



NORGE

(19) [NO]

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) Nr. 161909

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

(51) Int. Cl.⁴ C 07 C 101/24, C 07 D 233/64

(83)

(21) Patentsøknad nr. **830618**

(22) Inngivelsesdag 22.02.83

(24) Løpedag 22.02.83

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Int. inngivelsesdag og int. søknads nr. -

(85) Videreføringsdag -

(41) Alment tilgjengelig fra 24.08.83

(44) Utlegningsdag 03.07.89

(71)(73) Søker/Patenthaver **SOLVAY & CIE (SOCIETE ANONYME)**,
33, rue du Prince Albert,
B-1050 Brussel,
Belgia.

(72) Oppfinner **JACQUES LAMMERANT**, Namur,
JAROSLAW KOLANOWSKI,
Wezembeek-Oppem,
Belgia.

(74) Fullmektig Siv.ing. Sigrun E. Græsbøll,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 23.02.82, FR, nr. 8203100.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **ANALOGIFREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV FARMASØYTISK
ANVENDELIGE SALTER AV 3-HYDROKSY-BUTANSYRE.**

(57) Sammendrag Farnasøytiske preparater som inneholder 3-hydrokxy-
butansyre eller et salt som er avledet fra denne syre,
såsom et natriumsalt eller alternativt et salt avledet
fra en organisk nitrogenbase såsom et amin. Aminet
kan være en aminosyre av naturlig opprinnelse, såsom
arginin.

Preparatene og forbindelsene i henhold til opp-
finnelsen kan anvendes for profylaktisk eller
helbredende behandling av kardiomyopati av ikke-
ischaemisk og ischaemisk opprinnelse.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en analogifremgangsmåte for fremstilling av farmasøytiske forbindelser for metabolsk beskyttelse av myokardiet i tilfeller med sykdommer så som kardimyopati av ischaemisk eller ikke-ischaemisk opprinnelse.

Forbindelsene som fremstilles i henhold til oppfinnelsen er salter av 3-hydroksybutansyre avledet fra en aminosyre av naturlig opprinnelse som inneholder minst 2 nitrogengrupper pr. karboksylgruppe.

Fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen er karakterisert ved at 3-hydroksybutansyre blir omsatt med en aminosyre av naturlig opprinnelse som inneholder minst 2 nitrogengrupper pr. karboksylgruppe.

Gode resultater kan oppnås med salter som er avledet fra aminosyrer som har minst 2 nitrogengrupper pr. karboksylgruppe og som er i L-isomer form, og mer spesielt med saltene som er avledet fra L-lysin, L-histidin og L-arginin. De beste resultater er blitt oppnådd med saltene som er avledet fra L-arginin. Forbindelsene som er beskrevet ovenfor er foretrukket i farmasøytiske preparater.

3-hydroksybutansyren som inngår i slike preparater og som salter er avledet fra, og også forbindelsene selv, kan være forskjellige isomere former så som L(+)- og racemiske former. Denne syre er imidlertid fortrinnsvis i den D(-)-isomere form. 3-hydroksybutansyren kan oppnås ved hvilken som helst kjent syntesemetode, så som direkte kjemiske eller biokjemiske synteser. D(-)-3-hydroksybutansyren kan fordelaktig oppnås ved depolymerisering av naturlige polymerer som er ekstrahert fra biomasser, ved den fremgangsmåte som er beskrevet i den europeiske patentsøknad 43.620.

Saltene av 3-hydroksybutansyre og den beskrevne aminosyre kan fremstilles på hvilken som helst egnet måte. Med hensyn til salter som er avledet fra 3-hydroksybutansyren i D(-)- eller L(+)-isomere former så består den foretrukne fremgangsmåte i å omsette 3-hydroksybutansyren med aminosyren i et egnet løsningsmiddel, så som vann, og ved en temperatur på mellom 20 og 80°C og fortrinnsvis mellom 30 og 50°C. For å utføre dette er den vanlige metode å anvende medier som inneholder 3-hydroksybutansyren og aminosyren av naturlig opprinnelse i ekvimolare mengder eller i slike mengder at 3-hydroksybutansyren er i svakt

