



H U 0 0 0 2 1 7 9 8 3 B

(19) Országkód

HU

MAGYAR
KÖZTÁRSASÁGMAGYAR
SZABADALMI
HIVATALSZABADALMI
LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

217 983 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 92 02273

(22) A bejelentés napja: 1992. 07. 09.

(30) Elsőbbségi adatok:

P 41 22 884.7 1991. 07. 11. DE

P 42 17 639.5 1992. 05. 28. DE

(51) Int. Cl.⁷

A 61 K 31/52

A 61 P 25/00

(40) A közzététel napja: 1993. 03. 01.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 05. 29.

(72) Feltalálók:

dr. Gebert, Ulrich, Schlossborn (DE)

dr. Grome, John J., Wiesbaden (DE)

dr. Kittner, Barbara, Wiesbaden (DE)

dr. Rudolphi, Karl, Mainz (DE)

dr. Schubert, Hans-Peter, Apfeldorf (DE)

(73) Szabadalmaz:

Hoechst AG, Frankfurt/Main (DE)

(74) Képviselő:

Topor Gáborné, DANUBIA Szabadalmi és Véd-
jegy Iroda Kft., Budapest

(54)

**Eljárás xantinszármazékokat tartalmazó, sérülések által okozott
szekunder koponya-agy károsodások kezelésére alkalmas
gyógyszerkészítmények előállítására**

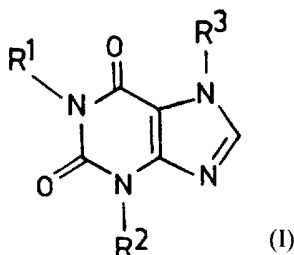
KIVONAT

A találmány tárgya eljárás legalább egy (I) általános képletű xantinszármazékot és/vagy ennek legalább egy, fiziológiailag elviselhető sóját tartalmazó gyógyszerkészítmény – az (I) általános képletben

R¹ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, 3–8 szénatomos oxo-alkil-csoport,

R² jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport és

R³ jelentése 1–6 szénatomos alkilcsoport – előállítására. Az eljárásra jellemző, hogy az ismert módon előállított xantinszármazékot vagy sóját a gyógyszergyártásban szokásos hordozó- és egyéb segédanyagokkal együtt koponya-agy sérülések következtében fellépő szekunder koponya-agy károsodások kezelésére alkalmas készítménnyé alakítják.



HU 217 983 B

A találmány tárgya eljárás xantinszármazékokat tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására.

Az oxo-alkil- és hidroxil-alkil-xantin-származékok egész sora serkenti a vérkeringést, és agyi vérrellátási problémák esetén is alkalmazhatók (US 4 289 776, PCT 86/00401, US 3 737 433). Ismert például, hogy az 1-(5-oxo-hexil)-3-metil-7-n-propil-xantin (1. számú vegyület) értágító hatásánál és kis toxicitásánál fogva arteriális vérrellátási zavarokban szenvedő betegek kezelésére alkalmazható (US 4 289 776).

Az 1-(5-oxo-hexil)-3-metil-7-n-propil-xantin alkalmazását emlékkiesés kezelésére a 4 719 212 számú USA-beli szabadalmi leírás ismerteti.

A koponya-agy sérülések statisztikailag kimutathatóan a baleset okozta halálesetek és maradandó agykárosodás okaként fontos szerepet játszanak. A közlekedési balesetek során sérült személyek mintegy 30%-a kórházi kezelést igénylő koponya- és agysérülést szenved. A Német Szövetségi Köztársaságban évente a legkülönbözőbb balesetek mintegy 150 000 koponya- és agysérülést okoznak, és a halálesetek száma körülbelül 14 000. Az Amerikai Egyesült Államokban évente 34 000 ember belehal a koponya- és agysérülésbe, és az ilyen sérülést túlélők gyakran hosszan tartó egészségi problémákkal küzdenek, illetve maradandóan keresőképtelenek vagy állandó ápolásra szorulnak. Ennek szociál-gyógyászati és közgazdasági hatásai óriásiak, mert a közlekedési balesetek áldozatainak többsége viszonylag fiatal.

