

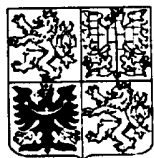
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

280 683

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1563-91**

(22) Přihlášeno: 24. 05. 91

(30) Právo přednosti:
25. 05. 90 DE 90/4016963

(40) Zveřejněno: 19. 02. 92

(47) Uděleno: 05. 02. 96

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 04. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 31/195

A 61 K 31/675

A 61 K 33/32

(73) Majitel patentu:
Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH,
Darmstadt, DE;

(72) Původce vynálezu:
Schneider Werner, Koblenz, DE;
Mayer Britta, Baldham, DE;
Elstner Erich F. prof. dr., Gröbenzell, DE;

(54) Název vynálezu:
**Farmaceutický prostředek k redukci
peroxidu s LDL vazbou a použití
magnesium-pyridoxal-5-fosfátglutaminátu
pro jeho přípravu**

(57) Anotace:
Řešení se týká použití magnesium-pyridoxal-5'-
fosfátglutaminátu k přípravě farmaka, vhodné-
ho k redukci peroxidů s LDL-vazbou a k profy-
laxi vaskulárních poruch z toho vyplývajících v
nepřítomnosti hypercholesterolemie nebo hy-
perlipidaemie.

CZ 280 683 B6

Farmaceutický prostředek k redukci peroxidu s LDL vazbou a použití magnesium-pyridoxal-5'-fosfátglutaminátu pro jeho přípravu

Oblast techniky

Vynález se týká použití magnesium-pyridoxal-5'-fosfát-glutaminátu k prevenci nemocí, které jsou způsobovány LDL-vazbou peroxidů a projevují se vaskulárními poruchami.

Dosavadní stav techniky

V posledních čtyřech desetiletích lze podporovat v západních průmyslových zemích rychlý nárůst metabolických poruch, zejména poruch metabolismu tuků. Hlavním důvodem toho je nadbytečná výživa a/nebo příliš tučné potraviny za současného nedostatku pohybu. Za těchto podmínek mohou se v krvi vytvářet zvýšené hodnoty cholesterolů a lipidů, čímž se zvětšuje riziko arteriosklerotických kardiálních a periferních vaskulárních nemocí. Je známo, že zvýšené hladiny cholesterolu v krvi jsou spoluzodpovědné za výskyt arteriální vaskulární sklerózy. Hypercholesterolemie je metabolická porucha, která vždy provází hyperlipidaemii. Patogeneticky odlišné, ale příznakově podobné klinické obrazy hyperlipidaemie (turbidita séra chylomikrony) a hypercholesterolemie (zvětšení obsahu cholesterolu v krevní plazmě na více než 200 mg%) se shrnují pod společnými pojmy hyperlipoproteinaemie nebo hyperlipidaemie.

K léčení hypercholesterolemie se používají především deriváty kyseliny aryloxyoctové, zejména ethylestery kyseliny alfa-(p-chlorfenoxi)isomáselné, jakož i deriváty kyseliny nikotinové.

Kromě toho se v DE-PS přihlášce č. 24 61 742 popisuje použití glutaminátových a asparaginátových esterů kyseliny pyridoxin-5'-fosforečné k léčení a profylaxi hypercholesterolemie.

Aniž by byly nutné projevy hypercholesterolemie nebo hyperlipidaemie, mohou v případě ohrožených skupin osob, zejména kuřáků, diabetiků, stárnoucích lidí a těch osob, jež mají vysoký krevní tlak, nastávat vaskulární poruchy. Tyto poruchy se přičítají přítomnosti zvětšené koncentrace peroxidů v krvi, které jsou vázány LDL (lipoproteinem o nízké hustotě). Tyto LDL-vázané peroxidy způsobují a urychlují tvorbu atheromae a arteriosklerotických destiček v cévách a mohou se považovat za příčinu diabetické angiopathie. Přítomnost zvýšených koncentrací peroxidujících produktů a jejich vztah s vaskulárními poruchami je popisován v publikacích J.M.C. Gutteridge et al., Trends in Biochemical Sciences, duben 1990, strany 129 až 135, a D.W. Morel et al., Journal of Lipid Research, sv. 30, 1989, strany 1827 až 1834.

Je známo, že arteriosklerotické změny v cévách jsou výsledkem endotheliálních poruch a patogenese probíhá následovně: endotheliální porucha - plateletovaná adhéze - proliferace (novotvoření) buněk hladkého svalstva - ukládání lipidů.

První stupeň, endotheliální porucha, může mít mnoho příčin, zejména mechanické poškození následkem střížných sil v případě hypertonie, chemické poškození vlivem cholesterolu při hypercho-

lesteraemii a při jednotlivých toxických poškozeních vlivem kontaminace v krvi. Existuje domněnka, že další průběh je povětšinou identický se všemi třemi typy poškození.

Důsledkem endotheliální poruchy, jakož i následného ukládání tuku mezi buňkami a uvnitř nich v samotné arterii je zvětšená agregace trombocytů, která je provázena novotvarem buněk hladkého svalstva, což je způsobováno dalším zvětšeným přítokem lipoproteinů v základní látce spojovací tkáně, kde tvorba komplexu s glukózo-amino-glykany spojovací tkáně a metabolické defekty probíhají na hladině buněk. Potom se v poškozených místech vytváří vápník, čímž se všechny tyto změny uzavírají, což při konečném rozboru vede ke stažení cév.