overskudd i forhold til den støkiometriske mengde, under kraftig røring og ved et trykk av størrelsesorden som atmosfæretrykk. Konsentrasjonene av de anvendte medier varierer mellom 0,5 og 8 molar med hensyn til 3-hydroksybutansyren og aminosyren, og denne konsentrasjon er fortrinnsvis mellom 1 og 6 molar. Slutten av omsetningen er karakterisert ved fortykning eller størkning av reaksjonsblandingen. Saltene kan så utvinnes ved vanlige fremgangsmåter, så som inndampning av løsningsmidlet, og saltene blir oppnådd i fast form. De kan så, om passende, utsettes for én eller flere omkrystalliseringer.

Forbindelsene som fremstilles i henhold til oppfinnelsen kan anvendes som legemidler, og spesielt til behandling og forebyggelse av metabolske sykdommer i myokardiet ved medisinsk behandling av mennesker og i veterinærmedisin. I dette tilfelle er de fortrinnsvis for anvendelse som et farmasøytisk middel bestemt for innvortes behandling. Videre kan slike preparater anvendes til behandling eller forebygging av andre sykdommer, f.eks. sykdommer som skyldes mangler i metabolismen av ketonsubstanser eller epilepsi.

Forbindelsene som fremstilles i henhold til oppfinnelsen kan blandes med tilsetningsadditiver som muliggjør at de kan administreres bekvemt, f.eks. i form av pulver, tabletter, kapsler, belagte tabletter, piller, granuler, suppositorier, gelatinkapsler, ampuller, siruper, emulsjoner, løsninger eller suspensjoner. Disse additiver kan være bærere eller ikke-toksiske løsningsmidler som vanligvis anvendes i farmasien, f.eks. vann, organiske løsningsmidler av paraffinisk type, og vegetabilske og alifatiske alkoholiske oljer, uorganiske salter og vanlige fyllstoffer, emulgeringsmidler av polyoksyalkylen-typen eller av den aromatiske eller alifatiske sulfonat-type, cellulosederivater, stivelse, dispergeringsmidler, smøremidler, f.eks. stearinsyresalter eller talk, bindemidler og vanlige søtningsmidler eller aromamidler.

De farmasøytiske preparater som forbindelser fremstilt i henhold til oppfinnelsen inngår i, inneholder vanligvis mellom 1 og 99 vekt% av én eller flere slike forbindelser. De kan administreres for behandling eller forebyggelse av metabolske forstyrrelser i myokardiet hos alle pattedyr, men spesielt mennesker, i form av én eller flere "dosisenheter" eller "administrasjonsdoser" i en farmasøytisk effektiv mengde.

Uttrykket "dosisenhet" eller "administrasjonsdose" er ment å bety en enhetsdose som kan administreres til en pasient og som lett kan behandles og pakkes, mens den blir værende i form av en fysikalsk stabil enhetsdose som inneholder den aktive ingrediens alene eller i blanding med faste eller flytende farmasøytiske fortynningsmidler eller bærere.

Forbindelsene som fremstilles i henhold til oppfinnelsen kan spesielt formuleres for oral administrasjon, rektal administrasjon, administrasjon ved intras Muskulær injeksjon eller administrasjon ved intravenøs perfusjon.

Dersom de er bestemt for oral administrasjon i fast form, kan preparatene inneholde opp til 5g av 3-hydroksybutansyre pr. administrasjonsdose. Vanligvis inneholder dosene mellom 0,1 og 3g, og fortrinnsvis mellom 0,5 og 2g, med 3-hydroksybutansyre eller en ekvivalent mengde av salt.

De preparater som foreligger i flytende form og er bestemt for oral administrasjon, kan være løsninger, emulsjoner eller suspensjoner, hvilke kan være eller ikke være sirupaktige. Den mengde av 3-hydroksybutansyre, eller salt ledet derfra, som de vanligvis inneholder, er i alminnelighet mellom 1 og 750g, og fortrinnsvis mellom 10 og 500g pr. liter væske.

