

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **203505**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **356119**

(22) Data zgłoszenia: **03.05.2000**

(86) Data i numer zgłoszenia międzynarodowego:

03.05.2000, PCT/SE00/00847

(87) Data i numer publikacji zgłoszenia międzynarodowego:

09.11.2000, WO00/66152

PCT Gazette nr 45/00

(51) Int.Cl.

A61K 38/55 (2006.01)

A61K 31/095 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

(54)

Preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor karboksypeptydazy U i inhibitor trombiny, zestaw składników i zastosowanie preparatu farmaceutycznego

(30) Pierwszeństwo:

03.05.1999, SE, 9901572-9

03.05.1999, SE, 9901573-7

13.08.1999, SE, 9902902-7

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

14.06.2004 BUP 12/04

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.10.2009 WUP 10/09

(73) Uprawniony z patentu:

ASTRAZENECA AB, Södertälje, SE

(72) Twórca(y) wynalazku:

Tommy Abrahamsson, Mölndal, SE

Viveca Nerme, Mölndal, SE

Magnus Polla, Mölndal, SE

(74) Pełnomocnik:

Zofia Sulima, Rzecznik Patentowy,

Sulima Grabowska Sierzputowska,

Biuro Patentów i Znaków Towarowych Sp.j.

PL 203505 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor karboksypeptydazy U (CPU) i inhibitor trombiny, zestaw składników i zastosowanie preparatu farmaceutycznego do wytwarzania leku do leczenia stanu, w którym jest wymagane lub pożądane hamowanie CPU i/lub hamowanie trombiny.

Proces krzepnięcia krwi jest kluczowym procesem związanym zarówno z hemostazą (to jest zapobieganiem utracie krwi z uszkodzonego naczynia), jak i zakrzepicą (to jest tworzeniem skrzepu krwi w naczyniu krwionośnym, co prowadzi do niedrożności naczynia). Krzepnięcie jest wynikiem złożonej sekwencji reakcji enzymatycznych, w której jednym z końcowych etapów jest przemiana proenzymu protrombiny w aktywny enzym trombinę.

Trombina odgrywa kluczową rolę w procesie krzepnięcia. Aktywuje ona płytki krwi, przekształca fibrynogen w monomery fibryny, które samorzutnie polimeryzują tworząc włókna i aktywuje czynnik XIII, który z kolei powoduje usieciowanie polimerów z utworzeniem nierozpuszczalnej fibryny. Ponadto trombina aktywuje czynnik V i czynnik VIII w reakcji z dodatnim sprzężeniem zwrotnym. Oczekuje się zatem, że inhibitory trombiny będą skutecznymi środkami przeciwzakrzepowymi, powodującymi hamowanie aktywacji płytek krwi, powstawanie fibryny i stabilizację fibryny. Oczekuje się, że dzięki hamowaniu mechanizmu dodatniego sprzężenia zwrotnego będą one wywierać działanie hamujące na początku łańcucha zjawisk prowadzących do krzepnięcia i zakrzepicy.

Fibrynoliza zachodzi w wyniku szeregu reakcji enzymatycznych powodujących degradację fibryny przez plazminę. Uaktywnienie plazminogenu jest kluczowym procesem w fibrynolizie. W rozszczepieniu plazminogenu z wytworzeniem plazminy uczestniczą aktywatory plazminogenu, aktywator plazminogenu typu tkankowego (t-PA) lub aktywator plazminogenu typu urokinazowego (u-PA). W początkowej plazminowej degradacji fibryny powstają reszty lizyny zakończone grupami karboksylowymi, służące jako miejsca o wysokim powinowactwie wiązania dla plazminogenu. Z uwagi na to, że plazminogen związany z fibryną o wiele łatwiej uaktywnia się do plazminy niż wolny plazminogen, mechanizm ten umożliwia regulację fibrynolizy z dodatnim sprzężeniem zwrotnym.

Jednym z endogennych inhibitorów fibrynolizy jest CPU. CPU jest określany również jako oszczowa karboksypeptydaza B, aktywny inhibitor fibrynolizy uaktywniany przez trombinę (TAFIa), karboksypeptydaza R lub indukowalna aktywność karboksypeptydazowa. CPU powstaje z prekursora, prokarboksypeptydazy U (proCPU) w wyniku działania enzymów proteolitycznych, np. trombiny, kompleksu trombina-trombomodulina lub plazminy. CPU rozszczepia zasadowe aminokwasy na karboksylowym końcu fragmentów fibryny. Ubytek zakończonych grupami karboksylowymi lizyn, a tym samym lizynowych miejsc wiązania dla plazminogenu powoduje następnie hamowanie fibrynolizy.

Nieoczekiwanie stwierdzono, że w porównaniu z osobnym stosowaniem inhibitorów CPU i trombiny, stosowanie zgodnie z wynalazkiem połączenia inhibitora CPU i inhibitora trombiny wzmacnia działanie przeciwzakrzepowe, a tym samym zmniejsza ryzyko zakrzepicy i nadkrzepliwości we krwi i tkankach ssaków. Ponadto wynalazek umożliwia podawanie mniejszych dawek substancji czynnych, a tym samym zmniejsza ryzyko potencjalnych działań ubocznych inhibitorów trombiny.

