

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 803995 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 803995

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 22.12.1980

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 22.12.1980

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 29.06.1981

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

28.12.1979 IT 28416_A/79

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Italfarmaco S.p.A., Viale Fulvio Testi, 330 Milano, Italia, ITALIA, (IT)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Sportoletti, Giancarlo, TOWN UNKNOWN, ITALIA, (IT)

2 • Baglioni, Alessandro, TOWN UNKNOWN, ITALIA, (IT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

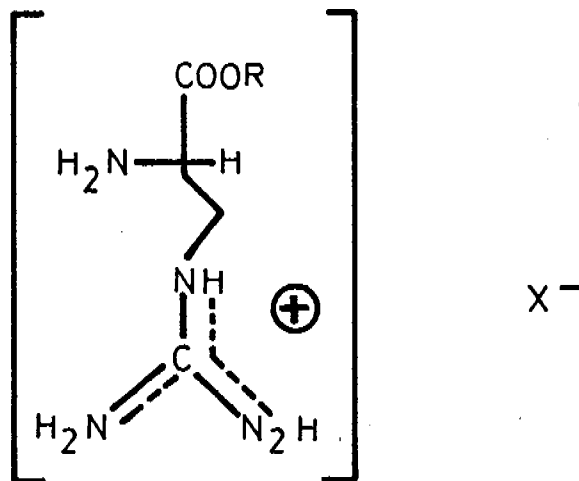
Farmaseuttisia seoksia, jotka ovat terapeuttisesti arvokkaita hoidettaessa akuuttia pulmonaarista edeemaaeräitä shokkitiloja ja hyperfibrinolyysiä, sekä menetelmä seoksen valmistamiseksi.

Farmaceutiska blandningar, som är terapeutiskt värdefulla vid skötsel av pulmonaris edema, vissa choktilchoktillstånd och hyperfibrinolys, samt förfarande för framställning av blandningen.

Farmaseuttisia seoksia, jotka ovat terapeuttisesti arvokkaita hoidettaessa akuuttia pulmonaarista edeemaa, eräitä shokkitiloja ja hyperfibrinolyysiä, sekä menetelmä seoksen valmistamiseksi. - Farmaceutiska blandningar, som är terapeutiskt värdefulla vid skötsel av pulmonaris edema, vissa choktillstånd och hyperfibrinolys, samt förfarande för framställning av blandningen.

Oheisen keksinnön kohteena ovat uudet terapeuttiset seokset, jotka ovat erityisesti hyödyllisiä akuuttia pulmonaarista edeemaa, bakteereiden endotoksiinien aiheuttamaan shokkia, hyperfibrinolyysiä ja anafylaktista shokkia vastaan. Tarkemmin sanoen keksinnön kohteena ovat L-arginiinin esterit.

Tunnetaan monia L-arginiinin estereitä, kuten esimerkiksi alifaattisten alkoholien kanssa muodostettuja estereitä, joilla on seuraava kaava:



jossa X on orgaaninen tai epäorgaaninen, farmaseuttisesti hyväksyttävä anioni; R on alkyyliryhmä.

Nämä esterit alifaattisten alkoholien kanssa saadaan esteröimällä L-arginiini millä tahansa, kirjallisuudessa raportoidulla menetelmällä, esimerkiksi saattamalla

L-arginiini reagoimaan alifaattisen alkoholin kanssa, joka on kyllästetty kuivalla kaasumaisella kloorivedyllä, tai esteröimällä poistamalla vettä aseotrooppisesti tislamalla tai saattamalla reagoimaan alkoholin kanssa tionyylikloridin läsnäollessa tai samanlaisilla menetelmillä. Nämä esterit, esimerkiksi hydrokloridisuoloina, ovat stabiileja kiinteässä tilassa ja näistä estereistä on mahdollista valmistaa liuoksia neutraalissa tai hieman happamassa pH-arvossa. Liuokset ovat stabiileja hyvin pitkiä aikoja.

