



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 602 23 670 T2 2008.03.06

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 385 498 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 602 23 670.3

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/CA02/00535

(96) Europäisches Aktenzeichen: 02 761 857.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2002/083120

(86) PCT-Anmeldetag: 18.04.2002

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 24.10.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 04.02.2004

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 21.11.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 06.03.2008

(51) Int Cl.⁸: A61K 31/20 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

284458 P 18.04.2001 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(73) Patentinhaber:

ProMetic BioSciences Inc., Mont-Royal, Quebec, CA

(72) Erfinder:

GAGNON, Lyne, Laval, Quebec H7M 3E5, CA;
BARABE, Jean, Montreal, Quebec H1X 3J1, CA;
LAURIN, Pierre, Montreal, Quebec H4P 2L7, CA;
PENNEY, Christopher, Pierrfonds, Quebec H8Z 3K7, CA; ZACHARIE, Boulos, Laval, Quebec H7P 5Y3, CA

(74) Vertreter:

Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(54) Bezeichnung: **Fettsäuren als Faktoren für das Überleben und die Aktivierung von Neutrophilen.**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verhütung und/oder Behandlung von Neutropenie. Dies umfasst die Behandlung von Neutropenie, die mit der Verwendung von Chemotherapie und Radiotherapie verbunden ist, sowie die Behandlung von Neutropenie, die aus Infektionen, hämatologischen Krankheiten und Ernährungsmängeln entsteht. Die vorliegende Erfindung betrifft auch allgemein die Verringerung von Arzneistofftoxizität und die Erhöhung der Arzneistoffwirksamkeit. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Fettsäuren mittlerer Kettenlänge, wie Caprinsäure, Caprylsäure oder Salzen oder Triglyceriden derselben oder Mono- oder Diglyceriden oder anderen Analoga derselben, als Faktor für das Überleben und die Aktivierung von Neutrophilen oder als Knochenmark-Stammzellen-Proliferationsfaktor.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Chemotherapie bezieht sich auf die Verwendung von zytotoxischen Mitteln, wie z.B., aber ohne Beschränkung, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Daunorubicin, Vinblastin, Vincristin, Bleomycin, Etoposid, Topotecan, Irinotecan, Taxoter, Taxol, 5-Fluoruracil, Methotrexat, Gemcitabin, Cisplatin, Carboplatin oder Chlorambucil, um Krebszellen und Tumoren zu zerstören. Jedoch sind diese Mittel nicht spezifisch und sie sind insbesondere in hohen Dosen für normale und sich rasch teilende Zellen toxisch. Dies führt häufig zu verschiedenen Nebenwirkungen bei Patienten, die sich einer Chemotherapie und Strahlentherapie unterziehen. Knochenmarkdepression, eine schwere Verringerung der Blutzellenproduktion im Knochenmark, ist eine derartige Nebenwirkung. Sie ist durch Leukopenie, Neutropenie und Thrombozytopenie gekennzeichnet. Schwere chronische Neutropenie (idiopathische, zyklische und congenitale) ist auch durch eine selektive Verringerung der Zahl der zirkulierenden Neutrophilen und eine erhöhte Empfänglichkeit für bakterielle Infektionen gekennzeichnet.

[0003] Der wesentliche Kern der Behandlung von Krebs mit chemotherapeutischen Arzneimitteln besteht darin, einen Mechanismus der Zytotoxizität mit einem Mechanismus der Selektivität für stark proliferierende Tumorzellen gegenüber Wirtszellen zu kombinieren. Jedoch ist es selten, dass chemotherapeutische Arzneistoffe eine derartige Selektivität haben. Die Zytotoxizität von chemotherapeutischen Mitteln beschränkt die verabreichbaren Dosen, beeinflusst die Behandlungszyklen und gefährdet ernsthaft die Lebensqualität der onkologischen Patienten.

