

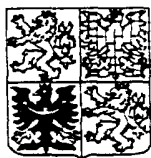
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

281 353

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2582-92**

(22) Přihlášeno: 21. 08. 92

(30) Právo přednosti:
22. 08. 91 DE 91/4127737

(40) Zveřejněno: 17. 03. 93

(47) Uděleno: 08. 07. 96

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11. 09. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:
A 61 K 31/42

(73) Majitel patentu:
HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT,
Frankfurt am Main, DE;

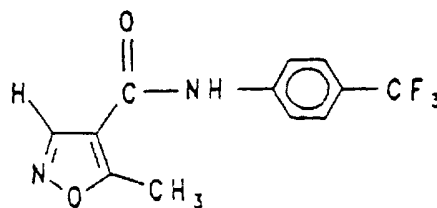
(72) Původce vynálezu:
Bartlett Robert Ryder dr., Darmstadt, DE;

(54) Název vynálezu:

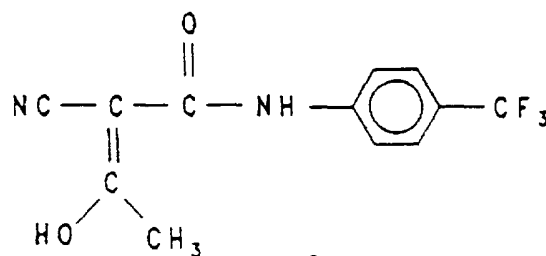
**Farmaceutický prostředek pro aplikaci
při odmítavých reakcích organismu a
použití (4-triflormethyl)anilidu kyseliny
5-methylisoxazol-4-karboxylové a/nebo
jejího metabolitu pro výrobu léčiv**

(57) Anotace:

Řešení se týká použití (4-trifluormethyl)anilidu kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové vzorce 1 a/nebo jejího metabolitu, amidu kyseliny N-(4-trifluormethylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotonové vzorce 2, jakož i fyziologicky přijatelných solí sloučeniny vzorce 2 pro aplikaci při odmítavých reakcích organismu příjemce orgánu proti transplantovanému orgánu a farmaceutického prostředku na jejich bázi.



1



2

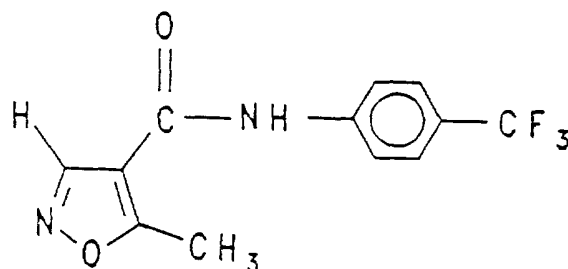
Farmaceutický prostředek pro aplikaci při odmítavých reakcích organismu a použití (4-trifluormethyl) anilidu kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové a/nebo jejího metabolitu pro výrobu léčiv

Oblast techniky

Vynález se týká použití (4-trifluormethyl) anilidu kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové a/nebo jejího metabolitu, amidu kyseliny N-(4-trifluormethyl-fenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotonové, jakož i fyziologicky přijatelných solí druhé uvedené sloučeniny, pro aplikaci při odmítavých reakcích organismu příjemce orgánu proti transplantovanému orgánu, jakož i léčiv, obsahujících uvedené sloučeniny.

Dosavadní stav techniky

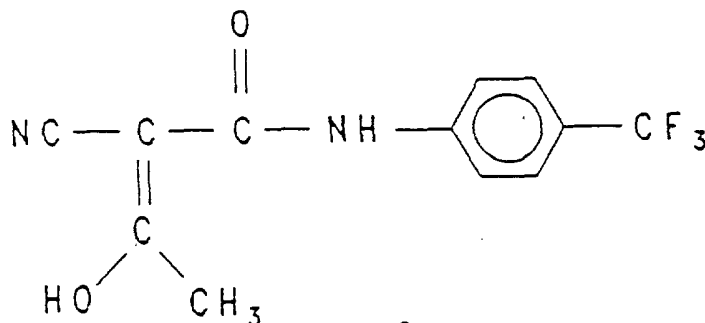
Z Evropského patentového spisu č. 13 376 je známý (4-trifluormethyl) anilid kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové vzorce 1



1

jako antiflogistické činidlo. Zde je také popsán způsob výroby této sloučeniny.

