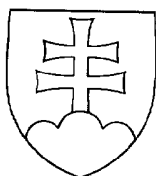


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

278 896

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. ⁶

A 61K 31/195

A 61K 31/675

A 61K 33/22

(21) Číslo prihlášky: 1563-91

(22) Dátum podania: 24.05.91

(31) Číslo prioritnej prihlášky: P 40 16 963-4

(32) Dátum priority: 25.05.90

(33) Krajina priority: DE

(40) Dátum zverejnenia: 19.02.92

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: 08.04.98

(86) Číslo PCT:

(73) Majiteľ patentu: Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH, Darmstadt, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Schneider Werner, Koblenz, DE;
Meyer Britta, Baldham, DE;
Elstner Erich F., prof. Dr., Gröbenzell, DE;

(54) Názov vynálezu: **Použitie magnézium-pyridoxal-5'-fosfátglutaminátu ako účinnej zložky na prípravu liečiva**

(57) Anotácia:
Použitie magnézium-pyridoxal-5'-fosfátglutaminátu ako účinnej zložky na prípravu liečiva vhodného na redukciu peroxidov s LDL-väzbou a na profylaxiu z toho vyplývajúcich vaskulárnych porúch v neprítomnosti hypercholesteraeémie alebo hyperlipidaémie.

Oblasť techniky

Vynález sa týka magnéziu-pyridoxal-5'-fosfátglutaminátu ako účinnej zložky na prípravu liečiva na prevenciu chorôb, ktoré sú spôsobované LDL-väzbou peroxidov a prejavujú sa vaskulárnymi poruchami.

Doterajší stav techniky

V posledných štyroch desaťročiach je možné pozorovať v západných priemyselných krajinách rýchly nárast metabolických porúch, najmä porúch metabolizmu tukov. Hlavným dôvodom je nadbytočná výživa alebo veľmi mastné potraviny pri súčasnom nedostatku pohybu. Pri takýchto podmienkach môže v krvi stúpať množstvo cholesterolu a lipidov, čím sa zväčšuje riziko arteriosklerotických kardiálnych a periférálnych vaskulárných chorôb. Je známe, že zvýšené hladiny cholesterolu v krvi sú spoluzodpovedné za výskyt arteriálnej vaskulárnej sklerózy. Hypercholesterémia je metabolická porucha, ktorá vždy sprevádza hyperlipidaémiu. Patogenicky odlišné, ale príznakovo podobné klinické obrazy hyperlipidaémie (turbidita séra chylomikrónu) a hypercholesteráemie (zväčšenie obsahu cholesterolu v krvnej plazme na viac než 200 mg %) sa zhŕňajú pod spoločné pojmy hyperlipoproteinaémie alebo hyperlipidaémie.

Na liečenie hypercholesteráemie sa používajú predovšetkým deriváty kyseliny arylloxyoctovej, najmä etylestery kyseliny alfa-(p-chlórfenoxi)izomaslovej, ako aj deriváty kyseliny nikotínovej.

Okrem toho sa v DE-PS prihlasovateľa č. 24 61 742 opisuje použitie glutaminátových a asparaginátových esterov kyseliny pyridoxin-5'-fosforečnej na liečenie a profylaxiu hypercholesteráemie.

Bez toho, že by bolo nutné pre klinický obraz hypercholesteráemie alebo hyperlipidaémie, aby boli prítomné, môžu v prípade ohrozených skupín osôb, najmä fajčiarov, diabetikov, starnúcich ľudí a tých osôb, ktoré majú vysoký krvný tlak, nastávať vaskulárne poruchy. Tieto poruchy sa pričítajú prítomnosti zväčšenej koncentrácie peroxidov v krvi, ktoré sú viazané LDL (lipoproteínom s nízkou hustotou). Tieto LDL-viazané peroxidy spôsobujú a urýchľujú tvorbu ateromatózy a arteriosklerotických doštičiek v ciechach a môžu sa považovať za príčinu diabetickej angiopatie. Prítomnosť zvýšených koncentrácií geroxidujúcich produktov a ich súvis s vaskulárnymi poruchami je opisovaný v publikáciách J.M.C. Gutteridge et al., Trends in Biochemical Sciences, apríl 1990, strany 129 až 135, a D.W. Morrel et al., Journal of Lipid Research, zv. 30, 1989, strany 1827 až 1834.

