



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

247187

(11) (B2)

(22) Přihlášeno 18 12 84
(21) PV 9931-84

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 31/40//
C 07 D 487/22

(40) Zveřejněno 17 04 86

(45) Vydáno 16 05 88

(72) Autor vynálezu INGBERG GRELS DANIEL, HELSINGFORS, PENTTILÄ RITVA LAILA ANERI,
TOKOLA REINO OLAVI, TENHUNEN RAIMO ANTERO, HELSINKI (Finsko)

(73) Majitel patentu MEDICA PHARMACEUTICAL COMPANY LTD., HELSINKI (Finsko)

(54) Způsob výroby nového heminového komplexu

Způsob výroby nového heminového komplexu, ve vodě rozpustného, s fyziologickým účinkem pro použití v tabletách nebo kapslích nebo jako pevná látka pro přípravu injekčního materiálu k léčbě různých typů anemií, zejména těch, které jsou spojeny s porfýrií, spočívající v tom, že se krystalický hemin uvede v reakci s bazickou aminokyselinou, s výhodou L-argininem nebo L-lysinem při molárním poměru heminu a L-argininu 1:1 až 1:3 a heminu a L-lysinu 1:1 až 1:3, ve směsi organického rozpouštědla a vody, s výhodou acetonu a vody v objemovém poměru 300:10 až 300:25, s výhodou 300:20 při teplotě místnosti za energického míchání na dobu 10 až 15 hodin.

Produkt je vhodný ve formě tablet, kapslí nebo prášku pro výrobu injekcí k léčení anemií, zvláště těch, které jsou spojeny s porfýrií.

Vynález se týká způsobu výroby nového heminového komplexu, fyziologicky účinného a rozpustného ve vodě. Jde o arginát nebo lysinát heminu, který je možno užít ve formě kapslí nebo tablet nebo ve formě pevné látky, určené pro injekční podání po rekonstituci například sterilním fyziologickým roztokem chloridu sodného.

Hemin se vyskytuje v organismu jako prostetická skupina hemoglobinu ve většině cytochromů a v některých enzymech. Hemoglobin se tvoří v kostním morku. V případě, že se bílkoviny s obsahem heminu rozkládají, uvolňuje se hemin, avšak pouze malá část této látky je pak za normálních fyziologických podmínek užita k produkci nových bílkovin s obsahem heminu.

Hemin se štěpí působením oxygenázy heminu na biliverdin, který se dále redukuje na bilirubin. Nativní neporušený hemoglobin není substrátem pro působení oxygenázy heminu.

Defekty v syntéze hemoglobinu mohou být způsobeny porušením syntézy heminového nebo globinového řetězce. Syntéza heminu může být porušena z toho důvodu, že a) chybí některá ze složek, nutných pro jeho tvorbu nebo b) existuje dysfunkce enzymu, který katalyzuje tvorbu této látky.

a) Nedostatek železa je limitujícím faktorem pro syntézu heminu. Organismus dostává nutnou denní dávku železa 1 až 2 mg v potravě. Nedostatek železa může vzniknout potravou, chudou na železo nebo tak, že v potravě se vyskytují látky, vážící železo. Nedostatky vstřebávání železa mohou také vést k nedostatku železa v organismu, přestože přívod potravou je dostatečný. Bez ohledu na příčinu vede nedostatek železa dříve nebo později k chudokrevnosti.

Při avitaminose B₆, která je poměrně vzácná, je vstřebávání železa normální, avšak železo není využíváno buňkami. V důsledku toho se vyvíjí určitý typ sideroplastické anemie.

Anemie z nedostatku železa se léčí buď podáváním perorálních preparátů s obsahem železa, obvykle ve formě síranu nebo glukonátu nebo injekčním podáním sorbitolu železa. V případě, že vážne vstřebávání železa, nemá smysl podávat perorální přípravky. Železo se nedostane ani do buněk sliznice střešní.

Na rozdíl od anorganického železa je železo v heminu, kde je na hemin přímo vázáno vstřebáváno buňkami i v případě porušeného vstřebávání železa tam, kde není možno užít běžnou perorální léčbu.

Znamená to, že železo, vázané na hemin je jediným známým prostředkem pro perorální léčbu případů, které jsou jinak proti léčbě odolné. Železo, vázané na hemin se vstřebává 4-5krát lépe než anorganické železo i u zdravých lidí, jak bylo popsáno v publikaci Seppänen H a Takkunen H: Suomen Lääkärilehti 36: 2 071-2 072, 1981.

b) Syntéza heminu je regulována enzymaticky. Porušená funkce enzymů, katalyzující syntézu heminů může být buď vrozená nebo způsobená zevními příčinami. V obou případech však dochází ke snížené tvorbě heminu, což se projeví vznikem porfyria nebo některých druhů sideroplastické anemie nebo jiným onemocněním.

