

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Februar 2009 (05.02.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/015752 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
A01N 1/02 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/005651

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. Juli 2008 (10.07.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 035 642.2 30. Juli 2007 (30.07.2007) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **LÖSEL, Ralf** [DE/DE]; Feuerbergstrasse 18,
67134 Birkenheide (DE). **YARD, Benito** [NL/DE]; In den
Weinbergen 2d, 67273 Dackenheim (DE). **BECK, Grietje**
[DE/DE]; Am Rosenblusch 1, 69118 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: **LEISLER-GERSTL, Gabriele**; Hoefer &
Partner, Pilgersheimer Strasse 20, 81543 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

(54) Title: SUBSTANCES FOR THE PROTECTION OF CELLS AND/OR TISSUES

(54) Bezeichnung: SUBSTANZEN ZUM SCHUTZ VON ZELLEN UND/ODER GEWEBEN

(57) Abstract: The invention relates to substances that are suitable for protecting cells and/or tissues.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Substanzen, die zum Schutz von Zellen und/oder Gewebe geeignet sind.



WO 2009/015752 A2

Substanzen zum Schutz von Zellen und/oder Geweben

Patentanmeldung**Gebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft Substanzen, die zum Schutz von Zellen und/oder Gewebe geeignet sind.

Hintergrund der Erfindung

Organe und Gewebe von Säugetieren oder auch andere eukaryote Zellen können vielfältigen schädigenden Einflüssen ausgesetzt sein. Gerade die Zellen von höheren Organismen sind besonders anfällig, insbesondere treten dann Schädigungen gehäuft auf, wenn Zellen oder Gewebe aus dem Organismus herausgelöst werden, wie beispielsweise in Zellkulturen oder bei Transplantationen. Des Weiteren treten auch dann Schädigungen auf, wenn die ursprüngliche Umgebung der Zellen oder Organe, z.B. durch chirurgische Intervention oder pathologische Vorgänge, verändert wird.

Besonders schwere Schäden an Zellen oder Gewebe eines Säugetiers treten unter ischämischen Bedingungen auf. Als Ischämie bezeichnet man die pathologisch verminderte oder aufgehobene Durchblutung eines Gewebes infolge mangelnder

arterieller Zufuhr von Blut, was zu einer Sauerstoffunterversorgung der Zellen oder des Gewebes führt. Hierbei findet man häufig trotz der verminderten Sauerstoffversorgung eine paradoxe oxidative Schädigung der Zellen oder des Gewebes. Durch Ischämie hervorgerufene Schäden an Zellen oder Gewebe können häufig bei chirurgischen Verfahren auftreten, und sind verantwortlich für hohe Komplikationsraten. Diesem Risiko entgegenzuwirken ist eine Aufgabe der Erfindung.

Besonders wichtig ist der Schutz von Zellen und Gewebe im Bereich der Transplantationschirurgie. Von der Entnahme eines Organs bis zu dessen Einsatz in den Empfänger ist es wichtig, seine Funktionen so weit wie möglich zu schützen.

Da Zellen oder Gewebe nur in den seltensten Fällen sofort an Ort und Stelle transplantiert werden können, wird es immer erforderlich sein, die Zellen oder das Gewebe zu konservieren. Häufig wird dabei das Gewebe nach Entnahme bei niedrigen Temperaturen gelagert, wodurch der Metabolismus reduziert wird. Hierdurch können allerdings am Gewebe schwere Schädigungen durch Einwirkung der Kälte selbst entstehen. Dies betrifft insbesondere innere Organe, die kältegelagert werden. Ein Beispiel sind die Nieren, wo die Kälte die Endothelzellen der Nieren schädigt, was zum Verlust der Barrierefunktion führt, womit ein stark erhöhtes Risiko immunologischer Komplikationen oder Funktionsstörungen einhergeht. Die bisher zur Prävention von Kälteschäden im Rahmen von Studien oder experimentell eingesetzten Wirkstoffe, wie Dopamin oder Dobutamin, zeigen zwar eine protektive Wirkung, jedoch ist hierzu eine sehr hohe Konzentration erforderlich. Bei der Anwendung an Tier oder Mensch zeigt sich daher schon nach kurzer Zeit ein sehr starker hämodynamischer Effekt, der in der Regel zu Komplikationen führt und daher unerwünscht ist. Bei Einwirkung von Dopamin oder Dobutamin auf Zellkulturen wird der Metabolismus deutlich verändert, so dass die Zellen nicht mehr ihre eigentliche Funktionsfähigkeit aufweisen und daher für die Transplantation ungeeignet sind.