Nyttemmin on yllättäen havaittu, että arginiinin ja alifaattisten alkoholien estereillä ja niiden suoloilla on arvokkaita terapeuttisia ominaisuuksia eräiden patologisten tilojen lievittämisessä. Tämä parenteraalista tietä annettava aine muodostuu vesiliuoksesta, jonka pH on 5,5 - 8,5 ja joka sisältää arginiinin ja epäorgaanisen tai orgaanisen anionin esterinä moolisuhteessa 1:1 tai jossain eri moolisuhteessa. Tarkemmin sanoen estereillä ja niiden vastaavilla suoloilla on inhiboiva vaikutus akuuttiin pulmonaariseen edemaan ja ne lisäävät odotettavissa olevaa elinaikaa, kun on kysymys shokki-syndroomasta, joka johtuu eri syistä, kuten bakteereiden endotoksiineista tai immunotyyppisistä endotoksiineista.

Edelleen on havaittu, että L-arginiinin estereillä on arvokas in vivo aktiivisuus hyperfibrinolyttisessä syndroomassa, joka on aiheutettu antamalla urokinaasia. On huomattava, että kaikki nämä terapeuttiset vaikutukset saavutetaan sellaisilla annoksilla ja sellaisia antamistietoja, joilla ei ole merkittäviä toksisia vaikutuksia ja että yleisesti ottaen kaikkien näiden aineiden toksisuus on hyvin alhainen. Kun otetaan huomioon annostus, antamistiet ja yleisesti tapa, jolla vaikutukset saadaan eläimissä aikaan, nämä aineet ovat myös hyödyllisiä ihmisten terapiassa hoidettaessa edellä mainitun tyyppisiä patologisia tiloja.

Oheisen keksirnön farmaseuttisten seosten aktiivisuus on osoitettu jäljempänä koottujen koetulosten avulla.

Suojavaikutus pulmonaarista edeemaa vastaan

A.M. Rothschild'in ja A. Castania'n menetelmällä (Arch. Pharmacol., 295, 177 (1976)) kehitettiin akuutti edeema keuhkoihin. Vertailuna käytettiin aineita, joiden terapeuttinen aktiivisuus tunnettiin.

Testissä käytettiin Wistar-tyyppisiä urosalbinorottia, joiden keskimääräinen paino oli 250 - 350 g. Rotat stabiloitiin 10 päivän aikana lämpötilassa $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ kontrolloidun dieetin ja "ad libitum" veden avulla. Ennen testiä eläimet jaettiin 10 eläimen ryhmiin, jotta saataisiin aikaan hyvä tilastollisuus. Jokainen annos tutkittiin kolmella eläinryhmällä. Eläimet anestetisoitiin testin alussa pentobarbitaalilla 30 mg/kg. Sen jälkeen, kun eläimet olivat täydellisessä narkoosissa, niille annettiin parenteraalista tietä seuraavat aineet:

1. vertailuna käytetyille eläimille fysiologista suoalliuosta 1 ml/kg,
2. testieläimille testattavan aineen liuosta fysiologisessa suolaliuoksessa 1 ml/kg seuraavassa taulukossa ilmoitettuina annoksina.

Yhdisteiden suojavaikutus määritettiin antamalla 15 minuutin kuluttua laskimonsisäisesti adrenaliinia 16 γ /kg fysiologisessa suolaliuoksessa. Tämän tarkoituksena oli aiheuttaa akuutti edeema.

Viiden minuutin kuluttua eläimet tapettiin poistamalla pää. Tämän jälkeen poistettiin keuhkot ja määritettiin keuhkojen paino. Testitulokset on ilmoitettu seuraavassa taulukossa 1, jossa on esitetty yhdisteiden konsentraatio

ja edeeman surteellinen inhiboituminen prosenteissa.
Tulokset on käsitelty taulukoiden lopussa.

