



C (45) Patenttihallitus
Patenttihallitus 10 01 1980

(51) Kv.Ik.⁴/Int.Cl.⁴ C 07 C 59/01 // C 07 C 101/24

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	830603
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	23.02.83
(24) Alkupaivä - Giltighetsdag	23.02.83
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	24.08.83
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.09.89
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	23.02.82
Ranska-Frankrike(FR) 8203100 Toteennäytetty-Styrkt	

(71) Solvay & Cie, 33, Rue du Prince Albert, Bruxelles, Belgia-Belgien(BE)

(72) Jacques Lammerant, Namur, Jaroslaw Kolanowski, Wezembeek-Oppeem,
Belgia-Belgien(BE)

(74) Oy Kolster Ab

(54) Menetelmä 3-hydroksivoihapon uusien, terapeuttisesti käyttökelpoisten
suolojen valmistamiseksi - Förfarande för framställning av nya, tera-
peutiskt värdefulla salter av 3-hydroxismörsyra

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena ovat farmaseuttiset valmisteet, jotka sisältävät 3-hydroksivoihappoa tai suolaa, joka on tämän hapon johdannainen, ja yhdisteet, jotka ovat 3-hydroksivoihapon johdannaisia ja jotka ovat käyttökelpoisia lääkkeinä. Farmaseuttiset valmisteet, jotka sisältävät 3-hydroksivoihappoa, tai suolaa, joka on tämän hapon johdannainen kuten natriumsuolaa tai vielä suolaa, joka on tyyppiä sisältävän orgaanisen emäksen johdannainen kuten amiini, joka voi olla luonnosta peräisin oleva aminohappo kuten arginiini. Keksinnön mukaiset valmisteet ja yhdisteet ovat käyttökelpoisia hoidettaessa ennaltaehkäisevästi tai parantavasti ei-ischaemistä tai ischaemistä alkuperää olevia sydänlihassairauksia.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser farmaceutiska preparat som innehåller 3-hydroxismörsyra eller ett salt som är ett derivat av denna syra, och föreningar som är derivat av 3-hydroxismörsyra och användbara som läkemedel. Farmaceutiska preparat som innehåller 3-hydroxismörsyra eller ett salt som är ett derivat av denna syra såsom natriumsaltet eller ytterligare ett salt som är ett derivat av en kväve innehållande organisk bas såsom amin, varvid aminen kan vara en naturlig aminosyra såsom arginin. Preparaten och föreningarna enligt uppfinningen är användbara vid förebyggande eller läkande behandling av hjärtmuskelsjukdomar med icke-ischaemisk eller ischaemisk ursprung.

Menetelmä 3-hydroksivoihapon uusien, terapeuttisesti käyttökelpoisten suolojen valmistamiseksi

5 Keksinnön kohteena on menetelmä 3-hydroksivoihapon uusien, terapeuttisesti käyttökelpoisten suolojen valmistamiseksi.

10 Keksinnölle on tunnusomaista, että 3-hydroksivoihappo saatetaan reagoimaan luonnon aminohapon kanssa, joka sisältää vähintään kaksi tyypeä sisältävää ryhmää karboksyyli-ryhmää kohden, liuottimessa, kuten vedessä 20 - 80°C:ssa.

15 Keksinnön mukaisesti valmistettuja suoloja ovat suolat, jotka ovat luonnosta peräisin olevien L-isomeerien aminohappojen johdannaisia. Hyviä tuloksia voidaan saada suoloilla, jotka valmistetaan luonnosta peräisin olevista L-isomeereistä, joissa on ainakin kaksi tyypeä sisältävää ryhmää, joissa on karboksyyli-ryhmä, ja erityisesti suoloilla, jotka ovat L-lysiinin, L-histidiinin ja L-arginiinin johdannaisia. Parhaat tulokset on saatu suoloilla, jotka ovat L-arginiinin johdannaisia. Edellä kuvatut yhdisteet
20 ovat parhaita käytettäväksi farmaseuttisiin valmisteisiin.