Dersom de er bestemt for administrasjon ved intramuskulær injeksjon, kan preparatene være tillaget (formulert) under sterile forhold, i konsentrert form eller en form som er klar for bruk, slik at de vanligvis inneholder minst 0,05 vekt%, og fortrinnsvis mellom 0,1 og 30 vekt%, av 3-hydroksybutansyre, idet den maksimale konsentrasjon blir fastsatt med isotonisiteten med blodserumet. Når det dreier seg om argininsaltet av D(-)-3-hydroksybutansyre, er de foretrukne konsentrasjoner i væsken som er klar for injeksjon, mellom 1 og 45g pr. liter væske. I det tilfellet hvor det blir brukt hypotoniske formuleringer, kan isotonisiteten oppnås ved å inkorporere midler som er kjent for dette formål, så som natriumklorid eller dekstrose. Formuleringene kan også inneholde sterile fortynningsmidler så som vann, ikke-flyktige oljer, polyetylenglykoler, glycerol og polypropylen-glycoler, antibakterielle midler så som benzylalkohol, anti-oksydanter så som askorbinsyre og natriumbisulfitt, chelateringsmidler og puffere så som acetater, citrater eller fosfater, som er fysiologisk forlikelige.

Formuleringene bestemt for administrasjon ved intramuskulær injeksjon, kan pakkes på hvilken som helst av de vanlige måter og kan spesielt tilbys i glass- eller plast-ampuller eller sprøyter som skal kastes etter bruk.

Preparater av forbindelser fremstilt ved oppfinnelsen og som er bestemt for administrasjon ved intravenøs perfusjon, kan også lages ved anvendelse av de teknikker og additiver som vanligvis anvendes på dette området. Konsentrasjonene av 3-hydroksybutansyre, eller av salt avledet derfra, i slike preparater er vanligvis ikke høyere enn 0,001 vekt%. Når det dreier seg om D(-)-3-hydroksybutansyresaltet avledet fra arginin, varierer disse konsentrasjoner vanligvis mellom 0,05 og 45g, og fortrinnsvis mellom 0,1 og 35g, pr. liter væske.

De farmasøytiske preparater kan inneholde andre bestanddeler som er aktive mot sykdommer i det kardiaale system eller i blodsirkulasjonen. Blant disse aktive bestanddeler kan f.eks. nevnes kardiotoniske heterosider, glukokortikoider, beta-blokkere, kalsiumantagonister, midler som gjør det mulig å nedsette blodtrykket, antiarrytmiske midler og antikoaguleringsmidler, forutsatt at der er forlikelighet.

De farmasøytiske preparater kan anvendes til metabolsk beskyttelse av myokardiet ved profylaktiske eller helbredende behandlinger, spesielt når det dreier seg om intense fysiske aktiviteter, så som sportsaktiviteter eller energetiske beskjeftigelser, som medfører overdrevent oksygenforbruk i et angivelig normalt hjerte, ved kardiomyopati av ikke-ischaemisk opprinnelse, ved kardiomyopati av ischaemisk opprinnelse, så som angina pectoris eller myokardial infarkt, ved myokardial ischaemia som kommer av sammenbrudd i det koronare perfusjonstrykk, så som iaktatt ved tilstander med sirkulerende sjokk på grunn av blødning, og vanligvis ved en hver situasjon med adrenergisk utløp, så som iaktatt ved tilstander av stress eller ved alvorlig trauma.

Virkemåten til forbindelsene fremstilt ved oppfinnelsen viser seg å være særegen ny. Hittil har det i virkeligheten vært vanlig å overvinne utilstrekkelig tilveiebringelse av oksygen til myokardiet, på grunn av myokardial ischaemia, ved å redusere kraftforbruket som blir utøvet. Nå har forsøk på hunder utført med preparater av forbindelser fremstilt ved oppfinnelsen vist

at de mekaniske påvirknings-indekser til hjertet, så som forholdet mellom gjennomsnittlig aortisk trykk og det myokardiale oksygenforbruk er forbedret. Dosene som skal administreres daglig kan varieres innen vide grenser, men blir vanligvis beregnet slik at de representerer 0,001 og 1g av 3-hydroksybutansyre, eller salt avledet derfra, pr. kg av vekten. Den foretrukne daglige dose er mellom 0,005 og 0,5g/kg.