Taulukko 1

Yhdiste	Annos*	Edeeman inhiboituminen, %
Fysiologinen liuos 1 ml/kg+adrenaliini	-	0,00
Aspiriini	1	32,2
"	2,5	36,9
"	5	48,2
"	10	54,3
"	20	19,6
Aprotiniini**	30	17,3
"	100	36,5
"	300	54,5
"	1000	42,7
L-A.M.***	1	21,2
"	2,5	27,4
"	5	29,0
"	10	55,7
"	20	15,7
D-A.M.****	1	16,8
"	2,5	11,7
"	5	15,4
"	10	4,4
"	20	6,4
L.A.E.*****	0,1	3,4
"	0,25	32,2
"	0,5	33,3
"	1	55,7
"	2,5	47,9
"	5	41,0
"	10	38,9
"	20	39,7

Taulukko 1

Yhdiste	Annos*	Edeeman inhiboituminen, %
D-A.E.*****	0,1	7
"	0,25	11
"	0,5	3
"	1,0	4,2
"	2,5	7
"	5,0	5,3
"	10	6
"	20	2,5
L-arginiini.2HCl	1	7
"	2,5	9
"	5	11
"	10	10,1
"	20	13,1
Etanoli	0,08	7
"	0,8	12
"	2	15
"	4	14,7
"	8	16
"	16	15,9
Metanoli	0,08	2,3
"	0,8	5
"	2	12
"	4	6
"	8	15
"	16	15

Taulukko 1

Yhdiste	Annos*	Edeeman inhiboituminen, %
L-arginiini.2HCl+etanoli	1+0,08	10
"	2,5+0,8	9
"	5+2	5,3
"	10+4	7,2
"	20+8	4,6
L-arginiini.2HCl+metanoli	1+0,08	11,4
"	2,5+0,8	7,2
"	5+2	9,5
"	10+4	8,1
"	20+8	6

* mg/kg paitsi aprotiniinin tapauksessa, jolloin numeroiden merkitys on U.I.K./kg, so. Kunitz'in inhibiitioyksiköitä.

** käytettiin kaupallista farmaseuttista seosta, jota Farbenfabriken Bayer markkinoi nimellä "Trasylol".

*** L-A.M. = L-arginiinimetyyliesteri-hydrokloridi.

**** D.-A.M. = D-arginiinimetyyliesteri-hydrokloridi.

***** L-A.E. = L-arginiinietyyliesteri-hydrokloridi.

***** D-A.E. = D-arginiinietyyliesteri-hydrokloridi.

Suojavaikutus endotoksiinien aiheuttamaa shokkia vastaan

Endotoksiinin indusoima shokki aiheutettiin A. Bertelli'n ja L. Donati'n menetelmällä, joka on raportoitu julkaisussa "The Influence of Some Enzymes and Enzymes Inhibitors in Shock", in "SCHOK Biochemical, Pharmaceutical and

Clinical Aspects"; A. Bertelli ja N. Back Editors, Advances in Experimental Medicine and Biology; Volume 9, Plenum Press New York - London 1970, sivu 215. Vertailuna käytettiin terapeuttiselta aktiivisuudeltaan hyvin tunnettua yhdistettä, nimittäin aprotiniinia, jota Farbenfabriken Bayer markkinoi kaupallisena tuotteena nimellä "Trasylol". Koe-eläiminä käytettiin Wistar-tyyppisiä rottia, jotka painoivat $120 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$. Rotat oli edeltäkäsikin stabiloitu 10 päivän aikana lämpötilassa $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pitämällä niitä kontrolloidulla dieetillä ja vedellä "ad libitum". 24 tuntia ennen testin alkua eläimet jaettiin tilastollisuuden aikaansaamiseksi 10 eläimen ryhmiin. Jokainen yksittäinen annos testattiin kuudella eläinryhmällä.

Endotoksiinina käytettiin S. Enteritidis-bakteerista saatua lipopolysakkaridia B (Difco Labs.). Tätä ainetta annettiin 10 mg/kg endoperitoneaalisesti yksi tunti sen jälkeen, kun yhdistettä oli annettu parenteraalista tietä tai kun fysiologista liuosta oli annettu yhtä suuri tilavuus vertailuna käytettyjen eläinten painokiloa kohti.