Porfyria je nejdůležitější skupinou onemocnění z porušené funkce enzymů. U nemocných dochází k nahromadění porfyrinů, meziproductů syntézy heminů a ke zvýšenému vyměšování těchto látek v moči a ve stolici.

Většina druhů tohoto onemocnění se projeví akutním záchvatem, který je velmi těžké zvládnout.

V některých případech se místo porfyria vytvoří sideroplastická anemie různého typu jako důsledek nesprávné funkce enzymů, které se účastní syntézy heminu. Tyto sideroplastické anemie mohou také být vrozené nebo získané.

Léčba porfyria byla až dosud založena převážně na vynechání některých látek a na podávání velkého množství uhlovodíků v průběhu akutního záchvatu, výsledky však nebyly příliš dobré. Od té doby, co vznik porfyria byl vyjasněn, došlo k podávání heminových sloučenin, například hematinu nitrožilně.

Hematin je velmi účinný při léčbě záchvatů, avšak u více než 50 % nemocných způsobuje záněty žil s trombózami. Mimoto je příliš nestálý a proto není vhodný k výrobě v průmyslovém měřítku. Je tedy zřejmé, že až dosud jsou k dispozici pro léčbu nemocných a porfyrií jen některé nedostatečné prostředky.

Vynález si klade za úkol navrhnout výrobu ve vodě rozpustné látky s obsahem heminu a železa pro léčbu některých druhů anemie, přičemž železo je v tomto případě k dispozici přímo v molekule heminu.

Tato látka by měla být především určena k léčbě porfyrie, u níž normální produkce hemoglobinu je z nějakého důvodu porušena. Protože sloučenina má být určena pro perorální podání ve formě tablet nebo kapslí, a také pro injekční podání, musí být rozpustná ve vodě.

Hemin, který je nedostatečně rozpustný ve vodě, může být získán v čisté formě z krve extrakcí kyselinou solnou nebo octovou z vodného roztoku rozrušených červených krvinek. Další způsob je založen na extrakci heminu acetonem za přítomnosti například histidylhistidinu, pilokarpinu nebo imidazolu při pH 7,0 podle publikace Wakid N. W. a Helou K. Y.: Int. J. Biochem. 4, 259 až 267, 1973.

PCT patentová přihláška č. 813 749 (PCT/F181/00026) popisuje způsob výroby ve vodě rozpustného koncentráту heminu, v němž přibližně 40 % hmotnostních je hemin a zbytek je "krevní substance" neznámé povahy. Produkt je určen pro použití v lyofilizované formě jako doplněk potravy s obsahem železa nebo jako léčivo proti chudokrevnosti.

Nevýhodou je, že výsledným produktem je směs heminu a "krevní substance". Protože druhá složka není jednotná, je směs nevhodná pro injekční podání.

Porfyria byla léčena až dosud v nemocnici připravovanou směsí, získanou tak, že hemin byl rozpuštěn ve sterilním roztoku uhlíčitanu sodného (hematin). Protože tento roztok je nestálý, nemůže být průmyslově vyráběn ve velkém měřítku.

Mimoto způsobuje hematin, jak bylo svrchu uvedeno, záněty žil s trombózou v místě injekce u přibližně 50 % případů, patrně v důsledku vysokého pH roztoku. Znamená to vážnou nevýhodu, která snižuje podstatně použitelnost uvedené látky.

Předmětem vynálezu je způsob výroby nového heminového komplexu, ve vodě rozpustného, s fyziologickým účinkem pro použití v tabletách nebo kapslích nebo jako pevná látka pro přípravu injekčního materiálu k léčbě různých typů anemií, zejména těch, které jsou spojeny s porfyrií, vyznačující se tím, že se krystalický hemin uvede v reakci s bazickou aminokyselinou, a to L-argininem nebo L-lysinem při molárním poměru heminu k L-argininu 1:1 až 1:4 a heminu k L-lysinu 1:1 až 1:4, ve směsi organického rozpouštědla a vody, s výhodou acetonu a vody v objemovém poměru 300:10 až 300:25, s výhodou 300:20 při teplotě místnosti za energetického míchání na dobu 10 až 15 hodin.

Složení rozpouštědla, zejména podíl organického rozpouštědla k vodě je velmi důležitý pro použití výsledného produktu, což je překvapující. Obsah vody ve směsi rozpouštědel je tak nízký, přibližně 7 %, že se v něm nerozpouští ani hemin ani lépe rozpustný L-arginin. Reakce probíhá za řízení pH reakčního roztoku. Vzniklý roztok se oddělí a susí.

Sloučenina s obsahem heminu se získá v suché formě a je rozpustná ve vodě, což je podstatné z lékařského hlediska a také z farmaceutického hlediska.