Eine weitere Möglichkeit der Konservierung von Zellen oder Gewebe, insbesondere bei der Transplantation, ist die Perfusion des Gewebes bzw. der Zellen mit

Konservierungsmittel enthaltenden Lösungen. So werden Lösungen zur Erhöhung der Lebensdauer von Transplantationsgewebe beschrieben, die PHB sowie PHB-Folsäureantagonisten in Kombination enthalten. Ferner beschreibt DE 295 04 589 U1 zu diesem Zweck die Verwendung von Benzoesäure und ihren Derivaten, ggf. in Kombination mit anderen wirksamen Substanzen. An anderer Stelle wiederum wird auf die Verwendung von Adrenalin oder Carvedilol verwiesen.

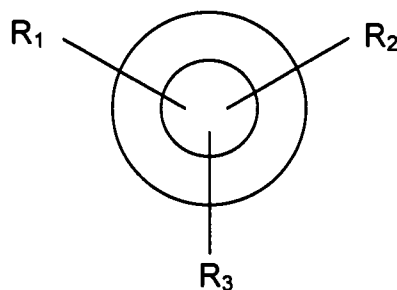
Eine optimale Substanz, die einerseits die Zellen bzw. das Gewebe ausreichend vor ischämischen Schäden schützt und andererseits in geringer Konzentration die gewünschte schützende Wirkung erzielt, so dass keine hämodynamischen Wirkungen auftreten, wobei die Substanz weder gesundheitsschädlich noch umweltschädlich ist, wurde bislang noch nicht gefunden.

Aufgabe der Erfindung war es daher eine Substanz zu finden, die Zellen und Gewebe, in vivo aber insbesondere bei Lagerung und Transport, d.h. ex-vivo, schützt, insbesondere zu transplantiertes Gewebe oder entnommene Zellen vor ischämischen Schäden oder Kälteschädigungen bewahrt bzw. diese reduziert. Ferner soll die Substanz in geringer Konzentration angewendet werden können und keine hämodynamische oder sonst unerwünschte Aktivität aufweisen.

Diese Aufgaben werden gelöst durch eine Substanz mit den Merkmalen gemäß Anspruch 1. Die Unteransprüche haben vorteilhafte Weiterbildungen zum Inhalt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass ein aromatisches System, das mindestens einen aromatischen Ring enthält, der zwei reduzierend wirkende Substituenten R_1 und R_2 , und einen weiteren Substituenten R_3 aufweist, sodass der $\log P$ des Moleküls mindestens 2,5 beträgt, Zellen oder Gewebe schützen kann. Die erfindungsgemäße Substanz wird in der folgenden allgemeinen Formel (1) dargestellt:



worin der Doppelkreis ein aromatisches System mit 6 bis 18 C-Atomen darstellt, das mindestens die Substituenten R_1 , R_2 und R_3 trägt, wobei R_1 und R_2 jeweils ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus OH, SH und NH_2 , die auch in geschützter Form vorliegen können, und R_3 eine hydrophobe Gruppe ist, wobei $\log P$ der Substanz mindestens 2,5 ist.

Das aromatische System kann sowohl aus aromatischen Ringen aufgebaut sein, die ausschließlich Kohlenstoffe als Ringatome tragen, als auch solchen die auch Heteroatome aufweisen, solange sie biologisch kompatibel sind. Geeignet sind beispielsweise Carbazole und Derivate davon als Heteroatome enthaltende aromatische Ringe im aromatischen System, nur Kohlenstoff enthaltende Aromaten sind bevorzugt.

Das aromatische System weist einen oder mehrere aromatische Ringe auf, die miteinander kondensiert sein können. Bevorzugte Beispiele sind Phenyl, Naphthalin und Anthracen. Das aromatische System kann neben den Substituenten R_1 , R_2 und R_3 weitere Substituenten tragen, die in Bezug auf die gewünschten Eigenschaften inert sind und gegebenenfalls das System stabilisieren oder aktivieren können. Bevorzugt sind außer R_1 , R_2 und R_3 keine weiteren Substituenten gebunden.

Bevorzugt zeichnet sich das aromatische System, das mindestens die Substituenten R_1 , R_2 und R_3 trägt, dadurch aus, dass es 5-, 6- oder 7-gliedrige Ringe enthält. Ringe in einer Größe von 5 bis 7 Atomen weisen eine hohe Ringstabilität auf, haben also verminderte innere Spannungen, selbst bei hohem Substitutionsgrad des

aromatischen Ringes. Zudem sind derartige aromatische Systeme leicht erhältlich, gut untersucht und damit sicher, im Sinne von nicht gesundheitsschädlich oder umweltschädlich.

Weiter bevorzugt ist ein aromatisches System, das 1 bis 3 Ringe aufweist. Zwar können prinzipiell auch Verbindungen eingesetzt werden, deren aromatisches System mehr Ringe enthält, jedoch hat sich herausgestellt, dass insbesondere kleinere aromatische Systeme mit lediglich 1 bis 3 Ringen aufgrund ihrer geringen Größe besser durch die Zellwand penetrieren können.

