



(12) PATENTSKRIFT

Pateni- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl.: A 61 K 31/7004 A 61 K 31/522
(21) Patentansøgning nr: PA 1988 03057
(22) Indleveringsdag: 1988-06-03
(24) Løbedag: 1987-10-05
(41) Alm. tilgængelig: 1988-06-03
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2000-09-11
(86) International ansøgning nr: PCT/US87/02524
(86) Internationa: Indleveringsdag: 1987-10-05
(85) Videreførelsesdag: 1987-10-05
(30) Prioritet: 1986-10-06 US 915557
- (73) Patenthaver: University of Virginia Patents Foundation, 1224 West Main Street, Charlottesville, VA 22903, USA
(72) Opfinder: Robert M. Mentzer Jr., Dept. of Surgery, U.Va. Medical Center, Charlottesville, Virginia 22908, USA
Stephen W. Ely, Route 1, Box 55, Troy, Virginia 22974, USA
Robert M. Berne, Dept. of Physiology, U. Va. Medical Center, Charlottesville, Virginia 22908, USA
Robert D. Lasley, Dept. of Physiology, U. Va. Medical Center, Charlottesville, Virginia 22908, USA
- (74) Fuldmægtig: Chas. Hude A/S, H.C. Andersens Boulevard 33, 1553 København V, Danmark
-

- (54) Benævnelse: **Anvendelse af en adenosin-, hypoxanthin- og riboseholdig opløsning til forbedret beskyttelse af hjertet under kirurgi**
- (56) Fremdragne publikationer:
J. Thorac. Cardiovasc. Surg., vol 84, 1982, s. 16-22
Medline Abstract nr. 69036392 (Farmakol Toksikol(USSR), vol31, 1968, s. 273-277)
J Thorac. Cardiovasc. Surg., vol 90, 1985, s. 68-72
Chest, vol 83, 1983, s. 787-792
US A 4605644
- (57) Sammendrag:
Cardioplegisk opløsning til reduktion af iskæmisk beskadigelse af hjertet under operationer og/eller transplantationer. Opløsningen indeholder adenosin, hypoxanthin og ribose ud over de elektrolytter, som er i cardioplegiske standardopløsninger.

Den foreliggende opfindelse angår en forbedret cardioplegisk opløsning til beskyttelse af hjertet for iskæmifremkaldt beskadigelse fremkommet under afbrydelse af blodcirkulationen til hjertet under kirurgi og transplantation.

Kirurgiske fremgangsmåder til korrigerende af kompleks medfødte hjerteabnormiteter, anbringelse af hjerteklapprotoser eller reparation af defekte klapper og når der føres uden 5 om (bypass) tilstoppede coronarkar, nødvendiggør, at legemet støttes af en hjerte-lungemaskine, mens hjertet bringes i hvile ved afbrydelse af dets blodtilføring og, at det kort perfunderes med en kold opløsning indeholdende elektrolytter og en høj kaliumkoncentration (cardioplegisk opløsning). Dette muliggør, at kirurgen kan arbejde i et stille og 10 blodfrit område for at færdiggøre de indviklede kirurgiske procedurer, før der sker irreversibel, iskæmisk beskadigelse.

Det iskæmiske hjerte tolererer iskæmi i 20 til 30 minutter, før der forekommer irreversibel beskadigelse. Ved begyndelse af iskæmi ophører leveringen af substrater til energi- 15 produktion og phosphatadenosintriphosphatet (ATP) med høj energi (som giver energi til kontraktion og operation af ionpumper i myocardiocellen) nedbrydes efterhånden til dets forstadier ADP og AMP. AMP kan undergå yderligere nedbrydning ved myocardiemembranen til det diffusionsdygtige purinnukleosidadenosin. Adenosin metaboliseres også hurtigt til inosin, hypoxanthin og xanthin. Ved genoprettelse af blodstrømmen vaskes disse nukleosider ud af hjertet via cirkulationen. Hvis iskæmitiden har været af 20 tilstrækkelig længde, er koncentrationen af ATP reduceret og giver således mindre energi til kontraktion og opretholdelse af ionstrømme og hjertets kontraktile funktion kan formindskes eller mistes. Derfor blev der udviklet metoder, som ville forlænge den tidsperiode, som hjertet kunne tolerere iskæmi for at reducere morbiditet og dødelighed ved hjerteoperationer. Undersøgelser af mulige opløsninger, som er egnede til at forsinke 25 begyndelsen af iskæmisk beskadigelse, har involveret anvendelsen af en lang række bestanddele, men den cardioplegiske standardopløsning, som anvendes i dag, indeholder normale plasmakoncentrationer af elektrolytter med undtagelse af en forhøjet koncentration af kalium, som depolariserer hjertemusklens og bringer den i hvile. Anvendelsen af