Molekula heminu obsahuje dvě karboxylové skupiny, které reagují s bazickými aminoskupinami L-lysinu nebo L-argininu.

Heminarginát a heminlysinát, připravené způsobem podle vynálezu, byly rozpuštěny ve vodě a bylo měřeno pH těchto roztoků a srovnáváno v různých časových intervalech a pH mechanické směsi heminu a L-argininu; rozpuštěného ve vodě. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

T a b u l k a 1

		pH		
		0 min	60 min	24 h
Heminarginát	0,02937 g/25 ml	8,22	8,22	8,22
Heminlysinát	0,02760 g/25 ml	8,10	7,97	8,13
Hemin +	0,01630 g/25 ml	10,13	9,81	9,33
L-arginin	0,01307 g/25 ml			

Výsledky měření pH ukazují, že pH heminarginátu a heminlysinátu je stálé, tj. přibližně 8 celých 24 hodin. Na druhé straně pH mechanické směsi pomalu klesá, patrně v důsledku pomalé reakce mezi karboxylovými skupinami heminu a aminoskupinou L-aminokyseliny.

Z tohoto důvodu není možno pouhým smísením získat produkt, vhodný pro léčbu. Heminarginát a heminlysinát, připravené způsobem podle vynálezu jsou komplexní sloučeniny, v nichž L-aminokyselina reagovala s karboxylovými skupinami heminu.

Aby bylo možno zjistit optimální molární vztah mezi oběma složkami a nejvýhodnější složení rozpouštědla, byly prováděny s heminem a argininem následující pokusy:

Do reakce byly uvedeny krystalický hemin a L-arginin v molárních poměrech 1:2 a 1:3 za energického míchání v rozpouštědle, které sestávalo z organického rozpouštědla a vody v různých poměrech. Vytvořené sraženiny byly odfiltrovány, promyty a usušeny.

Rozpustnost ve vodě byla stanovena rozpuštěním a mícháním po 1 hodinu celkem 1,0 g heminarginátu, získaného v každém pokusu v 50 ml destilované vody.

Roztoky byly odstředěny při přibližně 3 500 otáčkách za minutu, zbytek byl promyt 10 ml destilované vody a 10 ml acetonu a pak byl usušen a zvážen. Nerozpustný zbytek sestával převážně z nezreagovaného heminu. Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny v následující tabulce 2.

T a b u l k a 2

Hemin : L-argininu					
Hmotnost (g)	Molární podíl	Rozpouštědlo	ml	Teplota °C	Zbytek
6,52:3,48	1:2	methanol	300	20	dehet
6,52:3,48	1:2	ethanol	300	20	≈100%
6,52:5,22	1:3	ethanol	300	40	20,2%
6,52:3,48	1:2	isopropanol	300	20	≈100%
6,52:3,48	1:2	isopropanol/voda	300:20	20	21,2%
6,52:5,22	1:3	isopropanol/voda	300:20	20	9,7%
6,52:3,48	1:3	aceton/voda	300/15	20	16,8%
6,52:3,48	1:2	aceton/voda	300/20	20	12,4%
6,52:5,22	1:3	aceton/voda	300:10	20	≈100%
6,52:5,22	1:3	aceton/voda	300:10	40	11,4%
6,52:5,22	1:3	aceton/voda	300:15	20	8,3%
6,52:5,22	1:3	aceton/voda	300:20	20	0,3%

pokračování tabulky 2

Hemin : L-argininu

Hmotnost (g)	Molární podíl	Rozpouštědlo	ml	Teplota °C	Zbytek
6,52:5,22	1:3	aceton/voda	300:30	20	dehet
6,52:5,22	1:3	aceton/voda	150:10	20	4,2%
6,52:5,22	1:3	aceton/voda	150:12,5	20	dehet

Dentovitá látka, která se tvořila v některých pokusech, nemohla být převedena na práškovitou formu.

Prakticky nejpoužitelnější molární podíl heminu k argininu je patrně 1:3 a nejvýhodnější směsí rozpouštědel je 300 ml acetonu a 20 ml vody, protože hemin potřebuje malý přebytek L-argininu, aby reakce správně proběhla.

Místní účinek nitrozilně podaných heminových sloučenin na okolní tkáň byl sledován tak, že 5 ml/kg bylo podáno do ušní žíly králíků (California White). Jako referenční roztok byl užit běžný roztok heminkarbonátu (hematin).

Po infuzi heminarginátu zůstala okolní tkáň normální, to znamená, že nedošlo ke sterilnímu zánětu (tromboflebitidě).

Podobné výsledky bylo možno pozorovat po infuzi odpovídajícího roztoku heminlysinátu. Je tedy možno uzavřít, že tyto látky při nitrozilním podání nezpůsobují tromboflebitidu.