Die Substituenten R_1 und R_2 sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus OH, SH und NH_2 , gegebenenfalls in geschützter Form, wobei jede Kombination aus diesen Resten vorliegen kann. Bevorzugt sind R_1 und R_2 jeweils OH. Die Gruppen können mit einer Schutzgruppe geschützt sein, um sie vor schädlichen Reaktionen während der Lagerung zu schützen.

Die Reste R_1 und R_2 sind in dem aromatischen System jeweils an einen aromatischen Ring gebunden und zwar entweder in ortho- oder para-Stellung zueinander. Es wird vermutet, dass die reduzierende Wirkung der beiden funktionellen Gruppen und damit der Schutz des Gewebes vor oxidativer Schädigung gerade durch diese selektive Stellung der beiden Substituenten R_1 und R_2 zueinander verstärkt wird. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der Konformation des aromatischen Ringes bei ortho- bzw. para-Stellung, die beiden funktionellen Gruppen, also die Substituenten R_1 und R_2 , in die selbe Richtung weisen, und somit ihre Funktion synergistisch verstärkt wird. Besonders bevorzugt ist das aromatische System von 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 2,5-Dihydroxyphenethylamin oder 3,4-Dihydroxyphenethylamin abgeleitet.

Die erfindungsgemäße Substanz kann aber nur dann Zellen oder Gewebe vor schädigenden Einflüssen schützen, wenn die Substanz so gebildet ist, dass der log P der Substanz mindestens 2,5 beträgt. log P ist ein empirisch kalkulierter Parameter und kann anhand der Struktur einer Substanz mathematisch berechnet werden, wobei P den Verteilungskoeffizienten der betrachteten Substanz zwischen n-Octanol

und Wasser darstellt, also ein Maß für die Hydrophobizität einer Substanz darstellt. Kleine Werte des $\log P$ bedeuten dabei eine gesteigerte Hydrophilie des Moleküls, während große Werte eine erhöhte Lipophilie bedeuten.

Es wurde gefunden, dass ein Molekül mit einem $\log P$ von mindestens 2,5 eine so gute Lipophilie bzw. Hydrophobizität aufweist, dass das Molekül besser durch die Zellwand in Zellen wandern kann als herkömmliche Substanzen mit einem geringeren $\log P$, um dort seinen Schutz zu entfalten. Stark hydrophile Moleküle mit einem $\log P$ von weniger als 2,5 gelangen hingegen nicht durch die semipermeable Zellwand, so dass ihre Wirkung reduziert ist. Mit einem $\log P$ Wert von 2,5 scheint ein Schwellenwert erreicht zu sein, der Substanzen bezeichnet, die geeignet sind in die Zellen eines Gewebes einzudringen um ischämischen Schäden des Gewebes durch Verminderung oder Verhinderung oxidierender Faktoren vorzubeugen.

Zur Einstellung des $\log P$ Wertes weist die erfindungsgemäße Zubereitung neben den beiden reduzierend wirkenden Substituenten R_1 und R_2 noch einen weiteren Substituenten R_3 auf. Dieser dient dazu, die Applikationseigenschaften der Substanz gezielt einzustellen und wird insbesondere zur Anpassung des $\log P$ Wertes entsprechend variiert. Im Einzelnen ist die Konstitution von R_3 nicht beschränkt, solange sie biologisch kompatibel ist und zur Hydrophobizität beiträgt. So kann R_3 sowohl ein Homoalkylrest, wie auch ein Heteroalkylrest sein, geradkettig oder verzweigt. Die Definition von R_3 umfasst substituierte, wie nichtsubstituierte homoatomare oder heteroatomare „Reste“ im chemischen Sinne. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Substituent R_3 ein Alkylsubstituent mit einer Kettenlänge von C6 bis C26 und bevorzugt von C8 bis C18. Mit anderen Worten ist R_3 bevorzugt ein gesättigter Alkylrest, bestehend aus Kohlenstoffatomen, der linear oder verzweigt sein kann, und 6 bis 26 und bevorzugt 8 bis 18 Kohlenstoffatome umfasst. Unter den Alkylresten sind lineare gegenüber verzweigten Alkylketten bevorzugt. Es wird vermutet, dass derartige Alkylsubstituenten mit einer Kohlenstoffkette von 6 bis 26 Kohlenstoffatomen an demjenigen aromatischen Ring, der die hydrophileren Substituenten R_1 und R_2 trägt, die Hydrophobizität des aromatischen Ringes deutlich anhebt, so dass das Eindringen in die Zellen wiederum erleichtert wird, und damit die erfindungsgemäße Substanz diese Zellen und damit