Je známe, že arteriosklerotické zmeny v ciechach sú výsledkom endoteliálnych porúch a patogenéza prebieha nasledujúcim spôsobom: endoteliálna porucha - plateletovaná adhézia - proliferácia (novootvorenie) buniek hladkého svalstva - ukladanie lipidov.

Prvý stupeň, endoteliálna porucha, môže mať mnoho príčin, najmä mechanické poškodenie následkom strižných síl v prípade hypertónie, chemické poškodenie vplyvom cholesterolu pri hypercholesteráemii a pri jednotlivých toxických poškodeniach vplyvom kontaminácie v krvi. Existuje domnienka, že ďalší priebeh je väčšinou identický so všetkými tromi typmi poškodenia.

Dôsledkom endoteliálnej poruchy, ako aj následného ukladania tuku medzi bunkami a v ich vnútri v samotnej artérii je zväčšená agregácia trombocytov, ktorá je sprevá-

dzaná novotvorbou buniek hladkého svalstva, čo je spôsobované ďalším zväčšeným prítokom lipoproteínov v základnej látke spojovacieho tkaniva, pričom tvorba komplexu s glukózamino-glykánmi spájacieho tkaniva a metabolické defekty prebiehajú na úrovni buniek. Potom sa na poškodených miestach vytvára vápnik, čím sa všetky tieto zmeny uzatvárajú, čo pri konečnom rozbere vedie k stiahnutiu ciev.

Boli vykonané testy na hypercholesteremických králikoch a krysách. W. Schneider dochádza vo svojej dizertačnej práci k záveru (1987 na univerzite Johanna Gutenberga v Mainzi), že keď sa podávajú pomerne vysoké koncentrácie magnéziu-pyridoxal-5'-fosfátglutaminátu (MPPG), znižujú sa koncentrácie pečeneového a aortálneho lipidu. Táto práca však neuvádza poukazy súvisiace s mechanizmom, ktorý iniciuje tvorbu cievného aterómu v ohrozených skupinách osôb. Na základe výsledkov získaných W. Schneiderom však nie je možné vyvodzovať závery, že tvorbe aterómu je možné predchádzať vylúčením iniciálnych kontaminácií v krvi.

V minulosti sa istý čas pochybovalo, že peroxidy v krvi môžu pôsobiť ako iniciátory metabolických porúch. U.P. Steinbrecher et al. opisujú v J. Biol. Chem., zv. 264, č. 26, strany 15216 až 15223 (1989) prítomnosť oxidačne modifikovaného LDL, ako aj jeho receptora. Prihlasovateľ teraz preukázal testami vykonanými s týmto cieľom, že toto sa týka LDL-viazaných peroxidov. Testami vykonanými in vitro mohol byť objasnený jeden z mechanizmov zdôrazňujúci toxickú endoteliálnu poruchu a ukázalo sa, že je možné zachytiť tieto peroxidy a zneškodniť ich.

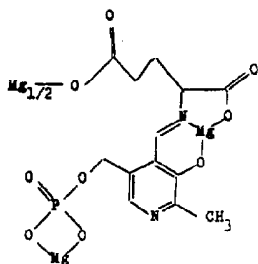
Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu je získať farmaceutický prostriedok na redukciu LDL-viazaných peroxidov, aby sa takto zabránilo vaskulárnym poruchám alebo aby sa vaskulárne poruchy odstránili, najmä vytváranie ateromatózy alebo arteriosklerotických doštičiek v arteriálnych ciechach, ako aj angiopatických chorôb v prípade diabetikov. Predmetom tohto vynálezu je najmä získať farmaceutický prostriedok aj pre tie uvedené prípady, pri ktorých neexistuje diagnóza hyperlipidaémie alebo hypercholesteráemie.

Uvedený predmet sa podľa vynálezu dosahuje použitím magnéziu-pyridoxal-5'-fosfátglutaminátu na prípravu farmaceutického prostriedku, ktorý je vhodný na profylaxiu chorôb spôsobovaných vaskulárnymi poruchami. Podľa vynálezu sa predchádza najmä ateromatóze ako aj angiofatickým chorobám u ohrozenej skupiny osôb, skladajúcej sa z fajčiarov, diabetikov, starnúcich ľudí, hypertenzných osôb a ľudí trpiacich stresom.

