



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 666 273 A5

⑤① Int. Cl.⁴: C 07 D 487/22
A 61 K 31/555

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳ Gesuchsnummer: 45/85

⑦③ Inhaber:
Huhtamäki Oy, Turku (FI)

㉒ Anmeldungsdatum: 07.01.1985

⑦② Erfinder:
Ingberg, Grels Daniel, Helsinki 53 (FI)
Penttilä, Ritva Laila Aleri, Helsinki 33 (FI)
Tokola, Reino Olavi, Helsinki 26 (FI)
Tenhunen, Raimo Antero, Helsinki 10 (FI)

㉔ Patent erteilt: 15.07.1988

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.07.1988

⑦④ Vertreter:
Bovard AG, Bern 25

⑤④ **Verfahren zur Herstellung einer neuen Hämin-Komplexverbindung und diese als Wirksubstanz enthaltende pharmazeutische Zubereitungen.**

⑤⑦ Zur Herstellung einer stabilen, physiologisch aktiven, wasserlöslichen Komplexverbindung von Hämin wird kristallines Hämin mit einer basischen Aminosäure, vorzugsweise L-Arginin oder L-Lysin, in einem Gemisch von Aceton und Wasser in einem Volumenverhältnis von 300:10 bis 300:25 bei Zimmertemperatur unter heftigem Rühren während 10 - 15 Std. zur Reaktion gebracht. Die erhaltene, pulverförmige Komplexverbindung wird als Wirksubstanz in Kapseln oder, zusammen mit Tablettierungsmittel in Tabletten oder, gelöst in steriler Salzlösung, als Injektionslösung in pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzt. Diese pharmazeutischen Zubereitungen sind wirksam für die Behandlung von verschiedenen Arten von Anämie, insbesondere Porphyria.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung einer physiologisch wirksamen, wasserlöslichen Häminverbindung für die Verwendung als Wirksubstanz in Tabletten oder Kapseln oder zur Herstellung von Injektionslösungen, dadurch gekennzeichnet, dass man kristallines Hämin mit einer basischen Aminosäure in einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton und Wasser mit einem Volumenverhältnis 300:10 bis 300:25 bei Zimmertemperatur unter heftigem Rühren während 10 bis 15 Std. unter Bildung einer Komplexverbindung des Hämins zur Reaktion bringt.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die basische Aminosäure L-Arginin oder L-Lysin ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als basische Aminosäure L-Arginin in einem Molverhältnis von Hämin zu L-Arginin von 1:1 bis 1:4, vorzugsweise 1:3, einsetzt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als basische Aminosäure L-Lysin in einem Molverhältnis von Hämin zu L-Lysin von 1:1 bis 1:4, vorzugsweise 1:3, einsetzt.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Lösungsmittelgemisch aus Aceton und Wasser mit einem Volumenverhältnis von 300:20 verwendet.

6. Nach dem Verfahren nach Anspruch 1 erhaltene Hämin-Komplexverbindung.

7. Pharmazeutische Zubereitung für die Behandlung verschiedener Arten von Anämie, insbesondere Porphyria, enthaltend eine Hämin-Komplexverbindung nach Anspruch 6 und ein pharmazeutisch annehmbares Träger- oder Hilfsmittel.

8. Zubereitung nach Anspruch 7 in Form von Kapseln oder Tabletten, die die Wirksubstanz in Pulverform, entweder in Kapseln als Hilfsmittel oder zusammen mit einem Tabletierungsmittel als Träger enthalten.

9. Zubereitung nach Anspruch 7 in Form einer Injektionslösung, die die Wirksubstanz, gelöst in einer sterilen Salzlösung, enthält.

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung einer physiologisch wirksamen, wasserlöslichen Häminverbindung für die Verwendung als Wirksubstanz in Tabletten oder Kapseln oder zur Herstellung von Injektionslösungen, auf die nach dem Verfahren erhaltene Hämin-Komplexverbindung sowie auf diese Komplexverbindung als Wirksubstanz enthaltende pharmazeutische Zubereitungen zur Behandlung von verschiedenen Arten von Anämie, insbesondere Porphyria.