Byly provedeny testy na hypercholesteremických králících a krysách. W. Schneider dochází ve své disertační práci k závěru (1987 na universitě Johanna Gutenberga v Mainzi), že když se podávají poměrně vysoké koncentrace magnesium-pyridoxal-5'-fosfátglutaminátu (MPPG), snižují se koncentrace jaterního a aortálního lipidu. Avšak tato práce neuvádí poukazy, související s mechanismem, který iniciuje tvorbu cévní atheromy v ohrožených skupinách osob. Na základě výsledků, získaných W. Schneiderem, nelze však činit závěry, že tvorbě atheromy lze předcházet vyloučením iniciačních kontaminací v krvi.

V minulosti se po jistou dobu pochybovalo, že peroxidy v krvi mohou působit jako iniciátory metabolických poruch. U.P. Steinbrecher et al. popisují v J. Biol. Chem., sv. 264, č. 26, strany 15 216 až 15 223 (1989) přítomnost oxidačně modifikovaného LDL jakož i jeho receptoru. Přihlašovatel nyní prokázal testy, provedenými za tímto účelem, že toto se týká LDL-vázaných peroxidů. Testy, provedenými in vitro, mohl být objasněn jeden z mechanismů, zdůrazňující toxickou endotheliální poruchu a ukázalo se, že je možné zachytit tyto peroxidy a učinit je neškodnými.

Podstata vynálezu

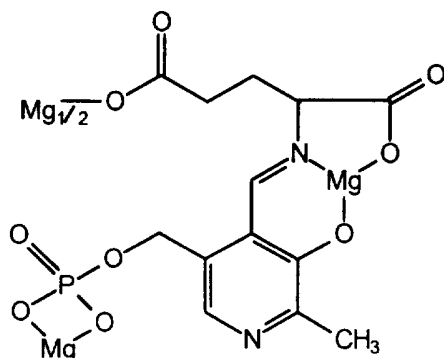
Předmětem vynálezu je získat farmakum pro redukci LDL-vázaných peroxidů, aby se takto zabránilo vaskulárním poruchám a/nebo aby se vaskulární poruchy odstranily, zejména vytváření atheromaei nebo arteriosklerotických destiček v arteriálních cévách, jakož i angiopathických nemocí v případě diabetiků. Předmětem tohoto vynálezu je zejména získat farmakum rovněž pro ty shora uvedené případy, u nichž neexistuje diagnóza hyperlipidaemie nebo hypercholesteremiae.

Shora uvedeného předmětu se podle vynálezu dosahuje použitím magnesium-pyridoxal-5'-fosfátglutaminátu k přípravě farmaka, které je vhodné pro profylaxi nemocí, způsobovaných vaskulárními poruchami. Podle vynálezu se předchází zejména atheromatóze, jakož i angiofatickým nemocím u ohrožené skupiny osob, skládající se z kuřáků, diabetiků, stárnoucích lidí, hypertonických osob a lidí trpících stresem.

Magnesium-pyridoxal-5'-fosfátglutaminát je látka, které se dříve používalo ke snižování zvýšené hladiny krevních tuků. Látka (MPPG) je známá pod obchodním označením Sedalipid^R a je distri-

buována firmou Steigerwald Arzneimittelwerk, Darmstadt. Až doposud nebylo známo, že magnesium-pyridoxal-5'-fosfátglutaminát působí jako radikální lapač v krvi a je proto schopný zabráňovat řetězové reakci, způsobované lipidovým peroxidem. Na základě tohoto účinku jako radikálního lapače je používání MPPG vhodné pro profylaxi vaskulárních poruch, zejména v nepřítomnosti hyperlipidaemie a/nebo hypercholesterolemie.

MPPG je derivátem pyridoxinu a má následující vzorec:



Ve smyslu vynálezu jsou ohroženými skupinami osob zejména kuřáci, diabetici, lidé s vysokým krevním tlakem, jakož i osoby trpící stresem, jako například vrcholoví sportovci a staří lidé.

Podle vynálezu se shora uvedená sloučenina MPPG podává uvedeným ohroženým osobám, které mají vysokou koncentraci LDL-vázaných peroxidů, avšak netrpí příznaky hyperlipidaemie a/nebo hypercholesterolemie. Tyto symptomy se obvykle stanovují na bázi cholesterolových hladin, jakož i cholesterolových a triglyceridových hladin. V Evropě a také v USA existují doporučení, pokud jde o to, co lze považovat za normální a zvýšené cholesterolové a triglyceridové hladiny. Co se toho týče, odkazuje se na doporučení US národního cholesterolového výchovného programu (National Cholesterol Education Programme NCEP) a směrnice, vypracované studijní skupinou evropské aterosklerózy společnosti. V následujících tabulkách 1 a 2 jsou shrnuty hodnoty, za co lze považovat normální cholesterolové a triglyceridové hladiny a kdy se má započít s léčením:

Tabulka 1

Doporučení US národního cholesterolového výchovného programu (NCEP)

Klasifikace	Hladina celkového cholesterolu	Doporučeno sledovat
Žádoucí cholesterol	<200 mg/dl	Opakovat měření po 5 letech
Mezní cholesterolové riziko	200-239 mg/dl	Není-li CHD a žádné jiné rizikové faktory: Informace o dietě a roční kontrola V případě jasného CHD nebo dvou jiných CHD rizikových faktorů: Další akce na základě LDL hladiny
Vysoké riziko cholesterolu	>240 mg/dl	Provést analýzu lipoproteinů a další akce na základě hladiny LDL
Žádoucí LDL	<130 mg/dl	---
Mezní LDL riziko	130-159 mg/dl	Léčení dietou, je-li CHD a dva další rizikové faktory
Vysoké riziko LDL	160-190 mg/dl	Léčení dietou, není-li CHD a žádné další rizikové faktory Lék a dieta, je-li CHD nebo dva další rizikové faktory Lék a dieta
	>190 mg/dl	

Tabulka 2

Směrnice studijní skupiny evropské atheroskleróзовé společnosti

Typ A: Cholesterol: 200-250 mg/dl (5,2-6,5 mmol/l)
Triglyceridy: <200 mg/dl (<2,3 mmol/l)

Odhadnout celkové riziko CHD za uvážení rodinného výskytu CHD, hypertenze, diabetu, mužské pohlaví, ranější věk, kouření, nízký HDL cholesterol, např. < 35 mg/dl.

