogy a szál 2 mm-es permeábilis szakasza a dorsalis gerincvelőszarvban helyezkedjen el. A mikrodialízis szálát PE₂₀ csőhöz (Ecton and Dickson) csatlakoztattuk, amit ezt követően a bőr alatt a nyakszirthez vezettünk. A szálát fogászati cementtel rögzítettük. A csövön keresztül egy órán át 5 µl/perc áramlási sebességgel mesterséges cerebroszinalis folyadékot (aCSF) pumpáltunk, majd a PE₂₀ csövet lezártuk és az állatokat hagytuk regenerálódni.

A termikus hyperalgesia méréséhez az állatokat a sugárzó hőforrástól történő lábvisszahúzásra nézve teszteltük. A szál behelyezését követő napon az állatokat egy kis Lucite™ fülkében lévő emelt üveglapra tettük. A hátsó láb sarkának talpfelületére hőszugárzást bocsátottunk addig, amíg a patkány felemelte a lábát. Azt az időpontot tekintettük a lábvisszahúzási latenciának (PWL), amelynél az állat felemelte a lábát. Ötperces intervallumokban, összesen öt alkalommal egymástól függetlenül mindkét lábat teszteltük. Az öt leolvasás átlagát alkalmaztuk PWL-ként. Az előzetesen kezelt patkányokban a PWL-t megmértük a GABA analógok beadása előtt (alapérték) és a GABA analógok 1,5 órás infúziója után, amikor kaolint és carrageenint injekcióztunk a térdizületbe. Az arthritis indukciója után összesen 4 órán keresztül mértük a PWL-t. Az utólag kezelt csoportban az állatokat a térdizületben indukált arthritis előtt (kontroll),

4 órával az indukció után és 1,5 órás hatóanyag-infúzió után, azaz az arthritis indukciója után 5,5 órával teszteltük. A térdizület-gyulladásos állat esetén a sugárzó hővel szembeni PWL csökkenése alapján a másodlagos hyperalgesiára következtethetünk.

Flexibilis szalag mérés alkalmazásával a kaolin és a carrageenin injekciója előtt a térdizület kerületét is megmértük (kontroll). Az arthritis kiváltása után feljegyeztük a hátsó láb védekezésének mértékét is. Az említett változások mennyiségi értékelése érdekében az állatokat egy szubjektív fájdalomfokozati skála (0-5) alapján osztályoztuk, ahol: 0 a normális érték; 1 a lábujjak begörbítésének felel meg; 2 a láb kifordítását jelenti; 3 részleges súlyáthelyezést jelent; 4 esetén a test nem nehezedik a lábára; és 5 esetén a láb nem érintkezik a padlóval.

Az arthritis kiváltása (indukálása)

A kontroll viselkedési teszt után (utólag kezelt csoport) vagy a hatóanyag infúziója után (előzetesen kezelt csoport) a patkányokat rövid időre nátrium-metohexitallal (Brevital; 60 mg/kg i.p.) anesztetizáltuk. Ezt követően a térdizületbe steril fiziológiás sóoldatban szuszpendált 3 % kaolin és 3 % carrageenint injekcióztunk (0,1 ml; pH 7,4). A térdizületet a patkányok ébredéséig (körülbelül 5 perc) kézzel hajlított állapotban tartottuk.

A GABA analógok beadása

Valamennyi GABA analógot egy aCSF-oldatban (pH 7,4, 95 % CO₂/5% O₂ buborékoltatással beállítva) oldottuk, majd az így

nyert oldatot 5 ml/perc áramlási sebességű infúzióval a gerincvelőbe juttattuk. Az állatok pregabalint, R-(-)-3-IGB-t vagy aCSF-et kaptak. Az utólag kezelt csoportban a GABA analógokat 0,1, 0,9 és 10 mg/ml koncentrációjú infúzióval adtuk be. Ezzel szemben az előzetesen kezelt csoport egyetlen 10 mg/ml-es dózist kapott.

Statisztikai analízis

Az adatok normális eloszlásúak voltak. A kezelt csoportok közötti, adott időpontban mért eltérések összehasonlításához a statisztikai elemzéseket páratlan t-tesztek alkalmazásával végeztük. Ugyanazon csoporton belül a kezelés előtti és utáni értékek összehasonlításához páros t-teszteket alkalmaztunk. A szignifikancia jelzésére 0,05-nál kisebb P értéket használtunk. Az adatokat átlag \pm standard középhiba formájában fejezzük ki. A tesztekete Statistica (Jandel Corporation) alkalmazásával hajtottuk végre.

EREDMÉNYEK

Az akut arthritis kialakulása előtt a gerincvelőbe infúzióval beadott pregabalinnak és R-izomerének a hatása

A gerincvelő dorsalis gerincvelőrészébe infúzióval önmagában beadott 10 mg/ml pregabalin, R-izomere vagy aCSF a termikus hyperalgesia tesztben az alapértékekhez képest nem változtatják meg a PWL-t. A gyulladás kiváltása előtt aCSF-fel kezelt patkányok PWL-je a kaolin és a carrageenin injekciója után 4 órával szignifikánsan kisebb volt ($P < 0,01$, páros t-teszt), mint a közvetlenül az injekció előtt mért érték. Ennél az időpontnál szignifikáns eltérés volt ($P < 0,05$, páratlan t-teszt) az in-

jekciózott és a nem injekciózott láb között is.