Diagnosztikailag nyílt és zárt koponya-agy sérülést különböztetnek meg. A nyílt agysérülés jellemzője, hogy az agyhártya (dura) szakadt, és az agy közvetlenül a külső környezettel áll összekötésben. Ez a fajta agysérülés nem tárgya a jelen bejelentésnek, hanem a bejelentés a zárt koponya-agy sérülésre vonatkozik. Ennek során fokális folytonossági hiányok (például kontuszió, bevérzés) és diffúz agyszövet-károsodások lépnek fel. Az utóbbiak a primer károsított tartományról kiterjednek más agyi területekre, és elhelyezkedésüktől, súlyosságuktól függően reverzibilis vagy maradandó zavarokhoz vezethetnek az agy érzékelő, motorikus és intellektuális funkcióiban. Gyakran a koponya-agy sérülés megtörténte után eszméletlenség lép fel, amely átmehet kómába. Az agyszövetek pusztítása utáni primer károsodás nem szüntethető meg, de csak ritka esetekben oka a halálos kimenetelnek. A maradandó károsodás vagy a halál fő oka a szekunder agykárosodások keletkezése és kiterjedése, és ezek a károsodások potenciálisan reverzibilisek, terápiásan befolyásolhatók. A koponya-agy sérüléseket elszenvedett személyek 90%-ánál szekunder léziók mutathatók ki.

Eddig nincs olyan gyógyszer, amely hatékony védelmet nyújtana a szekunder agykárosodások keletkezése ellen. Burbiturátokkal és kalciumatagonistákkal végzett koponya-agy sérülést szenvedett beteg kezelése jelenleg a szokásos intenzív-gyógyászati intézkedésekre, például szívkeringés és légzés stabilizálására, adott esetben az agy belső nyomásának diuretikummal vagy ozmoterápián végzett ellenőrzésére. Később fizioterápiás és logopedusos rehabilitációs intézkedések követnek.

A poszttraumatikus szekunder agykárosodás mértéke és súlyossága a primer sérülés mértékétől és az orvosi ellátás „timing”-jétől függ. A poszttraumatikus szekunder agykárosodás patogenézise összetett, és egyebek között végül erősen növekedett koponyán belüli nyomáshoz (diffúz agyödémához) és az igen sérülékeny idegsejtek elhalásához vezet (Pfenninger, E. 1988, *Des Schädel-Hirn-Trauma*, H. Bergmann „Anaesthesiologie und Intensivmedizin” című folyóiratának 203. kötet, Springer-Verlag, Berlin; *Head Injury: Hope through research*, 1984, U. S. Dept. of Health and Human Services, National Institutes of Health Publication No. 84-2478).

A szövetek elpusztulásának lényeges tényezőjeként az újabb szakirodalom makrofágok képződését tárgyalja: a makrofágok számos, szövetre toxikus anyagot, főleg szabad oxigéngyököt bocsátanak ki. Makrofágok az immunrendszer aktiválása során keletkeznek, mégpedig nemcsak szabad gyököket képző serkentett vesejtekből, hanem aktivált mikroglia-sejtekből is. Az utóbbiak és a proteolitikus enzimek különösen sok szabad gyököt termelnek (Banati és munkatársai: Glia, 1991). Tekintettel arra, hogy a szabad gyökök fokozódott képződése nyilván a sejtfunkciókat károsíthatja, és a makrofágok neurotoxikus hatását az idegsejtek elhalásával kapcsolatban tárgyalták, az agyi makrofágokban a szabad gyökök képződését elnyomó vegyületek neurologiai körképekben terápiásan alkalmazhatók. A mikroglia-sejtek aktiválását és/vagy makrofágok előfordulását számos olyan neuropatológiai folyamat esetén figyelték meg, amely agyszövet pusztulásával jár [Streit és munkatársai, Glia 1., (1988), 301], így a poszttraumatikus szekunder agykárosodás esetén is.

Meglepő módon az (I) általános képletű xantinszármazékok erősen gátolják a szabad gyökök képződését, mégpedig mind perifériás (peritoneális) makrofágokban, mind az agy aktivált mikroglia-sejtjeinek tenyésztésében.