V případě nadváhy omezit energetický obsah potravy; poskytnout rady o výživě a opravit jiné rizikové faktory, existují-li.

Typ B: Cholesterol: 250-300 mg/dl (6,7-7,8 mmol/l)
Triglyceridy: <200 mg/dl (<2,3 mmol/l)

Odhadnout celkové riziko CHD jako u typu A.
V případě nadváhy omezit energetický obsah potravy; předepsat dietu, snižující lipidy a sledovat odezvu a splnění. Zůstává-li cholesterol vysoký, zvážit použití léku, snižujícího lipidy.

Typ C: Cholesterol: <200 mg/dl (<5,2 mmol/l)
Triglyceridy: 200-500 mg/dl (2,3-5,6 mmol/l)

Snažit se zdůraznit příčiny hypertriglyceridaemie, např. obezitu, nadměrné používání alkoholu, diuretik, beta-blokátorů, exogenní oestrogens, diabetes.

V případě nadváhy snížit energii diety; projednat a zdůraznit příčiny, jsou-li. Předepsat a sledovat dietu, snižující lipidy. Sledovat hladiny cholesterolu a triglyceridů.

Typ D: Cholesterol: 200-300 mg/dl (5,2-7,8 mmol/l)
Triglyceridy: 200-500 mg/dl (2,3-5,6 mmol/l)

Odhadnout celkové riziko CHD jako u typu A. Snažit se zdůraznit příčiny hypertriglyceridaemie jako u typu C.

V případě nadváhy omezit dietní energii; existuje-li hypertriglyceridaemie, projednat a zdůraznit její příčiny podle typu A nebo B. Předepsat a sledovat dietu, snižující lipidy. Nemá-li odezva sérového lipidu přiměřená a celkové riziko CHD je vysoké, zvážit použití léku, snižujícího lipidy.

Typ E: Cholesterol: >300 mg/dl (7,8 mmol/l)
a/nebo
triglyceridy: >500 mg/dl (5,6 mmol/l)

Uvažovat o odkázání na lipidovou kliniku nebo ke specializovanému lékaři k vyšetření a započetí léčby dietou a v případě potřeby léky.

Obdobně existují publikovaná doporučení pracovní skupiny britské kardiální společnosti, pokud jde o koronární prevenci, britské hyperlipidaemické asociace a kanadské konference konsenzu o cholesterolu.

Z údajů uvedených ve shora zmíněných tabulkách je zřejmé, že se hodnoty slabě liší v případech, v nichž obsah cholesterolu je třeba považovat za škodlivý. Nicméně je zejména užitečné postupovat tak i pod těmito mezními hodnotami nebo zvláště v neurčitém pásmu mezi ještě normálními a zvýšenými hladinami. Podávání MPPG podle vynálezu je prospěšné pro ty jedince, kteří patří do ohrožených skupin, majících vysokou -LDL-vazbu peroxidů.

Ačkoliv nelze uvést určitou hranici, při níž diagnostikovaná hladina cholesterolu se musí vykládat jako hyperlipidaemie, má se za to, že se jako obecné vodítko může vzít obsah přibližně 240 mg/dl (podle amerických doporučení), nebo 250 mg/dl (podle evropských doporučení), který se může pokládat za počínající hyperlipidaemii. O podávání MPPG podle vynálezu se proto uvažuje zejména pod shora uvedenými hladinami cholesterolu.

Vynálezci provedli jistý počet testů, aby jasně dokázali, že v ohrožené skupině osob existují tyto vysoké hladiny peroxidů, vázaných na LDL. Bylo možné rovněž dokázat, že po podání MPPG zmizely detekční signály, indikující peroxidy, vázané na LDL. Z toho lze tudíž usuzovat, že aplikaci MPPG pacientům, patřícím do ohrožené skupiny, je oprávněná a užitečná.

Pro zvýšenou iniciaci vytváření atheromy, zejména ve shora jmenované skupině osob, se předpokládá následující mechanismus, který bude dokumentován testy in vitro, popsány dále:

LDL se oxiduje reaktivními druhy kyslíku (superoxidový radikál O_2^- , hydroxylový radikál OH), zejména peroxidem, jež jsou přítomné v krvi, čímž se tvoří LDL peroxid. Tento LDL peroxid se v podstatě neabsorbuje makrofágy, ale váže se na čistící receptor, který je rozmístěn na endoteliálních buňkách (viz shora uvedenou literaturu, Steinbrecher et al.). Takto se na endoteliálních buňkách ukládá LDL a tyto úsady přitahují další úsady lipidů.

Další poškozování cévních endoteliálních buněk je způsobováno oxidací glutathionu peroxidem a/nebo LDL-vázaným peroxidem. Tato oxidace může vést k usmrcení buněk, protože buňka nemůže déle udržet svůj redox potenciál (K. Kuzuya et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., sv. 163, č. 3, 1989, strany 1466 až 1472).

Následující konstatování poskytuje podrobnější vysvětlení mechanismu, pojednávající o vlivu MPPG na LDL-vázaný peroxid. Následující testy ukazují na základě peroxidů vázaných na mastnou kyselinu, že se tyto peroxidy v přítomnosti MPPG rozkládají, takže je lze takto zneškodňovat.