3-hydroksivoihappo sekä sen keksinnön mukaiset suolat voivat olla erilaisina isomeerisinä muotoinaan, kuten L(+)- ja raseemisina muotoina. Kuitenkin edullisesti tämä happo on D(-)-isomeerinä. 3-hydroksivoihappoa voidaan saada millä tahansa tunnetulla synteessimenetelmällä, kuten
25 suoralla kemiallisella tai biokemiallisella synteisillä. D(-)-3-hydroksivoihappoa voidaan saada edullisesti depolymeroimalla luonnon polymeerejä, jotka on uutettu biomassista menetelmällä, joka on kuvattu EP-patenttihakemuksessa EP-A-0 043 620 (Solvay & Cie.).
30

3-hydroksivoihapon suoloja voidaan valmistaa kaikilla sopivilla orgaanisilla synteeseillä. Mitä tulee suoloihin, jotka ovat 3-hydroksivoihapon D(-)- tai L(+)-isomeerien ja luonnosta peräisin olevien aminohappojen johdannaisia, paras menetelmä on saattaa 3-hydroksivoihappo reagoimaan luonnosta peräisin olevan aminohapon kanssa sopivassa liuottimessa, kuten vedessä ja 20 - 80°C:n lämpötilassa, ja
35

edullisesti 30 - 50°C:ssa; tämän aikaansaamiseksi valitaan yleensä olosuhteet, joissa 3-hydroksivoihappoa ja luonnosta peräisin olevaa aminohappoa on ekvimolaarisina määrinä tai stökiometrisesti hiukan enemmän 3-hydroksivoihappoa, joita sekoitetaan voimakkaasti noin normaali-ilmanpaineessa.

Reaktiokomponenttien konsentraatiot ovat 0,5 - 8 molaarisia 3-hydroksivoihapon ja aminohapon suhteen; edullisesti konsentraatio on 1 - 6 molaarinen. Reaktion loppumiselle on tunnusomaista reaktioseoksen paksuuntuminen tai muodostuminen massaksi. Suolan talteenotto voidaan suorittaa sitten tavanomaisilla menetelmillä, kuten haihduttamalla liuotin, jolloin suolat saadaan kiinteään aineen muodossa. Ne voidaan mahdollisesti kiteyttää uudelleen yhden tai useamman kerran.

Keksinnön mukaisesti valmistettuja yhdisteitä ja niistä valmistettuja valmisteita voidaan käyttää lääkkeinä ja etenkin sydänlihaksen metabolisten tautien hoitoon ja ennaltaehkäisyyn ihmis- ja eläinlääketieteessä. Tässä tapauksessa ne voidaan tehdä farmaseuttisiksi valmisteiksi, jotka on tarkoitettu sisäiseen käyttöön. Muutoin näitä yhdisteitä ja valmisteita voidaan myös käyttää muiden tautien hoitoon ja ennaltaehkäisyyn, kuten taudeissa, jotka johtuvat puutteista, ketoaineiden metanoliassa tai epilepsiassa; tässä tapauksessa on parempi käyttää yhdisteitä tai valmisteita, joiden perustana ovat suolat, jotka ovat 3-hydroksivoihapon ja sinkin johdannaisia ja erityisesti suoloja, jotka ovat edellä mainittujen aminohappojen johdannaisia.

Keksinnön mukaisista 3-hydroksivoihapon suoloista voidaan tehdä valmisteita, jotka valmisteet sisältävät tavallisesti näissä koostumuksissa käytettyjä lisäaineita, jotka tekevät niiden annostelun helpoksi, esimerkiksi jauheina, tabletteina, kapseleina, päällystettyinä pillereinä, pillereinä, rakeina, suppositoreina, hyytelönä, ampulleina, siirappeina, emulsioina, liuoksina tai suspensioina. Lisäaineet voivat olla kantajia tai myrkyttömiä liuottimia, joita tavallisesti käytetään lääkkeiden valmistuksessa, kuten vettä, paraffiinityyppejä orgaanisia liuottimia ja kasviöljyjä ja alifaattisia alkoholeja, epäorgaanisia suoloja ja tavallisia täyteaineita, polyoksialkyleenien tai aromaattis-

ten tai alifaattisten sulfonaattien tyyppisiä emulgaattoreita, selluloosan johdannaisia, tärkkelystä, dispersanteja, kosteuttavia aineita, kuten steariinihapon suolat tai talkki, sideaineita ja makeutusaineita tai tavallisia makuaineita.

