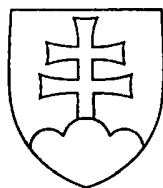


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **18. 4. 2000**
- (31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/130 665**
60/145 305, 60/151 121, 60/166 592
- (32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **23. 4. 1999**
23. 7. 1999, 27. 8. 1999, 19. 11. 1999
- (33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US, US, US, US**
- (40) Dátum zverejnenia prihlášky: **9. 5. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **5/2002**
- (62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
- (86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US00/10465**
- (87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO00/64443**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1538-2001

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷:

A61K 31/40,
A61K 31/4418

- (71) Prihlasovateľ: **Mason R. Preston, Sewickley, PA, US;**
- (72) Pôvodca: **Mason R. Preston, Sewickley, PA, US;**
- (74) Zástupca: **PATENTSERVIS BRATISLAVA, a. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Farmaceutický prostriedok obsahujúci amlodipín, spôsob liečenia a spôsob znižovania krvného tlaku**

- (57) Anotácia:
Kombinácia amlodipínu a atorvastatínu metabolitu má synergický antioxidantný účinok na peroxidáciu lipidov v ľudských nízkohustotných lipoproteínoch a v membránových váčkoch bohatých na polynenasýtené mastné kyseliny. Obmedzenie poškodenia spôsobené kyslíkovými radikálmi touto kombináciou liekov, ktorá bola pozorovaná na terapeutickú úroveň, nemôže byť dosiahnutá kombináciou amlodipínu s inými statínmi alebo prirodzeným antioxidantom, vitamínom E. Táto kombinovaná terapia môže byť využívaná na liečbu kardiovaskulárnych chorôb, predovšetkým ischemickej choroby srdca, zvyšovaním odolnosti nízkohustotných lipoproteínov a vaskulárnych bunkových membrán proti oxidatívnej modifikácii.

FARMACEUTICKÝ PROSTRIEDOK OBSAHUJÚCI AMLODIPÍN, SPÔSOB LIEČENIA A SPÔSOB ZNIŽOVANIA TLAKU

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka farmaceutických prostriedkov a ich kombinácií určených na liečbu arteriálnych srdcových chorôb a príbuzných ochorení.

Doterajší stav techniky

Ischemická choroba srdca (CAD) je hlavnou príčinou úmrtnosti vo vyspelom svete a je tiež spojená s výraznou morbiditou. Pacient s ischemickou chorobou srdca trpí niekoľkými sprievodnými javmi zahrňujúcimi vysoký krvný tlak, diabetes, dyslipidémiu, ktoré zvyšujú celkové riziko zlých výsledkov a komplikovaného priebehu liečby.

Medzi antihypertenzívnymi terapiami predstavuje lipofilný blokátor vápnikových kanálov (CCB) dihydropyridínového typu, amlodipinbesylát (AML), veľmi dobre znášateľnú zlúčeninu so zavedenými záznamami o bezpečnosti a účinnosti pri liečbe vysokého krvného tlaku a angíny. Potenciálna terapeutická úloha AML pri liečbe pacientov s ischemickou chorobou srdca bola nedávno opísaná v štúdií „Prospective randomized evaluation of the vascular effects of Norvasc® (AML) trial“ (PREVENT). Tieto trojročné skúšky vyhodnocovali účinky AML v porovnaní s placebo na vývoj a postup aterosklerotických lézií vo vencovitých a karotických tepnách medzi pacientmi so zaznamenanou CAD (Byington R.P., Miller M.E., Herrington D., et al., „Rationale, design and baseline characteristic of the prospective randomized evaluation of the vascular effects of vorvasc trial (PREVENT)“, *Am. J. Cardiol.* 1997, 80 : 1087 až 1090). Výsledky PREVENT preukázali pôsobivé účinky AML terapie, zahrňujúcej celkom 30 % pokles hlavných dokumentovaných prípadov alebo procedúr (Byington R.P., Chen J., Furberg C. D., Pitt B., „Effect of amlodipine on cardiovascular events and procedures.“ *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999, 33 : 314 A a Pitt B., Byington R.P., Hunninghake D. B., Mancini J., Miller M. E., Riley W., „Effect of

amlodipine on progression of carotid atherosclerosis and occurrence of clinical events.", *Circulation* 2000, 102, 1503 až 1210) AML Terapia bola tiež spojená s významným spomalením rozvoja karotickej aterosklerózy, čo bolo určené pomocou ultrasonografického stanovenia v B-módu (Byington R. P., Riley W., Booth D., at al., „Effect of amlodipine on progression of atherosclerosis in patients with documented heart disease.", *Am. J. Hypertens.* 1999, 12 : 42A až 43A a Pitt B., Byington R. P., Hunninghake D. B., Mancini J., Miller M. E., Riley W., „Effect of amlodipine on the progression of atherosclerosis and occurrence of clinical events.", *Circulation* 2000, 102 : 1503 až 1510. Klinický účinok pozorovaný u AML pri liečbe CAD nebol nikdy predtým zaznamenaný u žiadnych iných CCB, vrátane zlúčenín dihydropyridínového typu, ktoré boli použité na vyriešenie tejto otázky (Waters D., Lesperance J., Francetich M., et al., „A controlled clinical trial to assess the effect of a calcium channel blocker on the progression of coronary atherosclerosis.", *Circulation* 1990, 82 : 1940 až 1953, Lichten P. R., Hugenholtz P. G., Raffinbeul W., et al., „Retardation of coronary artery disease in humans by the calcium channel blocker nifedipine: Results of the INTACT study (International nifedipine trial an atherosclerotic therapy)." *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 1990, 4 : S1047 až S1068 a Borhani N. O., Mercuri M., Borhani P. A., at al., „Final outcome results of the multicenter isradipine diuretic atherosclerosis study (MIDAS). A randomized controlled trial." *JAMA* 1996, 276 : 765 až 791). Toto pozorovanie viedlo k zvýšenému záujmu o potenciálne antiaterogénické vlastnosti AML, zahrňujúce antioxidantné účinky, ktoré sú nezávislé od modulácií vápnikových kanálov (Mason R. P., Leeds P. R., Jacob R. E., et al., „Inhibition of excessive neuronal apoptosis by the calcium antagonist amlodipine and antioxidants in cerebral granule cells." *J. Neurochem.* 1999, 72 : 1448 až 1456, Tulenko T. N., Laury-Kleitop L., Walter M. F., Mason R. P., „Cholesterol, calcium and atherosclerosis: Is there a role for calcium channel blockers in atheroprotection ?" *Int. J. Cardiol.* 1997, 62 (2 Suppl) : 55S až 66S, Krams D. M., Sharma R. C., „Limits of lipid-lowering therapy: The benefits of amlodipine as an anti-atherosclerotic agent." *J. Hum. Hypertens.* 1995, 9 (Suppl 1 : S3 až S9) a Mason R. P., Walter M. F., Trumbore M. W., Olmstead E. G., Mason P. E., „Membrane antioxidant effects of the charged dihydropyridine calcium antagonist amlodipine." *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999, 31 : 375 až 281).

Bolo preukázané, že hypolipidemická terapia je tiež veľmi užitočná pri znižovaní morbidity a mortality spojenej s CAD. Bolo zistené, že orto- a para-

hydroxylované metabolity atorvastatínu ATM vykazujú antioxidačné účinky v lipoproteínových preparátoch (Aviram M., Rosenblat M., Bisgaier C.L., Newton R. S., „Atorvastatin and gemfibrozil metabolites but not parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation.“ *Atherosclerosis* 1998, 138 : 271 až 280). Orto-, meta- a para-hydroxylované metabolity atorvastatínu (ATM) a spôsoby ich prípravy sú opísané v patente US 5 385 929.

V súčasnosti bohužiaľ neexistuje farmaceutický prostriedok, ktorý by bol využiteľný na liečbu ako vysokého tlaku, tak aj hyperlipidémie. Taký farmaceutický prostriedok by bol v mnohých smeroch výhodný. Napríklad mnohé rizikové faktory spojené s arteriálnymi a príbuznými srdcovými ochoreniami, ktoré sa často vyskytujú u mnohých pacientoch, by mohli byť pokryté súčasne. Navyše by ľahké podávanie jednej kombinovanej farmaceutickej dávky mohlo významne zlepšiť dodržovanie liečebného režimu pacientov.

Predmetom predkladaného vynálezu je teda poskytnúť kombinovanú terapiu, ktorá by umožnila liečbu mnohých patologických procesov spojených s arteriálnymi a príbuznými srdcovými ochoreniami.

Tieto choroby zahrňujú okrem iného vysoký krvný tlak a hyperlipidémiu. Predmetom predkladaného vynálezu je tiež vyvinúť vhodné formy a množstvá farmaceutických dávok tohto kombinovaného lieku. Preferuje sa, aby tento farmaceutický prostriedok vykazoval synergické účinky na tieto sprievodné znaky arteriálnych a príbuzných ochorení tak, že účinky jednotlivých zložiek tohto vynálezu budú pôsobením ich kombinácie posilnené.

Predkladaný vynález teda predstavuje terapeutický medzník pri liečbe CAD, ktorý vedie k vývoju liekov, ktoré môžu súčasne postihnúť mnohé zásadné patologické procesy prispievajúce k ateroskleróze a ovplyvniť tak priebeh tejto choroby. S využitím tohto vynálezu môže liečba CAD vykazovať nárast pozitívnych výsledkov, ak je použitie antihypertenzívnej látky a inhibítora HMG-CoA reductázy spojené do jednotného systému.

Podstata vynálezu

Prekvapivo, keď boli AML a ATM skombinované, vykazovali synergický účinok pri prevencii peroxidácie lipidov v ľudských nízkohustotných lipoproteínoch (LDL) a

lipidových membránach. Aktivita tejto kombinácie je považovaná za synergickú, pretože zameraný účinok výrazne prekročil všetky aditívne účinky týchto dvoch liekov. Tieto zlúčeniny teda vykazujú skôr neznáme synergické antioxidantné účinky, vlastnosti, ktoré umožňujú týmto zlúčeninám zvyšovať odolnosť LDL a vaskulárnych bunkových membrán oproti oxidatívnej modifikácii počas aterogenézy. Oxidatívna modifikácia lipidov je dobre preskúmanou príčinou poškodenia endotelu a hladkej svaloviny (Ross R., „Atherosclerosis – an inflammatory disease.“, *N. Engl. J. Med.* 1999, 340 : 115 až 126, Diaz M. N., Frei B., Vita J. A., Keaney J. F., „Antioxidants and atherosclerotic heart disease.“, *N. Eng. J. Med.* 1997, 337 : 408 až 416). Bolo zistené, že lipofilné zlúčeniny, ktoré chránia pred peroxidáciou lipidov, prispievajú k obmedzeniu rozvoja lézií v rôznych aterosklerotických modeloch a v klinických štúdiách (Diaz M. N., Frei B., Vita J. A., Keaney J. F. „Antioxidants and atherosclerotic heart disease.“, *N. Eng. J. Med.* 1997, 337 : 408 až 413). Okrem toho, účinok spojený s hypolipidemickou terapiou je prisudzovaný ako účinku na plazmatické veľmi nízko hustotné lipoproteíny (VLDL), LDL a vysokohustotné lipoproteíny (HDL), tak aj na zníženie novej tvorby aterogénnych oxidovaných lipoproteínov.

V predkladanom vynáleze sú opísané odborné analýzy, ktoré podporujú kombinované použitie AML (Norvasc®) a ATM v jedinom systéme určenom na liečbu kardiovaskulárnych ochorení. Synergické antioxidantné aktivity blokátora vápnikových kanálov, AML, a aktívneho hydroxylovaného metabolitu inhibítora HMG-CoA reductázy atorvastatínu, ATM, boli určené v ľudských LDL a lipidových membránach bohatých na polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA), kľúčové štruktúry podliehajúce poškodeniu kyslíkovými radikálmi pri ateroskleróze. Synergické účinky týchto zlúčenín boli demonštrované na membránach vytvorených v prítomnosti cholesterolu. Kombinácia AML s ATM spôsobila výraznú a trvalú inhibíciu poškodenia lipidov kyslíkovými radikálmi už pri veľmi nízkych koncentráciách 10,0 nM. Antioxidantná aktivita závislá od dávky spojená s kombináciou týchto liekov bola na terapeutickú úroveň veľmi synergická a nemohla byť reprodukovaná pomocou endogénnej látky, vitamínu E. Antioxidantná aktivita ale nebola pozorovaná v prípade, kedy bol AML použitý v kombinácii s iným inhibítorom HMG-CoA reductázy, ako je lovastatín alebo mevastatín. Ako bolo zistené pomocou x-lúčovej difrakcie a chemických analýz, môže byť výrazná aktivita, opísaná pre túto kombináciu liekov, spojená so silnými fyzikálno-chemickými interakciami s membránovou dvojvrstvou, nezávislými od dobre

charakterizovaných účinkov týchto liekov na transport vápnika a metabolizmus cholesterolu. Tento synergický antioxidačný účinok predstavuje nový farmakologický mechanizmus pôsobenia týchto zlúčenín a vedie ku kombinovanému využitiu aktívnych zložiek Norvasc® a ATM na liečbu kardiovaskulárnych ochorení znižovaním obsahu LDL v krvnej plazme a zlepšovaním ochrany LDL a bunkových membrán proti oxidácii. Táto nová vlastnosť dopĺňa známe účinky týchto liekov pri liečbe vysokého krvného tlaku a dyslipidémie.