Viszont azokban a patkányokban, amelyek a kaolinnak és a carrageeninnek a térdizületbe történő injektálása előtt 1,5 órán keresztül a gerincvelőbe infúzióval 10 mg/ml koncentrációjú pregabalint vagy ennek megfelelő R-izomert kaptak, az injekció után négy órával nem tapasztaltunk másodlagos termikus hyperalgesziát (1A. ÁBRA).

Nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést sem a gyulladás után 4 órával és a kaolin és carrageenin injekció előtt mért FWL értékek között, sem pedig 4 órával a kaolin és carrageenin injekció után a gyulladásos láb és a nem gyulladásos láb között.

A pregabalinnak és R-izomerének az arthritis indukálása előtt 1,5 órán keresztül a gerincvelőbe beadott infúziója szignifikáns mértékben csökkentette ($P < 0,04$; páratlan t-teszt) csökkentette a kaolin és a carrageenin térdizületbe adott injekciója után jellegzetes duzzadás mértékét; az aCSF infúziót kapott patkányokéhoz képest a csökkenés hozzávetőleg 30 %-os (1B. ÁBRA). Ezenkívül a pregabalinnal vagy R-izomerével végzett előzetes kezelés megakadályozta a spontán fájdalomra jellemző abnormális lábtartás kialakulását (1C. ÁBRA).

Az akut arthritis kialakulása után a gerincvelőbe infúzióval beadott pregabalinnak és R-izomerének a hatása

A térdizület akut gyulladásának kiváltása után 4 órával a kontroll értékhez képest valamennyi állatban ($n = 30$) csökkent az ipsilaterális hőszugárzásra adott PWL, ami másodlagos hyperalgesia jelenlétére utal (2. ÁBRA). A csökkenés szignifikáns

Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményei azt mutatják, hogy a patkányok térdízületébe beadott kaolin és carrageenin injekció olyan akut arthritist eredményez, amit másodlagos termikus hyperalgesia, a térdízület megduzzadása és spontán fájdalom jellemez. A pregabalinnak és az R-(-)-3-IBG-nek a gerincvelő dorsalis gerincvelőszarvába a kaolin és carrageenin injekció előtt 1,5 órával beadott infúziója csökkentette a duzzadás mértékét, valamint blokkolta a másodlagos hyperalgesiát és a spontán fájdalmat. A GABA analógok tehát felhasználhatók gyulladásos betegségek, különösen az arthritis kezelésére.

4. PÉLDA

Egy másik GABA analógot, nevezetesen a gabapentint egy hasonló vizsgálatban értékeltünk, és azt állapítottuk meg, hogy a gabapentin hatásosan megakadályozza és visszafordítja a kaolin/carrageenin térdízületi gyulladás káros hatásait, a másodlagos termikus hyperalgesiát és a spontán fájdalommal kapcsolatos viselkedést.

Módszerek

Harminc állatot két kísérleti csoportba osztottunk, majd az állatokat (1) a kísérletes arthritis kiváltása előtt és (2) a kísérletes arthritis kiváltása után kezeltük. A térdízületi gyulladást kaolin/carrageenin injekció beadásával indukáltuk. Spinalis kezelés esetén egy, a dorsalis gerincvelőszarvban elhelyezett mikrodialízis szálon keresztül, illetve szisztémás kezelés esetén a nyakszirthez szubkután történő beadással juttattunk az állatok szervezetébe gabapentint vagy aCSF-et. A ható-

anyaggal végzett kezelés mellett valamennyi kísérlet esetén vakpróbát is végeztünk.

A mikrodialízis szálak elhelyezése

220-270 g testtömegű Sprague-Dawley patkányokat nátrium-pentobarbitállal (Nembutal; 50 mg/kg i.p.) anesztetizáltunk. Mikrodialízis szálakat (200 μ m o.d., 45000 MW Cut-off, Hospal AN69) egy 2 mm-es szakasz kivételével epoxigyantával vontunk be. Huszonnégy állatban behelyeztük a mikrodialízis szálát behelyeztük a dorsalis gerincvelőszarvba. Az L₁ csigolya magasságában a hátoldalon egy kis középvonali bemetszést végeztünk. Ezt követően az L₁ csigolyát megtisztítottuk az izomtól, majd a lamina mindkét oldalán egy-egy lyukat fúrtunk. A mikrodialízis szálát bevezettük a lyukakon és harántirányban a gerincvelő dorsalis gerincvelőszarván keresztül a csigolyába. A mikrodialízis szál oly módon helyezkedett el az L₄-L₆ lumbalis szegmensek között, hogy a szál 2 mm-es permeábilis szakasza a dorsalis gerincvelőszarvba esett. A mikrodialízis szálát PE₂₀ csőhöz (Becton and Dickson) csatlakoztattuk, amit ezt követően a bőr alatt a nyakszirthez vezettünk. A mikrodialízis szál és a PE₂₀ cső közötti kapcsolatot fogászati cementtel rögzítettük. A csövön keresztül egy órán át 5 μ l/perc áramlási sebességgel mesterséges cerebrospinalis folyadékot (aCSF) pumpáltunk, majd a PE₂₀ csövet lezártuk és az állatokat 24 órán át hagytuk regenerálódni. Amikor a patkányok magukhoz tértek, az állatokat megvizsgálatuk az esetleges mozgáshiányra nézve; amennyiben bármilyen mozgáshiányt tapasztaltunk, az adott állatot kizártuk a további vizsgálatokból. A hatóanyag-beadás szisztémás kont-

jaként további 6 patkányban a mikrodialízis szálát a nyakszirt szubkután szövetébe implantáltuk.

