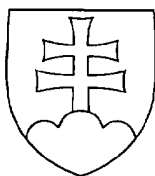


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 323

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl 6:

A 61K 31/42

A 61K 31/165

(21) Číslo prihlášky: 2582-92

(22) Dátum podania: 21.08.92

(31) Číslo prioritnej prihlášky: P 41 27 737.6

(32) Dátum priority: 22.08.91

(33) Krajina priority: DE

(40) Dátum zverejnenia: 13.09.95

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: 07.10.98

(86) Číslo PCT:

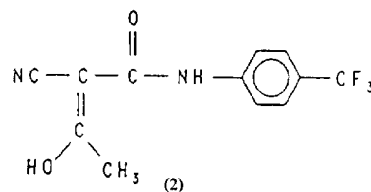
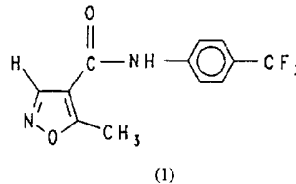
(73) Majiteľ patentu: Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Bartlett Robert Ryder, Dr., Darmstadt, DE;

(54) Názov vynálezu: **Liečivo na aplikáciu pri odmietavých reakciách organizmu pri transplantáciách orgánov**

(57) Anotácia:

Je opísané použitie (4-trifluormetyl)anilidu kyseliny 5-metylizoxazol-4-karboxylovej vzorca (1) a/alebo jej metabolitu, amidu kyseliny N-(4-trifluormetylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotónovej vzorca (2), ako aj fyziologicky prijateľných solí zlúčeniny vzorca (2) na výrobu liečiv na aplikáciu pri odmietavých reakciách organizmu príjemcu orgánu na transplantovaný orgán.

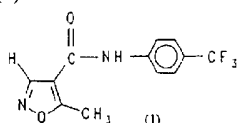


Oblasť techniky

Vynález sa týka použitia (4-trifluormetyl) anilidu kyseliny 5-metylizoxazol-4-karboxylovej a/alebo jej metabolitu, amidu kyseliny N-(4-trifluormetylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotónovej, ako aj fyziologicky prijateľných solí druhej uvedenej zlúčeniny, na aplikáciu pri odmietavých reakciách organizmu príjemcu orgánu na transplantovaný orgán, ako aj liečiv, obsahujúcich uvedené zlúčeniny.

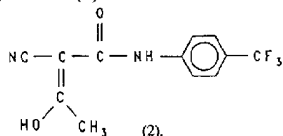
Doterajší stav techniky

Z európskeho patentového spisu č. 13 376 je známy (4-trifluormetyl) anilid kyseliny 5-metylizoxazol-4-karboxylovej vzorca (1)



ako antiflogistické činidlo. Je tu tiež opísaný spôsob výroby tejto zlúčeniny.

Ďalej je známe, že zlúčenina vzorca (1) a jej metabolit, amid kyseliny N-(4-trifluormetylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotónovej vzorca (2)



majú imunomodulačné vlastnosti, takže tieto zlúčeniny sú vhodné ako liečivá proti chronickej chorobe „Graft-versus-Host“, ako aj proti chorobe autoimunitného systému, najmä systematickému Lupus erythematoses (EP-A-217 206).

US- patentový spis 4 061 767 opisuje použitie anilidových derivátov kyseliny 2-hydroxyetylidenkanoctovej na výrobu liečiv s antiflogistickým a analgetickým účinkom.

V USA bolo v roku 1990 uskutočnených 15 000 transplantácií orgánov. Väčší počet sa týkal obličiek, ale pribúdali tiež transplantácie srdca, kože, pľúc, pečene a pankreasu. U veľkého počtu pacientov pri tom dochádza k odmietavým reakciám tela proti prenášanému orgánu, ktorý pochádza od iného človeka. Pri tom sa rozlišujú tri formy odmietavých reakcií:

hyperakútne, akútne a chronické odmietanie.

Hyperakútna odmietavá reakcia je v podstate spôsobená protilátkami, cirkulujúcimi v krvi, ktoré sú zamerané proti tkanivu preneseného orgánu (transplantátu) a vo veľmi krátkom čase, často v priebehu niekoľkých minút, vedú k nekróze transplantátu.

