

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

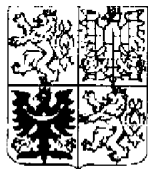
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

524-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21. 08. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.08.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/19531342**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 04. 99**
(Věstník č. 4/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/03678**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/07791**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 31/13

(71) Přihlášovatel:

MERZ + CO. GMBH & CO., Frankfurt am
Main, DE;

(72) Původce:

Elstner Erich F., Gröbenzell, DE;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití sloučenin aminoadamantanu jako
imunoregulátorů**

(57) Anotace:

Sloučeniny aminoadamantanu mohou být používány pro regulaci a/nebo modulaci aktivity předem aktivovaných neutrofilů in vivo nebo in vitro. Při tom nízký koncentrační rozsah funguje tak, že aktivitu zvětšuje, kdežto vyšší koncentrační rozsah aktivitu zmenšuje.

CZ 524-98 A3

Použití sloučenin aminoadamantanu jako imunoregulátorů

Oblast techniky

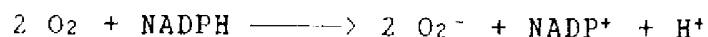
Vynález se týká použití sloučenin aminoadamantanu jako imunoregulátorů, zejména pro regulaci a modulaci již aktivovaných neutrofilních leukocytů.

Dosavadní stav techniky

Neutrofilní leukocyty, podtřída leukocytů, jsou obsaženy v imunitních obranných a jiných reakcích v systému krevních cév v hraničních tkáních (Roitt, I.M.: Příručka imunologie, Steinkopf-Verlag Darmstadt, druhé vydání, 1984).

Neutrofily mohou být aktivovány látkami zevního původu (exogenními látkami), jako jsou např. složky buněčné stěny (obchodně získatelný produkt je "Zymosan"). Ve spojení s tímto jsou reaktivní kyslíkaté druhy tvořeny v tzv. dýchacích (respiračních) prasklinách.

Obr. 1 popisuje zjednodušené schéma stimulace neutrofilního leukocytu: po navázání příslušného ligandu (např. Zymosanu A) na specifické čidlo na neutrofilní membráně je aktivován guanosintrifosfát (GTP), který dále aktivuje fosfatidyl-inositol-4,5-bifosfát (PIP₂) - specifickou fosfolipázu C (PLC). PLC katalyzuje hydrolýzu PIP₂ na inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DG). IP₃ stimuluje uvolňování iontů Ca²⁺ z nitrobuněčných (intracelulárních) zásob. Ionty Ca²⁺ spolu s DG aktivují enzymatický protein kinázu C (PKC), jenž fosforyluje četné bílkoviny a tímto způsobem aktivuje mj. komplex oxidázy NADPH. Oxidáza NADPH katalyzuje dále reakci:



z níž vyplývá reaktivní druh kyslíkatého kationtu O₂⁻.

Ačkoliv aktivované neutrofilní leukocyty (neutrofily) jsou důležité pro fungování imunitní obrany, mohou mít za následek subjektivní příznaky chorob jako jsou např. akutní nebo chronické záněty nebo jiné alergické reakce vyvolané nadměrnými reakcemi způsobenými zejména reaktivními kyslíkatými částicemi. Na druhé straně může být

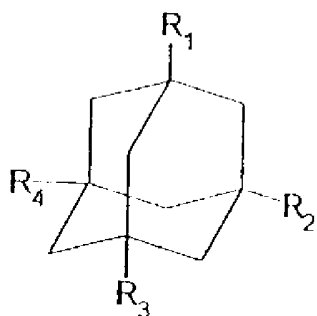
neutrofilní aktivita příliš nízká či nedostatečná pro úspěšnou imunitní obranu s obecnou imunitní nedostatečností jako např. u AIDS. Existuje tudíž potřeba, zejména z lékařského hlediska, možnosti ovlivňování regulační a/nebo zklidňující činnosti neutrofilních leukocytů in vivo (v živém organismu) a in vitro (ve zkumavce). V této souvislosti by měla být neutrofilní aktivita buď zvětšována nebo zmenšována v závislosti na dané indikaci, tj. měla by být regulovatelná podle libosti.

Proto je cílem tohoto vynálezu zpřístupnit prostředek nebo činidlo k regulaci a/nebo zklidňování činnosti neutrofilu.

Podstata vynálezu

Bylo nyní neočekávaně zjištěno, že jisté sloučeniny aminoadamantanu mají regulační a/nebo zklidňující účinek na činnost neutrofilních leukocytů. Tento vynález se týká tohoto zjištění. Pro toto je rozhodující, že neutrofilní leukocyty již byly aktivovány jinými stimulačními prostředky. Aminoadamantany samy o sobě neprokazují žádný aktivující účinek na neutrofily.

Výše uvedený cíl je podle toho řešen použitím sloučenin aminoadamantanu o vzorci (I)



(I)

kde R₁, R₂, R₃ a R₄ jsou zvoleny na sobě navzájem nezávisle z následujících prvků či skupin: -NR₅R₆, -NR₅R₆R₇⁺, vodík, aryly nebo heteroaryly až se sedmičlennými kruhy, C₁-C₂₀-alkyly, C₁-C₂₀-alkenyly a C₁-C₂₀-alkinyly, kde alkylové, alkenylové a alkinylové zbytky (funkční skupiny) mohou být rozvětveny, nerozvětveny nebo cyklizovány a volitelně substituovány halogeny, aryly nebo heteroaryly až se

sedmičlennými cykly pod podmínkou, že alespoň jeden ze zbytků či funkčních skupin R_1 , R_2 , R_3 a R_4 bude zastoupen $-NR_5R_6$ nebo $-NR_5R_6R_7$;
a

R_5 , R_6 a R_7 jsou nezávisle na sobě zvoleny ze zbytků či funkčních skupin: vodík, aryl nebo heteroaryl s až sedmičlennými cykly, C_1 - C_{20} -alkyl, C_1 - C_{20} -alkenyl, C_1 - C_{20} -alkinyl, kde alkyl-, alkenyl- či alkinylskupiny mohou být rozvětvené, nerozvětvené, cyklické a volitelně substituované halogeny, aryly nebo heteroaryly s až 7 členy cyklu, nebo R_5 nebo R_6 , jež spolu s atomem dusíku tvoří heterocyklickou skupinu až se sedmi členy cyklu;
pro regulaci činnosti již aktivovaných neutrofilů.