Na přiložených výkresech značí jednotlivé grafy následující:

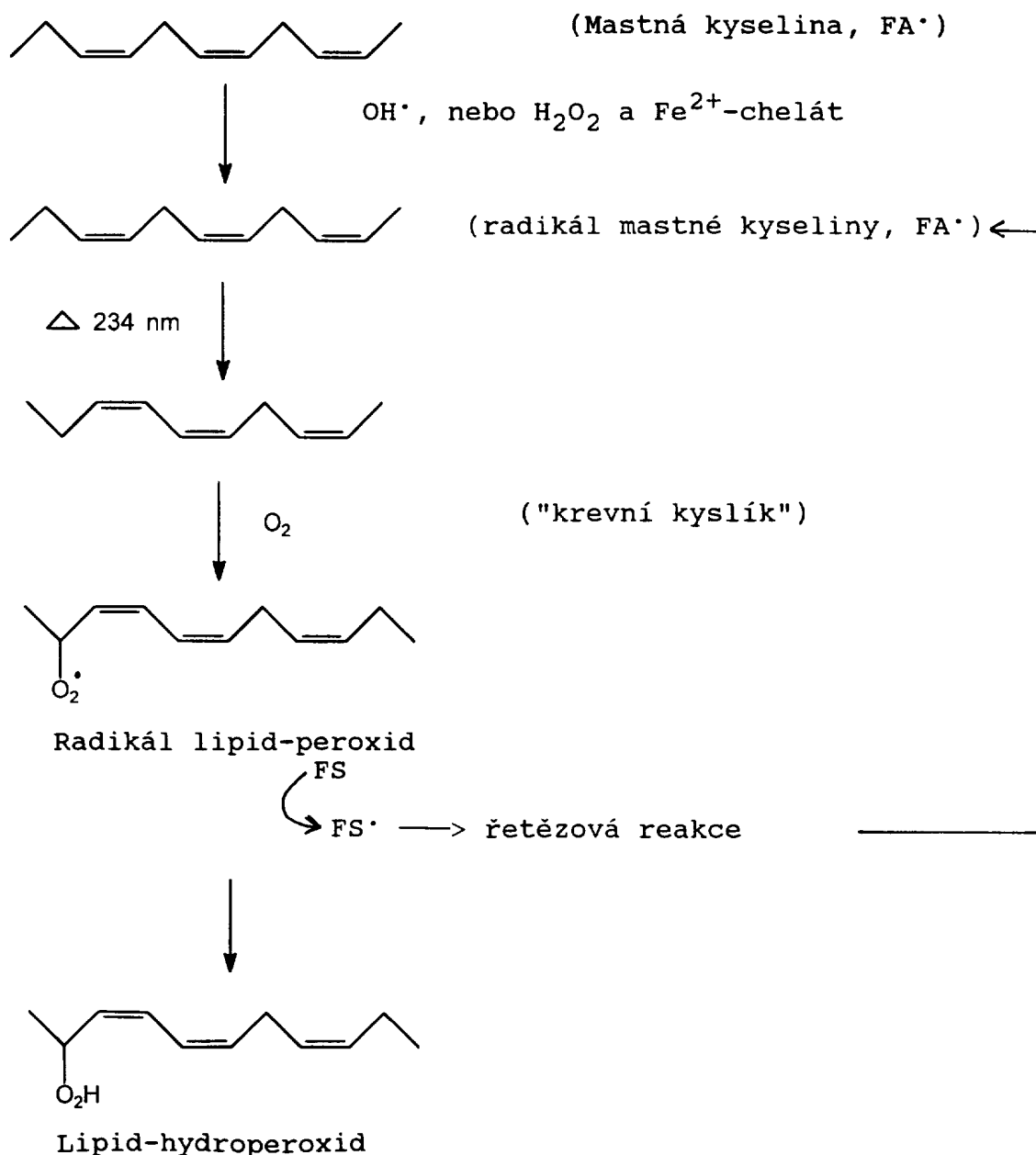
Obr. 1 znázorňuje spektrum linolenové kyseliny (0,88 mM). Hlavní vrchol je při 211 nm, zatímco při asi 232 se zjistí menší

vrchol, což poukazuje na přítomnost malého procenta oxidované linolenové kyseliny.

Obr. 2 znázorňuje spektrum MPPG (koncentrace 0,125 nM), u něhož se projevují vrcholy při 222, 327 a 387.

Obr. 3 znázorňuje spektrum roztoku linolenové kyseliny a MPPG. Toto spektrum má vrcholy při 211, 243 a 289 nm. Vrchol získaný dříve v obr. 1 při 232 není již více přítomen v obr. 3. Místo toho obr. 3 ukazuje dva nové vrcholy při 243 a 289 nm.

Následující náčrtek znázorňuje předpokládaný reakční mechanismus, probíhající během oxidace mastné kyseliny, jak to popisuje např. J.M.C. Gutteridge et al. v publikaci *Trends in Biochemical Sciences*, duben 1990, str. 130:



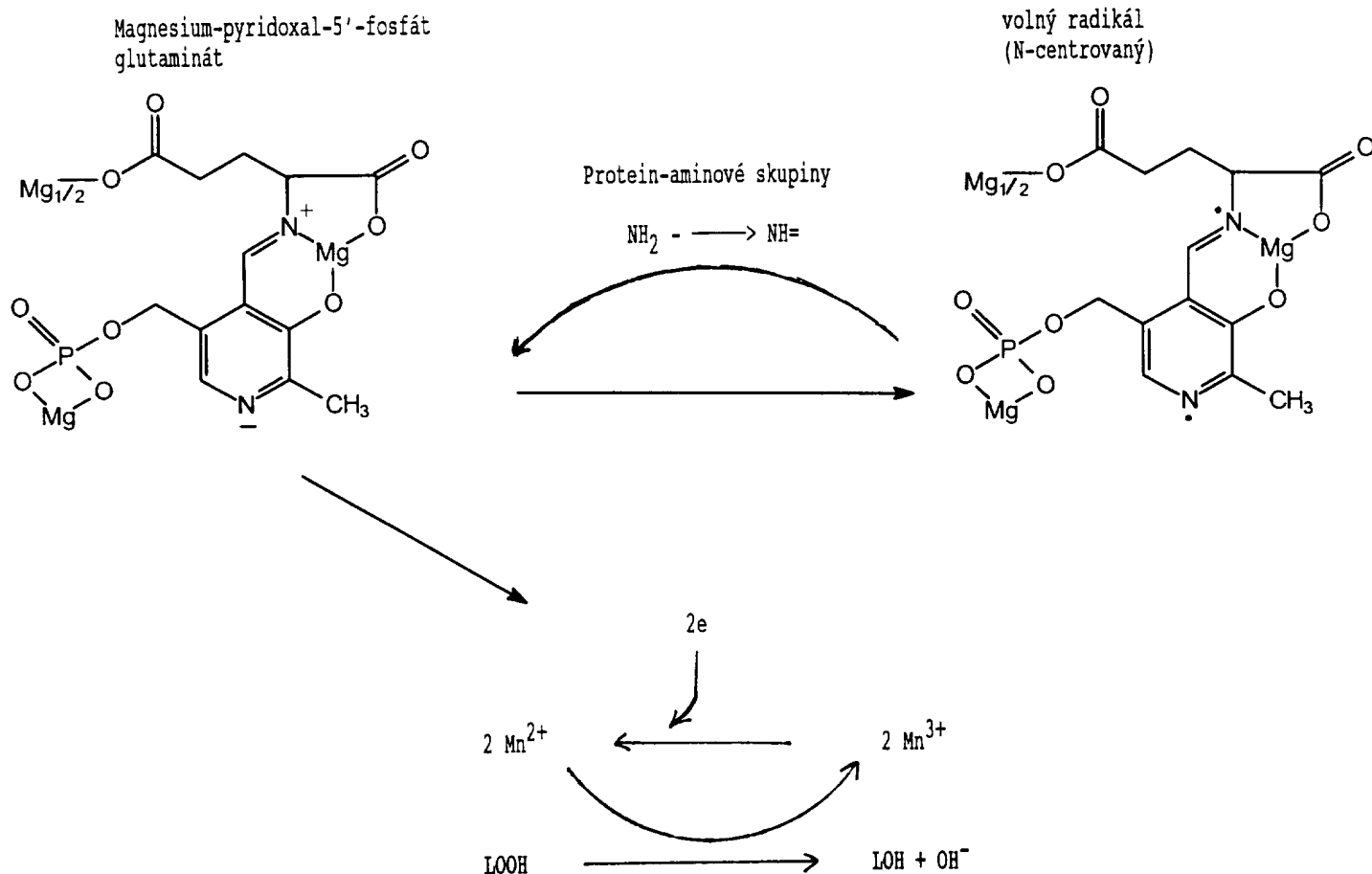
Zpočátku nastává útok na přemostující CH_2 skupinu radikálem $\text{H}^\bullet$. Toto způsobuje přemístění, takže se z izolovaných dvojných vazeb vytvoří konjugované dvojně vazby. Výsledkem je vznik radikálu mastné kyseliny, který v přítomnosti kyslíku vytváří peroxidový radikál. V přítomnosti další molekuly kyseliny mastné vytvářejí se hydroperoxid mastné kyseliny a rovněž radikál mastné kyseliny, čímž začíná řetězová reakce.

Shora znázorněné hlavní rysy reakce mohou být při 234 nm následovány důkazem dienové reakce.

Z obrázků 1 až 3 lze vyvozovat, že vrchol pro zoxidovanou linolenovou kyselinu zmizí při 232 nm (obr. 1) přidáním MPPG v koncentraci 0,125 mM (obr. 3), přičemž dříve spuštěná řetězová reakce se přeruší a tím i postup nemoci.

Pro rozklad hydroperoxidu v přítomnosti látky MPPG, používané podle tohoto vynálezu, se předpokládá následující mechanismus, katalyzovaný manganem:

Předpokládaný mechanismus rozkladu hydroperoxidu, katalyzovaný MPPG-Mn



Nyní je možné zkoumat tuto rozkladnou reakci pomocí indikátorové látky, již je kyselina aminocyklopropankarboxylová (ACC). ACC je základní látkou, vyskytující se v přírodě při tvorbě ethylenu. Uvolňovaný ethylen lze stanovovat kvantitativně.

Rozklad hydroperoxidu může probíhat např. kumenhydroperoxidem. ACC působí jako iniciátor. Předpokládá se, že reakce postupuje přes amin na pyridoxalfosfát, který způsobuje tvorbu radikálu. Tento radikál iniciuje rozklad ACC na CH_2H_4 , CO_2 a kyanid.

Následující testy ukazují stimulaci rozkladu ACC působením MPPG v přítomnosti kumenhydroperoxidu v závislosti na koncentraci kumenhydroperoxidu (KumOOH). Současně byly provedeny srovnávací testy s odpovídajícími množstvími pyridoxalfosfátu (PP).

Příklad testu:

Byly připraveny následující roztoky ve fosfátovém pufru (0,1 M) o pH 7,4 s různými koncentracemi kumenhydroperoxidu.

