



REPUBLIKA SLOVENIJA

Urad RS za varstvo industrijske lastnine

(10) **SI 9200404 A**

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: 9200404

(22) Datum prijave: 18.12.1992

(51) MPK⁵: C07C 217/58 , C07C 217/60,
C07C 217/62, C07C 43/225,
C07C 225/54, C07C 205/19,
A61K 31/085, A61K 31/165

(45) Datum objave: 30.06.1993

(30) Prednost: 20.12.1991 HU 4060/91;
08.12.1992 HU 4060/91

(72) Izumitelj: **MAGYAR KALMAN**, Budapest H-1119, HU;
GAAL JOZSEF, Budapest H-1174, HU;
SZIRAKI ISTVAN, Budapest H-1054, HU;
LENGYEL JOZSEF, Budapest H-1043, HU;
SZABO ANNA Z., Budapest H-1163, HU;
MARMAROSI KATALIN, Biatorbagy H-2051, HU;
HERMECZ ISTVAN, Budapest H-1056, HU;
SZATMARI ISTVAN, Budapest H-1118, HU;
TOEROEK ZOLTAN, Budapest H-1043, HU;
KOERMOECZY PETER, Budapest H-1046, HU

(73) Nosilec: **CHINOIN GYOGYSZER- ES VEGYESZEIT TERMEKEK GYARA RT.**, 1-5, To utca, Budapest IV, HU

(74) Zastopnik: **PATENTNA PISARNA D.O.O.**, Čopova 14, p.p. 322, 61000 Ljubljana, SI

(54) FARMACEVTSKI PRIPRAVEK IN POSTOPEK ZA NJEGOVO PRIPRAVO

(57) Izum se nanaša na dvofazen farmacevtski pripravek, ki obsega kot učinkovino inhibitor MAO in inhibitor privzema skupaj z običajnimi farmacevtskimi pomožnimi snovmi. Pripravek lahko uporabimo za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni. Kot učinko-

vino lahko uporabimo po izbiri N-(1-fenil-izopropil)-N-metil-propinilamin ali N-(4-fluoro-fenil)-izopropil-1-il-N-metil-propinilamin ali njune soli, optično aktivne izomere ali metabolite tako kot inhibitor MAO kot tudi inhibitor privzema.

SI 9200404 A

CHINOIN GYÓGYSZER- ÉS VEGYÉSZETI TERMÉKEK GYÁRA RT.

Farmaceutski pripravek in postopek za njegovo pripravo

Izum se nanaša na farmacevtski pripravek, primeren za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, ki vsebuje sestavine, ki imajo za posledico časovno in množinsko primerne koncentracije tako v krvi kot v možganih, in na postopek za njegovo pripravo.

Znano je, da je monoamin oksidaza (MAO) eden od glavnih metabolitskih encimov (Blaschko H. Pharmacol. Rev. 4, 415, (1951)) biogenih aminov, ki se nahajajo v človekovih živčnih celicah. Zaradi njene aktivnosti se biogeni amini, ki igrajo bistveno vlogo pri nevrotransmisiji, razgrade v neučinkovite metabolite. Znano je, da se pri nekaterih boleznih nivo biogenih aminov v možganih zmanjša.

Sredstva, ki inhibirajo metabolitski encim (metabolitske encime), lahko obnovijo normalni nivo teh aminov. Iz tega razloga so uvedli inhibitorje MAO v humano terapijo. Opazili so, da lahko inhibicije MAO pripeljejo do vrste stranskih učinkov, ki so povezani s porastom tiramina (ki je strukturno biogen amin) ("reakcija na sir"), ki izvira iz živil in lahko povzroči zvišanje krvnega tlaka, in ki so lahko smrtni. (Piackar in sodelavci, Psychopharmacology 73, 3087, (1981)).

MAO obstoji v dveh oblikah, imenovanih MAO-A in MAO-B. Če selektivno inhibiramo obliko B, je oblika A sposobna, da razgradi tiramin, ki je substrat mešanega tipa, in nevarne stranske učinke lahko preprečimo. To lahko opazimo v primeru (-)-deprenila, [(-)-N-(-1-fenil-izopropil)-N-metil-propinilamin-hidroklorida)], ki selektivno in ireverzibilno inhibira encim MAO-B (Elsworth et al., Psychopharmacology

57, 33, (1978))].

Zaradi ireverzibilne inhibicije je lahko obnovitev encimske aktivnosti posledica nove ponovne sinteze encima.

Razvoj ireverzibilne inhibicije encima obsega dve stopnji. Prva je reverzibilna in samo tvorba drugega kompleksa encim-inhibitor postane ireverzibilna. Polovična življenjska doba regeneracije encima je 7-8 dni. (Oreland et al., J. Neural. Transm. Suppl. 32, 55-59, (1990)).

Pregled specifičnosti substratov za encime in selektivnosti najbolj znanih inhibitorjev so objavili Dostert in sodelavci. (Medicinal Research Reviews, Vol. 9, No. 1. 45-89, (1989)).

Balard (Science 219, 979-980, (1980) in Burns (Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 4546-4550, (1983)) so opisali, da izzove MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) zaradi svojega nevrotoksičnega delovanja Parkinsonov sindrom pri človeku in da lahko opazimo podobne simptome pri poskusih z živalmi. MPTP povzroči selektivne poškodbe dopaminergičnih nevronov corpusa striatuma. Histološke spremembe so podobne tistim, ki jih opazimo pri obdukciji možganov bolnikov s Parkinsonovo boleznijo. Znano je, da se ta učinek MPTP prepreči z inhibitorji MAO, zlasti z deprenilom. Preprečevalna vloga (-)-deprenila je posledica inhibicije pretvorbe MPTP v MPP⁺. (Nature, 311, 467, (1984)). Poškodbe nevronov, ki jih povzroča MPTP, lahko zadržimo tudi z inhibitorji privzema dopamina (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 2175, 1985), kot mazindolom, s čimer inhibiramo aktivni privzem MPP⁺ (metil-fenil-piridinijevega iona) v dopaminergične nevrone.

Med delovanjem MAO se tvorijo prosti radikali vodikovega peroksida in kisika, kar lahko privede do oksidativne poškodbe nevronov. MAO lahko tudi tvori amoniak in nekatere heterociklične izokinoline, ki jih lahko smatramo kot nevrotoksične. (Maret et al., Drug metabolism. Reviews, 22, 291-332, (1990); P. Riederer et al., Acta Neurol. Scand. 126, 41, (1989); Benedetti in Dostert, Biochem. Pharm. Vol. 38, 555, (1989)).

Znano je, da povzroča nevrotoksično sredstvo DSP-4 (N-(2-kloroetil)-N-etil-2-bromo-benzilamin), sproščanje noradrenalina (NA) selektivno iz centralnih in perifernih noradrenergičnih nevronov (Grzanna et. al., J. Histochem. Cytochem., 1435-1442, 1989).

Nadalje je znano,

- da inhibitorji ponovnega privzema, kot desipramin (10,11-dihidro-N-metil-5-H-dibenz(6,7)azepin-5-propanamin), inhibirajo učinek DSP-4 na sproščanje NA (Jonsson et al., Neuroscience, 7, 2895, (1982); Ross Br. J. Pharmacol., 58, 521, (1976)), in da
- MDL 72974A ((E)-4-fluoro-beta-fluoro-etilen benzen butanamin), visoko selektiven inhibitor MAO-B, nima lastnosti blokiranja kateholaminergičnega ponovnega privzema in ne more preprečiti z DSP-4 povzročene toksičnosti (Finnegen et al. Eur.J. of Pharmacol. 184, 119-126, (1990)).

Pokazalo se je, da (-)-deprenila ni mogoče smatrati samo za enostavno selektiven, ireverzibilen inhibitor MAO-B. Ugotovili so, da inhibira privzem dopamina, noradrenalina in tiramina v živčnih končičih in v periferne ganglione, vendar le v ekstremno visokih dozah (Knoll, Advances in Biochem. Psychopharmacology Vol. 5, 393, 1972). Ne smemo pozabiti, da ima poleg inhibitornega učinka na MAO deprenil tudi inhibitoren učinek na privzem.

Naš cilj je bil pripraviti farmacevtski pripravek z optimalnimi lastnostmi za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni.

Med našimi poskusi smo ugotovili tole:

- 1.) Dolgotrajno inhibicijo MAO lahko dosežemo samo, če koncentracija inhibitorja v možganih in v krvi dosega dovolj visoko koncentracijo (15-40 pmolov/mg tkiva). Če je koncentracija inhibitorja previsoka (30 mg/dan), bo tudi koncentracija metabolitov dovolj visoka, da bo povzročila nezaželen psihostimulativen učinek in/ali prišlo bo tudi do izgube selektivnosti inhibitorja (inhibiran bo tudi MAO-A).
- 2.) Deprenil in p-fluoro-deprenil (N-(4-fluoro-fenil)-izoprop-1-il)-N-metil-propinil-amin) kažeta svojo aktivnost tako kot prvotna (nespremenjena) spojina kot tudi kot metaboliti.

Rezultati so pojasnjeni na sliki 1 in 2.

Po oralnem dajanju izmenično in pozicijsko radiativno markiranega deprenila in p-fluoro-deprenila (obročni ^3H in propargilni ^{14}C (1,5 oz. 10 mg/kg) smo na podganah preizkusili porazdelitev spojin v 15-ih možganskih

regijah (možganske dele v parih smo ločeno preučevali v celoti v 25 možganskih področjih in v plazmi v teku 96 ur kot funkcijo časa. Ugotovili smo, da se je nespremenjena spojina hitro (15 min) absorbirala in prodrla v centralno živčevje. Nespremenjena molekula deprenila je v možganih obstojna le malo časa, metabolite pa lahko najdemo v tkivih dalj časa.

Istočasna prisotnost in enaka množina obeh markerjev kažeta na nespremenjeno molekulo (podatki se nanašajo na molarne koncentracije, izračunane na osnovi obeh markerjev). Zaradi hitre spremembe, ki smo jo opazili pri razmerju injiciranega $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ v tkivih, kažejo naši poskusi na signifikantno tvorbo metabolitov (amfetamina, metilamfetamina, p-fluoro-metilamfetamina in p-fluoro-amfetamina) in na njihovo prisotnost v možganih.

- 3.) Potencialni metaboliti deprenila in p-fluoro-deprenila (metilamfetamin, amfetamin in p-fluoro-metilamfetamin, oz. p-fluoro-amfetamin) imajo signifikantno učinkovitost inhibiranja privzema. In vivo lahko preprečijo nevrotoksičnost MPTP, ne da bi prišlo do znatne inhibicije MAO. Rezultati so prikazani v tabelah 1, 2 in 3. Preizkuse smo izvedli po metodi po Heikilli (Nature, 311, 467-469, (1984)).
- 4.) Potencialni metaboliti deprenila in p-fluoro-deprenila (metilamfetamin, amfetamin in p-fluoro-metilamfetamin, oz. p-fluoro-amfetamin) so sposobni, da preprečijo in vivo pri dozi 1-5 mg/kg (i.p.) z DSP-4 povzročeno nevrotoksičnost, ne da bi prišlo do razvoja inhibicije MAO. Rezultati so prikazani v tabeli 8.

Preizkuse smo izvedli po metodi po Finneganu (Finnegan et al., Eur. J. Pharmacol., 184; 119-126, (1990)).

Metaboliti, uporabljeni v visoki koncentraciji (10 mg/kg; i.p.) in vivo, so okrepili toksični učinek DSP-4, kot je pokazala smrt živali.

- 5.) Za preprečenje nevrotoksičnosti je potrebna bodisi kratkotrajnejša pravilno visoka koncentracija nespremenjene spojine (koncentracija, ki je potrebna za popolno ireverzibilno inhibicijo MAO-B), bodisi - zaradi reverzibilnosti inhibicije privzema - dolgotrajna prisotnost metabolitov.

Ugotovili smo, da lahko dosežemo največji učinek, če sta izpolnjena oba pogoja.

Izum se nanaša na dvofazne farmacevtske pripravke, ki obsegajo kot učinkovino spojino z inhibitornim učinkom na MAO in spojino z inhibitornim učinkom na privzem skupaj z običajnimi pomožnimi snovmi.

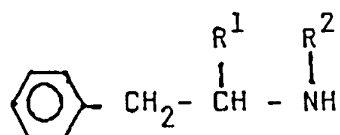
Spojine v skladu z izumom vsebujejo kot učinkovino 5-95 mas.% reverzibilnega ali ireverzibilnega inhibitorja MAO, 5-95 mas.% inhibitorja privzema, s pridom s podaljšanim delovanjem, v razmerju 1-19:1-19, s pridom v razmerju 1:1, 1:2 ali 1:3.

V odvisnosti od bolnikovega stanja, resnosti klinične slike in individualne bolnikove občutljivosti dajemo pripravek v dozi 5-20, s pridom 10 mg/dan.

V kolikor inhibitor privzema nima podaljšanega delovanja, uporabljamo inhibitor s pridom v retardni obliki.

Kot inhibitor MAO lahko s pridom uporabimo deprenil, p-fluoro-deprenil, njune soli oz. optično aktivne izomere.

Kot inhibitorje privzema lahko uporabimo s pridom deprenil, p-fluoro-deprenil ali spojino s splošno formulo I



v kateri je R^1 ravna ali razvejena C_{1-8} alkilna skupina, C_{7-10} fenilalkilna skupina ali fenilna skupina ali C_{3-8} cikloalkilna skupina, R^2 je ravna ali razvejena C_{1-8} alkilna skupina ali C_{1-8} alkilna skupina, substituirana z atomom vodika, hidroksi- C_{1-4} alkoksi skupino ali z eno ali z dvema fenilnima skupinama, fenilna skupina ali C_{3-8} cikloalkilna skupina, pod pogojem, da vsebujeta R^1 in R^2 skupaj najmanj 3 atome ogljika, ali njene kislinske adicijske soli ali metabolite.

Kot spojino s splošno formulo I lahko uporabimo s pridom N-propil-1-fenil-2-pentilamin ali njegovo kislinsko adicijsko sol, N-propil-1-fenil-2-butilamin ali njegovo kislinsko adicijsko sol ali N-propil-1-fenil-2-heksilamin ali njegovo kislinsko adicijsko sol.

Dvofazne pripravke v skladu z izumom lahko pripravimo po samih po sebi znanih metodah v obliki peletov, tablet, preslojenih tablet, transdermalnih pripravkov, dražejev, mikrokapsul, ki vsebujejo suspenzijo, kapsul, preslojenih kapsul, oralnih suspenzij in injekcijskih suspenzij in pri čemer uporabimo znane pomožne snovi.

Kot pomožne snovi lahko s pridom uporabimo tele materiale:

- a.) Kot polnila: saharoza, laktoza, manitol, škrob, škrob-smukec-saharoza, kalcijev fosfat, vodno alkoholna raztopina polividona (polivinilpirolidona) itd.
- b.) Retardna pomožna sredstva:
 - lipofilna baza (stearinska kislina, palmitat stearinske kisline, gliceril-ditripalmitat-stearat, itd.);
 - druge pomožne snovi, znane v farmacevtski tehnologiji: derivati Eudragita, itd.;
 - celulozni derivati: HPMC, CMC, EC in njihove soli.
- c.) Granulacijska tekočina: voda, etanol, etanol-voda, izopropanol, izopropanol-voda.
- d.) Veziva: PVP/VA, derivati Eudragita, celulozni derivati in njihove soli.

Delamo lahko tudi tako, da farmacevtski pripravek pripravimo in situ, to pomeni, bolniku damo istočasno primerno dozo inhibitorja MAO, ki je potreben, da dosežemo kontinuirno 98%-no inhibicijo MAO, in primerno dozo inhibitorja privzema, potrebno, da dosežemo kontinuirno inhibicijo privzema.

Priprava deprenila, p-fluoro-deprenila in spojin s splošno formulo I je opisana v US patentu števil. 4,564,706; v evropskem patentu števil. 186,680 in portugalskem patentu števil. 85.799.

PRIMERI

1. Dvofazno tableto pripravimo po sami po sebi znani metodi:

Prilavek:

Notranja faza: pripravljena z dvojno granulacijo

a.)

Deprenil	:	5 mg
Methocel k 4 M premium	:	50 mg
Laktoza	:	20 mg

Quantum satis izopropanola za pripravo granul

b.)

Deprenil	:	10 mg
Amylum maydis	:	40 mg
Avicel PH-101	:	20 mg
PVP K-25	:	10 mg

Quantum satis izopropanola za pripravo granul (uporabimo lahko tudi destilirano vodo)

Zunanja faza:

Mg stearat	:	8 mg
Smukec	:	15 mg
Aerosil-200	:	2 mg

2. Priprava retardnih tablet, ki vsebujejo 15 mg deprenila

Sestavine

Deprenil	15 mg
Stearinska kislina	30 mg
Eudragit RSPM	45 mg
Collidon VA 64	47 mg
Carbopol 940	35 mg
Sterotex	25 mg
Magnezijev stearat	3 mg

220 mg

(premer tablet 8 mm)

Tehnologija tabletiranja

1. Priprava granul s samo po sebi znano metodo suhega granuliranja.

Zaporedje mešanja prahov:

Collidon VA 64, Carbopol 940, stearinska kislina, Sterotex (atomiziran) (hidrogenirano olje bombažnega semena), Eudragit® RSPM (kopolimer estra akrilne in metakrilne kisline), deprenil.

2. Tabletiranje zmesi prahov z ekscentrsko tabletirko z majhnim številom vrtljajev na minuto.

Rezultati testa raztapljanja

Izvedli smo tri paralelne meritve

Ena celica je vsebovala 15 tablet.

- a.) 316,5 cg/15 kosov
- b.) 316,0 cg/15 kosov
- c.) 319,0 cg/15 kosov

Medij, ki smo ga uporabili za raztapljanje, je bil umetni želodčni sok brez pepsina. (Ph. Hg. VII).

Razredčenje je nič.

$d = 1 \text{ cm}$

$\lambda = 256 \text{ cm}$

Rezultati

Čas (minute)	Raztopljena učinkovina (%)
10	4,5
15	9,0
30	21,0
60	31,2
90	47,7
120	39,3
150	41,1
180	48,6
240	51,9
300	63,3
360	69,0
420 (7 ur)	75,6

3.) Priprava dvofaznih peletov

- Pripravimo "hitre" in "počasne" pelete s telima sestavama:

* HITRI PELETI

- Nevtralni peleti (sladkorne kroglice)	61,1 mg
- Deprenil	16,3 mg
- Laktoza	16,6 mg
- Polyvidone (K30)	6,3 mg

* POČASNI PELETI

- Nevtralni peleti (sladkorne kroglice)	44,6 mg
- Deprenil	11,9 mg
- Laktoza	11,9 mg
- Polyvidone (K30)	4,6 mg
- Etilceluloza	okoli 8,4 mg
- Smukec	okoli 16,9 mg
- Ricinovo olje	okoli 1,7 mg

- Postopek izdelave

Kristale saharoze prevlečemo z zmesjo škroba/smukca/saharoze in vodno alkoholno raztopino Polyvidona in saharoze (sladkorna kroglica).

Na mikrogranule naneseemo ob uporabi alkoholne raztopine Polyvidona zmes deprenil hidroklorida in laktoze.

V primeru "počasnega" peleta naneseemo na dobljene mikrogranule alkoholni lak iz etilceluloze (plastificirane z ricinovim oljem) in smukca.

Da dobimo zahtevani "hitri in počasni" pelet, zmešamo v kapsuli po sami po sebi znani metodi zelene množine "hitrih" in "počasnih" peletov.

4. Priprava dvofaznega transdermalnega pripravka (UG-191)

Sestavine:

Carbowax®	35000	1,0
Carbowax®	4000	16,0
Carbowax®	400	53,0
1,2-propilen-glikol		2,0
Ksantanska smola		15,0
Deprenil		7,0
Cremophor®EL		6,0
		100,0

Tehnologija:

Sestavine Carbowaxa smo stalili in zmes vlili v mešalno posodo vrste Erweka pri 50°C in mešali pri stopnji 6. Deprenil smo raztopili in suspendirali v zmesi propilen glikola in Cremophorja EL pri 50°C in zmes po obrokih (po 50 g) dodali v mešalno posodo. Po vsakem obroku smo zmes mešali 1 minuto. Končno smo pri povečani hitrosti (stopnja 9) dodali po obrokih (po 5 g) ksantansko smolo. Po vsakem obroku smo zmes mešali 1 minuto. Nato smo hitrost mešanja zmanjšali do stopnje 3,5 in z mešanjem nadaljevali do ohlavitve (okoli 1,5 ure). Vsebnost učinkovine je 6,84% in obstojnost je primerna.

Tekoče kristalinično stanje: 100%, s prosojnimi trdnimi kristali z 8-10 μm .

[Cremophor® EL: glicerín-polietilenglikol-ricinoleat.

Ksantanska smola: polisaharid].

Farmakološki podatki:

Pri načrtovanju poskusnih pogojev je treba upoštevati te podatke.

Neposredno in vivo merjenje inhibitorne učinkovitosti metabolitov na privzem ni bilo možno zaradi njihove reverzibilne narave.

Učinkovitost inhibitorja MAO-B se da - ob uporabi aktivnosti MAO-B iz krvnih plosčic kot indikatorja - periferno meriti pri prašičih (krvne plosčice, ki izvirajo iz drugih species, ne vsebujejo dobro merljive aktivnosti encima MAO-B).

Z merjenjem časovne odvisnosti nevrotoksičnosti DSP-4 pri podganah (ob uporabi vsebnosti noradrenalina hipokampusa kot indikatorja) po predhodnem zdravljenju z različnimi dozirnimi oblikami deprenila se da dokazati soodvisnost med pomanjkanjem nevrotoksičnosti DSP-4 in adekvatnim, vendar ne skrajno visokim nivojem metabolitov deprenila v krvi.

V vrsti poskusov smo z analitskimi tehnikami izmerili stalni nivo metabolitov deprenila v krvi domačih prašičev, določili pa smo tudi aktivnost MAO v krvnih ploščicah, možganih in jetrih.

Poskuse smo izvedli na samicah domačih prašičev (velikih belih), ki so tehtale 20 do 25 kg. Prašiče smo imeli med poskusi v ločenih kletkah in dajali smo jim krmo, kakršno so dobivali prej.

Živali smo obdelali oralno s 5, 7,5, 10, 15 mg (-)-deprenila v peletu in z 10 mg i.v. Krvne vzorce (5 ml) smo odvzeli pri 0, 0,08, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 12, 24 in 48 h v epruvetah za centrifugiranje, ki so vsebovale 500 IU heparina za analitsko meritev. Vzorce smo centrifugirali pri 1500 vrt./min 10 min, da smo ločili plazmo. Metabolite smo določili s plinsko kromatografsko metodo ob uporabi plinskega kromatografa Hp-5890 in elucijskim časom za metilamfetamin 21,4 min.

Rezultati so prikazani na sliki 3.

Inhibicijo nevrotoksičnosti DSP-4 smo izmerili na podganah. Za obdelavo podgan smo uporabili program po Finneganu (Finnegan et al., Eur. J. Pharmacol. 184; 119-126; [1990]).

Uporabili smo podganje samce Wistar, ki so tehtali 170-200 g. Živali smo imeli v kletkah s po šestimi živalmi pri konstantni temperaturi (22°C) v prostoru, ki je bil osvetljen 12 h dnevno. Krma in voda sta bili prosto na razpolago. Podgane smo predhodno obdelali oralno s 3 mg/kg kombinacije iz primera 3 (1 mg/kg "hitri"(F) + 2 mg/kg "počasni"(S)), 1, 2, 4 in 8 ur pred obdelavo z DSP-4 (50 mg/kg; intraperitonealno).

Pred predhodno obdelavo z (-)-deprenilom smo živali postili 24 h. Hipokampus podgan smo izrezali in vsebnost noradrenalina izmerili s tehniko HPLC.

Rezultati so prikazani na sliki 4.

Kot lahko vidimo iz slike 4, lahko 3 mg/kg deprenila p.o. prepreči nevrotoksičnost 50 mg/kg DSP-4 i.p. pri podganah. V primeru kontrolnega ("hitrega") pripravka je to preprečevanje v prvem razdobju veliko (86,1%), vendar pa pojema eksponencialno in doseže po 8 urah nivo kontrole, obdelane z DSP-4 (19,6%). Pripravek, za katerega zahtevamo zaščito s patentom, povzroči 58,8%-no inhibicijo, pri čemer je inhibicija praktično enaka (54,5%) inhibiciji kontrolnega pripravka (51,5%) po 2 urah, vendar je signifikantno večja (43,31%) kot pri kontrolah (16%) in se v teku 8 ur praktično ne spremeni. V primeru obdelave s 4 mg/kg deprenila smo ugotovili, da je kontrolni ("hitri") pripravek olajšal nevrotoksičnost DSP-4 v odvisnosti od časa v nasprotju s pripravkom ("hitri in počasni"), za katerega zahtevamo zaščito s patentom. (Glej sliko 5). To pomeni, da doze "hitre" sestavine ne moremo povečevati neomejeno, ne da bi se pojavili nezaželeni stranski učinki.

Nasprotno pa bo pri uporabi pripravkov, za katere zahtevamo zaščito, z naraščajočo množino "počasnega" dela povečana inhibicija MAO-A, kar pomeni, da bo prišlo do izgube selektivnosti deprenila.

Rezultati so podani v tabeli 4.

Tabela 4

Odstotna inhibicija MAO s pripravki deprenila

Pripravek	Možgani	
	MAO-B	MAO-A
1 mg/kg (tablete)	88,02±1,49	2,55±0,56
0,5+0,25 mg/kg ("hiter" in "počasni")	85,84±4,16	14,83±3,37
0,5+1,0 mg/kg ("hiter" in "počasni")	90,50±3,10	27,28±3,93

V primeru transdermalnih pripravkov smo kontrolno skupino obdelali oralno z 10 mg (-)-deprenila v želatinski kapsuli.

Krvne vzorce smo vzeli za določitev aktivnosti MAO-B pri 0, 3, 6, 24, 48, 72 in 96 h. Pri 96 h smo po odvzemu vzorcev krvi prašiče usmrtili in v njihovih izrezanih možganih določili aktivnost MAO-B in MAO-A.

Drugo skupino smo obdelali kot kontrolo s transdermalnim pripravkom UG-111, ki je vseboval 10 mg (-)-deprenila. Vzorce krvi smo vzeli pri 0, 3, 6, 24 in 48 h. Transdermalne pripravke smo odstranili pri 24 h. Za določitev vsebnosti preostalega (-)-deprenila v pripravkih smo uporabili obliž in njegovo najlonsko zaščito. Kožo smo umili z vato z etanolom, ki smo jo tudi uporabili za določitev s HPLC. Prašiče smo usmrtili pri 48 h in določili aktivnost MAO-A in MAO-B v možganih.

Tretjo skupino prašičev smo obdelali kot kontrolo z UG-167, ki je vseboval 20 mg (-)-deprenila. Vzorce krvi smo vzeli pri 0, 3, 6, 24, 48 in 72 h. Obliže smo odstranili pri 48 h in izvedli celotni postopek, opisan pri skupini 2.

Štiri skupine prašičev smo obdelali z UG-191, ki je vseboval 30 mg (-)-deprenila. Vzorce krvi smo vzeli pri 0, 3, 6, 24, 48, 72 in 96 h. Obliže smo odstranili pri 48 h in izvedli celotni postopek, opisan pri skupini 2.

Kri smo vzeli iz v. cava cranialis z 20 ml plasteno brizgalko za injekcije, ki je vsebovala 1,5 ml 7,6%-ne raztopine natrijevega citrata. Volumen odvzete krvi je bil pri jemanju vzorcev vsakokrat 18,5 ml.

Aktivnost MAO smo izmerili radiometrično v skladu z metodami po Wurtmanu in Axelrodu (Biochem. Pharmacol. 12. 1414-19; 1963) z rahlo modifikacijo (K. Magyar v: Monoamine Oxidases and their Selective Inhibition. Ed.: K. Magyar, Pergamon Press, Akadémiai Kiadó, Budapest 11-21; 1980).

Za pripravo krvnih ploščic smo delali po metodi, ki sta jo opisala Willberg in Orelund (Med. Biol., 54: 137-44; 1976).

Tabela 5

Absorpcija (-)-deprenila iz transdermalnih pripravkov kot funkcija časa pri prašičih. (Preostalo vsebnost (-)-deprenila v obližih smo določili s tehniko HPLC).

Transdermalni pripravek	Trajanje poskusa (h)	Preostali deprenil % + S.D.
UG-111 (kontrola)		
10 mg	24	14,2±5,5
UG-167 (kontrola)		
20 mg	24	36,5±9,3
	48	6,1±5,1
UG-191	24	58,5±14,1
30 mg	48	28,3±12,1
	72	8,4±2,4

Rezultati inhibicije aktivnosti MAO-B krvnih ploščic po p.o. in transdermalnem dajanju so prikazani v tabeli 6.

Tabela 6. Učinek (-)-deprenila na inhibicijo aktivnosti MAO-B krvnih ploščic (%) v primerjavi s kontrolo. Meritve smo izvedli s substratom ^{14}C -PEA. $\pm$ S.D. (n = 3)

način dajanja	3	čas				72	96
		6	24	48			
<u>per os</u> 1	97,77	86,04	100,00	82,67		72,32	0,0
	92,52	96,51	100,00	70,48		65,63	0,0
	0,0	95,63	100,00	69,93		50,17	0,0
(10 mg)	95,15	92,73 $\pm$ 3,35	100 $\pm$ 0,0	74,36 $\pm$ 4,16		52,71 $\pm$ 6,56	-
<u>UG-111</u> (kontrola)	0,0	36,27	52,68	60,70		-	-
trans- 2	54,80	86,47	86,02	92,03		-	-
dermalno	95,66	95,47	93,76	98,63		-	-
(10 mg;24h)	75,23	72,74 $\pm$ 18,42	77,49 $\pm$ 12,6	83,79 $\pm$ 11,7		-	-

nadaljevanje

<u>UG-167</u>	23,29	55,77	90,94	88,56	100,00	-
(kontrola)						
trans- 3	72,11	95,90	98,54	91,44	89,34	-
dermalno	65,81	65,05	0,0	90,57	75,02	-
(20 mg; 48h)	53,74±15,33	72,24±12,13	94,74	90,19±0,85	88,12±7,24	
<u>UG-191</u>	85,76	90,55	98,18	94,02	95,08	96,52
trans-	79,83	93,32	95,73	94,66	95,87	96,16
dermalno						
(30 mg; 72h)	0,0	0,0	67,75	95,51	94,22	92,84
	82,80	91,94	87,22±9,76	94,73±0,43	95,06	95,17

Rezultati določanja aktivnosti MAO v možganih so prikazani v tabeli 7.

Tabela 7. Učinek (-)-deprenila na inhibicijo aktivnosti MAO (%) v primerjavi s kontrolo. Meritve smo izvedli v homogenizatih možganov domačih prašičev brez jeder in v jetrih z ^{14}C -PEA; substrat ^{14}C -5-HT. $\pm$ S.D. (n = 3)

način dajanja	^{14}C -PEA	možgani ^{14}C -5-HT	jetra ^{14}C -PEA	^{14}C -5-HT
<u>p. os</u> (96 h)	73,22 $\pm$ 8,13	20,14 $\pm$ 6,0	41,04 $\pm$ 7,62	10,45 $\pm$ 6,4
<u>UG-111</u> (48 h)				
transdermalno	56,31 $\pm$ 10,03	16,39 $\pm$ 8,77	28,80 $\pm$ 5,15	13,7
(24 h)				0
				0
<u>UG-167</u> (72 h)				
transdermalno	86,76 $\pm$ 6,67	18,50 $\pm$ 3,81	30,30 $\pm$ 10,23	19,4
(48 h)				4,1
				0
<u>UG-191</u> (96 h)				
transdermalno	88,82 $\pm$ 1,21	15,52 $\pm$ 3,35	16,92 $\pm$ 10,59	0
(72 h)				

Sestava, velikost delcev in odstotek tekočega kristaliničnega stanja različnih kontrolnih pripravkov so bili takile:

UG-111

PEG 4000	16,0 g
PEG 400	60,0 g
Propilenglikol	8,0 g
Cremophor® EL	2,0 g
Deprenil HCL	5,0 g
PEG 400 ad	100,0 g

Povprečna velikost delcev: 72,7 μm ; tekoče kristalinično stanje: 20 %.

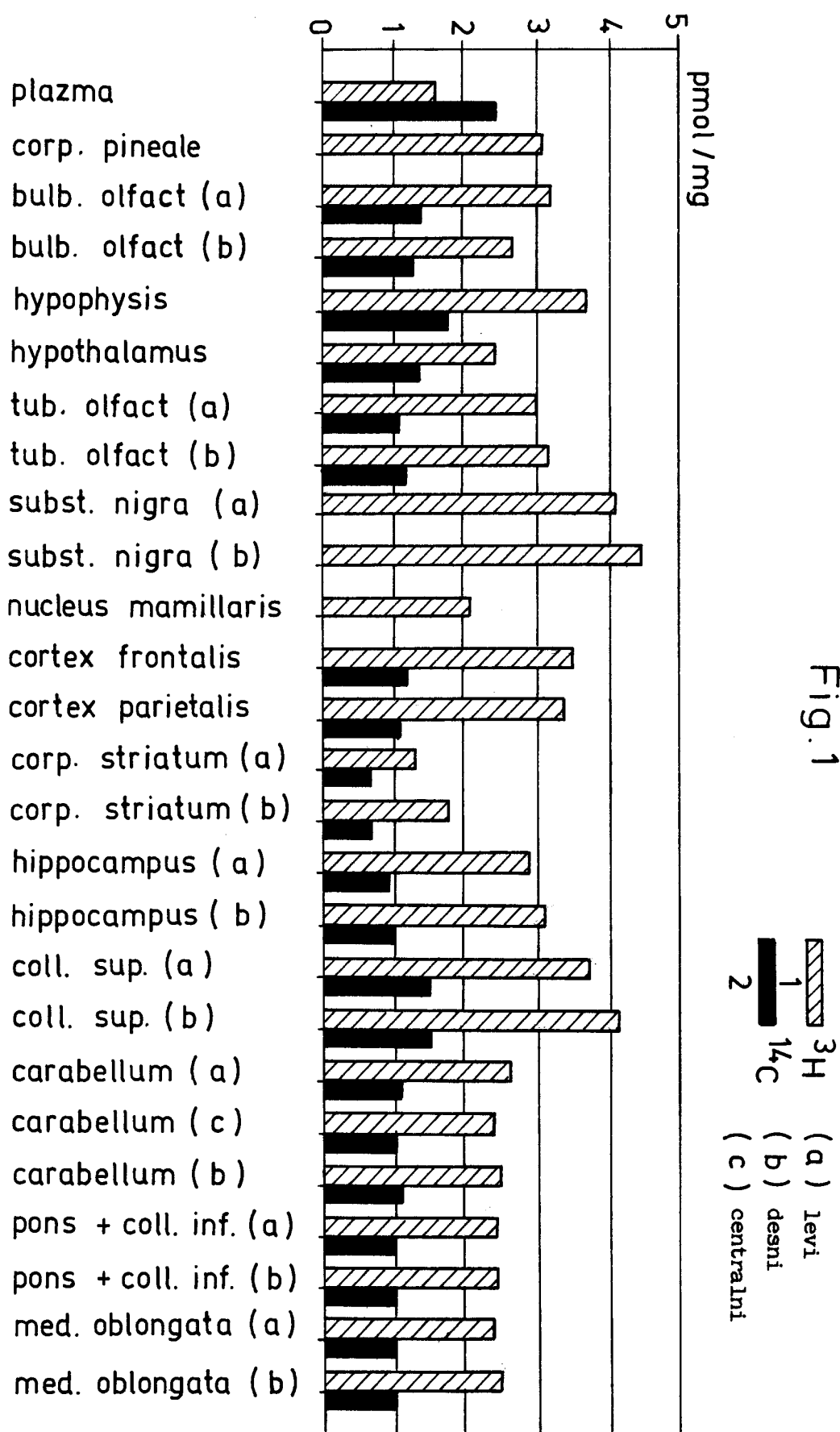
UG-167

PEG 4000	19,0 g
PEG 400	55,0 g
Propilenglikol	8,0 g
Ksantanska smola	10,0 g
Deprenil HCL	5,0 g
PEG 400 ad	100,0 g

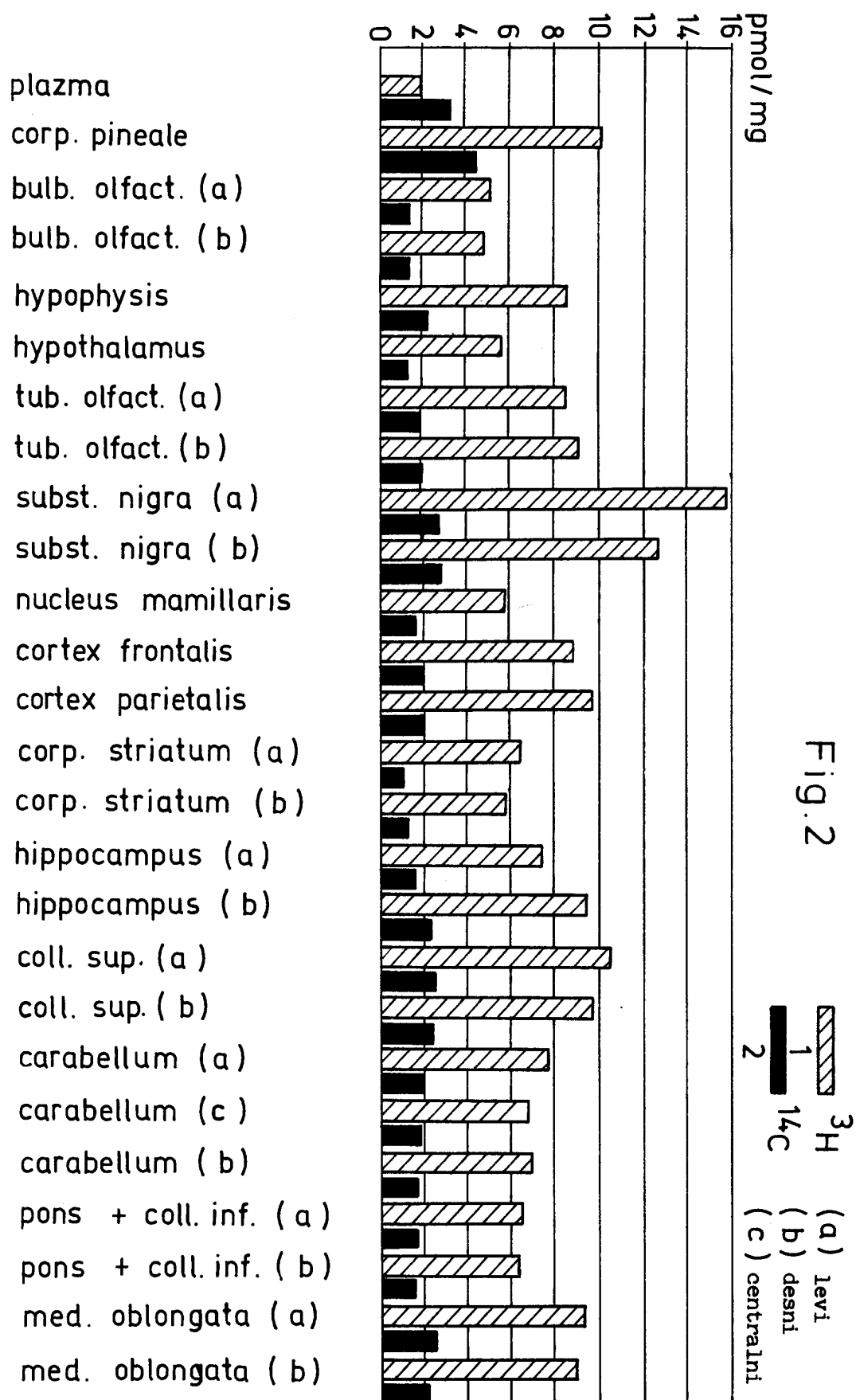
Povprečna velikost delcev: 91-109 μm ; tekoče kristalinično stanje: 70-80 %.

Nivo deprenila v različnih področjih možganov 45 minut po oralni obdelavi z 1,5 mg/kg
izračunan na osnovi meritve ^3H in ^{14}C

Fig. 1

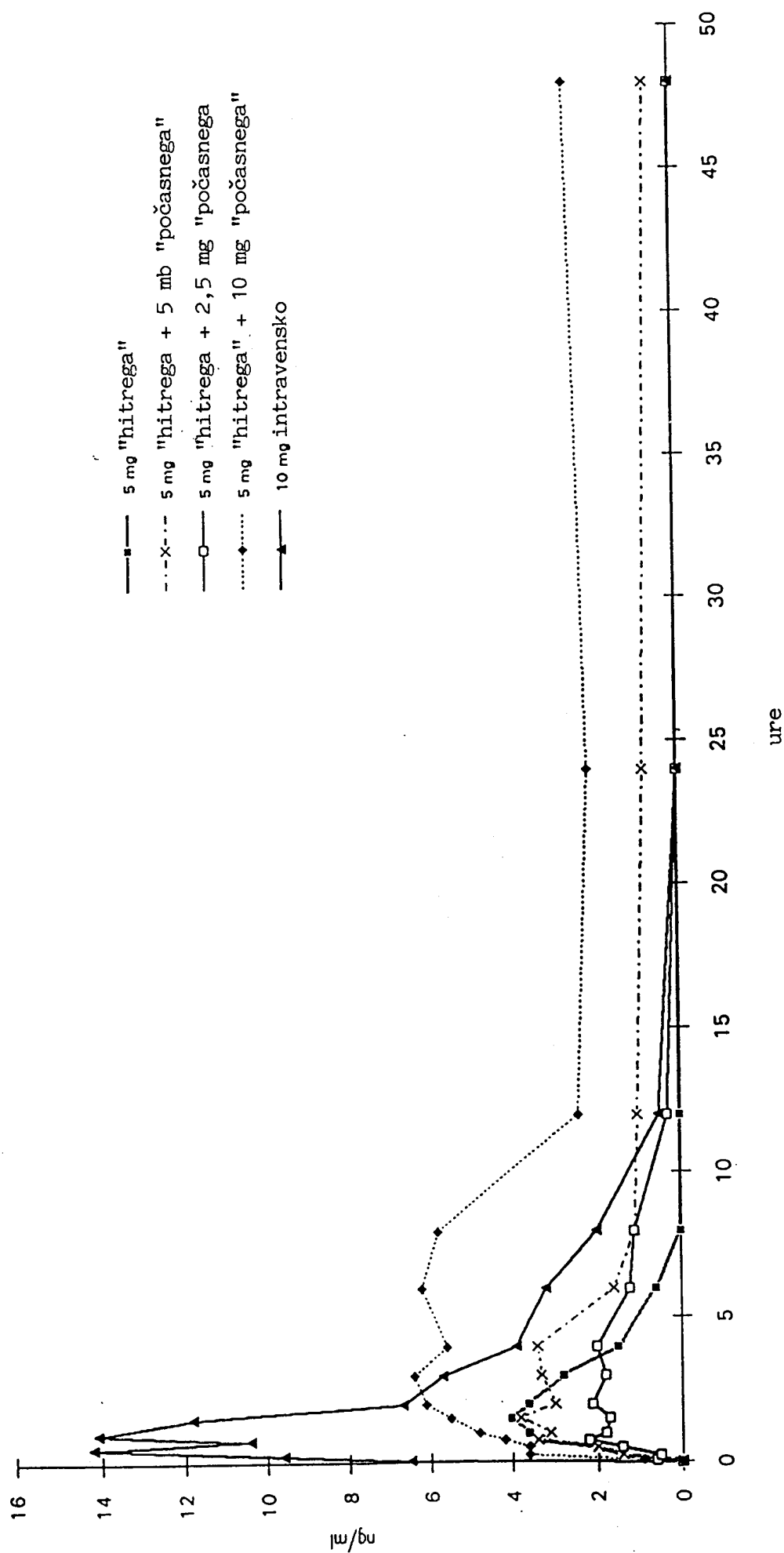


Nivo CH-175 v različnih področjih možganov 45 minut po oralni obdelavi z 1,5 mg/kg,
izračunan na osnovi meritev ^3H in ^{14}C



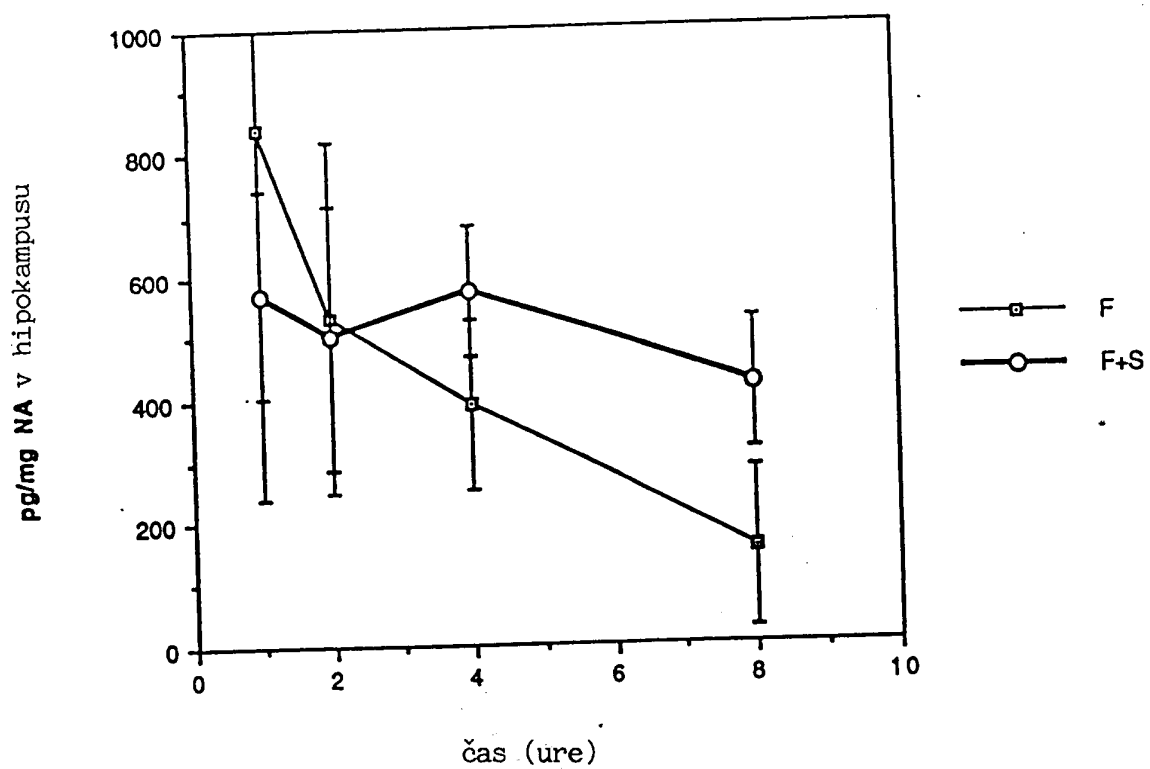
UNIVERSITETA
LJUBLJANA
FACULTETA
ZDRAVSTVENIH
VED

Slika 3 Nivoji amfetamina v plazmi pri prašičih po dajanju različnih doz in oblik Selegilina



Slika 4

Učinek 3 mg/kg deprenila proti nevrotoksičnosti DSP-4 pri podganah



Slika 5

Učinek 4 mg/kg deprenila proti nevrotoksičnosti s 50 mg/kg DSP-4

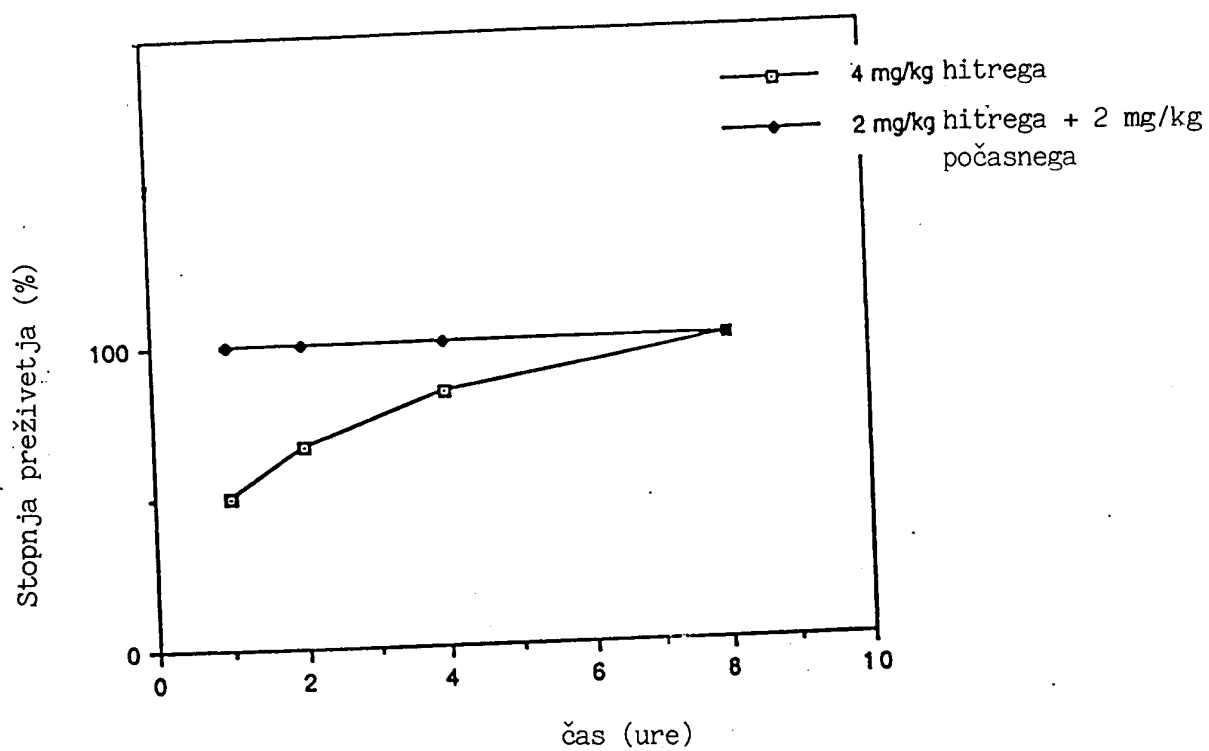


Tabela 1 Vrednosti IC_{50} deprenila in metabolitov pri privzemu MPP⁺ v striatalne sinaptosome

Spojina		Spojina		IC_{50}
	IC_{50} M			M
(-)-deprenil	-	(-)-p-F-deprenil	-	
(-)-desmetil-deprenil	-	(-)-p-F-desmetil-deprenil	-	
(+)-desmetil-deprenil	$9,1 \times 10^{-6}$	(-)-p-F-metamfetamin		$1,3 \times 10^{-6}$
(-)-metamfetamin	$4,9 \times 10^{-7}$	(-)-p-F-metamfetamin		$1,3 \times 10^{-7}$
(+)-metamfetamin	$9,1 \times 10^{-8}$	(-)-p-F-amfetamin		$7,2 \times 10^{-7}$
		(+)-p-F-amfetamin		$1,0 \times 10^{-7}$
homifensin	$3,1 \times 10^{-7}$			
mazindol	$1,7 \times 10^{-7}$			

