

(19)



(10) **LT 3589 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3589**

(51) Int.Cl.⁵: **A61K 31/165**

(21) Paraiškos numeris: **IP1501**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 11 30**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 12 27**

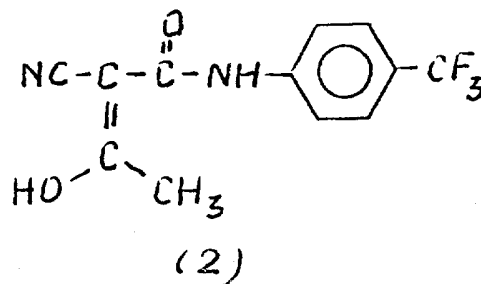
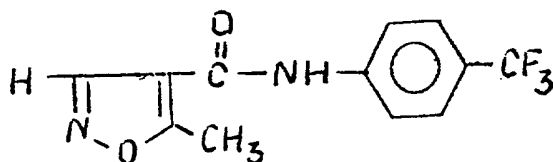
(72) Išradėjas:
Robert Ryder Bartlett, DE

(73) Patent savininkas:
HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, D-65926 Frankfurt am Main, DE

(74) Patentinis patikėtinis:
Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Žinomų junginių panaudojimas prieš atmetimo reakcijas transplantuojant organus

(57) Referatas:
Aprašyta žinomų junginių, kurių formulės



ir fiziologiškai toleruojamų junginio 2 druskų panaudojimas, gaminant vaistus, skirtus recipientui atmetimo reakcijoms persodinto organo atžvilgiu gydyti.

Išradimas skirtas N-(4-trifluormetil)-5-metilizoksazol-4-karboksanilido ir N-(trifluormetilfenil)-2-cian-3-krotonamido ir/arba jų fiziologiškai toleruojamų druskų panaudojimui vaistiniams preparatams, skirtiems recipiento atmetimo reakcijoms transplantuoto organo at-
 5 žvilgiu gydyti, gaminti.

Iš Europos patento paraiškos Nr. 13376 yra žinomas N-(4-trifluormetil)-5-metilizoksazol-4-karboksanilidas
 10 (junginys 1), kaip medžiaga, turinti prieš uždegiminio veikimo savybių. Ten pat aprašytas ir šio junginio gavimo būdas.

Be to, yra žinoma, kad junginys 1 ir jo metabolitas
 15 N-(4-trifluormetilfenil)-2-cian-3-hidroksikrotonamidas (junginys 2) turi imuninio moduliavimo savybių, todėl jie gali būti naudojami, gydant chroniškas homologiškas ligas (transplantantas prieš šeimininką), o taip pat autoimuninius susirgimus, pavyzdžiui, sisteminius raudonosios vilkligės pasireiškimus (EP-A-217206).
 20

JAV patente Nr. 4061767 aprašytas 2-hidroksietilidencianacetanilido darinių panaudojimas vaistiniams preparatams, turintiems prieš uždegiminį ir nuskaus-
 25 minantį veikimą, gauti.

Jungtinėse Amerikos Valstijose 1990 metais buvo atlikta 15 000 organų persodinimo operacijų. Didesniąją jų dalį sudarė insktų persodinimo operacijos, tačiau pastaruoju metu išaugo skaičius širdies, odos, plaučių, kepenų ir
 30 kasos persodinimo operacijų. Daugelio pacientų organizme įvyksta organo, persodinto iš kito žmogaus, atmetimo reakcija. Šiais atvejais būna trys atmetimo reakcijų formos: ypatingai ūmus, ūmus ir chroniškas atme-
 35 timas.

Ypatingai ūmus atmetimas įvyksta dažniausiai dėl kraujyje cirkuliuojančių antikūnų, kurie veikia į persodinto organo (transplantanto) audinius, dėl to per labai trumpą laiką, kartais net per kelias minutes, gali įvykti transplantanto nekrozė.