A találmány tárgya tehát eljárás legalább egy (I) általános képletű xantinszármazékot és/vagy ennek legalább egy fiziológiailag elviselhető sóját tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására. Az (I) általános képletben

R¹ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, 3–8 szénatomos oxo-alkil-csoport,

R² jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport és

R³ jelentése 1–6 szénatomos alkilcsoport.

A fenti vegyületeket és/vagy fiziológiailag elfogadható sóikat a gyógyszergyártásban szokásos hordozó- és egyéb segédanyagokkal együtt koponya-agy sérülések kezelésére alkalmas készítménnyé alakítjuk.

Előnyösen olyan (I) általános képletű xantinszármazékot alkalmazunk, amelyben

R¹ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, 4–6 szénatomos oxo-alkil-csoport,

R² jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport és

R³ jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport.

Különösen előnyösen az 1-(5-oxo-hexil)-3-metil-7-n-propil-xantint vagy annak fiziológiailag elviselhető sóját alkalmazzuk.

Az (I) általános képletű xantinszármazékok megfelelő, fiziológiailag elfogadható sóiként például az alkáli-

fém-, alkáliföldfém- vagy ammóniumsókat, vagy fiziológiailag elfogadható szerves ammóniumbázisokkal képzett sókat említhetjük meg.

A találmány a fenti gyógyszerkészítmények előállítására vonatkozik. A találmány értelmében a készítményeket úgy állítjuk elő, hogy legalább egy, ismert módon előállított (I) általános képletű xantinszármazékot farmakológiailag alkalmas és fiziológiailag elviselhető hordozó- és egyéb segédanyagokkal összekeverjük és sérülés következtében fellépő szekunder koponya-agy károsodás kezelésére alkalmas gyógyszerkészítménnyé alakítjuk. A készítmények orálisan, topikusan, rektálisan, intravénásan vagy adott esetben parenterálisan is alkalmazhatók. A készítmények sérülések által okozott szekunder koponya-agy károsodások esetén alkalmazhatók.

Alkalmas szilárd vagy folyékony készítményformák, például granulátum, porózus, draszté, tableta, (mikro)kapszulák, kupak, szörp, kanalas orvosság, szuszpenziók, emulziók, cseppek vagy injektálható oldatok, valamint készletetett hatóanyag-leadású készítmények. A készítmények előállítása során a szokásos segédanyagok, így hordozók, a szétesést elősegítő anyagok, kötő-, bevonó-, duzzasztó-, csúszató- vagy kenőanyagok, ízesítők, édesítők vagy oldódásközvetítők kerülnek felhasználásra, például mangézium-karbonát, titán-dioxid, laktóz, mannit és egyéb cukor, talkum, tejfehérje, zselatin, keményítő, cellulóz és származékai, állati és növényi eredetű olajok, polietilén-glikolok és oldószerek, például steril víz, valamint egy- vagy többértékű alkohokok, például glicerin.

A készítményeket előnyösen adagolási egységekben szereljük ki, ahol mindegyik egység aktív anyagként legalább egy (I) általános képletű xantin és/vagy fiziológiailag elviselhető sójának bizonyos dózisát tartalmazza. Szilárd adagolási egységek, így tableta, kapszula, draszté és kúp esetén a dózis akár 300 mg-ot, előnyösen azonban 10...100 mg-ot tehet ki. Egy 70 kg testtömegű, koponya-agy sérülést szenvedett ember számára az intenzív kezelés korai fázisában infúzióként 1200 mg, a későbbi rehabilitációs fázisban orálisan adagolt 3×300 mg (I) általános képletű vegyület és/vagy a megfelelő sója az alkalmas napi dózis. A körülményektől függően azonban ennél kisebb vagy nagyobb dózis is lehet célszerű. A dózist egyszeri dózisként, egy egységben vagy több kisebb dózisként meghatározott intervallumokban beadhatjuk.

Végül az (I) általános képletű xantinszármazékok és/vagy megfelelő sóik az említett adagolási formák készítésekor egyéb alkalmas szinergetikus hatást elő nem idéző hatóanyagokkal, például szabad oxigéngyököket befogó hatóanyagokkal, így például 4H-pirazolo-1,5-dihidro-(3,4-d)pirimidin-4-onnal vagy szuperoxid-diszmutáz-enzimmal is formulázhatók.