Dávka: Fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4
 ACC 1,0 mM
 MPPG 0,5 mM
 Mn^{2+} 0,1 mM
 LA 0,88 mM
 KumOOH 0,006-1,2 mM
 destilovaná voda ad 2 ml

Tabulka 3

Stimulace disociace ACC působením MPPG/PP vlivem KumOOH v závislosti na koncentraci KumOOH

(LA = linolenová kyselina, KumOOH = kumenhydroperoxid, ACC = aminocyklopropankarboxylová kyselina)

Konc. KumOOH (mM)	Ethylen (pMol)					
	0,006	0,12	0,05	0,12	0,6	1,2
a) MPPG						
KumOOH samotný	-	-	74	122	271	1192
			± 40	± 60	± 147	± 500
LA samotná	4028	4028	4028	4028	4028	4028
	± 933	± 933	± 933	± 933	± 933	± 933
teoret. Σ	4028	4028	4102	4150	4299	5219
LA + KumOOH	1014	6926	9655	16059	79079	57894
		± 407	± 471	± 565	± 5672	± 6768
Stimulace (%)	-	72,0	139,7	298,7	1863,3	1337,4
b) PP						
KumOOH samotný	-	-	-	-	-	-
LA	2972	2972	2972	2972	2972	2972
(= teoret. Σ)	± 439	± 439	± 439	± 439	± 439	± 439
LA + KumOOH	4319	4394	5247	5635	11972	17695
	± 173	± 250	± 540	± 533	± 425	± 1827
Stimulace (%)	45,3	47,8	76,5	89,6	302,8	495,3

Na obrázcích 4a a 4b je znázorněná stimulace disociace ACC působením MPPG nebo PP v závislosti na koncentraci KumOOH.

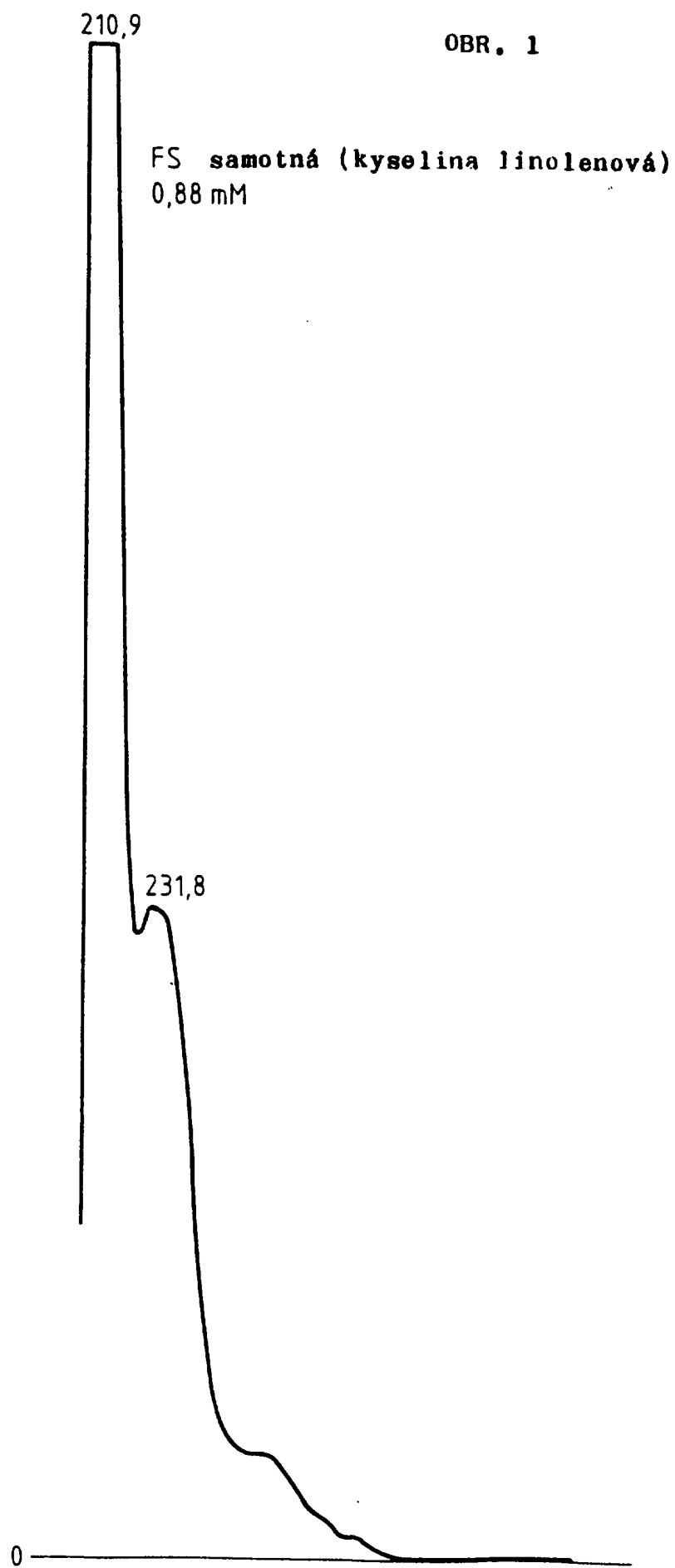
Při disociaci ACC pyridoxalfosfátem se pozoruje měřitelné množství uvolňovaného ethylenu, na rozdíl od MPPG, ve spodním rozsahu koncentrace, použité pro kumenhydroperoxid (0,006 mM). Při koncentraci KumOOH 0,12 nM v přítomnosti MPPG se zjistí stimulace disociace ACC ve výši 70 %. Při koncentracích KumOOH 0,6 mM a 1,2 mM se naměří jasně vyšší účinky stimulace v přítomnosti MPPG ve srovnání s PP.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