hyperkaliæmiske opløsninger med nedkøling for at sænke den grundlæggende metaboli-
ske hastighed hos hjertevævet reducerer graden af ATP-nedbrydning under iskæmi og
forøger hjertets tolererede iskæmiske tidsrum under kirurgi. Den beskyttelse som opnås
ved disse teknikker er imidlertid ikke optimal i alle tilfælde, og utilstrækkelig mycardie-
5 beskyttelse under langvarig iskæmi er ansvarlig for langvarig afvænnning fra den cardio-
pulmonare bypass-maskine, anvendelsen af inotrope trommer (eng.: drums) til at støtte
det svigtende hjerte efter operation og for den dødelighed som er forbundet med arytmier
eller hjertesvigt efter operation. Derfor er der behov for forbedringer med hensyn til den
beskyttende cardioplegiske opløsning for at reducere den risiko, som ledsager hjerte-
10 kirurgiske procedurer.

I *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* bind 84, s. 16-22, 1982 vises metabolismekoblingerne
mellem adenosin og hypoxanthin. I *Farmakol Toksikol (USSR)* 1968, bind 31, s. 273-
277 indikeres, at puriner, såsom hypoxanthin og adenin har positive effekter på hjertet;
medens US-A-4 605 644 omtaler anvendelsen af adenin og ribose til perfusionen af
15 hjertevæv og i *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* bind 90, s. 68-72, 1985 beskrives anvendel-
sen af allopurinol til forebyggelse af perfusionsskader.

Det har nu vist sig, at myocardiumets målte evne til at tolerere iskæmi kan forøges
signifikant ved tilsætningen af adenosin, hypoxanthin og ribose til standardelektrolyt-
opløsninger.

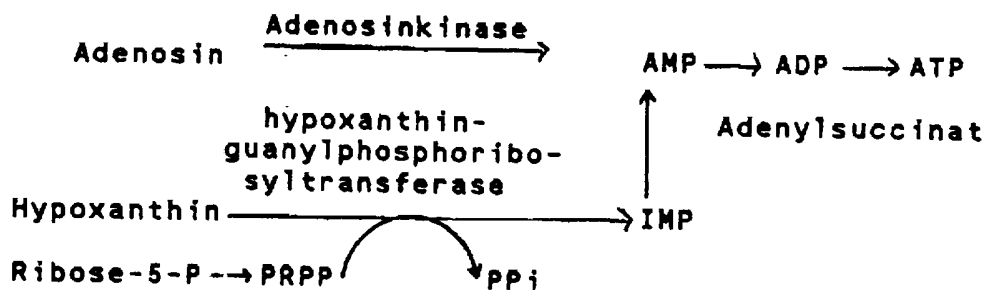
20 Ifølge den foreliggende opfindelse anvises derfor anvendelse af forbindelserne adenosin,
hypoxanthin og ribose som additiver til et hjerteperfusat til fremstillingen af en car-
dioplegisk opløsning til reduktion af iskæmisk beskadigelse af et hjerte, som er isoleret
fra en normal blodforsyning.

Den forebedrede virkning kan måles med hensyn til større bevarelse af phosphater med
25 høj energi under iskæmi, hurtigere generhvervelse af phosphater med høj energi efter
iskæmi og en større generhvervelse af kontraktile funktion efter en iskæmisk periode.

Anvendelsen af denne opløsning giver forøget beskyttelse af hjertet under iskæmi, som forekommer under kirurgi eller under transporten af hjertet mellem donor og modtager til hjertetransplantatoin.