Sloučeniny aminoadamantanu tohoto typu jsou známy. Tak 1-aminoadamantany jsou popsány v patentech DE 22 19 256, DE 28 56 393, DE 22 32 735, US 3 450 761 nebo US 4 122 193. Výroba sloučenin o vzorci (I) se děje obecně známými způsoby, jako je např. alkylace halogenovaných adamantanů. Následná další halogenace a alkylace vytvářejí jednotlivé di- a /nebo trisubstituované adamantany. Na EP 392 059, jehož podstata je sem výslovně zahrnuta příslušným odkazem, se podívejte ohledně výroby aminoadamantanů.

Sloučeniny aminoadamantanu byly již používány pro farmaceutické účely. Tak patent EP 392 059 odkrývá použití sloučenin 1-aminoadamantanu pro léčení Alzheimerovy choroby nebo poškození mozkových buněk jako důsledek mozkové ischemie (místní nedokrevnosti mozkové tkáně). Patent US 3 450 761 popisuje aminoadamantany s protivirovou aktivitou.

Zda je aktivita neurofilů (neurofilních leukocytů) zvětšena nebo částečně nebo zcela potlačena, závisí na koncentraci použité sloučeniny aminoadamantanu. Tak koncentrace od 10^{-6} do 10^{-5} M má účinek zvětšující příslušnou aktivitu. Koncentrace zhruba $5 \cdot 10^{-6}$ M se ukázala zvláště účinná pro zvětšování neurofilní aktivity - což je koncentrace, jež může být snadno dosažena in vivo v krevní plazmě. Naopak potlačení aktivity je důsledkem zvětšení koncentrace aminoadamantanu. Koncentrace vhodná pro tento účel je 10^{-4} až 10^{-3} M.

Vynález zahrnuje sloučeniny adamantanu substituované jednou nebo několika aminoskupinami, přičemž jsou upřednostňovány

monoaminoadamantany. Tudiž vhodné sloučeniny o vzorci (I) jsou ty, kde R_1 představuje aminoskupinu, jako je např. 1-amino-3-etyl-5,7-dimetyladamantan; a rovněž sloučeniny, v nichž R_1 představuje aminoskupinu a R_3 a R_4 představují vodíkový atom, jako např. 1-amino-3-cyklohexyladamantan nebo 1-amino-3-etyladamantan.

Příklady provedení vynálezu

Upřednostňované sloučeniny adamantanu jsou 1-amino-3,5-dimetyladamantan, 1-amino-3,5-dietyladamantan a N-substituované sloučeniny 1-N-metylamino-3,5-dimetyladamantan a sloučenina 1-N-etylamino-3,5-dimetyladamantan. Zvláště výhodný je 1-amino-3,5-dimetyladamantan, k němuž je odkazováno jako k memantinu (INN, Akatinol Memantine®). Gortelmeyer, R. et al. popisují léčbu Demensova syndromu v knize Spektrum neurorehabilitace, W: Zuckschwerdt Publishers, Mnichov, 1993, str. 50 a dále.

Jak bylo vysvětleno výše, sloučeniny adamantanu podle tohoto vynálezu mají pouze regulační účinek na neutrofily, jež jsou předem aktivovány nebo byly stimulovány zvláštními aktivátory.

Přírodní látky, jako jsou Zymosan, N-formyl-Met-Leu-Phe (N-FLMP) nebo A 23187 (Ca protilátka), jsou známy jako aktivátory. Tyto látky mohou být používány, jestliže se zamýšlí specificky a intenzivněji aktivovat neutrofily in vitro, ale rovněž in vivo. Takto je možné zjistit neutrofily ve vzorku, např. ve vzorku tělesné tekutiny, zejména ve vzorku krve, i když je přítomno jen málo neutrofilů nebo když je jejich činnost velmi slabá. V této souvislosti může být aktivátor přítomen ve spojení se sloučeninou aminoadamantanu: stupeň aktivace neutrofilů stimulovaných daným aktivátorem je zesílen současným přidáním sloučeniny aminoadamantanu.

Další oblastí použití je zlepšování imunitní obrany u osob s různými formami imunitních nedostatečností, zejména u pacientů s AIDS. V tomto případě může být podáván farmaceutický lék, jenž obsahuje sloučeninu adamantanu podle tohoto vynálezu, alternativně ve spojení s aktivátorem neutrofilu. Kromě toho je možné použití u CGD (agranulomatózy), Wegenerovy granulomatózy a/nebo glykogenózy.

Jako samozřejmá věc mohou být neutrofily aktivovány rovněž jako důsledek přirozené imunitní reakce organismu, jako reakce na různé imunogeny a aktivační alergické reakce, záněty a revmatické příznaky způsobené nadměrnou reakcí. Zde může být neutrofilní aktivita oslabena vhodně zvýšenými koncentracemi aminoadamantanu a pacientovi se může dostat úlevy. Proti podmínkám vnitřních a vnějších zánětů např. v koleni, kyčli nebo čelisti a rovněž proti autoimunitním chorobám lze zvláště účinně bojovat lékem obsahujícím aminoadamantan. Další oblast aplikace spočívá v léčbě cizopasných (parazitických) chorob jako je leishmanióza.

V této souvislosti záleží na úvaze lékaře, jak zajistit vhodnou koncentraci sloučenin aminoadamantanu pro regulaci a ztlumení neutrofilní aktivity volbou vhodného dávkování a formy podávání. Podle dané oblasti aplikace jsou zde možné parenterální (mimostřevní) formy, např. nitrožilní nebo ústní formy aplikace; vhodné jsou rovněž formy se stálým působením. Vynález obsahuje též kombinace sloučenin aminoadamantanu podle tohoto vynálezu a také farmaceuticky přijatelné soli, zejména kyselé adiční soli; zde lze uvést např. hydrochloridy, hydrobromidy, sírany, octany, jantarany, vínany nebo adiční sloučeniny s kyselinou fumarovou, maleinovou, citronovou nebo fosforečnou. Farmaceutické směsi mohou rovněž navíc obsahovat neutrofilní aktivátor v závislosti na rozsahu indikací. Pro výrobu léčivého přípravku jsou používány obvyklé farmaceuticky přijatelné nosiče a pomocné látky (adjuvanty).