A viselkedés tesztelése és az arthritis értékelése

A káros hőszugárzással szembeni PWL-t a termikus hyperalgesia mérésével teszteltük. A térdízület-gyulladásos állatokban a PWL csökkenését a másodlagos hyperalgesia jeleként értékeltük. Mivel a hőszugárzási stimulust a hátsó láb talpfelületén, azaz a gyulladásos térdízülettől meglehetősen nagy távolságban alkalmazzuk, a mérések a másodlagos termikus hyperalgesziát reprezentálják.

A szál behelyezését követő napon az állatokat egy kis Lucite™ fülkében lévő emelt üveglapra tettük. A hátsó láb sarkának talpfelületére hőszugárzást bocsátottunk addig, amíg a patkány felemelte a lábát. Azt az időpontot tekintettük a láb-visszahúzási latenciának (PWL), amelynél az állat felemelte a lábát. Ötperces intervallumokban, összesen öt alkalommal egymástól függetlenül mindkét lábat teszteltük. Minden egyes időpontban az öt leolvasás átlagát alkalmaztuk PWL-ként. Az előzetesen kezelt patkányokban (n = 12) a PWL-t megmértük a GABA analógok beadása előtt (alapérték), a GABA analógok 1,5 órás infúziója után, és 4 órával az arthritis után. Az utólag kezelt csoportban (n = 18) az állatokat a térdízületben indukált arthritis előtt (alapérték), 4 órával az arthritis indukciója után és 1,5 órás hatóanyag-infúzió után, azaz az arthritis indukciója után 5,5 órával teszteltük.

A fájdalommal kapcsolatos viselkedést, az arthritises hátsó láb védekezésének mértékét egymástól függetlenül két megfi-

gyelő pontozta. Az említett változások mennyiségi értékelése érdekében az állatokat egy szubjektív fájdalomfokozati skála (0-5) alapján osztályoztuk, ahol: 0 a normális érték; 1 a lábujjak begörbítésének felel meg; 2 a láb kifordítását jelenti; 3 részleges súlyáthelyezést jelent; 4 esetén a test nem nehezedik a lábra; és 5 esetén a láb nem érintkezik a padlóval.

Flexibilis szalag mérés alkalmazásával megmértük a térdízület kerületét az arthritis indukálása előtt (alapérték), 4 órával az arthritis indukálása után (előzetesen kezelt és utólag kezelt csoport), valamint az utólag kezelt csoportban 1,5 órával a hatóanyag beadás után (azaz 5,5 órával az arthritis indukálása után).

Az arthritis kiváltása (indukálása)

A kontroll viselkedési teszt után (utólag kezelt csoport) vagy a hatóanyag infúziója után (előzetesen kezelt csoport) a patkányokat rövid időre nátrium-metohexitalal (Brevital; 60 mg/kg i.p.) anesztetizáltuk. Ezt követően a térdízületbe steril fiziológiás sóoldatban szuszpendált 3 % kaolin és 3 % carrageenint injekcióztunk. A térdízületet a patkányok ébredéséig (körülbelül 5-10 perc) kézzel hajlított állapotban tartottuk.

A hatóanyag beadása

Az állatokat gabapentinnel vagy kontrollként aCSF-fel kezeltük. A gabapentint aCSF-ben oldottuk. A gabapentin és az aCSF infúzióját 5 µl/perc áramlási sebesség mellett a mikrodialízis szálon keresztül adtuk be. Felhasználás előtt a gabapentinoldat és az aCSF pH-ját 95 % CO₂/5% O₂ buborékoltatásával

állítottuk be (körülbelül 7,4-re).

A vizsgálathoz a gabapentin egyetlen 10 mg/ml-es dózisát használtuk.

Statisztikai analízis

Az egyes csoportok esetén kapott eredményeket az alapérték \pm standard középhiba (s.e.m.) értékétől mért százalékos eltérés átlagként fejeztük ki. Az egyes állatok esetén a válaszok és az alapértékek összehasonlításához páros t-teszteket végeztünk ($P < 0,01$).

EREDMÉNYEK

Az alapértékek mérése

Az ebben a vizsgálatban alkalmazott valamennyi patkány PWL, spontán viselkedési és térdizület-kerületi alapértékét azt megelőzően mértük, hogy a hatóanyag vagy a vivőanyag infúzióját a gerincvelőn keresztül vagy szubkután beadtuk volna (2. táblázat). Az átlagos PWL értéke $10,52 \pm 0,39$ másodperc, míg az átlagos térdizület-kerület értéke $5,26 \pm 0,03$ cm volt. Spontán fájdalommal kapcsolatos viselkedést nem észleltünk, így az adott pontszám értéke 0 volt.