Tabela 2. Inhibicija privzema in vitro v sinaptosomih podganjih možganov

	NA	DA	5-HT
SPOJINA	HYPOTHALAMUS	STRIATUM	HIPPOCAMPUS
(-)-DEPR.	$5,1 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-3}$
(+)-DEPR.	$1,7 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-2}$
(-)-p-FLUORO-D	$1,3 \times 10^{-5}$	$2,9 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-3}$
(+)-p-FLUORO-D	$6,1 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-4}$
(-)-METILAMF.	$3,5 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-5}$	-
(+)-METILAMF.	$3,5 \times 10^{-7}$	$6,0 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-2}$
(-)-p-FLUORO-MA	$7,5 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-4}$	-
(+)-p-FLUORO-MA	$7,7 \times 10^{-6}$	$2,3 \times 10^{-5}$	$1,7 \times 10^{-3}$

Tabela 3. Učinek naknadne obdelave z deprenilom na nevrotoksičnost MPTP

1. obdelava	čas med obdelavama 30 min	2. obdelava	Dopamin	%	DOPAC	%	HVA	%
fiziološka raztopina		fiz.raztopina	15,1±0,4	100	0,9±0,02	100	1,4±0,06	100
MPTP		"	8,0±0,5 ^a	53	0,7±0,04 ^a	77	1,3±0,07 ^a	79
MPTP		deprenil	15,3±0,4 ^b	101	0,9±0,04 ^b	100	1,3±0,05 ^c	93
MPTP		pargilin	7,1±0,6 ^{NS}	47	0,5±0,04 ^{NS}	55	0,9±0,09 ^{NS}	64
pargilin		MPTP	13,8±0,5 ^b	91	0,1±0,06 ^b	111	1,4±0,06 ^b	100
MPTP		mazindol	14,8±0,8 ^b	98	1,1±0,08 ^b	122	1,7±0,10 ^b	121

a: signifikantno nižje kot kontrola (p 0,01)

b: signifikantno višje kot skupina, obdelana z MPTP (p 0,01)

c: signifikantno višje kot skupina, obdelana z MPTP (0,05 p 0,01)

NS: ni signifikantno

DOPAC in HVA: metabolita dopamina

Tabela 8

Medsebojno delovanje metabolitov (-)-deprenila in (-)-p-fluoro-deprenila z nevrotoksičnostjo DSP-4 pri podganah.

Predhodna obdelava		Obdelava	Vsebnost NA hipokampusa	Preživetje
mg/kg;	i.p.	DSP-4 v % $\pm$ S.D.	v % $\pm$ S.D.	%
(-)-MA	1	50	61 $\pm$ 3,5	100
(-)-MA	5	30	116 $\pm$ 2,1	63
(-)-MA	10	50	nd*	0
(-)-p-F-MA	10	50	nd*	0

* nd: nismo določali. Zaradi toksičnega mesebojnega delovanja so živali poginile v teku prvega dne.

MA = metilamfetamin

p-F-MA = p-fluoro-metilamfetamin.

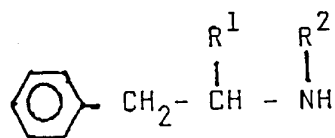
Za

CHINOIN GYÓGYSZER- ÉS
VEGYÉSZETI TERMÉKEK GYÁRA RT.:



PATENTNI ZAHTEVKI

1. Dvofazni farmacevtski pripravek, označen s tem, da obsega kot učinkovino inhibitor MAO in inhibitor privzema skupaj z običajnimi farmacevtskimi pomožnimi snovmi.
2. Pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da obsega kot inhibitor MAO reverzibilen ali ireverzibilen inhibitor MAO s podaljšanim delovanjem.
3. Pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da obsega inhibitor privzema s podaljšanim delovanjem.
4. Pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da obsega inhibitor MAO v masni množini 5 do 95% in inhibitor privzema v masni množini 5 do 95 %.
5. Pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da obsega inhibitor MAO in inhibitor privzema v razmerju 1 - 19:1-19.
6. Pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da uporabimo inhibitor privzema v retardni obliki.
7. Pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da obsega kot inhibitor MAO N-[1-fenil-izopropil]-N-metil-propinilamin hidroklorid ali njegov optično aktiven izomer.
8. Pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da obsega kot inhibitor MAO N-[4-fluoro-fenil-izoprop-1-il]-N-metil-propinilamin ali njegov optično aktiven izomer.
9. Pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da obsega kot inhibitor privzema retardni N-[1-fenil-izopropil]-N-metil-propinilamin hidroklorid ali njegov metabolit ali njegove optično aktivne izomere ali metabolite.
10. Pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da obsega kot inhibitor privzema retardni N-[4-fluoro-fenil-izoprop-1-il]-N-metil-propinilamin ali njegov metabolit ali njegove optično aktivne izomere ali metabolite.
11. Pripravek po zahtevku 1, označen s tem, da obsega kot inhibitor privzema spojino s splošno formulo I



v kateri je R^1 ravna ali razvejena C_{1-8} alkilna skupina, C_{7-10} fenilalkilna skupina ali fenilna skupina ali C_{3-8} cikloalkilna skupina, R^2 je ravna ali razvejena C_{1-8} alkilna skupina ali C_{1-8} alkilna skupina, substituirana z atomom vodika, hidroksi- C_{1-4} alkoksi skupino ali z eno ali z dvema fenilnima skupinama, fenilna skupina ali C_{3-8} cikloalkilna skupina, pod pogojem, da vsebujeta R^1 in R^2 skupaj najmanj 3 atome ogljika, ali njene kislinske adicijske soli ali metabolite.

12. Pripravek po zahtevku 11, označen s tem, da obsega kot učinkovino spojino s splošno formulo I, kjer pomeni R^1 etilno, propilno, butilno, heksilno, fenilno ali fenilmetilno skupino.

13. Pripravek po zahtevku 12, označen s tem, da obsega kot spojino s splošno formulo I N-propil-1-fenil-2-pentilamin ali njegovo kislinsko adicijsko sol, N-propil-1-fenil-2-butilamin ali njegovo kislinsko adicijsko sol ali N-propil-1-fenil-2-heksilamin ali njegovo kislinsko adicijsko sol.

14. Postopek za pripravo pripravkov po zahtevku 1, označen s tem, da pomešamo inhibitor MAO in inhibitor privzema z običajnimi farmacevtskimi pomožnimi snovmi in zmes po sami po sebi znani metodi dodelamo v farmacevtski pripravek, primeren za zdravljenje kliničnih slik, ki se razvijejo v teku nevrodegenerativnih procesov.

15. Postopek po zahtevku 14, označen s tem, da formuliramo pripravek v obliki dvofaznega peleta, tablete ali transdermalnega pripravka.

Za:

CHINOIN GYÓGYSZER- ÉS
VEGYÉSZETI TERMÉKEK GYÁRA RT.

1111 Budapest, Váci utca 111.

Handwritten signature

POVZETEK

Farmacevtski pripravek in postopek za njegovo pripravo

Izum se nanaša na dvofazen farmacevtski pripravek, ki obsega kot učinkovino inhibitor MAO in inhibitor privzema skupaj z običajnimi farmacevtskimi pomožnimi snovmi. Pripravek lahko uporabimo za zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni. Kot učinkovino lahko uporabimo po izbiri N-(1-fenil-izopropil)-N-metil-propinilamin ali N-(4-fluoro-fenil)-izopropil-1-il-N-metil-propinilamin ali njune soli, optično aktivne izomere ali metabolite tako kot inhibitor MAO kot tudi kot inhibitor privzema.