Zatem wynalazek dotyczy preparatu farmaceutycznego cechującego się tym, że zawiera inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest mergetpa lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, oraz inhibitor trombiny, inogatran, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem; albo

inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest kwas 3-(6-aminopirydyn-3-ylo)-2-merkaptometylopropanowy jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, oraz inhibitor trombiny, melagatran, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem.

Korzystnie preparat farmaceutyczny według wynalazku cechuje się tym, że stosunek molowy inhibitora karboksypeptydazy U do inhibitora trombiny wynosi od około 1000:1 do około 1:1000, korzystnie od 50:1 do 1:50.

Ponadto wynalazek dotyczy zestawu składników cechującego się tym, że zawiera:

pojemnik zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest mergetpa lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, oraz pojemnik zawierający inhibitor trombiny, inogatran; albo

pojemnik zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest kwas 3-(6-aminopirydyn-3-ylo)-2-merkaptometylopropanowy lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, oraz pojemnik zawierający inhibitor trombiny, melagatran,

a także instrukcje dotyczące podawania kolejno, osobno lub równocześnie inhibitorów karboksypeptydazy U i trombiny potrzebującemu tego pacjentowi.

Korzystnie zestaw według wynalazku, cechuje się tym, że stosunek molowy inhibitora karboksypeptydazy U do inhibitora trombiny wynosi od około 1000:1 do około 1:1000, korzystnie od 50:1 do 1:50.

Ponadto wynalazek dotyczy zestawu składników cechującego się tym, że zawiera:

preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest mergetpa lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem; oraz preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor trombiny, inogatran, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem; albo

preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest kwas 3-(6-aminopirydyn-3-yl)-2-merkaptometylopropanowy jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem, oraz preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor trombiny, melagatran, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem,

przy czym każdy z inhibitorów karboksypeptydazy U i trombiny jest w postaci odpowiedniej do podawania w połączeniu z drugim.

Korzystnie zestaw według wynalazku, cechuje się tym, że inhibitory karboksypeptydazy U i trombiny są odpowiednie do podawania kolejno, osobno lub równocześnie.

Korzystnie zestaw według wynalazku, cechuje się tym, że stosunek molowy inhibitora karboksypeptydazy U do inhibitora trombiny wynosi od około 1000:1 do około 1:1000, korzystnie od 50:1 do 1:50.

Wynalazek również dotyczy powyżej zdefiniowanego preparatu do stosowania w terapii medycznej.

Wynalazek również dotyczy zestawu składników zawierającego:

pojemnik zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest mergetpa lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, oraz pojemnik zawierający inhibitor trombiny, inogatran; albo

pojemnik zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest kwas 3-(6-aminopirydyn-3-yl)-2-merkaptometylopropanowy lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, oraz pojemnik zawierający inhibitor trombiny, melagatran,

a także instrukcje dotyczące podawania kolejno, osobno lub równocześnie inhibitorów karboksypeptydazy U i trombiny potrzebującemu tego pacjentowi, do stosowania w terapii medycznej.

Korzystne cechy podane powyżej odnośnie tego zestawu składników odnoszą się również do powyższego rozwiązania.

Wynalazek również dotyczy zestawu składników zawierającego:

preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest mergetpa lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem; oraz preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor trombiny, inogatran, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem; albo

preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest kwas 3-(6-aminopirydyn-3-yl)-2-merkaptometylopropanowy lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem, oraz preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor trombiny, melagatran, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem,

przy czym każdy z inhibitorów karboksypeptydazy U i trombiny jest w postaci odpowiedniej do podawania w połączeniu z drugim,

do stosowania w terapii medycznej.

Korzystne cechy podane powyżej odnośnie tego zestawu składników odnoszą się również do powyższego rozwiązania.

Ponadto wynalazek dotyczy zastosowania powyżej zdefiniowanego preparatu do wytwarzania leku do leczenia zakrzepicy i nadkrzepliwości we krwi i tkankach ssaków, w tym ludzi.

Określenie „podawanie w połączeniu z” oznacza podawanie kolejno, osobno i/lub równocześnie odpowiednich preparatów zawierających dany inhibitor CPU i dany inhibitor trombiny, w trakcie leczenia odpowiedniego stanu, który to stan może być stanem ostrym lub przewlekłym. Korzystnie określenie to oznacza podawanie dwóch preparatów (ewentualnie w powtórzeniach) w wystarczająco bliskich odstępach czasu, aby wystąpiło korzystne działanie na pacjenta, silniejsze w trakcie leczenia odpowiedniego stanu niż w przypadku podawania (ewentualnie w powtórzeniach) któregośkolwiek z dwóch

preparatów oddzielnie, bez podawania drugiego preparatu w danym trakcie leczenia. Oszacowanie czy połączenie zapewnia silniejsze, korzystne działanie ogólnie w odniesieniu do określonego stanu, a także w odniesieniu do przebiegu leczenia tego stanu, będzie zależało od samego stanu, który się leczy lub któremu się zapobiega, przy czym może to określić rutynowo fachowiec.