Ízületi gyulladásból származó elváltozások

A 2. táblázatban feltüntetjük az arthritises állatokban várt következményeket. Az adatok magukban foglalják mindkét kezelt csoport és az aCSF arthritises kontroll állatok kombinált méréseit. Az aCSF-fel kezelt arthritises kontroll patkányokban ($n = 12$) a kaolin és carrageenin injekció után 4 órával a káros hősu-grázással szembeni PWL az alapérték 76 %-ára csökkent. Ez a csökkenés szignifikáns mértékű volt (páros t-teszt, $p < 0,01$)

és másodlagos hyperalgesia jelenlétét jelzi.

Az arthritises állatokban a patkányok hátsólábtartásában szignifikáns változás történt, ami spontán folyamatban lévő fájdalommal kapcsolatos viselkedést jelez. Ezek a spontán folyamatban lévő fájdalommal kapcsolatos viselkedést jelző testtartásváltozások $1,25 \pm 0,13$ ($p < 0,01$) pontértéknek megfelelő mértékűek voltak. Az alapértékhez képest szignifikáns, 14 %-os növekedést észleltünk a térdízület kerületében (páros t-teszt, $p < 0,01$).

2. táblázat

Nem arthritises vs. arthritises állatok

	FWL (mp)	FWL (alapérték %-a)	Viselkedés pontszám	Kerület (cm)	Kerület (alapérték %-a)
Alapérték	$11,47 \pm$ $0,56$	100	0	$5,18 \pm$ $0,04$	100
Arthritis (4 óra)	$8,66 \pm$ $0,56^*$	$75,42 \pm$ $3,10^*$	$1,25 \pm$ $0,13^*$	$5,92 \pm$ $0,09^*$	$114,38 \pm$ $1,86^*$

* $p < 0,01$

A térdízületi gyulladás előtt közvetlenül a gerincvelőbe beadott gabapentin infúzió hatása

A gabapentin hatásosan megakadályozta az alkalmazott hősu-gárzásra adott másodlagos hyperalgesia kialakulását. Mielőtt a térdízületet kaolinnal és carrageeninnel beinjekcióztuk volna,

a mikrodialízis szálon keresztül végzett infúzióval gabapentint vagy aCSF-et juttattunk a gerincvelőbe. A spinális hatóanyag-infúzió után 1,5 órával az alapértékhez képest nem tapasztaltunk szignifikáns változást a hőszugárzásra adott PWL értékében (3. táblázat). A térdízületbe adott kaolin és carrageenin injekció után 4 órával a nem arthritises alapértékhez képest nem történt szignifikáns változás a hőszugárzásra adott PWL válaszban és a lábtartásban. Ezzel ellentétben az aCSF-fel kezelt állatok esetén szignifikáns mértékben csökkent a PWL válasz, ami szignifikáns spontán fájdalommal kapcsolatos viselkedést igazolt. Az arthritis után 4 órával a gyulladásos ízület kerülete — hasonlóan az aCSF-fel kezelt kontroll patkányokéhoz — jelentősen megnőtt. Tehát a gabapentín igen hatásosan megakadályozta a másodlagos termikus hyperalgesia kialakulását és mérsékelte a spontán fájdalommal kapcsolatos viselkedést.

3. táblázat

A gyulladás előtt beadott gabapentin hatása

Csoport	Alapérték (kontroll %-a)	PWL (ható- anyag-in- fúzió után 1,5 óra)	PWL (ízületi injekció után 4 óra)	Viselkedés pontszám (ízületi injekció után 4 órával)	Kerület (ízületi injekció után 4 órával)
Gabapentin (n = 6)	100	105,18 ± 4,56	100,03 ± 4,37	0,67 ± 0,20	114,20 ± 1,53*
aCSF (n = 6)	100	93,12 ± 6,31	74,47 ± 3,44*	1,33 ± 0,2*	114,87 ± 1,74*

* p < 0,01

A térdízületi gyulladás után a gerincvelőbe vagy szubkután beadott gabapentin infúzió hatása

Az arthritises állatok utólagos kezelése spinalis beadás esetén visszafordította a másodlagos termikus hyperalgesiát és a spontán fájdalommal kapcsolatos viselkedést. Az utólagos kezelési vizsgálatokban az állatok két csoportja kapott gabapentint (4. táblázat). A patkányok egyik csoportja egy közvetlenül a gerinagyba implantált mikrodialízis szálon keresztül kapta a hatóanyag infúzióját, míg a másik csoport egy szubkután a nyakszirtbe implantált mikrodialízis szálon keresztül szisztémásan kapta a gabapentint.

A kaolin és carrageenin injekció után 4 órával valamennyi állat csökkentett PWL választ és spontán fájdalommal kapcsolata-

tos viselkedést mutatott. A spinalis gabapentin infúziót kapott csoportban a FWL szignifikánsan, az alapérték körülbelül 81 %-ára csökkent (páros t-teszt, $p < 0,01$). A spinalis gabapentin infúzió után 1,5 órával a FWL értékek visszatértek az alapértékre, és a talpak gyakorlatilag kisimultak.