[0004] Obwohl andere normale Gewebe ebenso beeinträchtigt sein können, ist das Knochenmark für Proliferationsspezifische Behandlungen, wie Chemotherapie oder Strahlentherapie, besonders empfindlich. Eine akute und chronische Knochenmarktoxizität ist eine übliche Nebenwirkung von Krebstherapien, welche zu Verringerungen der Zahl der Blutzellen und zu Anämie, Leukopenie, Neutropenie, Agranulozytose und Thrombozytopenie führt. Eine Ursache derartiger Wirkungen ist eine Verringerung der Zahl der hämatopoetischen Zellen (z.B. pluripotenten Stammzellen und anderen Vorläuferzellen), die sowohl durch eine letale Auswirkung von zytotoxischen Mitteln oder von Strahlung auf diese Zellen als auch durch die Differenzierung von Stammzellen verursacht wird, welche von einem Rückkoppelungsmechanismus hervorgerufen wird, der durch die Verarmung reiferer Mark-Kompartimente induziert wird. Die zweite Ursache ist eine Verringerung der Selbstrenerungsfähigkeit von Stammzellen, welche ebenfalls mit sowohl direkten (Mutation) als auch indirekten (Altern der Stammzellenpopulation) Auswirkungen in Beziehung steht (Tubiana, M. et al., Radiotherapy and Oncology 29:1-17, 1993). Demgemäß haben Krebsbehandlungen häufig eine Verringerung von polymorphekerigen Neutrophilen (PMN) oder eine Neutropenie zur Folge. PMN sind die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene und spielen eine zentrale Rolle bei der akuten Entzündung, wobei ihre primäre Funktion die Phagozytose und das Abtöten der infektiösen Agenzen ist. Um diese Rolle zu erfüllen, verlassen PMN die Zirkulation als Reaktion auf chemotaktische Faktoren und dringen in den betroffenen Bereich ein, um ihre biologischen Funktionen auszuüben. Bei Personen, die eine normale Zahl von Blutzellen aufweisen, machen Neutrophile etwa 60 % der gesamten Leukozyten aus. (SI Units Conversion Guide, 66-67 (1992), New England Journal of Medicine Books). Jedoch können so viele wie einer aus drei Patienten, die eine chemotherapeutische Behandlung für Krebs erhalten, an Neutropenie leiden. Mittlere normale Neutrophilenzahlen bei gesunden erwachsenen Menschen liegen in der Größenordnung von 4400 Zellen/ μ l, mit einem Bereich von 1800-7700 Zellen/ μ l. Eine Zahl von 1.000 Zellen bis 500 Zellen/ μ l stellt eine mäßige Neutropenie dar und eine Zahl von 500 Zellen/ μ l oder weniger ist eine schwere Neutropenie. Patienten in knochenmarkdeprimierten Zuständen neigen zu Infektionen und leiden häufig an Blutgerinnungsstörungen, was einen Krankenhausaufenthalt erfordert. Ein Mangel an Neutrophilen und Blutplättchen ist die Hauptursache von Krankheit und Sterblichkeit nach Krebsbehandlungen und trägt zu den hohen Kosten der Krebstherapie bei. Unter den oben erwähn-

ten Umständen kann die Verwendung jedes Mittels, das in der Lage ist, eine Neutrophilenapoptose zu inhibieren oder die Neutrophilenaktivierung und -mobilisierung zu stimulieren, von therapeutischem Wert sein. Bemühungen, das Immunsystem des Patienten nach der Chemotherapie wiederherzustellen, beinhalten die Verwendung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, um die verbleibenden Stammzellen dazu zu stimulieren, zu proliferieren und in reife infektionsbekämpfende Zellen zu differenzieren.

[0005] Bei der Knochenmarktransplantation ist ein Phänomen, dass als "Mobilisierung" bekannt ist, auch ausgenutzt worden, um größere Zahlen von Stamm/Vorläuferzellen aus peripherem Blut zu ernten. Dieses Verfahren wird derzeit für die autologe oder allogene Knochenmarktransplantation verwendet. Wachstumsfaktoren werden verwendet, um die zu erntende Zahl der peripheren Vorläuferstammzellen vor der knochenmarkablativen Therapie und Infusion von Vorläuferstammzellen zu erhöhen.

[0006] Eine posttherapeutische Knochenmarktransplantation kann ebenfalls einer Neutropenie entgegenwirken, erfordert aber eine 10-15-tägige Behandlung, welche die Patienten gegenüber einer Infektion verletzlich lässt. Mittel, die zur Stimulierung von Knochenmarkstammzellen in der Lage sind, können die Transplantation von Stammzellen erleichtern und beschleunigen, was so das Neutropenie-Fenster nach Knochenmarktransplantation verkürzt.