Zatem określenie „w połączeniu z” oznacza, że jeden lub drugi z dwóch preparatów może być podawany (ewentualnie w powtórzeniach) przed podaniem, po podaniu i/lub w tym samym czasie, w którym jest podawany drugi składnik. Stosowane w tym kontekście określenia „podawany równocześnie” i „podawany w tym samym czasie, w którym” oznaczają, że poszczególne dawki inhibitora CPU i inhibitora trombiny są podawane w ciągu 48 godzin, np. w ciągu 24 godzin.

Zestaw składający się z wymienionych części wytwarza się sposobem polegającym na połączeniu określonego powyżej jednego składnika (a) z określonym powyżej drugim składnikiem (b), tak że te dwa składniki są odpowiednie do podawania w połączeniu ze sobą.

Określenie „połączenie” dwóch składników ze sobą oznacza, że te składniki (a) i (b) mogą być:

- (i) dostarczone w postaci odrębnych preparatów (czyli niezależnie od siebie), które następnie łączy się w celu zastosowania w połączeniu jeden z drugim w leczeniu skojarzonym; albo
- (ii) pakowane i oferowane razem w postaci oddzielnych składników „złożonego opakowania” do stosowania w połączeniu jeden z drugim w leczeniu skojarzonym.

W celu uniknięcia wątpliwości stosowane w opisie określenie „leczenie” obejmuje stosowanie terapeutyczne i/lub profilaktyczne.

Zakresem wynalazku są objęte zarówno czyste enancjomery, mieszaniny racemiczne, jak i mieszaniny dwóch enancjomerów w nierównych ilościach. Należy zdawać sobie sprawę, że wszystkie możliwe postacie diastereoizomeryczne są również objęte zakresem wynalazku.

W zależności od warunków procesu związki określane jako inhibitory CPU można wytwarzać w postaci obojętnej, jako sole, np. jako farmaceutycznie dopuszczalne sole, lub jako solваты, np. jako hydraty, przy czym wszystkie takie postacie są objęte zakresem wynalazku.

Inhibitory trombiny obejmują $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cha-Pic-Nag-H}$ (znany jako inogatran) i $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab-H}$ (znany jako melagatran) (patrz odpowiednio publikacje międzynarodowego zgłoszenia patentowego nr WO 93/11152 i WO 94/29336, oraz zestawienia zamieszczonych tam skrótów).

W publikacji międzynarodowego zgłoszenia patentowego nr WO 97/23499 ujawniono szereg związków, które, jak to stwierdzono, są użyteczne jako proleki inhibitorów trombiny. Takie proleki są określone ogólnym wzorem



w którym R^a oznacza atom wodoru, benzyl lub C_{1-10} alkil, R^b (który zastępuje jeden z atomów wodoru grupy amidynowej w Pab-H) oznacza OH, OC(O)R^c lub C(O)OR^d , gdzie R^c oznacza C_{1-17} alkil, fenyl lub 2-naftyl, a R^d oznacza C_{1-12} alkil, fenyl, C_{1-3} alkilofenyl lub 2-naftyl. Do korzystnych związków należą związki o wzorze $\text{R}^a\text{OOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab-OH}$, w którym R^a oznacza benzyl lub C_{1-10} alkil, np. etyl lub izopropyl, a zwłaszcza $\text{EtOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab-OH}$. Same aktywne inhibitory trombiny ujawniono w publikacji WO 94/29336.

Preparaty farmaceutyczne

Jak podano powyżej, wynalazek dotyczy preparatów farmaceutycznych, zawierających jako substancje czynne inhibitor CPU (mergetpę lub kwas 3-(6-aminopirydyn-3-ylo)-2-merkaptometylopropanowy) i inhibitor trombiny (inogatran lub melagatran) lub ich farmaceutycznie dopuszczalne sole.

Odpowiednie preparaty, w których stosuje się $\text{HOOC-CH}_2\text{-(R)Cgl-Aze-Pab-H}$ (melagatran) opisano w literaturze, między innymi np. w publikacjach międzynarodowych zgłoszeń patentowych nr WO 94/29336, WO 96/14084, WO 96/16671, WO 97/23499, WO 97/39770, WO 97/45138, WO 98/16252, WO 99/27912 i WO 99/27913.

Do stosowania klinicznego inhibitor CPU i inhibitor trombiny formuluje się w preparat farmaceutyczny do podawania doustnego, dożylnego, podskórnego, dotchawiczego, dooskrzelowego, donosowego, dopłucznego, przezskórnego, podpoliczkowego, doodbytniczego, pozajelitowego lub pewnymi innymi drogami podawania. Preparat farmaceutyczny zawiera inhibitory w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem i/lub nośnikiem.

Całkowita zawartość substancji czynnych w preparacie wynosi dogodnie około 0,1-95% wag., zwykle 0,5-50% wag., korzystnie 1-25% wag.

Stosunek molowy inhibitora CPU do inhibitora trombiny może wynosić od około 1000:1 do około 1:1000. Dogodnie stosunek molowy inhibitora CPU do inhibitora trombiny wynosi od 300:1 do 1:300, korzystnie od 50:1 do 1:50.