Oppfinnelsen blir belyst av de følgende eksempler.

Eksempel

Fremstilling av L(+)-argininsaltet av D(-)-3-hydroksybutansyre

1 kg av en vandig løsning inneholdende 593 g (5,7 mol) av D(-)-3-hydroksybutansyre blir innført i en sylindrisk reaktor som er forsynt med en kappe som gjør det mulig å avkjøle eller oppvarme reaktoren, har en høyde på 30 cm og en diameter på 11 cm og er forsynt med en rører som har 4 blad dekket med polyvinylidenfluorid. Alt sammen blir rørt kraftig og 960 g av L(+)-arginin blir innført i løpet av 5 minutter. Når temperaturen i reaksjonsblandingen når 45°C, blir blandingen avkjølt ved å sirkulere vann ved 20°C gjennom kappen, mens det samtidig fortsettes med å røre blandingen. En gradvis fortykning av suspensjonen blir iakttatt, og blandingen størkner til sist 15 minutter etter at innføringen av L(+)-arginin har opphørt. Det faste stoff blir så utvunnet og tørker til konstant vekt i en vakuumnovn ved 50°C. Til sist blir et L(+)-argininsalt av D(-)-3-hydroksybutansyre utvunnet, hvilket har et smeltepunkt på mellom 100 og 105°C og en optisk rotasjon $[\alpha]_D^{27^\circ}$ på 2,32°, målt med en vandig løsning som har en konsentrasjon på 4,60 g/100 ml, ved 27°C.

Forsøk 1

Dette forsøk blir utført for sammenligning på 6 hunder, identifisert som A, B, C, D, E og F, hvis kjønn og vekt er angitt i tabell I nedenfor, som er bedøvet ved subkutan injeksjon av 2 mg/kg av morfin. Det blir administrert 30 mg/kg av nembutal, og hundene blir holdt under kunstig åndedrett ved hjelp av en Starling-pumpe. Det aortiske trykk, det myokardiale oksygen-

forbruk, oksygen-partial-trykket i det koronare vene-blod, den koronare strømming i den aortiske pH blir målt, sammen med det myokardiale forbruk av laktat, glukose, frie fettsyrer og 3-hydroksybutanoat. De gjennomsnittlige verdier som ble iaktatt, er angitt i tabell III nedenfor.

Tabell I

Hund	Kjønn	Vekt i kg
A	Hankjønn	24,5
B	Hankjønn	29
C	Hankjønn	38
D	Hunkjønn	25
E	Hunkjønn	24
F	Hankjønn	26,5

Forsøk 2

Dette forsøk blir også utført for sammenligning.

De 6 hundene fra forsøk 1, holdt under de ovennevnte forhold med hensyn til bedøvelse, blir utsatt for adrenergisk stimulasjon ved intravenøs infusjon av noradrenalin med de doser og i de perioder som er angitt i tabell II nedenfor.

Tabell II

Hund	Mengde av noradrenalin i ng/kg, min.	Periode i min.
A	400	15
B	1.000	15
C	400	20
D	400	10
	800	10
E	400	10
	800	10
	1.600	10
F	1.000	15

De samme parametere blir målt som i forsøk 1, og de gjennomsnittlige verdier av disse målinger er gitt i tabell III nedenfor.

Forsøk 3

Dette forsøk blir utført ved anvendelse av et preparat inneholdende en forbindelse fremstilt i henhold til oppfinnelsen.

Forsøk 2 blir gjentatt på de samme hunder, bortsett fra at dyrene mottar en intravenøs infusjon av natriumsaltet av D(-)-3-hydroksybutansyre i en grad av 80 μmol pr. kg legemsvekt og pr. minutt.

De gjennomsnittlige verdier for de målte parametere er angitt i tabell III nedenfor.