Testattujen eläinten kuolleisuus prosenteissa määritettiin 24 tunnin kuluttua verrattuna vertailuihin. Tulokset on ilmoitettu seuraavassa taulukossa 2.

Taulukko 2

Yhdiste	Annos	Kuolleisuus, %
Fysiologinen liuos	-	70,9
Aprotiniini	1000	50,0
"	3000	65,0
"	10000	65,0
"	100000	93,3
L-A.M.	5	55,0
"	10	50,0
"	20	40,0
"	50	28,0
D-A.M.	5	71,2
"	10	68,5
"	20	69
"	50	73
L-A.E.	5	51,3
"	10	48,2
"	20	37,5
"	50	25,0
D-A.E.	5	72
"	10	67
"	20	69,3
"	50	71
L-arginiini.2HCl	5	69
"	10	73
"	20	71
"	50	78
Metanoli	2	76
"	4	72
"	8	74

Taulukko 2

Yhdiste	Annos	Kuolleisuus, %
Etanoli	2	67
"	4	69
"	8	73
L-arginiini.2HCl+metanoli	4+0,61	73
"	8+1,23	71
"	16+2,46	75
L-arginiini.2HCl+etanoli	4+1,06	69
"	8+2,12	71
"	16+4,24	74

Lyhennykset on selitetty taulukon 1 alla. Myös tässä tapauksessa aprotiniinin annokset ilmoitetaan U.I.K./kg yksikköinä.

Suojavaikutus anafylaktista shokkia vastaan

Anafylaktinen shokki indusoitiin S.M. Feimberg'in menetelmällä, J. Pharmacol. Exp. Terap., 99, 195 (1950). Koe-eläiminä käytettiin urospuolisia albinomarsuja, joiden paino oli keskimäärin 350 ± 20 g ja jotka oli edeltäkäsikin stabiloitu 10 päivän ajan lämpötilassa $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pitämällä niillä kontrolloidulla dieetillä ja vedellä "ad libitum". Kolme päivää ennen kokeen alkua eläimet jaettiin hyvän tilastollisuuden aikaansaamiseksi kymmenen eläimen ryhmiin. Kukin annos testattiin kolmella eläinryhmällä.

Herkistäminen tapahtui antamalla laskimonsisäisesti kullekin marsulle 1 ml hevosseerumia (koko seerumi, ei käsitelty säilytysaineilla, joka oli laimennettu 1:10 fysiologisella suolaliuoksella. 14 päivän kuluttua annettiin parenteraalisesti testattavien yhdisteiden

Taulukko 3

Yhdiste	Annos	Kuolleisuus, %
Fysiologinen liuos	-	80
Aprotiniini	3000	40
"	10000	55
"	100000	80
L-A.M.	10	40,5
"	20	27
"	50	12,5
D-A.M.	10	78,8
"	20	81,0
"	50	76,3
L-A.E.	10	35
"	20	23
"	50	9,5
D-A.E.	10	76,7
"	20	79,4
"	50	81,0
L-arginiini.2HCl	10	78,5
"	20	76,3
"	50	80
Metanoli	2	76,6
"	4	79,4
"	8	81
Etanoli	2	76,4
"	4	74
"	8	76,5

Taulukko 3

Yhdiste	Annos	Kuolleisuus, %
L-arginiini.2HCl+metanoli	4+0,61	77,3
"	8+1,23	76,3
"	16+2,46	81,0
L-arginiini.2HCl+etanoli	4+1,06	75,8
"	8+2,12	73,2
"	16+4,24	77,0

Annostuksen ja lyhennelmien suhteen viitataan taulukkoon 1.