W procesie wytwarzania preparatów farmaceutycznych według wynalazku substancje czynne można mieszać ze stałymi, sproszkowanymi składnikami, takimi jak laktoza, sacharoza, sorbitol, mannitol, skrobia, amylopektyna, pochodne celulozy, żelatyna lub inny odpowiedni składnik, a także ze środkami rozsadzającymi lub środkami smarującymi, takimi jak stearynian magnezu, stearynian wapnia, stearylofumarany sodu i glikole polietylenowe w postaci wosków. Mieszaninę można następnie poddać granulowaniu lub sprasować w tabletki.

Substancje czynne można osobno wstępnie mieszać z innymi składnikami nie będącymi substancjami czynnymi, przed zmieszaniem dla otrzymania preparatu. Można także mieszać ze sobą substancje czynne, przed zmieszaniem ze składnikami nie będącymi substancjami czynnymi, dla otrzymania preparatu.

Można wytwarzać miękkie kapsułki żelatynowe zawierające mieszaninę substancji czynnych według wynalazku, oleju roślinnego, tłuszczu lub innego odpowiedniego nośnika stosowanego w miękkich kapsułkach żelatynowych. Twarde kapsułki żelatynowe mogą zawierać granulki substancji czynnych. Twarde kapsułki żelatynowe mogą również zawierać substancje czynne w połączeniu ze stałymi sproszkowanymi składnikami, takimi jak laktoza, sacharoza, sorbitol, mannitol, skrobia ziemniaczana, skrobia kukurydziana, amylopektyna, pochodne celulozy lub żelatyna.

Jednostkowe postacie dawkowane do podawania doodbytniczego można wytwarzać (i) w postaci czopków zawierających substancję czynną zmieszaną z obojętnym podłożem tłuszczowym; (ii) w postaci żelatynowej kapsułki doodbytniczej, która zawiera substancję czynną w mieszaninie z olejem roślinnym, olejem parafinowym lub innym odpowiednim nośnikiem stosowanym w żelatynowych kapsułkach doodbytniczych; (iii) w postaci gotowego do użycia mikrowlewu; albo (iv) w postaci suchego preparatu do mikrowlewu, do roztwarzania w odpowiednim rozpuszczalniku tuż przed podaniem.

Ciekłe preparaty można wytwarzać w postaci syropów lub zawiesin, np. roztworów lub zawiesin zawierających substancje czynne i pozostałe składniki, np. cukier lub alkohole cukrowe oraz mieszaninę etanolu, wody, gliceryny, glikolu propylenowego i glikolu polietylenowego. Jeśli zachodzi potrzeba takie ciekłe preparaty mogą zawierać środki barwiące, środki smakowo-zapachowe, środki konserwujące, sacharynę i karboksymetylocelulozę lub inne środki zagęszczające. Ciekłe preparaty można również wytwarzać w postaci suchych proszków do roztwarzania w odpowiednim rozpuszczalniku przed użyciem.

Roztwory do podawania pozajelitowego można wytwarzać jako roztwory preparatu według wynalazku w farmaceutycznie dopuszczalnym rozpuszczalniku. Takie roztwory mogą również zawierać środki stabilizujące, środki konserwujące i/lub składniki buforujące. Roztwory do podawania pozajelitowego można również wytwarzać w postaci suchych preparatów do roztwarzania w odpowiednim rozpuszczalniku przed użyciem.

Dawka podawanego związku będzie zależeć od konkretnych wskazań, wieku, wagi i płci pacjenta i może być ustalana przez lekarza. Dawka będzie korzystnie wynosić 0,01-10 mg/kg.

Typowa dzienna dawka substancji czynnych zmienia się w szerokim zakresie i będzie zależeć od różnych czynników, takich jak konkretne wskazania, droga podawania, wiek, waga i płeć pacjenta i może być ustalana przez lekarza. Zazwyczaj dawki doustne lub pozajelitowe będą wynosić 0,1-1000 mg substancji czynnych łącznie.

W opisie „terapeutycznie skuteczna łączna ilość” dotyczy całkowitej ilości inhibitora CPU i inhibitora trombiny, która po podaniu tych substancji w połączeniu zapewnia działanie terapeutyczne, nawet jeśli ilość danej substancji przy podawaniu odrębnym może być mniejsza od ilości terapeutycznie skutecznej.

Zastosowanie medyczne i farmaceutyczne

Jak podano powyżej, wynalazek dotyczy również preparatów i zestawów do stosowania w terapii medycznej; zastosowania preparatów według wynalazku do wytwarzania leków do stosowania w leczeniu stanu, w którym jest wymagane lub pożądane hamowanie trombiny i/lub hamowanie CPU, tj. zakrzepicy i nadkrzepliwości we krwi i tkankach ssaków, w tym ludzi.

Wynalazek znajduje zatem zastosowanie do leczenia zgodnie z którym podaje się terapeutycznie skuteczną łączną ilość inhibitora CPU i inhibitora trombiny według wynalazku pacjentowi cierpiącemu lub podatnego na stan, w którym jest wymagane lub pożądane hamowanie trombiny i/lub hamowanie CPU.

Inhibitor CPU i inhibitor trombiny można podawać kolejno, osobno i/lub równocześnie. Ponadto inhibitor CPU można podawać przed podaniem inhibitora trombiny lub *vice versa*.