Dále je známo, že sloučenina vzorce 1 a její metabolit, amid kyseliny N-(4-trifluormethylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotonové vzorce 2



2

mají imunomodulační vlastnosti, takže tyto sloučeniny jsou vhodné jako léčiva proti chronickému onemocnění "Graft-versus-Host", jakož i proti onemocnění autoimunitního systému, obzvláště systematickému Lupus erythematoses (EP-A-217 206).

US-patentový spis 4 061 767 popisuje použití anilidových derivátů kyseliny 2-hydroxyethylidenkyanoctové pro výrobu léčiv s antiflogistickým a analgetickým účinkem.

V USA bylo v roce 1990 provedeno 15 000 transplantací orgánů. Větší počet se týkal ledvin, ale přibývalo také transplantací srdce, kůže, plic, jater a pankreasu. U velkého počtu pacientů přitom dochází k odmítavým reakcím těla proti přenášenému orgánu, který pochází od jiného člověka. Při tom se rozlišují tři formy odmítavých reakcí:

hyperakutní, akutní a chronické odmítání.

Hyperakutní odmítavá reakce je v podstatě způsobena protilátkami, cirkulujícími v krvi, které jsou zaměřeny proti tkáni přeneseného orgánu (transplantátu) a ve velmi krátké době, často v průběhu několika minut, vedou k nekrose transplantátu.

Při akutním odmítání transplantátu je odmítavá reakce časově zpomalena. Vedle toho se vyskytuje chronická forma průběhu onemocnění. Transplantát přežívá první rok po transplantaci, může však být v příštích letech organismem odmítán. Dále je známo, že hostitelský vztah transplantátu není samotný omezen na odmítání hostitelským organismem, v určitých případech může nastupovat imunoreakce proti hostitelskému organismu, vycházející z transplantátu (EP-A-217 206). Rozlišuje se tedy mezi odmítavou reakcí mezi transplantátem a hostitelem a mezi hostitelem a transplantátem.

Dále je známo, že dochází k odmítavým reakcím, když se přenášejí orgány různých druhů organismů, například z myši na krysu (Roitt a kol., Immunology, Gower Medical Publishing Ltd., 1985).

Dosud nejsou známá žádná léčiva, která by poskytovala účinnou ochranu proti hyperakutní odmítavé reakci. Na klinikách se dosud dárce a příjemci orgánů testují na nesnášenlivost. U 20 až 40 % pacientů jde při tom o případ, že nemohou přijmout darovaný orgán. Akutní odmítavou reakci je možno ošetřovat, avšak používané medikamenty vykazují při terapii nefrotoxické vedlejší účinky. Dosud také nejsou známy žádné medikamenty, které by mohly zachytit původ chronických odmítavých reakcí.

Jako podstatný patogenní faktor pro zánik tkáně u transplantátu jsou brány allofilní a xenofilní protilátky (Auchincloss H., Transplantation 46, 1, 1988). Tyto protilátky jsou v podstatě zodpovědné za odmítání při přenosech orgánů v jednom druhu organismu (allo) nebo mezi dvěma různými druhy organismů (xeno).

Podstata vynálezu

Nyní bylo překvapivě zjištěno, že sloučenina vzorce 1 a její metabolit, shora uvedená sloučenina 2, vykazují silnou inhibici tvorby allofilních nebo xenofilních protilátek. Tím je umožněno účinně ošetřovat hyperakutní, akutní a chronické reakce příjemce proti transplantovanému orgánu.

Předložený vynález se tedy týká použití (4-trifluormethyl-fenyl) anilidu kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové a amidu kyseliny N-(trifluormethylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotonové a/nebo jeho fyziologicky přijatelné soli pro výrobu léčiv pro aplikaci při odmítavých reakcích organismu příjemce orgánu proti transplantovanému orgánu.

Vhodné fyziologicky přijatelné soli jsou například soli s alkalickými kovy, kovy alkalických zemin nebo soli amonné, zahrnující také fyziologicky přijatelné organické amonné base.