Následující příklad dokládá závislost aktivitu zvětšujícího nebo tlumícího účinku derivátů aminoadamantanu pomocí speciální sloučeniny - memantinu.

Příklad

Princip měření:

Stanovení aktivity stimulovaných neurofilů při různých koncentracích memantinu bylo provedeno měřením chemiluminiscence. Aktivované neurofily tvoří reaktivní kyslíkaté částice v respirační prasklině, jež jsou zjistitelné jako velmi slabá chemiluminiscence - tzv. nízkourovňová nebo ultraslabá chemiluminiscence. Ke zvětšení výtěžku

fotonů je přidáván luminol jako senzibilizátor (na indikátoru závislá chemiluminiscence). Luminol je cyklický hydrazid, jenž může být působením reaktivních kyslíkatých částic oxidován na diazochinon. Nukleofilním atakem aniontu peroxidu vodíku je tento diazochinon konvertován dále na hydroxyhydroperoxid, který se rozpadá za uvolňování světelného záření na aminoftalát.

Reakční dávka:

Neutrofilý:	10^6 i.A.
PBS-pufr pH (7,4):	až 250 ml
Luminol:	80 mM
Memantin:	různé koncentrace
Stimulační prostředek:	
Zymosan	2,5 mg/ml
nebo PMA	1 mM
nebo A 23187	20 mM
nebo N-FLMP	10 mM

PBS = fyziologický roztok tlumený fosfátem

Analogické reakční směsi mohou být vytvářeny s dalšími sloučeninami adamantanu.

Měření:

Měření bylo prováděno s velmi citlivými, nízký šum registrujícími fotonásobiči, jež konvertují fotony na fotokatodě na primární elektrony a pak je vícenásobně zesilují na signál elektrického impulsu.

Reakce je zahájena stimulačním prostředkem a je měřena bez inkubační doby po dobu 40 minut (= 80 cyklů).

Výsledky:

U neutrofilů, jež byly aktivovány přirozenými stimulačními prostředky (Zymosan A; A23187; N-formyl-Met-Leu-Phe), může být základní rychlost RLU (= relativní světelné jednotky) pomocí 10^{-6} M memantinu dodatečně

zvětšena (Zymosan A zhruba o 90%; A 23187 asi o 60%; N-FMLP o cca 78% ze základní stimulace) [obr. 2-4]. To svědčí o zvětšené respirační puklině a zvětšené fagocytární aktivitě. Tato reakce neprobíhá při stimulaci s toxickým forbol-mystrát-acetátem (asi - 20% základní stimulace) [obr. 5]. Naopak memantin téměř zcela utlumí základní stimulaci všech stimulačních prostředků při koncentraci 10^{-3} .

V kontrolním experimentu může být ukázáno, že memantin sám o sobě nevykazuje žádnou chemiluminiscenci ani ji nezhasí (není ukázáno).

Specifičnost regulace aktivace

Regulační účinek sloučenin aminoadamantanu podle tohoto vynálezu je vysoce specifický pro neutrofily. Tak sloučeniny aminoadamantanu nevykazují žádný vliv na deregulační účinek aktivovaných leukocytů. Z obr. 6 vyplývá, že ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina) ani v relativně vysokých koncentracích sama s memantinem nereaguje. ACC je specifickým indikátorem pro myeloperoxidázu, jež se uvolňuje degranulací leukocytů a tvoří škodlivý chlornan v mimobuněčných prostorech. Myeloperoxidáza reaguje specificky s ACC za vzniku etylénu, který může být zjištěn plynovým chromatografem. Proto vzniklé množství etylénu představuje nepřímou měrnou veličinu pro aktivitu leukocytů.

Naproti tomu indikátor pro respirační puklinu a z toho vznikající kyslíkaté radikály (superoxid, OH-radikály a peroxid vodíku) jsou memantinem aktivovány. To je vidět již při koncentraci pouhých 10^{-7} M, jež může snadno získána in vivo. Aktivační účinek může být zviditelněn přidáním iontů Fe^{3+} , jež posouvají reakční rovnováhu Haber-Weissovy reakce od superoxidu a peroxidu vodíku směrem k OH-radikálům. Citlivým indikátorem pro kyslíkaté částice či složky tohoto typu je KMB (α -keto- γ -tiobutyryl), jenž se rozpadá mj. na etylén za oxidačních podmínek a jenž může být snadno zjištěn (obr. 7).

Jako kontrola ukazuje obr. 8, že KMB-reakce, ale ne ACC-reakce, je stimulována nejprve přidáním iontů Fe^{3+} při koncentraci $> 5 \times 10^{-4}$ M. Samotné ionty Fe^{3+} nemají žádný vliv.

Patentové nároky

1. Použití sloučeniny aminoadamantanu vzorce (I), kde R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou zvoleny nezávisle na sobě navzájem z $-NR_5R_6$, $-NR_5R_6R_7^+$, vodíku, arylu nebo heteroarylu s až 7 články kruhu, C_1 - C_{20} -alkylu, C_1 - C_{20} -alkenylu a C_1 - C_{20} -alkinylu, kde alkyl-, alkenyl- a alkinylskupiny mohou být rozvětvené, nerozvětvené nebo cyklické a volitelně substituované halogenem, arylem nebo heteroarylem s až 7 články kruhu s podmínkou, že alespoň jeden ze zbytků R_1 , R_2 , R_3 a R_4 je reprezentován $-NR_5R_6$ nebo $-NR_5R_6R_7^+$; a

R_5 , R_6 a R_7 jsou zvoleny nezávisle na sobě navzájem z vodíku, arylu nebo heteroarylu až s 7 články kruhu, C_1 - C_{20} -alkylu, C_1 - C_{20} -alkenylu, C_1 - C_{20} -alkinylu, kde alkylové, alkenylové a alkinylové zbytky mohou být rozvětvené, nerozvětvené nebo cyklické a volitelně substituované halogenem, arylem nebo heteroarylem s až 7 články kruhu, nebo R_5 a R_6 , spolu s atomem dusíku, tvoří heterocyklickou skupinu s až 7 články kruhu;

pro přípravu léku užitečného pro regulaci činnosti již aktivovaných neutrofilů.

