



A2

P0300221

*eljárás az előállítására*

Oltiprazt tartalmazó készítmények) **valamint**  
oltipraz alkalmazása májfibrózis és májcirrózis

**megelőzésére és kezelésére**

*alkalmas  
gyógyászati készítmények előállítására*

Kivonat

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány tárgyát az 5-(2-pirazinil)-4-metil-1,2-dithiol-3-tion (oltipraz) májfibrózis és májcirrózis megelőzésére és gyógykezelésére *alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására /* történő alkalmazása, valamint aktív hatóanyagként oltiprazt tartalmazó gyógyászati készítmények képezik. Találmány tárgya kiterjed a készítmények előállítási eljárására is.

PK

P0300221



**Oltiprazt tartalmazó készítmények) valamint**  
**oltipraz alkalmazása májfibrózis és májcirrózis**

**megelőzésére és kezelésére** *alkalmazás*  
*gyógyászati készítmények előállítására*

**KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY**

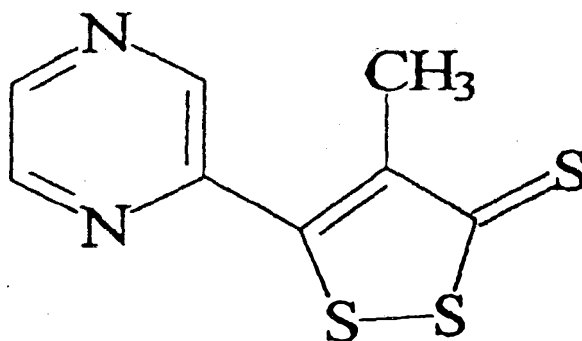
A találmány tárgyát az 5-(2-pirazinil)-4-metil-1,2-ditiol-3-tion (oltipraz) májfibrózis és májcirrózis megelőzésére és gyógykezelésére történő alkalmazása, valamint aktív hatóanyagként oltiprazt tartalmazó gyógyászati készítmények képezik.

A máj a különféle enzimreakciókban és az energia-metabolizmusban betöltött funkciói mellett kulcsfontosságú szerepet játszik a xenobiotikumok és bizonyos endogén anyagok metabolizmusában is. Koreában a szív-érrendszeri betegségek után a májgyulladás, a májcirrózis és a májrák számítanak a leggyakoribb, és a legtöbb elhalálozást okozó idült megbetegedésnek. Koreában jelentős figyelmet fordítanak a májbetegségek kezelésére, mivel az országban a fejlett államokhoz képest viszonylag sok az alkoholfogyasztó és meglehetősen gyakori a túlzott alkoholfogyasztás miatti heveny májkárosodás. A vírusfertőzés vagy alkoholfogyasztás eredményeként kialakult idült májkárosodás gyakran májcirrózis vagy májrák kialakulásához vezet. A máj kulcsfontosságú élettani szerepének ismeretében, a májbetegségek megelőzésének és kezelésének fontossága miatt jelentős igény mutatkozik a májkárosodás megelőzésére és gyógykezelésére szolgáló hatóanyagok kifejlesztése iránt.



Mind *in vitro*, mind *in vivo* számos szintetikus vegyület és galenusi készítmény rendelkezik májvédő hatással. Bár már korábban ismertté vált, hogy a szilimarín ("silymarin") és a betain a citokinek gátlása és a glutati-on-koncentráció fokozása miatt májvédő hatással bírnak, alacsony hatékonyságuk miatt ezektől a hatóanyagoktól nehezen várható el terápiás hatás. Mivel a májbetegségek kezelésére jelenleg nem állnak rendelkezésre megfelelő gyógyhatású hatóanyagok, az említett hatóanyagokat gyakran veszik igénybe klinikai vizsgálatokban. A májfibrózis kezelésére alkalmazott malotilát és származékai megvédik a májat a toxikus kémiai anyagoktól, hatásmechanizmusuk valószínűleg II. fázisbeli konjugáló enzimek indukálásán és a citokróm P450-es enzimek gátlásán alapul. Ezek a vegyületek ugyanakkor nem szelektíven bénítanak számos citokróm P450-es enzimet és csupán megelőző hatással rendelkeznek.

Ismert, hogy a természetes körülmények között a keresztesvirágúakban előforduló kéntartalmú ditioltion különféle szubsztituált változatai májvédő hatással rendelkeznek. Közülük a következő képlettel leírható oltiprazt schistosomiasis gyógykezelésére alkalmazták:





Az oltipraz fokozza a sejt tioltartalmát és indukálja a sejtbeli glutation (GSH) készlet fenntartásáért és a szövetek elektrofil molekuláktól történő megtisztításáért felelős enzimek expresszióját. Az oltipraz fokozza a NAD(P)H kinon-reduktáz, a mikroszomális epoxid-hidroláz, a glutation S-transzferáz (GST) és az UDP glükuronil-transzferáz (UDP-GT) enzimek aktivitását. A GST megvédi a májat bizonyos toxikus kémiai anyagok, pl. a széntetraklorid vagy az acetaminofen káros hatásától [Ansher, S. S. és mtsai.: *Hepatology* 3, 932 (1983)].

Mindezekon túl az oltipraz meggátolja a benzo(a)pirén, az NDEA és az uracilmustár okozta kémiai karcinogenezist, az aflatoxin B<sub>1</sub>-kiváltotta májdaganat-képződést és az azoximetán előidézte vastagbélrák kialakulást [Bolton, M. G. és mtsai.: *Cancer Res.* 53, 3499 (1993)].

Az oltipraz ismereteink szerint a következő módokon gátolja a karcinogenezist: (1) fokozza az antioxidáns hatású redukált GSH szöveti koncentrációját; (2) az I. fázisbeli enzimek pl. a citokróm P450 gátlásával megakadályozza a rákkeltő anyagok biológiai aktiválását; (3) a II. fázisbeli detoxikáló enzimek, pl. a GST és az UDP-GT indukálásával elősegíti a rákkeltő anyagok detoxikálását; (4) *in vitro* gátolja az I. típusú emberi immunhiányos tünetegyüttes vírusának replikációját; (5) a tiolkoncentráció növelésével eltávolítja a sejtbeli reaktív köztes reakciótermékeket és elősegíti a DNS kijavítását. Az oltipraz a legtöbb szövetben fokozza a GSH mennyiségét és eltávolítja a besugárzás vagy a xenobiotikumok hatására képződött szabad gyököket.



Ismert továbbá, hogy az oltipraz a sejtbeli homeosztázis fenntartását elősegítve megvéd a besugárzás káros hatásától is.

Az oltipraz előbbiekben röviden ismertetett daganatképződést gátló hatása a következőképpen érvényesül. A daganatképződés feltehetően a szomatikus sejtek DNS-ének sérülése által előidézett szabályozatlan sejtnövekedés és -differentiálódás eredménye (Cancer Biology, 3. kiadás, pp. 61-95, 497-507, szerk.: Ruddon, R. W., kiad.: Oxford Press). A kémiai anyagok daganatellenes hatása elsősorban azok mutagenezist vagy a daganatsejteké történő transzformációt gátló, vagy a daganatsejtek proliferációját megakadályozó képességén alapul. Korábban már kísérletesen vizsgálták az oltipraz kémiai daganatmegelőző szerként történő alkalmazhatóságát [Ansher és mtsai. (1983); Bolton és mtsai. (1993)]. Az oltipraz daganatmegelőző hatása nem csupán a citokróm P450 3A gátlásán, hanem a II. fázisú detoxikáló enzimek indukálásán is alapul. Az oltipraz sejtekben és állatokban egyaránt fokozza a GST expresszióját [Clapper és mtsai. (1994); Davidson és mtsai. (1990)], amely toxikus anyagok okozta szövetsérülés és karcinogenezis esetében egyébként csökken [Kensler és mtsai. (1987); Maxuitenko és mtsai. (1998)]. Az oltipraz megakadályozza a sugárzás okozta májszövet-sérülést (Kim és mtsai. (1997)], a korábbi vizsgálatban megfigyelt GST-indukció a sejt alkalmazkodási válaszreakciójának jele. Az oltipraz toxikus anyagok esetében is májvédő hatású [Ansher és mtsai. (1983)]. Az oltipraz aflatoxin B1 indukálta daganatképződést meggátló hatá-



sa a rákkeltő anyag citokróm P450 3A által katalizált metabolikus aktiválásának megakadályozásán alapul. Az ember nagymértékben érzékeny az aflatoxin rákkeltő hatására. A közelmúltban elvégzett klinikai vizsgálatok alapján emberben az oltipraz hatékonyan csökkentette a plazmabeli aflatoxin B1 mennyiségét. Oltipraz adagolással állatokban is csökkenthető volt az aflatoxin B1 kiváltotta rákképződés mértéke.

A szakirodalom szerint a hepatitis B vírus (HBV) DNS-t tartalmazó plazmiddal fertőzött 2.2.15 sejtekben az oltipraz meggátolta a HBV replikációját. Ez alapján az oltipraz meggátolja a HBV gén transzkripcióját, fokozza a p53 protein expresszióját [Chi és mtsai. (1998)] és megakadályozza a HIV replikációját [Prochaska és mtsai. (1995)].