Hämin kommt im Organismus als eine prosthetische Gruppe von Hämoglobin in den meisten Cytochromen und in bestimmten Enzymen vor. Hämoglobin wird im Knochenmark synthetisiert. Bei Zersetzung von Häminproteinen wird Hämin freigesetzt, wovon jedoch unter normalen physiologischen Bedingungen nur ein geringer Anteil in der Synthese von neuen Häminproteinen verbraucht wird. Hämin wird unter Einwirkung von Häminoxygenase zu Biliverdin gespalten, das weiterhin zu Bilirubin reduziert wird. Natürliches, unbeschädigtes Hämoglobin dient natürlich nicht als Substrat für Häminoxygenase.

Mängel in der Hämoglobinsynthese können auf gestörter Synthese von Hämin oder von Globinketten beruhen. Die Häminsynthese kann gestört werden durch a) Fehlen einer für die Synthese notwendigen Komponente, oder b) Versagen eines die Synthese katalysierenden Enzyms.

a) Eisenmangel ist der einschränkende Faktor in der Häminsynthese. Der Organismus erhält seinen täglichen Bedarf an Eisen (1 bis 2 mg) aus der Nahrung. Eisenmangel kann auf einer Nahrung mit ungenügendem Eisengehalt oder möglicherweise auf dem Vorhandensein von eisenbindenden Verbindungen in der Nahrung beruhen. Störungen im Mechanismus der Eisenabsorption können trotz ausreichendem Eisengehalt in der Nahrung zu Eisenmangel führen. Ungeachtet der Ursache führt Eisenmangel früher oder später zu Anämie.

Beim selten auftretenden Mangel an Vitamin B₆ ist die Absorption von Eisen normal, jedoch wird dessen Ausnutzung durch die Zellen unterdrückt. Als Folgeerscheinung davon entwickelt sich eine bestimmte Art von sideroblastischer Anämie.

Anämie auf Grund von Eisenmangel wird entweder mittels oraler Eisenzubereitungen (z. B. Eisensulfat oder -gluconat), oder seltener mittels Injektionen (Eisen-sorbit) behandelt. Wenn der Absorptionsmechanismus für Eisen gestört ist, sind diese konventionellen oralen Zubereitungen nutzlos, und das Eisen dringt nicht einmal in die Zellen der Darmschleimhaut ein. Im Gegensatz zu anorganischem Eisen wird Hämineisen, in welchem das Eisen an Hämin gebunden ist, selbst in Fällen gestörter Eisenabsorption, die gegen konventionelle orale Therapie beständig sind, durch diese Zellen absorbiert. Somit ist Hämineisen die einzige bekannte, wirksame Massnahme für orale Behandlung von therapiebeständigen Fällen. Es wurde gefunden, dass Hämineisen sogar durch ziemlich gesunde Subjekte vier- bis fünfmal besser absorbiert wird als anorganisches Eisen (Seppänen H. & Takkunen H., «Suomen Lääkärilehti», 36, S. 2071-2072, 1981).

b) Die Synthese von Hämin wird enzymatisch reguliert. Beeinträchtigte Funktion der die Häminsynthese katalysierenden Enzyme kann entweder hereditär sein oder auf äusseren Faktoren beruhen. Sie führt unvermeidlich zu verminderter Bildung von Hämin, was sich durch Entwicklung von Porphyria oder bestimmten Arten von sideroblastischer Anämie oder anderen Krankheiten ausdrückt.

Porphyria ist die wichtigste Gruppe von Krankheiten, die auf beeinträchtigte Enzymfunktion zurückzuführen sind. Bei Porphyria-Patienten zeigen sich eine Akkumulierung von Porphyrinen, Zwischenprodukten der Häminsynthese, und deren erhöhte Exkretion in Urin und Fäkalien. Die meisten Arten von Porphyria äussern sich durch akute Anfälle, die äusserst schwierig zu meistern sind.

Manchmal können sich anstelle von Porphyria zufolge Versagens der an der Häminsynthese beteiligten Enzyme sideroblastische Anämien verschiedener Arten entwickeln. Auch sideroblastische Anämien können entweder vererbt oder erworben sein.

Die Behandlung von Porphyria basierte bis heute prinzipiell auf der Vermeidung von bestimmten Arzneimitteln und der Verabreichung von grossen Mengen von Kohlehydraten während akuten Anfällen, jedoch war die Wirkung gering. Seit die Ätiologie von Porphyria geklärt ist, hat intravenöse Behandlung mit Häminverbindungen (Hämatin) zunehmende Bedeutung erlangt. Hämatin hat sich für die Behandlung von Porphyriaanfällen als wirksam erwiesen, hat jedoch bei mehr als 50% der Patienten zu Thrombophlebitis geführt. Ausserdem ist es sehr instabil und daher ungeeignet für die Herstellung in industriellem Massstab. Es gibt somit sehr wenig Möglichkeiten für wirksame Behandlung von Porphyriapatienten.