Adenosin, hypoxanthin og ribose er endogene stoffer. Adenosin og hypoxanthin er purinnukleosider, ribose er en sukker. Når disse stoffer anvendes som additiver til cardioplegiske standardopløsninger, kan der opnås en relativ høj lokal koncentration i hjertet uden udsættelse for den systemiske cirkulation. Da disse stoffer vaskes ud af myocardiumet og hurtig fordeles og metaboliseres, giver de en meget bred sikkerhedsmargin.

10 Fornuften bag ved anvendelse af disse stoffer er at lette bevarelsen og opfyldningen af adeninnukleotidpuljen under iskæmi ved at tjene som substrat for purinnukleotidsamlingsvejene. Disse veje er opsummeret nedenfor.



Under iskæmi omdannes den intracellulære adeninnukleotidpulje til de difunderbare nukleosider adenosin, inosin og hypoxanthin. Disse vaskes derefter ud under genperfusionsperioden. ATP-niveauer kan være undertrykket så længe som 7 til 10 dage på grund af tabet af disse nukleotidforstadier adenosin, inosin og hypoxanthin. Genoprettelsen af adeninnukleotiderne kan opnås via to hovedveje. Den første er via syntese påny. Denne vej er imidlertid meget langsom og det ville være nødvendigt med mere end en uge for at genoprette en nedgang på 50% i ATP-niveauer. Den anden mekanisme omfatter nukleotidsamlingsveje, som indbefatter den direkte phosphorylering af adenosin til AMP og phosphorylering af hypoxanthin til IMP, som derefter omdannes til AMP. Fra AMP

kan ADP og til sidst ATP regenereres, hvis der ikke er forekommet irreversibel beskadigelse af de intracellulære organeller. Det samlede hypoxanthin nødvendiggør dets kondensation med phosphoribosyl-pyrophosphat (PRPP), som på sin side hidrører fra riboseden. Således er cellen ved fravær af beskadigelse på cellernes biokemiske maskineri i stand til at regenerere disse højenergi-phosphatpuljer (AMP, ADP, ATP) relativt hurtigt. Dog foregår genoprettelsen af phosphater med høj energi efter iskæmi i virkeligheden ganske langsomt. Den hæmmede genindvindelsesgrad kan være på grund af de lave koncentrationer af substratforstadier i form af adenosin, hypoxanthin og ribose.

Opdagelsen af, at adenosin og hypoxanthin individuelt er i stand til at bevare og/eller genoprette myocardi-ATP blev opnået ved eksperimenter udført ved hjælp af Langendorff-modellen med isoleret perfunderet rottehjerte. Adenosin (100 μM) eller hypoxanthin (100 μM) blev anvendt udover et standard-hjerteperfusat og virkningerne på præiskæmiske, iskæmiske og postiskæmiske ATP-værdier blev bestemt og er vist i tabel 1.

15

Tabel 1

		ATP $\mu\text{mol/g}$ våd vægt				
		Ligevægt	10' iskæmi	15' RP	30' RP	60' RP
	Ubehandlet	3,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	2,1 \pm 0,7	2,1 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1
	Adenosin	3,9 \pm 0,4	1,7 \pm 0,1	2,9 - 0,8	2,7 \pm 0,08	2,7 \pm 0,06
20	Ubehandlet	3,4 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	2,2 \pm 0,1	1,8 \pm 0,2
	Hypoxanthin	3,4 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1

RP = genperfusion, N \geq 5, T = 37°C

Disse forsøg viste, at adenosin eller hypoxanthin er i stand til at forøge nukleotidpuljer (ATP) under iskæmi og/eller under den post-iskæmiske genperfusionsperiode. Forbedringen af energilagre ville teoretisk forbedre den funktionelle genoprettelse af hjertet, da ATP er nødvendig for kontraktile aktivitet. Denne hypotese blev også undersøgt under

25

anvendelse af den førnævnte isolerede rottehjerte-model. Virkningerne af adenosin og hypoxanthin på genoprettelsen af hjertets kontraktile funktion blev bedømt ved bestemmelsen af det udviklede venstre ventrikulære tryk under den post-iskæmiske genperfusionsfase ved anvendelsen af en intra-ventrikular saltopløsningsfyldt ballon. Disse resultater er vist i tabel 2.