Kínában több klinikai vizsgálatot végeztek az oltipraz májrakképződést gátló hatásával kapcsolatban. Ezek eredményei az oltipraz májrakképződés elleni alacsony fokú hatékonyságára utaltak. Ismert, hogy az oltipraz legalább mérsékelt védő hatást fejt ki a toxinok okozta májkárosodás ellen. Az oltipraz biztonságosságát patkányokon és kutyákon végzett toxicitás-vizsgálatokkal igazolták [Fund. Appl. Toxicol. 35, 9 (1997)].

A májfibrózis olyan állapotot jelöl, amelyben *in vivo* adaptációs jelenségként az idült májbetegség, pl. májgyulladás következtében károsodott májszövet pótlása nem ép májsejtekkel, hanem kollagénrostos kötőszövettel történik. Bár a májfibrózis szövetkárosodást követő *in vivo* helyreállítási folyamat eredménye, az elpusztult májszövet helyén



megjelenő kötőszövet nem képes ellátni annak funkcióit (a metabolikus működést, az epetermelést stb.). Mivel a folyamatos vagy kiújuló májbeli kötőszövet-szaporodás májcirrózishoz és végső soron halálhoz vezet, a májfibrózis kezelésére alkalmas új hatóanyagok kifejlesztése rendkívül fontos feladat. Mivel azonban a májbeli kötőszövet-szaporodás pontos mechanizmusa még nem ismert, annak gyógykezelésére alkalmas hatóanyagokat sem sikerült ezidáig kifejleszteni.

Újabb keletű vizsgálatok alapján kiderült, hogy a májbeli Kupffer- és Ito-sejtek által kiválasztott  $\beta$  transzformáló növekedési faktor (TGF- $\beta$ ) elnevezésű citokin a májfibrózis lényeges mediátor anyaga. Kimutatták továbbá azt is, hogy a TGF- $\beta$  aktivitás gátlása TGF- $\beta$  ellenanyagokkal, antiszensz RNS-sel, vagy a TGF- $\beta$  receptorok módosítása jelentősen csökkenti a májfibrózis mértékét. Az említett kutatás eredményei azonban eddig csupán kísérletes igazolást nyertek. Ezidáig nem számoltak be a májfibrózis és a májcirrózis terápiájára klinikai körülmények között alkalmas hatóanyagokról.

A találmány tárgyát a májfibrózis és a májcirrózis terápiájának hatékonyságát maximálisra növelő, és egyben megelőző céllal is alkalmazható gyógyászati készítmény képezi.

Közelebbről, a találmány tárgyát az 5-(2-pirazinil)-4-metil-1,2-ditiol-3-tion (oltipraz) májfibrózis és májcirrózis megelőzésére és gyógykezelésére történő alkalmazása képezi. A találmány tárgyát képezi továbbá a májfibrózis és májcirrózis gyógykezelésére vagy megelőzésére szolgáló, ak-



tív hatóanyagként oltiprazt tartalmazó gyógyászati készítmény emlősnek történő beadásán alapuló eljárás.

A májfibrózis és a májcirrózis gyógykezelésére és megelőzésére alkalmas hatóanyag kifejlesztését célzó vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy az 5-(2-pirazinil)-4-metil-1,2-ditiol-3-tion (oltipraz) meglepően hatékony az említett kórképek megelőzésében vagy gyógykezelésében.

Ez alapján a találmány tárgyát májfibrózis és májcirrózis gyógykezelésére és megelőzésére szolgáló, 5-(2-pirazinil)-4-metil-1,2-ditiol-3-tiont és gyógyászati szempontból elfogadható vivőanyagot tartalmazó gyógyászati készítmény képezi.

A találmány tárgyát képező oltipraz májfibrózis és májcirrózis gyógykezelésére és megelőzésére szolgáló gyógyszerként alkalmazható, amely még viszonylag alacsony dózisban is májfibrózist gátló hatást fejt ki. A találmány szerinti, optimális oltipraz adagot tartalmazó kiszerezések meglepően jó eredménnyel alkalmazhatók a májfibrózis és májcirrózis gyógykezelésére és megelőzésére, emellett biztonságosan alkalmazható, az emberi szervezetre csupán kis mértékben toxikus készítménynek tekinthetők.

Az alábbiakban az ábrák rövid leírását közöljük.

Az 1a ábra egészséges állat májszövetének képe [hematoxin-eozin (H-E) festés].

Az 1b ábra oltipraz kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (H-E festés).

Az 1c ábra DMN kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (H-E festés).



Az 1d ábra egyidejű DMN és oltipraz kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (H-E festés).

A 2a ábra DMN kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (Van Gieson festés).

A 2b ábra egyidejű DMN és oltipraz kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (Van Gieson festés).

A 2c ábra DMN kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (Masson-féle trikróm festés).

A 2d ábra egyidejű DMN és oltipraz kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (Masson-féle trikróm festés).

A 3. ábra az oltipraz DMN-nel kezelt patkány májszövetében a TGF- $\beta$  1 mRNS expressziójára gyakorolt gátló hatását szemlélteti.

A 4. ábra az oltipraz LPS hatására kialakuló TNF- $\alpha$  koncentráció emelkedésre gyakorolt gátló hatását szemlélteti patkányban.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

Példa nélkül álló felfedezésünk alapját az a váratlan felismerés képezi, hogy az oltipraz a TGF- $\beta$  termelés megakadályozásán keresztül meglepően hatékonyan bizonyult a májfibrózis és májcirrózis kezelésében és megelőzésében.

Amint a fentiekben bemutattuk, az oltipraz védelmet nyújt a toxikus májkárosodás ellen és gátolja a daganatképződés folyamatát. Az oltipraz májfibrózis és májcirrózis jelen találmány szerinti kezelése és megelőzése céljából



történő alkalmazásának hatékonyságáról azonban ezidáig egyetlen közlemény sem tett említést.

A cirrózist megelőző stádiumnak számító fibrózis számos, súlyos fokú májkárosodást kiváltó tényező következménye lehet. A cirrózis részben összefügg a karcinogenezissel, a májcirrózisban megbetegedett személyek esetében jelentős mértékben fokozódik a májrák kialakulásának veszélye. A májcirrózis körfejlődése azonban élesen elválasztható a májrák kialakulásának folyamatától. Májfibrózis akkor alakul ki, amikor a májszövetet idült, súlyos fokú károsodás éri. A májkárosodás vírusok, paraziták, alkoholfogyasztás, kémiai anyagok és gyógyászati készítmények hatására egyaránt kialakulhat. A májfibrózis a májban található non-parenchymalis sejtek, pl. a Kupffer-sejtek, a nyúlványos sejtek stb. aktiválódása következtében kialakult túlzott mértékű extracelluláris mátrix (pl. I., III. és IV. típusú kollagén) képződés következménye. Közelebbről, a fibrózis a nyúlványos sejtek aktiválódása, majd myofibroblast sejtekké alakulása miatt jön létre. Az aktivált nyúlványos sejtek ezután túlságosan nagy mennyiségű extracelluláris mátrixot termelnek. A fibrózis és a cirrózis a vírusos májgyulladás-tól és a májráktól egyértelműen elkülöníthető kórképek. Ennek megfelelően gyógykezelésük és megelőzésük módjai is eltérőek. Jelenleg azonban a májcirrózis kezelésére nem áll rendelkezésre klinikai körülmények között alkalmazható hatóanyag.

A találmány szerinti megoldás azon a felismerésen alapul, hogy a májrák megelőzésében ismertén hatékony oltipraz



a májraktól teljes mértékben eltérő kórfejlődésű májfibrózis és májcirrózis ellen is hatásos. Mindezeket a következőkben bemutatott kísérletek eredményei bizonyítják.

Az oltipraz csökkenti a dimetil-nitrózamin (DMN) által felgyorsított fibrózist jelző, kórszövetteni vizsgálattal megállapított ún. fibrózis- és Knodell-pontszámokat. Emellett az oltipraz lényeges mértékben gátolja egyes toxikus májkárosodást jelző anyagok, mint pl. az alanin-aminotranszferáz (ALT), az aszpartát-aminotranszferáz (AST), a bilirubin, valamint a gamma-glutamil transzpeptidáz (gamma-GT) mennyiségének növekedését. Az oltipraz a fibrózishoz vezető folyamatok lassításával csökkentheti annak súlyosságát. Az oltipraz fibrózisellenes hatása a TGF- $\beta$  expresszió gátlásán alapul. Mennyiségi RT-PCR vizsgálataink eredményei alapján az oltipraz teljes mértékben meggátolja a dimetil-nitrózamin kiváltotta fokozott TGF- $\beta$  mRNS expressziót. Ez azt bizonyítja, hogy az oltipraz képes meggátolni a májfibrózis és májcirrózis kialakulását és súlyosbodását. Az oltipraz potenciálisan kiváló fibrózisellenes hatóanyagnak tekinthető, mivel erős fibrózisgátló hatással rendelkezik, indukálja a májbeli detoxikálásért felelős GST enzimet, fokozza a GSH mennyiségét, valamint gyökkonjugáló aktivitással is rendelkezik. Az oltipraz még alacsony dózisban alkalmazva is várhatóan kielégítő gyógyászati hatást biztosít.