1. példa

Farmakológiai vizsgálatok és eredményeik

A szabad oxigéngyökök peritoneál-makrofágokban, valamint aktivált mikroglia sejtek tenyésztésében történő intracelluláris képződését átfolyásos citometriás módszerrel (Rothe, Oser, Valet, Naturwissenschaften, 75.,

354., 1988) mérjük. Közelebbről az egyes vitális sejtekben a szabad gyökök képződését úgy határoztuk meg, hogy a membrán-permeabilis és nem fluoreszkáló dihidro-rodamin 123 (DHR; Eugene, OR, USA) intracelluláris oxidációját mértük a membránokon áthatolni képtelen és a sejten belül „foglyul ejtett”, zölden fluoreszkáló rodamin 123-hoz viszonyítva.

A dihidro-rodaminból N,N-dimetil-formamiddal (MF, Merck, Darmstadt, NSZK) 43,3 mmol/l koncentrációjú törzssoldatot készítettünk. A módszer arra is alkalmas, hogy vegyes sejtpopuláción belül egyidejűleg külön-külön mérjük a különböző részpopulációkat, így szennyező populációk kizárására ad módot. Ezen túlmenően egy másik kísérlet sorozatban az adott, megmért sejt típus azonosítását is biztosítottuk fajlagos immuncitokémiai antitest festéssel az átfolyásos citometriás mérés alatt.

12 hetes, hímnemű fehér Wistar-patkányokat peritoneális mosásnak vetettünk alá 10-10 ml HBS-Hanks-oldattal (Serva Feinbiochemica, Heidelberg), peritoneális makrofágok izolálása céljából. A sejteket leüleptítettük ($200 \times g$, 5 perc, $20^\circ C$), majd újból HBS-Hanks-oldatban szuszpendáltuk (4×10^6 sejt/ml). A sejteket ki-preparálás után $4^\circ C$ -on legfeljebb 2 órán át tároltuk, a citometriás elemzés kezdetéig.

A makrofág szuszpenziót (10 μ l) 1 ml HBS-Hanks-oldattal tovább hígítottuk, majd a mérés előtt az összes sejtet a fentiek szerint készített DHR-oldat 1 μ l-jével $37^\circ C$ -on 5 percen át befestettük. Az 1. számú vegyület hatásának vizsgálatára a kísérleti csoportokban a DHR-t tartalmazó sejteket a vegyület 10 μ mol/l, illetve 50 μ mol/l koncentrációjú oldatában 15, 25, 35, 45, illetve 60 percen át inkubáltuk, a szabad gyöökképződés Concanavalin A (Sigma Chemie, Deisenhofen, conA, 100 μ mol/ml) finomvegyszerrel végzett serkentése vagy enélkül. A kontroll csoportok hatóanyag nélkül készültek.

Újszülött patkányok agyából mikroglia sejteket preparáltunk (Giulian & Baker, J. Neuroscience, 1986, 6:2163-2178). A szövet mechanikai széttroncsolása után [ezt Dulbecco szerint módosított Eagle's közegben (Sigma Chemie, DMEM) végeztük, amelyhez még 2 g/l nátrium-hidrogén-karbonátot és 20% hővel inaktivált főtális borjúsérumot adtunk] a primer tenyészeteket 75 ml-es tenyész edényekben 3% parciális CO_2 nyomás mellett $37^\circ C$ -on 2-4 héten át tenyésztettük. A lassan összenövő sejtréteg tetején növekvő sejteket rázásal leválasztottuk, pelletáltuk és Hepes Hanks-féle pufferolt sóoldatban (5 mmol/l Hepes, 0,15 mol/l NaCl, pH 7,35; Serva Feinbiochemica, Heidelberg, NSZK) újból szuszpendáltuk (3×10^6 sejt/ml). Az 1. számú vegyület hatásának vizsgálatára a kísérleti csoportokban a DHR-t tartalmazó sejteket a vegyület 50 μ mol/l koncentrációjú oldatában 15, 25, 35, 45, illetve 60 percen át inkubáltuk, a szabad gyöökképződés Concanavalin A (Sigma Chemie, Deisenhofen, conA, 100 μ mol/ml) finomvegyszerrel végzett serkentése vagy e nélkül. A kontroll csoportok hatóanyag nélkül készültek.