[0007] Obwohl hämatopoetische Wachstumsfaktoren, wie Granulozytenmakrophagenkolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), derartige Wirkungen ausüben können, ist ihre Verwendung teuer, da sie durch rekombinante Techniken erzeugt werden müssen. Derartige posttherapeutische Verbesserungsbehandlungen sind unnötig, wenn Patienten vor einer Immunsuppression "chemogeschützt" werden.

[0008] Die WO 95/30413 offenbart die Verwendung von Fettsäuren als Proliferationsbeschleuniger für hämatopoetische Stammzellen. Sie schlägt vor, dass ungesättigte langkettige Fettsäuren, wie Linolensäure, sowie gesättigte langkettige (C_{16} oder länger) Fettsäuren wirken können, um die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen zu erhöhen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die vorliegende Erfindung beruht auf der Entdeckung, dass gewisse Salze Chemoschutzmittel sind. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine Verbindung für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Zustands verwendet, welcher aus Knochenmarkdepression, Wunden, Knochenmarktransplantation und Neutropenie ausgewählt ist, wobei die Verbindung ein Salz der Formel $(R_1\text{-CO-O})_nM$ ist, in der R_1 für C_{7-11} -Alkyl steht und M ein Metallmonokation ($n=1$) oder -dikation ($n=2$) ist.

[0010] Die vorliegende Erfindung stellt ein Mittel zur Behandlung von kochenmarkdepressiven Wirkungen von Chemotherapie und Radiotherapie und jeder anderen Situation bereit, in der eine Stimulierung des hämatopoetischen Systems von therapeutischem Wert sein kann, wie zum Beispiel, aber ohne Beschränkung, Knochenmarktransplantation und chronische Neutropenie sowie Neutropenie, die eine Folge von Infektionen, hämatologischen Krankheiten und Ernährungsmängeln ist. Dies unterstützt das hämatopoetische System bei der Bekämpfung von Knochenmarkdepression, was die Aktivierung und das Überleben von Neutrophilen bei Patienten erhöht, die sich einer derartigen Behandlung unterziehen.

Beschreibung der Erfindung

[0011] Wenn sie bei der Chemotherapie und Radiotherapie verwendet wird, wird eine Zusammensetzung, welche das Salz enthält, vor, während und/oder nach der Behandlung verabreicht, um das Neutropenie-Fenster zu verkürzen und die Wiederauffüllung des hämatopoetischen Systems zu beschleunigen. Weiter ist es möglich, eine Kombination von Salzen zu mehreren Zeitpunkten in Bezug auf die Behandlung durch Chemotherapie und Radiotherapie zu verwenden. Alternativ ist es möglich, die Kombination gleichzeitig vor, während und/oder nach der Behandlung durch Chemotherapie und Radiotherapie zu verabreichen. Bei schwerer Neutropenie wird eine Zusammensetzung, die das Salz enthält, als das therapeutische Mittel verwendet. Bei Knochenmarktransplantation wird das Salz verwendet, um die Zahl der peripheren Stammzellen zu erhöhen, welche für eine Transplantation nach ablativer Radiotherapie oder Chemotherapie verfügbar sind. Das Salz kann auch nach Knochenmarktransplantation verwendet werden, um die Knochenmarkstammzellen zu stimulieren, was so die Zeitspanne zur Erholung von einer Neutropenie verkürzt.

[0012] Die Erfindung ist deshalb zur Stimulierung der Hämatopoese zur Behandlung von Knochenmarkde-

pression, die aus Chemotherapie und Radiotherapie entsteht; chronischer oder vorübergehender Neutropenie; Arzneistoff-induzierter Neutropenie und Neutropenie, welche die Folge einer hämatologischen Krankheit, eines Ernährungsmangels, einer Infektion oder Radiotherapie ist, nützlich. Eine vorübergehende Neutropenie kann aus dem Stress aufgrund eines Tiertransports oder einer Reise eines Menschen oder eines Tiers entstehen. Das Verfahren ist auch zur Stimulierung der Hämatopoese nützlich, um eine Wunde bei einem Patienten zu heilen und eine Neutrophilen-Mobilisierung zu induzieren, um die Knochenmarktransplantation bei einem Patienten zu erleichtern.