Stosowane tu określenie „terapia medyczna” obejmuje profilaktyczny, diagnostyczny i terapeutyczny tryb leczenia prowadzony *in vivo* lub *ex vivo* w odniesieniu do ludzi i innych ssaków.

Preparaty według wynalazku zawierają inhibitor CPU i inhibitor trombiny, jako takie lub, w przypadku proleków, po podaniu. Zatem oczekuje się, że preparaty według wynalazku będą użyteczne w leczeniu zakrzepicy i nadkrzepliwości we krwi i tkankach ssaków, w tym ludzi.

Wiadomo, że nadkrzepliwość może prowadzić do chorób zakrzepowo-zatorowych. Wśród stanów związanych z nadkrzepliwością i chorobami zakrzepowo-zatorowymi można wymienić dziedziczną lub nabytą oporność na uaktywnione białko C, taką jak mutacja czynnika V (czynnik V Leiden) i dziedziczne lub nabyte niedobory antytrombiny III, białka C, białka S, kofaktora heparyny II. Wiadomo, że inne stany związane z nadkrzepliwością i chorobami zakrzepowo-zatorowymi obejmują krążące przeciwciała antyfosfolipidowe (antykoagulant tocznia), homocysteinemię, indukowaną heparyną trombocytopenię i zakłócenia w fibrynolizie.

Leczenie stanów, w których występuje niepożądany nadmiar trombiny bez oznak nadkrzepliwości, np. chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera.

Określone stany chorobowe, które można wymienić obejmują leczenie i/lub profilaktykę zakrzepic naczyń (np. zakrzepicy żył głębokich) i zatorów tętnicy płucnej, zakrzepicy tętniczej (np. przy zawale mięśnia sercowego, niestabilnej dusznicy bolesnej, udarze wskutek zakrzepicy i obwodowej zakrzepicy tętniczej) i ogólnoustrojowych zatorów zwykle odpręśnikowych przy zwłóknieniu tętniczym lub od lewej komory przy pełnościennym zawale mięśnia sercowego lub spowodowanych przez zastoinową niewydolność serca; profilaktykę nawrotów niedrożności (czyli zakrzepicy) po rozpuszczeniu skrzepu, przezskórnej transluminalnej angioplastyce (PTA) i zabiegów związanych z wykonaniem połączenia omijającego zwężenia tętnicy wieńcowej; profilaktykę nawrotów zakrzepicy po zabiegach mikrochirurgicznych i ogólnie zabiegach chirurgii naczyniowej.

Inne wskazania obejmują leczenie i/lub profilaktykę rozszanego krzepnięcia wewnątrznaczyniowego spowodowanego przez bakterie, liczne urazy, zatrucie lub o innych mechanizmach; leczenie środkiem przeciw krzepnięciu przy kontakcie krwi z powierzchniami ciał obcych w organizmie, takimi jak przeszczepy naczyniowe, rurki umieszczone w naczyniu dla utrzymania jego drożności, cewniki naczyniowe, mechaniczne i biologiczne zastawki protetyczne lub jakiegokolwiek inne narzędzia medyczne; oraz leczenie środkiem przeciw krzepnięciu przy kontakcie krwi z narzędziami medycznymi poza organizmem, takimi jak podczas zabiegów chirurgii sercowo-naczyniowej przy użyciu aparatu płuc-serce lub przy hemodializie; leczenie i/lub profilaktykę zespołu ostrego wyczerpania oddechowego idiopatycznego i u dorosłych, zwłóknienia płucnego po leczeniu naświetlaniem lub chemioterapią, wstrząsu septycznego, posocznicy, odpowiedzi zapalnych, które obejmują, lecz nie wyłącznie obrzęki, ostrą lub przewlekłą miażdżycę tętnic, taką jak choroba tętnic wieńcowych, choroba tętnic mózgowych, choroba tętnic obwodowych, uszkodzenie reperfuzyjne i nawrót zwężenia po przezskórnej transluminalnej angioplastyce (PTA).

P r z y k ł a d y

Wynalazek ilustrują poniższe przykłady.

Materiały i metody

Materiały

Batroksobinę nr 520 CRY (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA) przechowywano w 8°C, zarówno w stanie zliofilizowanym, jak i po rozpuszczeniu w roztworze soli do stężenia 10 BU/ml. Stosowano ją w doświadczeniach przez 5 dni. Resztę leku zamrażano i przechowywano w -20°C przez co najwyżej 30 dni.

Endotoksynę L-3129 (Sigma, St. Louis, MO, USA) rozpuszczono w roztworze soli do stężenia 50 µg/ml. Do każdego doświadczenia przygotowywano świeży roztwór.

Ludzki fibrynogen znakowany ¹²⁵I (Amersham, Little Chalfont, Buck, Wielka Brytania) przechowywano w stanie zliofilizowanym w 8°C. Po rozpuszczeniu w roztworze soli/wodzie destylowanej (80/20 objętościowo) w celu otrzymania roztworu podstawowego o zawartości około 0,8 MBq/ml (20 µCi/ml) roztwór podzielono na podwielokrotne porcje (po jednej na każde doświadczenie), szybko zamrażano i przechowywano w -20°C. Stosowano go w doświadczeniach przez 14 dni od daty produkcji.