Tabell III

Parameter	Forsøk		
	1	2	3
Aortisk trykk i mm Hg	106	122	136
Myokardialt oksygen-forbruk i ml/100 g, min.	8,1	13,8	12,5
Oksygen-partial-trykk i det koronare vene-blod i mm Hg	22,9	24,4	24,4
Koronar strøm i ml/100 g, min.	82	120	131
Aortisk pH	7,401	7,338	7,392
Konsentrasjon av 3-hydroksybutanoat i det arterielle plasma i millimol ‰	0,02	0,13	5,97
Myokardialt forbruk av			
- laktat i $\mu\text{mol}/100\text{ g, min.}$	18	0	0
- glukose i $\mu\text{mol}/100\text{ g, min.}$	8	0	0
- frie fettsyrer i $\mu\text{mol}/100\text{ g, min.}$	6	16	10
- 3-hydroksybutanoat i $\mu\text{mol}/100\text{ g, min.}$	0,2	2,3	73

En sammenligning av resultatene i tabell III viser at administrasjonen av natriumsaltet av D(-)-3-hydroksybutansyre forårsaker en reduksjon i det virkelige oksygenforbruk i myokardiet utsatt for adrenergisk utløp (sammenligning av forsøkene 2 og 3) og en økning i forholdet mellom det aortiske trykk og oksygenforbruket, som blir høyere (sammenligning av forsøkene 2 og 3) og nærmer seg verdiene målt forøvrig (sammenligning av forsøkene 1 og 3).

Resultatene viser også at assimilasjonen av de frie fettsyrer avtar i favør av 3-hydroksybutanoatet (sammenligning av forsøkene 2 og 3) og nærmer seg verdiene observert med det ikke-stimulerte myokardium (sammenligning av forsøkene 1 og 3).

Endelig blir den metabolske syredose bremsset ved det adrenergiske utløp korrigert (sammenligning av forsøkene 1, 2 og 3).

Forsøk 4 til 6

Forsøkene beskrevet ovenfor blir gjentatt på en hann-hund som veier 28 kg, men med stimulering forårsaket av intravenøs infusjon av 200 ng/kg, min. av noradrenalin i 25 minutter, og ved intravenøs administrasjon av 40 μ mol/kg, min. av L-argininsaltet av D(-)-3-hydroksybutansyren fra eksempel 1. Parameterne målt under forløpet av forsøket (forsøk 6) og under forløpet av sammenligningsforsøkene utført i fravær av stimulering og behandling (forsøk 4), og ved å bevirke stimulering men ikke behandling (forsøk 5), er angitt i tabell IV nedenfor.

Tabell IV

Parameter	Forsøk		
	4	5	6
Aortisk trykk i mm Hg	94	132	94
Myokardialt oksygen-forbruk i ml/100 g, min.	8,9	13,4	6,9
Oksygen-partial-trykk i det koronare vene-blod i mm Hg	15,3	17,8	14,7
Koronar strøm i ml/100 g, min.	70	104	56
Aortisk pH	7,390	7,355	7,391
Konsentrasjon av 3-hydroksybutanoat i det arterielle plasma i millimol O/OO	0,02	0,02	1,95
Myokardialt forbruk av			
- laktat i $\mu\text{mol}/100 \text{ g, min.}$	28,6	37,0	19,8
- glukose i $\mu\text{mol}/100 \text{ g, min.}$	22,4	21,7	4,6
- frie fettsyrer i $\mu\text{mol}/100 \text{ g, min.}$	2,4	10,7	1,8
- 3-hydroksybutanoat i $\mu\text{mol}/100 \text{ g, min.}$	0,2	0,3	24,1

En sammenligning av resultatene i tabell IV viser at administrasjonen av argininsaltet av D(-)-3-hydroksybutansyre (forsøk 6) gjør det mulig å redusere det virkelige oksygenforbruk i myokardiet utsatt for adrenergisk stimulering under de verdier som er målt med og uten adrenergisk stimulering (sammenligning av forsøkene 4 og 5), og også øke forholdet mellom det aortiske trykk og oksygenforbruket.

Resultatene viser også at assimilasjonen av de frie fettsyrer er normalisert og at blodets pH blir holdt ved normale verdier (forsøkene 4, 5 og 6).