[0013] Wie hierin verwendet, können die Begriffe "ein" oder "eine" ein(e) oder mehrere bedeuten, abhängig von dem Zusammenhang, in dem sie verwendet werden.

[0014] Wie hierin verwendet, bezeichnet "Zusammensetzung, die das Salz enthält" eine Zusammensetzung, welche den aktiven Bestandteil und einen oder mehrere pharmazeutisch annehmbare Träger umfasst.

[0015] Wie hierin verwendet, bezeichnet der Ausdruck "pharmazeutisch annehmbarer Träger" eine Substanz, welche die physiologischen Wirkungen des Salzes nicht stört und für Säuger, einschließlich Menschen, nicht toxisch ist.

[0016] Eine Zusammensetzung zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung wird unter Verwendung des Salzes und von pharmazeutisch annehmbaren Trägern anhand von Verfahren formuliert, die dem Fachmann wohlbekannt sind (Merck Index, Merck & Co., Rahway, NJ). Diese Zusammensetzungen umfassen, jedoch ohne Beschränkung, Flüssigkeiten, Öle, Emulsionen, Aerosole, Inhalationsmittel, Kapseln, Pillen, Pflaster und Suppositorien.

[0017] Alle Verfahren umfassen den Schritt des In-Kontakt-Bringens des aktiven Bestandteils oder der aktiven Bestandteile mit dem Träger, der ein oder mehrere zusätzliche Bestandteile darstellt.

[0018] Wie hierin verwendet, bezeichnet der Ausdruck "Chemotherapie" ein Verfahren des Abtötens von proliferierenden Zellen unter Verwendung eines zytotoxischen Mittels. Der Ausdruck "während der Chemotherapie" bezeichnet die Zeitspanne, in der die Wirkung der Verabreichung eines zytotoxischen Mittels andauert. Der Ausdruck "nach der Chemotherapie" soll alle Situationen abdecken, in denen eine Zusammensetzung nach der Verabreichung eines zytotoxischen Mittels verabreicht wird, ungeachtet irgendeiner früheren Verabreichung desselben und auch ungeachtet des Anhalts der Wirkung des verabreichten zytotoxischen Mittels.

[0019] Wenn diese Erfindung auf Chemotherapie angewandt wird, kann das Salz vor, während oder nach der Chemotherapie (d.h. vor, während oder nach der Verabreichung eines zytotoxischen Mittels) verabreicht werden.

[0020] Mit "zytotoxischem Mittel" ist ein Mittel gemeint, dass stark proliferierende Zellen, z.B. Tumorzellen, viral infizierte Zellen oder hämotopoetische Zellen tötet. Beispiele für ein zytotoxisches Mittel, das bei der Durchführung der Erfindung verwendet werden kann, umfassen, jedoch ohne Beschränkung, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Daunorubicin, Vinblastin, Vincristin, Bleomycin, Etoposid, Topotecan, Irinotecan, Taxoter, Taxol, 5-Fluoruracil, Methotrexat, Gemcitabin, Cisplatin, Carboplatin oder Chlorambucil und einen Agonisten aller vorstehender Verbindungen. Ein zytotoxisches Mittel kann auch ein antivirales Mittel sein, z.B. AZT (d.h. 3'-Aido-3'-desoxythymidin) oder 3TC/Lamivudin (d.h. 3-Thiacytidin).

[0021] Wie hierin verwendet, bezeichnet der Ausdruck "Leukopenie" eine abnormale Verringerung der Zahl der Leukozyten im Blut.

[0022] Wie hierin verwendet, bezeichnet der Ausdruck "Neutropenie" das Vorliegen von abnormal kleinen Zahlen von Neutrophilen im Blut.

[0023] In einer bevorzugten Ausführungsform liegt die pharmazeutische Zusammensetzung in Form jeder geeigneten Zusammensetzung für die orale, sublinguale Verabreichung oder Inhalation (Nasenspray), intravenös, intramuskulär, subkutan zur Verwendung bei der Behandlung von Neutropenie, Thrombozytopenie oder als Faktor für das Überleben und die Aktivierung von Neutrophilen vor.