Pod pojmem orgán se rozumí všechny orgány savců, obzvláště lidí, například ledviny, srdce, kůže, játra, pankreas, svaly, kosti, střeva nebo žaludek, ale také krev nebo vlasy.

Pod pojmem odmítavá reakce se míní všechna obranná opatření organismu příjemce, která vedou konečně k zániku buněk nebo tkáni přenášeného orgánu, popřípadě která ovlivňují životaschopnost přenášeného orgánu.

Sloučeniny vzorce 1 a 2 se mohou vyrobit následujícím způsobem:

Nechá se reagovat sloučenina obecného vzorce I



ve kterém značí X atom halogenu, výhodně chloru nebo bromu, s aminem vzorce II



na sloučeninu vzorce 1, která se potom může nechat zreagovat za přítomnosti basickeho činidla na sloučeninu vzorce 2.

Shora uvedené reakce probíhají za standardních podmínek známým způsobem (EP-B-13 376, US 4 061 767).

Výchozí látky pro uvedené reakce jsou známe, nebo se dají lehce vyrobit pomocí metod, známých z literatury.

Předložený vynález se dále týká léčiv, která obsahují účinné množství sloučeniny vzorce 1 nebo sloučeniny vzorce 2 a/nebo fyziologicky přijatelné soli sloučeniny vzorce 2, vedle farmaceuticky vhodných a fyziologicky přijatelných nosičů, zředovacích činidel a/nebo jiných účinných a pomocných látek.

Dále se předložený vynález týká také způsobu výroby léčiv pro aplikaci při odmítavých reakcích organismu příjemce orgánu proti transplantovanému orgánu, jehož podstata spočívá v tom, že se sloučenina vzorce 1 nebo 2 a/nebo fyziologicky přijatelná sůl sloučeniny vzorce 2 převede s farmaceuticky vhodným a fyziologic-

ky přijatelným nosičem a popřípadě s dalšími vhodnými účinnými, přídatnými nebo pomocnými látkami, na vhodnou aplikační formu.

Léčiva podle předloženého vynálezu se mohou aplikovat orálně, topicky, rektálně, intravenosně nebo také parenterálně. Aplikace se provádí před, během a po transplantaci orgánu u příjemce a/nebo dárce.

Jako vhodné pevné nebo kapalné aplikační formy je možno uvést například granuláty, dražé, prášky, tablety, (mikro) kapsle, čípky, sirupy, šťávy, suspense, emulze, kapky nebo injikovatelné roztoky, jakož i preparáty s protrahovaným účinkem. Při jejich výrobě se používají běžné pomocné látky, jako jsou například nosiče, bubřidla, pojiva, potahové látky, botnací látky, maziva a mazací látky, chuťové látky, sladidla nebo látky zprostředkující rozpouštění. Jako často používané pomocné látky je možno uvést například uhličitán hořečnatý, oxid titaničitý, laktosu, mannit a ostatní cukry, mastek, mléčnou bílkovinu, želatinu, škroby, celulosu a její deriváty, živočišné a rostlinné oleje, polyethylenglykoly a rozpouštědla, jako je sterilní voda a jednocné nebo vícemocné alkoholy, například glycerol.

Výhodně se farmaceutické preparáty vyrábějí a aplikují v jednotkách dávky, přičemž každá jednotka obsahuje jako aktivní substanci určité množství sloučeniny vzorce 1 nebo 2 a/nebo fyziologicky přijatelnou sůl sloučeniny 2. U pevných jednotek dávky, jako jsou tablety, kapsle nebo čípky, může toto množství činit až asi 300 mg, výhodně však 10 až 200 mg.

Pro ošetření pacientů (70 kg), kterým byl transplantován nějaký orgán, se v počáteční fázi po transplantaci aplikuje intravenosně v infusích maximálně 1 200 mg za den a v pozdějších fázích rehabilitace se aplikuje orálně třikrát 300 mg za den sloučeniny vzorce 1 nebo 2 a/nebo odpovídající soli sloučeniny vzorce 2.