A sejtterfogatot és két fluoreszkálást mértünk párhuzamosan minden „sample”-ban (mintegy 10 000 sejt)

FACScan átfolyásos citométerben (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A rodamin 123 zöld fluoreszkálást (500–530 nm) és propidiumjodid piros fluoreszkálást (590–700 nm) 488 nm hullámhosszú argonlézerrel végzett indukálás mellett. Az átfolyásos citométert szabványosított, 4,3 µm átmérőjű, sárga-zölden fluoreszkáló mikrogömbökkel (Polysciences, St. Goar, NSZK) kalibráltuk.

Mindegyik mért érték az egy „sample”-ban lévő, körülbelül 10 000 sejt egyedi mérésén alapul. A kísérleti peremfeltételek minél állandóbban tartása érdekében több kísérletet végeztünk egy és ugyanazon a napon. Mindegyik ilyen kísérletsorozaton belül egy kísérleti csoportba tartozó 4-4 „sample”-t és kontrollját mértük citometriásan, különbözően definiált időpontokban. Általában egy-egy kísérleti csoport esetén 3-4 kísérletsorozatot végeztünk.

A) A peritoneális makrofágokra gyakorolt hatás

A peritoneális makrofágok Concanavalin A-val (conA, 100 µg/ml) végzett serkentése a szabad oxigén-gyökök szignifikáns növekedéséhez vezetett, ami a zöld fluoreszkálás százalékos fokozódásaként mérhető, miután a dihidrorodamin 123 (DHR) rodamin 123-vá oxidálódott. Ha a peritoneális makrofágokat 50 µmol l. számú vegyület jelenlétében mértük, a conA serkentő hatása blokkoltak mutatkozott (1. táblázat). Az 1. számú vegyület hatása a 15 perces meghaladó inkubálási idő esetén mindegyik mérésnél szignifikáns ($p < 0,05$ t-tesztben). A conA-val serkentett peritoneális makrofágok 50 µM 1. számú vegyület jelenlétében százalékban mért fluoreszkálása még a nem serkentett kontrollmakrofágokénál is kisebb volt. Az 1. számú vegyületnek a szabad gyökök képződésére gyakorolt szuppresszív hatása dózisfüggő, szignifikáns hatást az 1. számú vegyületet 10 µmol koncentrációban tartalmazó oldatban is sikerült elérni. Ennek során a 10 µmol 1. számú vegyület conA-serkentett makrofágokra kifejtett %-os gátlását maximális conA-aktiválhatóság mellett mértük: a 35. percben 21%-ot tett ki és szignifikáns volt ($p < 0,05$ t-tesztben).

Az alábbi 1. táblázat az 50 µM koncentrációjú 1. számú vegyület conA-serkentett makrofágokra gyakorolt hatását mutatja a szabad gyökök képződése vonatkozásában. A számértékek átlagértékek, a standard eltérés zárójelben szerepel. A fluoreszkálás értékei a készülék saját egységei, azaz dimenzió nélküli számok.

* statisztikailag szignifikánsan különbözik a kontrolltól

$p < 0,05$ t-teszt

1. táblázat

Perc	Kontroll	conA	conA + 1. számú vegyület	gátlás%
15	4,5025 (0,897)	7,7775 (1,487)	9,0875 (0,742)	–
25	9,025 (2,658)	20,2 (7,883)	8,067 (6,159)	60*

Perc	Kontroll	conA	conA + 1. számú vegyület	gátlás%
35	28,988 (2,64)	40,47 (0,837)	25,5 (1,87)	37*
45	40,015 (4,54)	46,253 (3,12)	31,755 (1,59)	32*