4. táblázat

A gyulladás után beadott gabapentin hatása

Csoport	PWL vagy kerület (kontroll % a)	FWL (arthritis után 4 óra)	FWL (arthritis után 5,5 óra)	Viselkedés pontszám (arthritis után 5,5 órával)	Kerület (arthritis után 5,5 órával)
Gabapentin (gerincve- lő) (n = 6)	100	80,71 ± 3,23*	100,85 ± 10,63	0,50 ± 0,20	122,22 ± 2,32*
Gabapentin (szubkután) (n = 6)	100	85,05 ± 3,68*	81,89 ± 4,43*	1,17 ± 0,29*	120,66 ± 3,59*
aCSF (gerincve- lő) (n = 6)	100	78,37 ± 5,37*	78,57 ± 4,38*	1,17 ± 0,28*	113,89 ± 3,49*

* $p < 0,01$

A gabapentint szubkután infúzió útján kapott csoportban az ízületi injekció után 4 órával és a hatóanyag-infúzió után 1,5

alapérték 82 %-ra csökkent, hasonlóan ahhoz, ahogyan az az aCSF kontroll arthritises patkányok esetében történt. A fájdalommal kapcsolatos viselkedés pontszáma és a gyulladáshoz köztartozó ízület kerülete valamennyi csoport esetén szignifikánsan nőtt 4 órával az arthritis és 1,5 órával a hatóanyag infúziója után.

Az előbbi vizsgálat igazolja, hogy a GABA analógok, például a gabapentin, hatásosan megakadályozzák vagy visszafordítják a kaolin/carrageenin térdízületi gyulladáshoz kapcsolódóan a másodlagos termikus hyperalgesiára és a spontán fájdalommal kapcsolatos viselkedésre gyakorolt káros hatását. Mindkét kezelt csoportban azt találtuk, hogy a gabapentin szignifikáns mértékben képes a PWL értékét az alapértékre visszatéríteni. Ebben a modellben a gabapentin az arthritis teljes kialakulása után hatásosan csökkentette a hyperalgesiát és a fájdalommal kapcsolatos viselkedést, ami arra utal, hogy a gabapentin és a hasonló GABA analógok felhasználhatók a gyulladáshoz kapcsolódó állapotok klinikai kezelésében.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Gabapentin és pregabalin vagy ezek gyógyászatilag elfogadható sói közül választott vegyületek alkalmazása gyulladáscsökkentő betegségek kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények hatóanyagaként.

2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, **azzal jellemezve**, hogy hatóanyagként gabapentint alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, **azzal jellemezve**, hogy hatóanyagként pregabalint alkalmazunk.

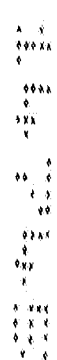
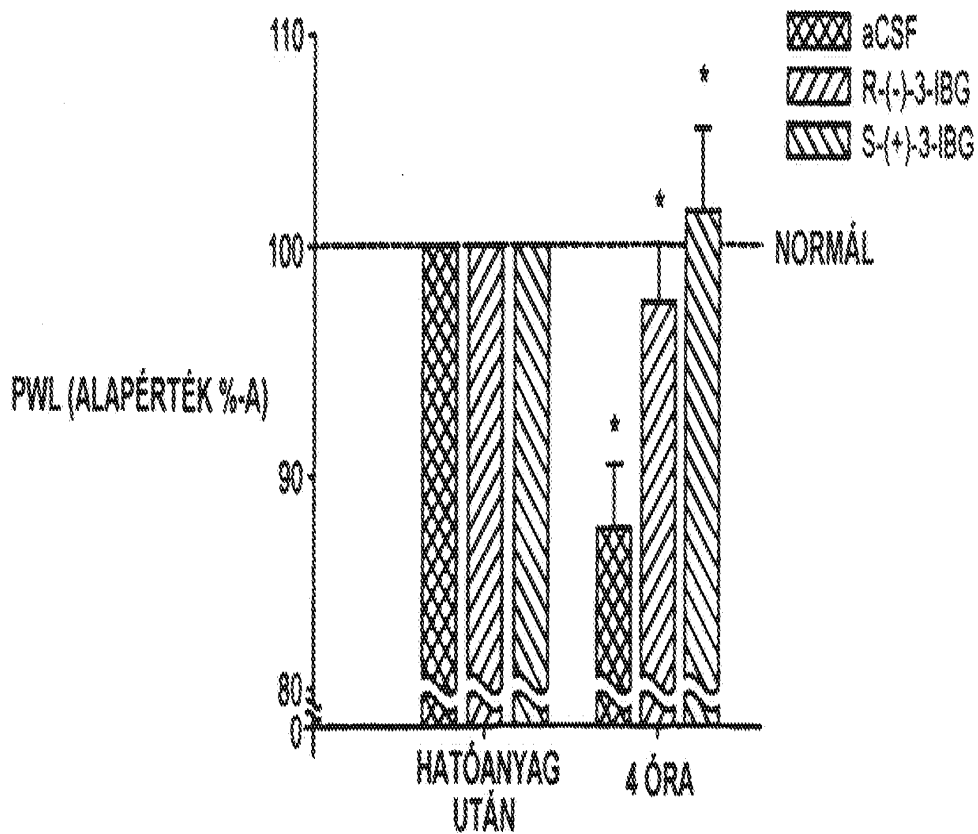
+ 9 lap rajta / *[Handwritten signature]*