Podle okolností je však možno aplikovat také nižší nebo vyšší dávky. Aplikace dávky se může provádět jedním podáním ve formě jediné jednotky dávky, nebo také ve formě většího počtu menších jednotek dávky nebo také vícenásobným podáváním rozdělené dávky v určitých intervalech.

Konečně je také možné kombinovat sloučeninu vzorce 1 nebo 2 a/nebo odpovídající sůl sloučeniny vzorce 2 při výrobě shora uvedených galenických aplikačních forem také s jinými vhodnými účinnými látkami, například s antiurikopatiky, látkami potlačujícími agregaci trombocytů, analgetiky a steroidními nebo nesteroidními antiflogistiky.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Farmakologické zkoušky a výsledky

Krasy (LEW) staré 2 až 3 měsíce se intraperitoneálně (i.p.) sensibilisují $2 \cdot 10^7$ lidských periferních krevních lymfocytů. Intraperitoneální aplikace sloučeniny vzorce 2 počíná čtyři dny před sensibilisací a končí 10 dní po sensibilisaci krys. Vzorky séra se odebírají z ocasní žíly a skladují se při teplotě -80°C ; tepelnou aktivací se vyloučí komplementární funkce.

Přírodně se vyskytující xenofilní protilátky (nXA) a sensibilací indukované xenofilní protilátky (sXA) se titrují a přidávají se k lidským periferním krevním lymfocytům (živým) (45 minut při 20°C). Po intensivním promytí se přidá koží protilátka proti krysímu IgG a IgM, značená FITC a kvantitativně se stanovuje vazba na sXA nebo nXA pomocí Flow-cytometrie (FACScan, Becton Dickinson).

A) Nesensibilisované krasy

Samčí krasy LEW mají ve svém séru obsažené nXA, které se vážou na vitální lidské periferní krevní lymfocyty, a sice s průměrným IgM-titrem 1 : 4 a s průměrným IgG-titrem menším než 1 : 1.

Krasy ($n = 8$), kterým bylo podáváno každý den 10 mg/kg sloučeniny vzorce 2, vykazují v 11. dnu 30% redukci u IgG-titru a 50% redukci u IgM-titru.

B) Sensibilisované krasy

U sensibilisovaných krys se vyskytuje silně zvýšené množství sXA. IgG-titr činí 1 : 1 024 až 1 : 16 384 a IgM-titr činí 1 : 4 až 1 : 256. IgG-titr zůstává po 50 dní stabilní, zatímco IgM-titr po 10. dnu pomalu klesá.

Sensibilisované krasy ($n = 5$) se ošetřují 3 a 10 mg/kg sloučeniny vzorce 2. 11. den se dosáhne následujících sXA-titrů:

Sloučenina (mg/kg)	IgG	IgM
0	1 : 2 048	1 : 90
3	1 : 25	1 : 16
10	1 : 1	1 : 1,5

Účinek sloučeniny vzorce 2 na tvorbu allofilních protilátek

Samčí krasy Brown-Norway o hmotnosti 200 až 250 g se použijí jako dárce srdce. Srdce se transplantují samčím krysám Lewis o stejné hmotnosti. Všem krysám se podává standardní dieta a voda a v okolí se zachovává 12 hodin světlo a 12 hodin temno.

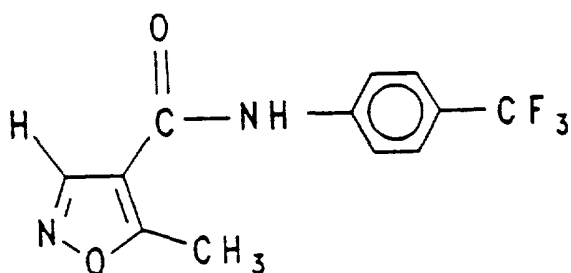
Krysám (Lewis) se v den transplantace srdce a potom v odstupu 4 dnů odebírá vždy 1 ml krve z ocasní žíly. Titr allofilních protilátek v krvi těchto krys se zjišťuje tak, že se různá zředění krve příjemců inkubují se slezinými buňkami krys dárcovských (Brown-Norway) a králíka. Cytotoxicita se stanovuje vylučovací metodou Tryptan-Blau. p-Hodnota pro protilátky se stanovuje pomocí standard-T-testu ve srovnání s neošetřenými kontrolními zvířaty.