Hyperfibrinolyysin inhiboiminen

Hyperfibrinolyysi indusoidaan antamalla urokinaasia. Inhiboituminen määritetään stafylokokkien kasautumistestin avulla (Boehringer Mannheim GmbH-testi) mitaamalla F.D.P. (Fibrin Degradation Products) arvo J. Hawiger'in et al menetelmällä, J. Lab. Clin. Med. 75, 93 (1970).

Koe-eläiminä käytetään Wistar-rottia, joiden paino on $300 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ ja jotka on edeltäkäs in stabiloitu 10 päivän ajan lämpötilassa $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pitämällä kontrolloidulla dieetillä ja vedellä "ad libitum". 24 tuntia ennen kokeen alkua eläimet jaetaan tilastollisuuden aikaansaamiseksi 10 eläimen ryhmiin. Kukin yksittäinen annos testataan kolmella eläinryhmällä.

Kokeen alussa eli hetkellä nolla testattavat yhdisteet annetaan parenteraalista tietä. Vertailueläimille annetaan samalla hetkellä yhtä suuri tilavuus fysiologista suolaliuosta ja sydämfunktion avulla poistetaan jonkin verran verta fibrinolyyttisen perusaktiivisuuden määrittämiseksi.

30 minuutin kuluttua annetaan intravenöösisti ihmisen urokinaasia (yhdistettä markkinoi Ukidan-Seorono) 2500 U.I/rotta. 10 minuutin kuluttua poistetaan veri sydän-funktion avulla ja määritetään F.D.P. ml:na. Näin saadut tulokset on koottu taulukkoon 4.

Taulukko 4

Yhdiste	Annos	F.D.P.
-	-	0,26 perusarvo
Fysiologinen liuos	-	3,30
Aprotiniini	1000	0,34
"	3000	0,29
"	10000	0,30
Traneksaamihappo	5	0,58
"	10	0,39
"	20	0,33
L-A.M.	5	0,48
"	10	0,30
"	20	0,25
D-A.M.	5	3,10
"	10	3,03
"	20	3,16
L-A.E.	5	0,50
"	10	0,33
"	20	0,27
D-A.E.	5	3,20
"	10	3,16
"	20	3,19
L-arginiini.2HCl	5	3,28
"	10	2,96
"	20	3,15

Taulukko 4

Yhdiste	Annos	F.D.P.
Metanoli	2	3,02
"	4	3,12
"	8	3,27
Etanoli	2	3,06
"	4	2,95
"	8	3,11
L-arginiini.2HCl+metanoli	4+0,61	3,00
"	8+1,23	3,12
"	16+2,46	3,20
L-arginiini.2HCl+etanoli	4+1,06	2,98
"	8+2,12	2,99
"	16+4,24	3,20

Annostuksen ja lyhennysten suhteen viitataan taulukkoon 1. Traneksaamihappo on trans-4-(aminometyyli)sykloheksaanikarboksyylihappo.

Edellisten taulukoiden 1 - 4 arvot osoittavat, että arginiinin etyyli- tai metyyliestereillä on merkittävä terapeuttinen vaikutus testien annostuksella ja että aktiivisuus on spesifinen yhdisteen rakenteen ja myös sen stereoisomeerian suhteen. Antamalla eläimille itse arginiinia tai itse alkoholeja tai arginiinin ja alkoholien seoksia tai D-arginiinin estereitä on itse asiassa saatu ei-merkitseviä tehoja tai tehoja, jotka ovat verrattavissa siihen, että eläimet on käsitelty vertailuna fysiologisella suolaliuoksella.

L-arginiinin estereiden, joiden terapeuttinen aktiivisuus on osoitettu edellisissä esimerkeissä, toksisuus on

testattu kahdella eläinlajilla, hiirellä intravenöösisti ja rotilla sekä intravenöösisti että endoperitoneaalisesti. Tulokset annostuksella DL-50 mg/kg ovat seuraavat:

Laji: urospuolinen sveitsiläinen albinohiiri, keskimääräinen paino 22 ± 1 g, antamistapa: endovenöösisti
DL-50: 315,6 mg/kg (L.F. = 276,5 - 360,2)

Laji: urospuolinen Wistar-albinorotta, keskimääräinen paino 180 ± 10 g
antamistapa: endovenöösisti
DL-50: 431,73 mg/kg (L.F. = 374,2 - 498,0)
antamistapa: endoperitoneaalisesti
DL-50: 1111,1 mg/kg (L.F. = 1002,9 - 1230,8).