2. Použití podle nároku 1, kde sloučenina aminoadamantanu o vzorci (I) je zvolena z

1-amino-3-etyl-5,7-dimetyl-adamantanu,

1-amino-3-cyklohexyl-adamantanu,

1-amino-3-etyl-adamantanu,

1-amino-3,5-dimetyl-adamantanu,

1-amino-3,5-dietyladamantanu,

1-N-metylamino-3,5-dimetyl-adamantanu,

1-N-etylamino-3,5-dimetyl-adamantanu.

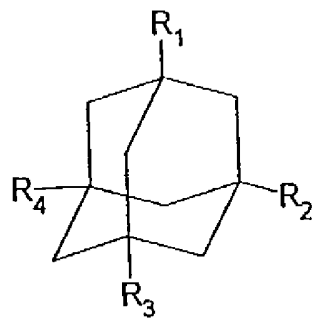
3. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde lék zvětšuje aktivitu neutrofilů zvýšením koncentrace sloučeniny aminoadamantanu o vzorci (I) z 10^{-6} na 10^{-5} M.

4. Použití podle nároku 3, kde lék je užitečný pro léčbu CGD (agranulomatózy), Wegenerovy granulomatózy a/nebo chorob imunitní nedostatečnosti, zejména AIDS.

5. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde lék zmenšuje aktivitu neutrofilů zvýšením koncentrace sloučeniny aminoadamantanu o vzorci (I) z 10^{-4} na

10^{-2} M.

6. Použití podle nároku 5, kde lék je užitečný pro léčbu chronických nebo akutních zánětů, alergických reakcí, autoimunitních chorob a parazitických chorob, zejména leishmaniózy.
7. Použití sloučeniny aminoadamantanu, jak je definována v nároku 1 nebo 2, spolu s aktivátorem pro přípravu léku užitečného pro zesílenou, specifickou aktivaci neutrofilů.
8. Použití podle nároku 7, kde aktivátor je vybírán ze Zymosanu, N-formyl-Met-Leu-Phe a A 23187.
9. Použití sloučeniny aminoadamantanu, jak je definována v nároku 1 nebo 2, pro regulaci již aktivovaných neutrofilů ve zkumavce (in vitro).
10. Použití podle nároku 9, kde aktivita neutrofilů je zvýšena nárůstem koncentrace sloučeniny aminoadamantanu o vzorci (I) z 10^{-6} na 10^{-5} M.
11. Použití podle nároku 9, kde aktivita neutrofilů je snížena zvýšením koncentrace sloučeniny aminoadamantanu o vzorci (I) z 10^{-4} na 10^{-2} M.
12. Použití sloučeniny aminoadamantanu, jak je definována v nároku 1 nebo 2, spolu s aktivátorem pro zesílenou, specifickou aktivaci neutrofilů ve zkumavce (in vitro).
13. Použití podle nároku 12 v detekčním postupu pro zjišťování neutrofilů ve vzorku.
14. Použití podle nároku 12 nebo 13, kde aktivátor je vybírán ze Zymosanu, N-formyl-Met-Leu-Phe a A 23187.

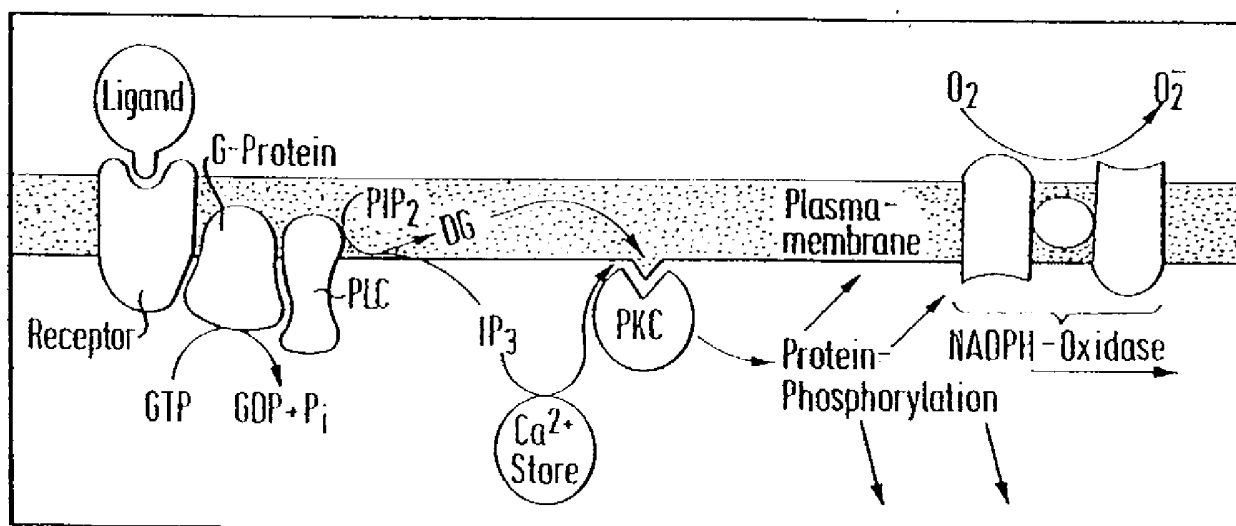


(I)

vzorec (I)