A meghatalmazott:

Derzsi Katalin
szabadalmi ügyvéd
Dr. S.B.G. & Dr. Szabó Katalin Ügyvédi Iroda
tagja
H-1067 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1080 Fax: 461-1099

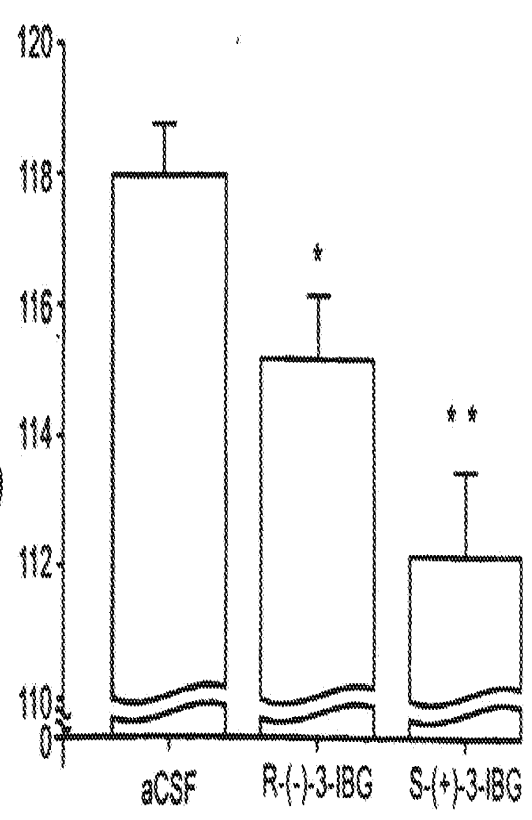
MEGADÁS ALAPJÁN
SZOLGÁLÓ VÁLTOZÁS

1A. ÁBRA



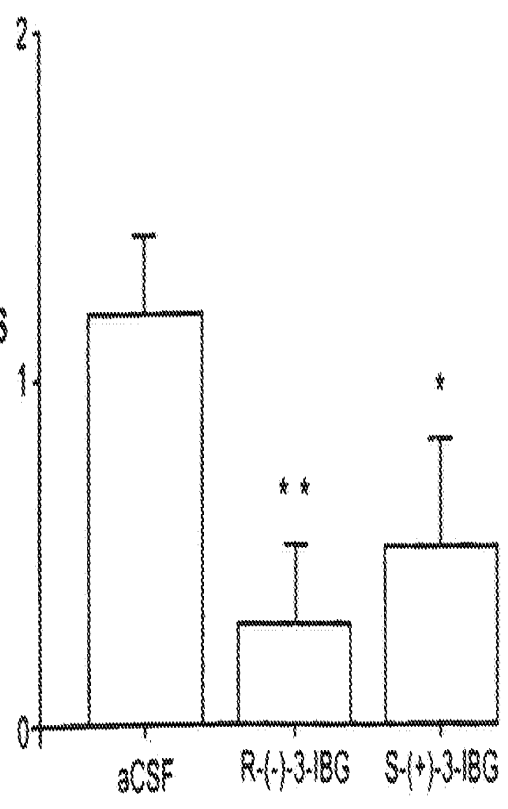
1B. ÁBRA

KERÜLET
(INJEKCIÓ ELŐTTI %-A)