Tabel 2

% af udviklet kontroltryk

	Kontrol	15' RP	30' RP	60' RP
Ubehandlet	100%	75 ± 7	73 ± 6	73 ± 6
10 Adenosin	100%	86 ± 3	96 ± 3	95 ± 3
Ubehandlet	100%	76 ± 5	76 ± 5	82 ± 5
Hypoxanthin	100%	84 ± 5	88 ± 2	87 ± 3

RP = genperfusion, N ≥ 5, T = 37°C.

Disse resultater fastslog, at både adenosin og hypoxanthin er i stand til at genoprette det isolerede perfunderede rottehjertes kontraktile funktion efter en periode på 10 minutter med totalt iskæmi.

For at udstrække disse undersøgelser fra et in vitro system til en klinisk relevant in vivo-relevant model, blev virkningerne af en cardioplegisk standardelektrolytopløsning versus den samme elektrolytopløsning med undtagelsen af tilsætningen af adenosin, hypoxanthin og ribose sammenlignet. Under anvendelse af hunde med cardiopulmonart bypass blev den samme protokol anvendt som er konventionel ved klinisk hjertekirurgi. Dyrene blev anæstetiseret, anbragt med cardio pulmonar bypass-maskinen og en saltopløsningsfyldt ballon blev indsat i den venstre ventrikel i hjertet for at optage udviklet tryk. Efter stabilisering af hæmodynamiske variabler blev hjerterne skyllet via den naturlige coronare cirkulation med enten en cardioplegisk standardopløsning eller den samme opløs-

ning indeholdende adenosin, hypoxanthin og ribose i 5 minutter før påbegyndelsen af iskæmi. Elektrolytindholdene i disse to opløsninger er vist i tabel 3.

Tabel 3

	Cardioplegisk standardopløsning	Cardioplegisk opløsning ifølge opfindelsen
5		
Na	110 mækv./l	110 mækv./l
Cl	160 mækv./l	160 mækv./l
K	16 mækv./l	16 mækv./l
Ca ⁺⁺	2,4 mækv./l	2,4 mækv./l
10 Mg	32 mækv./l	32 mækv./l
Ado	0	100 µmol/l
Hx	0	100 µmol/l
Ribose	0	2 mmol/l

Hver opløsnings pH-værdi blev indstillet til 7,4, og osmolariteten var ca. 300 mosm i
 15 hver. Efter cardioplegisk standsning, blev hjertet gjort iskæmisk i 1 time ved 37°C. I løbet af timen med iskæmi blev flere biopsier taget for at bestemme ATP-nedbrydnings-hastigheden i den ubehandlede og behandlede gruppe. Disse resultater er vist i tabel 4.

Tabel 4

ATP ($\mu\text{mol/g}$ våd vægt)

	30'	15'	30'	45'	60'
	ligevægt	iskæmi	iskæmi	iskæmi	iskæmi
5 Ubehandlet (cardiople- gisk standard- opløsning)	5,09 \pm 0,24	3,67 \pm 0,24	3,01 \pm 0,25	2,03 \pm 0,30	1,97 \pm 0,13
10 Behandlet (cardiople- gisk standard- opløsning + adenosin, hypoxantin, 15 ribose).	5,29 \pm 0,20	4,51 \pm 0,42	4,03 \pm 0,42	3,07 \pm 0,48	2,74 \pm 0,27

$N \geq 5$ i hver gruppe.

Disse resultater viser, at den cardioplegiske opløsning ifølge opfindelsen reducerer ATP-nedbrydningshastigheden under iskæmi. Denne iagttagelse angår hjerter, som undergår konventionelle hjertekirurgiske metoder, og hjerter udtaget til hjertetransplantation.

- 20 Under den post-iskæmiske genperfusionsperiode blev genoprettelsen af ATP-pulver og genoprettelsen af den kontraktile venstre hjertefunktion også bedømt i den ovenfor beskrevne hundemodel. Virkningerne af iskæmi på hjertet beskyttet med den cardioplegiske standardopløsning blev sammenlignet med hjerter beskyttet med den samme opløsning, bortset fra tilsætning af adenosin, hypoxanthin og ribose Disse resultater, som er
- 25 udtrykt med hensyn til genoprettelse af ATP og venstre hjertefunktion, er vist i tabel 5.