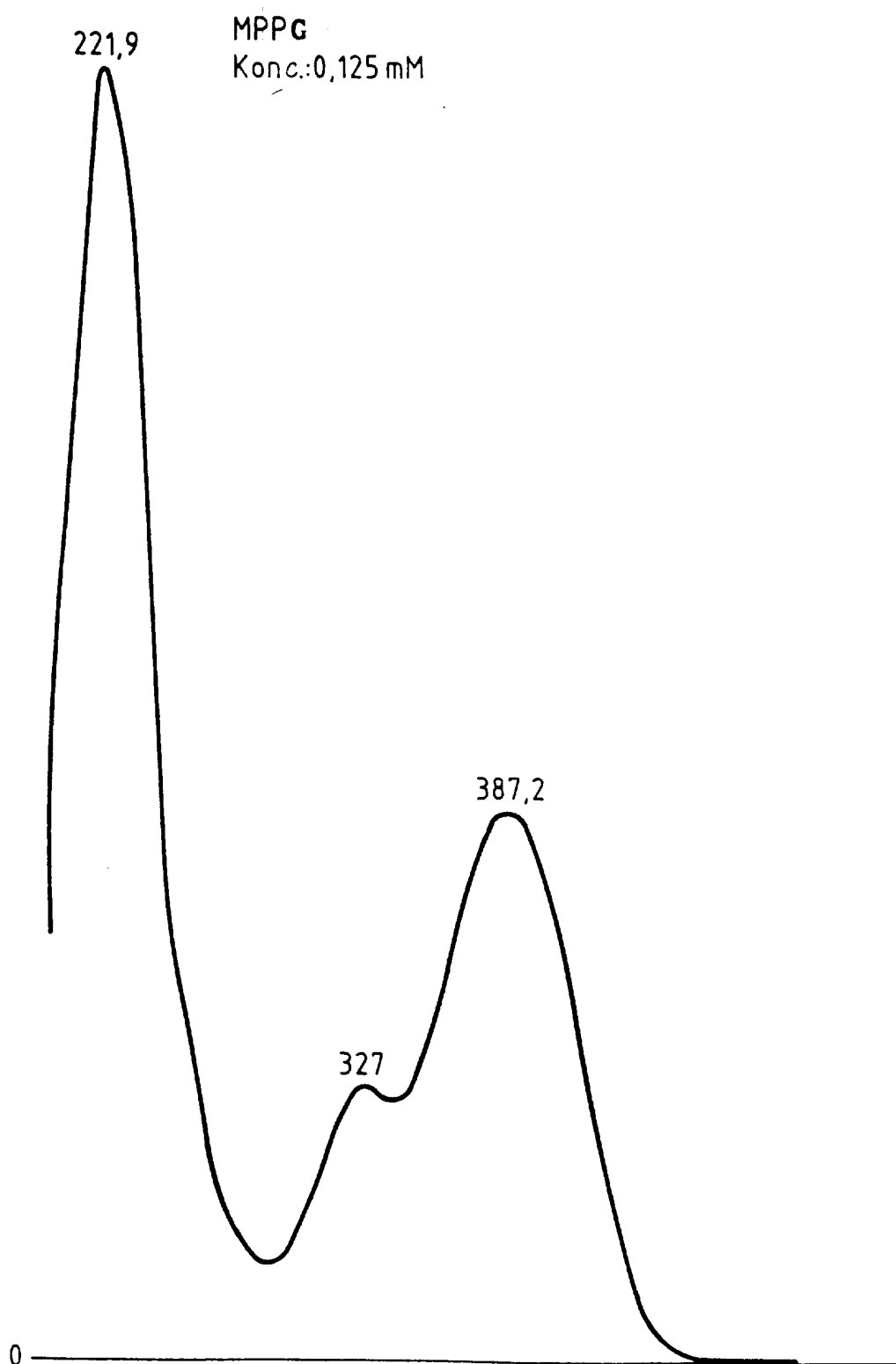
1. Farmaceutický prostředek k redukci peroxidů s LDL-vazbou a k profylaxi z toho vyplývajících vaskulárních poruch v nepřítomnosti hypercholesterolemie nebo hyperlipidaemie, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako účinnou složku obsahuje magnesium-pyridoxal-5'-fosfátglutamát a farmaceuticky přijatelný nosič či ředidlo.
2. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje manganatou sůl.
3. Použití magnesium-pyridoxal-5'-fosfátglutamátu pro přípravu farmaceutického prostředku pro redukci peroxidů s LDL-vazbou a k profylaxi z toho vyplývajících vaskulárních poruch v nepřítomnosti hypercholesterolemie nebo hyperlipidaemie.
4. Použití podle nároku 3 pro přípravu farmaceutického prostředku pro profylaxi proti atheromatóze.
5. Použití podle nároku 3 pro přípravu farmaceutického prostředku pro profylaxi angiopatických nemocí.