[0024] Man erkennt, dass die Menge einer Zusammensetzung der Erfindung, die zur Verwendung bei der Behandlung erforderlich ist, mit dem Verabreichungsweg, der Natur des behandelten Zustands, dem Alter und Zustand des Patienten abhängt und letztendlich von der Beurteilung des behandelnden Arztes abhängt. Die

gewünschte Dosis kann zweckmäßig in einer einzigen Dosis oder als aufgeteilte Dosen dargereicht werden, welche in geeigneten Zeitabständen, zum Beispiel zwei, drei, vier oder mehr Dosen pro Tag, eingenommen werden.

[0025] Obwohl es zur Verwendung in der Therapie möglich ist, dass das Salz als rohe Chemikalie verabreicht wird, ist es vorzuziehen, den aktiven Bestandteil als pharmazeutische Formulierung darzureichen.

[0026] In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung ist die Menge an verabreichtem aktivem Bestandteil derart, dass die Konzentration im Blut (frei und/oder an Serumalbumin gebunden) größer als 1 μ M ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Konzentration im Blut größer als 1 mM.

[0027] In einer weiteren Ausführungsform liegt die pharmazeutische Zusammensetzung in Form einer oralen (einschließlich sublingualen) oder parenteralen (einschließlich intramuskulären, subkutanen, rektalen und intravenösen) Verabreichung vor. Die Formulierungen können, falls geeignet, zweckmäßig in diskreten Dosierungseinheiten dargereicht werden und können durch irgendeines der auf dem Gebiet der Pharmazie geläufigen Verfahren hergestellt werden. Alle Verfahren umfassen den Schritt des In-Kontakt-Bringens der aktiven Verbindung mit flüssigen Trägern oder fein zerteilten festen Trägern oder beiden und dann, falls erforderlich, das Formen des Produkts zu der gewünschten Formulierung. Wenn gewünscht, können Formulierungen verwendet werden, die angepasst sind, um eine verzögerte Freisetzung des aktiven Bestandteils zu ergeben.

[0028] Das Metallmonokation oder -dikation, das in der Erfindung verwendet wird, ist bevorzugt Calcium, Magnesium, Kalium oder Natrium. Das aktive Mittel ist bevorzugt Natriumcaprylat, Natriumcaprat, Calciumcaprylat oder Calciumcaprat.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Chemoschutzstudien: Protokoll für die in-vivo-Induktion der Immunzellenproliferation oder des Immunzellschutzes

[0029] Weibliche C57BL/6-Mäuse, 6 bis 8 Wochen alt, wurden durch Behandlung mit 100-200 mg Cyclophosphamid (CY) immunsupprimiert, das intravenös am Tag 0 verabreicht wurde. Um die Immunschutzwirkung von MCT oder anderen Verbindungen zu überprüfen, wurden die Mäuse oral an den Tagen -3, -2 und -1 vorbehandelt oder intravenös am Tag 0 mit der Testverbindung behandelt. Die Mäuse wurden am Tag +5 durch Herzpunktur und Halsdislokation geopfert.

[0030] Zellsuspensionen wurden aus Thymus, Milz und Knochenmark wie folgt hergestellt: Die Gewebe wurden in PBS-Puffer zerstoßen und kontaminierende Erythrozyten wurden in ACK-Puffer (155 mM NH_4Cl , 12 mM NaHCO_3 , 0,1 mM EDTA, pH 7,3) fünf Minuten lang lysiert; Zellen wurden dann durch Zentrifugation gesammelt und dreimal in PBS gewaschen und in Gewebekulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden mit einem Hämozytometer gezählt.

Beispiel 1

[0031] Die Wirkung von Natriumcaproat auf eine in-vivo-Induktion der Immunzellenproliferation oder des Immunzellenschutzes wurde durch das vorstehend beschriebene Induktionsprotokoll abgeschätzt. Natriumcaproat (6,25 μ M) hatte bei CY-immunsupprimierten Mäusen eine schwache (nicht signifikante) Auswirkung auf Knochenmark und die Zahl der Milzzellen (Tabelle 1).