Ošetření sloučeninou vzorce 2 počíná 4. den po transplantaci. Aplikuje se intraperitoneálně vždy 10 mg/kg sloučeniny 2 dvakrát denně. Počet zvířat, která se současně ošetřují, je 5. Ošetřování končí 17. den. Následující tabulka ukazuje průměr hodnot cytotoxicity (%) během ošetřování.

Zředění krve	dny po transplantaci						p-hodnota 17. den
	0	4	7	11	14	17	
1 : 5	3	63	36	19	22	11	0,001
1 : 25	3	58	31	16	11	6	0,001
1 : 125	4	34	20	9	6	5	0,050

Příklad 2

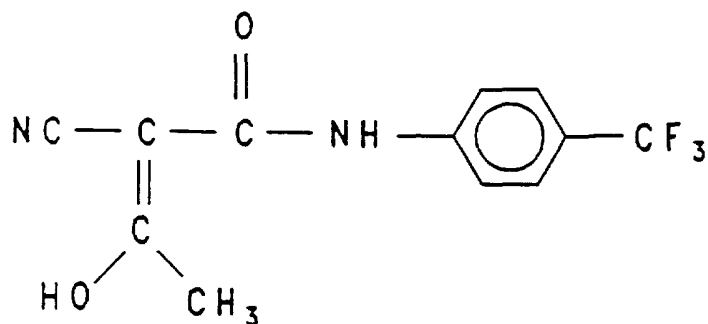
Výroba (4-trifluormethyl) anilidu kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové (sloučenina vzorce 1)



Roztok 0,05 mol chloridu kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové (7,3 g) ve 20 ml acetonitrilu se při teplotě místnosti přidá po kapkách do roztoku 0,1 mol 4-trifluormethylanilinu (16,1 g) ve 150 ml acetonitrilu. Po dvacetiminutovém míchání se vysrážený hydrochlorid 4-trifluormethylanilinu odsaje, dvakrát se promyje vždy 20 ml acetonitrilu a spojené filtráty se za sníženého tlaku zahustí. Získá se takto 12,8 g bílého krystalického (4-trifluormethyl) anilidu kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové (sloučenina 1).

Příklad 3

Výroba amidu kyseliny N-(4-trifluormethylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotonové (sloučenina vzorce 2)



Rozpustí se 0,1 mol (4-trifluormethyl) anilidu kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové ve 100 ml methylalkoholu a při teplotě 10 °C se smísí s roztokem 0,11 mol (4,4 g) hydroxidu sodného ve 100 ml vody. Reakční směs se míchá po dobu 30 minut a po zředění vodou se okyselí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vysrážené krystaly se odsají, promyjí se vodou a na vzduchu se vysuší. Výtěžek činí 24,4 g amidu kyseliny N-(4-trifluormethylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotonové (sloučenina 2). Teplota tání (z methylalkoholu): 205 až 206 °C.

Příklad 4

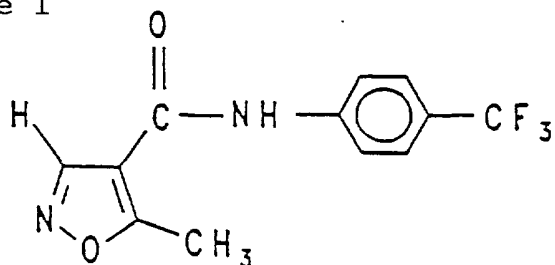
Akutní toxicita po intraperitoneální aplikaci

Zkouška na akutní toxicitu se provádí po intraperitoneální aplikaci testované substance s myši NMRI (20 až 25 g) a krysy SD (120 až 195 g). Testovaná substance se suspenduje v 1% roztoku natrium-karboxymethylcelulosity. Různé dávky testované substance se aplikují myším v objemu 10 ml/kg tělesné hmotnosti a krysám v objemu 5 ml/kg tělesné hmotnosti. Pro dávku se použije 10 zvířat. Po 3 týdnech se zjišťuje akutní toxicita podle metody Lichfielda a Wilcoxon. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