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä.

Esimerkki 1

D(-)-3-hydroksivoihapon ja L(+)-arginiinin suolan valmistus

10 Lieriönmuotoiseen reaktioastiaan, joka on varustettu kaksoisvaipalla astian jäädytyksen tai lämmityksen aikaansaamiseksi ja joka on 30 cm korkea ja 11 cm halkaisijaltaan sekä varustettu sekoittajalla, jonka 4 potkurin lapaa on päällystetty polyvinyylideenifluoridilla, lisätään 15 1 kg vesiliuosta, joka sisältää 593 g (5,7 moolia) D(-)-3-hydroksivoihappoa. Tätä sekoitetaan voimakkaasti ja lisätään 960 g L(+)-arginiinia 5 minuutin aikana. Kun reaktioseoksen lämpötila on noussut 45°C:seen, seosta 20 jäädytetään kierrättämällä 20 Celsius-asteista vettä astiaan kaksoisvaipassa koko ajan sekoittaen seosta. Huomataan suspension asteittainen muuttuminen paksummaksi ja lopulta seoksen muuttuminen massaksi 15 minuuttia sen jälkeen, kun L(+)-arginiini on lisätty. Kiinteä aine otetaan sitten talteen ja kuivataan vakuumiunissa 50°C:ssa, 25 kunnes saavutetaan vakiopaino. Lopulta saadaan D(-)-3-hydroksivoihapon L(+)-arginiinisuolo, jonka sulamispiste on 100-105°C ja ominaiskiertokyky mitattuna vesiliuoksessa, jossa sen konsentraatio on 4,60 g/100 ml 27°C:ssa;
(α)_D^{27°C} = 2,32°.

30

Esimerkki 2

Koe 1

Tämä koe suoritettiin vertailun vuoksi kuudella koiralla, jotka luettelotiin A, B, C, D, E ja F ja joiden sukupuoli ja paino on mainittu alla olevassa taulukossa I,

35

Taulukko I

	Koirat	Suku- puoli	paino kg:ina
5	A	M	24,5
	B	M	29
	C	M	38
	D	F	25
	E	F	24
10	F	M	26,5

ja jotka nukutettiin ihonalaisella morfiiniruis-
keella 2 mg/kg ja antamalla 30 mg/kg nembutaalia; ja
niiden hengitystä ylläpidettiin keinotekoisesti Starling-
pumpun avulla. Mitataan paine aortassa, sydänlihaksen
hapenkulutus, hapen osapaine sydämen laskimoveressä,
virtausnopeus sydämessä, pH aortassa sekä sydänlihaksen
kuluttama määrä laktaattia, glukoosia, vapaita rasvahappo-
ja ja 3-hydroksivoihappoa. Havaitut keskimääräiset arvot
on mainittu jäljempänä taulukossa III.

Koe 2

Tämäkin koe suoritettiin vertailun vuoksi.

Kokeessa 1 käytetyille kuudelle koiralle, joita
pidettiin nukutettuina yllä mainituissa olosuhteissa,
tehtiin adrenerginen stimulaatio suonensisäisenä noradre-
naliini-infuusiona alla olevassa taulukossa II maini-
tuilla annoksilla ja mainitun pituisen ajan.

Taulukko II

	Koira	Noradrenasiinin määrä ng/kg.min.	Kesto min:ina
5	A	400	15
	B	1 000	15
	C	400	20
	D	400	10
		800	10
10	E	400	10
		800	10
		1 600	10
	F	1 000	15

15 Mitataan samat muuttujat kuin kokeessa I ja mitatut keskimääräiset arvot on mainittu jäljempänä olevassa taulukossa III.

Koe 3

20 Tämä koe suoritetaan kokeilemalla keksinnön mukaista valmistetta.

Koe 2 toistetaan samoilla koirilla paitsi, että eläimet saavat suonensisäisenä infuusiona 3-hydroksivoidin hapon natriumsuolaa 80 mikromoolia kehon painokiloa kohti minuutissa.