Tabelle 1

	Knochenmark			Milz		
	Zahl der Zellen ($\times 10^5$)	P/Kontrolle	P/CY	Zahl der Zellen (10^6)	P/Kontrolle	P/CY
Kontrolle	48 \pm 4,9			98 \pm 24,2		
CY	25 \pm 4,9	>0,0001		33 \pm 13,2	0,0018	
CY + Natriumcaproat	39 \pm 17,9	0,2403	0,09	35 \pm 10,6	0,0026	0,77

Beispiel 2

[0032] Die Auswirkung von Natriumcaprylat und Natriumcaproat auf die in-vivo-Induktion der Immunzellenproliferation oder des Immunzellenschutzes wurde durch das vorstehend beschriebene Induktionsprotokoll abgeschätzt. Es wurde eine signifikante Zunahme der Proliferation oder des Schutzes der Zahl der Knochenmarkzellen von etwa 24×10^6 (CY) auf 30×10^6 (CY + 3 % Natriumcaprylat) oder 35×10^6 (CY + 3 % Natriumcaproat) wurde bei der Vorbehandlung mit Natriumcaprylat und Natriumcaproat in mit CY behandelten Mäusen beobachtet.

Beispiel 3

[0033] Chemoschutzstudien wurden durchgeführt, wie es in dem vorstehenden Induktionsprotokoll beschrieben wird, außer dass die Mäuse mit 12,5 μ M Natriumcaprylat oder Natriumcaproat per os an den Tagen 1, 2, 3 und 4 (nach)behandelt wurden. Es wurde eine signifikante Zunahme der Zahl der Knochenmarkzellen bei der Nachbehandlung beobachtet (Tabelle 2).

Tabelle 2

	Knochenmark			Milz		
	Zahl der Zellen ($\times 10^5$)	P/Kontrolle	P/CY	Zahl der Zellen (10^6)	P/Kontrolle	P/CY
Kontrolle	52±6,17			110±29,3		
CY	19±4,99	>0,001		30±9,5	0,0007	
CY + Natriumcaproat	26±5,33	>0,001	0,0455	36±12,5	0,0009	0,394
CY + Natriumcaprylat	29±4,45	0,0001	0,0140	28±6,3	0,0007	0,696

Chemoschutzstudien: Immunphänotypisierungsprotokoll

[0034] Weibliche 6 bis 8 Wochen alte C57BU6-Mäuse wurden an den Tagen -3, -2 und -1 per os oder intravenös am Tag 0 mit verschiedenen Testverbindungskonzentrationen vorbehandelt. Die Immunphänotypisierung wurde auch bei immunsupprimierten Tieren durchgeführt. Die Immunsuppression wurde mit 200 mg/kg Cyclophosphamid (CY) erzielt, das am Tag 0 i.v. injiziert wurde. Die Mäuse wurden am Tag 5 durch Herzpunktur geopfert. Blut und Milz wurden gesammelt und Zellsuspensionen wurden hergestellt und die Erythrozyten wurden in ACK-Puffer (155 mM NH_4Cl , 12 mM NaHCO_3 , 0,1 mM EDTA, pH 7,3) 5 Minuten lang lysiert. Die Zellen wurden dreimal in PBS, pH 7,4, gewaschen und in Gewebekulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann 45 Minuten lang auf Eis mit Fluoresceinisothiocyanat(FITC)- oder Phycoerythrin(PE)-konjugiertem Zelloberflächenmarker gemäß der Empfehlung des Herstellers (Gibco/BRL, Cedarlane, Boehringer Mannheim) inkubiert. Die Zellen wurden dann in PBS gewaschen, mit 1 %-igem Formaldehyd fixiert und mit einem Coulter XL-Durchflusszytometer analysiert. Die Analyse von Zell-Untergruppen wurde durch Bestimmung von Standard-Zelloberflächenmarkern vorgenommen, welche wie folgt waren: TCR (T-Zellrezeptor), CD4 (T-Helfer), CD8 (T-zytotoxisch/Supressor), CD11b (Makrophage), NK (NK-Zellen) und Ly5 (B-Zellen).