4 výkresy

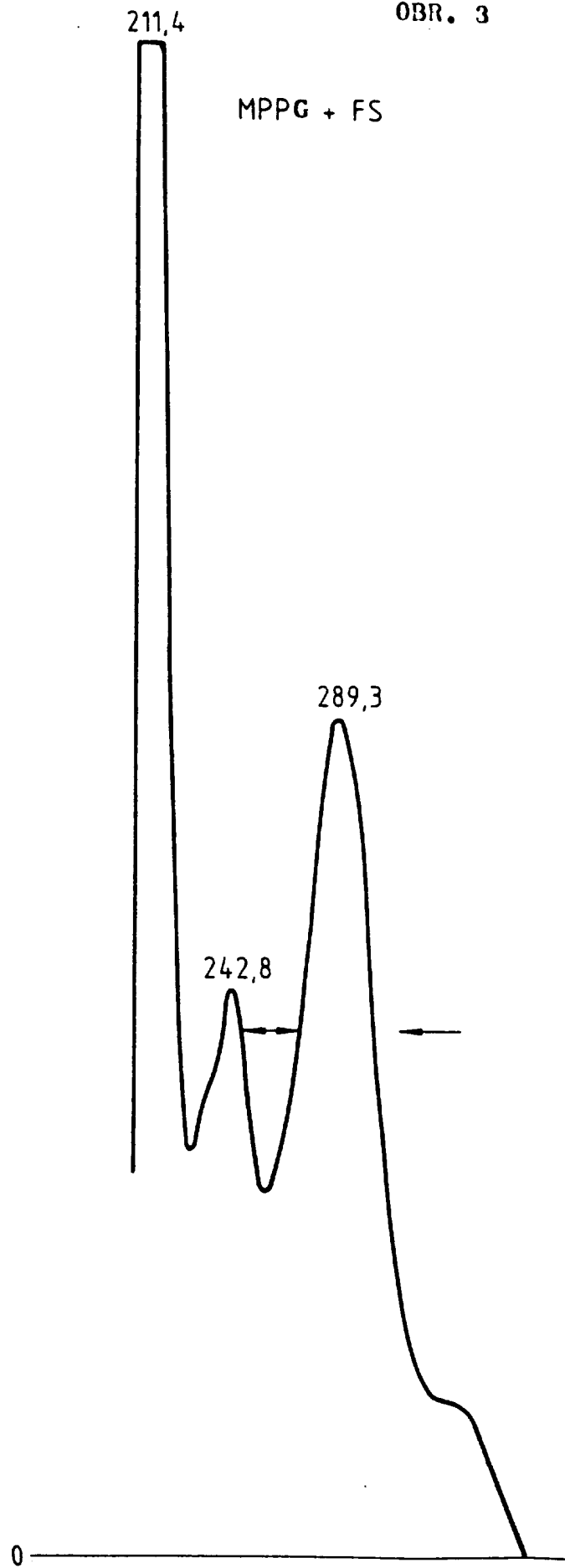
OBR. 1



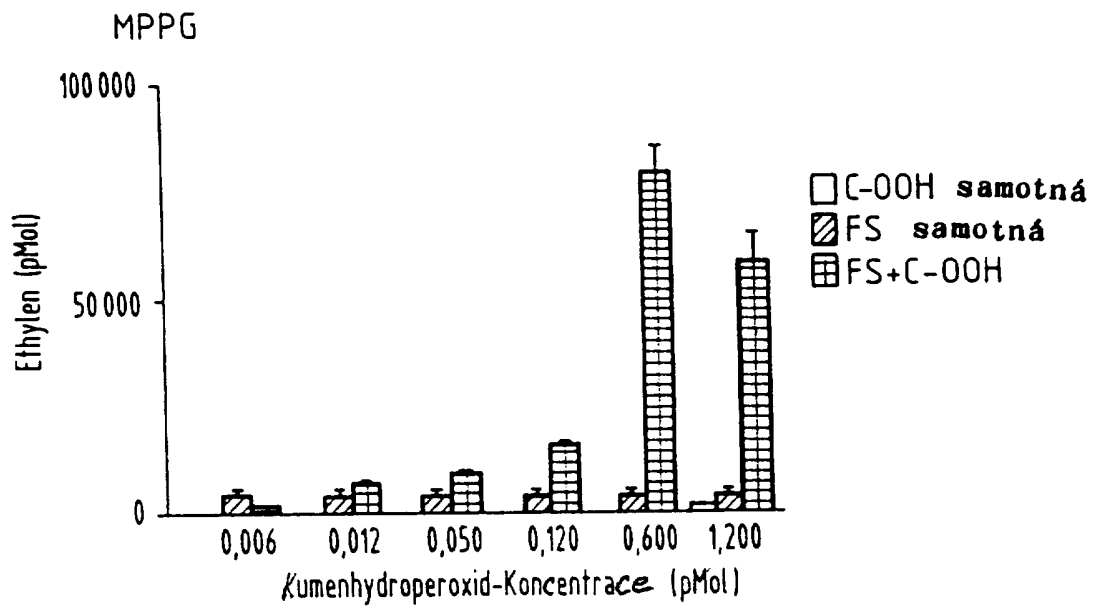
OBR. 2



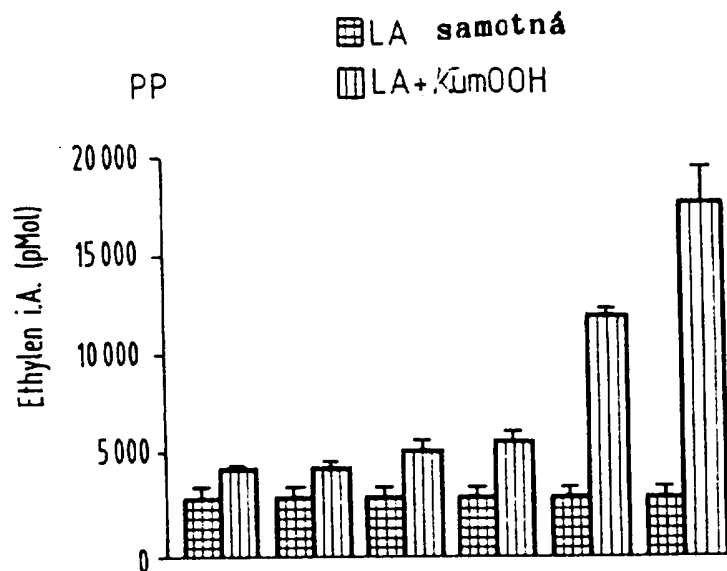
OBR. 3



OBR. 4a



OBR. 4b



Konec dokumentu