Inaktywną, sól sodową tiobutabarbitalu (Research Biochemicals International, Natick, USA) rozpuszczono w roztworze soli/wodzie destylowanej (50/50 objętościowo) do stężenia 50 mg/ml.

Inhibitor trombiny, inogatran, rozpuszczano w 40% (wag.) roztworze cyklodekstryny (HB β CD) do stężenia 5 mg/ml i przechowywano w -20°C. Przed użyciem w różnych doświadczeniach rozcieńczano go 40% roztworem cyklodekstryny. W badaniach lek podawano podskórnie.

Inhibitor trombiny melagatran rozpuszczano w roztworze soli.

Inhibitory CPU, MERGETPA i związek A, rozpuszczano w odtlenionym roztworze soli. Roztwór soli odtleniano drogą obróbki ultradźwiękami przez 20 minut, a następnie przepuszczania azotu przez kolejne 20 minut. Do każdego doświadczenia zawsze przygotowywano świeże roztwory. Inhibitor CPU podawano szczurom drogą infuzji i.v. trwającej 5 minut.

Zwierzęta

W doświadczeniach stosowano samce szczurów szczepu Sprague Dawley (Charles River, Szwecja), ważące 325-425 g. Tydzień przed użyciem w doświadczeniach zwierzęta pozostawiono by się oswoiły z warunkami w laboratoriach AstraZeneca R&D, Mölndal, Szwecja.

Przygotowanie zwierząt

Znieczulenie wywołano i utrzymywano z użyciem inaktywnego 100 mg/kg i.p.

W lewej żyły szyjnej umieszczano dwa cewniki, jeden do podawania 125 I fibrynogenu i batroksobiny, a drugi do podawania endotoksyny i inhibitora CPU lub odpowiednich ich nośników. W tętnicy szyjnej umieszczano trzeci cewnik do pobierania próbek krwi i pomiaru średniego tętniczego ciśnienia krwi i częstości akcji serca. Dla uniknięcia powstawania skrzepin krwi w cewniku tętniczym przez cały czas doświadczenia prowadzono powolną infuzję roztworu soli (około 1,0 ml/kg*h). Szczurom wykonano tracheotomię w celu ułatwienia samorzutnego oddychania. Temperaturę ciała monitorowano i utrzymywano na poziomie 38°C przez zewnętrzne ogrzewanie.

Procedura doświadczalna

Na początku doświadczenia zwierzętom wstrzykiwano i.v. endotoksynę (50 μ g/kg). Po upływie 2 godzin wstrzykiwano podskórnie inhibitor trombiny lub jego nośnik, a po upływie kolejnych 15 minut podawano 125 I fibrynogen (0,04 MBq) drogą iniekcji dożylną (i.v.). Po upływie 5 minut rozpoczynano trwającą 5 minut infuzję inhibitora CPU lub jego nośnika. Po 5 minutach podawano batroksobinę (10 BU/kg) w postaci iniekcji dożylną (bolus), trwającej 1 minutę.

We wszystkich doświadczeniach próbki krwi do oznaczania zawartości 125 I pobierano tuż przed podaniem batroksobiny oraz w 5, 20 i 30 minut po jej podaniu. Po zakończeniu doświadczenia wycinano płuca, tkankę łagodnie przemywano roztworem soli, osuszano bibułą i ważono. Zawartość 125 I w tkance i próbkach krwi oznaczano z użyciem licznika Wallac 1282 Compugamma. Stężenie 125 I w osoczu i w płucach wyrażano jako procent radioaktywności w stosunku do próbki krwi tętnicznej pobranej tuż przed wstrzyknięciem batroksobiny.

Przykład 1

Inhibitor CPU, mergetpa (kwas DL-2-merkaptometylo-3-guanidynoetylotiopropionowy), znany np. z Biochimica & Biophysica Acta 1034 (1990), 86-92, zastosowano w połączeniu z inhibitorem trombiny, inogatranem.

Wyniki doświadczeń przedstawiono w tabeli I. Wyniki wyrażono jako procent fibryny pozostającej w płucach po leczeniu, czyli 100% oznacza brak działania; n oznacza liczbę doświadczeń (szczurów).

T a b e l a I
Wpływ na osadzanie się fibryny w płucach u znieczulonych szczurów
w doświadczeniach ze środkiem MERGETPA i/lub inogatranem

Inhibitor CPU		Inhibitor trombiny		Inhibitor CPU + inhibitor trombiny	
Dawka (μ mole/kg)	Fibryna pozostająca po leczeniu (% $\pm$ SD)	Dawka (μ mole/kg)	Fibryna pozostająca po leczeniu (% $\pm$ SD)	Dawka (μ mole/kg)	Fibryna pozostająca po leczeniu (% $\pm$ SD)
1	2	3	4	5	6
2,1	-	0,6	-	2,1 + 0,6	100 $\pm$ 23,9 n = 6
4,2	-	1,2	-	4,2 + 1,2	62 $\pm$ 21,9 n = 6
8,4	90 $\pm$ 18,1 n = 6	2,3	94 $\pm$ 20,2 n = 6	8,4 + 2,3	26 $\pm$ 13,3 n = 9

cd. tabeli I

1	2	3	4	5	6
21,1	$37 \pm 19,3$ n = 6	3,4	$72 \pm 23,6$ n = 6	-	-
33,7	$23 \pm 17,3$ n = 6	5,7	$41 \pm 20,3$ n = 6	-	-
-	-	17,2	$39 \pm 15,9$ n = 6		

Z tabeli I wynika, że podawanie połączenia inhibitora CPU i inhibitora trombiny jest korzystniejsze od podawania któregośkolwiek z inhibitorów pojedynczo, w odniesieniu do fibryny pozostającej po leczeniu.