Az oltipraz májfibrózis kezelésében mutatott gyógyhatását különböző DMN adagokkal kezelt patkányokon figyeltük meg. Az eredmények alapján a DMN-kezelt csoport plazma ALT-



és AST-aktivitása a normálérték négyszeresére növekedett. Az oltipraz adagolás dózisfüggő mértékben gátolta a plazma ALT- és AST-aktivitás fokozódását. A plazma GT-aktivitásának és bilirubin-tartalmának meghatározását a májfunkció értékelésére veszik igénybe. Az oltipraz patkányokban 70-80%-ban meggátolta a DMN-adagolás előidézte gamma-GT aktivitás fokozódást. A DMN adagolás hatására a kísérleti állatokban a bilirubin-tartalom nyolcszoros emelkedést mutatott. A DMN és oltipraz együttes adagolásakor a vérplazma bilirubin-tartalmának emelkedése 65%-kal alacsonyabb mértékű volt. A kórszövettani vizsgálattal meghatározott fibrózis- és Knodell-pontszámok vizsgálatokor kiderült, hogy az oltipraz jelentős mértékben gátolta a DMN kiváltotta májfibrózis súlyosbodását. Az említett jelenségek elsősorban az oltipraz TGF- $\beta$  termelődést gátló hatásának tulajdoníthatók. Feltételezhető, hogy az antioxidáns enzimek indukciója és a GSH-aktivitás fokozódása is hozzájárul az oltipraz fibrózisellenes hatásához.

Az oltipraz klinikai körülmények között is hatékonyan alkalmazható a májfibrózis és májcirrózis gyógykezelésére és megelőzésére. A találmány szerinti gyógyászati készítmény klinikai alkalmazása esetén a szájon át történő beadásra szánt gyógyszeradagok kiszerezése és adagolása az gyógyászati terület szabályai szerint történhet. A szájon át történő beadásra szánt kiszerezések közé tartoznak a kemény vagy lágy kapszulák, a tabletták, a por stb. Az ilyen kiszerezések az oltipraz, mint aktív hatóanyag mellett egy vagy több, gyógyászati szempontból inaktív hagyományos vi-



vőanyagot is tartalmazhatnak. A szájon át történő beadásra szánt készítmény tartalmazhat vehiculumokat, pl. keményítőt, laktózt, karboximetil-cellulózt és kaolint; kötőanyagokat, pl. vizet, zselatint, alkoholt, glükózt, gumiarábigumot, tragantmézgát; dizintegráló szereket, pl. keményítőt, dextrint vagy nátrium-alginátot; síkosító szereket, pl. sztearinsavat, magnézium-sztearátot, vagy folyékony paraffint.

A találmány szerinti készítmény napi adagja különböző tényezők függvényében határozható meg, ilyenek pl. a páciens májkárosodásának mértéke, a májgyulladás kialakulásának ideje, a páciens életkora, egészségi állapota, egyéb megbetegedései stb. Átlagos testtömegű felnőtt betegnek az oltipraz naponta egy vagy két alkalommal, 10-1000 mg/nap, előnyösebben 50-300 mg/nap összes dózisban adagolható. Súlyos fokú májkárosodás esetén, vagy májrák műtéti eltávolítását követően a kiújulás meggátlása céljából alkalmazva a találmány szerinti gyógyászati készítmény az előbb említetteknel magasabb dózisban is adagolható.

A találmány tárgyát a kiváló májfibrózis- és májcirrózis-súlyosbodás gátló hatással rendelkező oltipraz alacsony toxicitású és mellékhatásokkal szinte nem rendelkező, nem csupán gyógykezelési, hanem megelőzési célból is igénybevehető, hosszú ideig, biztonságosan alkalmazható készítmény előállítására történő alkalmazása képezi. A találmány szerinti gyógyászati készítmény hosszú ideig biztonságosan alkalmazható májfibrózis és májcirrózis gyógykezelésére és megelőzésére.



A találmány szerinti megoldást az alábbi, a találmány hatókörét nem korlátozó munkapéldákon ("working examples") keresztül ismertetjük részletesebben.

A találmány szerinti megoldást az alábbi kísérleti példákon ("test examples") keresztül ismertetjük részlete-  
sebben.

### **1. kísérleti példa**

#### **Az oltipraz fibrózisellenes hatása I.**

A négy héten keresztül folyamatosan dimetilnitrózamin-  
nal (DMN) kezelt patkányok vérplazmájában négyszeresére  
emelkedett az ALT- és az AST-aktivitása. Az 50 mg/kg olti-  
prazzal végzett előzetes kezelés hatására a vérplazma ALT-  
és AST-aktivitás fokozódásának 50%-os gátlása volt megfi-  
gyelhető (1. táblázat).

A plazma gamma-GT-aktivitásának és bilirubin-tartal-  
mának meghatározását a májfunkció értékelésére veszik  
igénybe. Az oltipraz DMN-nel kezelt patkányokban 70-80%-ban  
meggátolta a DMN-adagolás előidézte gamma-GT-aktivitás fo-  
kozódást. A DMN adagolás hatására a kísérleti állatokban a  
kontrollokhoz képest a bilirubin-tartalom nyolcszoros emel-  
kedést mutatott. A DMN és az 50 mg/kg oltipraz együttes  
adagolásakor a vérplazma bilirubin-tartalmának emelkedése  
65%-kal alacsonyabb mértékű volt.



1. táblázat: ALT-, AST, gamma-GT- és bilirubin-értékek

Csoport	ALT	AST	gamma-GT	bilirubin
Kontroll	49 ± 2	113 ± 6	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,01
DMN	190 ± 12*	412 ± 39*	12,1 ± 4,1*	0,9 ± 0,2*
DMN + 50 mg/kg oltipraz	116 ± 4 <sup>#</sup>	246 ± 32 <sup>#</sup>	2,6 ± 0,5 <sup>#</sup>	0,3 ± 0,03 <sup>#</sup>

Az értékeket átlag ± standard eltérés alakban tüntettük fel. Az egyes csoportokban 8-16 állatot alkalmaztunk. A csoportok közötti különbségeket Newman-Keuls többszörös összehasonlítási teszttel állapítottuk meg. A statisztikai szignifikancia mértékét a következőképpen jelöltük: \* =  $p < 0,05$  a kontrollhoz képest; # =  $p < 0,05$  a DMN-kezelt csoporthoz képest.

## 2. kísérleti példa

### Az oltipraz fibrózisellenes hatása II.

Az oltipraz DMN-indukálta májfibrózisban kifejtett hatását állati modellben, kórszövetteni vizsgálattal állapítottuk meg. A négy héten keresztül heti három alkalommal DMN-kezelésben részesült patkányokban egyértelmű májfibrózis volt megfigyelhető. A négy héten keresztül, heti három alkalommal 5-50 mg/kg adagban szájon át adott oltipraz és DMN együttes alkalmazása a csak DMN-kezelésben részesült állatokhoz képest enyhébb mértékű májszövetbeli fibrózist eredményezett. A májelhalás- és -fibrózis mértékét Van



Gieson festés és Masson-féle trikróm festés segítségével határoztuk meg.

Az 1a ábra egészséges állat májszövetének képe (H-E festés); az 1b ábra oltipraz kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (H-E festés); az 1c ábra DMN kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (H-E festés); az 1d ábra egyidejű DMN és oltipraz kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (H-E festés). A 2a ábra DMN kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (Van Gieson festés); a 2b ábra egyidejű DMN és oltipraz kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (Van Gieson festés); a 2c ábra DMN kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (Masson-féle trikróm festés); a 2d ábra egyidejű DMN és oltipraz kezelésben részesült állatcsoportból származó májszövet képe (Masson-féle trikróm festés).

Az oltipraz 50 mg/kg-os adagja hatékonynak bizonyult a DMN-kiváltotta fibrózis megelőzésében (2. táblázat). A fibrózis mértékét a májkárosodás és májfibrózis súlyosságát jelző fibrózis- és Knodell-pontszám meghatározásával állapítottuk meg. A csupán DMN-kezelésben részesült csoporthoz képest a DMN + oltipraz csoportban alacsonyabb fibrózis- és Knodell-pontszámot állapítottunk meg, ami a májkárosodás és -fibrózis enyhébb voltára utalt.