Synergické antioxidačné pôsobenie amlopidínu a atorvastatínového metabolitu na lipidové membrány:

Boli stanovené od dávky závislé antioxidačné aktivity samotného AML a ATM a ich kombinácie v membránových vačkoch vytvorených z fosfolipidov obohatených o cholesterol a PUFA, dilinoleoylfosfatidylcholín, v molárnom pomere 0,5 : 1. Membránové vačky boli pre tieto experimenty použité z nasledujúcich dôvodov: 1) tento systém je dobre definovaný a vysoko reprodukovateľný, 2) linoleová kyselina predstavuje prvoradý cieľ oxidatívneho poškodenia a táto zlúčenina je bežne obsiahnutá v membránach buniek cievneho systému a lipoproteínových časticiach, 3) tento membránový systém neobsahuje vápnikové kanály ani enzým HMG-CoA reductázu a 4) peroxidácia lipidov v tomto systéme môže byť spontánne iniciovaná pri 37 °C v neprítomnosti exogénnych chemických iniciátorov, ako sú vysoké koncentrácie železa a askorbátu. V týchto experimentoch dochádzalo k postupnej, od času závislej oxidácii, ktorá bola meraná spektroskopicky počas 72 h periódy.

Synergická antioxidačná aktivita AML a ATM znázornená na obrázku 1 bola demonštrovaná na membránových vačkoch zložených z cholesterolu a fosfolipidov pri fyziologických podmienkach (Tulenko T.N., Chen M., Mason P. E., Mason R. P., „Physical effects of cholesterol on arterial smooth muscle membranes: Evidence of immiscible cholesterol domains and alterations in bilayer width during atherogenesis.“, *J. Lipid. Res.* 1998, 39 : 947 až 956). Pri koncentrácii 100,0 nM vykazoval v tomto membránovom preparáte obohatenom cholesterolom jedinú viditeľnú inhibíciu peroxidácie lipidov (9 % z kontrolnej) len samotný ATM. Avšak keď boli obidve zlúčeniny skombinované, zvýšil sa stupeň inhibície na 33 %, čo predstavuje výrazne vyšší účinok ($p < 0,01$), ako účinok zmeraný pre tieto zlúčeniny samostatne. Antioxidačná aktivita tejto kombinácie bola veľmi slabá, lieky inhibovali tvorbu lipidových peroxidov ($> 5 \times 10^2 \mu\text{M}$) pri koncentrácii 100,0 nM (kontrolná

úroveň tvorby lipidových peroxidov bola 1,6 mM). Táto kombinácia liekov vykazovala účinok, ktorý bol výrazne závislý od dávky v širokom rozsahu koncentrácií (obrázok 2). Významná inhibícia ($p < 0,05$) bola pozorovaná ešte pri koncentrácii 10,0 nM s $IC_{50} = 500,0 \mu\text{M}$. Pre kombináciu bola pri koncentrácii 10,0 μM pozorovaná vyššia ako 90 % inhibícia ($> 1 \text{ mM}$ tvorba lipidových peroxidov) (obrázok 2). Skutočnosť, že inhibícia bola pozorovaná na submikromolárnej úrovni znamená, že účinok pozorovaný u kombinácie AML a ATM je terapeuticky významný.

Antioxidačný účinok kombinácie pretrvával v priebehu času a nemohol byť reprodukovateľný pomocou vitamínu E ani pri zvýšenej koncentrácii (10,0 μM) (obrázok 3). Toto zistenie je v súlade s predstavou, že vitamín E alebo α -tokoferol je počas procesu peroxidácie lipidov priebežne spotrebovaný. Oproti tomu nebola aktivita AML/ATM ovplyvnená dĺžkou inkubačnej periódy, počas ktorej sa v čase 72 hodín zvýšila úroveň celkových lipidových peroxidov na 2,2 mM.

Zvýšená polarita ATM spôsobená prítomnosťou dodatočnej hydroxylovej skupiny môže prispievať k ľahším interakciám s formálne nabitým AML, vedúcim k zreteľným interakciám s fosfolipidovými molekulami, ako bolo preukázané pomocou x-lúčovej difrakčnej analýzy. Dodatočná hydroxylová skupina ATM tiež poskytuje ďalší voľný protón, ktorý je možné preniesť na voľné radikálové molekuly (obrázok 4). Po strate protónu môže byť zostávajúci nepárový voľný elektrón účinne stabilizovaný v rezonančných štruktúrach metabolitu, ako je znázornené na obrázku 4. Odlišná antioxidačná aktivita kombinácie AML s ATM je preukázaná pozorovaním, že rovnaký účinok nemohol byť reprodukovateľný, keď bol AML skombinovaný s akýmkoľvek z dvoch ďalších statínov (mevastatín a lovastatín), ako je znázornené na obrázku 5.

Výsledky výskumu *in vivo* preukázali dôležitú úlohu lipofilných antioxidantov pri znižovaní kardiovaskulárnej morbidity a mortality, predovšetkým CAD. LDL častice, ktoré majú vyššiu odolnosť voči oxidatívnejmu poškodeniu, vykazujú zníženú cytotoxicitu, menej interferujú s endoteliálnou tvorbou oxidu dusnatého a neprispievajú k tvorbe penových buniek (Diaz M. N., Frei B., Vita J. A., Keaney J. F., „Antioxidants and atherosclerotic heart disease.“, *N. Engl. J. Med.* 1997, 337 : 408 až 416). Poskytovanie antioxidantu viedlo k zvýšeniu odolnosti LDL pred oxidatívnou modifikáciou a k zníženiu endoteliálnej bunkovej cytotoxicity (Belcher J. D., Balla J., Ball G., et al., „Vitamin E, LDL, and endothelium. Brief oral vitamin supplementation

prevents oxidized LDL-mediated vascular injury in vitro.", *Atheroscler. Thromb.* 1993, 13 : 1779 až 1789). Lipofilný antioxidant probucol viedol k zmierneniu tvorby arteriosklerotických plakov u cholesterolom živených primátov, ktoré bolo vo vzťahu so zvýšenou odolnosťou LDL proti oxidatívnemu poškodeniu (Sasahara M., Raines E. W., Chait A., et al., „Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol. I. Is the extent of atherosclerosis related to resistance of LDL to oxidation?", *J. Clin. Invest.* 1994, 94 : 155 až 164). Tento antioxidant inhiboval tvorbu lézií u Watanabe – dedičných hyperlipidemických králikov (WHHL), dobre charakterizovanom modeli aterosklerózy, nezávisle od účinkov vyplývajúcich zo znižovania hladiny cholesterolu (Carew T. E., Schwenke D. C., Steinberg D., „Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: Evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.", *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84 : 7725 až 7729).

Popri týchto štúdiách na zvieracích systémoch preukázala klinická placebo-kontrolovaná štúdia, že použitie probucolu viedlo po predchádzajúcom angioplastickom rozšírení vencovitých tepien k zníženiu restenózy u pacientov s CAD o 47 %, pravdepodobne vďaka svojmu antioxidantnému pôsobeniu (Tardif J. C., Cote G., Lesperance J., et al., „Probuco and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Multivitamins and probucol study group.", *N. Eng. J. Med.* 1997, 337 : 365 až 372). Samostatná štúdia preukázala, že probucol na rozdiel od antioxidantných vitamínov vykazoval pozitívny účinok na vaskulárnu premenu u pacientov, ktorí postúpili angioplastiku, čo bolo preukázané pomocou intravaskulárnych ultrazvukových metód (Cote G., Tardif J.-C., Lesperance J., et al., „Effects of probucol on vascular remodeling after coronary angioplasty.", *Circulation* 1999, 99 : 30 až 35).

Prehľad dostupných údajov teda poskytuje racionálny základ na využitie lipofilných antioxidantov na liečbu zápalových procesov spojených s CAD. Zvyšovaním odolnosti LDL a membrán buniek cievneho systému pred oxidatívnym poškodením môžu látky s antioxidantnou aktivitou účinne pôsobiť na patologické zmeny v cievnej stene počas aterogenézy. Tieto procesy zahrňujú okrem iného tvorbu penových buniek, endoteliálnu dysfunkciu a toxicitu, adhéziu leukocytov a krvných doštičiek a arteriálny angiospazmus, sekundárne tiež útlm prirodzenej tvorby

oxidu dusnatého. Tieto pozorovania na bunkovej úrovni podporujú epidemiologické analýzy, ktoré naznačujú inverzný vzťah medzi koncentráciou určitých antioxidantov v sére a nežiaducimi dôsledkami spojenými s koronárnymi chorobami (Stampfer M. J., Henkens C. H., Manson J. E., Colditz G. A., Rosner B., Willet W. C., „Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women.“, N. Engl. J. Med. 1993, 328 : 1450 až 1456, Rimm E. B., Stampfer M. J., Ascherio A., Giovannucci E., Colditz G. A., Willett W. C., „Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men.“, N. Engl. J. Med. 1993, 328 : 1450 až 1456, Enstrom J. E., Kanim L. E., Klein M. A., „Vitamin C intake and mortality among sample of the United States population.“, Epidemiology 1992, 3 : 194 až 202, Rimmersma R. a., Wood D. A., Macintyre C. C., Elton R., Gey K. F., Oliver M. F., „Low plasma vitamins E and C. Increased risk of angina in Scottish men.“, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1989, 570 : 291 až 295, Ramirez J., Flowers N. C., „Leukocyte ascorbic acid and its relationship to coronary artery disease in man.“, Am. J. Clin. Nutr. 1980, 33 : 2079 až 2087, Hennekens C. H., Buring J. E., Manson J. E., et al., "Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease.“, N. Engl. J. Med. 1996, 334 : 1145 až 1149, Losonczy K. G., Harris T. B., Havlik R. J., „Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: The established populations for epidemiologic studies of the elderly.“, Am. J. Clin. Nutr. 1996, 64 : 190 až 196). Niektoré z týchto epidemiologických štúdií preukázali účinok vitamínu E ako antioxidantu s obmedzenou schopnosťou brániť oxidatívne poškodeniu. Výsledky tejto štúdie naznačujú, že kombinácia AML a ATM je pri obmedzovaní poranení ciev spojených s CAD podstatne účinnejšia ako vitamín E.

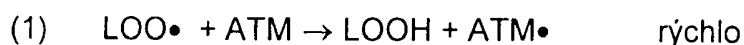
Synergické antioxidačné pôsobenie amlodipínu s hydroxyatorvastatínovým metabolitom na ľudských LDL:

Antioxidačné pôsobenie samotného AML a ATM a ich kombinácie bolo stanovené tiež na ľudských LDL preparátoch. Schopnosť týchto zlúčenín inhibovať peroxidáciu LDL bola po pridaní iónov medi (10,0 mM) overená *in vivo* meraním obsahu reaktívnych tiobarbiturátových substancií (TBARS) – ukazovatele lipidovej peroxidácie. Obrázok 6 znázorňuje, že stupeň oxidácie LDL bol charakterizovaný sigmoidálnou kinetickou krivkou s počiatočnou lag fázou, ktorou nasledovala ostrá propagácia a konečná fáza plató (Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G.,

„The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL.“, *Free Radic. Biol. Med.* 1992, 13 : 341 až 390). Po 4 hodinách inkubácie boli rôzne účinky týchto zlúčenín pozorované pri koncentrácii 3,0 μM . V porovnaní s kontrolnou peroxidáciou lipidov (100 % tvorba TBARS) predstavovala zaznamenaná tvorba TBARS pomocou AML a ATM $93,3 \pm 6 \%$ a $65,6 \pm 7 \%$. Avšak keď boli tieto zlúčeniny použité v kombinácii, predstavovala tvorba TBARS len $29,3 \pm 6 \%$, teda úroveň, ktorá bola výrazne nižšia ($p < 0,01$), ako ktorá bola pozorovaná pre každú zlúčeninu zvlášť. Synergický antioxidantný účinok kombinácie zotrval v čase 6 hodín. Tieto zistenia sú ďalším dôkazom synergickej aktivity zhodujúce sa s aktivitou pozorovanou na membránových váčkoch, pretože táto kombinácia liekov vykazovala úroveň inhibície, ktorá výrazne prekročila ich očakávaný aditívny efekt. Antioxidantná aktivita vitamínu E v týchto experimentoch bola blízka aktivite pozorovanej pre samotný ATM.

Chemické mechanizmy synergickej aktivity amlopidínu a atorvastatínového metabolitu:

Synergická antioxidantná aktivita pozorovaná pre túto kombináciu liekov na LDL a rekonštituované lipidové membrány napovedá, že tieto zlúčeniny vzájomne priamo interagujú jedna s druhou, čo vedie k zachycovaniu lipidových radikálov. Podľa termodynamických štúdií (obrázok 7) sa uvažuje, že ATM reaguje rýchlejšie s lipidovými radikálmi (rovnica 1) ako AML, ako je opísané v rovnici 2. Pokiaľ by tieto rovnice predstavovali dve jediné možné metabolické cesty týchto látok, tak by po spoločnom pridaní do systému bol účinok ich kombinácie aditívny. Ale kombinácia oboch zlúčenín poskytuje možnosť tretej metabolickej cesty (rovnica 3), ako alternatívy podporovanej výsledkami peroxidáčnych experimentov na LDL a lipidových membránach. Kombinácia cesty 1 a 3 by viedla k synergickému efektu, ktorý sa prejavuje výraznejšie ako pri ceste 2. Semiempirické výpočty naznačujú, že reakcia 3 je uprednostňovaným exotermickým procesom ($H_f = -40,7 \text{ KJ/mol}$). Prítomnosť rýchleho inhibítora (ATM) teda umožňuje slabšiemu inhibítoru odstraňovať voľné radikály rýchlejšie, ako keby reagoval s lipidovými radikálmi sám o sebe. Tri cesty opisujúce tieto interakcie, kde $\text{LOO}\bullet$ predstavuje lipidový radikál, sú:



- (2) $\text{LOO}\bullet + \text{AML} \rightarrow \text{LOOH} + \text{AML}\bullet$ pomaly
 (3) $\text{ATM}\bullet + \text{AML} \rightarrow \text{ATM} + \text{AML}\bullet$ rýchlo

Výsledkom tejto synergie medzi AML a ATM je, že recyklovaný metabolit je ďalej schopný ďalšieho zachytávania lipidových radikálov. Rozdiely v miere inhibície medzi AML a ATM sú čiastočne založené na vypočítaných entalpiách týchto látok, respektive príslušných radikálov (obrázok 7). Čím je nižšia (tj. zápornejšia) hodnota ΔH_f , tým ľahšie je odtrhnutie vodíka spojené s tvorbou radikálov. Raz vytvorený nespárovaný radikál môže byť stabilizovaný vo forme rezonančných štruktúr.

Molekulárne membránové interakcie amlopídínu a atorvastatínového metabolitu:

Na výskum molekulárnych membránových interakcií kombinácie AML a ATM sa použila technika X-lúčovej difrakcie pod malým uhlom. Táto vysokokvantitatívna metóda poskytuje priame informácie o štruktúre membránovej dvojvrstvy v neprítomnosti a prítomnosti liekov. Už predtým sa písalo, že AML sa v porovnaní s inými CCB vyznačuje vysokou afinitou k membránovým lipidom ($K_p > 10^3$) s aterosklerotickými podmienkami (Mason R. P., Moisey D. M., Shajenko L., „Cholesterol alters the binding of Ca^{2+} channel blockers to the membrane lipid bilayer.“, *Mol. Pharmacol.* 1992, 41 : 315 až 321). Určitá lipofilita AML je prisudzovaná jeho amfifilnej chemickej štruktúre, ktorá smeruje molekulu do výhodnej polohy v membráne, kde môže zabraňovať šíreniu voľných radikálov pomocou biofyzikálnych a biochemických mechanizmov, ako bolo predtým podrobnejšie opísané našim laboratóriom (Mason R. P., Leeds P. R., Jacobs R. F., et al., „Inhibition of excessive apoptosis by the calcium antagonist amlodipine and antioxidants in cerebellar granule cells.“, *J. Neurochem.* 1999, 72 : 1448 až 1456, Mason R. P., Moisey D. M., Shajenko L., „Cholesterol alters the binding of Ca^{2+} channel blockers to the membrane lipid bilayer.“, *Mol. Pharmacol.* 1992, 41 : 315 až 321, Mason R. P., Campbell S. F., Wang S. D., Herbette L. G., „Comparison of location and binding for the positively charged 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonist amlodipine with uncharged drugs of this class in cardiac membranes.“, *Mol. Pharmacol.* 1989, 36 : 634 až 640. Mason R. P., Walter M. F., Trumbore M. W., Olmstead Jr. E. G., Mason P. E., „Membrane antioxidant effects of the charged

dihydropyridine calcium antagonist amlodipine.", *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999, 31 : 275 až 281). V membránach, ktoré neboli obohatené o cholesterol amlodipín inhiboval peroxidáciu lipidov do takej miery, ktorá nemohla byť reprodukovaná s použitím iného CCB alebo inhibítora enzýmu premieňajúceho angiotenzín (ACE), captopril (Mason R. P., Walter M. F., Trumbore M. W., Olmstead Jr. E. G., Mason P. E., „Membrane antioxidant effects of the charged dihydropyridine calcium antagonist amlodipine.", *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999, 31 : 275 až 281). Podobne ako u amlodipínu má chemická štruktúra atorvastatinového metabolitu amfifilný charakter, ktorý umožňuje tomuto lieku interakciu s membránovou lipidovou dvojvrstvou, ako bolo predtým opísané našim laboratóriom (Mason R. P., „Inhibition of oxidative damage to low density lipoproteins and isolated membranes by atorvastatin and its active metabolite.", *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000, 35 : 317A).

Pri týchto štúdiách bola kombinácia AML a ATM pridaná k membránovým včekom rekonštituovaným z cholesterolu a fosfolipidu s molárnym pomerom zložiek 0,5 : 1 (obrázok 8). X-lúčová difrakčná analýza vzoriek membrán poskytla presvedčivé a reprodukovateľné difraktogramy pre kontrolnú vzorku s obsahom liekov. V neprítomnosti lieku bola celková šírka membránovej dvojvrstvy vrátane hydratačného obalu $5,55 \times 10^{-9}$ nm s vzdialenosťou medzi hlavami fosfolipidov vo vnútri dvojvrstvy $4,4 \times 10^{-9}$ nm. Prídavok obidvoch liekov spoločne v pomere liekov k fosfolipidu 1 : 15 viedol v porovnaní s prídavkom liekov oddelene k malým zmenám v štruktúre a organizácii fosfolipidovej dvojvrstvy (obrázok 8). V prítomnosti kombinácie liekov došlo k zníženiu celkovej šírky membránovej dvojvrstvy vrátane hydratačného obalu na $5,35 \times 10^{-9}$ nm s vzdialenosťou medzi hlavami fosfolipidov vo vnútri dvojvrstvy $4,1 \times 10^{-9}$ nm. Pri prídavku samotného AML a ATM boli šírky membránovej dvojvrstvy $5,48 \times 10^{-9}$ nm a $5,8 \times 10^{-9}$ nm (obrázok 9). Tieto výsledky štrukturálnych štúdií poskytujú priamy dôkaz, že kombinácia týchto látok ovplyvňuje štruktúru lipidových molekúl iným spôsobom, ako pri oddelenom pôsobení liekov.

Priame odčítanie profilov hustoty membránových elektrónov (vzdialenosť verzus elektróny/vzdialenosť³) dokazuje rozdiely v štruktúre lipidov, ktoré nemôžu byť pripísané prítomnosti liekov (obrázok 8). Prídavok kombinácie liekov viedol k výraznému zvýšeniu elektrónovej hustoty spojenej s vonkajším uhl'ovodíkovým jadrom / oblasťou hydratovaných hláv lipidov membránovej dvojvrstvy vo vzdialenosti $\pm 1,1 \times 10^{-9}$ nm až $2,1 \times 10^{-9}$ nm od stredu dvojvrstvy. Toto zvýšenie elektrónovej hustoty v rozsahu $1,0 \times 10^{-9}$ nm je prisudzované rovnovážnemu rozmiestneniu liekov

v membráne. Súčasne s touto zmenou bol pozorovaný efekt neusporiadania spojený s oblasťou centrálného jadra membrány $\pm 1,1 \times 10^{-9}$ nm. Toto zníženie elektrónovej hustoty je dôsledkom zvýšenia molekulárneho objemu vyplývajúceho zo vstupu molekúl lieku do oblasti vysokej molekulárnej hustoty pozdĺž membránového uhľovodíkového jadra/rozhrania s vodou. Z týchto dát je teda možné usudzovať, že vstup kombinácie liekov do membránovej dvojvrstvy ovplyvňuje možnosti intermolekulárneho usporiadania fosfolipidových molekúl podobným spôsobom, aký bol pozorovaný pri znížení obsahu cholesterolu alebo pri zvýšení teploty (Tulenko T. N., Chen M., Mason P. E., Mason R. P., „Physical effects of cholesterol on arterial smooth muscle membranes: Evidence of immiscible cholesterol domains and alterations in bilayer width during atherogenesis.“, *J. Lipid. Res.* 1998, 39 : 947 až 956, Chang H. M., Reitsstter r., Mason R. P., Gruener R., „Attenuation of channel kinetics and conductance by cholesterol: An interpretation using structural stress as a unifying concept.“, *J. Membr. Biol.* 1995, 143 : 51 až 63). Bolo opísané, že takéto zmeny v biofyzikálnych vlastnostiach vedú k obmedzeniu šírenia voľných radikálov matricou lipidovej dvojvrstvy (McLean L. R., Hagaman K. A., „Effect of lipid physical state on the rate of peroxidation of liposomes.“, *Free Radic. Biol. Med.* 1992, 12 : 113 až 119).

Použitie AML a ATM oddelene viedlo v porovnaní s ich kombináciami k rôznym zmenám v membránovej štruktúre z dôvodu špecifických interakcií so stavebnými fosfolipidovými molekulami (obrázok 8 a 9). Zatiaľ čo použitie týchto zlúčenín viedlo k 2×10^{-10} nm alebo 4 % zníženiu ($p < 0,01$) celkovej šírky membrány, viedlo použitie samotného ATM k 5 % zvýšeniu ($p < 0,01$) šírky ($2,5 \times 10^{-10}$ nm) a použitie AML nijako významne neovplyvnilo rozmery membrány ani vzdialenosť medzi hlavami fosfolipidov vo vnútri dvojvrstvy. V porovnaní so samotným AML viedlo použitie ATM k výraznejšiemu zníženiu hustoty uhľovodíkového jadra. Toto pôsobenie na membránovú štruktúru môže prispievať k vyšším antioxidantným schopnostiam ATM v porovnaní s AML. Kombinácia AML a ATM umožnila okrem ich odlišných umiestnení v membráne tiež vytvorenie nového miesta interakcie s lipidovou membránovou dvojvrstvou (obrázok 8).

Predkladaný vynález sa teda vzťahuje na farmaceutický prostriedok obsahujúci amlodipín a atorvastatínový metabolit. Tieto individuálne farmaceuticky aktívne zlúčeniny môžu byť pripravené samostatne alebo ako ich kombinácie, vo

forme solí a dávkovania poskytujúceho maximálnu terapeutickú odpoveď. Táto kombináčn terapia je uren na liečbu patofyziologických prejavov arteriálnych a príbuzných srdcových ochorení zahrujcch okrem iného vysok krvný tlak, hyperlipidémiu, aterosklerózu, arteriosklerózu, ischemick chorobu srdca, infarkt myokardu, celkov zlyhanie srdca, mrtvicu a angínu pectoris. Špecificky je táto kombináčn terapia uren na znizovanie krvného tlaku a systémovej koncentracie lipidov, tak ako s nimi spojených patofyziologických dôsledkov absencie ich regulacie zahrujcm okrem iného cieвне ochabovanie a ukladanie arteriosklerotickho plátu. Pokiaľ sú tieto zlueniny pouit v kombinácii, moe byť ich pôsobenie na rozlin procesy a dsledky spojen s arteriálnymi a príbuznými srdcovými ochoreniami aditívne a/alebo synergick.

Sksenm osobám bude určite zrejme, že pri konkrétnej realizácii jednotlivých konceptov a postupov tu opísaných mou byť vykonan ist úpravy a zmeny, ktoré sú v súlade s podstatou a rámcom predkladaného vynálezu a pripojených patentových nárokov.

Prehľad obrázkov na vykresoch

Obrázok 1 znázorňuje synergick účinky AML a ATM na peroxidáciu lipidov pri nízkej terapeutick koncentracii lieku (100,0 nM) v membrnch obsahujících fyziologick množstvo cholesterolu. X predstavuje percentuálnu inhibíciu peroxidacie lipidov a y predstavuje liečbu amlodipínom (AML), atorvastatnovm metabolitom (ATM) a kombináciou obidvoch zluenn (AML + ATM) s koncentraciou 10 nM. Hodnoty sú myslen pre \pm štandardn odchýlku pre $n = 6$. *** znázorňuje $p < 0,001$ verzus kontroln a in spôsoby liečby.

Obrázok 2 znázorňuje od dávky zvisl antioxidantn účinok kombinacie AML a ATM v širokom rozsahu koncentracie (0,01 až 10,0 μ M). x predstavuje percentuálnu inhibíciu peroxidacie lipidov a y predstavuje liečbu pomocou kombinacie AML a ATM za určených mikromolrnch koncentracií. Hodnoty sú myslen pre \pm štandardn odchýlku pre $n = 6$. *** znázorňuje $p < 0,001$ verzus kontroln a in spôsoby liečby.

Obrázok 3 znázorňuje lepšiu antioxidačnú aktivitu kombinácie AML/ATM ako vitamín E, ako funkciu času pri zhodných koncentráciách (10,0 μM). x predstavuje percentuálnu inhibíciu peroxidácie lipidov a y predstavuje liečbu pomocou kombinácie amlodipínu a atorvastatínového metabolitu (AML + ATM), prázdny stĺpec, alebo pomocou vitamínu E (E), čiarkovaný stĺpec, v oboch prípadoch s koncentráciou 10 μM . Hodnoty sú myslené pre \pm štandardnú odchýlku pre n = 6 až 12. *** znázorňuje p < 0,001 verus kontrolné a iné spôsoby liečby.

Obrázky 4A až 4D znázorňujú miesta odobratia protónov (S1, S2 a S3) pre ATM, ktoré prispievajú k antioxidačnej aktivite (obrázok 4A), spolu s úvahami o stabilizácii rezonančných štruktúr (obrázky 4B až 4D).

Obrázok 5 znázorňuje na porovnanie účinkov antioxidačnej aktivity AML, pokiaľ je skombinovaný s rôznymi inhibítormi HMG-CoA reductázy s rovnakými koncentraciami. X predstavuje percentuálnu inhibíciu peroxidácie lipidov a y predstavuje liečbu pomocou kombinácie amlodipínu a atorvastatínového metabolitu (AML + ATM), tmavý stĺpec, amlodipínu a mevastatínu (AML + M), čiarkovaný stĺpec, alebo pomocou amlodipínu a lovastatínu (AML + L), žiadna inhibícia peroxidácie lipidov, všetky s koncentráciou 1,0 μM . Hodnoty sú myslené pre \pm štandardnú odchýlku pre n = 6 až 12. *** znázorňuje p < 0,001 verus kontrolné a iné spôsoby liečby.

Obrázky 6A až 6B znázorňujú synergické antioxidačné účinky AML a ATM v ľudských LDL vzorkách porovnané s účinkom Trolox C (rozpuštný vitamín E). Na obrázku 6A predstavuje x tvorbu tiobarbiturátových reaktívnych substancií (TBARS) meranú ako absorbanciu pri 532 nm a y predstavuje čas v hodinách. Kontrola je znázornená plnou čiarou s plnými kolieskami, Trolox C (rozpuštný vitamín E) je znázornený bodkovanou čiarou s plnými prevrátenými trojuholníkmi, samotný AML je znázornený čiarkovanou čiarou s prázdnyimi kosoštvorcami, ATM samotný je znázornený prerušovanou čiarou s prázdnyimi kolieskami a kombinácia AML a ATM je znázornená čiarkovanou čiarou s plnými štvorčekmi. Na obrázku 6B predstavuje x tvorbu tiobarbiturátových reaktívnych substancií (TBARS) meranú ako absorbanciu pri 532 nm a y predstavuje pôsobenie amlodipínu (AML), prázdny stĺpec, atorvastatínového metabolitu (ATM), čiarkovaný stĺpec, alebo pomocou kombinácie amlodipínu a atorvastatínového metabolitu (AML + ATM), tmavý stĺpec, pri

koncentracii 3,0 μM . Hodnoty sú myslené pre \pm štandardnú odchýlku. *** znázorňuje $p < 0,001$ verzus kontrolné a iné spôsoby liečby.

Obrázok 7 znázorňuje vypočítané entalpie pre ATM, AML a ich odvodených radikálov.

Obrázky 8A až 8C znázorňujú x-lúčovú difrakčnú analýzu interakcie samotných AML a ATM a ich kombinácie s lipidovou membránou. X predstavuje relatívnu hustotu elektrónov a y predstavuje vzdialenosť v nm od stredu lipidovej dvojvrstvy. Vo všetkých troch grafoch znamená plná čiara kontrolu. Na obrázku 8A je ako bodkovaná čiara znázornený AML, na obrázku 8B je ako bodkovaná čiara znázornený ATM a na obrázku 8C je ako bodkovaná čiara znázornená kombinácia AML a ATM. Tmavé oblasti v každom grafe predstavujú rozdiely v elektrónových hustotách medzi kontrolnými a stanovenými profilmi elektrónovej hustoty.

Obrázok 9 znázorňuje pomocou x-lúčovej difrakčnej analýzy vplyv samotného AML a ATM na rozmery membránovej dvojvrstvy. X predstavuje zmeny v šírke membrány v nm a y predstavuje pôsobenie AML – tmavý stĺpec, ATM – čiarovaný stĺpec a kombinácia AML a ATM – čiarovaný stĺpec. Hodnoty sú myslené pre \pm štandardnú odchýlku. *** znázorňuje $p < 0,0001$ verzus kontrolné a iné spôsoby liečby.

Dilinoleoylfosfatidylcholin (DPLC), 1-palmitoyl-2-oleoylfosfatidylcholin (POPC) a neesterifikovaný cholesterol boli získané od firmy Avati Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL) a udržiavané pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alikvotné podiely LDL (L-2139) z ľudskej plazmy boli získané od firmy Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Kolóny Sephadex G-25 M (PD-10) boli zakúpené od firmy Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ). Amlodipínbesylát bol získaný od firmy Pfizer Central Research (Groton, CT) a hydroxy metabolit atorvastatínu bol získaný od firmy Parke Davis (Ann Arbor, MI). Vitamín E, Trolox (analóg Vitamínu E), lovastatín a mevastatín boli zakúpené od firmy Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

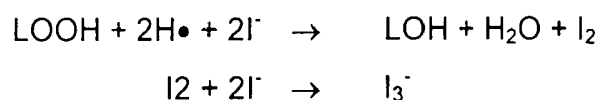
Priklady uskutočnenia vynálezu

Priklad 1: Stanovenie peroxidácie membránových lipidov

Samostatné a kombinované od dávky závislé aktivity týchto zlúčenín boli stanovené v membránach obohatených PUFA, pripravených z cholesterolu a fosfolipidu v molárnom pomere 0,5 : 1 (Mason R. P., Walter M. F., Trumbore M. W., Olmstead Jr. E. G., Mason P. E., „Membrane antioxidant effects of the charged dihydropyridine calcium antagonist amlodipine.“, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1990, 31 : 275 až 281). Lipidy použité na prípravu vzoriek (dilinoleoylfosfatidylcholín a cholesterol) boli rozpustené v chloroforme (HPLC čistota, 25,0 mg/ml). Do sklenených skúmaviek (13 x 100 mm) bolo pridaný alikvotný podiel lipidov (1,0 mg) a chloroform bol odstránený pomocou voľného odparovania na miske pod ochrannou N₂ atmosférou. Lipidy boli vysušené počas absencie a v prítomnosti lieku(ov) rozpustených v etanole. Zvyšky rozpúšťadla boli odstránené vo vákuu a vzorky boli chránené pred svetlom. Membránové vaky vytvorené pri laboratórnej teplote rýchlym miešaním vysušených lipidov v 1,0 ml fyziologického roztoku s prídavkom pufru HEPES (0,5 mM a 154,0 mM NaCl, pH 7,2). Konečná koncentrácia fosfolipidov bola 1,0 mg/ml pufru a konečná koncentrácia lieku bola v rozsahu od 10,0 nM do 10,0 μM.

Peroxidácia membránových lipidov bola, ako bolo predtým detailnejšie opísané, vykonaná pri 37 °C v miešanom vodnom kúpeli bez prídavku exogénnych stimulantov (Mason R. P., Walter M. F., Trumbore M. W., Olmstead Jr. E. G., Mason P. E., „Membrane antioxidant effects of the charged dihydropyridine calcium antagonist amlodipine.“, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1990, 31 : 275 až 281). Po rôznych časových intervaloch (24, 48, 65, 72h) bol odobratý alikvotný podiel vzorky lipidov (10 až 100 μl) a potom sa k vzorke na zastavenie peroxidačnej reakcie ihneď pridalo 25 μl 5,0 mM kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA) a 20 μl 35,0 mM butylovaného hydroxytoluénu (BHT).

Stupeň peroxidácie membránových lipidov bol zmeraný pomocou CHOD-jodidovej analýzy, ako bolo predtým podrobnejšie opísané (El-Saadani M., Esterbauer H., el-Sayed M., Gober M., Nassar A. Y., Jurgens G., „A spectroscopic assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent.“, *J. Lipid. Res.* 1989, 30 : 627 až 630). Množstvo I₃⁻ bolo stanovené podľa nasledujúcej reakcie, kde L reprezentuje fosfolipidovú molekulu:



Po rôznych časových intervaloch bol odobratý alikvotný podiel membránovej vzorky a potom bol pridaný k 1,0 ml farebného CHOD činidla (E. M. Science, Gibbstown, NJ), ktorý obsahoval 20,0 μM BHT, 24,0 μM EDTA a 0,2 % Triton-X. Vzorka bola potom zabalená do fólie a nechaná 2 hodiny inkubovať v neprítomnosti svetla a nakoniec bola zmeraná absorbanca vzorky pri 365 nm ($\epsilon = 2,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Ako slepý pokus bol okrem vzorky meraná v triplikátoch vzorka obsahujúca 76,7 μl 0,652 mM HEPES, 20 μl 5,0 mM EDTA a 33 μl DDI vody. Stupeň peroxidácie membránových lipidov bol meraný v triplikátoch pre každú koncentráciu lieku a porovnaný s kontrolnými vzorkami, ktoré neobsahovali liek. Štatistická významnosť týchto experimentov bola vypočítaná pomocou nepárového t-testu. Významnosť bola prijateľná pri $p < 0,05$.

Príklad 2: Stanovenie oxidácie LDL

Okrem stanovenia na lipidových membránach bola stanovená aktivita AML a ATM na ľudských LDL. EDTA obsiahnutá vo vzorkách LDL bola odstránená pomocou gélovej filtrácie na filtračných kolónach PD-10 Sephadexu G25-M s použitím PBS (premytým dusíkom) ako eluentu. Vzorky LDL (50 μg proteínu / ml) boli potom preinkubované pri absencii alebo v prítomnosti lieku (3,0 μM) v čase 30 minút pri 37 °C. Oxidácia LDL bola potom indukovaná prídavkom 10,0 μM CuSO_4 . Časový priebeh oxidácie LDL pomocou tvorby TBARS bol zaznamenávaný v čase 6 hodín pri 37 °C (Mak I. T., Kramer J. H., Weglicki W. B., „Potentiation of free radical-induced lipid peroxidative injury to sarcolemmal membranes by lipid amphiphiles.L, *J. Biol. Chem.* 1986, 261 : 1153 až 1157). Oxidácia LDL stanovená pomocou TBARS metódy bola opísaná sigmoidálnou kinetickou krivkou s počiatočnou lag fázou nasledovanou silnou propagáciou a konečnou fázou plató (Esterbauer H., Gebicky J., Puhl H., Jurgens G., „The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL.“, *Free Radic. Biol. Med.* 1992, 13 : 341 až 390). Obsah proteínov v LDL bol stanovený pomocou analytickej súpravy Coomassie Protein Plus od firmy Pierce Chemical („A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.“, *Anal. Biochem.* 1976, 72 : 248 až 254).

Príklad 3: X-lúčová difrakčná analýza pod malým uhlom

X-lúčová difrakčná analýza pod malým uhlom bola použitá na priamy výskum molekulárnych membránových interakcií AML a ATM. Lipidy použité pre tieto vzorky (1-palmitoyl-2-oleylfosfatidylcholín a cholesterol) boli rozpustené v chloroforme (HPLC čistota, 10,0 mg/ml). Membránové vačky boli vytvorené z týchto lipidov pomocou rovnakej metódy, ktorá je opísaná v peroxidačných experimentoch. Konečná koncentrácia fosfolipidov bola 5,0 mg/ml pufru a molárny pomer lieku k fosfolipidu bol 1 : 15. Membránové vzorky boli pre difrakčnú analýzu pripravené pomocou centrifugácie, ako bolo už opísané skôr (Chester D. W., Herbette L. G., Mason R. P., Joslyn A. F., Triggle D. J., Koppel D. E., „Diffusion of dihydropyridine calcium channel antagonists in cardiac sarcolemmal lipid multibilayers.“, *Biophys. J.* 1987, 52 : 1021 až 1030). Vačky boli vložené do sedimentačných baniek, ktoré obsahovali podklad z hliníkovej fólie. Vačky boli sedimentované v rotori SW-28 (Beckman Instruments Fullerton, CA) pri 35 000 g v čase 1,5 hodiny pri 5 °C. Po skončení centrifugácie bol supernatant oddelený od peliet a vzorky boli pripevnené na sklenenom nadstavci. Vzorky boli umiestnené do uzavretých nádob na kontrolu relatívnej vlhkosti a teploty počas difrakčných experimentov, ako bolo skôr podrobnejšie opísané (Chester D. W., Herbette L. G., Mason R. P., Joslyn A. F., Triggle D. J., Koppel D. B., „Diffusion of dihydropyridine calcium channel antagonists in cardiac sarcolemmal lipid multibilayers.“, *Biophys. J.* 1987, 52 : 1021 až 1030).

X-lúčové difrakčné experimenty boli vykonané meraním vzoriek pomocou kolimovaného žiariča, cez nikel filtrovaných monochromatických x-lúčov ($Cu\alpha$ 1,54 x 10⁻¹⁰ nm) produkovaných pomocou vysoko výkonného rotačného anódového mikroohniskového generátora (Rigaku Rotaflex RU-200, Danvers, MA). Dráha lúču s pevnou geometriou pozostávala z jediného niklom pokrytého Franksovho zrkadla definujúceho čiarový zdroj, kde K_α a K_β nie sú rozlíšené. Difrakčné dáta boli zhromaždené na jednorozmernom polohovo citlivom elektronickom detektore (Innovative Technologie, Newburyport, MA) umiestnenom vo vzdialenosti 150 mm od vzorky. Každý poludníkový difrakčný pik bol korigovaný podľa Lorentza a podľa pozadia, ako už bolo predtým opísané (Mason R. P., Gonye G. E., Chester D. W., Herbette L. G., „Partitioning and location of Bay K 8644, 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonist, in model and biological membranes.“, *Biophys. J.* 1989, 55 : 769

až 778). Fázy pre dáta štvrtého rádu boli určené pomocou bobtnavej analýzy (Moody M. F., „X-ray diffraction pattern of nerve myelin: A method for determining the phases.“, *Science* 1963, 142 : 1173 až 1177). Fourierove transformácie dát boli vykonané pomocou softwaru Origin (Microcal Software, Nothampton, MA).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prostriedok, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje:
 - a) účinné množstvo amlodipínu,
 - b) účinné množstvo hydroxylovaného atorvastatínového metabolitu (ATM),
a
 - c) farmaceuticky prijateľné pomocné látky, kde účinné množstvá amlodipínu a ATM sú postačujúce na významnú inhibíciu peroxidácie lipidov v ľudských nízkohustotných lipoproteínoch alebo lipidových membránach a na dosiahnutie terapeutického efektu.
2. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipínom je terapeutický derivát amlodipínu.
3. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 2, **vyznačujúci sa tým**, že terapeuticky účinným derivátom amlodipínu je amlodipínbesylát.
4. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje riziko arteriálnej a príbuznej srdcovej choroby.
5. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 4, **vyznačujúci sa tým**, že arteriálna a srdcová choroba je vybratá zo skupiny zahrňujúcej vysoký krvný tlak, hyperlipidémiu, aterosklerózu, arteriosklerózu, ischemickú chorobu srdca, infarkt myokardu, celkové zlyhanie srdca, mŕtvicu a angínu pectoris.
6. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje krvný tlak.
7. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 6, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje krvný tlak na úroveň zodpovedajúcu zníženému riziku arteriálnej a príbuznej choroby.

8. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 6, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje krvný tlak na úroveň štatisticky zhodnú s úrovňou prirodzenou.
9. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje systémové koncentrácie lipidov.
10. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 9, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje systémové koncentrácie lipidov na úrovne zodpovedajúce zníženému riziku arteriálnej a príbuznej srdcovej choroby.
11. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 9, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje systémové koncentrácie lipidov na úrovne štatisticky zhodné s prirodzenými úrovňami.
12. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov.
13. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne zodpovedajúce zníženému riziku arteriálnej a srdcovej choroby.
14. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne štatisticky zhodné s úrovňami prirodzenými.
15. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že súčasne znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov.
16. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 15, **vyznačujúci sa tým**, že súčasne znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne zodpovedajúce zníženému riziku arteriálnej a príbuznej srdcovej choroby.

17. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 15, **vyznačujúci sa tým**, že súčasne znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne štatisticky zhodné s úrovňami prirodzenými.
18. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že synergicky znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov.
19. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že synergicky znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne zodpovedajúce zníženému riziku arteriálnej a príbuznej choroby.
20. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 18, **vyznačujúci sa tým**, že synergicky znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne štatisticky zhodné s úrovňami prirodzenými.
21. Farmaceutický prostriedok podľa ktoréhokoľvek z nárokov 15 až 20, **vyznačujúci sa tým**, že súčasné zníženie krvného tlaku a systémových koncentrácií lipidov je aspoň čiastočne spôsobené zníženou oxidáciou lipidov.
22. Farmaceutický prostriedok, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje:
 - a) terapeuticky účinné množstvo kombinácie amlodipínu a hydroxylovaného atorvastatínového metabolitu, a
 - b) farmaceuticky prijateľné pomocné látky, ktoré znižujú krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov, čo je aspoň čiastočne spôsobené zníženou oxidáciou lipidov.
23. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 22, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipínom je terapeuticky účinný derivát amlodipínu.
24. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 23, **vyznačujúci sa tým**, že terapeuticky účinným derivátom amlodipínu je amlodipínbesylát.
25. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 22, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje riziko arteriálnej a príbuznej srdcovej choroby.

26. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 25, **vyznačujúci sa tým**, že arteriálna a príbuzná srdcová choroba je vybratá zo skupiny zahrňujúcej vysoký krvný tlak, hyperlipidémiu, aterosklerózu, arteriosklerózu, ischemickú chorobu srdca, infarkt myokardu, celkové zlyhanie srdca, mŕtvicu a angínu pectoris.
27. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 22, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne zodpovedajúce zníženému riziku arteriálnej a príbuznej srdcovej choroby.
28. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 22, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne štatisticky zhodné s úrovňami prirodzenými.
29. Spôsob liečenia arteriálnej a príbuznej srdcovej choroby a výrazného obmedzenia tvorby lipidových peroxidov v LDL a lipidových membránach, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje podávanie terapeuticky účinného množstva kombinácie amlodipínu a hydroxylovaného atorvastatínového metabolitu.
30. Spôsob podľa nároku 29, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipínom je terapeuticky účinný derivát amlodipínu.
31. Spôsob podľa nároku 30, **vyznačujúci sa tým**, že terapeuticky účinným derivátom amlodipínu je amlodipínbesylát.
32. Spôsob podľa nároku 29, **vyznačujúci sa tým**, že arteriálna a príbuzná srdcová choroba je vybratá zo skupiny zahrňujúcej vysoký krvný tlak, hyperlipidémiu, aterosklerózu, arteriosklerózu, ischemickú chorobu srdca, infarkt, celkové zlyhanie srdca, mŕtvicu a angínu pectoris.
33. Spôsob podľa nároku 29, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané ako spoločný liek.

34. Spôsob podľa nároku 29, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané ako samostatné lieky.
35. Spôsob podľa nároku 29, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané v rovnakom čase.
36. Spôsob podľa nároku 29, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané v rôznom čase.
37. Spôsob výrazne obmedzujúci oxidáciu lipidov a znižujúci krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje podávanie na tieto ciele terapeuticky účinného množstva amlodipínu a hydroxylovaného atorvastatínového metabolitu.
38. Spôsob podľa nároku 37, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipínom je terapeuticky účinný derivát amlodipínu.
39. Spôsob podľa nároku 38, **vyznačujúci sa tým**, že terapeuticky účinným derivátom amlodipínu je amlodipínbesylát.
40. Spôsob podľa nároku 37, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané ako spoločný liek.
41. Spôsob podľa nároku 37, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané ako samostatné lieky.
42. Spôsob podľa nároku 37, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané v rovnakom čase.
43. Spôsob podľa nároku 37, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané v rôznom čase.

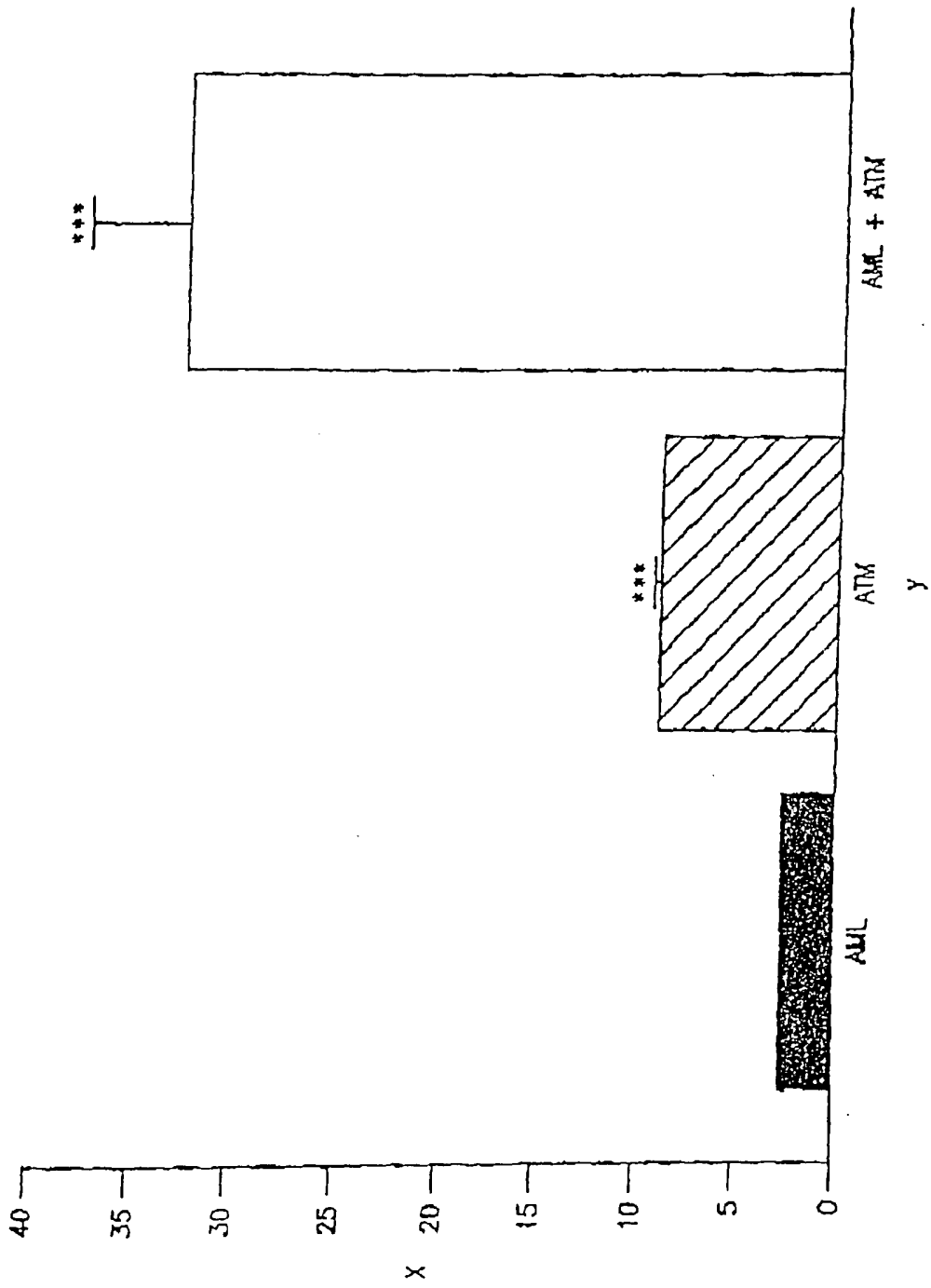
44. Spôsob podľa nároku 37, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne zodpovedajúce zníženému riziku arteriálnej a príbuznej srdcovej choroby.
45. Spôsob podľa nároku 37, **vyznačujúci sa tým**, že arteriálna a príbuzná srdcová choroba je vybratá zo skupiny zahrňujúcej vysoký krvný tlak, hyperlipidémiu, aterosklerózu, arteriosklerózu, ischemickú chorobu srdca, infarkt, celkové zlyhanie srdca, mŕtvicu a angínu pectoris.
46. Spôsob podľa nároku 37, **vyznačujúci sa tým**, že znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne štatisticky zhodné s úrovňami prirodzenými.
47. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z nárokov 37 až 46, **vyznačujúci sa tým**, že zníženie krvného tlaku a systémových koncentrácií lipidov je aspoň čiastočne spôsobené zníženou oxidáciou lipidov.
48. Spôsob synergicky obmedzujúci oxidáciu lipidov, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje podávanie terapeuticky účinného množstva kombinácie amlodipínu a hydroxylovaného atorvastatínového metabolitu.
49. Spôsob podľa nároku 48, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipínom je terapeutický účinný derivát amlodipínu.
50. Spôsob podľa nároku 49, **vyznačujúci sa tým**, že terapeuticky účinným derivátom amlodipínu je amlodipínbesylát.
51. Spôsob podľa nároku 48, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané ako spoločný liek.
52. Spôsob podľa nároku 48, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané ako samostatné lieky.