25 Mitattujen muuttujien keskiarvot on mainittu alla olevassa taulukossa III.

Taulukko III

Muuttuja	Koe		
	1	2	3
Paine aortassa mm Hg	106	122	136
Sydänlihaksen hapenku- lutus ml/100 g.min	8,1	13,8	12,5
Hapen osapaine sydämen laskimoveressä mm Hg	22,9	24,4	24,4
Virtausnopeus ml/100 g.min sydämessä	82	120	131
pH aortassa	7,401	7,338	7,392
3-hydroksibutyraatin plasmakonsentraatio valtimoveressä mM °/oo	0,02	0,13	5,97
Sydänlihaksen kuluttama määrä			
-laktaattia $\mu\text{mol}/100 \text{ g.min}$	18	0	0
-glukoosia $\mu\text{mol}/100 \text{ g.min}$	8	0	0
-vapaita rasvahappoja $\mu\text{mol}/100\text{g.min}$	6	16	10
- 3-hydroksibutyraattia $\mu\text{mol}/100\text{g.min}$	0,2	2,3	73

Vertaamalla tuloksia taulukossa III nähdään, että D(-)-3-hydroksivoihapon natriumsuolan antaminen aiheutti hapenkulutuksen vähentymistä sydänlihaksessa, jossa oli tapahtunut adrenerginen purkaus (kokeiden 2 ja 3 vertailu), ja aorttapaineen suhteen kohoamisen hapenkulutukseen nähden, joka tulee suuremmaksi (kokeiden 2 ja 3 vertailu) ja lähestyy levossa mitattuja arvoja (kokeiden 1 ja 3 vertailu).

Tulokset osoittavat myös, että vapaiden rasvahappojen käyttö alenee 3-hydroksibutyraatin kustannuksella (kokeiden 2 ja 3 vertailu) ja lähestyy arvoja, jotka on havaittu stimuloimattomassa sydänlihaksessa (kokeiden 1 ja 3 vertailu).

Lopuksi metabolinen asidoosi, jonka adrenerginen purkaus saa aikaan, korjaantuu (kokeiden 1, 2 ja 3 vertailu).

Esimerkki 3

10 Kokeet 4-6

Koiraskoiralle, jonka paino on 28 kg, toistetaan edellä kuvatut kokeet, mutta lisäämällä stimulaatio, joka suoritetaan suonensisäisen noradrenaliinifuusion avulla 200 ng/kg min 25 minuutin aikana ja antamalla suonensisäisesti esimerkin 1 D(-)-3-hydroksivoihapon arginiinisuoletta 40 mikromoolia/kg min.

Muuttujat, jotka on mitattu kokeen aikana (koe 6), ja vertailukokeiden aikana ilman stimulaatiota ja lääkettä (koe 4) ja käyttämällä stimulaatiota, mutta ei lääkettä (koe 5), on mainittu alla olevassa taulukossa IV.

Taulukko IV

5	Muuttuja	Koe		
		4	5	6
	Paine aortassa mm Hg	94	132	94
10	Sydänlihaksen hapenku- lutus ml/100 g.min	8,9	13,4	6,9
	Hapen osapaine sydämen laskimoveressä mm Hg	15,3	17,8	14,7
15	Virtausnopeus ml/100 g.min sydämessä	70	104	56
	pH aortassa	7,390	7,355	7,391
20	3-hydroksibutyraatin plasmakonsentraatio valtimoveressä mM °/oo	0,02	0,02	1,95
	Sydänlihaksen kuluttama määrä			
	-laktaattia $\mu\text{mol}/100 \text{ g.min}$	28,6	37,0	19,8
	-glukoosia $\mu\text{mol}/100 \text{ g.min}$	22,4	21,7	4,6
25	-vapaita rasvahappoja $\mu\text{mol}/100\text{g.min}$	2,4	10,7	1,8
	- 3-hydroksibutyraattia $\mu\text{mol}/100\text{g.min}$	0,2	0,3	24,1

30 Taulukon IV tulosten vertailu osoittaa, että D(-)-
3-hydroksivoihapon arginiinisuo-
lan antaminen (koe 6)
vähentää sydänlihaksen omaa hapenkulutusta, kun sitä on
stimuloitu adrenergisesti, alle niiden arvojen, jotka on
mitattu adrenergisen stimulaation vaikutuksesta ja ilman
35 sitä (kokeiden 4 ja 5 vertailu) sekä suurentaa suhdetta

aorttapaineen ja hapenkulutuksen välillä.

Tulokset osoittavat myös, että vapaiden rasvahappojen käyttö on säädeltyä ja että veren pH pysyy normaaliarvoissa. (kokeet 4, 5 ja 6).

- 5 Lisäksi taulukoiden III ja IV arvojen vertailu (kokeet 3 ja 6) osoittaa, että suoloilla, jotka ovat arginiinin johdannaisia, on se etu natriumsuoloihin nähden, että ne stabiloivat aorttapainetta arvoihin, jotka ovat samoja kuin arvot, jotka on mitattu ilman adrenergistä stimulaatiota (kokeet 1 ja 4).
- 10

Esimerkki 4

Kokeet 7-9

- Toistetaan esimerkissä 2 suoritettut kokeet, mutta tekemällä ne 10 koiralle, joiden keskimääräinen paino on noin 29 kg, ja stimuloimalla noradrenaliini-infuusiolla, joka on keskimäärin 500 ng/kg min, sydämen vasempaan kammioon 20 minuutin ajan ja antamalla suonensisäisesti 80 mikromoolia/kg min esimerkin 1 D(-)-3-hydroksivoihapon L-arginiinisuoloa. Kokeen aikana (koe 9) mitattujen 10 arvon keskiarvo ja vertailukokeiden aikana mitatut vastaavat arvot kokeissa, jotka on suoritettu ilman stimulaatiota tai lääkehoitoa (koe 7) ja käyttämällä stimulaatiota, mutta ei lääkehoitoa (koe 8), on mainittu alla olevassa taulukossa V.
- 15
- 20

Taulukko V

5	Muuttuja	Koe (kymmenen arvon keskiarvo)		
		7	8	9
	Paine aortassa mm Hg	124	141	136
10	Sydänlihaksen hapenkulutus ml/100 g.min	8,5	12,3	8,9
	Hapen osapaine sydämen laskimoveressä mm Hg	20,3	21,4	21,0
15	Virtausnopeus ml/100 g.min sydämessä	79	96	79
	pH aortassa	7,396	7,333	7,344
20	3-hydroksibutyraatin plasmakonsentraatio valtimoveressä mM °/oo	0,04	0,11	8,30
	Sydänlihaksen kuluttama määrä			
	-laktaattia µmol/100 g.min	12,0	4,9	2,2
	-glukoosia µmol/100 g.min	14,4	4,7	2,8
25	-vapaita rasvahappoja µmol/100g.min	4,4	16,9	5,5
	- 3-hydroksibutyraattia µmol/100g.min	0,7	1,8	35,8

30 Taulukon V tulosten vertailu osoittaa, että
 D(-)-3-hydroksivoihapon arginiinisuo-
 35 lan antaminen (koe 9) alentaa sydänlihaksen omaa hapenkulutusta, kun sitä on stimuloitu adrenergisesti, suhteessa arvoihin, jotka on mitattu adrenergisen stimulaation läsnäollessa, mutta ilman D(-)-3-hydroksivoihapon antamista (vertailu kokeen 8 kanssa).

Patenttivaatimus

Menetelmä 3-hydroksivoihapon uusien, terapeuttisesti käyttökelpoisten suolojen valmistamiseksi, t u n n e t -
5 t u siitä, että 3-hydroksivoihappo saatetaan reagoimaan luonnon aminohapon kanssa, joka sisältää vähintään kaksi typpeä sisältävää ryhmää karboksyyli-ryhmää kohden, liuot-
timessa, kuten vedessä 20-80°C:ssa.

10

Patentkrav

Förfarande för framställning av nya, terapeutiskt användbara salter av 3-hydroxismörsyra, k ä n n e t e c k -
n a t därav, att 3-hydroxismörsyra omsätts med en naturlig
15 aminosyra med minst två kväveatomer innehållande grupper per en karboxylgrupp i ett lösningsmedel, såsom vatten vid 20-80°C.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

-