2. táblázat: Az oltipraz májfibrózis kialakulását gátló hatása

Csoport	Fibrózis pontszám	Knodell pontszám
Kontroll	0	0
DMN	3,7 ± 0,5	16,1 ± 2,9
DMN + 5 mg/kg oltipraz	3,1 ± 0,4*	11,1 ± 1,7*
DMN + 15 mg/kg oltipraz	2,9 ± 0,8*	12,1 ± 1,9*
DMN + 50 mg/kg oltipraz	2,5 ± 0,9**	8,0 ± 1,6**

Az értékeket átlag ± standard eltérés alakban tüntetjük fel. Az egyes csoportokban 8-16 állatot alkalmaztunk. A csoportok közötti különbségeket Newman-Keuls többszörös összehasonlítási teszttel állapítottuk meg. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ . A fibrózis mértékét a következő pontozásos rendszerrel értékeltük: 0 = ép szövet, 1 = enyhe fokú fibrózis, 2 = közepes mértékű fibrózis, 3 = kifejezett fibrózis, 4 = súlyos fokú fibrózis. A Knodell-pontszámot a periportális hídképződés ("bridging") (a legmagasabb érték = 10), az intralobuláris sejtpusztulás (a legmagasabb érték = 4), a portális gyulladáshoz sejtbeszűrődés (a legmagasabb érték = 4) és a fibrózis (legmagasabb érték = 4) pontszámainak összegzésével állapítottuk meg.



### **3. kísérleti példa**

#### **Az oltipraz fibrózisellenes hatásának farmakológiai alapja**

A TGF- $\beta$  1 a szövetkárosodás következtében fibrózis során fokozott mértékben expresszált fő citokin. A csak DMN-kezelésben, valamint egyidejű DMN és oltipraz kezelésben részesül állatokban RT-PCR segítségével a TGF- $\beta$  1 mRNS expresszióját figyeltük meg. A négy hétnél tovább DMN-nel kezelt állatokban a visszafordíthatatlan, súlyos fokú kötőszövet-szaporodás eredményeként a TGF- $\beta$  1 mRNS expressziója már nem volt megfigyelhető. A TGF- $\beta$  1 mRNS expresszióját DMN egyszeri adagjának beadását követően értékeltük. A DMN beadását követően 18 órával oltiprazt adtunk az állatoknak, majd 24 órával később meghatároztuk a TGF- $\beta$  1 mRNS expresszióját. A DMN-nel kezelt állatok májszövetében jelentős mértékben fokozódott a TGF- $\beta$  1 mRNS expressziója. A 100 mg/kg oltipraz adagolása ugyanakkor teljes mértékben meggátolta a DMN-indukálta TGF- $\beta$  1 mRNS expressziót. A GAPDH mRNS expressziója sem a csak DMN-nel, sem a DMN-nel és oltiprazzal egy időben végzett kezelés hatására nem változott. Az oltipraz tehát a TGF- $\beta$  1 expressziójának gátlását előidéző mechanizmuson keresztül akadályozza meg a májfibrózis kialakulását (3. ábra).

### **4. kísérleti példa**

#### **Az oltipraz TGF- $\beta$ termelést gátló hatásának értékelése**

Annak megállapítására, hogy az oltipraz közvetlenül gátolja-e a makrofágokban egyébként nagy mennyiségben



expresszált TGF- $\beta$  termelését, valamint az ezzel kapcsolatos molekuláris farmakológiai mechanizmusok vizsgálata érdekében RAW264.7 makrofágok alkalmazásával végeztünk kísérleteket. A TGF- $\beta$ -t expresszáló RAW264.7 sejtek oltiprazkezelése dóziszfüggő módon meggátolta a TGF- $\beta$  expresszióját. Ez alapján az oltipraz a májbeli Kupffer-sejtek TGF- $\beta$  termelésének megakadályozásával fibrózis-ellenes hatóanyagként működhet. A TGF- $\beta$  expresszió növekedése EGTA-val vagy tirozin-kináz inhibitor geniszteinnel is meggátolható. Mindezek alapján az oltipraz TGF- $\beta$  termelést gátló hatása a sejten belüli kalcium szabályozásban és a proteinkináz aktivitásban bekövetkező változások eredménye lehet (3. táblázat).

3.táblázat: Makrofágok TGF- $\beta$  expressziójának gátlása oltiprazzal

	Kontroll	30 $\mu$ M oltipraz	100 $\mu$ M oltipraz	1 mM EGTA	100 $\mu$ M genisztein
Százalékos TGF- $\beta$ gátlás	0	30	60	80	80

### **5. kísérleti példa**

#### **Az oltipraz TNF- $\alpha$ termelést gátló hatása**

A TNF- $\alpha$  a makrofágok által kibocsátott citokin, amely a különböző mikrobák, pl. baktériumok elpusztításával lényeges szerepet tölt be a gazdaszervezet védekező reakcióiban. A túlzott mértékű TNF- $\alpha$  termelés miatt felerősödő



gyulladásos válaszreakció azonban sejtpusztulást idéz elő. Ezért alkalmaznak anti-TNF- $\alpha$  ellenanyagokat vagy TNF- $\alpha$  termelést gátló anyagokat szisztémás gyulladásos megbetegedések esetében. Ebben a kísérletben annak igazolására, hogy az oltipraz gátolja a Kupffer-sejtek aktivitását, endotoxinnal (LPS-sel) kezelt patkányokban vizsgáltuk az oltipraz TNF- $\alpha$  termelésre gyakorolt hatását. Az oltiprazzal kezelt patkányokban az LPS által kiváltott TNF- $\alpha$  termelés dóziszfüggő gátlását állapítottuk meg. Ez alapján megállapítható, hogy az oltipraz gátolja a TNF- $\alpha$  termelést, így megakadályozza a májszövet gyulladásos reakcióját, hatását pedig a Kupffer-sejtekre fejti ki. Az oltipraz májvédő hatása a TGF- $\beta$  termelés megakadályozásán túl a májbeli gyulladásos reakciók gátlásán is alapulhat (4. ábra, az LPS kezelésben részesült állatcsoport adataihoz képest megállapított eltérés szignifikanciája \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

### **1. munkapélda**

oltipraz	25 mg
laktóz	50 mg
keményítő	10 mg
magnézium-sztearát	megfelelő mennyiségben

A fenti összetevőkből azok összekeverése után hagyományos tablettakészítési eljárással tablettát készítettünk.



**2. munkapélda**

oltipraz	100 mg
laktóz	50 mg
keményítő	10 mg
magnézium-sztearát	megfelelő mennyiségben

A fenti összetevőkből azok összekeverése után hagyományos tablettakészítési eljárással tablettát készítettünk.

**3. munkapélda**

oltipraz	250 mg
laktóz	50 mg
keményítő	10 mg
magnézium-sztearát	megfelelő mennyiségben

A fenti összetevőkből azok összekeverése után hagyományos tablettakészítési eljárással tablettát készítettünk.

**4. munkapélda**

oltipraz	25 mg
laktóz	30 mg
keményítő	28 mg
talkum	2 mg
magnézium-sztearát	megfelelő mennyiségben

A fenti összetevőket összekevertük, majd a keveréket hagyományos kapszulakészítési eljárással kemény zselatin-kapszulába töltve kapszulát állítottunk elő.



**5. munkapélda**

oltipraz	100 mg
laktóz	30 mg
keményítő	28 mg
talkum	2 mg
magnézium-sztearát	megfelelő mennyiségben

A fenti összetevőket összekevertük, majd a keveréket hagyományos kapszulakészítési eljárással kemény zselatin-kapszulába töltve kapszulát állítottunk elő.

**6. munkapélda**

oltipraz	250 mg
izomerizált cukor	10 g
cukor	30 mg
nátrium-CMC	100 mg
citromízű ízesítőanyag	megfelelő mennyiségben

(a keverékhez 100 ml össztérfogat eléréséig tisztított vizet adunk)

A fenti összetevőkből hagyományos szuszpenzió-készítési eljárással szuszpenziót állítottunk elő. A szuszpenziót 100 ml-es barna üvegbe töltöttük és sterilizáltuk.



**7. munkapélda**

oltipraz	500 mg
izomerizált cukor	20 g
cukor	20 mg
nátrium-arginát	100 mg
narancsízű ízesítőanyag	megfelelő mennyiségben
tisztított víz	100 ml össztérfogatig

A fenti összetevőkből hagyományos szuszpenzió-készítési eljárással szuszpenziót állítottunk elő. A szuszpenziót 100 ml-es barna üvegbe töltöttük és sterilizáltuk.

**8. munkapélda**

oltipraz	250 mg
laktóz	30 mg
keményítő	20 mg
magnézium-sztearát	megfelelő mennyiségben

Porkészítmény előállítására érdekében a fenti összetevőket összekevertük, polietilén-bevonatú tasakba töltöttük, majd azt lezártuk.

**9. munkapélda**

1 lágy kapszula tartalma:

oltipraz	100 mg
polietilén-glikol	400 mg
koncentrált glicerin	55 mg
tisztított víz	35 mg

A polietilén-glikolt összekevertük a koncentrált glicerinrel, majd tisztított vizet adtunk a keverékhez. Ezután



a keverékhez a hőmérsékletet 60°C-on tartva oltiprazt adtunk, majd azt kb. 1500 fordulat/perc sebességgel összekevertük. Egyneművé válása után a keveréket lassú kevergetés közben szobahőmérsékletűre hűtöttük. A légbuborékok vákuumpumpával történt eltávolítását követően kaptuk meg a lágy kapszula tartalmát.