Das Ziel der vorliegenden Erfindung war die Herstellung einer wasserlöslichen Hämineisenverbindung für die Behandlung bestimmter Arten von Anämie, in welcher das Eisen im Häminmolekül sozusagen leicht verfügbar ist. Die Verbindung ist in erster Linie für die Behandlung von Porphyria

bestimmt, wo die normale Bildung von Hämoglobin aus diesen oder anderen Gründen gestört ist. Da die Verbindung sowohl für orale Verabreichung in Tabletten oder Kapseln wie auch für Injektion bestimmt ist, muss sie wasserlöslich sein.

Hämin, das in Wasser gering löslich ist, kann aus Blut in reiner Form erhalten werden durch Extraktion mit einem Gemisch von Salz- oder Essigsäure aus einer wässrigen Lösung von hämolysierenden Erythrocyten. Eine andere Methode basiert auf der Extraktion von Hämin mit Aceton in Gegenwart von beispielsweise Histidylhistidin, Pilocarpin oder Imidazol bei pH-Wert 7,0 (Wakid N.W. & Helou K.Y., «Int. J. Biochem.», 4, S. 259-267, 1973).

In der PCT-Patentanmeldung Nr. 813749 (PCT/FI81/00026) wird ein Verfahren zur Herstellung eines wasserlöslichen Häminkonzentrats, in welchem etwa 40 Gew.-% Hämin sind und der Rest eine «Blutsubstanz» unbekannter Art ist, beschrieben. Das Produkt ist für die Verwendung in lyophilisierter Form als Eisenzusatz in Nahrungsmitteln oder als anti-anämisches Arzneimittel bestimmt. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, dass das Endprodukt ein Gemisch von Hämin und «Blutsubstanz» darstellt. Da die letztere Komponente nicht einheitlich ist, ist das Gemisch für Injektion nicht geeignet.

In Spitälern wurde Porphyria mit einem Extempore durch Lösen von Hämin in einer sterilen Natriumcarbonatlösung (Hämatin) hergestellten Gemisch behandelt. Da diese Lösung instabil ist, kann sie nicht als Handelsprodukt in grossem Massstab hergestellt werden. Ausserdem erzeugt Hämatin in etwa 50% der Fälle an der Injektionsstelle Thrombophlebitis, wahrscheinlich auf Grund des hohen pH-Wertes der Lösung. Dies ist ein ernsthafter Nachteil, der die Nützlichkeit des Produktes beträchtlich vermindert.

Gegenstand der Erfindung ist das im Patentanspruch 1 definierte Verfahren.

Im erfindungsgemässen Verfahren wird als basische Aminosäure vorzugsweise L-Arginin oder L-Lysin, und als Lösungsmittelgemisch wird Aceton und Wasser im Volumenverhältnis 300:10 bis 300:25 verwendet. Die Zusammensetzung des Lösungsmittelgemischs, d.h. das Volumenverhältnis von organischem Lösungsmittel zu Wasser, ist überraschenderweise wichtig für den medizinischen Wert des Endproduktes. Der Wassergehalt im Lösungsmittelgemisch ist so niedrig (vorzugsweise etwa 7 Vol-%), dass weder Hämin noch das ziemlich leicht lösliche L-Arginin gelöst werden. Die Reaktion erfolgt unter heftigem Rühren, wobei der pH-Wert der Lösung zweckmässig kontinuierlich überwacht wird. Das gebildete Produkt kann abgetrennt und getrocknet werden, und die so erhaltene Hämin-Komplexverbindung in trockener Form ist wasserlöslich, was sowohl vom medizinischen wie auch vom pharmakotechnischen Standpunkt aus wesentlich ist.

Das Häminmolekül enthält zwei Carboxylgruppen, die mit den basischen Aminogruppen von L-Arginin bzw. L-Lysin reagieren.