Tabel 5

		ATP			
		$\mu\text{mol/g}$ våd vægt			
		15' RP	30' RP	60' RP	
5	Ubehandlet (standardopløsning)	$2,77 \pm 0,22$	$2,13 \pm 0,21$	$2,95 \pm 0,16$	
	Behandlet (standardopløsning) + adenosin, 10 hypoxanthin, ribose)	$3,24 \pm 0,39$	$3,22 \pm 0,32$	$3,33 \pm 0,33$	
		% genoprettelse af udviklet tryk			
		15' RP	30' RP	45' RP	60' RP
15	Ubehandlet (standardopløsning)	$19 \pm 3,0$	$27 \pm 3,2$	41 ± 1	49 ± 3
	Behandlet (standardopløsning) + adenosin, hypoxanthin, 20 ribose) N \geq 5	25 ± 4	40 ± 4	54 ± 3	67 ± 4

Disse forsøg viser, at beskyttelsen af hjertet under 1 time med iskæmi ved 37°C er større med hensyn til bevarelse og genoprettelse af ATP-niveauer og med hensyn til genoprettelse af hjertets kontraktile funktion, når opløsningen ifølge opfindelsen indeholdende adenosin, hypoxanthin og ribose sammenlignes med en klinisk accepteret cardioplegisk standardopløsning.

En foretrukken udførelsesform for opfindelsen er:

(1) En sammensætning til fremstilling af en opløsning til reduktion af iskæmisk beskadigelse på hjertet under hjertekirurgi eller under opnåelse til hjertetransplantation. Denne opløsning har de følgende ioniske indhold:

	Na	110 mækv./l
5	Cl	160 mækv./l
	K	16 mækv./l
	Ca ⁺⁺	1,4 mækv./l
	Mg	32 mækv./l
10	Adenosin i en mængde til opnåelse af en slutkoncentration på 100 µmol/l	
	Hypoxanthin i en mængde til opnåelse af en slutkoncentration på 100 µmol/l	
	Ribose i en mængde til opnåelse af en slutkoncentration på 1 mmol/l	
15	+ NaHCO ₃ eller HCl til indstilling af pH-værdien til 7,4.	

Den ovenfor nævnte opløsning repræsenterer en forbedring sammenlignet med en cardioplegisk standardopløsning på grund af tilsætningen af adenosin, hypoxanthin og ribose.

20 (2) En metode til reduktion af iskæmisk beskadigelse på hjertet under operationer eller transplantation ved anvendelse af den ovenfor beskrevne opløsning ifølge opfindelsen, som en infusion til at standse hjertet før iskæmi under operationer eller før opnåelse af hjerter fra donorer ved forberedelse af transplantationer.

P A T E N T K R A V

1. Anvendelse af forbindelserne adenosin, hypoxanthin og ribose i kombination som additiver til et hjerteperfusat til fremstillingen af en cardioplegisk opløsning til reduktion
5 af iskæmisk beskadigelse af et hjerte, som er isoleret fra en normal blodforsyning.
2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor de endelige koncentrationer af adenosin og hypoxanthin i opløsningen hver er 100 $\mu\text{mol/l}$.
3. Anvendelse ifølge krav 1, hvor ribose-additivet har en endelig koncentration i opløsningen på ca. 2 mmol.
- 10 4. Anvendelse ifølge krav 2 og 3, hvor additivet yderligere omfatter Na-, Cl-, K-, Ca- og Mg-ioner i opløsning.
5. Anvendelse ifølge krav 4, hvor ionerne i opløsning har de følgende koncentrationer:

15	Na	110 mækv./l
	Cl	160 mækv./l
	K	16 mækv./l
	Ca ⁺⁺	2,4 mækv./l
	Mg	32 mækv./l, og
	NaHCO ₃ eller HCl til indstilling af pH-værdien til 7,4.	

- 20 6. Fremgangsmåde til reduktion af iskæmisk beskadigelse af hjertet, når det er isoleret fra et fungerende legeme, hvilken fremgangsmåde omfatter perfusion af hjertet med en cardioplegisk opløsning ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 5.