[0035] Die Zellen wurden mittels einer 45-minütigen Inkubation mit FITC- oder PE-konjugiertem Zelloberflächenmarker gemäß der Empfehlung des Herstellers gefärbt. Die Zellen wurden dann in PBS gewaschen, mit 1 %-igem Paraformaldehyd fixiert und mit einem Coulter XL-Durchflusszytometer analysiert. Die Analyse von Zell-Untergruppen wurde durch die Bestimmung von Standard-Zelloberflächenmarkern vorgenommen, die wie folgt waren: CD34 (hämatopoetische Vorläuferzellen), CD41 (Blutplättchen, Megakaryozyten), CD13 (myelo-monozytische Stammzellen, Myelozyten, Promonozyten) und CD38 (Lymph-Stammzellen, pro-B, prä-B).

Beispiel 4

[0036] Die Immunphänotypisierung von Natriumcaproat wurde gemäß dem vorstehend beschriebenen Immunphänotypisierungsprotokoll vorgenommen. 6,25 μ M Natriumcaproat erhöhte signifikant den relativen Prozentsatz von LY5-TCT- bei Blut von 40,91" 8,84 unter Verwendung von CY allein auf 2,43" 10,16 ($p = 0,063$, schwach).

Beispiel 5

[0037] Die Auswirkung von Natriumcaprylat und Natriumcaprat auf die Knochenmark-Immunphänotypisierung wurde durch das vorstehend beschriebene Protokoll bestimmt. Die Behandlung mit Cyclophosphamid induzierte eine signifikante Zunahme in allen untersuchten Untergruppen (CD34+, CD13+, CD41+ und CD38+). Die Zugabe von Natriumcaprylat oder Natriumcaprat amplifizierte die Zahl der CD13+-Linie, bei der es sich um myelomonozytische Stammzellen, Myelozyten und Promonozyten handelt. Diese Zunahme des relativen Prozentsatzes an CD13+ im Vergleich zu Cyclophosphamid allein ist signifikant. Die Ergebnisse zeigen klar, dass die Natriumsalze eine signifikante Zunahme der Zahl der Knochenmarkzellen induzieren und weiter den relativen Prozentsatz an Vorläufer von phagozytischen Zellen (PMN und Monozyten) erhöhen. Dies kann eine bessere Erholung von einer zytotoxischen Behandlung oder einen Schutz gegen infektiöse Mittel zur Folge haben (Tabelle 3).

Tabelle 3

% Zellen	CD34+	CD13+	CD41+	CD38+
Kontrolle	1,1±0,3	0,8±0,2	1,6±0,2	29,8±6,5
CY	10±1,0	3,2±0,5	4,2±0,6	39,6±13,6
CY + Natriumcap- roat	11,2±1,3	4,9±1,2 p<0,017	4,6±1,3	36±9,7
CY + Natriumcap- roat	9,1±3,1	4,7±1,7 p<0,06	3,7±0,7	44,3±22,8

Patentansprüche

1. Verwendung einer Verbindung für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Zustandes, der aus Knochenmarkdepression, Wunden, Knochenmarktransplantation und Neutropenie ausgewählt ist, wobei die Verbindung ein Salz der Formel $(R_1\text{-CO-O})_nM$ ist, in der R_1 C₇₋₁₁-Alkyl ist und M ein Metall-Monokation (n=1) oder -Dikation (n=2) ist.
2. Verwendung nach Anspruch 1, bei der M ein Calcium-, Magnesium-, Kalium- oder Natriumkation ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1, bei der die Verbindung Natriumcaprylat, Natriumcaprat, Calciumcaprylat oder Calciumcaprat ist.
4. Verwendung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, bei der M ein Monokation ist.
5. Verwendung nach Anspruch 1, bei der die Verbindung Natriumcaprat ist.
6. Verwendung nach irgendeinem vorangehenden Anspruch, bei der der Zustand eine Arzneistoff/Drogen-induzierte Neutropenie oder eine Neutropenie ist, die von einer hämatologischen Krankheit, einem Ernährungsmangel, einer Infektion oder einer Radiotherapie herrührt.
7. Produkt, umfassend eine Verbindung, wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 definiert, und einen humanen Kolonien-stimulierenden Faktor zur gleichzeitigen oder getrennten Verwendung bei der Behandlung eines Zustandes, wie er in Anspruch 1 oder Anspruch 6 definiert ist.
8. Produkt nach Anspruch 7, in dem der Faktor G-CSF oder GM-CSF ist.
9. Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung, wie in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5 definiert, und Interleukin 15.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen