HU 000 022 149 8 B1

(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

221 498 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 94 03518
(22) A bejelentés napja: 1994. 12. 08.
(30) Elsőbbségi adatok:
P 43 42 024.9 1993. 12. 09. DE

(51) Int. Cl.[7]

A 61 K 31/498
A 61 K 31/72
A 61 K 31/513
A 61 P 31/14

(40) A közzététel napja: 1995. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2002. 10. 28.

(72) Feltalálók:
dr. Blunck, Martin, Wuppertal (DE)
dr. Kleim, Jörg-Peter, Kelkheim/Taunus (DE)
dr. Meichsner, Christoph, Liederbach (DE)
dr. Paessens, Arno, Haan (DE)
dr. Riess, Günther, Hattersheim (DE)
dr. Rösner, Manfred, Eppstein/Taunus (DE)

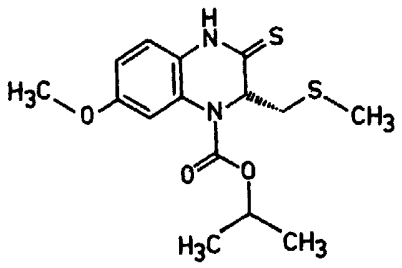
(73) Szabadalmas:
Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt/Main (DE)

(74) Képviselő:
dr. Farkas Erzsébet, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) Kinoxalinszármazék és nukleozidszármazékok kombinációját tartalmazó szinergetikus gyógyászati készítmények

KIVONAT

A találmány gyógyászati készítményekre, alkalmazásukra és előállításukra vonatkozik. A találmány szerinti gyógyászati készítmények hatóanyagként az (A) képletű S-4-izopropoxi-karbonil-6-metoxi-3-(metil-tio-metil)-3,4-dihidrokinoxalin-2(1H)-tion és zidovudin vagy lamivudin 1:20 és 10:1 közötti tömegarányú szinergetikus kombinációját tartalmazzák a szokásos hordozó- és/vagy segédanyagokkal együtt.



(A)

HU 221 498 B1

A találmány szinergetikus gyógyászati készítményekre, alkalmazásukra és előállításukra vonatkozik. A találmány szerinti gyógyászati készítmények hatóanyagként az (A) képletű S-4-izopropoxi-karbonil-6-metoxi-3-(metil-tio-metil)-3,4-dihidrokinoxalin-2(1H)-tion és zidovudin vagy lamivudin kombinációját tartalmazzák a szokásos hordozó- és/vagy segédanyagokkal együtt.

A kinoxalinok régóta ismert vegyületek (lásd O. Hingberg, J. Liebigs Ann. Chem., 237, 327, 1986).

A szabadalmi irodalomban számos kinoxalinszármazékot írtak már le különféle gyógyászati felhasználásra. A 284 848 számú osztrák szabadalmi leírás (1967. 12. 19.) az 1-N-dialkil-amino-alkil-3,4-dihidrokinoxalin-2-(1H)-ont írja le mint görcsoldó hatású vegyületet. A gyulladásgátló hatással rendelkező 4-N-aroil-aril-acil- és -aril-szulfonil-3,4-dihidro-kinoxalin-2-(1H)-onok a japán Sumitomo Chem. Co. Ltd. cég számos szabadalmi bejelentéséből ismertek. A 3 654 275 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerinti 3,4-dihidro-kinoxalin-2(1H)-on-3-karboxamid-származékok gyulladásgátló hatásúak.

A kinoxalinszármazékok vírus elleni hatását ez ideig nem mutatták ki.

Kinoxalinszármazékokkal a 0 509 398 számú európai szabadalmi leírás is, ezen szabadalmi leírásra itt kifejezetten hivatkozunk.

Találmányunk azon a meglepő felismerésen alapul, hogy az említett (A) képletű kinoxalinszármazék vagy fiziológiailag elfogadható sója a nukleozidok vírus elleni hatását fokozza, különösen a retrovírusok esetén, mint amilyen például a HIV (Human Immunodeficiency Virus).

A találmány szerinti szinergetikus készítmények nukleozidként zidovudint (AZT) vagy lamivudint (3-TC®) tartalmaznak. Ezek a nukleozidok általánosan ismert módszerek segítségével állíthatók elő [lásd a Merck-Index 11. kiadását, Rahway, N. J. (1989), Drugs 45 (4), 488. oldaltól kezdve; Drugs 44 (4), 637. old.; Clin. Pharmacol. Ther. 55, 2, 198 (1994), Antiviral. Chem. Chemother 2. szám, 3, 125–132 (1991); Antiviral-Rest. 23, Suppl. 1, 67 (1994); a 34. JCAAC kivonata, Orlando 4–7., 10 (1994)].

Az (A) képletű vegyület a P9201288 számú közzétett német szabadalmi bejelentés szerint állítható elő, de útmutatás az előállítására az alábbi irodalomban is található: Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, S. Coffey, M. F. Ansell (kiadó); Elsevier, Amsterdam, 1989; IV. rész, IJ, 301–311. oldal, Heterocyclic Compounds, R. C. Elderfield (kiadó); Wiley, New York, 1957, 6. kötet, 491–495. old.

A találmány szerinti készítmények előnyösen vírusos megbetegedések kezelésére alkalmazhatók.

A humángyógyászatban indikációs területként például az alábbiakat említjük meg:

1. Humán betegek retrovírus-fertőzéseinek kezelésére és megelőzésére,
2. HIV I megelőzése és kezelése (a humán immunhiányos betegség vírusa; régebben HTLV III/LAV-nek is jelölték), a HIV II által előidézett megbetegedések (AIDS) és az azzal kapcsolatos stádiumok, mint ARC (AIDS related complex), valamint LAS (Lymphadenophathie-szindróma), továbbá ezen vírus által előidézett immungyengeség és encephalopathia.
3. HTLV-I- vagy HTLV-II-fertőzés megelőzése vagy kezelése
4. Az AIDS-carrier állapot (AIDS-vírus-hordozó) kezelése és megelőzése.

Az állatgyógyászatban indikációként az alábbiakat soroljuk fel:

a) Maedivisna által előidézett fertőzés (juhoknál és kecskéknél)
b) progresszív pneumoniavírus (PPV) által előidézett fertőzések (juhoknál és kecskéknél),
c) caprine arthritis encephalitis vírus által előidézett fertőzések (juhoknál és kecskéknél),
d) Zwoegerziekte vírus által előidézett fertőzések (juhoknál),
e) vírus okozta anémia (lónál)
f) a macska-leukémiavírus által előidézett fertőzések
g) a macska immunhiányvírusa által előidézett fertőzések.

A találmány szerinti kombinációs készítmények különösen előnyösen alkalmazhatók a HIV leküzdésére, továbbá a HIV által előidézett megbetegedések kezelésére.

A találmány tárgyához a fenti készítmények előállítása és alkalmazása is tartozik.

A találmány szerinti gyógyászati készítmények enterálisan (orálisan), parenterálisan (intravénásan), rektálisan, szubkután, intramuszkulárisan vagy helyileg alkalmazhatók.

A készítmények lehetnek oldatok, porok, tabletták, kapszulák (beleértve a mikrokapszulákat is), kenőcsök, krémek, zselék, kúpok. Az ilyen készítmények kialakítására segédanyagként felhasználhatjuk a gyógyszerészeti célra szokásosan alkalmazott folyékony vagy szilárd töltőanyagokat és vivőanyagokat, oldószereket, emulgeátorokat, kenőanyagokat, ízesítőanyagot, színezéket és/vagy puffert.

Az alkalmazott dózis 0,1–10, előnyösen 0,2–8 mg/kg testtömeg napi egy vagy több részletre elosztva. Az alkalmazott dózisegységek célszerűen megfelelnek a felhasznált hatóanyag, illetve a felhasznált gyógyászati készítmény farmakokinetikájának.

A találmány szerinti szinergetikus készítmények összetétele bizonyos határokon belül változhat és a technika állásából ismert módszerekkel optimálható. A találmány szerinti kombinációs készítményekben a kétféle hatóanyag tömegaránya 1:20 és 10:1 közötti, különösen előnyösen 1:10 és 5:1 közötti.