das Gewebe oder aber das Organ, schützen kann. Die hydrophilen, stark reduzierenden Substituenten R_1 und R_2 werden damit sozusagen „maskiert“ und die Substanzen in die Zelle eingeschleust, wo sie ihre Wirkung entfalten. Diese, die Lipophilie erhöhende Wirkung kann erst ab einer Kettenlänge von mindestens 6 Kohlenstoffatomen auftreten und ist am stärksten bei einem Kohlenwasserstoffrest von 8 bis 18 Kohlenstoffatomen. Ab einer Kohlenstoffanzahl von über 26 Kohlenstoffatomen wirkt der Substituent R_3 zu stark abschirmend, so dass die Substanz ihre schützende Wirkung in der Zelle nicht entfalten kann, da die aktiven stark reduzierenden funktionellen Gruppen R_1 und R_2 sterisch gehindert sind.

Der Substituent R_3 kann direkt an das aromatische System gebunden sein. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bindung über ein Brückenglied, das die chemische Gruppierung $Y-NHCO$ sein kann, wobei Y entweder eine direkte Bindung zwischen dem aromatischen System und der $NHCO$ -Gruppe, oder aber eine Alkylgruppe mit einer Kohlenstoffkette von C1 bis C8 und bevorzugt von C1 bis C3 darstellt. R_3 ist dann an den Carbonylkohlenstoff gebunden. Zusammen mit R_3 stellt dies somit ein Amid dar.

Amide, also Substanzen, die eine Peptidbindung aufweisen, sind in der Natur häufig anzutreffen. Sie sind Bausteine der Polypeptide, der Eiweiße. Es wird demnach vermutet, dass Substanzen, die eine Amidgruppe aufweisen prinzipiell sehr gut in Zellen einwandern können.

Die Erfinder haben nun gefunden, dass Amide, die am Stickstoffatom einen Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen und bevorzugt von 1 bis 3 Kohlenstoffatomen und am Carbonylkohlenstoff eine Alkylkette mit 2, bevorzugt 6 bis 26 Kohlenstoffatomen aufweisen, erfindungsgemäß gut geeignet sind, um die Permeabilität der erfindungsgemäßen Substanz durch die Zellwand in das Zellinnere zu erhöhen, und damit den Eintritt in das Zellinnere zu erleichtern, so dass die Substanz ihre zellschützende bzw. organschützende Wirkung an Ort und Stelle sehr gut entfalten kann. Bei Bindungen über ein Brückenglied kann somit die Alkylkette von R_3 kürzer sein, da die Kette durch das Brückenglied verlängert wird. Längere Alkylketten am Stickstoffatom wären zwar auch geeignet, jedoch hat sich gezeigt, dass besonders

die kurzen Alkylketten, also solche, die maximal 3 Kohlenstoffatome umfassen, besonders gut geeignet sind. Es wird vermutet, dass dies mit der sterischen Anordnung am aromatischen Ring zusammenhängt, bzw. auch mit der Elektronenwolke des freien Elektronenpaares am Stickstoffatome, das einen abschirmenden Effekt bewirken kann. Ähnliches gilt für den Alkylrest, der an den Carbonylkohlenstoff gebunden ist. Jedoch ist hier der Effekt der sterischen Abschirmung nicht mehr so groß, weil bereits durch den Stickstoff die wesentliche Abschirmung bewirkt ist, so dass prinzipiell auch längere Kohlenstoffketten von bis zu 26 C-Atomen möglich sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist R_3 über eine Gruppe mit der Struktur Y-COO gebunden, wobei Y wiederum eine direkte Bindung zwischen dem aromatischen System und der Gruppierung COO darstellen, aber auch eine C1 bis C8 Alkylgruppe, bevorzugt eine C1 bis C3 Alkylgruppe sein kann. R_3 , d.h. bevorzugt ein Alkylrest mit einer Kettenlänge von C2 bis C26, ist an ein Sauerstoffatom gebunden und ergibt in diesem Ausführungsbeispiel eine Estergruppierung.

Für eine derartige Estergruppierung gelten ähnliche, wie die bereits angestellten, sterischen Betrachtungsweisen, wie bereits für die Amide im Einzelnen ausgeführt. Ester und Amide weisen zudem eine ähnliche Polarität auf, so dass sie alternativ oder aber auch in Kombination verwendet werden können. Allerdings trägt die Peptidbindung zu einer gegenüber dem Ester etwas verbesserten Akzeptanz in der Zelle bzw. im Gewebe bei. Ferner sind Ester in chemischer Hinsicht nicht so stabil wie Peptide und spalten sich schon bei etwas veränderten pH-Werten in Säure und Alkohol, wodurch die Wirkung der erfindungsgemäßen Substanz zumindest teilweise verloren geht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist R_3 über eine Gruppe mit der Struktur Y-CH₂O gebunden, wobei Y wiederum eine direkte Bindung zwischen dem aromatischen System und der Gruppierung CH₂O darstellen oder aber auch eine C1 bis C8 Alkylgruppe, bevorzugt eine C1 bis C3 Alkylgruppe sein kann. R_3 , d.h. bevorzugt ein Alkylrest mit einer Kettenlänge von C2 bis C26, ist an den Sauerstoff gebunden, was in diesem Ausführungsbeispiel zu einer Ethergruppierung führt.