1/6

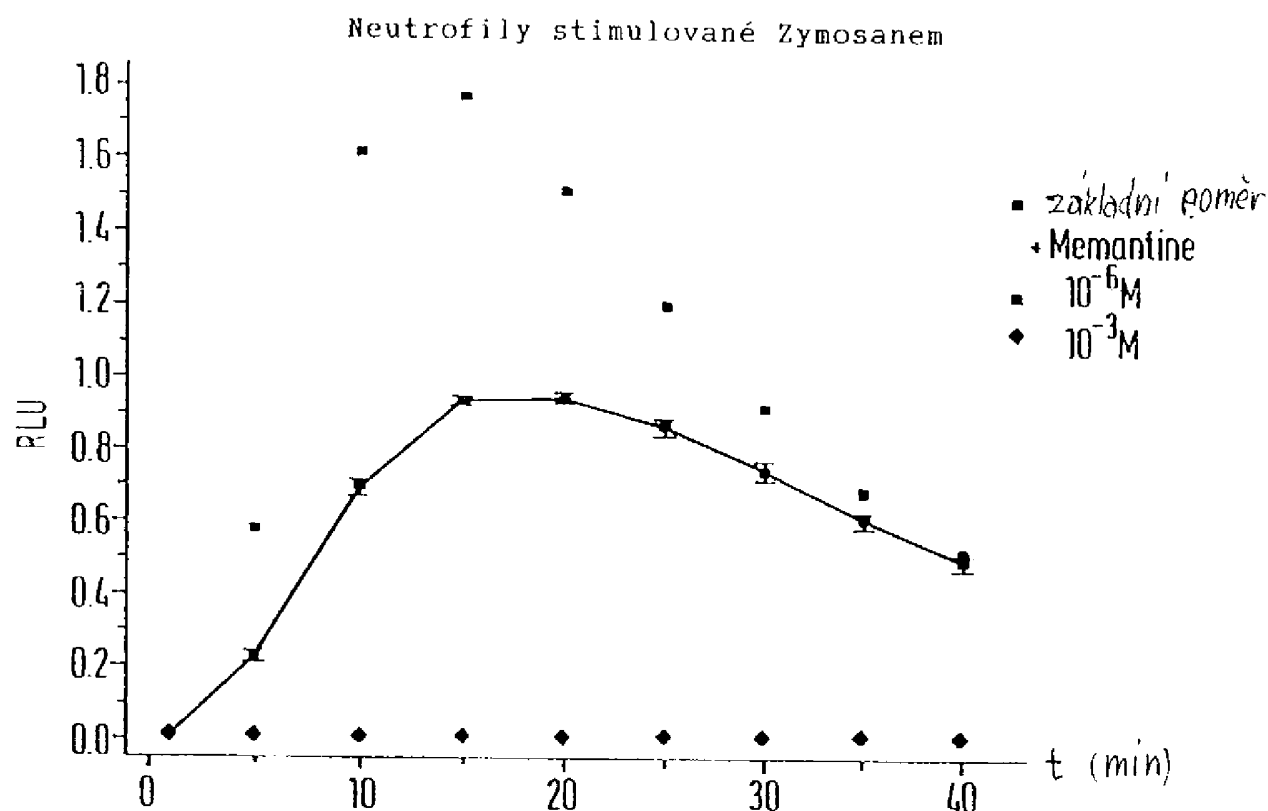
Obr. 1:



Receptor	=	přijemce, čidlo
Ligand	=	vázaná skupina iontů nebo molekul
Ca ²⁺ Store	=	skladování Ca ²⁺
Plasma membrane	=	plazmatická membrána

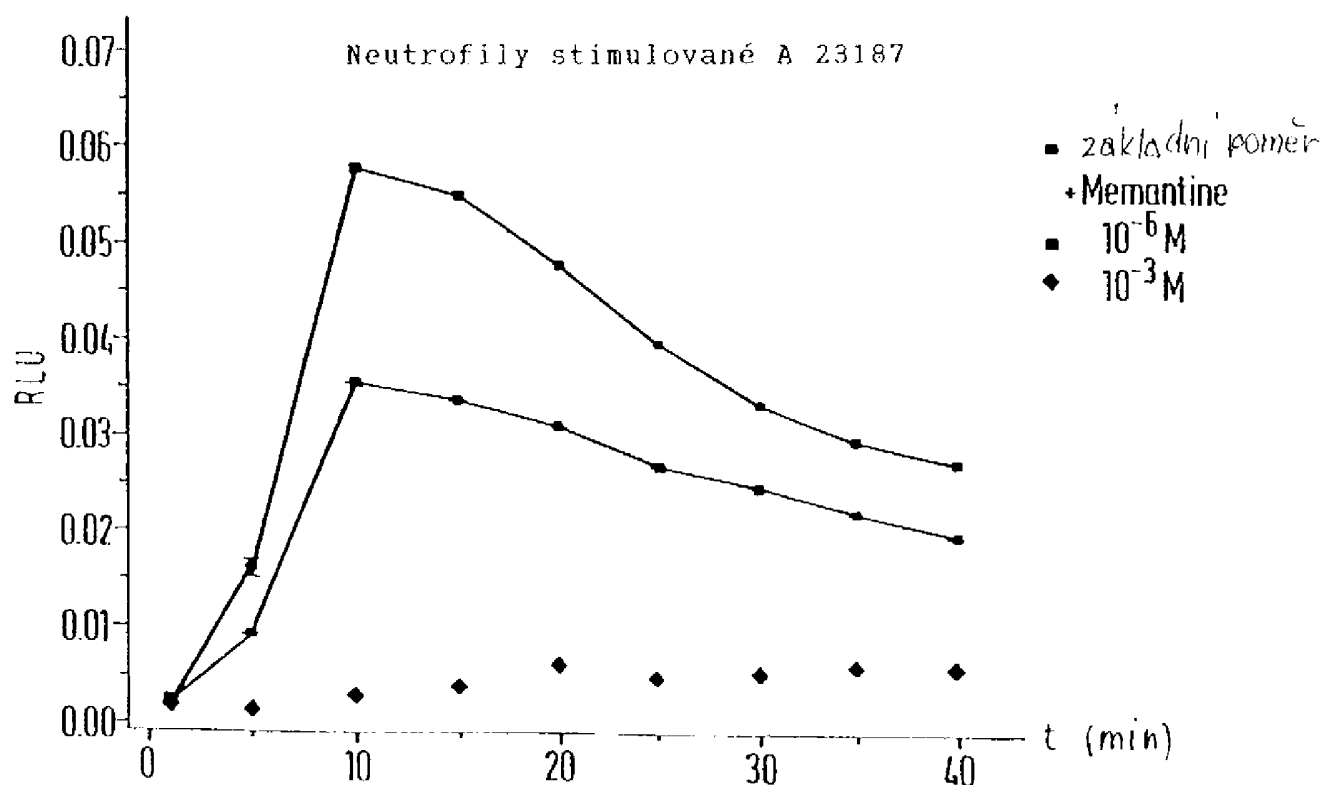
Obr. 2:

2/6



Reakční podmínky: 10^6 neutrofilů i.A.; PBS (pH 7,4); 80 μ M Luminolu; 2,5 mg/ml Zymosan; n = 2x6