Dessuten viser en sammenligning av verdiene i tabellene III og IV (forsøkene 3 og 6) at saltene som er avledet fra arginin har fordel overfor natriumsaltene ved stabilisering av det aortiske trykk med verdier som er identiske med dem målt i fravær av adrenergisk stimulering (forsøkene 1 og 4).

Forsøk 7 til 9

Forsøkene beskrevet i eksempel 2 blir gjentatt, men de blir utført på 10 hunder som har en gjennomsnittlig legemsvekt på ca. 29 kg, og med stimulering fremkalt ved hjelp av en gjennomsnittlig infusjon i det venstre ventrikulære hulrom på 500 ng/kg, min. med noradrenalin i 20 minutter, og ved intravenøs administrasjon av 80 $\mu\text{mol/kg}$, min. av L-argininsaltet av D(-)-3-hydroksybutansyren fra eksempel 1. Gjennomsnittet av de 10 verdier som ble målt under forløpet av forsøket (forsøk 9) og under forløpet av sammenligningsforsøkene utført i fravær av stimulering og behandling (forsøk 7), og ved å bevirke stimuleringen men ikke behandlingen (forsøk 8), er angitt i tabell V nedenfor.

Tabell V

Parameter	Forsøk (gjennomsnitt av 10 verdier)		
	7	8	9
Aortisk trykk i mm Hg	124	141	136
Myokardialt oksygen-forbruk i ml/100 g, min.	8,5	12,3	8,9
Oksygen-partial-trykk i det koronare vene-blod i mm Hg	20,3	21,4	21,0
Koronar strøm i ml/100 g, min.	79	96	79
Aortisk pH	7,396	7,333	7,344
Konsentrasjon av 3-hydroksybutanoat i det arterielle plasma i millimol O/OO	0,04	0,11	8,30
Myokardialt forbruk av			
- laktat i $\mu\text{mol}/100 \text{ g, min.}$	12,0	4,9	2,2
- glukose i $\mu\text{mol}/100 \text{ g, min.}$	14,4	4,7	2,8
- frie fettsyrer i $\mu\text{mol}/100 \text{ g, min.}$	4,4	16,9	5,5
- 3-hydroksybutanoat i $\mu\text{mol}/100 \text{ g, min.}$	0,7	1,8	35,8

En sammenligning av resultatene i tabell V viser at administrasjonen av arginin-saltet av D(-)-3-hydroksybutansyre (forsøk 9) gjør det mulig å redusere det virkelige oksygenforbruk i myokardiet utsatt for adrenergiske stimulasjoner, i forhold til verdiene målt med adrenergisk stimulasjon men uten administrasjon av saltet av D(-)-3-hydroksybutansyre (sammenligning med forsøk 8).

Forsøk 1 : Som en løsning for oral administrasjon

Argininsalt av D(-)-3-hydroksybutansyre	20 g
Essens av peppermynte	0,4 g
Sakkarin	0,1 g
Destillert vann	<u>400 g</u>
	420,5 g

Argininsaltet av D(-)-3-hydroksybutansyre blir blandet med essensen av peppermynte og sakkarinet, det hele blir oppløst i vannet og løsningen blir innført i flasker på 500 cm³.

Forsøk 2 : Løsning for intravenøs perfusjon

Argininsalt av D(-)-3-hydroksybutansyre	70 g
Destillert vann	<u>930 g</u>
	1000 g

Argininsaltet blir oppløst i det destillerte vann og løsningen blir innført i løsningsposer på 1000 cm³ under sterile forhold.

P a t e n t k r a v

1. Analogifremgangsmåte for fremstilling av farmasøytisk anvendelige salter av 3-hydroksybutansyre, avledet fra en aminosyre av naturlig opprinnelse som inneholder minst 2 nitrogen-grupper pr. karboksylgruppe, k a r a k t e r i s e r t v e d at 3-hydroksybutansyre blir omsatt med en aminosyre av naturlig opprinnelse som inneholder minst 2 nitrogengrupper pr. karboksylgruppe.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som aminosyre anvendes L-arginin.

3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som aminosyre anvendes L-lysin eller L-histidin.

4. Fremgangsmåte som angitt i hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at 3-hydroksybutansyre omsettes i sin D(-)-isomere form.