Przykład 2

Inhibitor CPU (kwas 3-(6-aminopirydyn-3-ylo)-2-merkaptometylo)propanowy (związek A) zastosowano w połączeniu z inhibitorem trombiny, melagatranem.

Wyniki tych doświadczeń przedstawiono w tabeli II. Wyniki wyrażono jako procent fibryny pozostającej w płucach po leczeniu, czyli 100% oznacza brak działania; n oznacza liczbę doświadczeń (szczurów).

Tabela II
Wpływ na osadzanie się fibryny w płucach u znieczulonych szczurów
w doświadczeniach ze związkiem A i/lub melagatranem

Inhibitor CPU		Inhibitor trombiny		Inhibitor CPU + inhibitor trombiny	
Dawka (μ mole/kg)	Fibryna pozostająca po leczeniu (% $\pm$ SD)	Dawka (μ mole/kg)	Fibryna pozostająca po leczeniu (% $\pm$ SD)	Dawka (μ mole/kg)	Fibryna pozostająca po leczeniu (% $\pm$ SD)
0,20	$100 \pm 25,8$ n = 8	0,23	$97 \pm 12,4$ n = 6	0,20 + 0,23	$75 \pm 35,2$ n = 5
0,28	$88 \pm 23,2$ n = 4	0,35	$77 \pm 22,4$ n = 4	0,28 + 0,35	$19 \pm 13,9$ n = 8
0,4	$87 \pm 50,6$ n = 6	0,58	$62 \pm 17,0$ n = 2	-	-
2,0	$49 \pm 30,0$ n = 7	1,75	$31 \pm 13,3$ n = 4	-	-
4,0	$15 \pm 9,3$ n = 4	3,5	$55 \pm 21,7$ n = 4	-	-
20,0	$7 \pm 1,4$ n = 2	-	-	-	-

Z tabeli II wynika, że podawanie połączenia inhibitora CPU i inhibitora trombiny jest korzystniejsze od podawania któregośkolwiek z inhibitorów pojedynczo, w odniesieniu do fibryny pozostającej po leczeniu.

Przykład 3

Inhibitor CPU (kwas 3-(6-aminopirydyn-3-ylo)-2-merkaptometylo)propanowy (związek A) zastosowano w połączeniu z inhibitorem trombiny, melagatranem.

Wyniki tych doświadczeń przedstawiono w tabeli III. Wyniki wyrażono jako procent fibryny pozostającej w płucach po leczeniu, czyli 100% oznacza brak działania; n oznacza liczbę doświadczeń (szczurów).

T a b e l a III
Potwierdzenie synergistycznego działania na osadzanie się fibryny
w płucach u znieczulonych szczurów w doświadczeniach ze związkiem A i melagatranem

Inhibitor CPU (związek A)		Inhibitor trombiny (melagatran)		Inhibitor CPU + inhibitor trombiny	
Dawka (μ mole/kg)	Fibryna pozostająca po leczeniu (% $\pm$ SD) n	Dawka (μ mole/kg)	Fibryna pozostająca po leczeniu (% $\pm$ SD) n	Dawka (μ mole/kg)	Fibryna pozostająca po leczeniu (% $\pm$ SD) n
0,20	97 $\pm$ 24,1 n = 10	0,18	110 $\pm$ 15,2 n = 3	-	-
0,20	97 $\pm$ 24,1 n = 10	0,23	98 $\pm$ 11,5 n = 7	0,20 + 0,23	70 $\pm$ 33,8 n = 6
0,20	97 $\pm$ 24,1 n = 10	0,30	87 $\pm$ 27,6 n = 3	0,20 + 0,30	51 $\pm$ 33,3 n = 5
0,20	97 $\pm$ 24,1 n = 10	0,35	77 $\pm$ 22,4 n = 4	0,20 + 0,35	35 $\pm$ 24,3 n = 5
0,20	97 $\pm$ 24,1 n = 10	0,70	-	0,20 + 0,70	18 $\pm$ 12,7 n = 2
0,28	81 $\pm$ 24,5 n = 5	0,18	110 $\pm$ 15,2 n = 3	0,28 + 0,18	71 $\pm$ 33,2 n = 5
0,28	81 $\pm$ 24,5 n = 5	0,23	98 $\pm$ 11,5 n = 7	0,28 + 0,23	42 $\pm$ 28,3 n = 5
0,28	81 $\pm$ 24,5 n = 5	0,30	87 $\pm$ 27,6 n = 3	-	-
0,28	81 $\pm$ 24,5 n = 5	0,35	77 $\pm$ 22,4 n = 4	0,28 + 0,35	20 $\pm$ 13,3 n = 9
0,28	81 $\pm$ 24,5 n = 5	0,42	-	0,28 + 0,42	9 $\pm$ 3,5 n = 2