A lágy kapszula burkát hagyományos eljárással, 132 mg zselatint, 52 mg koncentrált glicerint, kapszulánként 6 mg 70%-os diszorbitol oldatot, megfelelő mennyiségű etilvanilin ízesítőszeret tartalmazó közismert lágy zselatin-képlékenyítőszert keverék és karnaubaviasz bevonószer alkalmazásával állítottuk elő.

#### **Ipari alkalmazhatóság**

A találmány szerinti, oltiprazt tartalmazó gyógyászati készítmény meglepően kiváló hatékonyságúnak bizonyult a májfibrózis és májcirrózis terápiájában és megelőzésében.



## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. 5-(2-pirazinil)-4-metil-1,2-ditiol-3-tion (olti-praz) alkalmazása májfibrózis vagy májcirrózis előrehaladásának megelőzésére vagy kezelésére szolgáló gyógyászati készítményként.

2. Gyógyászati készítmény májfibrózis vagy májcirrózis előrehaladásának megelőzésére vagy kezelésére, amely 5-(2-pirazinil)-4-metil-1,2-ditiol-3-tiont és gyógyászatilag elfogadható kötőanyagot tartalmaz.


3. A 2. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, melynek kiszerelése a következők bármelyike: kapszula, tabletta, lág kapszula, szuszpenzió, szirup, injekció vagy por.

4. A 2. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely szájon át történő beadásra alkalmasan kiszerelt készítmény.

5. 5-(2-pirazinil)-4-metil-1,2-ditiol-3-tion alkalmazása májfibrózis vagy májcirrózis előrehaladásának megelőzésére vagy kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására.

6. Eljárás májfibrózis vagy májcirrózis előrehaladásának megelőzésére vagy kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy 2. igénypont szerinti gyógyászati készítményt említsnek beadunk.

A meghatalmazott:

  
**DANUBIA**  
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.  
**Dr. Pethő Árpád**  
szabadalmi ügyvivő

10 oldal rajzzal  
2003. 04. 02.