Magnéziu-pyridoxal-5'-fosfátglutaminát je látka, ktorá sa predtým podávala na znižovanie zvýšenej hladiny krvných tokov. Látka (MPPG) je známa pod obchodným označením Sedalipid[®] a je distribuovaná firmou Steigerwald Arzneimittelwerk, Darmstadt. Až doteraz nebolo známe, že magnéziu-pyridoxal-5'-fosfátglutaminát pôsobí ako radikálny lapač v krvi a je preto schopný zabraňovať reťazovej reakcii spôsobenej lipidovým peroxidom. Na základe tohto účinku ako radikálneho lapača je používanie MPPG vhodné na profylaxiu vaskulárných porúch, najmä v neprítomnosti hyperlipidaémie alebo hypercholesteráemie.

MPPG je derivátom pyridoxínu a má nasledujúci vzorec:



V zmysle vynálezu sú ohrozenými skupinami osôb najmä fajčiari, diabetici, ľudia s vysokým krvným tlakom, ako aj osoby trpiace stresmi, ako napríklad vrcholoví športovci a starí ľudia.

Podľa vynálezu sa uvedená zlúčenina MPPG podáva uvedeným ohrozeným osobám, ktoré majú vysokú koncentráciu LDL-viazaných peroxidov, ale netrpia príznakmi hyperlipidaémie alebo hypercholesterolemie. Tieto symptómy sa zvyčajne určujú na báze cholesterolových hladín ako aj cholesterolových a triglyceridových hladín. V Európe a tiež v USA existujú doporučená, čo sa týka normálnych a zvýšených cholesterolových a triglyceridových hladín.

Čo sa tohto týka, odkazuje sa na doporučenie US národného cholesterolového výchovného programu (National Cholesterol Education Programme NCEP) a smernice vypracované študijnou skupinou európskej artériosklerózovej spoločnosti. V nasledujúcich tabuľkách 1 a 2 sú zhrnuté hodnoty, čo je možné považovať za normálne cholesterolové a triglyceridové hladiny a kedy sa má začať s liečením:

Tabuľka 1

Doporučenie US národného cholesterolového výchovného programu (NCEP)

Klasifikácia	Hladina celkového cholesterolu	Doporučené sledovať
Žiaduci cholesterol	< 200 mg/dl	Opakovať meranie po 5 rokoch
Medzné cholesterolové riziko	200-239 mg/dl	Ak nie je CHD a žiadne iné rizikové faktory: Informácie o diéte a ročná kontrola V prípade jasného CHD alebo dvoch iných CHD rizikových faktorov: Ďalšie akcie na základe LDL hladiny
Vysoké riziko cholesterolu	> 240 mg/dl	Vykonať analýzu lipoproteínov a ďalšie akcie na základe hladiny LDL
Žiaduca LDL	< 130 mg/dl	-----
Medzné LDL riziko	130-159 mg/dl	Liečenie diétou, ak je CHD a dva ďalšie rizikové faktory
Vysoké riziko LDL	160-190 mg/dl	Liečenie diétou, ak nie je CHD a žiadne ďalšie rizikové faktory
	> 190 mg/dl	Liek a diéta, ak je CHD alebo dva ďalšie rizikové faktory

Smernice študijnej skupiny európskej artériosklerózovej spoločnosti.

Typ A: Cholesterol: 200-250 mg/dl (5,2-6,5 mmol/l)

Triglyceridy: < 200 mg/dl (< 2,3 mmol/l)

Odhadnúť celkové riziko CHD pri uvážení rodinného výskytu CHD, hypertenzie, diabetu, mužského pohlavia,

ranejšieho veku, fajčenia, nízkeho HDL cholesterolu, napr. < 35 mg/dl.

V prípade nadváhy obmedziť energetický obsah potravy; poskytnúť rady o výžive a opraviť iné rizikové faktory, ak existujú.

Typ B: Cholesterol: 250-300 mg/dl (6,5-7,8 mmol/l)

Triglyceridy: < 200 mg/dl (< 2,3 mmol/l)

Odhadnúť celkové riziko CHD ako pri type A.

V prípade nadváhy obmedziť energetický obsah potravy; predpísať diétu znižujúcu lipidy a sledovať odozvu a splnenie. Ak zostáva cholesterol vysoký, zvážiť použitie lieku znižujúceho lipidy.

Typ C: Cholesterol: < 200 mg/dl (< 5,2 mmol/l)

Triglyceridy: 200-500 mg/dl (2,3-5,6 mmol/l)

Snažiť sa zdôrazniť príčiny hypertriglyceridaémie, napr. obezitu, nadmerné používanie alkoholu, diuretik, beta-blokátorov, exogénny oestrogens, diabetes.