	Sloučenina 1 akutní toxicita intraperitoneálně LD50 (mg/kg)	sloučenina 2 akutní toxicita intraperitoneálně LD50 (mg/kg)
myši NMRI	185 (163 až 210)	(100 až 200)
krysy SD	170 (153 až 189)	

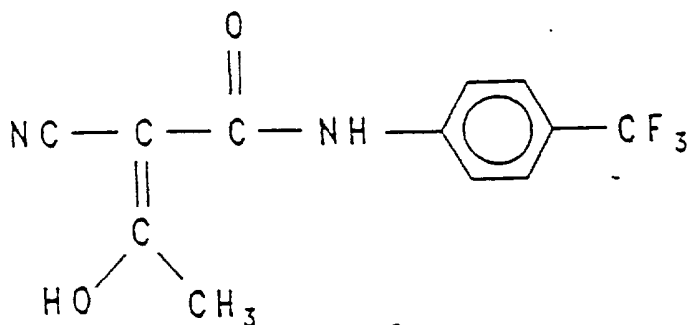
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Farmaceutický prostředek pro aplikaci při odmítavých reakcích organismu příjemce orgánu proti transplantovanému orgánu, vyznačující se tím, že obsahuje účinné množství (4-trifluormethyl) anilidu kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové vzorce 1



1

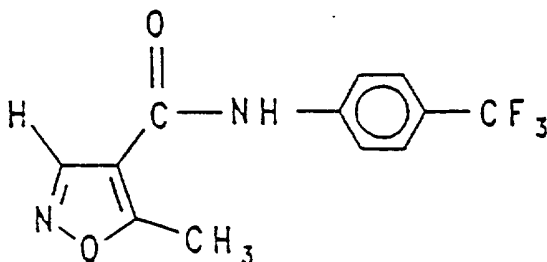
a/nebo jejího metabolitu, amidu kyseliny N-(4-trifluormethylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotonové vzorce 2.



2

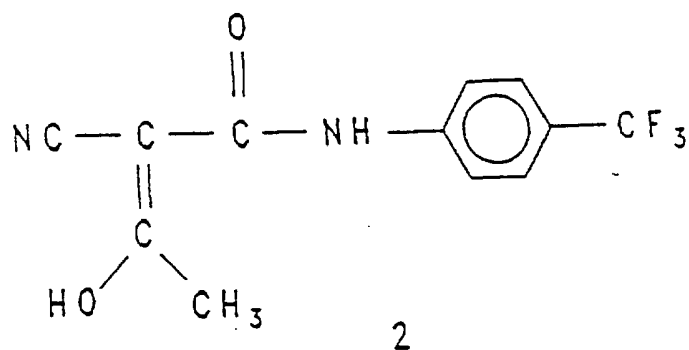
příčemž sloučenina 2 se vyskytuje jako taková, nebo ve formě své fyziologicky přijatelné soli.

2. Použití (4-trifluormethyl) anilidu kyseliny 5-methylisoxazol-4-karboxylové vzorce 1



1

a/nebo jejího metabolitu, amidu kyseliny N-(4-trifluormethylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotonové vzorce 2



příčemž sloučenina 2 se vyskytuje jako taková, nebo ve formě své fyziologicky přijatelné soli, pro výrobu léčiv pro aplikaci při odmítavých reakcích organismu příjemce orgánu proti transplantovanému orgánu.

3. Použití podle nároku 2 pro výrobu léčiv, která se aplikují před, během a/nebo po transplantaci u příjemce nebo dárce orgánu.
4. Použití podle nároků 2 nebo 3 pro výrobu léčiv pro aplikaci při hyperakutních nebo akutních odmítavých reakcích organismu.
5. Použití podle nároků 2 nebo 3 pro výrobu léčiv pro aplikaci při chronických odmítavých reakcích organismu.
6. Použití podle nároků 2 až 5 pro výrobu léčiv pro aplikaci při přenosech orgánů z jednoho druhu organismu na jiný druh.
7. Použití podle nároků 2 až 6 pro výrobu léčiv pro snížení množství allofilních nebo xenofilních protilátek.
8. Použití podle nároků 2 až 7 pro výrobu léčiv pro aplikaci u savců, obzvláště u lidí.

Konec dokumentu