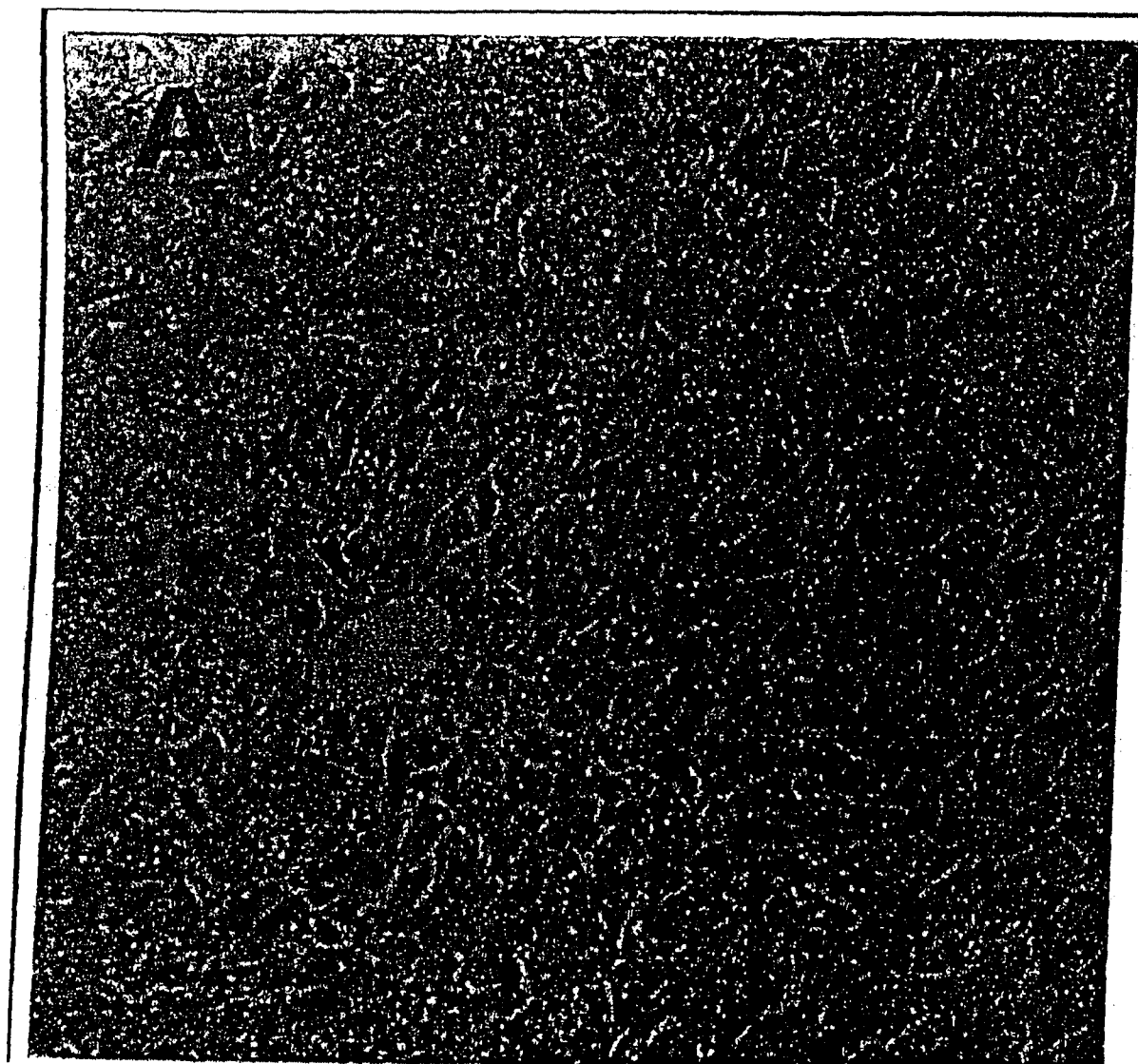
P03 002 21



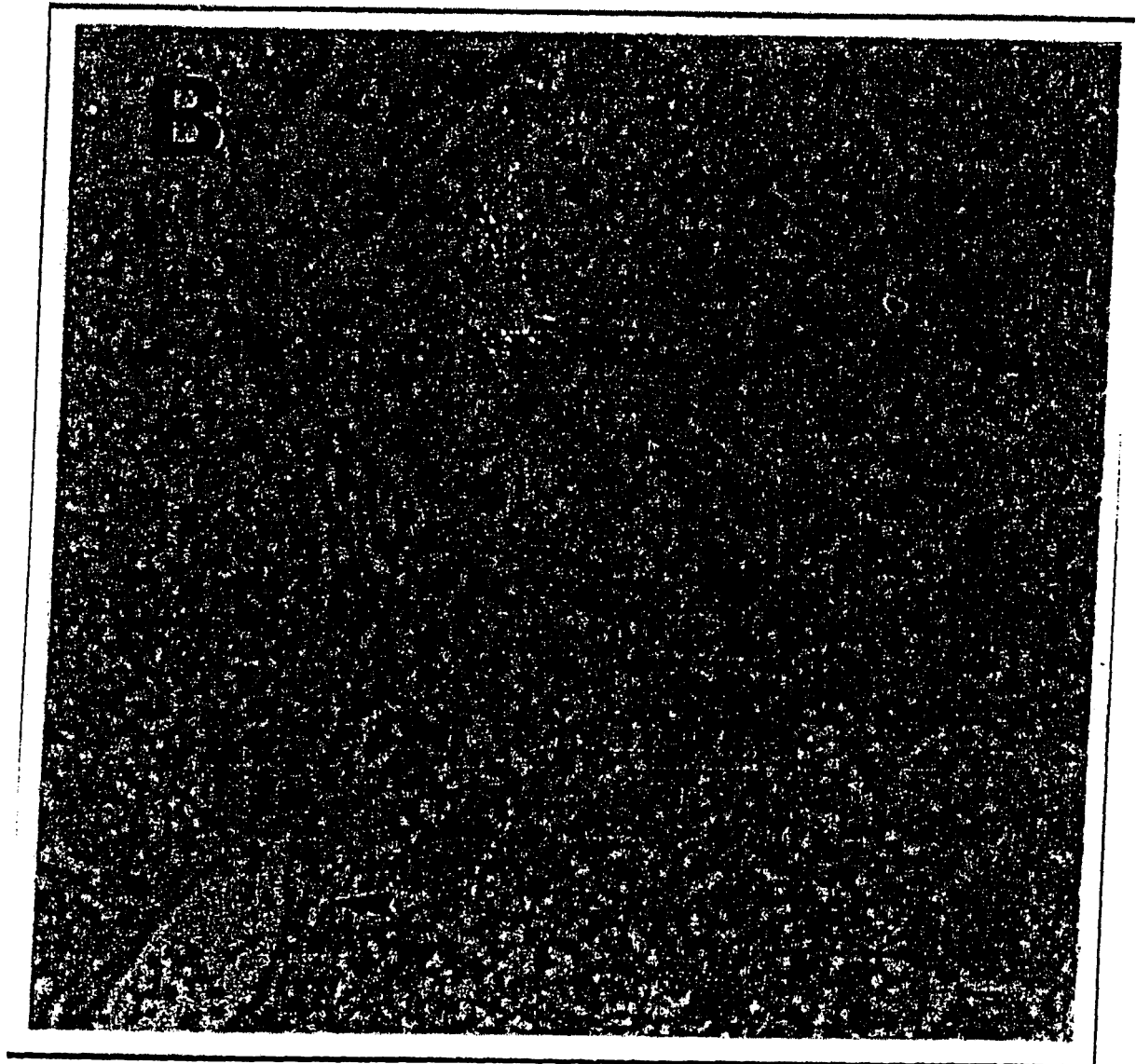
PCT/KR01/00319

A2 1/10

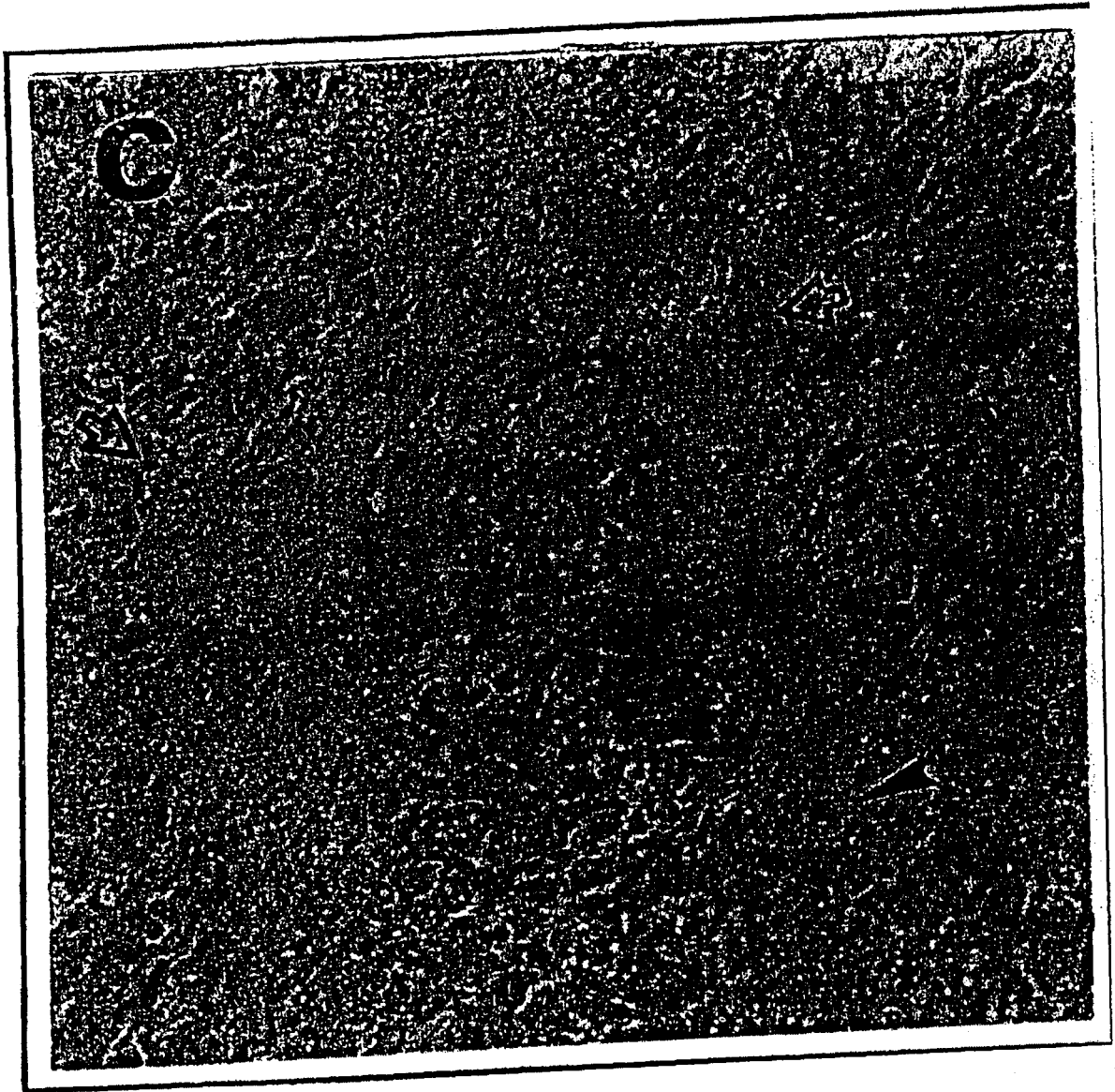
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