V prípade nadváhy znížiť energiu diéty; prejednať a zdôrazniť príčiny, ak sú. Predpísať a sledovať diétu znižujúcu lipidy. Sledovať hladiny cholesterolu a triglyceridu.

Typ D: Cholesterol: 200-300 mg/dl (5,2-7,8 mmol/l)

Triglyceridy: 200-500 mg/dl (2,3-5,6 mmol/l)

Odhadnúť celkové riziko CHD ako pri type A. Snažiť sa zdôrazniť príčiny hypertriglyceridaémie ako pri type C.

V prípade nadváhy obmedziť diétu energiu; ak existuje hypertriglyceridaemia, prejednať a zdôrazniť jej príčiny podľa typu A alebo B. Predpísať a sledovať diétu znižujúcu lipidy. Ak nie je odozva sérového lipidu primeraná a celkové riziko CHD je vysoké, zvážiť použitie lieku znižujúceho lipidy.

Typ E: Cholesterol: > 300 mg/dl (7,8 mmol/l)

Triglyceridy: > 500 mg/dl (5,6 mmol/l)

Uvažovať o odkázaní na lipidovú kliniku alebo k špecializovanému lekárovi na vyšetrenie a započatie liečenia diétou a v prípade potreby liekmi.

Odhadnúť celkové riziko CHD ako pri type A. Snažiť sa zdôrazniť príčiny hypertriglyceridaémie ako pri type C.

Podobne existujú publikované odporúčania pracovnej skupiny britskej kardiálnej spoločnosti, čo sa týka koronárnej prevencie, britskej hyperlipidaemickej asociácie a kanadská konferencia konsenzu pri cholesterolu.

Z údajov uvedených v tabuľkách je zrejme, že sa hodnoty mierne líšia v prípadoch, pri ktorých je obsah cholesterolu potrebné považovať za škodlivý. Predovšetkým je však užitočné tak postupovať pod týmito medznými hodnotami, najmä v neurčitom pásme medzi ešte normálnymi a zvýšenými hladinami. Podávanie MPPG podľa vynálezu je prospešné pre tých jedincov, ktorí patria do ohrozených skupín majúcich vysokú -LDL-väzbu peroxidov.

Aj keď nie je možné uviesť určitú hranicu, pri ktorej sa musí diagnostikovaná hladina cholesterolu vykladať ako hyperlipidaemia, zaujíva sa, že sa ako všeobecné vodidlo môže použiť obsah približne 240 mg/dl (podľa amerických doporučení) alebo 250 mg/dl (podľa európskych doporučení), ktorý sa môže pokladať za začínajúcu hyperlipidaémiu. O podávanie MPPG podľa vynálezu sa preto uvažuje najmä pod uvedenými hladinami cholesterolu.

Vynálezci vykonali istý počet testov, aby jasne dokázali, že v ohrozenej skupine osôb existujú tieto vysoké hladiny peroxidov viazaných na LDL. Bolo tiež možné dokázať, že po podaní MPPG zmizli detekčné signály indikujúce peroxidy viazané na LDL. Z toho je teda možné usudzovať,

že aplikácia MPPG pacientom patriacim do ohrozenej skupiny je oprávnená a užitočná.

Pre zvýšenú iniciáciu vytvárania aterómu, najmä v uvedenej skupine osôb, sa predpokladá nasledujúci mechanizmus, ktorý bude dokumentovaný ďalej opísanými in vitro testami:

LDL sa oxiduje reaktívnymi druhmi kyslíka (superoxidový radikál O_2^- , hydroxylový radikál OH), najmä peroxidom, ktoré sú prítomné v krvi, čím sa vytvára LDL peroxid. Tento LDL peroxid sa v podstate neabsorbuje makrofágmi, ale viaže sa na čistiace receptory, ktorý je rozmiestnený na endoteliálnych bunkách (pozri uvedenú literatúru, Steinbrecher et al.). Takto sa na endoteliálnych bunkách ukladá LDL a tieto usadeniny priťahujú ďalšie usadeniny lipidu.

Ďalšie poškodzovanie cievnych endoteliálnych buniek je spôsobované oxidáciou glutatiónu peroxidom alebo LDL-viazaným peroxidom. Táto oxidácia môže viesť k usmrteniu buniek, pretože bunka nemôže ďalej udržať svoj redox potenciál (K.Kuzuya et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., zv. 163, č. 3, 1989, strany 1466 až 1472).