53. Spôsob podľa nároku 48, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané v rovnakom čase.
54. Spôsob podľa nároku 48, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipín a atorvastatínový metabolit sú podávané v rôznom čase.
55. Spôsob podľa nároku 48, **vyznačujúci sa tým**, že farmaceutický prostriedok znižuje oxidáciu lipidov na úroveň zodpovedajúcu zníženému riziku arteriálnej a príbuznej srdcovej choroby.
56. Spôsob podľa nároku 48, **vyznačujúci sa tým**, že arteriálna a príbuzná srdcová choroba je vybratá zo skupiny zahrňujúcej vysoký krvný tlak, hyperlipidémiu, aterosklerózu, arteriosklerózu, ischemickú chorobu srdca, infarkt myokardu, celkové zlyhanie srdca, mŕtvicu a angínu pectoris.
57. Farmaceutický prostriedok, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje:
- terapeuticky účinné množstvo amlodipínu,
 - terapeuticky účinné množstvo hydroxylovaného atorvastatínového metabolitu, a
 - farmaceuticky účinné pomocné látky
58. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 57, **vyznačujúci sa tým**, že amlodipínom je terapeuticky účinný derivát amlodipínu.
59. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 57, **vyznačujúci sa tým**, že terapeuticky účinným derivátom amlodipínu je amlodipínbesylát.
60. Spôsob znižujúci krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje podávanie terapeuticky účinného množstva kombinácie amlodipínu a hydroxylovaného atorvastatínového metabolitu.
61. Spôsob podľa nároku 60, **vyznačujúci sa tým**, že farmaceutický prostriedok synergicky znižuje krvný tlak a systémové koncentrácie lipidov na úrovne štatisticky zhodné s úrovňami prirodzenými.

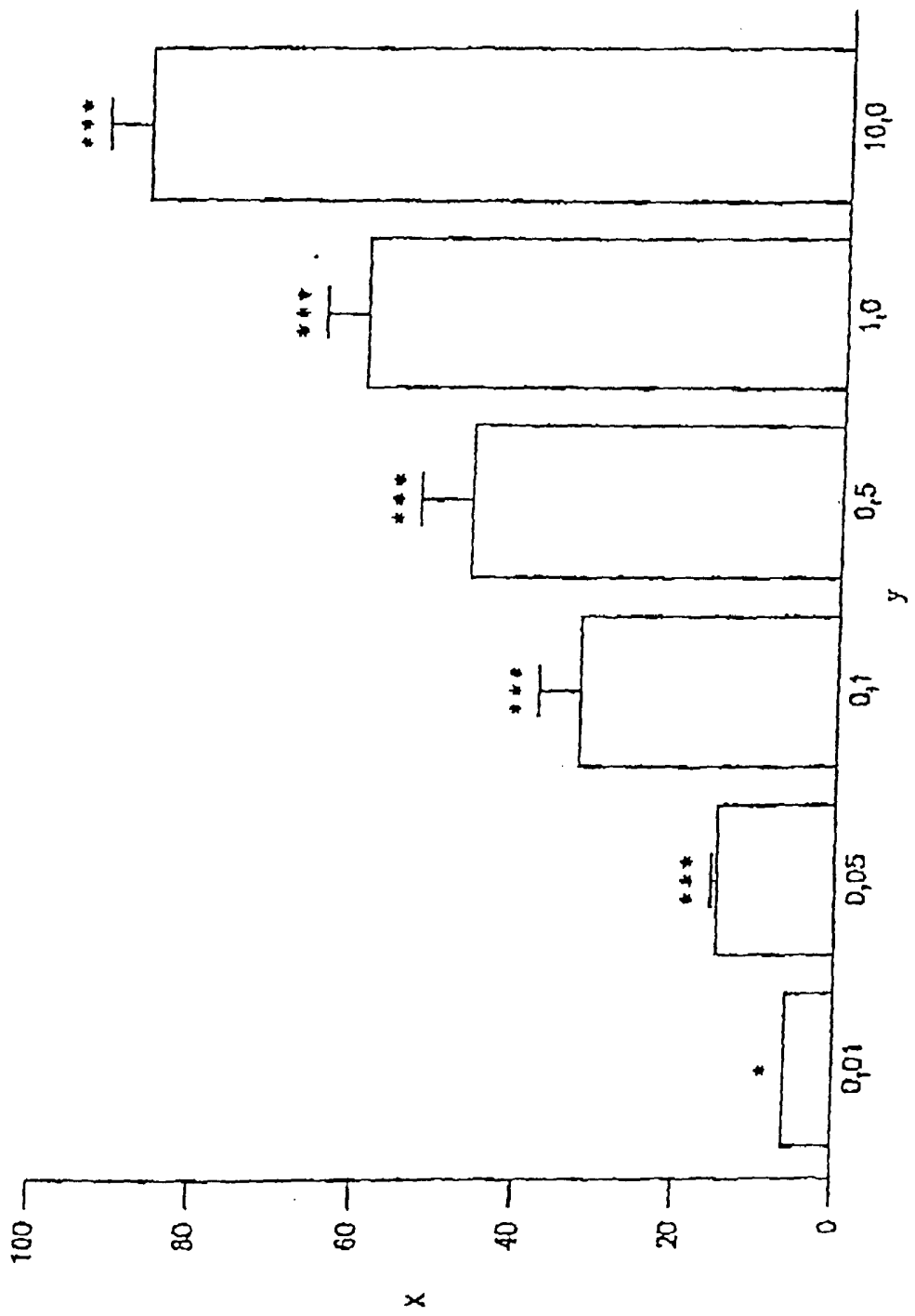
62. Spôsob podľa nároku 60, **vyznačujúci sa tým**, že synergické zníženie krvného tlaku a systémových koncentrácií lipidov je aspoň čiastočne spôsobené zníženou oxidáciou lipidov.

1/13

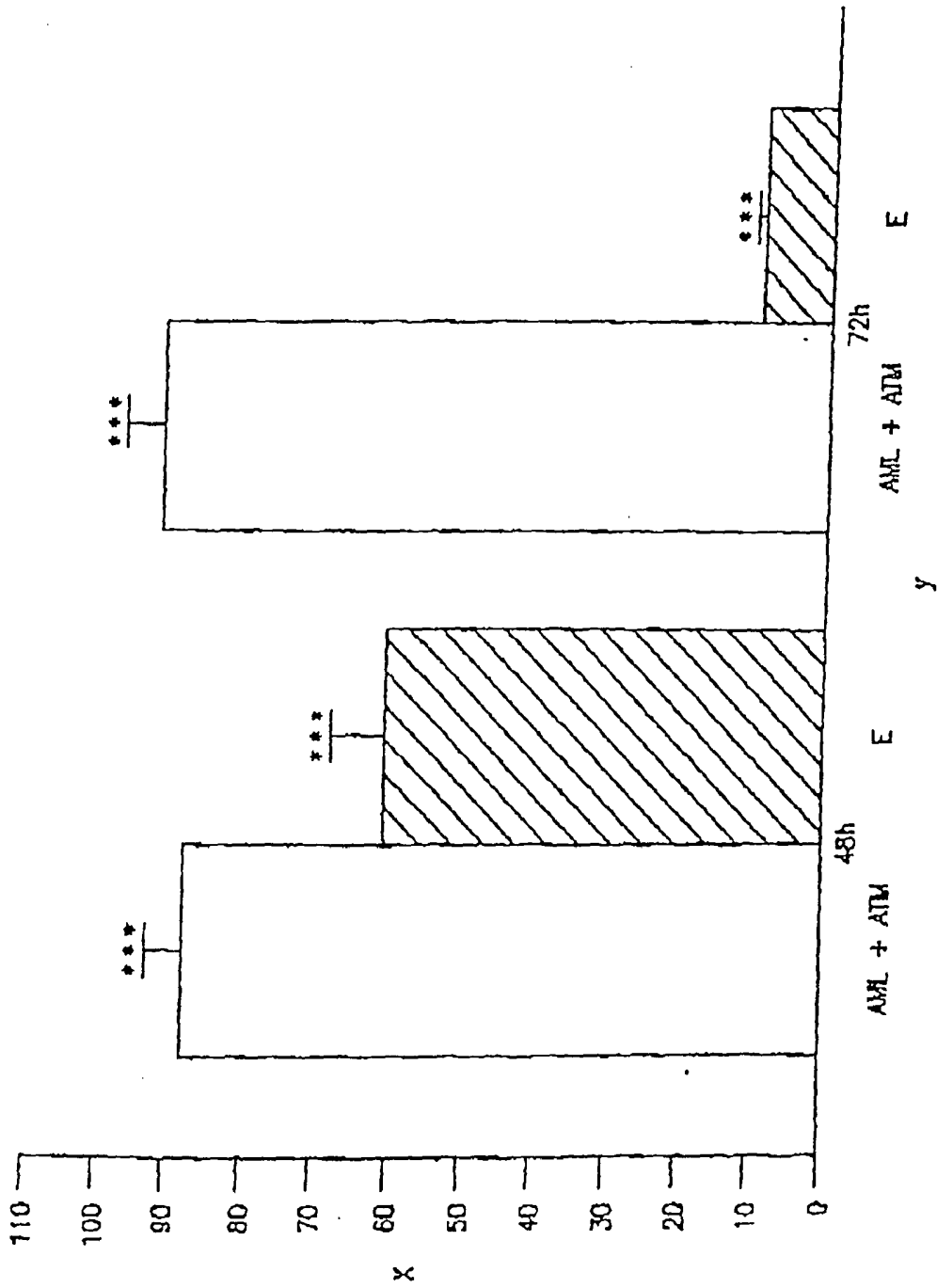
Obr. 1

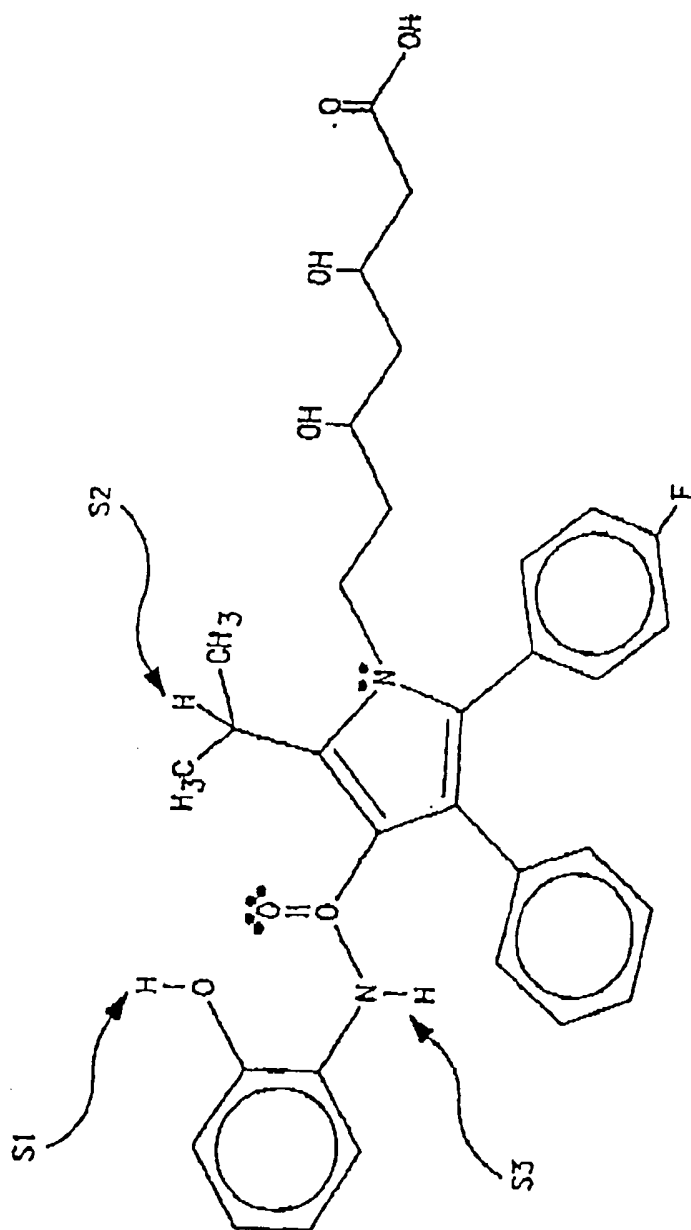


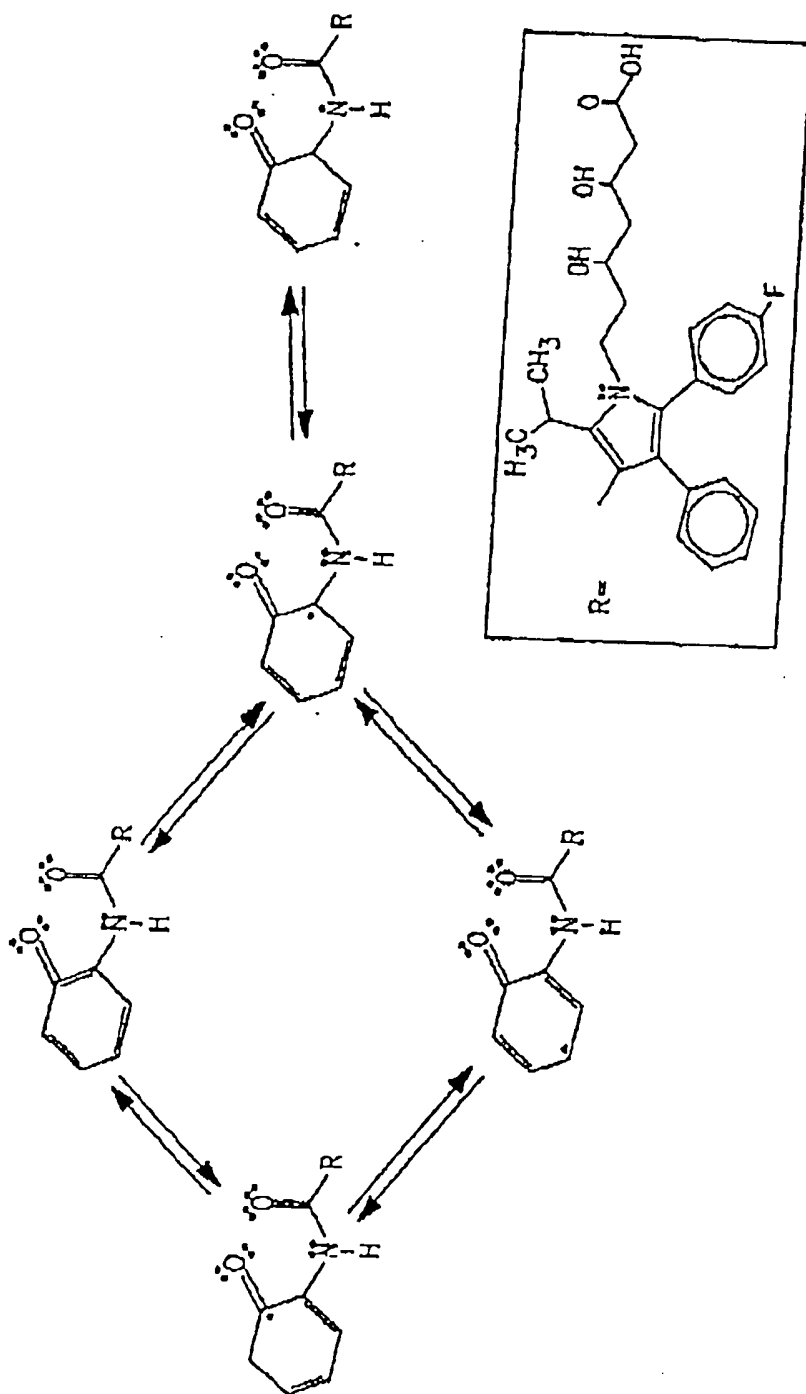
Obr. 2



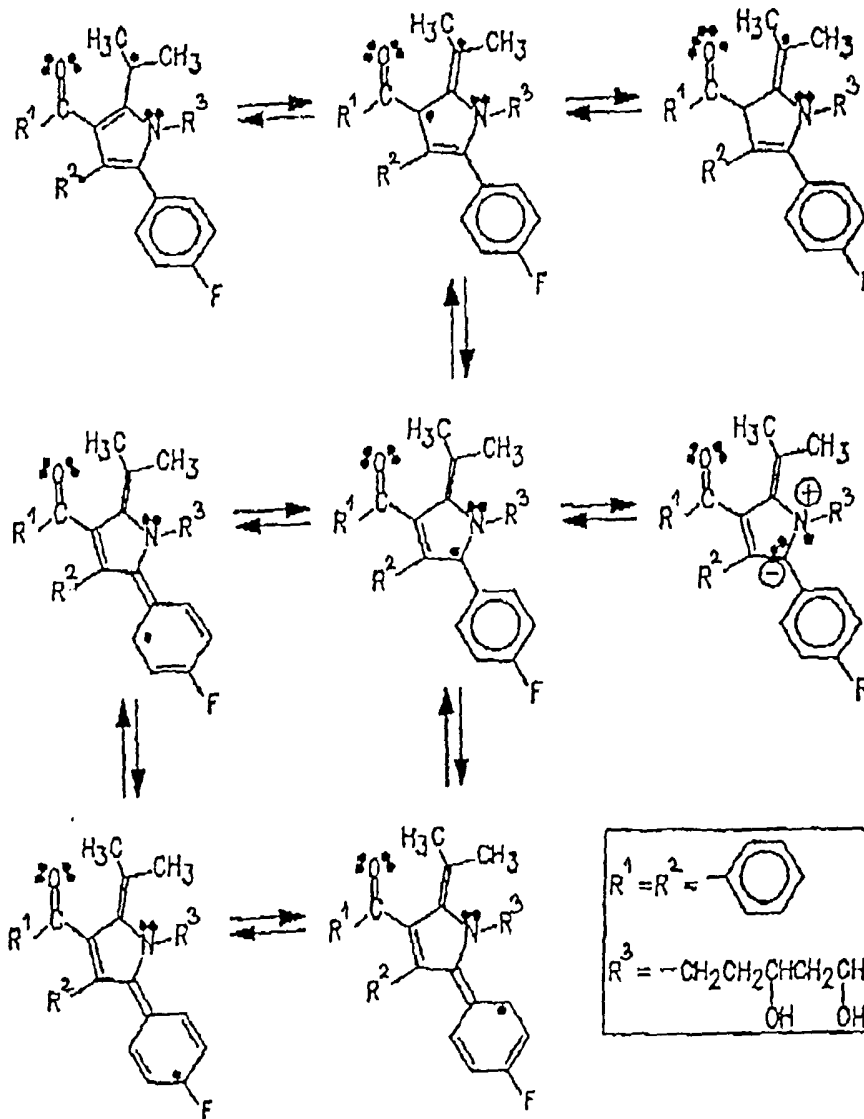
Obr. 3

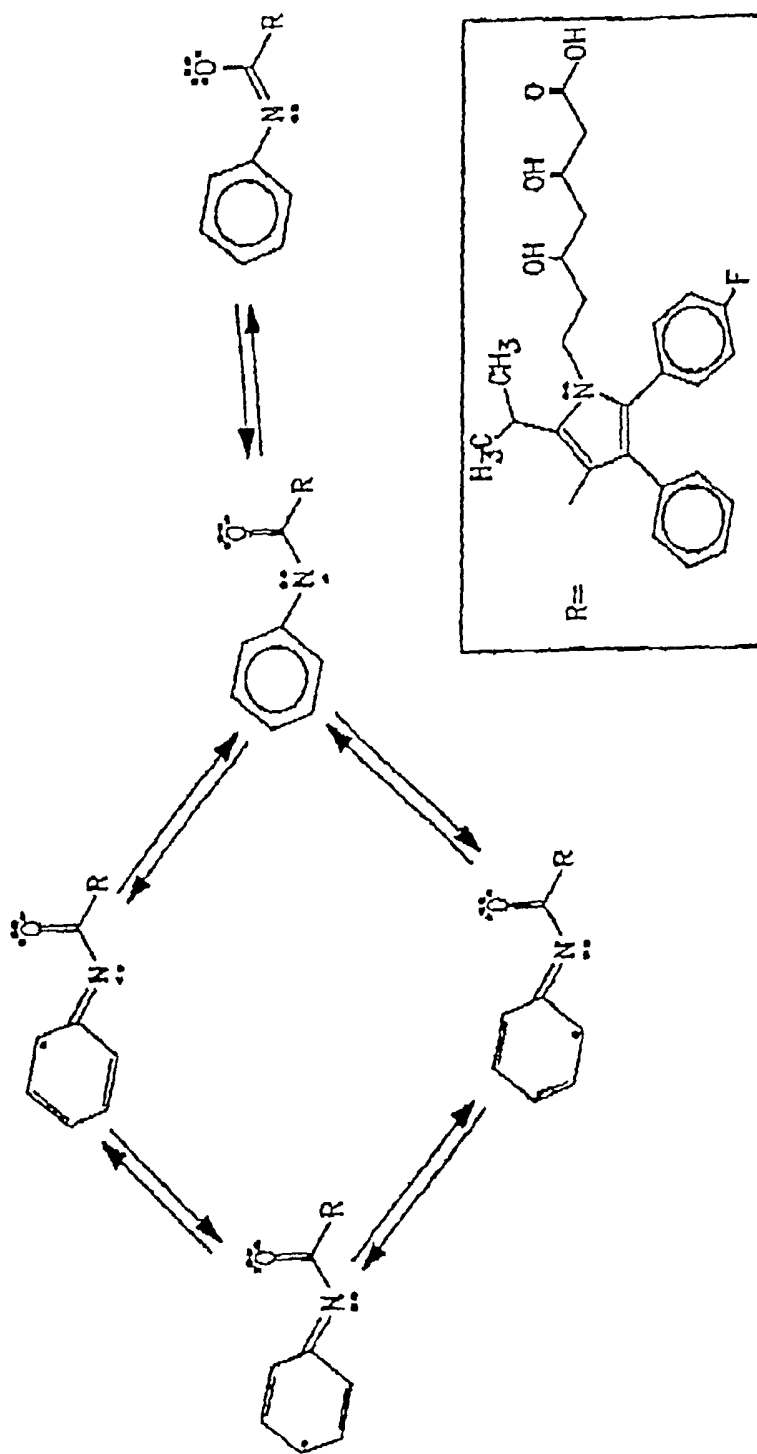


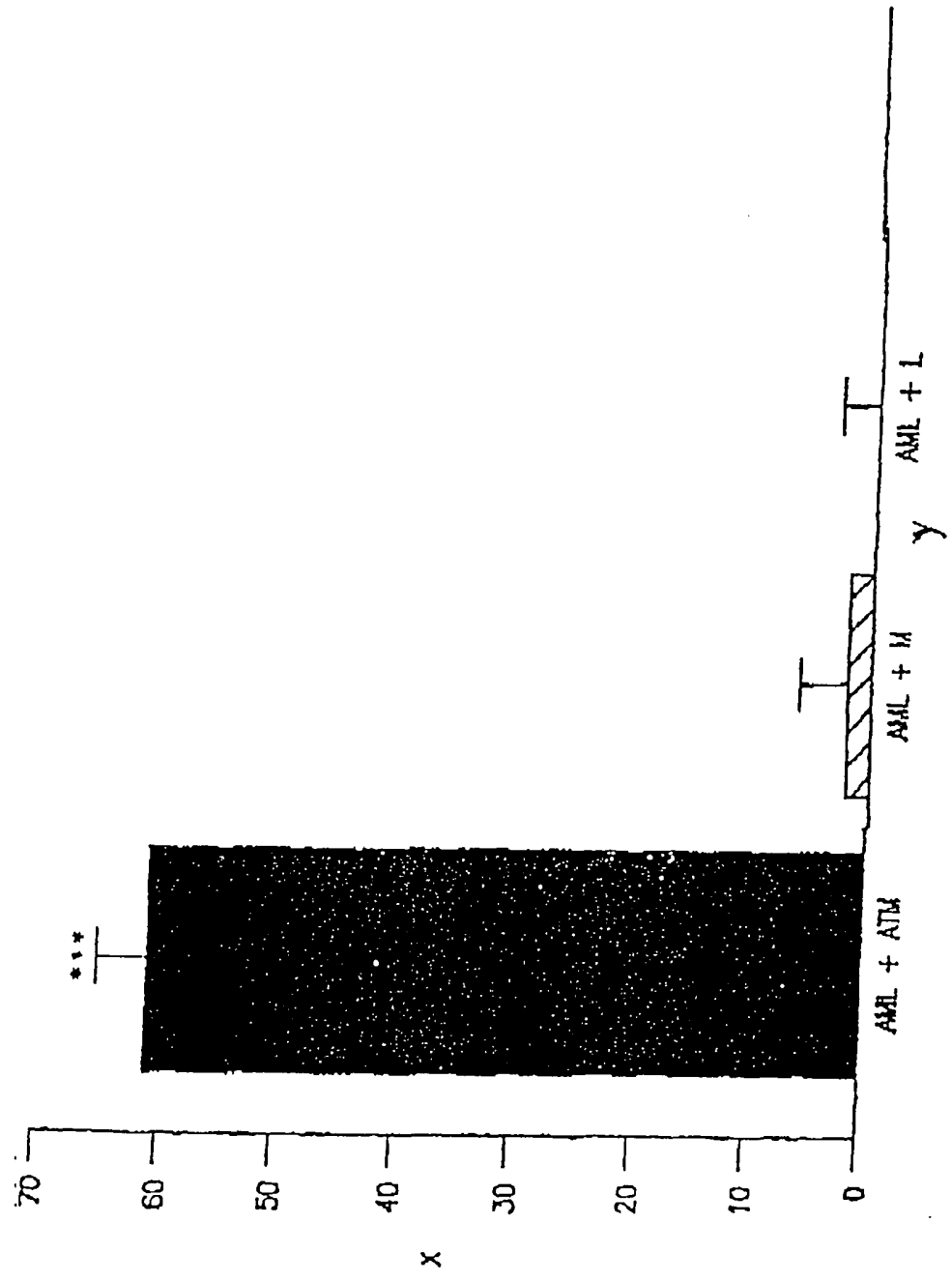




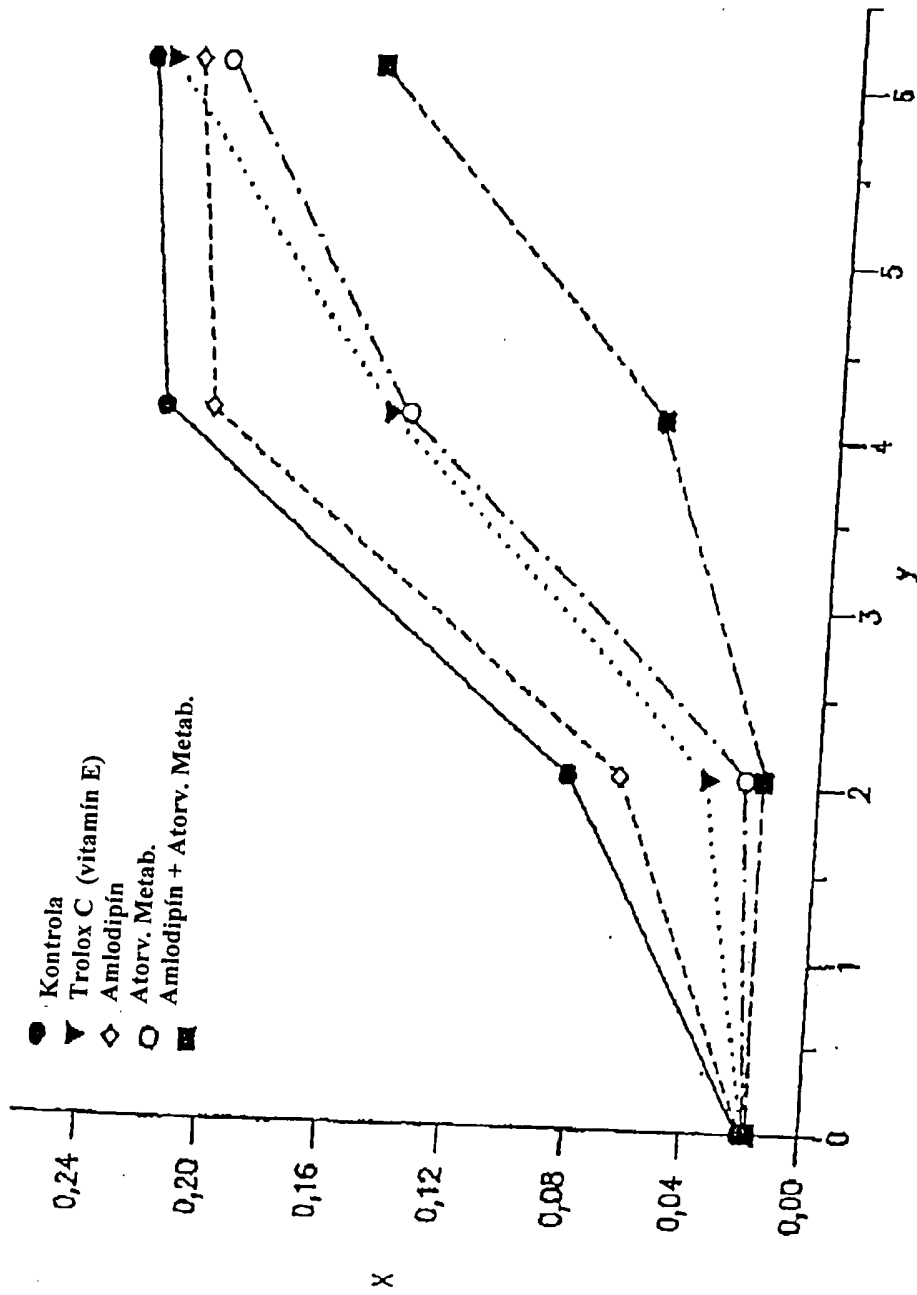
6/13
Obr. 4C



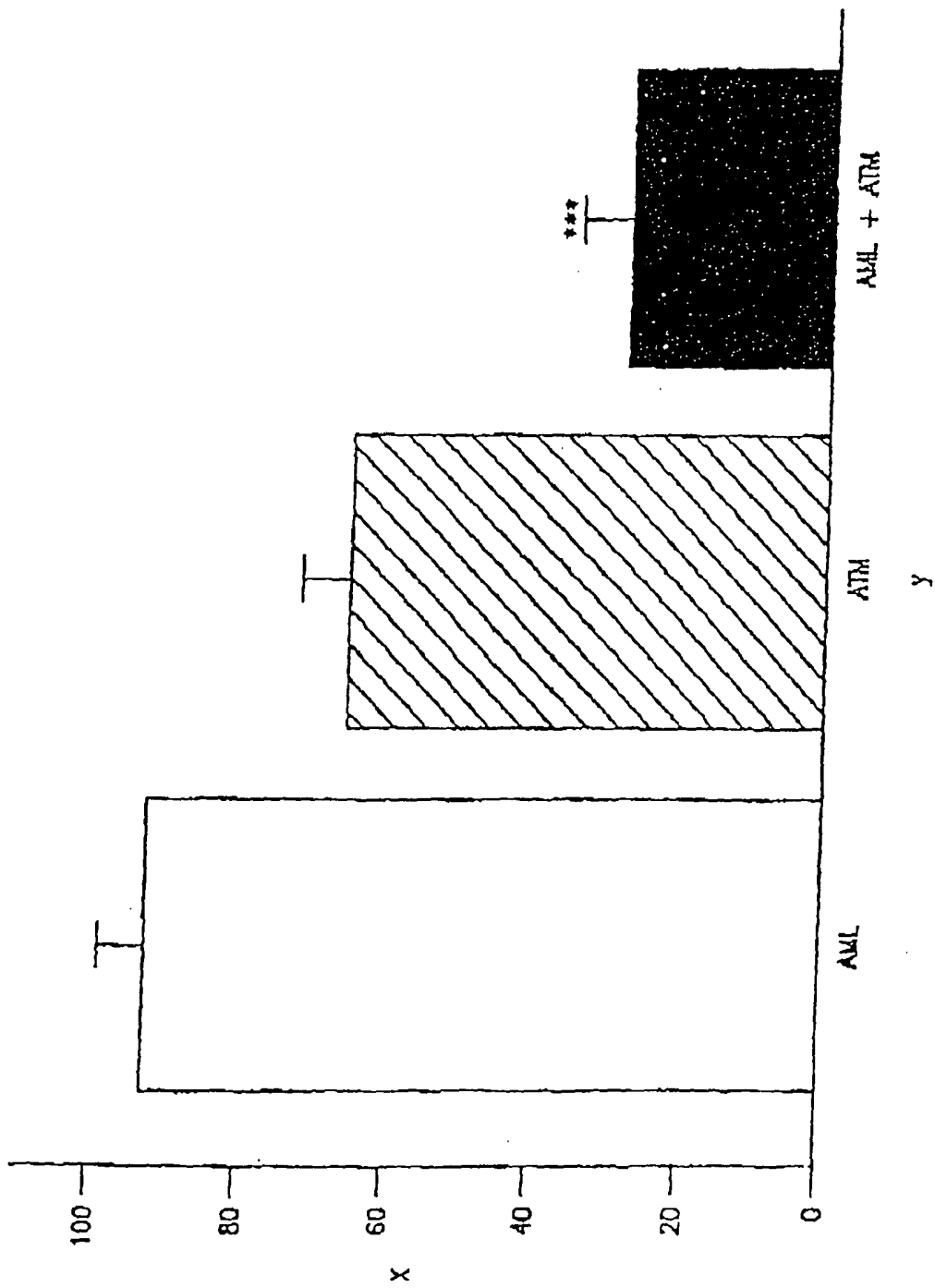




Obr. 6A



10/13
Obr. 6B



Obr. 7

Výpočet entalpie pre tvorbu radikálov atorvastatínového metabolitu*

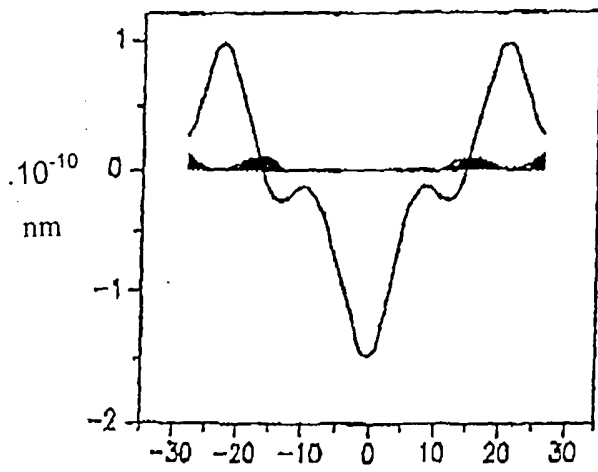
Molekula	ΔH_f (kJ/mol)
Uhlíkový radikál	- 875,71
Kyslíkový radikál	- 835,54