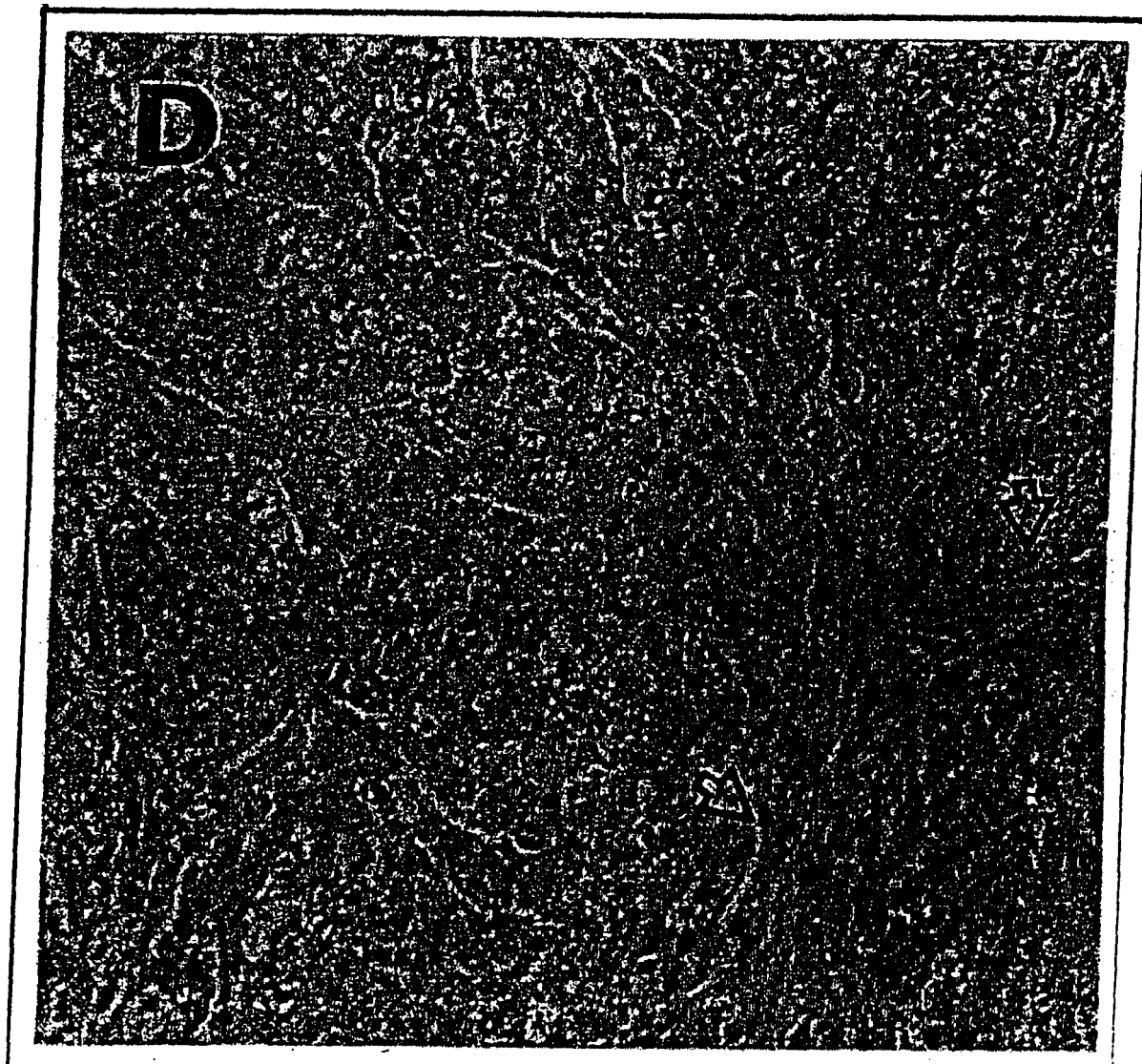
1a ábra



1b ábra



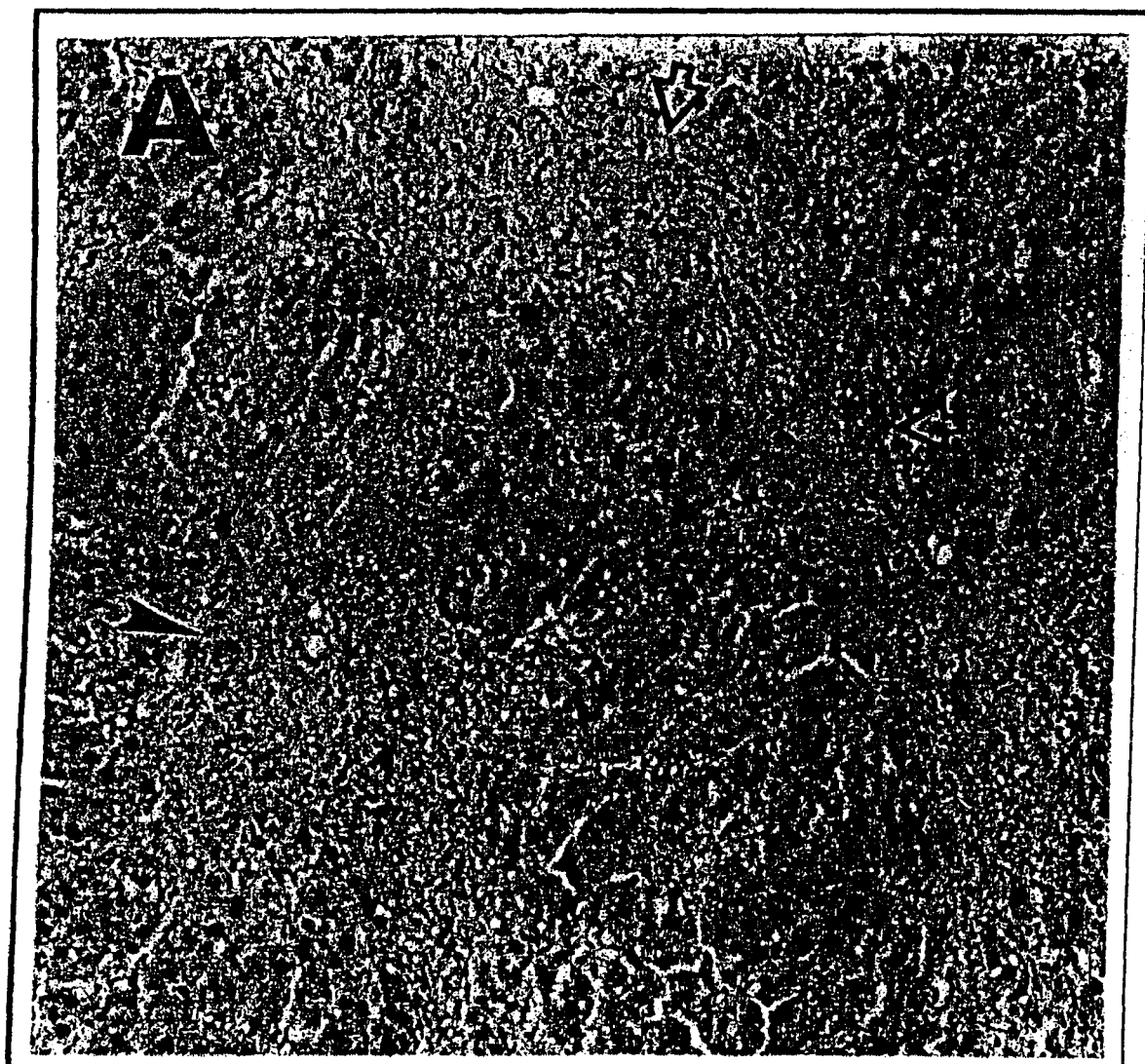
1c ábra



1d ábra



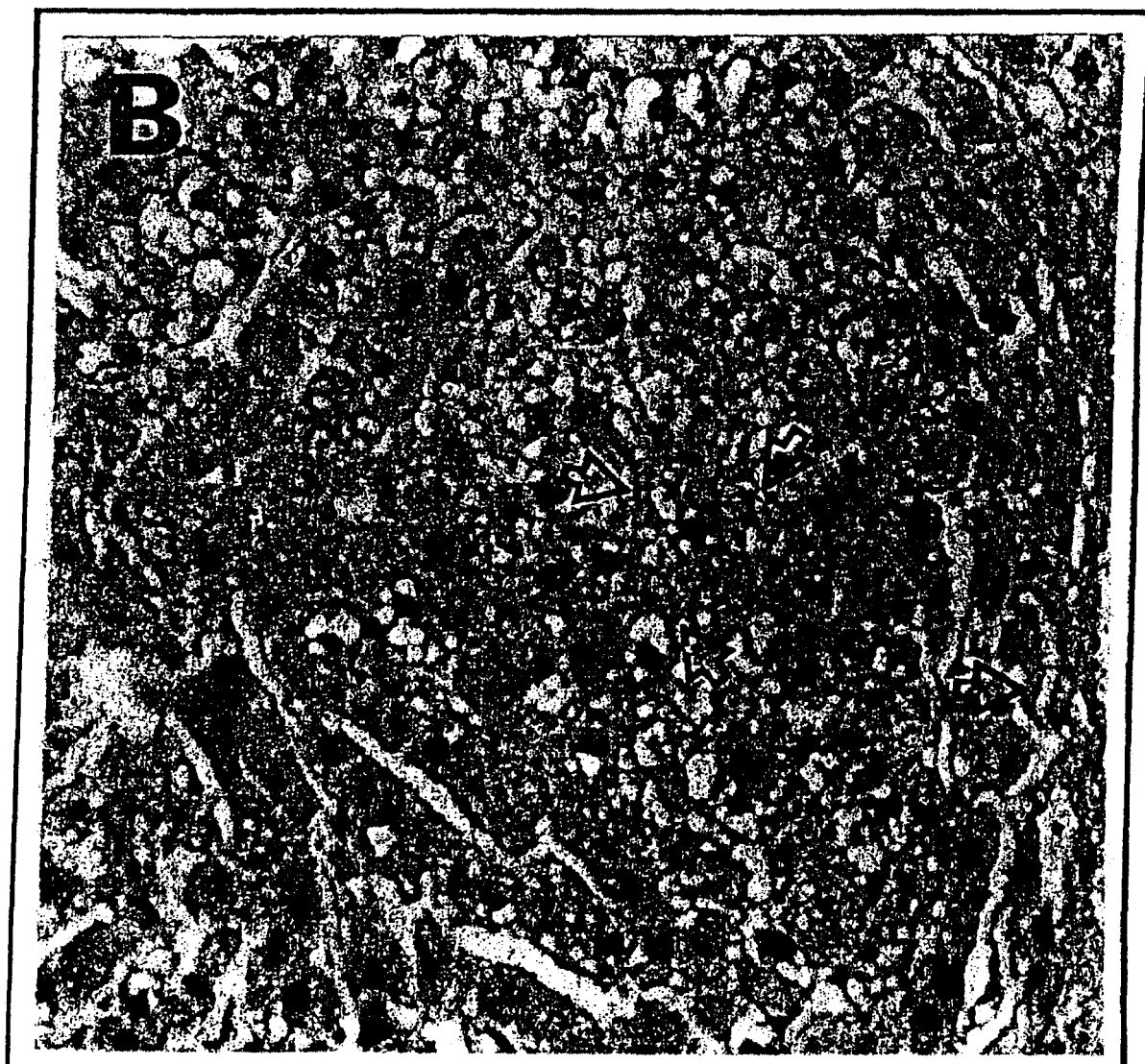
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



2a ábra



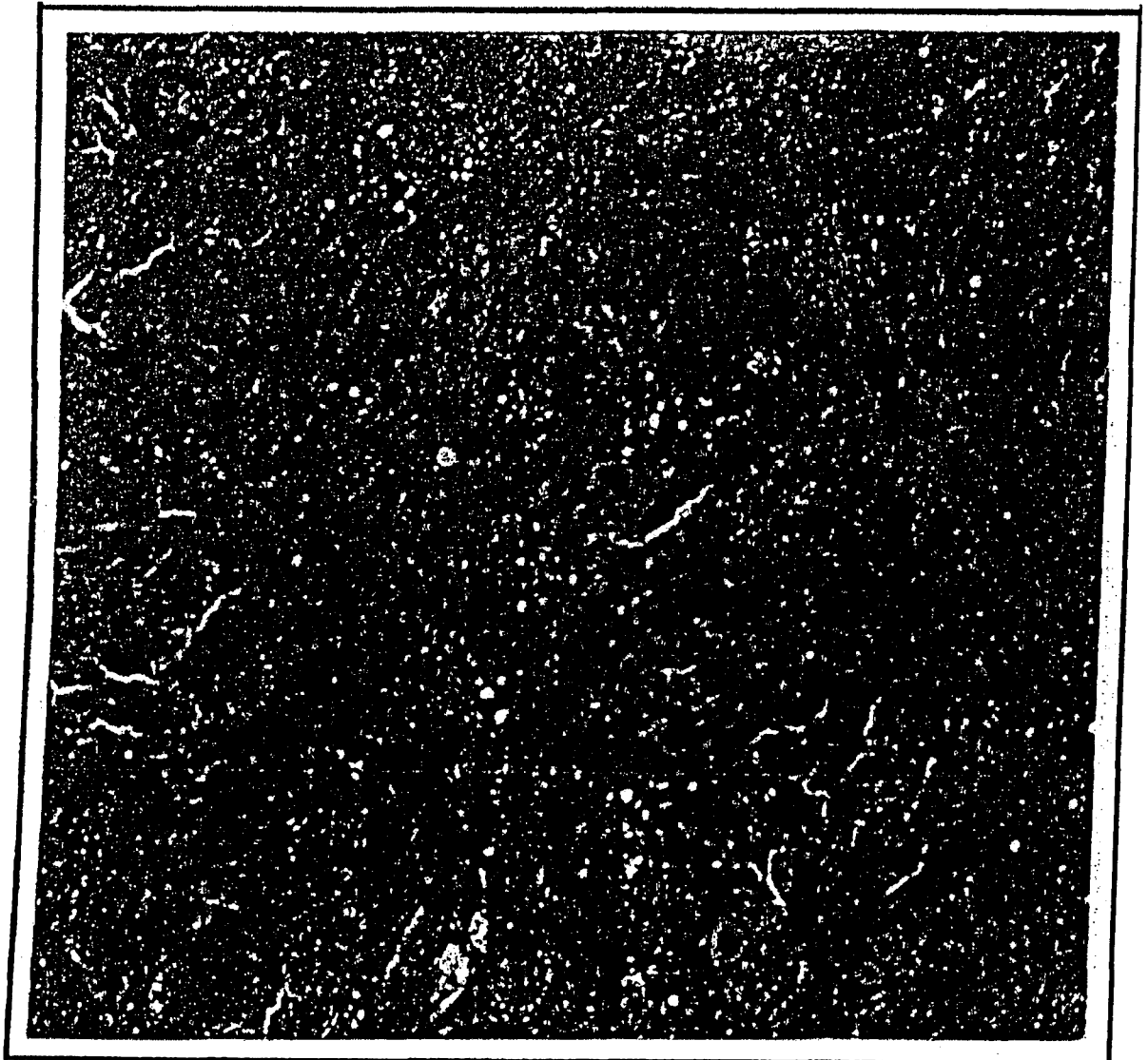
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