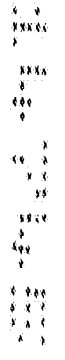
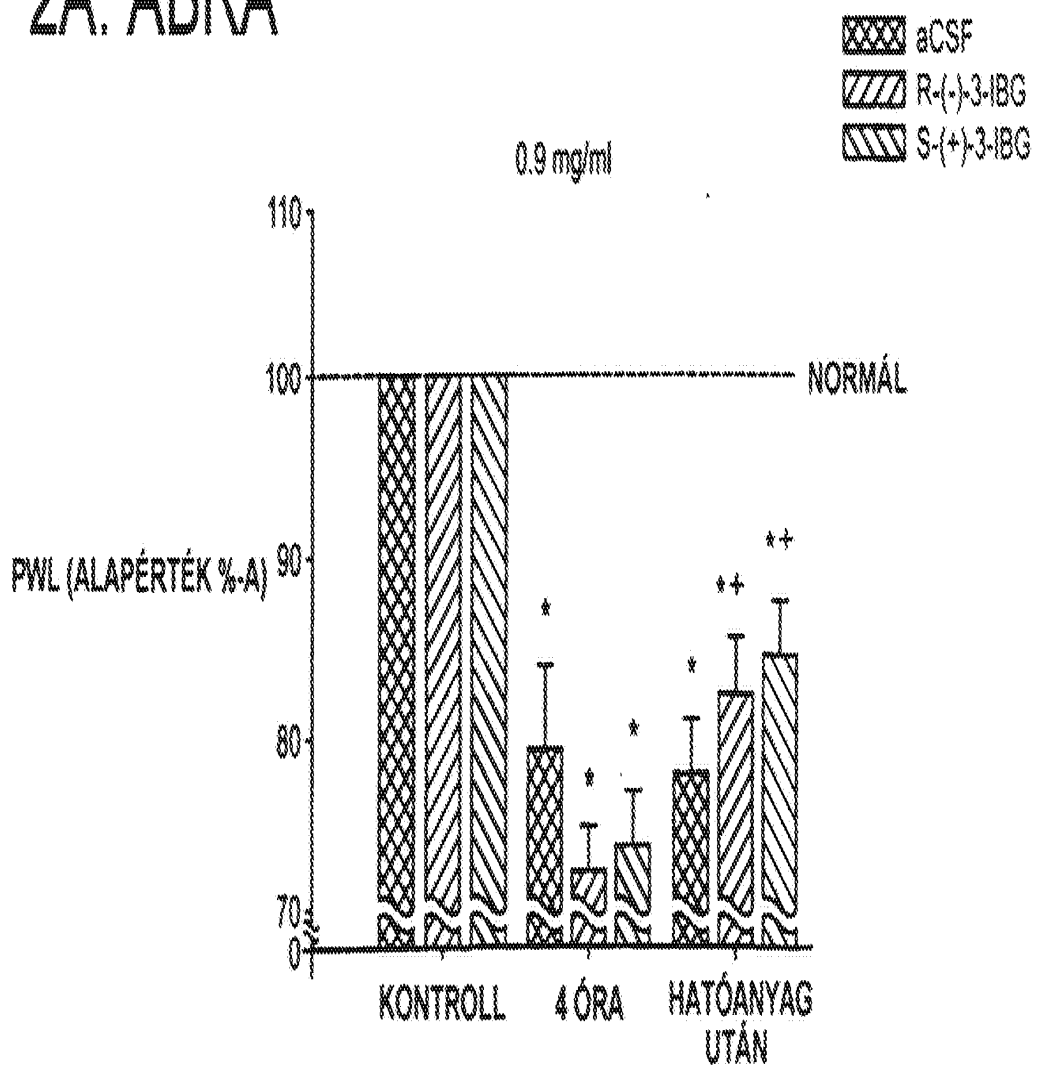


1C. ÁBRA

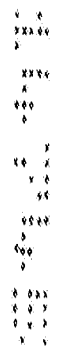
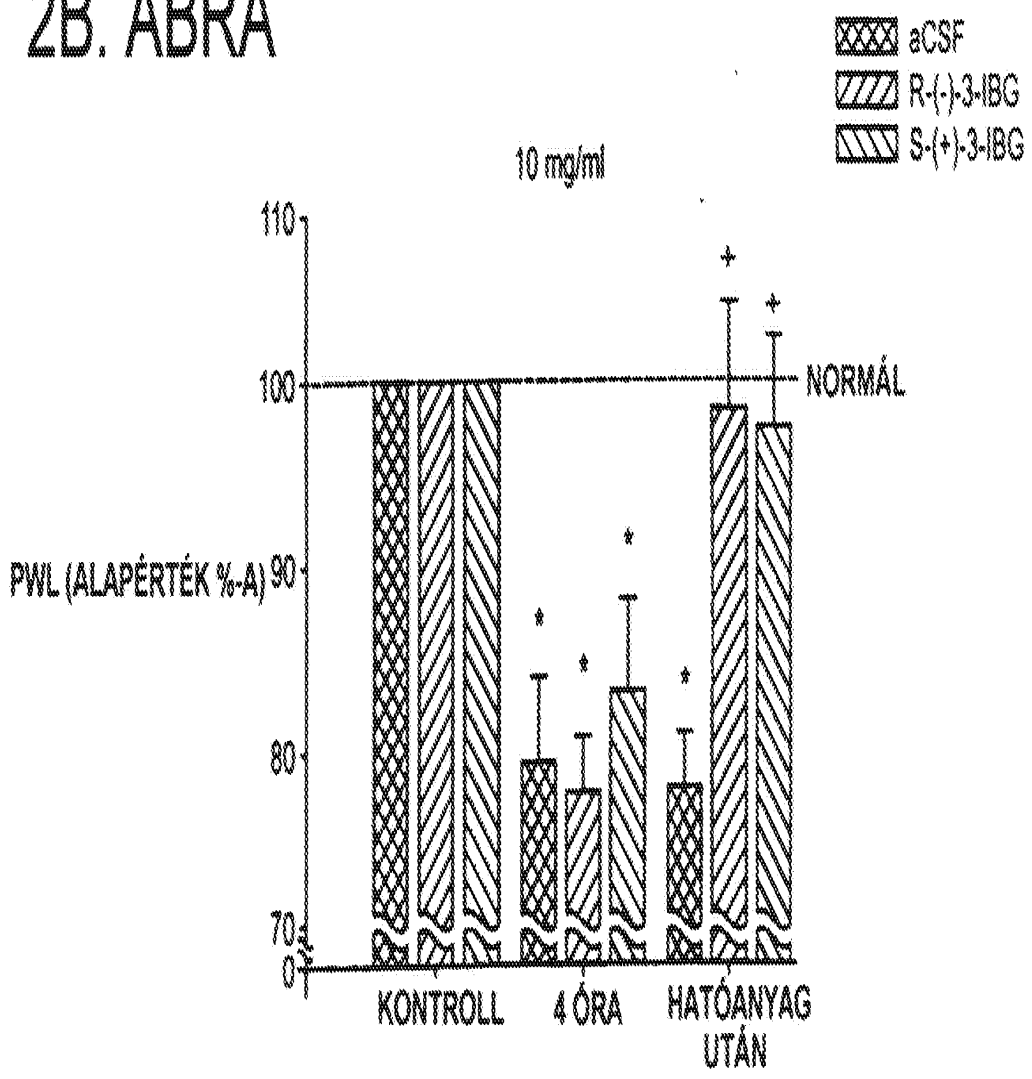
FÁJDALOMMAL KAPCSOLATOS
VISELKEDÉS (PONTSZÁM)