Das nach dem beschriebenen Verfahren hergestellte Hämin-arginat bzw. -lysinat wurde in Wasser gelöst, und der pH-Wert der erhaltenen Lösungen wurde in unterschiedlichen Zeitpunkten mit einem in Wasser gelösten mechanischen Gemisch von Hämin und L-Arginin verglichen. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1

		ph-Wert			
		0 min	60 min	24 h	
5	Hämin-arginat	0,02937 g/25 ml	8,22	8,22	8,22
	Hämin-lysinat	0,02760 g/25 ml	8,10	7,97	8,13
	Hämin +	0,01630 g/25 ml			
	L-Arginin	0,01307 g/25 ml	10,13	9,81	9,33

Die Resultate der pH-Messungen zeigen, dass der pH-Wert der Lösungen von Hämin-arginat und -lysinat (bei etwa pH-Wert 8) während bis zu 24 h stabil ist. Andererseits sinkt der pH-Wert des mechanischen Vergleichsgemischs sehr langsam ab, wahrscheinlich auf Grund der äusserst langsamen Reaktion zwischen den Carboxylgruppen im Häminmolekül und der Aminogruppe in der L-Aminosäure. Nach dieser Methode kann daher kein therapeutisch nützlich Produkt erhalten werden. Nach dem beschriebenen Verfahren hergestelltes Hämin-arginat und -lysinat sind Komplexverbindungen, in denen die L-Aminosäure mit den Carboxylgruppen des Hämins reagiert hat.

Zur Bestimmung des optimalen Molverhältnisses zwischen den beiden Reaktanten einerseits und der bestgeeigneten Zusammensetzung des Lösungsmittelgemischs andererseits wurden die nachstehenden Versuche mit Hämin und Arginin ausgeführt:

Kristallines Hämin und L-Arginin wurden im Molverhältnis von 1 : 2 bzw. 1 : 3 unter heftigem Rühren in einem Lösungsmittelgemisch aus einem organischen Lösungsmittel und Wasser in variierenden Mengenanteilen zur Reaktion gebracht. Die jeweils gebildete Ausfällung wurde abfiltriert, gewaschen und getrocknet.

Die Löslichkeit in Wasser wurde bestimmt, indem jeweils etwa 1,0 g des in jedem Versuch erhaltenen Hämin-arginats unter heftigem Rühren während etwa 1 h in 50 ml dest. Wasser gelöst wurde.

Die erhaltenen Lösungen wurden bei etwa 3500/min zentrifugiert und der Rückstand mit je 10 ml dest. Wasser und Aceton gewaschen und danach getrocknet und ausgewogen. Die unlöslichen Rückstände bestanden zur Hauptsache aus unreaktiertem Hämin. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die in einigen der Versuche gebildete teerige Substanz konnte nicht in Pulverform überführt werden.

Das praktische Molverhältnis von Hämin zu Arginin erwies sich als 1 : 3, und das bestgeeignete Lösungsmittelgemisch war 300 ml Aceton und 20 ml Wasser, da Hämin einen geringen Überschuss von L-Arginin verlangt, um richtig zu reagieren.

Die lokale Auswirkung von intravenöser Infusion von Häminverbindungen auf Gewebe der Umgebung wurde untersucht durch Infusion von 5 mg/kg in die Auricularvene von kalifornischen weissen Kaninchen. Eine konventionelle Hämin-carbonatlösung (Hämatin) wurde als Referenzlösung verwendet.

Nach Infusion von Hämin-arginatlösung verblieb das Umgebungsgewebe der Vene normal, d.h. es trat keine sterile Entzündung (Thrombophlebitis) auf.

Ein ähnliches Resultat wurde nach Infusion einer entsprechenden Hämin-lysinatlösung beobachtet. Es kann somit darauf geschlossen werden, dass die Verbindungen bei intravenöser Infusion keine Thrombophlebitis erzeugen.

Bei Verabreichung einer Hämin-carbonatlösung auf gleiche Art wurde das Umgebungsgewebe der Vene gerötet und entzündet, d.h. es entwickelte sich eine offenbar sterile Entzündung (Thrombophlebitis). 3 h nach der Infusion der

Tabelle 2

Hämin:L-Arginin Gewicht g	Molver- hältnis	Lösungsmittel	ml	°C	wasserunlöslicher Rückstand, Gew.-%
6,52:3,48	1:2	Methanol	300	20	Teer
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/Wasser	300/20	20	21,2
6,52:5,22	1:3	Isopropanol/Wasser	300/20	20	9,7
6,52:3,48	1:2	Aceton/Wasser	300/15	20	16,8
6,52:3,48	1:2	Aceton/Wasser	300/20	20	12,4
6,52:5,22	1:3	Aceton/Wasser	300/10	20	≈ 100
6,52:5,22	1:3	Aceton/Wasser	300/10	40	11,4
6,52:5,22	1:3	Aceton/Wasser	300/15	20	8,3
6,52:5,22	1:3	Aceton/Wasser	300/20	20	0,3
6,52:5,22	1:3	Aceton/Wasser	300/30	20	Teer
6,52:5,22	1:3	Aceton/Wasser	150/10	20	4,2
6,52:5,22	1:3	Aceton/Wasser	150/12,5	20	Teer

Hämin-carbonatlösung war die Thrombophlebitis immer noch offenbar vorhanden.