W przypadku każdej z czterech różnych kombinacji dawek, sam inhibitor CPU, sam inhibitor trombiny oraz inhibitor trombiny wraz z inhibitorem CPU w dawce odpowiednio 0,2 i 0,28 μ mola/kg, dopasowywano odrębne modele E-max. Modele dopasowywano w skali logarytmicznej, otrzymując szacunkowe wartości mediany skutecznej dawki, czyli dawki, przy której u połowy populacji osiągnięto 50% efekt. Na fig. 1 przedstawiono przedziały ufności dla tych wartości ED_{50} .

Przy braku działania synergistycznego wartość ED_{50} dla połączenia inhibitora CPU z inhibitorem trombiny powinna leżeć na linii łączącej wartości ED_{50} dla każdego z leków podawanych osobno (patrz fig. 1). W celu oszacowania działania synergistycznego wszystkie cztery kombinacje dawek dopasowano do modelu E-max, przy czym ED_{50} dla inhibitora trombiny wraz z inhibitorem CPU w dawce odpowiednio 0,2 i 0,28 μ mola/kg modelowano z użyciem parametru Δ , jak to przedstawiono na figurze. Wartość parametru Δ oszacowano na 0,52 przy 95% przedziale ufności (0,116 - 0,934); był on statystycznie różny od 0, $p < 0,001$.

Skróty

Aze = kwas (S)-azetyldyno-2-karboksylowy

BU = jednostki batroksobiny, określone przez American Diagnostica Inc., USA

Cha = β -cykloheksyloalanina

Cgl = (S)-cykloheksyloglicyna

HP β CD = hydroksypropylo- β -cyklodekstryna

i.p. = śródtrzewnowo

i.v. = dożylnie

Nag-H = noragmatyna

Pab-H = 1-amidyno-4-aminometylobenzen

Pic = kwas pipekolinowy

SD = odchylenie standardowe

Zastrzeżenia patentowe

1. Preparat farmaceutyczny, **znamienny tym**, że zawiera inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest mergetpa lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, oraz inhibitor trombiny, inogatran, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem; albo inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest kwas 3-(6-aminopirydyn-3-ylo)-2-merkaptometylopropanowy lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, oraz inhibitor trombiny, melagatran, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem.

2. Preparat farmaceutyczny według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek molowy inhibitora karboksypeptydazy U do inhibitora trombiny wynosi od około 1000:1 do około 1:1000, korzystnie od 50:1 do 1:50.

3. Zestaw składników, **znamienny tym**, że zawiera:

pojemnik zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest mergetpa lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, oraz pojemnik zawierający inhibitor trombiny, inogatran; albo

pojemnik zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest kwas 3-(6-aminopirydyn-3-ylo)-2-merkaptometylopropanowy lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, oraz pojemnik zawierający inhibitor trombiny, melagatran,

a także instrukcje dotyczące podawania kolejno, osobno lub równocześnie inhibitorów karboksypeptydazy U i trombiny potrzebującemu tego pacjentowi.

4. Zestaw według zastrz. 3, **znamienny tym**, że stosunek molowy inhibitora karboksypeptydazy U do inhibitora trombiny wynosi od około 1000:1 do około 1:1000, korzystnie od 50:1 do 1:50.

5. Zestaw składników, **znamienny tym**, że zawiera:

preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest mergetpa lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem; oraz preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor trombiny, inogatran, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem; albo

preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor karboksypeptydazy U, którym jest kwas 3-(6-aminopirydyn-3-ylo)-2-merkaptometylopropanowy lub jego farmaceutycznie dopuszczalna sól, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem, oraz preparat farmaceutyczny zawierający inhibitor trombiny, melagatran, w mieszaninie z farmaceutycznie dopuszczalnym środkiem pomocniczym, rozcieńczalnikiem lub nośnikiem,

przy czym każdy z inhibitorów karboksypeptydazy U i trombiny jest w postaci odpowiedniej do podawania w połączeniu z drugim.

6. Zestaw według zastrz. 5, **znamienny tym**, że inhibitory karboksypeptydazy U i trombiny są odpowiednie do podawania kolejno, osobno lub równocześnie.

7. Zestaw według zastrz. 5 albo 6, **znamienny tym**, że stosunek molowy inhibitora karboksypeptydazy U do inhibitora trombiny wynosi od około 1000:1 do około 1:1000, korzystnie od 50:1 do 1:50.

8. Preparat zdefiniowany w zastrz. 1 i 2 do stosowania w terapii medycznej.

9. Zestaw składników zdefiniowany w zastrz. 3 i 4 do stosowania w terapii medycznej.

10. Zestaw składników zdefiniowany w zastrz. 5 - 7 do stosowania w terapii medycznej.

11. Zastosowanie preparatu zdefiniowanego w zastrz. 1 i 2 do wytwarzania leku do leczenia zakrzepicy i nadkrzepliwości we krwi i tkankach ssaków, w tym ludzi.

Rysunek

Fig. 1