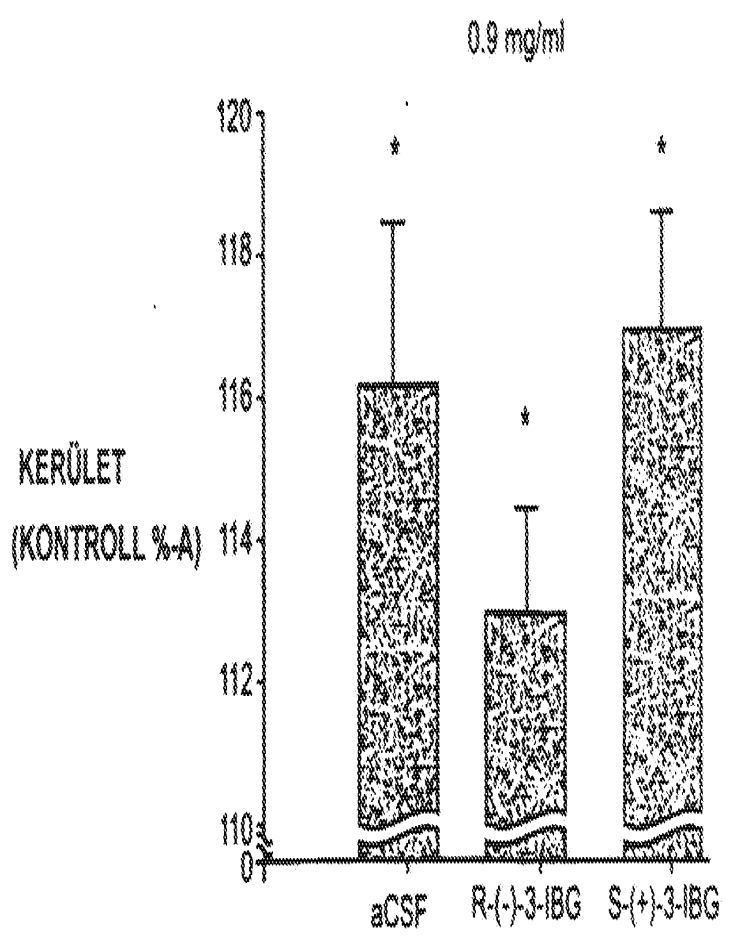
2A. ÁBRA



2B. ÁBRA



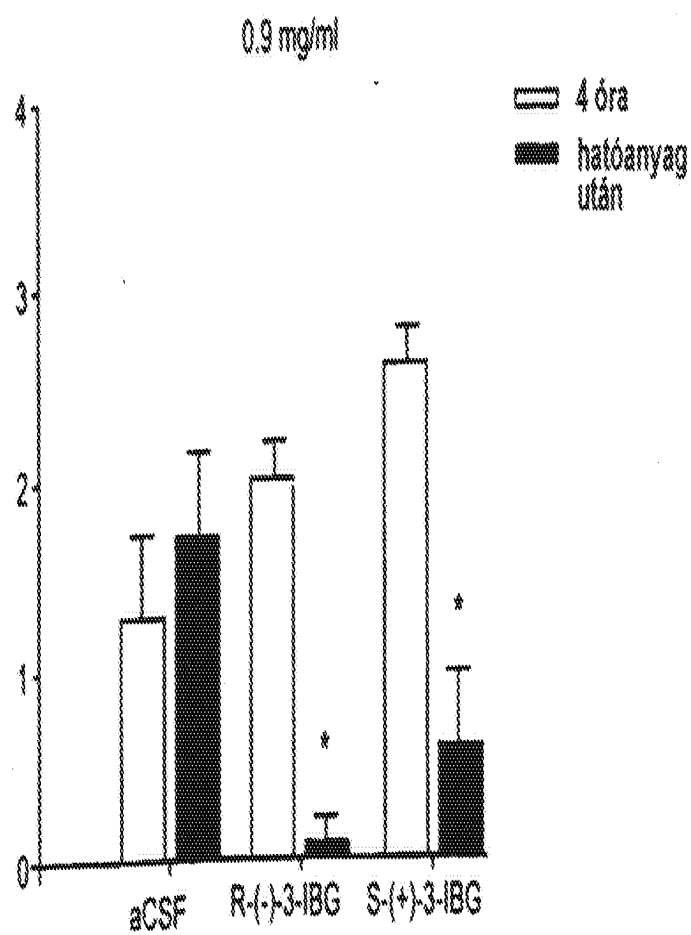
3A. ÁBRA



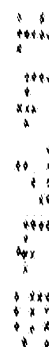
6/9



4A. ÁBRA



8/9



4B. ÁBRA