Vizsgálati módszerek ismertetése
HIV-fertőzés sejttenyészetben

Pauwels és munkatársai [Journal of Virological Methods 20, 309–320. oldal (1985)] módosított módszere szerint végezzük el a HIV-vizsgálatot. Normális humán vérlimfocitákat (PBL-félét) Ficoll–Hypaque-eljárással feldúsítunk és 20% embrionális borjúszérumot tartal-

mazó RPMI 1640 közegben 90 ng/ml fithemagglutininnel és 40 egység/ml interleukinnel stimulálunk. A HIV-fertőzés céljából a vérlimfocitákat kicsapjuk és a sejtpelletet 1 ml HIV-vírus-oldatban szuszpendáljuk, amikor is a vírus adszorbeálódik, majd az elegyet 37 °C-on 1 órán át inkubáljuk.

A vírus adszorpciójához alkalmazott oldatot centrifugáljuk, a fertőzött sejtüledéket növekedési táptalajjal felvesszük úgy, hogy a sejtkoncentráció 1×10^5/ml legyen. Ezt követően 96 mélyedéssel rendelkező mikrotiterlemezre visszük a fertőzött sejteket úgy, hogy mindegyik mélyedésbe 1×10^4 sejttartalmú szuszpenzió kerüljön.

Egy másik vizsgálati sorozatban a PBL-sejtek helyett H9 jelzésű sejteket alkalmazunk a vírus elleni hatás vizsgálatára.

A találmány szerinti kombinációs készítmény hatását sakktáblatitrálással vizsgáljuk.

A mikrotiterlemezen lévő első függőleges oszlop mélyedései csak táptalajt és a sejteket tartalmazza, ezt a sort nem fertőzzük, azonban ugyanúgy kezeljük, mint azt a fentiekben ismertettük (sejtkontroll). A mikrotiterlemezen lévő második függőleges sorba csak HIV-vel fertőzött sejteket (víruskontroll) és növekedési táptalajt viszünk. A mikrotiterlemez többi mélyedéseiben helyezzük el a találmány szerinti vegyületeket önmagukban vagy megfelelő kombinációban, különféle koncentrációkat alkalmazva, a mikrotiterlemez harmadik függőleges oszlopából kiindulva, ahonnan számítva a vizsgálati vegyületeket a 2. lépésben tovább hígítjuk (100 µl térfogattal mélyedésenként). A kombináció esetében a 2. vizsgálati anyagból hígításokat készítünk egy további 96 mélyedésű mikrotiterlemezen, majd ezt követően az előkészített első lemezre pipettázzuk át a vizsgálandó anyagot. Ennek során minden esetben 100 µl elkészített HIV-vel fertőzött sejteket tartalmazó szuszpenziót adunk (lásd fent).

Ily módon az IC–50 koncentráció feletti, mintegy 10–50-szeres töménységű, és az IC–50 alatti koncentrációértékek tartományát egyaránt feltérképezzük.

A vizsgálati lemezeket 37 °C-on addig inkubáljuk, amíg a kezeletlen vírust tartalmazó kontrollban a HIV-re tipikus óriássejtek képződését a gazdasejtek között mikroszkóppal ki nem tudjuk mutatni (a fertőzést követő harmadik és hatodik nap közötti időszakban). A kezeletlen vírust tartalmazó kontrolltenyészetben a fent ismertetett vizsgálati körülmények között mintegy 20–50 óriássejt képződését észlelhetjük, ugyanakkor a kezeletlen sejtkontrollt tartalmazó mélyedésekben nem jelentkeznek óriássejtek. A 96 mélyedésű mikrotiterlemezen lévő tenyészeteket leszüreteljük és HIV-re fajlagos ELISA-teszttel a HIV-re jellemző antigének jelenlétét ellenőrizzük (Vironostika HIV-antigén, Organon Teknika).

A gátlási értékeket a megfelelő sejtkontrollhoz, illetve vírustartalmú kontrollhoz viszonyítva százalékban fejezzük ki; az IC–50 értékeket pedig a fertőzött és vizsgálati vegyületekkel kezelt sejtek esetében számítjuk ki; az IC–50 az a koncentráció, amely a vírusra fajlagos antigének 50%-ára csökken, a vegyületekkel végzett kezelés hatására. A szinergetikus hatás értékelésére megállapítjuk minden egyes kombináció esetében a számított és a mért gátlási értékek differenciáját [Prichard M. N. és munkatársai: Antimicrob. Agents Chemoth, 37, 540–545 (1993)].