On huomattava, että toksisuusarvot ovat huomattavasti korkeammalla alueella kuin terapeuttisiin tarkoituksiin käytetty annostus.

Kun aineita on annettu terveille eläimille edellä annetulla annostuksella ja edellä kuvattua antamistietä, tämä ei ole aiheuttanut kuolleisuutta eikä oireita toksisuudesta. Taulukkojen 1 - 4 tulokset osoittavat keksinnön mukaisten farmaseuttisten seosten terapeuttisen arvon.

Patenttivaatimukset

1. Farmaseuttinen seos, joka suojaa akuutilta pulmonaariselta edeemalta, eri tyyppisiltä shokeilta, mukaanlukien anafylaktinen shokki, ja plasminogeenin aktivoivien aineiden indusoimalta hyperfibrinolyysiltä, t u n n e t t u siitä, että se muodostuu liuoksesta, joka sisältää L-arginiinin esterä alifaattisen alkoholin kanssa tai sen suolaa yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän orgaanisen tai epäorgaanisen hapon kanssa vedessä pH-arvossa välillä 5,5 ja 8,5.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen seos yksikköannosmuodossa, jonka pitoisuus on 0,25 - 100 mg kohteen, jota hoidetaan parenteraalista tietä painokiloa kohti.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen seos, t u n n e t t u siitä, että shokki on bakteerien endotoksiinien aiheuttama.
4. Menetelmä suojata elävä kohde akuutilta pulmonaariselta edeemalta, shokkitilalta, mukaanlukien anafylaktinen shokki, tai plasminogeenin aktivoivien aineiden indusoimalta hyperfibrinolyysiltä, t u n n e t t u siitä, että kohteelle annetaan tehokas määrä L-arginiinin esterä alifaattisen alkoholin kanssa tai sen suolaa yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän orgaanisen tai epäorgaanisen hapon kanssa vesiliuoksessa pH-arvossa välillä 5,5 ja 8,5.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että L-arginiinin esterä annetaan hydrokloridina.
6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että alkoholi on metyyli- tai etyylialkoholi.

Patentkrav

1. Farmaceutisk blandning, som skyddar mot akut pulmonarisk edema, olika typers chocker, medräknat anafylaktisk chock och mot den hyperfibrinolys, som induceras av plasningen aktiverande ämnen, k ä n n e t e c k n a d därav, att den består av en blandning, som innehåller L-arginets ester tillsammans med alifatisk alkohol eller dess salt tillsammans med en farmaceutiskt accepterad organisk eller oorganisk syra i vatten med pH-värde mellan 5,5 och 8,5.
2. Blandning enligt patentkrav 1 i enhetsportionsform, vars halt är 0.25 - 100 mg per målets, som skötes på parenteral väg, viktkilogram.
3. Blandning enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att chocken förorsakats av bakteriernas endotoxiner.
4. Metod för att skydda ett levande mål mot akut pulmonarisk edema, chocktillstånd, medräknat anafylaktisk chock eller den hyperfibrinolys, som induceras av plasminogen aktiverande ämnen, k ä n n e t e c k n a d därav, att målet ges en effektiv mängd L-argininets ester tillsammans med alifatisk alkohol eller dess salt tillsammans med en farmaceutiskt accepterad organisk eller oorganisk syra i vattenlösning med pH-värde mellan 5,5 och 8,5.
5. Metod enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att L-argininets ester ges som hydroklorid.
6. Metod enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att alkoholen är metyl- eller etylalkohol.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Helena Kallio

Allekirjoitus