V případech, že byl podán stejným způsobem heminkarbonát, zčervenala kůže v okolí žíly a byla podrážděná, došlo ke sterilnímu zánětu (tromboflebitidě). Tři dny po vstříknutí roztoku heminkarbonátu tento stav ještě setrval.

Fyziologické vlastnosti různých ve vodě rozpustných heminových sloučenin byly sledovány zkoumáním schopnosti heminoxygenázy štěpit tyto látky. Fyziologickým substrátem pro uvedený enzym je methemalbumin, který se štěpí na biliverdin, který je dále redukován na bilirubin biliverdinreduktázou.

To znamená, že přebytečný hemin, který organismus nemůže využít se rozkládá především heminoxygenázou až na bilirubin a další příbuzné látky, které se pak normálním způsobem vyměšují. Limitujícím enzymem je tedy heminoxygenáza.

Při našich enzymatických analýzách byla účinnost methemalbuminu vyjádřena jako 100, aby bylo možno zjistit schopnost heminarginátu a heminlysinátu sloužit jako substráty pro heminoxygenát. Odpovídající hodnota pro heminarginát a heminlysinát bylo 106. Účinnosti ostatních heminových aminových derivátů, v nichž aminovou složkou byl diethanolamin, ethylamin, cyklohexylamin nebo piperidin, bylo 13, 21, 31 a 78.

Je tedy zřejmé, že obě svrchu uvedené látky, tj. heminarginát a heminlysinát se chovají v organismu vzhledem k heminoxygenáze jako normální fyziologické sloučeniny.

Vynález bude objasněn následujícími příklady.

P ř í k l a d 1

6,52 g (0,01 ml) krystalického heminu a 3,48 g (0,02 moly) krystalického L-argininu se energicky míchá 10 až 15 hodin v kádince, opatřené mechanickým míchadlem a obsahující 300 ml acetonu a 20 ml vody. Vzniklý produkt se odfiltruje, promyje acetonem a suší.

Tímto způsobem se ve výtěžku 95 % získá 9,5 g heminarginátu jako pevná látka. Nerozpustný podíl, stanovený svrchu uvedeným způsobem je 0,13 g (14 %).

P ř í k l a d 2

6,52 g (0,01 mol) krystalického heminu a 4,35 g (0,025 mol) krystalického L-argininu se zpracovává způsobem podle příkladu 1.

Tímto způsobem se ve výtěžku přibližně 100 % získá 11,1 g heminarginátu. Nerozpustný podíl je 0,042 g (4,2 %).

P ř í k l a d 3

6,52 g (0,01 mol) krystalického heminu a 5,23 g (0,03 mol) krystalického L-argininu se zpracovává způsobem, který byl popsán v příkladu 1.

Tímto způsobem se ve výtěžku přibližně 102 % získá 12,0 g heminarginátu. Nerozpustný podíl je 0,001 g (0,1 %).

P ř í k l a d 4

6,52 g (0,01 mol) krystalického heminu a 6,10 g (0,035 mol) krystalického L-argininu se zpracovává způsobem, který byl svrchu popsán v příkladu 1.

Tímto způsobem se ve výtěžku 95 % získá celkem 12,0 g výsledného heminarginátu. Mimoto se získá 0,0005 g (1,05 %) výsledného nerozpustného podílu.

P ř í k l a d 5

6,52 g (0,01 mol) krystalického heminu a 4,39 g (0,03 mol) krystalického L-lysinu se zpracovává způsobem podle příkladu 1.

Tímto způsobem se ve výtěžku 99 % získá 10,8 g heminu lysinátu. Nerozpustný podíl je 0,020 g (2,8 %).

Je zřejmé, že optimální molární podíl heminu k arginátu je 1:3 jako v příkladu 3, protože v tomto případě se získá nejvyšší výtěžek heminarginátu a nejnižší množství nerozpustného podílu.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby nového heminového komplexu, ve vodě rozpustného, s fyziologickým účinkem pro použití v tabletách nebo kapslích nebo jako pevná látka pro přípravu injekčního materiálu k léčbě různých typů anemií, zejména těch, které jsou spojeny s porfyrií, vyznačující se tím, že se krystalický hemin uvede v reakci s bazickou aminokyselinou, a to L-argininem nebo L-lysinem při molárním poměru heminu k L-argininu 1:1 až 1:4 a heminu k L-lysinu 1:1 až 1:4, ve směsi organického rozpouštědla a vody, s výhodou acetonu a vody v objemovém poměru 300:10 až 300:25, s výhodou 300:20 při teplotě místnosti za energického míchání na dobu 10 až 15 hodin.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že molární podíl heminu k L-argininu se pohybuje v rozmezí 1:2 až 1:4, s výhodou je 1:3.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že molární podíl heminu k L-lysinu je 1:3 až 1:4, s výhodou je 4:3.