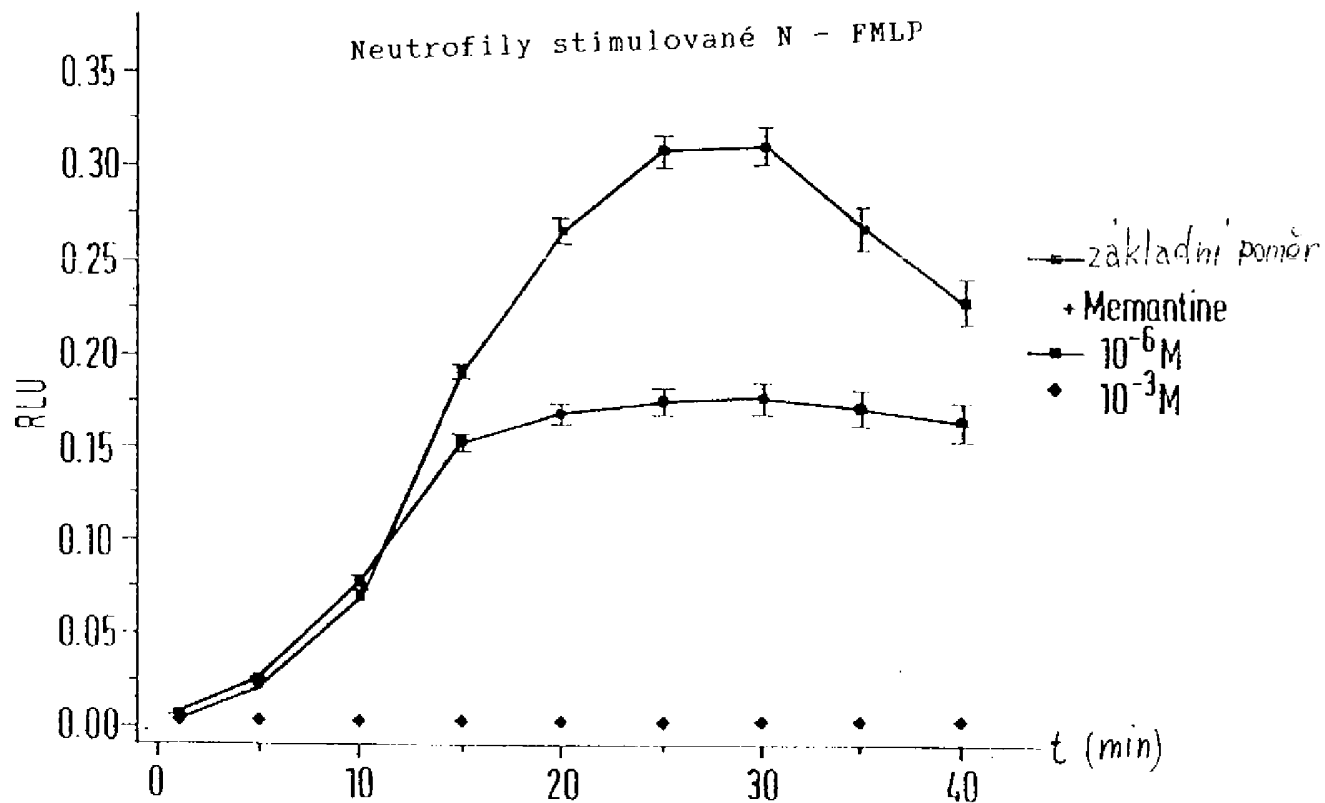
Obr. 3:



Reakční podmínky: viz obr. 2. Místo Zymosan je A23187.

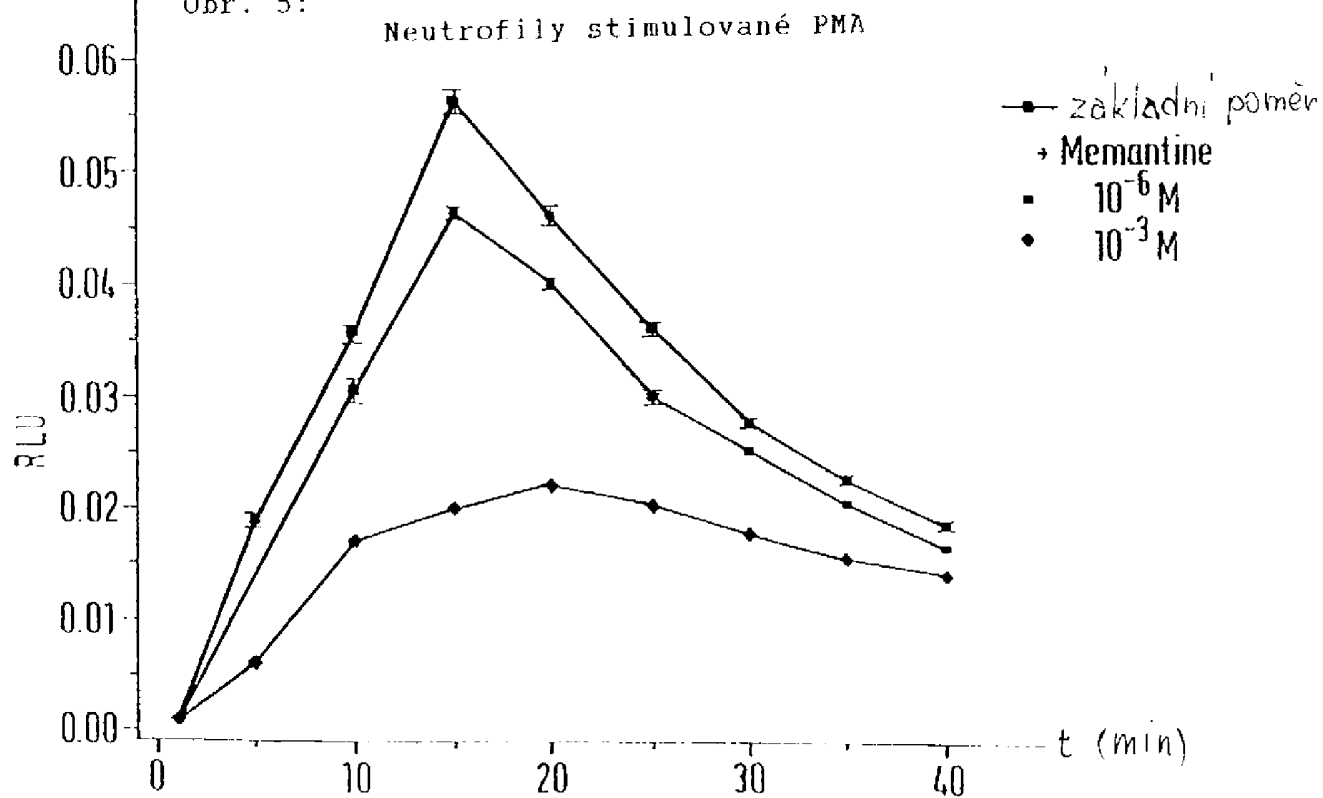
Obr. 4:

3/6



Reakční podmínky: viz výše. Místo Zymosanu je N-FMLP.