Pri akútnom odmietaní transplantátu je odmietavá reakcia časovo spomalená. Popri tom sa vyskytuje chronická forma priebehu choroby. Transplantát prežíva prvý rok po transplantácii, môže však byť v nasledujúcich rokoch organizmom odmietaný. Ďalej je známe, že hosťiteľský vzťah transplantátu nie je samotný obmedzený na odmietanie hosťiteľského organizmu; v určitých prípadoch môže nastupovať imunoreakcia proti hosťiteľskému organizmu, vychádzajúca z transplantátu (EP-A-217 206). Rozlišuje sa teda medzi odmietavou reakciou medzi transplantátom a hosťiteľom a medzi hosťiteľom a transplantátom.

Ďalej je známe, že dochádza k odmietavým reakciám, keď sa prenášajú orgány rôznych druhov organizmov, na-

príklad z myši na krysu (Roitt a kol., Immunology, Gower Medical Publishing Ltd., 1985).

Doteraz nie sú známe žiadne liečivá, ktoré by poskytovali účinnú ochranu proti hyperakútnej odmietavej reakcii. Na klinikách sa doteraz darcovia a príjemcovia orgánov testujú na neznášanlivosť. U 20 až 40 % pacientov ide pritom o prípad, že nemôžu prijať darovaný orgán. Akútnu odmietavú reakciu je možné ošetrovať, ale používané liečivá majú pri terapii nefrotoxicke vedľajšie účinky. Doteraz tiež nie sú známe žiadne liečivá, ktoré by mohli zachytiť pôvod chronických odmietavých reakcií.

Podstatným patogénnym faktorom zániku tkaniva pri transplantáte sú allofilné a xenofilné protilátky (Auchincloss H., Transplantation 46, 1, 1988). Tieto protilátky sú v podstate zodpovedné za odmietanie pri prenosoch orgánov v jednom druhu organizmu (allo) alebo medzi dvoma rôznymi druhmi organizmov (xeno).

Podstata vynálezu

Teraz bolo prekvapivo zistené, že zlúčenina vzorca (1) a jej metabolit, uvedená zlúčenina 2, majú silnú inhibíciu tvorby allofilných alebo xenofilných protilátok. Tým je umožnené účinne ošetrovať hyperakútne, akútne a chronické reakcie príjemcu na transplantovaný orgán.

Predložený vynález sa teda týka použitia (4-trifluormetylfenyl) anilidu kyseliny 5-metylizoxazol-4-karboxylovej a amidu kyseliny N-(trifluormetylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotónovej a/alebo jeho fyziologicky prijateľnej soli na výrobu liečiv na aplikáciu pri odmietavých reakciách organizmu príjemcu orgánu na transplantovaný orgán.

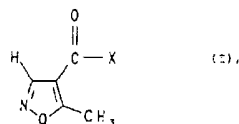
Vhodné fyziologicky prijateľné soli sú napríklad soli s alkalickými kovmi, kovmi alkalických zemín alebo soli amónne, zahŕňajúce tiež fyziologicky prijateľné organické amónne bázy.

Pod pojmom orgán sa rozumejú všetky orgány cicavcov, obzvlášť ľudí, napríklad obličky, srdce, koža, pečeň, pankreas, svaly, kosti, črevá alebo žalúdok, ale tiež krv alebo vlasy.

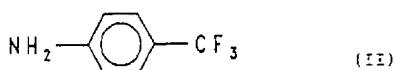
Pod pojmom odmietavá reakcia sa rozumejú všetky obranné opatrenia organizmu príjemcu, ktoré vedú ku konečnému zániku buniek alebo tkaniva prenášaného orgánu, prípadne ktoré ovplyvňujú životaschopnosť prenášaného orgánu.

Zlúčeniny vzorca (1) a (2) sa môžu vyrobiť nasledujúcim spôsobom:

Nechá sa reagovať zlúčenina všeobecného vzorca (I)



v ktorom znamená X atom halogénu, výhodne chlór alebo bróm, s aminom vzorca (II)



na zlúčeninu vzorca (1), ktorá sa potom môže nechať zreagovať za prítomnosti báze na zlúčeninu vzorca (2).

Uvedené reakcie prebiehajú za štandardných podmienok známym spôsobom (EP-B-13 376, US 4 061 767).