Auch Ether mit der oben angegebenen Formel können als Substituent R_3 in Frage kommen. Durch die Ethergruppe erlangt das Molekül einen Anteil an Hydrophilie, die aber in Bezug auf die Ester oder aber Amide deutlich reduziert ist. Dennoch sind freie Ether im Körper eines Säugetiers deutlich weniger anzutreffen, die Akzeptanz derartiger Substanzen ist daher gegenüber Amiden und Estern etwas verringert. Allerdings wird dieser Effekt durch die deutlich erhöhte Lipophilie wieder zumindest teilweise aufgewogen, so dass Ether in der oben angegebenen Konstitution ebenfalls eine Alternative für den Substituenten R_3 darstellen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform trägt mindestens einer der beiden Substituenten R_1 oder R_2 eine Schutzgruppe. Schutzgruppen für funktionelle Gruppen werden in der Chemie immer dann eingesetzt, wenn eine bestimmte funktionelle Gruppe vor einer vorzeitigen Reaktion bewahrt werden soll. Nach Abspaltung der Schutzgruppe liegt dann die reaktive funktionelle Gruppe wieder frei und kann wunschgemäß reagieren. Als Schutzgruppen kommen die üblicherweise in der organischen Chemie verwendeten Schutzgruppen für OH-, SH- und NH_2 -Gruppen in Betracht, die dem Fachmann wohl bekannt sind. Die Schutzgruppen müssen, wie dem Fachmann allgemein bekannt, an die funktionellen Gruppen R_1 und R_2 in ausreichender Weise binden, um diese während der Lagerung zu schützen, wobei die Bindung jedoch so ausgebildet sein muss, dass sich die Schutzgruppe in physiologischer Umgebung wieder löst.

Geeignete Schutzgruppen für OH sind Acylgruppen, bevorzugt die Acetylgruppe oder Succinylgruppe oder aber Phosphatgruppen. Die erfindungsgemäße Substanz wird demnach entsprechend bei erwünschtem Schutz von einem der Reste R_1 oder R_2 mit einer geeigneten Säure, wie zum Beispiel Essigsäure oder Phosphorsäure, umgesetzt. Dabei entsteht entweder ein Ester, ein Amid oder ein Thioester, je nach reduzierend wirkendem Substituent. Derartige Schutzgruppen lassen sich sehr leicht wieder abspalten, meist schon unter etwas veränderten Bedingungen im Inneren der Zelle, z.B. bei verändertem pH-Wert. Durch die Spaltung der Schutzgruppe wird die funktionelle, stark reduzierend wirkende Gruppe, also entweder OH, SH oder NH_2 zurückgewonnen, die im Inneren der Zelle diese vor oxidativen Schäden schützt.

Besonders geeignet sind Acetylschutzgruppen. Sie sind leicht erhältlich, wohl bekannt, spalten bei Entfernung der Schutzgruppe keine gesundheitsschädlichen Substanzen ab und sind zudem kostengünstig.

Alternativ verwendbar sind auch Succinylschutzgruppen oder Phosphatschutzgruppen. Sie werden durch Reaktion des bzw. der Substituenten R_1 und/oder R_2 mit Bernsteinsäure oder Phosphorsäure erhalten. Auch die Succinylgruppe oder Phosphatgruppe lässt sich leicht unter Bedingungen, wie sie im Inneren einer Zelle vorliegen, wieder abspalten, so dass die reduzierende Wirkung der OH, SH bzw. NH_2 Gruppen wieder zu Tage tritt. Auch Bernsteinsäure und Phosphorsäure, die nach Spaltung der Schutzgruppe zurückgewonnen werden, sind für den Körper ungefährliche Substanz, die einfach wieder ausgeschwemmt werden können.

Ohne an die Theorie gebunden zu sein wird angenommen, dass ein aromatisches System, das an einem Ring mindestens zwei Substituenten R_1 und R_2 , ausgewählt aus OH, SH und NH_2 , trägt, stark reduzierend wirkt und daher den oxidativen Schäden an Zellen oder Gewebe, wie sie durch ischämische Bedingungen hervorgerufen werden, entgegenwirkt.