Der physiologische Charakter der verschiedenen wasserlöslichen Häminverbindungen wurde festgestellt durch Testen der Fähigkeit von Häminoxygenase zur Aufspaltung der Verbindungen. Das physiologische Substrat für Häminoxygenase, Methemalbumin, wird hierdurch zu Biliverdin aufgespalten, das durch Biliverdin-reductase weiterhin zu Bilirubin reduziert wird. Somit wird das überschüssige Hämin, das der Organismus nicht verbrauchen kann, zersetzt, in erster Stelle durch Häminoxygenase zu Bilirubin und anderen, nahe verwandten Substanzen, die dann normal ausgeschieden werden können. Das die Reaktionsrate einschränkende Enzym ist somit Häminoxygenase.

In enzymatischen Analysen, die u.a. ausgeführt wurden, um die Fähigkeit von Hämin-arginat und -lysinat als Substrate für Häminoxygenase zu dienen, abzuklären, wurde die Aktivität des Referenzsubstrats Methemalbumin als 100 ausgedrückt. Der entsprechende, für Hämin-arginat und -lysinat ermittelte Wert war 106. Die Aktivitäten von anderen Hämin/Amin-Derivaten, in denen die Aminkomponente die Ethanolamin, Ethylamin, Cyclohexylamin bzw. Piperidin war, wurden als 11,1 g Hämin-arginat erhalten, und der unlösliche Rückstand betrug 0,042 g (4,2%).

Beispiel 3

Nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehen wurden 6,52 g (0,01 mol) kristallines Hämin und 5,23 g (0,03 mol) kristallines L-Arginin zur Reaktion gebracht. Mit etwa 102% Ausbeute wurden 12,0 g Hämin-arginat erhalten, und der unlösliche Rückstand betrug 0,001 g (0,1%).

Beispiel 4

Nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehen wurden 6,52 g (0,01 mol) kristallines Hämin und 6,10 g (0,035 mol) kristallines L-Arginin zur Reaktion gebracht. Mit etwa 95%

Ausbeute wurden 12,0 g Hämin-arginat erhalten, und der unlösliche Rückstand betrug 0,0005 g (0,05%).

25 Beispiel 5

Nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehen wurden 6,52 g (0,01 mol) kristallines Hämin und 4,39 g (0,03 mol) kristallines L-Lysin zur Reaktion gebracht. Mit etwa 99% Ausbeute wurden 10,8 g Hämin-lysinat erhalten, und der unlösliche Rückstand betrug 0,020 g (2,8%).

Es scheint, dass das optimale Molverhältnis von Hämin zu Arginin 1 : 3 beträgt (Beispiel 3), da dies die höchste Ausbeute an Hämin-arginat ergab, während der Mengenanteil an unlöslichem Rückstand minimal war.

35 den als 13, 21, 31 bzw. 78 ermittelt. Die Tests zeigen, dass sich Hämin-arginat und -lysinat hinsichtlich Häminoxygenase im Organismus wie normale physiologische Verbindungen verhalten.

40 In den nachstehenden Beispielen werden Ausführungsformen der Erfindung erläutert.

Beispiel 1

In einem mit mechanischem Rührwerk ausgerüsteten und ein Lösungsmittelgemisch von 300 ml Aceton und 20 ml Wasser enthaltenden Becher wurden 6,52 g (0,01 mol) kristallines Hämin und 3,48 g (0,02 mol) kristallines L-Arginin während 10 bis 15 h heftig gerührt. Das gebildete Produkt wurde abfiltriert, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Mit einer Ausbeute von 95% wurden 9,5 g Hämin-arginat erhalten. Der wie vorstehend beschrieben bestimmte unlösliche Rückstand betrug 0,14 g (14%).

Beispiel 2

55 Nach dem in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehen wurden 6,52 g (0,01 mol) kristallines Hämin und 4,36 g (0,025 mol) kristallines L-Arginin zur Reaktion gebracht. Mit etwa 100%