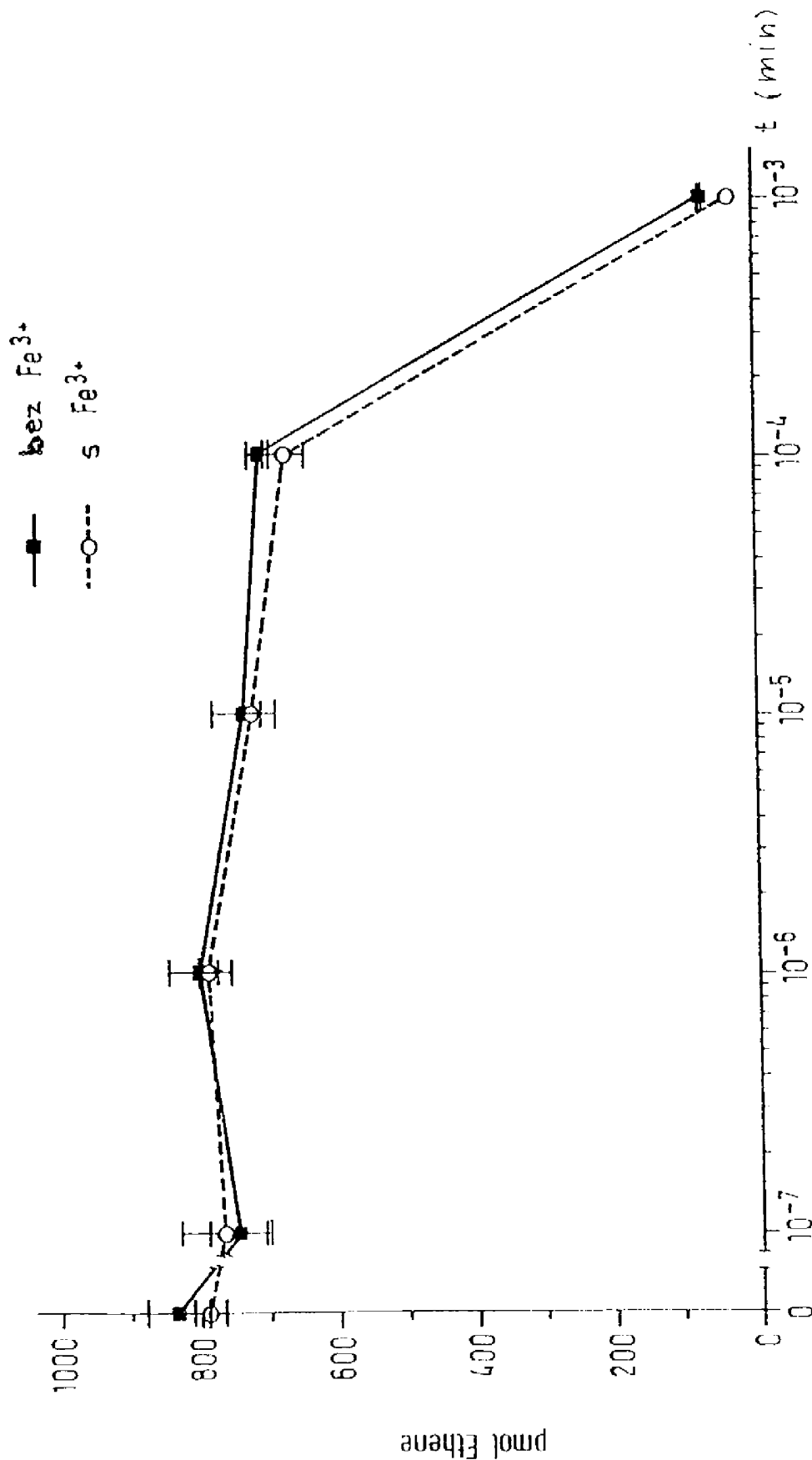
Obr. 5:



Reakční podmínky: viz výše. Místo Zymosanu je PMA.

4/6

Obr. 6:

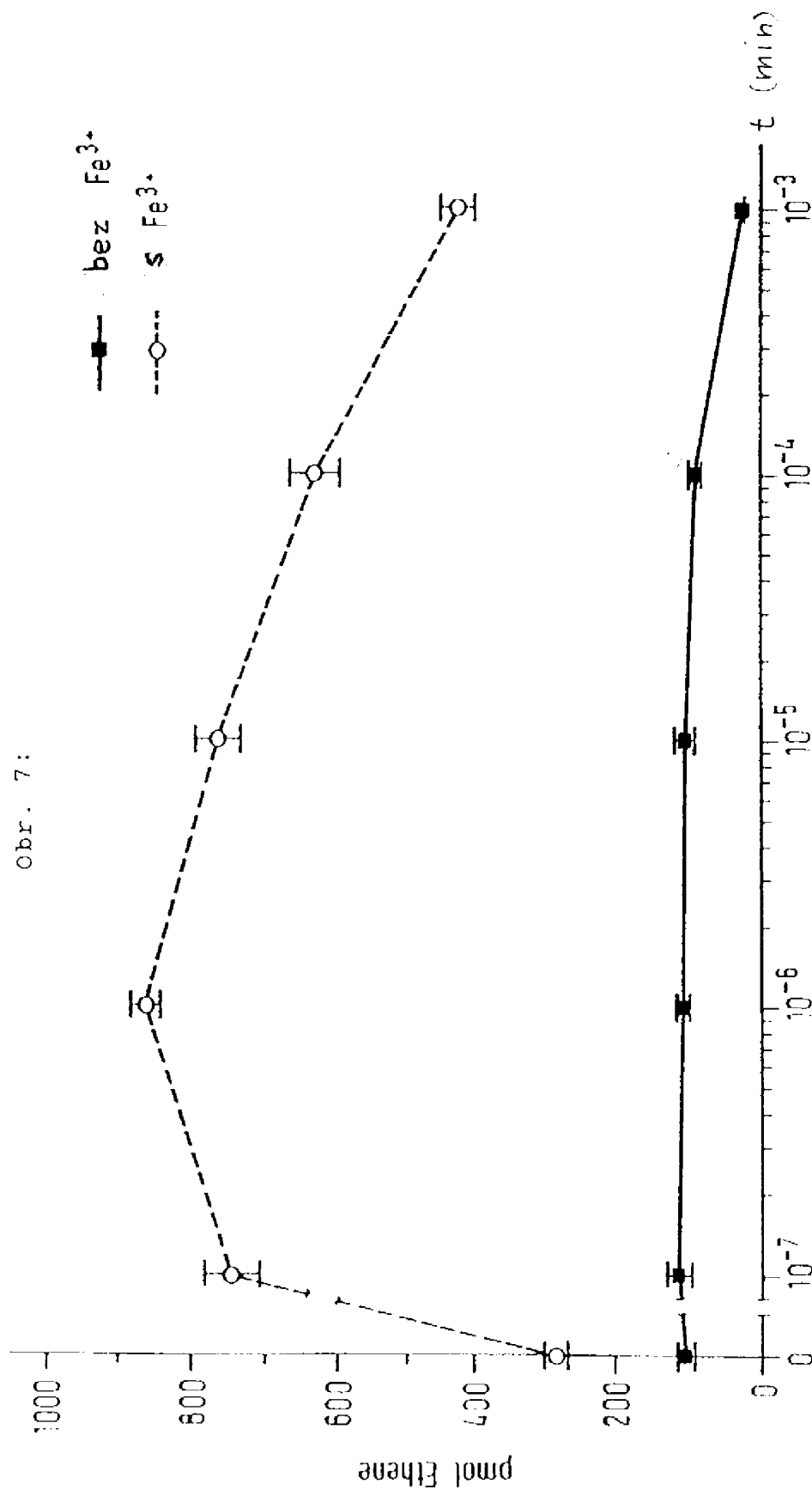


Koncentrace memantinu v M

Reakční podmínky: leukocyty 10^7 ; Zymosan 2,5 mg; ACC 1,5 mM; 10^{-3} M

Fe^{3+} ; inkubace 15 minut

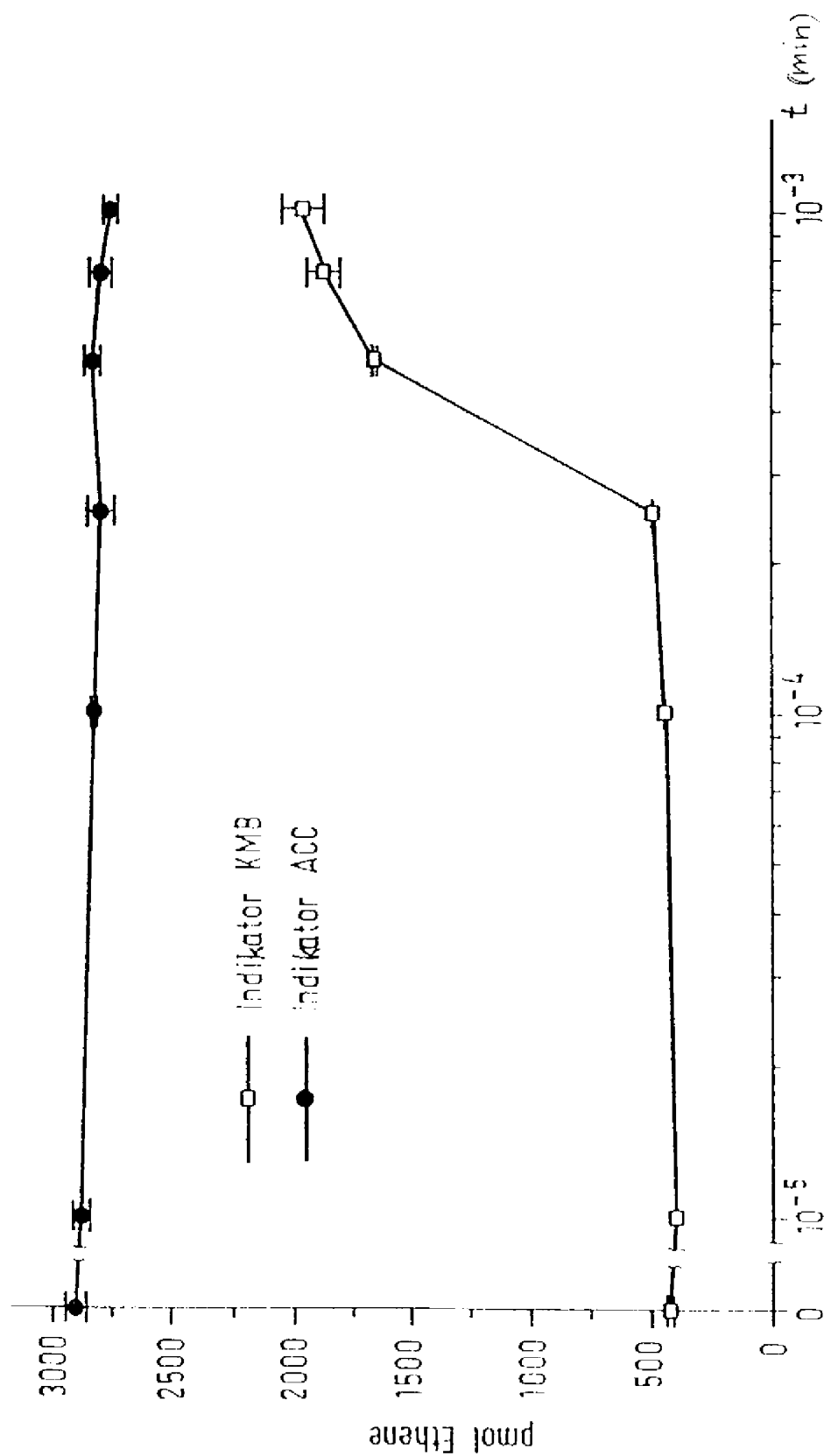
5/6



Jako u obr. 6, jen místo ACC je KMB.

6/6

Obr. 8:

Závislost množství eténu na koncentraci Fe^{3+} v MReakční podmínky: leukocyty 10^7 ; Zymosan 2,5 mg; indikátor 1,5 mM; inkubace 60 minut.