2b ábra



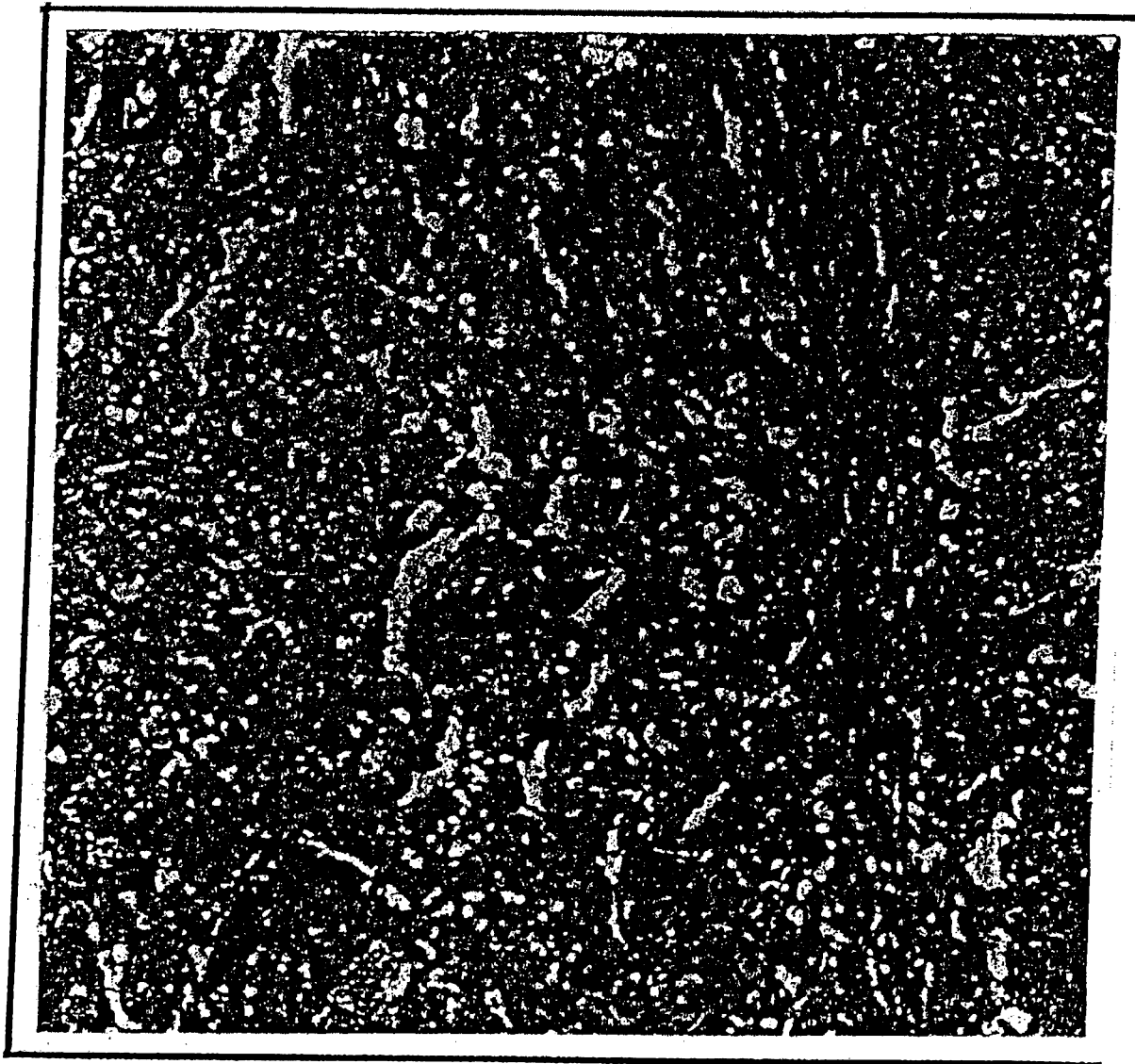
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



2c ábra



KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



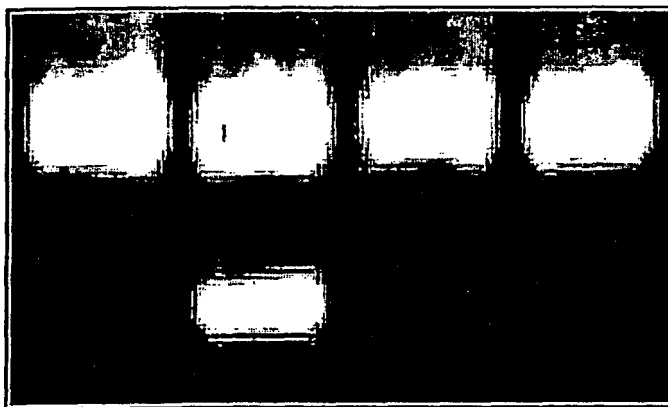
2d ábra



KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

**GAPDH**

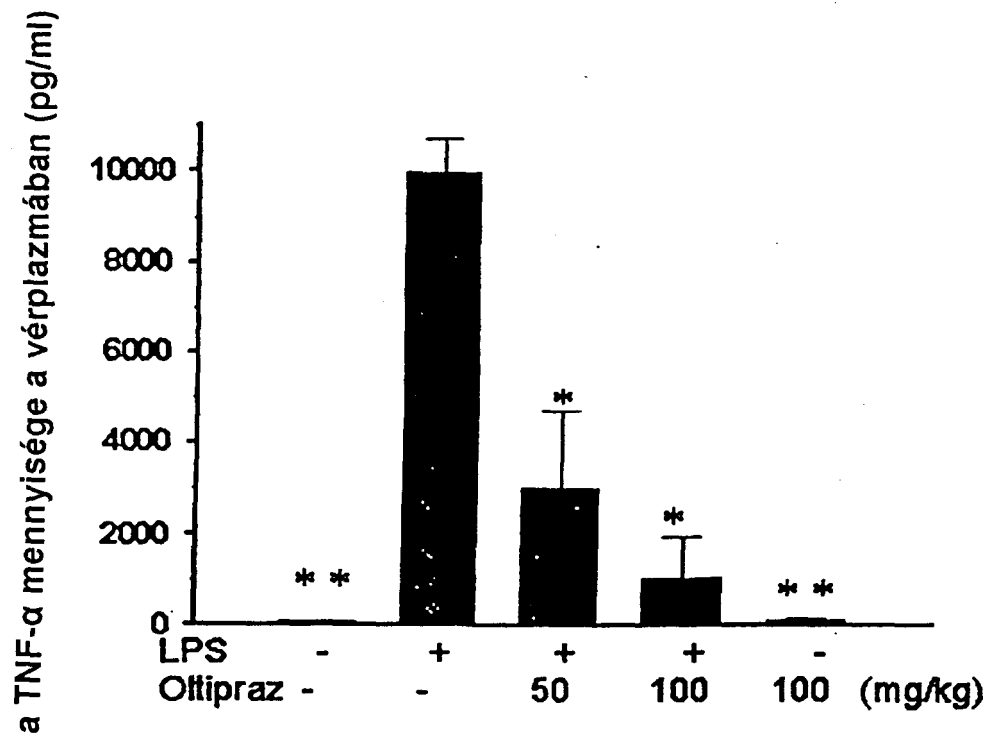
**TGF- $\beta$ 1**



kontroll DMN DMN+ Olt  
Olt

3. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



4. ábra