Ūmaus transplantanto atmetimo atveju atmetimo reakcija šiek tiek uždelsta. Be to, chroniška atmetimo reakcija gali sukelti susirgimą. Transplantantai, sėkmingai atlaikę pirmuosius persodinimo metus, kitais metais gali būti atmesti. Taip pat yra žinoma, kad priklausomybė "transplantantas-šeimininkas" neapsiriboja vien tuo atmetimu, kuri nulemia šeimininko organizmas. Tam tikrais atvejais gali įvykti iš transplantanto pusės imuninė reakcija, nukreipta prieš šeimininko audinius (EP-A-217 206). Todėl atmetimo reakcijas yra priimta skirstyti į atmetimo reakcijas tarp transplantanto ir šeimininko ir tarp šeimininko ir transplantanto.

Be to, yra žinoma, kad atmetimo reakcijos galimos ir tuo atveju, kada organų persodinimas yra atliktas iš skirtingo tipo organizmų, pavyzdžiui, iš pelės žiurkei (Roitt et al., Immunology, Gower, Medical Publishing Ltd. 1985).

Iki šiol nežinomas vaistinis preparatas, galintis užtikrinti efektyvią apsaugą nuo ypatingai ūmių atmetimo reakcijų. Klinikose iki šiol atliekami "donoro" ir "recipiento" suderinamumo tyrimai. 20-40% pacientų negali priimti persodinamo organo. Ūmios atmetimo reakcijos gali būti gydomos, tačiau medikamentai dažnai turi šalutinį nefrotoksišką veikimą. Iki šiol nežinomi tokie medikamentai, kurių veikimas būtų nukreiptas atmetimo reakcijų priežasčiai šalinti.

Pagrindiniu patogeniniu audinių ardymo faktoriumi transplantacijos atveju gali būti alofiliniai ir kse-

nofiliniai antikūnai (Auchincloss H., Transplantation, 46, 1, 1988). Šie antikūnai iš esmės ir nulemia persodintų organų atmetimą tarp tos pačios rūšies gyvūnų ("alo") ir tarp dviejų skirtingų rūšių ("kseno").

5

Netikėtai buvo nustatyta, kad junginys 1 ir jo metabolitas, aukščiau minėtas junginys 2 yra potencialūs alofilinių ir ksenofilinių antikūnų susidarymo inhibitoriai. Todėl atsiranda galimybė daryti efektyvų poveikį ypatingai ūmioms, ūmioms ir chroniškoms recipiento atmetimo reakcijoms transplantuoto organo atžvilgiu.

10

Todėl šis išradimas skirtas N-(4-trifluormetil)-5-metilizoksazol-4-karboksanilido ir N-(4-trifluormetilfenil)-2-cian-3-hidroksikrotonamido ir/arba jo fiziologiškai toleruojamų druskų panaudojimui gaminti vaistiniams preparatams, skirtiems recipiento atmetimo reakcijoms transplantuoto organo atžvilgiu gydyti.

15

20

Tinkamos fiziologiškai toleruojamos junginio 2 druskos - tai, pavyzdžiui, šarminių metalų, žemės šarminių metalų druskos arba amonio druskos, įskaitant fiziologiškai toleruojamų organinių amonio bazių druskas.

25

Terminą "organai" reikia suprasti, kad tai yra visi žinduolių organai, tarp jų žmogaus, pavyzdžiui, inkstai, širdis, oda, kepenys, kasa, raumenys, kaulai, skrandis arba žarnynas, o taip pat kraujas ir plaukai.

30

Atmetimo reakcija - tai recipiento organizmo apsauginės reakcijos, kurios galų gale atveda prie persodinto organo ląstelių arba audinių atmirimo arba suirimo arba paveikia jo gyvybingumą.

35

Junginiai 1 ir 2 gali būti gauti šiuo būdu:

Junginys, kurio formulė I:



10 kurioje X - halogeno atomas, pavyzdžiui, chloras arba bromas, veikiamas aminu, kurio formulė II:



20 ir gaunamas junginys 1, o šis junginys gali būti toliau veikiamas baziniu agentu ir paverčiamas junginiu 2.

25 Aukščiau nurodytos reakcijos gali būti vykdomos standartinėse sąlygose pagal žinomą būdą (EP-B-13 376, US 4 061 767).

Reakcijų pradinės medžiagos yra žinomos arba gali būti lengvai gautos literatūroje aprašytais metodais.

30 Išradimas taip pat skirtas vaistiniams preparatams, turintiems efektyvų kiekį junginio 1 arba junginio 2 ir/arba fiziologiškai toleruojamų junginio 2 druskų kartu su tinkamais farmaciniais priedais, medžiagomis-
35 nešėjomis, skiedikliais ir/arba kitomis aktyviomis medžiagomis ir pagalbinėmis medžiagomis.

- Išradimas taip pat skirtas vaistinio preparato, skirto gydyti recipiento atmetimo reakcijas persodinto organo atžvilgiu, gavimo būdui, kuris pasižymi tuo, kad junginį 1 arba 2 ir/arba fiziologiškai toleruojamą junginio 2 druską paverčia, kartu su farmaciškai tinkamu, fiziologiškai priimtiniu nešėju, o, reikalui esant, ir su kitomis tinkamomis aktyviomis medžiagomis, priedais ir pagalbinėmis medžiagomis, tinkama vaistine forma.
- 10 Vaistiniai preparatai sutinkamai su šiuo išradimu gali būti vartojami oraliniu, lokalinu, rektaliniu, intraveniniu arba parenteriniu būdu. Juos vartoja recipientas ir/arba donoras iki organo transplantavimo, jo metu ir po jo.
- 15 Tinkamomis kietomis arba skystomis galeninėmis vaisto formomis gali būti, pavyzdžiui, granulės, milteliai, dražė, tabletės, (mikro)kapsulės, žvakutės, sirupai, sultys, suspensijos, emulsijos, lašai arba tirpalai
- 20 injekcijoms, o taip pat preparatai su prolonguotu aktyviosios medžiagos išsiskyrimu, kuriuos gaminant gali būti panaudojami įprastiniai farmaciniai priedai - tai medžiagos-nešėjos, dezintegratoriai, rišamosios, aptraukiančiosios, brinkinančiosios, tepančiosios medžiagos, o taip pat skoninės medžiagos, pasaldinimo medžiagos arba tirpimo stimulatoriai. Dažniausiai naudojamos pagalbinės medžiagos - tai, pavyzdžiui, magnio karbonatas, titano dioksidas, laktozė, manitas arba kiti cukrūs, talkai, pieno baltymas, želatina, krak-
- 25 molas, celiuliozė ir jos dariniai, gyvuliniai ir augaliniai aliejai, polietilenglikoliai ir tokie tirpikliai, kaip sterilus vanduo arba vien- ar daugia-
- 30 atominiai alkoholiai, pavyzdžiui, glicerinas.
- 35 Rekomenduojama gauti ir vartoti preparatus unifikuotomis dozuotomis formomis, o kiekviena iš tų formų turi savyje turėti kaip aktyvų komponentą tam tikrą junginio 1

arba 2 ir/arba fiziologiškai toleruojamų junginio 2 druskų dozę. Kietose vaistų formose, pavyzdžiui, tabletėse, kapsulėse arba žvakutėse ši dozė gali sudaryti iki 300 mg, o geriausiai - nuo 10 iki 200 mg.

5

Paciento (70 kg), kuriam yra persodintas organas, gydimui ankstyvosiose po persodinimo fazėse atliekamas intraveninis įpylimas, kur maksimalus veikliojo junginio kiekis yra 1200 mg per dieną, o vėlyvesnėse reabilitacijos stadijose - oraliniu būdu įvedama 3 kartus per dieną po 300 mg junginio 1 arba 2 ir/arba atitinkamų junginio 2 druskų.

10

Tačiau tam tikromis aplinkybėmis gali atsirasti reikalus įvesti didesnes arba mažesnes dozes. Dozė gali būti priimama per vieną kartą kaip atskira vienetinė dozė arba kelios mažesnės dozės, arba ji gali būti padalinta į daugiau mažesnių dozių ir būti priiminėjama tam tikrais laiko intervalais.

20

Ir, pagaliau, junginys 1 arba 2 ir/arba jo atitinkamos druskos, gauminant aukščiau nurodytas vaistines formas, gali būti kombinuojami su kitomis aktyviosiomis medžiagomis, pavyzdžiui, medžiagomis, vartojamomis gydant šlapimo organus, trombocitų agregacijos inhibitoriais, analgetikais ir steroidinėmis bei nesteroidinėmis priešūždegiminėmis medžiagomis.

25

Toliau pateiktieji pavyzdžiai paaiškina išradimą, jo neapribodami.

30

Pavyzdys 1

Farmakologiniai bandymai ir gauti rezultatai

35

2-3 mėnesių amžiaus žiurkės (LEW) buvo sensibilizuojamos, suleidžiant į pilvo ruimą (i.p.) 2×10^7 žmogaus

periferinio kraujo limfocitų. Prieš 4 dienas iki sensibilizacijos buvo pradedamas junginio 2 įvedimas į pilvo ruimą ir užbaigiamas, praėjus 10 dienų po žiurkių sensibilizacijos. Iš stuburgalio venos buvo imami serumo mėginiai ir laikomi -80°C temperatūroje. Šiluminės dezaktyvacijos dėka išvengiama komplemento funkcijos.

Natūralios kilmės ksenofiliniai antikūnai (NXA) ir sensibilizacijos indukuoti ksenofiliniai antikūnai (SXA) titruojami ir pridedama žmogaus periferinio kraujo gyvų limfocitų (45 min. 20°C). Po intensyvaus perplovimo pridėta FITC-žymėtų ožys-prieš-žiurkę IgG arba IgM antikūnų ir nustatomas susijungimas su SXA arba NXA srovės citometrijos metodu (FACScan, Becton Dickinson).

A) Nesensibilizuotos žiurkės

Žiurkių (LEW) patinėlių serume yra NXA, kurie susijungia su gyvybingais žmogaus periferinio kraujo limfocitais, tiksliau sakant, paprastai esant vidutiniam IgM titrui 1:4 ir vidutiniam IgG titrui, mažesniau už 1:1.

Žiurkės (n=8) kasdien veikiamos 10 mg/kg junginio 2 ir 11-ją dieną rodo 30% IgG titro sumažėjimą ir 50% IgM titro sumažėjimą.

B) Sensibilizuotos žiurkės

Sensibilizuotos žiurkės turi žymiai padidintą SXA kiekį. IgG titras yra nuo 1:1024 iki 1:16384, o IgM titras yra nuo 1:4 iki 1:256. IgG titras išlieka stabilus daugiau negu 50 dienų, tuo tarpu IgM titras po 10-osios dienos lėtai mažėja.

Sensibilizuotos žiurkės (n=5) buvo veikiamos 3 arba 10mg/kg junginio 2. 11-ją dieną buvo gautos tokios SXA titro reikšmės:

Junginys (mg/kg)	IgG	IgM
0	1:2048	1:90
3	1:25	1:16
10	1:1	1:1,5

5

Junginio 2 poveikis alofilinių antikūnų susidarymui

10 Brown-Norway žiurkių patinėliai, kurių svoris nuo 200 iki 250 g, buvo panaudoti kaip širdies donorai. Jų širdys buvo transplantuotos to paties svorio Lewis žiurkių patinėliams. Visoms žiurkėms buvo taikoma standartinė dieta ir vandens režimas. Žiurkės buvo laikomos 12-os valandų šviesos/tamsos ciklo sąlygomis.

15 Iš žiurkių-recipienčių (Lewis žiurkės) širdies transplantavimo dieną, po to kas 4 dienos buvo imama iš stuburgalio venos po 1 ml kraujo. Alofilinių antikūnų titras žiurkių-recipienčių kraujyje nustatomas inkubuojant įvairaus praskiedimo recipiento kraują su žiurkių-donorų (Brown-Norway žiurkės) blužnies ląstelėmis ir triušio komplementu. Citotoksiškumas buvo nustatytas Trypan Blue išstūmimo metodu. Antikūnų p-reikšmės nustatyta, panaudojant standartinį t-testą, ir palyginta su nepaveiktų kontrolinių gyvuliukų reikšme.

25

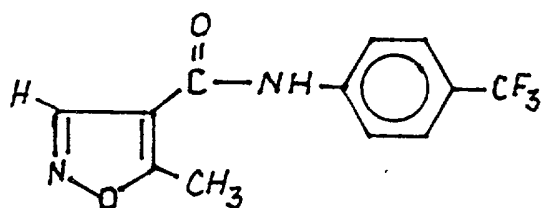
30 Veikimas junginiu 2 buvo pradėtas 4-ją dieną po transplantavimo. Kiekvienu atveju vieną kartą per dieną į pilvo ruimą suleidžiama 10 mg/kg junginio 2. Vienu metu bandomų gyvuliukų skaičius yra 5 (n=5). Veikimas baigiamas 17-ją dieną. Žemiau pateiktoje lentelėje parodytos vidutinės citotoksiškumo reikšmės (%) bandymo eigoje.

Serumo praskiedimas	Dienos po transplantacijos						p-reikšmė 17-ją dieną
	0	4	7	11	14	17	
1:5	3	63	36	19	22	11	0,001
1:25	3	58	31	16	11	6	0,001
1:125	4	34	20	9	6	5	0,050

Pavyzdys 2

N-(4-trifluormetil)-5-metilizoksazol-4-karboksanilido
gavimas

(Junginys 1)

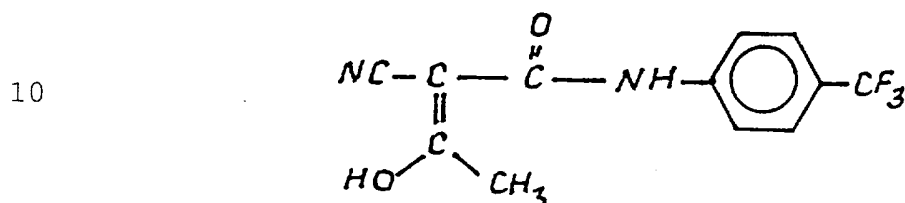


0,05 molio 5-metilizoksazol-4-karbonilo chlorido (7,3 g) tirpalo 20-je ml acetonitrilo kambario temperatūroje sulašinama į 0,1 molio 4-trifluormetilanilino (16,1 g) tirpalą 150-je ml acetonitrilo. Po 20 min. maišymo išskritusios 4-trifluormetilanilino hidrochlorido nuosėdos nusiurbiamos ir du kartus perplaunamos po 20 ml acetonitrilo. Jungtinis filtratas koncentruojamas esant sumažintam slėgiui. Gaunama 12,8 g balto kristalinio produkto, kuris yra N-(4-trifluormetil)-5-metilizoksazol-4-karboksanilidas (junginys 1).