Um diesen Schäden vorzubeugen ist eine sehr geringe Konzentration ausreichend, d.h. eine Konzentration der Substanz von etwa 0,5 bis 200 μM , bevorzugt 1 bis 100 μM .

Um die gewünschte schützende Wirkung entfalten zu können kann die erfindungsgemäße Substanz auf vielfältige Weise verabreicht werden. Hier sind alle Verabreichungsarten geeignet, wie eine parenterale oder orale Verabreichung, wobei die parenterale Gabe bevorzugt ist. Wesentlich ist, dass die Substanz in den Blutkreislauf des zu schützenden Gewebes oder der zu schützenden Zellen gelangt, so dass dort eine Akkumulation der wirksamen Substanz in ausreichender Menge stattfinden kann. Dies wird zumeist durch Injektion oder Infusion in die Blutbahn des Spenders erzielt.

Die erfindungsgemäße Substanz eignet sich insbesondere in Form eines injizierbaren Präparats zur Verabreichung an einen Spender. Das Präparat besteht dabei zumindest aus der erfindungsgemäßen Substanz und mindestens einem pharmazeutisch annehmbaren Träger. Der Träger kann im einfachsten Fall Wasser sein. Zumeist wird die Substanz in geeigneten pharmazeutisch annehmbaren Lösungsmitteln wie PEG-Derivaten oder dergleichen vorgelöst und dann nach Verarbeitung entweder als Lösung bzw. Dispersion oder aber in Form von Liposomen oder Mizellen verabreicht. Auch biologisch und physiologisch kompatible Tenside können zur besseren Verarbeitung eingesetzt werden. Hierzu sind die auch für pharmazeutische Produkte eingesetzten Tenside geeignet, zum Beispiel Substanzen, die unter dem Namen „Pluronic“ vertrieben werden.

Das Präparat ist dazu geeignet in einen Spender injiziert zu werden und kann bevorzugt als Spüllösung eingesetzt werden, die das betreffende zu transplantierende Organ durchströmt, so dass die erfindungsgemäße Substanz in alle Zellen des Organs gelangt. Eine nahezu vollständige Durchspülung ist nach etwa 30 Minuten bis zu 2 Stunden erreicht. Bevorzugt enthält das Präparat die Substanz zu 0,5 bis 20 μM , da somit eine ausreichende, wirkungsvolle, also die Zellen oder die Organe schützende Konzentration an der erfindungsgemäßen Substanz vorliegt.

Die oben beschriebene erfindungsgemäße Substanz wird verwendet, um Zellen oder aber auch Gewebe und Organe zu schützen. Der Schutz bezieht sich insbesondere auf Schäden durch Sauerstoffunterversorgung (ischämische Bedingungen) der Zellen/des Gewebes, besonders bei zu transplantierendem Gewebe oder entnommenen Zellen. Die erfindungsgemäße Substanz wird dabei in sehr geringer Konzentration angewendet und zeigt keine hämodynamische Aktivität. Sie ist damit bestens verträglich und verlängert die Lebenszeit von Zellen oder Gewebe, das für die Transplantation vorgesehen ist, ausreichend, um bereits vor der Transplantation entstehende Schäden am Gewebe zu reduzieren oder aber komplett zu verhindern, so dass die Chancen einer erfolgreichen Transplantation deutlich erhöht sind.

Ausführungsbeispiele der Erfindung werden im Folgenden näher beschrieben

Die aktiven Substanzen werden wie nachfolgend beschrieben synthetisiert. Die Wirkung der Substanzen auf die kälteinduzierte Schädigung von Zellen wird in einem Modellsystem quantifiziert. Hierzu werden Endothelzellen, beispielsweise Zellen des Endothels der menschlichen Nabelschnurvene, in Kultur gezüchtet. Die Zellen werden mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen für variable Zeitspannen inkubiert, danach das Medium durch frisches Medium ohne Testsubstanz ersetzt. Anschließend werden die Zellen für beispielsweise 24 Stunden bei 0°C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wird im Überstand der Kulturgefäße mit bekannten Verfahren die freigesetzte Laktatdehydrogenase bestimmt, deren Konzentration ein Maß für die Zellschädigung ist. Die Effektivität der einzelnen Verbindungen wird durch die Konzentration bestimmt, bei der 50% der Freisetzung von Laktatdehydrogenase gehemmt werden (EC50).

Beispiel 1

N-Octanoyldopamin

1 Gramm N-Octansäure wird in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und 0,90 Gramm N-Ethyl-diisopropylamin zugegeben. Unter Rühren wird langsam 0,75 Gramm (0,658 ml) Chlorameisensäureethylester zugegeben. Nach 3 Stunden wird die Mischung mit 15 ml Ethylacetat und 10 ml Wasser versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet.

Unter Stickstoffatmosphäre wird 1,24 Gramm Dopaminhydrochlorid in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Hierzu wird eine stöchiometrische Menge des in Ethylacetat gelösten Ethoxycarbonyl-octanoats unter Rühren zugegeben. Die dabei sich bildende Trübung löst sich nach Zugabe der stöchiometrischen Menge von N-Ethyl-diisopropylamin wieder auf. Nach Rühren unter Lichtausschluss über Nacht werden 20 ml einer wässrigen Lösung mit 5% Natriumhydrogencarbonat/1% Natriumsulfit zugegeben und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird nochmals mit 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit 10 ml ges. Kochsalzlösung, 10 ml 0,5 M Schwefelsäure sowie 10 ml Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wird über

Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum (Rotationsverdampfer) entfernt. Man erhält 1,74 Gramm (96%) eines sehr zähen, nahezu farblosen Öls.

Beispiel 2

O-Succinyl-N-octanoyldopamin

0,66 Gramm N-Octanoyldopamin werden unter Stickstoff in 3 ml Tetrahydrofuran gelöst und hierzu 236 mg Bernsteinsäureanhydrid in 4 ml Tetrahydrofuran gegeben. Nach Rühren über Nacht wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der feste Rückstand in 5 ml 5% Natriumhydrogencarbonat und 5 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird verworfen, die wässrige Phase mit 10 ml Ethylacetat versetzt und mit 10 ml 0,5 M Schwefelsäure angesäuert. Die organische Phase wird mit ges. Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält rohes O-Succinyl-N-octanoyldopamin, das durch Umkristallisieren weiter gereinigt wird.

Beispiel 3

N-Decanoyldopamin

1,72 Gramm n-Decansäure wird in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst, 1,2 Gramm Thionylchlorid zugegeben. Nach Zugabe eines Tropfens Dimethylformamid wird unter Rühren zum Rückfluss erhitzt. Nach 5 h wird das Lösungsmittel abdestilliert. 0,95 Gramm Dopaminhydrochlorid werden in 6 ml Dimethylformamid gelöst und im Eisbad unter Stickstoff die stöchiometrische Menge Decansäurechlorid langsam zutropft. Nach 3 Stunden wird wie in Beispiel 1 aufgearbeitet.

Beispiel 4

N-Octadecanoyldopamin

1,42 Gramm Stearinsäure wird in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und 0,57 g N-Hydroxysuccinimid sowie 1,03 Gramm Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Nach Rühren über Nacht wird das Präzipitat durch Filtration abgetrennt, mit

Tetrahydrofuran nachgewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum von Lösungsmitteln befreit. Unter Stickstoffatmosphäre wird das so erhaltene N-Octanoyloxysuccinimid mit der stöchiometrischen Menge Dopaminhydrochlorid und Triethylamin (in Dimethylformamid gelöst) zur Reaktion gebracht. Nach Rühren unter Lichtausschluss über Nacht erhält man nach Aufarbeitung N-Octanoyldopamin.

Beispiel 5

2,5-Dihydroxybenzoylamidooctan

Aus 2,38 Gramm 2,5-Dihydroxybenzoesäure wird in bekannter Weise mittels Phosphortrichlorid das Säurechlorid dargestellt. Zu diesem, gelöst in 20 ml Tetrahydrofuran, wird unter Stickstoffatmosphäre im Eisbad unter kräftigem Rühren langsam die stöchiometrische Menge N-Octylamin zugegeben. Nach beendeter Zugabe wird das Eisbad entfernt und über Nacht unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, die organische Phase nacheinander mit Natriumhydrogencarbonat/Natriumsulfit-Lösung, Wasser, verd. Phosphorsäure und Kochsalzlösung gewaschen und schließlich über Molekularsieb getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man 2,5-Dihydroxybenzoylamidooctan als fast weißen Feststoff.

Beispiel 6

3,4-Dihydroxybenzoylamidooctan

1,19 Gramm 3,4-Dihydroxybenzoesäure werden in 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und unter Stickstoff 0,57 Gramm N-Hydroxysuccinimid, 1,03 Gramm Dicyclohexylcarbodiimid und 0,65 Gramm Octylamin zugegeben. Nach Rühren über Nacht unter Lichtausschluss wird das Präzipitat abfiltriert und die organische Phase mit 15 ml Ethylacetat verdünnt und mit 10 ml 5% Natriumhydrogencarbonat/1% Natriumsulfit gewaschen. Nach Schütteln mit Kochsalzlösung, 0,5 M Schwefelsäure und Kochsalzlösung wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Man erhält 1,44 Gramm (83%) eines beigen Feststoffs.

Beispiel 7**2,5-Bisacetoxybenzoylamidohexan**

Aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure wird nach bekannten Methoden mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat 2,5-Bisacetoxybenzoesäure dargestellt. Aus 1,19 Gramm dieser Verbindung, gelöst in 10 ml Diethylether, wird durch Zugabe von 0,68 Gramm N-Hydroxybenzotriazol und 0,96 Gramm N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid der aktive Ester synthetisiert. Nach Rühren über Nacht wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 10 ml Ethylacetat und 10 ml Wasser aufgenommen. Die organische Phase wird getrocknet und 0,5 Gramm Hexylamin zugegeben. Nach Rühren über Nacht wird nacheinander mit Natriumhydrogencarbonatlösung, Kochsalzlösung und verd. Phosphorsäure gewaschen und die organische Phase getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man 1,3 Gramm (81%) rohes 2,5-Bisacetoxybenzoylamidohexan.

Die protektive Wirkung einiger erfindungsgemäßer Substanzen ist anhand ihrer EC50-Werte dargestellt (Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin und Dobutamin nur zum Vergleich):

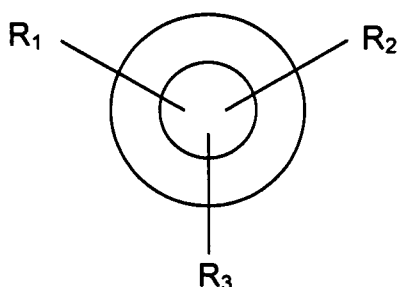
Substanz	EC50 [μ M]
Dopamin	75
Adrenalin	600
Noradrenalin	700
Dobutamin	5
N-Octanoyldopamin	$2,1 \pm 0,2$
N-Decanoyldopamin	$0,9 \pm 0,2$
N-Dodecanoyldopamin	$1,2 \pm 0,2$
N-Tetradecanoyldopamin	$1,3 \pm 0,2$
N-(4-Methylphenylsulfonyl)dopamin	12 ± 1
N-(3-Phenylpropanoyl)dopamin	9 ± 1
2,3-Dihydroxybenzoylamidooctan	$1,2 \pm 0,1$
3,4-Dihydroxybenzoylamidooctan	$2,4 \pm 0,2$
2,5-Dihydroxybenzoylamidooctan	6 ± 1

Beispiel 8

0,5 Gramm N-Octanoyldopamin wird in 9,5 Gramm einer Mischung von 60% (v/v) 1,2-Propylenglycol und 40% (v/v) Wasser aufgenommen und gemischt. Es entsteht eine klare, haltbare Lösung, die nach Sterilisation nach den anerkannten pharmazeutischen Regeln zur parenteralen Anwendung an Säugetieren geeignet ist.

Patentansprüche

1. Substanz zum Schutz von Zellen oder Gewebe, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz mindestens einen aromatischen Ring der Formel 1 mit zwei Substituenten R_1 und R_2 , ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus OH, SH und NH_2 aufweist, wobei R_1 und R_2 zueinander in ortho- oder para-Stellung stehen und einen weiteren Substituent R_3 , der den log P des Moleküls auf mindestens 2,5 bringt.



Formel (1)

2. Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das aromatische System 1 bis 3 Ringe aufweist, die kondensiert sein können.
3. Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das aromatische System aromatische Ringe mit 5, 6 oder 7 Kohlenstoffen enthält.
4. Substanz nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass R_3 ein substituierter oder nicht substituierter Alkylrest mit einer Kettenlänge von C6 bis C26, bevorzugt C8 bis C18, ist.
5. Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass R_3 über $Y-CH_2O-$, $Y-COO-$ oder $Y-NHC(O)-$ gebunden ist, wobei Y eine direkte Bindung oder eine C1 bis C8 Alkylgruppe, bevorzugt eine C1 bis C3 Alkylgruppe ist.

6. Substanz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens einer der beiden Substituenten R_1 oder R_2 eine Schutzgruppe trägt.
7. Substanz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Schutzgruppe eine Acylgruppe, bevorzugt eine Acetylgruppe, Phosphatgruppe oder eine Succinylgruppe ist.
8. Präparat enthaltend eine wirksame Menge Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 7, gelöst in einem physiologisch annehmbaren Träger, wobei der Träger ein auf Wasser oder einem organischen Lösungsmittel basierender Träger ist, und ggf. ein Tensid.
9. Präparat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger Wasser ist und dass die Substanz ggf. in einem Lösungsvermittler vorgelöst wurde.
10. Präparat nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass es die Substanz zu 0,5 bis 200 μM enthält.
11. Präparat nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass es in injizierbarer Form ist.
12. Präparat nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es in Form einer Dispersion vorliegt und die Substanz in Form von Micellen oder Liposomen enthalten ist.
13. Verwendung einer Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Herstellung einer Injektionslösung zur Organprotektion.