Výhodiskové látky na uvedené reakcie sú známe, alebo sa dajú ľahko vyrobiť pomocou metód známych z literatúry.

Predložený vynález sa ďalej týka liečiv, ktoré obsahujú účinné množstvo zlúčeniny vzorca (1), alebo zlúčeniny vzorca (2) a/alebo fyziologicky prijateľné soli zlúčeniny vzorca (2), vedľa farmaceuticky vhodných a fyziologicky prijateľných nosičov, zriedovacích činidiel a/alebo iných účinných a pomocných látok.

Ďalej sa predložený vynález týka tiež spôsobu výroby liečiv na aplikáciu pri odmietavých reakciách organizmu príjemcu orgánu voči transplantovanému orgánu, ktorého podstata spočíva v tom, že sa zlúčenina vzorca (1) alebo (2) prevedie s farmaceuticky vhodným a fyziologicky prijateľným nosičom a prípadne s ďalšími vhodnými účinnými, prídavnými alebo pomocnými látkami, na vhodnú aplikačnú formu.

Liečivá podľa predloženého vynálezu sa môžu aplikovať orálne, topicky, rektálne, intravenózne alebo tiež parenterálne. Aplikácia sa vykonáva pred, v priebehu a po transplantácii orgánu u príjemcu a/alebo darcu.

Ako vhodné pevné alebo kvapalné aplikačné formy je možné uviesť napríklad granuláty, dražé, prášky, tabletky, (mikro)kapsuly, čapíky, sirupy, šťavy, suspenzie, emulzie, kvapky alebo injektovateľné roztoky, ako aj preparáty s predĺženým účinkom. Pri ich výrobe sa používajú bežné pomocné látky, ako sú napríklad nosiče, nadúvadlá, spojivá, poťahové látky, napučiacie látky, mazivá a mazacie látky, chuťové látky, sladidlá alebo látky sprostredkujúce rozpúšťanie. Ako často používané pomocné látky je možné uviesť napríklad uhličitan horečnatý, oxid titaničitý, laktózu, mannit a ostatné cukry, mastenec, mliečnu bielkovinu, želatínu, škroby, celulózu a jej deriváty, živočíšne a rastlinné oleje, polyetylen glykoly a rozpúšťadlá, ako je sterilná voda a jednodomocné alebo viacdomocné alkoholy, napríklad glycerol.

Výhodne sa farmaceutické preparáty vyrábajú a aplikujú v jednotkách dávky, pričom každá jednotka obsahuje ako aktívnu substanciu určité množstvo zlúčeniny vzorca (1) alebo (2) a/alebo fyziologicky prijateľnú soľ zlúčeniny 2. Pri pevných jednotkách dávky, ako sú tabletky, kapsuly alebo čapíky, môže toto množstvo dosahovať hodnotu až asi 300 mg, výhodne však 10 až 200 mg.

Pre ošetrovanie pacientov (70 kg), ktorým bol transplantovaný nejaký orgán, sa v počiatočnej fáze po transplantácii aplikuje intravenózne v infúziách maximálne 1200 mg za deň a v neskorších fázach rehabilitácie sa aplikuje orálne trikrát 300 mg za deň zlúčeniny vzorca (1) alebo (2) a/alebo zodpovedajúce soli zlúčeniny vzorca (2).

Podľa okolností je však možné aplikovať tiež nižšie alebo vyššie dávky. Aplikácia dávky sa môže vykonávať jedným podaním vo forme jedinej jednotky dávky, alebo tiež vo forme väčšieho počtu menších jednotiek dávky, alebo tiež viacnásobným podávaním rozdelenej dávky v určitých intervaloch.

Nakoniec je tiež možné kombinovať zlúčeninu vzorca (1) alebo (2) a/alebo zodpovedajúcu soľ zlúčeniny vzorca (2) pri výrobe uvedených galenických aplikačných foriem tiež s inými vhodnými účinnými látkami, napríklad s antiirupatikami, látkami potlačujúcimi agregáciu trombocytov, analgetikami a steroidnými alebo nesteroidnými antiflogistikami.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Farmakologické skúšky a výsledky

Krasy (LEW) staré 2 až 3 mesiace sa intraperitoneálne (i. p.) senzibilizujú $2 \cdot 10^7$ ľudských periférnych krvných lymfocytov. Intraperitoneálna aplikácia zlúčeniny vzorca (2) začína štyri dni pred senzibilizáciou a končí 10 dní po senzibilizácii krás. Vzorky séra sa odoberajú z chvostovej žily a skladujú sa pri teplote -80°C ; tepelnou aktiváciou sa vylúčia komplementárne funkcie.