B) A mikrogliasejtekre gyakorolt hatás

Tenyésztett mikrogliasejtekben a szabad gyökök képződése (rodamin-fluoreszkálásként mérve) lényegesen intenzívebb volt (50–100-szoros), mint a peritoneális makrofágokban. Mint ismeretes (Banati és munkatársai, Glia, 1991), ez a tömeges gyökképződés conA-val végzett serkentéssel már nem fokozható. Az 50 µM 1. számú vegyület jelenlétében inkubált mikrogliasejtek esetén a szabad gyökök képződése észrevehetően gátolt volt. 35 perces inkubálás után a sejtekben lévő rodamin 123 fluoreszkálása elérte a csökkenés mélypontját, és az 1. számú vegyület nélkül mért kontrollérték egyharmadát tette ki (2. táblázat). Az 1. számú vegyület hatása 15 percnél hosszabb inkubálás esetén mindegyik mérésnél szignifikáns volt ($p < 0,05$ t-tesztben).

2. táblázat

50 µM 1. számú vegyület szabad gyökök tenyésztett mikrogliasejtekben végbemenő képződésére

Perc	Kontroll	1. számú vegyület	%-os gátlás
15	2190,4 (19,5)	2060,6 (102,3)	–
25	2626,7 (227,4)	2121,3 (21,4)	19*
35	1602,2 (125,1)	1170,4 (27,3)	27*
45	2029,5 (283,5)	1556,9 (151,9)	23*
60	1239,2 (108,1)	910,4 (24,4)	27*

A számértékek átlagértékek, a standard eltérés zárójelben szerepel.

A fluoreszkálás értékei a készülék saját egységei, azaz dimenzió nélküli számok.

* statisztikailag szignifikánsan különbözik a kontrolltól
 $p < 0,05$ t-teszt

Az (1) általános képletű vegyületek ismertek, és a fent megadott irodalom egy része előállításukat is tárgyalja. A legelőnyösebben alkalmazható vegyület (1. számú vegyület) előállítására az alábbiakban adunk példát.

2. példa

1-(5-Oxo-hexil)-3-metil-7-n-propil-xantin (1. számú vegyület) előállítása

437,2 g 3-metil-7-propil-xantin 240 g metanol és 321 g víz elegyével készített szuszpenziójához emelt

hőmérsékleten 160 g 50 tömeg%-os nátrium-hidroxid-oldatot, majd a kapott oldathoz forráshőmérsékleten 358 g 1-bróm-hexán-5-ont adunk. Az elegyet visszafolyatódító alatt 4,5 órán át forraljuk. Lehűlés után az el nem reagált 3-metil-7-propil-xantint elválasztjuk és az alkoholt ledesztilláljuk. A vizes oldat pH-értékét nátrium-hidroxid-oldattal 11-re állítjuk és az oldatot diklór-metánnal extraháljuk. A szerves fázis bepárlása után a maradékot 5,2 liter diizopropil-éterből átkristályosítjuk. Mintegy 90%-os hozammal (az elreagált 3-metil-7-propil-xantinra vonatkoztatva) kapjuk a cím szerinti terméket.

Olvadáspont: 69–70 °C.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás legalább egy (I) általános képletű xantinszármazékot és/vagy ennek legalább egy, fiziológiailag elviselhető sóját tartalmazó gyógyszerkészítmény – az (I) általános képletben

R¹ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, 3–8 szénatomos oxo-alkil-csoport,

R² jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport és

R³ jelentése 1–6 szénatomos alkilcsoport –

5 előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy ismert módon előállított (I) általános képletű xantinszármazékot vagy sóját a gyógyszergyártásban szokásos hordozó- és egyéb segédanyagokkal együtt koponya-agy sérülések következtében fellépő szekunder koponya-agy károsodások kezelésére alkalmas készítménnyé alakítjuk.

10 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan (I) általános képletű xantinszármazékot vagy sóját alkalmazzuk, amelyben

R¹ jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, 4–6 szénatomos oxo-alkil-csoport,

15 R² jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport és

R³ jelentése 1–4 szénatomos alkilcsoport.

20 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (I) általános képletű xantinszármazékként 1-(5-oxo-hexil)-3-metil-7-n-propil-xantint vagy annak fiziológiailag elviselhető sóját alkalmazzuk.