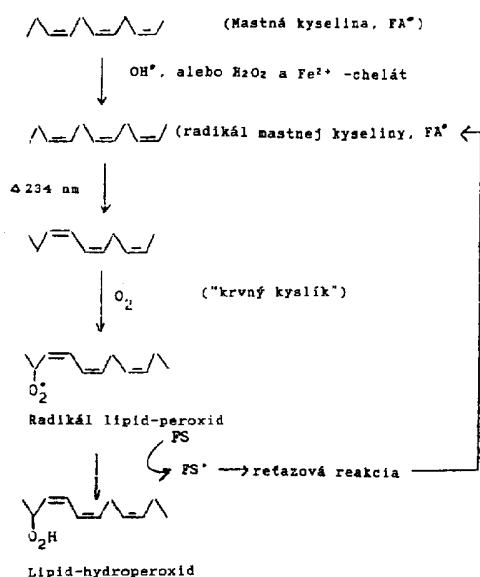
Nasledujúce konštatovanie poskytuje podrobnejšie vysvetlenie mechanizmu hovoriace o vplyve MPPG na LDL-viazaný peroxid. Nasledujúce testy ukazujú na základe peroxidov viazaných na masťnú kyselinu, že sa tieto peroxidy v prítomnosti MPPG rozkladajú, takže ich je možné takto zneškodňovať.

Na priložených výkresoch jednotlivé grafy znamenajú: Obr. 1 znázorňuje spektrum linoleovej kyseliny (0,88 mM). Hlavný vrchol je pri 211 nm, zatiaľ čo pri asi 232 sa zistí menší vrchol, čo poukazuje na prítomnosť malého percenta oxidovanej linoleovej kyseliny.

Obr. 2 znázorňuje spektrum MPPG (koncentrácia 0,125 nM), pri ktorom sa prejavujú vrcholy pri 222, 327 a 387.

Obr. 3 znázorňuje spektrum roztoku linoleovej kyseliny a MPPG. Toto spektrum má vrcholy pri 211, 243 a 289 nm. Vrchol získaný skôr na obr. 1 pri 232 už nie je viac prítomný na obr. 3. Namiesto toho obr. 3 znázorňuje dva nové vrcholy pri 243 a 289 nm.

Nasledujúci náčrt znázorňuje predpokladaný reakčný mechanizmus prebiehajúci počas oxidácie masťnej kyseliny, ako to opisuje napr. J.M.C. Gutteridge et al. v publikácii Trends in Biochemical Science, apríl 1990, str. 130:



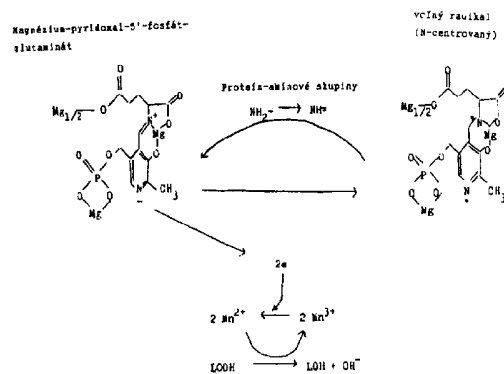
Najprv nastáva útok na premostujúcu CH_2 skupinu radikálom $H^\bullet$. Toto spôsobuje premiestnenie, takže sa z izolovaných dvojných väzieb vytvoria konjugované dvojné väzby. Výsledkom je vznik radikálu masťnej kyseliny, ktorý v prítomnosti kyslíka vytvára peroxidový radikál. Za prítomnosti ďalšej molekuly kyseliny masťnej sa vytvára hydroperoxid masťnej kyseliny a tiež radikál masťnej kyseliny, čím začína reťazová reakcia.

Znárodné hlavné črty reakcie môžu byť pri 234 nm nasledované dôkazom diénovej reakcie.

Z obrázkov 1 až 3 je možné vyvodzovať, že vrchol pre oxidovanú kyselinu zmizne pri 232 nm (obr. 1) pridaním MPPG v koncentrácii 0,125 mM (obr. 3), pričom predtým spustená reťazová reakcia sa preruší, a tým aj postup choroby.