Prírodne sa vyskytujúce xenofilné protilátky (nXA) a senzibilizáciou indukované xenofilné protilátky (sXA) sa titrujú a pridávajú sa k ľudským periférnym krvným lymfocytom (živým) (45 minút pri 20°C). Po intenzívnom premytí sa pridá kozia protilátka proti krysiemu IgG a IgM, označená FITC a kvantitatívne sa stanovuje väzba na sXA alebo nXA pomocou Flow-cytometrie (FACScan, Becton Dickinson).

A. Nesenzibilizované krasy

Samčie krasy LEW majú vo svojom sére obsiahnuté nXA, ktoré sa viažu na vitálne ľudské periférne krvné lymfocyty, a síce s priemerným IgM-titrom 1 : 4 a s priemerným IgG-titrom menším než 1 : 1.

Krasy ($n = 8$), ktorým bolo podávané každý deň 10 mg/kg zlúčeniny vzorca (2), majú v 11. dni 30 % redukciu pri IgG-titri a 50 % redukciu pri IgM-titri.

B. Senzibilizované krasy

Pri senzibilizovaných krasách sa vyskytuje silno zvýšené množstvo sXA. IgG-titer dosahuje 1 : 1024 až 1 : 16384 a IgM-titer dosahuje 1 : 4 až 1 : 256. IgG-titer zostáva po 50 dní stabilný, zatiaľ čo IgM-titer po 10. dni pomaly klesá.

Senzibilizované krasy ($n = 5$) sa ošetrojú 3 a 10 mg/kg zlúčeniny vzorca (2). 11. deň sa dosiahne nasledujúcich sXA-titrov:

Zlúčenina (mg/kg)	IgG	IgM
0	1 : 2048	1 : 90
3	1 : 25	1 : 16
10	1 : 1	1 : 1.5

Účinok zlúčeniny vzorca (2) na tvorbu allofilných protilátok

Samčie krasy Brown-Norway s hmotnosťou 200 až 250 g sa použijú ako darcovia srdca. Srdcia sa transplantujú samčím krasám Lewis rovnakej hmotnosti. Všetkým krasám sa podáva štandardná diéta a voda a v okolí sa zachováva 12 hodín svetlo a 12 hodín tma.

Krasám (Lewis) sa v deň transplantácie srdca a potom v odstupe 4 dní odoberá vždy 1 ml krvi z chvostovej žily. Titer allofilných protilátok v krvi týchto krás sa zisťuje tak, že sa rôzne zriedenia krvi príjemcov inkubujú so slezinovými bunkami krás darcovských (Brown-Norway) a králikov. Cytotoxicita sa stanovuje vylučovacou metódou Trypan-Blau. p-hodnota pre protilátky sa stanovuje pomocou standard-T-testu v porovnaní s neošetrenými kontrolnými zvieratami.

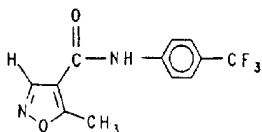
Ošetrovanie zlúčeninou vzorca (2) začína 4. deň po transplantácii. Aplikuje sa intraperitoneálne vždy 10 mg/kg zlúčeniny 2 dvakrát denne. Počet zvierat, ktoré sa súčasne o-

šetrujú, je 5. Ošetrovanie končí 17. deň. Nasledujúca tabuľka ukazuje priemer hodnôt cytotoxicity (%) v priebehu ošetrovania.

Zriedenie krvi	Dni po transplantácii						p-hodnota 17. deň
	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

Príklad 2

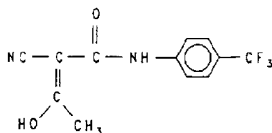
Výroba (4-trifluormetyl) anilidu kyseliny 5-metylizoxazol-4-karboxylovej (zlúčenina vzorca (1))



Roztok 0,05 mol chloridu kyseliny 5-metylizoxazol-4-karboxylovej (7,3 g) v 20 ml acetonitrilu sa pri teplote miestnosti pridá po kvapkách do roztoku 0,1 mol 4-trifluormetylanilínu (16,1 g) v 150 ml acetonitrilu. Po dvadsaťminútovom miešaní sa vyzrážaný hydrochlorid 4-trifluormetylanilínu odsaje, dvakrát sa premyje vždy 20 ml acetonitrilu a spojené filtráty sa za zníženého tlaku zahustia. Získa sa takto 12,8 g bieleho kryštalického (4-trifluormetyl) anilidu kyseliny 5-metylizoxazol-4-karboxylovej (zlúčenina 1).