Pavyzdys 3

N-(4-trifluormetilfenil)-2-cian-3-hidroksikrotonamidas

5 (Junginys 2)



15 0,1 mol N-(4-trifluormetil)-5-metilizoksazol-4-karbok-
sanilido ištirpinama 100 ml metanolio ir 10°C tem-
peratūroje veikiama 0,11 molio (4,4 g) natrio hi-
droksido tirpalu 100 ml vandens. Mišinys maišomas
30 minučių, atskiedžiamas vandeniu ir parūgštinamas
20 koncentruota druskos rūgštimi. Iškritusi kristalų masė
nusiurbama, plaunama vandeniu ir išdžiovinama ore.
N-(4-trifluormetilfenil)-2-cian-3-hidroksikrotonamido
(junginys 2) išeiga yra 24,4 g. Lyd. temp.: 205-206°C
(iš metanolio).

25

Pavyzdys 4

Ūmus toksiškumas įvedant į pilvo ruimą

30 Ūmaus toksiškumo, įvedus tiriamąsias medžiagas į pilvo
ruimą, nustatymas buvo atliktas su NMRI pelėmis (20-25 g)
ir SD žiurkėmis (120-195 g). Tiriamoji medžiaga buvo
suspenduota 1 %-niame natrio karboksimetilceliuliozės
tirpale. Įvairios tiriamosios medžiagos dozės pelėms
35 buvo įvedamos 10 ml/kg kūno svorio tūryje, o žiurkėms -
5 ml/kg kūno svorio tūryje. Kiekvienam dozavimui buvo
imta po 10 gyvuliukų. Po 3 savaičių buvo nustatytas

ūmus toksiškumas pagal Litchfield ir Wilcoxon. Rezultatai pateikti lentelėje.

Lentelė

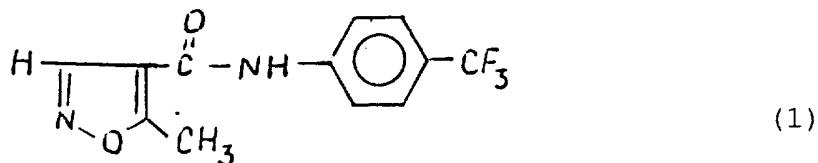
5

	Junginys 1 ūmus toksiškumas į pilvo ruimą LD ₅₀ (mg/kg)	Junginys 2 ūmus toksiškumas į pilvo ruimą LD ₅₀ (mg/kg)
Pelei NMRI	185 (163-210)	150 (100-200)
Žiurkei SD	170 (153-189)	

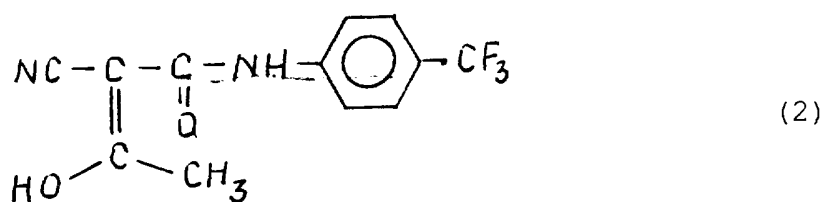
IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Junginių, kurių formulės 1 ir/arba 2:

5



10



15

kur junginys 2 yra toks, arba jo fiziologiškai toleruojamos druskos formoje, panaudojimas, gaminant vaistus, skirtus labai ūmioms recipiento organizmo atmetimo reakcijoms transplantuoto organo atžvilgiu gydyti.

2. Panaudojimas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad junginiai yra naudojami atmetimo reakcijoms, transplantuojant organus iš vieno tipo organizmo į kito tipo organizmą, gydyti.

3. Panaudojimas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad junginiai yra naudojami žinduolių, jų tarpe žmogaus, atmetimo reakcijoms gydyti.

4. Panaudojimas pagal vieną ar daugiau iš 1-3 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad kartu gali būti naudojamos ir kitos veikliosios medžiagos, tokios kaip antiurikopatikai, trombocitų agregacijos inhibitoriai, analgetikai ir steroidinės arba nesteroidinės prieš-
uždegiminės medžiagos.