Na rozklad hyperoxidu za prítomnosti látky $\bullet$ MPPG používanej podľa tohto vynálezu sa predpokladá nasledujúci mechanizmus katalyzovaný mangánom:

Predpokladaný mechanizmus rozkladu hydroperoxidu katalyzovaný MPPG -Mn



Teraz je možné skúmať túto rozkladnú reakciu pomocou indikátorovej látky, ktorou je kyselina aminocyklopropánkarboxylová (ACC). ACC je základnou látkou vyskytujúcou sa v prírode pri tvorbe etylénu. Uvoľňovaný etylén je možné určovať kvantitatívne.

Rozklad hydroperoxidu môže prebiehať napr. kuménhydroperoxidom. ACC pôsobí ako iniciátor. Predpokladá sa, že reakcia postupuje cez amin na pyridoxalfosfát, ktorý spôsobuje tvorbu radikálu. Tento radikál iniciuje rozklad ACC na CH_2H_4 , CO_2 a kyanid.

Nasledujúce testy znázorňujú stimuláciu rozkladu ACC pôsobením MPPG za prítomnosti kuménhydroperoxidu v závislosti od koncentrácie kuménhydroperoxidu (KumOOH). Súčasne boli vykonané porovnávacie testy so zodpovedajúcimi množstvami pyridoxalfosfátu. (PP).

Príklad testu:

Boli pripravené nasledujúce roztoky vo fosfátovom pufrí (0,1 M) s pH 7,4 s rôznymi koncentraciami kuménhydroperoxidu.

Dávka :Fosfátový pufr 0,1 M, pH 7, 4

ACC	1,0 mM
MPPG	0,5 mM
Mn $^{2+}$	0,1 mM
LA	0,88 mM
KumOOH	0,006-1,2 mM
destilovaná voda	ad 2 ml

Tabuľka 3

Stimulácia disociácie ACC pôsobením MPPG/PP vplyvom KumOOH v závislosti od koncentrácie KumOOH (LA = linoleová kyselina, KumOOH = kuménhydroperoxid, ACC = aminocyklopropánkarboxylová kyselina)

Konc. KumOOH (mM)	Etylén (pH ₀₁)					
	0,006	0,12	0,05	0,12	0,6	1,2
a) MPPG						
KumOOH samotný	-	-	74 ±40	122 ±60	271 ±147	1192 ±500
LA samotná	4028 ±933	4028 ±933	4028 ±933	4028 ±933	4028 ±933	4028 ±933
teoret.Σ	4028	4028	4102	4150	4299	5219
LA + KumOOH	1014 ±407	6926 ±407	9655 ±471	16059 ±565	79079 ±5672	57894 ±6768
Stimulácia (%)	-	72,0	139,7	298,7	1863,3	1337,4
b) PP						
KumOOH samotný	-	-	-	-	-	-
LA	2972 ±439	2972 ±439	2972 ±439	2972 ±439	2972 ±439	2972 ±439
(=teoret.Σ)	2972	2972	2972	2972	2972	2972
LA + KumOOH	4319 ±173	4394 ±250	5247 ±540	5635 ±533	11972 ±425	17695 ±1827
Stimulácia (%)	45,3	47,8	76,5	89,6	302,8	495,3

Na obrázkoch 4a a 4b je znázornená stimulácia disociácie ACC pôsobením MPPG alebo PP v závislosti od koncentrácie KumOOH.

Pri disociácii ACC pyridoxalfosfátu sa pozoruje merateľné množstvo uvoľňovaného etylénu, na rozdiel od MPPG, v dolnom rozsahu koncentrácie použitej na kuménhydroperoxid (0,006 mM). Pri koncentrácii KumOOH 0,12 mM v prítomnosti MPPG sa zistí stimulácia disociácie ACC vo výške 70%. Pri koncentráciách KumOOH 0,6 mM a 1,2 mM sa namerajú jasne vyššie účinky stimulácie za prítomnosti MPPG v porovnaní s PP.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie magnézium-pyridoxal-5'-fosfátglutaminátu ako účinnej zložky na prípravu liečiva vhodného na redukciu peroxidov s LDL-väzbou a na profylaxiu z toho vyplývajúcich vaskulárnych porúch v neprítomnosti hypercholesterolemie alebo hyperlipidaémie.

2. Použitie podľa nároku 1 na prípravu liečiva na profylaxiu proti ateromatóze.

3. Použitie podľa nároku 2 na prípravu liečiva na profylaxiu angiopatického ochorenia.

Koniec dokumentu