Príklad 3

Výroba amidu kyseliny N-(4-trifluormetylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotónovej (zlúčenina vzorca (2))



Rozpustí sa 0,1 mol (4-trifluormetyl) anilidu kyseliny 5-metylizoxazol-4-karboxylovej v 100 ml metylalkoholu a pri teplote 10 °C sa zmieša s roztokom 0,11 mol (4,4 g) hydroxidu sodného v 100 ml vody. Reakčná zmes sa mieša počas 30 minút a po zriedení vodou sa okyslí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vyzrážané kryštály sa odsajú, premyjú sa vodou a na vzduchu sa vysušia. Výťažok tvorí 24,4 g amidu kyseliny N-(4-trifluormetylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotónovej (zlúčenina 2). Teplota topenia (z metylalkoholu): 205 - 206 °C.

Príklad 4

Akútna toxicita po intraperitoneálnej aplikácii

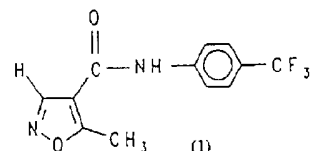
Skúška na akútnu toxicitu sa uskutočňuje po intraperitoneálnej aplikácii testovanej substancie s myšami NMRI (20 až 25 g) a krysami SD (120 až 195 g). Testovaná substancia sa suspenduje v 1 % roztoku natrium-karboxymetylcelulózy. Rôzne dávky testovanej substancie sa aplikujú myšiam v objeme 10 ml/kg telesnej hmotnosti a krysám v objeme 5 ml/kg telesnej hmotnosti. Pre dávku sa použije 10 zvierat. Po 3 týždňoch sa zisťuje akútna toxicita podľa metódy Lichfielda a Wilcoxon. Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke:

	Zlúčenina 1	Zlúčenina 2
--	-------------	-------------

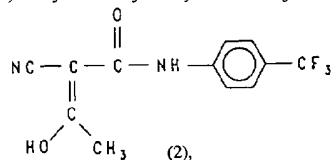
	akútna toxicita intraperitoneálne LD50 (mg/kg)	akútna toxicita intraperitoneálne LD50 (mg/kg)
myši NMRI	185 (163 - 210)	(100 - 200)
krysy SD	170 (153 - 189)	

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie (4-trifluormetyl)anilidu kyseliny 5-metylizoxazol-4-karboxylovej vzorca (1)



a/alebo jej metabolitu, amidu kyseliny N-(4-trifluormetylfenyl)-2-kyano-3-hydroxykrotónovej vzorca (2)



pričom zlúčenina 2 sa vyskytuje sama osebe, alebo vo forme svojej fyziologicky prijateľnej soli, na výrobu liečiv na aplikáciu pri odmietavých reakciách organizmu príjemcu orgánu na transplantovaný orgán.

2. Použitie podľa nároku 1 na výrobu liečiv, ktoré sa aplikujú pred, počas a/alebo po transplantácii u príjemcu alebo darcu orgánu.

3. Použitie podľa nároku 1 alebo 2 na výrobu liečiv na aplikáciu pri hyperakútnych odmietavých reakciách organizmu.

4. Použitie podľa nároku 1 alebo 2 na výrobu liečiv na aplikáciu pri chronických odmietavých reakciách organizmu.

5. Použitie podľa nároku 1 až 4 na výrobu liečiv na aplikáciu pri prenosoch orgánov z jedného druhu organizmu na iný druh.

6. Použitie podľa nároku 1 až 5 na výrobu liečiv na zníženie množstva allofilných alebo xenofilných protilátok.

7. Použitie podľa nároku 1 až 6 na výrobu liečiv na aplikáciu u cicavcov, najmä u ľudí.

Koniec dokumentu