Dusíkový radikál	- 804,86
Metylový radikál	- 808,87
Fenylový radikál	- 735,89
Uhlíkový/kyslíkový diradikál	- 761,05
Uhlíkový/dusíkový diradikál	- 728,37

*Čím je nižšia (tj. zápornejšia) hodnota ΔH_f , tým ľahšie je možné odtrhnúť H atóm z tejto častice.

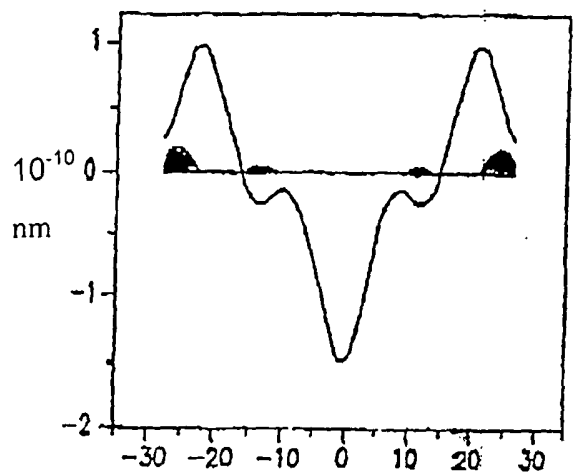
Vypočítané entalpie pre tvorbu amlodipínových radikálov*

Molekula	ΔH_f (kJ/mol)
Uhlíkový radikál	- 686,69
Dusíkový radikál	- 619,76

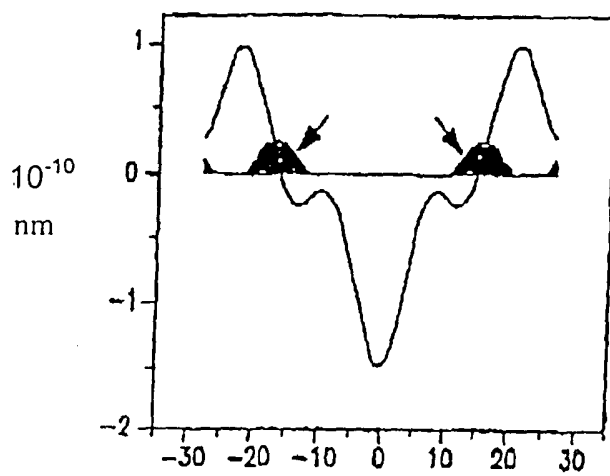
*Čím je nižšia (tj. zápornejšia) hodnota ΔH_f , tým ľahšie je možné odtrhnúť H atóm z tejto častice.



Obr. 8A



Obr. 8B



Obr. 8C