Amennyiben a differencia értéke 0-nál nagyobb, ez azt jelenti, hogy szinergetikus hatásról beszélhetünk. Így az (A) képletű vegyület és AZT, illetve lamivudin alkalmazásakor az 1a. és 1b. táblázatban feltüntetett eredményeket kaptuk.

Az (A) képletű vegyület S-4-izopropoxi-karbonil-6-metoxi-3-(metil-tio-metil)-3,4-dihidrokinoxalin-2(1H)-tion, olvadáspontja 101 °C.

1a. táblázat

A számított és a mért AZT-hatás differenciaértéke (A) képletű vegyület alkalmazása esetén

(A) vegyület nm / AZT nm	50	25	12	6	3	1
50	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	–17	–4
12	0	0	4	18	23	23
6	0	0	7	29	23	–17
3	0	0	10	33	10	–13
1,5	0	0	–2	40	17	3
0,7	–17	–20	–5	7	17	3

1b. táblázat

A számított és mért 3'-TC-hatás differenciaértéke (A) képletű vegyület alkalmazása esetén

(A) vegyület nM / 3'-TC nM	50	25	12	6	3	1,5
50	0	0	0	2	−7	−60
25	0	0	0	40	70	30
12	0	0	0	47	60	20
6	0	0	0	30	40	22
3	0	0	0	34	17	0

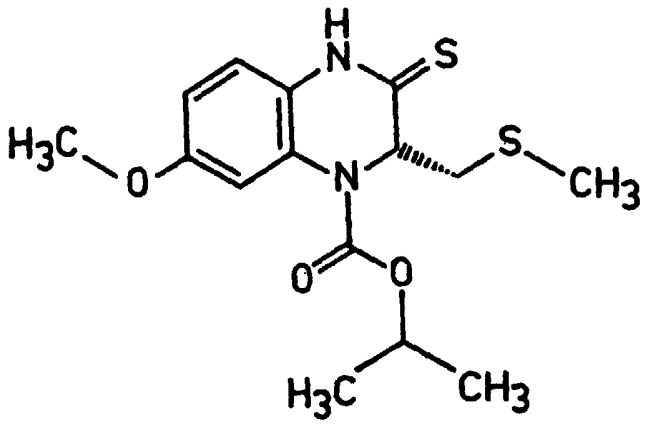
0,7–12 nmol AZT-t 1–6 nmol/l koncentrációjú kinoxalinnal elvegyítve szinergetikus kombinációt kapunk. Hasonlóképpen szinergetikus hatást mutat az (A) képletű kinoxalin és a 3'-TC együttes alkalmazása, ahol ezek koncentrációja 1,5–6 nmol/l, illetve 3–25 nmol/l. Esetleges szinergetikus toxicitás kimutatására a vegyületek Tox-50 értékét határoztuk meg, és a fentiekhez analóg módon értékeljük. A vizsgált kombinációk egyikénél sem észleltünk szinergetikus toxicitást.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Szinergetikus gyógyászati készítmény, amely (A) képletű S-4-izopropoxi-karbonil-6-metoxi-3-(metil-tio-metil)-3,4-dihidrokinoxalin-2(1H)-tion és zidovudin vagy lamivudin 1:20 és 10:1 közötti tömegarányú kombinációját tartalmazza a szokásos hordozó- és/vagy segédanyagokkal együtt.

2. (A) képletű S-4-izopropoxi-karbonil-6-metoxi-3-(metil-tio-metil)-3,4-dihidro-kinoxalin-2(1H)-tion és zidovudin vagy lamivudin 1:20 és 10:1 közötti tömegarányú kombinációjának alkalmazása gyógyászati készítmények előállítására.

3. Eljárás gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve,* hogy (A) képletű S-4-izopropoxi-karbonil-6-metoxi-3-(metil-tio-metil)-3,4-dihidrokinoxalin-2(1H)-tion és zidovudin vagy lamivudin 1:20 és 10:1 közötti tömegarányú kombinációját a szokásos segéd- és/vagy vivőanyagokkal összekeverjük és készítménnyé alakítjuk.



(A)